

2001 A – 2006 B

397714142

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FLUJO DE AGUA, DENSIDAD DE
SIEMBRA Y TRATAMIENTO PROFILÁCTICO DURANTE EL PERÍODO DE
INCUBACIÓN EN HUEVOS DEL PARGO FLAMENCO *Lutjanus guttatus*
(Steindachner, 1869)**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

LANDY ELIZABETH MUÑOZ MEZA

Las Agujas, Zapopan, Jal., Enero del 2009



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1325 C. C. BIOLOGÍA

C. Landy Elizabeth Muñoz Meza

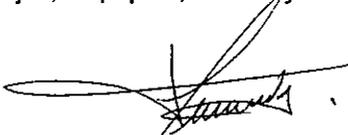
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido **aprobado** su tema de titulación en la modalidad de: Tesis e Informes Opción Tesis: con el título: “Evaluación del efecto de flujo de agua, densidad de siembra y tratamiento profiláctico durante el periodo de incubación en huevos del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869)” para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **M.C. Leonardo Ibarra Castro** y como asesor al **Dr. Eduardo Rios Jara**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan., 9 de mayo del 2008.


DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

P. A.

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de: Tesis e informes, opción: Tesis, con el título: **“Evaluación del efecto de flujo de agua, densidad de siembra y tratamiento profiláctico durante el periodo de incubación del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869)”** que realizó la pasante **Landy Elizabeth Muñoz Meza**, con número de código 397714142 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las agujas, Zapopan., Agosto/2008.

Mc. Leonardo Ibarra Castro
 Director de tesis

Dr. Eduardo Ríos Jara
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Manuel Guzmán Arroyo Sinodal titular		12/Dic/08
Mc. Agustín Camacho Rodríguez Sinodal titular		27/08/08
Dr. Ernesto López Uriarte Sinodal titular		
Dr. Eduardo Juárez Carrillo Sinodal suplente		27/Ago/08

Este trabajo de investigación fué realizado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán, Sinaloa (CIAD). En el laboratorio de genética y reproducción de peces marinos.

Dr. Leonardo Ibarra Castro
Director de tesis

Dr. Eduardo Ríos Jara
Asesor interno

Dr. Manuel Guzmán Arroyo
Sinodal titular

M.c. Agustín Camacho Rodríguez
Sinodal titular

Dr. Ernesto López Uriarte
Sinodal titular

Dr. Eduardo Juárez Carrillo
Sinodal suplente

DECLARACION DEL AUTOR

Se permiten citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos. Se deberá contar con la autorización escrita del rector del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

Landy Elizabeth Muñoz Meza

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante en mi vida, darme salud y por su presencia en los momentos críticos y de desesperación.

A toda mi familia que estuvo involucrada directa e indirectamente en el desarrollo de mi carrera.

A mi madrina Laura y a Angélica por presionarme y darme el último empujón para que terminara la tesis.

A mi director de tesis el Dr. Leonardo Ibarra Castro que siempre mostró interés por que hiciera un excelente trabajo; por lo que siempre estuvo interesado en que aprendiera bien lo que estaba haciendo, me enseñó a trabajar duro y a hacer bien las cosas.

Agradezco a los investigadores Dr. Luis Sergio Álvarez Lajonchere, MC. Luz Estela Rodríguez, MC. Isabel Abdo, MC. Gabriela Velasco, MC. Noemí García y Armando Ibarra del laboratorio de genética y reproducción de peces marinos del CIAD, Mazatlán por orientarme en el trabajo diario y brindarme su amistad.

Dra. Gabriela del Valle Pignataro por haberme hablado de este centro y de sus proyectos por lo cuales me interese y decidí ingresar para practicas profesionales y finalmente como tesista.

A mis compañeros de laboratorio y de mantenimiento del área de reproducción de peces, por aguantarme todo un año y hacer mucho mas ameno y divertido el trabajo de cada día.

Y por último pero no menos importantes a mis amigos con quienes compartí mis años de universidad y por ellos, es que recuerdo esos años como los mejores de mi vida...**gracias a todos!!!!**

DEDICATORIA

Dedico con mucho cariño este trabajo a mis padres Esperanza y Leobardo que me dieron la vida, pero muy especialmente a mi madre por ese apoyo y amor que me brinda muy a su manera. A ambos por haberme dado la oportunidad y la confianza para seguir estudiando, muy a pesar de las múltiples dificultades que se fueron presentando a lo largo de mi carrera.

A mi madrina Laura, quien es mi apoyo en muchos sentido; quien ha sabido ser para mí como una segunda madre y que nunca tendré las palabras suficientes ni las mas indicadas para hacerle saber lo que ha significado en mi vida y el curso que ésta ha tomado gracias a ella.

A todos mis hermanos, ya que gracias a la unidad que tenemos nos hemos sabido dar apoyo unos a otros a pesar de la distancia.

ÍNDICE

	Página
Lista de tablas	Xii
Lista de figuras	Xiii
Resumen	XXii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	8
2.1 Diversidad de huevos en peces marinos	10
2.2 Desarrollo y obtención de huevos fertilizados	18
2.2.1 Primeras divisiones del huevo	20
2.2.2 Epibolia	22
2.2.3 Organogénesis	23
2.3 Diferencias morfológicas entre los huevos desovados	26
2.3.1 Calidad de huevos	29
2.4 Incubación	34
2.5 Tipos de incubadoras	35
2.6 Densidad de incubación de los huevos	38
2.7 Causas de mortalidad de huevos durante la incubación	41
2.7.1 Condiciones de incubación	42
2.8 Tratamientos profilácticos en huevos	44
2.9 Trabajos de incubación en pargo	47
3. Justificación	50
4. Hipótesis	52
5. Objetivos	53

5.1 Objetivo General	53
5.2 Objetivos específicos	53
6. Materiales y métodos	55
6.1 Mantenimiento de reproductores	55
6.1.1 Alimentación y preparación de la dieta	57
6.1.2 Limpieza de taques	59
6.2 Sistema de colecta de huevos	60
6.2.1 Colecta de huevos	62
6.3 Diseño experimental	65
6.4 Registro de parámetros durante los experimentos	66
6.5 Incubación con flujo y sin flujo	67
6.6 Incubación a dos diferentes densidades	71
6.7 Incubación con tratamiento profiláctico y sin tratamiento profiláctico	71
6.7.1 Tratamiento de los huevos	72
6.8 Procedimiento de la toma de muestras utilizado en todos los experimentos	73
6.9 Calidad de larvas	75
6.9.1 Criterio para la separación de larvas	77
6.9.1.1 Larvas normales	77
6.9.1.2 Larvas deformes	77
6.9.1.3 Larvas muertas	77
6.9.1.4 Huevos	78
6.9.2 Evaluación de variables	79
6.9.2.1 Calculo de variables al momento de la eclosión	79
6.9.2.2 Calculo de variables a las 48 horas post- eclosión	80
6.9.2.3 Tamaño de larvas	81
6.10 Análisis estadístico de los datos	83

7. Resultados	84
7.1 Calidad de huevos usados en los procedimientos de incubación	84
7.2 Parámetros fisicoquímicos	87
7.2.1 Tratamientos con flujo (0.5 ℓ/min) y sin flujo	87
7.2.2 Incubación a 1000 H/ℓ y a 250 H/ℓ	88
7.2.3 Tratamiento profiláctico y sin tratamiento	92
7.3 Calidad de larvas	95
7.3.1 Experimento de flujo (0.5 ℓ/min y sin flujo)	95
7.3.2 Incubación a una densidad de 1000 H/ℓ y 250 H/ℓ	101
7.3.3 Incubación con tratamiento profiláctico y sin tratamiento profiláctico	109
8. Discusiones	118
9. Conclusiones	133
10. Recomendaciones	135
11. Literatura citada	136

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de la calidad de huevos utilizados durante cada uno de los experimentos.

Tabla 2. Parámetros del agua durante los experimentos de flujos.

Tabla 3. Parámetros del agua durante los 3 experimentos de densidades.

Tabla 4. Parámetros del agua durante los experimentos de tratamiento profiláctico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de ornamentación del corion en huevos pelágicos de peces marinos (Ahlistrom y Moser, 1980).

Figura 2. Variedad de patrones en huevos de peces marinos (Ahlistrom y Moser, 1980).

Figura-3. (a) Tanque de reproductores (b) Reproductores.

Figura 4. Alimentación de los reproductores.

Figura 5. Sistema de colecta: (a) Entrada principal de agua al tanque (b) Salida de rebozo para facilitar la colecta (c) Tubo para lograr que la caída de agua sea dentro del colector de huevos (d) Colector de 60 litros (e) Colector con malla de 500 μm , con capacidad de 20 litros.

Figura 6. (a) Colecta de huevos (b) Traspaso de huevos colectados a la probeta de 500 ml (c) Medición del volumen total colectado.

Figura 7. Refractómetro y espectrómetro para la toma de parámetros.

Figura 8. (I) Tanque de suministro de agua para las incubadoras: (a) Manguera de suministro principal, (b) Manguera de rebozo, (c) Manguera de suministro para las incubadoras. (II) Disposición de Incubadoras, sistema de distribución de agua y aire.

Figura 9. (a y b) Toma de muestras de huevos para la siembra.

Figura 10. (a y b) Toma de muestras de larvas.

Figura 11. (a) Caja negra (b) conteo y separación de larvas.

Figura 12. (a) Larva normal y huevo no eclosionado, (b) Larvas deformes y (c) Larvas muertas.

Figura 13. Larvas a las 48 horas de la eclosión.

Figura 14. (a) Gota de anestésico para la medición de larvas (b) Larvas al microscopio.

Figura 15. Porcentaje de eclosión. Cada barra muestra el promedio de los datos obtenidos en los tres experimentos ($n = 36$) \pm desviación estándar para cada tratamiento.

Figura 16. Porcentaje de supervivencia. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ su desviación estándar al momento de la eclosión y el promedio de $n = 9 \pm$ su desviación estándar a las 48 horas post-eclosión respectivamente. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$) en cada etapa del desarrollo.

Figura 17. Porcentajes de larvas normales y larvas deformes. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ desviación estándar de cada variable y para cada tratamiento. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre experimentos ($p < 0.05$).

Figura 18. Longitud promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con flujo Vs exp 1 sin flujo; exp 2 con flujo Vs exp 2 sin flujo; exp 3 con flujo Vs exp 3 sin flujo).

Figura 19. Longitud promedio \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento (con flujo a, b) (sin flujo x, y, z); letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con flujo Vs exp 1 sin flujo; exp 2 con flujo Vs exp 2 sin flujo; exp 3 con flujo Vs exp 3 sin flujo).

Figura 20. Porcentaje de eclosión. Cada barra muestra el promedio de los datos obtenidos en cada experimento ($n = 12$) \pm desviación estándar para cada tratamiento. Letras minúsculas muestran diferencia significativa entre experimentos de un mismo tratamiento, mientras que letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar entre tratamientos (exp 1 1000 H/ℓ Vs exp 1 250 H/ℓ; exp 2 1000 H/ℓ Vs exp 2 250 H/ℓ; exp 3 1000 H/ℓ Vs exp 3 250 H/ℓ).

Figura 21. Porcentaje de supervivencia a la eclosión y las 48 horas post-eclosión. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ su desviación estándar al momento de la eclosión y el promedio de $n = 9 \pm$ su desviación estándar a las 48 horas post-eclosión respectivamente. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$) en cada etapa del desarrollo.

Figura 22. Porcentajes de larvas normales y larvas deformes. Cada barra muestra el promedio de las repeticiones \pm desviación estándar para cada tratamiento ($n = 12$). Las letras minúsculas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) entre experimentos de cada tratamiento. Letras mayúsculas muestran diferencias significativa entre experimentos (exp 1 1000 H/ℓ Vs exp 1 250 H/ℓ; exp 2 1000 H/ℓ Vs exp 2 250 H/ℓ; exp 3 1000 H/ℓ Vs exp 3 250 H/ℓ).

Figura 23. Longitud de larvas a la eclosión, promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los

experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 1000 H/ℓ Vs exp 1 250 H/ℓ; exp 2 1000 H/ℓ Vs exp 2 250 H/ℓ; exp 3 1000 H/ℓ Vs exp 3 250 H/ℓ).

Figura 24. Longitud de larvas a las 48hr post-eclosión, promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 1000 H/ℓ Vs exp 1 250 H/ℓ; exp 2 1000 H/ℓ Vs exp 2 250 H/ℓ; exp 3 1000 H/ℓ Vs exp 3 250 H/ℓ).

Figura 25. Porcentaje de eclosión. Cada barra muestra el promedio de los datos obtenidos en los tres experimentos ($n = 36$) \pm desviación estándar para cada tratamiento.

Figura 26. Porcentaje de supervivencia. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ su desviación estándar al momento de la eclosión y el promedio de $n = 9 \pm$ su desviación estándar a las 48 horas post-eclosión respectivamente. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$) en cada etapa del desarrollo.

Figura 27. Porcentajes de larvas normales y larvas deformes. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ desviación estándar de cada variable y para cada tratamiento. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento).

Figura 28. El gráfico muestra la longitud promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras

minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento).

Figura 29. El gráfico muestra la longitud promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento).

RESUMEN

El presente estudio evaluó el efecto del flujo de agua (0.5 ℓ/min), la densidad de siembra (250 y 1000 H/ℓ) y el tratamiento profiláctico con formalina (10 ppm) durante el periodo de incubación en huevos de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Los experimentos se corrieron entre los meses de julio a diciembre del 2006. Los huevos utilizados fueron obtenidos por desoves naturales los cuales presentaron una viabilidad promedio del 96.49 ± 2.32 % y un promedio de fertilización del 96.47 ± 6.25 %. Los tanques de incubación utilizados fueron de fibra de vidrio, cónicos, con capacidad de 100 ℓ, los cuales mantuvieron temperaturas promedio de 28.84 ± 0.68 °C a 29.16 ± 0.41 °C para los experimentos con flujo y 28.23 ± 0.70 °C a 29.33 ± 0.31 °C para los experimentos sin flujo. Mientras que para los experimentos de densidad se obtuvo que en las incubadoras con 1000 H/ℓ los promedios de temperatura variaron de 26.48 ± 1.45 °C a 28.16 ± 0.83 °C y de 26.24 ± 1.47 °C a 27.89 ± 0.83 °C para la densidad de 250 H/ℓ. Por último para los experimentos de tratamiento profiláctico; el promedio de temperatura varió de 23.66 ± 1.07 °C a 25.55 ± 1.18 °C para los experimentos donde se aplico el tratamiento con formalina, mientras que para los experimentos sin tratamiento los promedios variaron de 23.76 ± 1.34 °C a 25 ± 1.68 °C. El porcentaje de saturación de oxígeno varió de 62.9- 81.6 %, 74.3- 82 % y 55.7- 84.2 % para los experimentos de flujo, densidad y tratamiento profiláctico respectivamente. Los resultados de los experimentos de incubación con flujo (0.5 ℓ/min) y sin flujo no demostraron diferencias significativas durante la eclosión y la supervivencia a las 48 horas post-eclosión, así como tampoco hubo diferencias significativas en los experimentos de densidad de siembra de 250 y 1000 H/ℓ. Así también los resultados sugieren que no es necesario el tratamiento de los huevos con formalina a 10 ppm, previo a la incubación, pero por cuestiones de higiene y para reducir la carga bacteriana que pudieran tener los huevos al ser introducidos a los tanques de cultivo larvario se recomienda hacer el tratamiento.

1. INTRODUCCION

A pesar de que el cultivo de peces marinos se ha venido desarrollando de manera experimental desde hace más de 50 años, el desarrollo comercial no se dio sino hasta hace aproximadamente treinta años en países como Japón, Francia, España, Noruega y Canadá, entre otros, donde se han logrado los mayores avances (Tucker, 1998). Mientras que en América Latina la maricultura se restringe a la producción de pocas especies de peces marinos, en su mayoría salmónes y truchas (FAO, 2006). Por otro lado, algunas de las especies marinas que actualmente se cultivan son: dorada (*Sparus auratus*), corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*), jurel (*Seriola quinqueradiata*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), salmón del Atlántico (*Salmo solar*), entre otras (FAO, 2006), las cuales han aumentado paulatinamente sus producciones.

Por tal motivo en los últimos años se ha dado un continuo incremento en la demanda de juveniles para el cultivo intensivo de peces, requiriendo de una gran cantidad de huevos (Watanabe *et al.*, 1985; Cerdà *et al.*, 1994); donde el número de huevos viables para incubación es uno de los factores principales que determina el número de juveniles que estarán disponibles para el proceso de cultivo (Watanabe *et al.*, 1985). Por tal necesidad los esfuerzos se han encaminado hacia la masificación durante el proceso de incubación de huevos. Sin embargo, no hay que olvidar que la incubación de los huevos y la cría de las larvas son aspectos que, a pesar de estar separados en tiempo respecto a la maduración, desove y fertilización, están íntimamente relacionados entre sí (Álvarez-Lajonchere y Hernández Molejón, 1994).

Por lo tanto a la par de la importancia comercial de algunas especies de peces marinos, la necesidad de proteína animal de calidad que demanda la creciente población humana y el requerimiento de altas producciones de juveniles, han determinado la necesidad de ampliar el conocimiento de los trabajos previos a la engorda de peces. Para satisfacer esta necesidad de producción masiva de larvas de peces, se requiere mejorar las técnicas de incubación, que por lo general son incubaciones a altas densidades; estas altas densidades pueden afectar negativamente los porcentajes de eclosión e incluso estar relacionados con altas mortalidades de los huevos de peces marinos (Hansen *et al.*, 1992; Nelson y Ghiorse, 1999). Una vez que se realiza la incubación de huevos en condiciones intensivas se incrementa, aún más, el riesgo de la proliferación microbiana; por lo tanto se requiere de tratamientos profilácticos, previendo que las condiciones de aplicación de estos tratamientos sean cuidadosamente definidas.

Aunado a lo anterior se sabe que los estadios de embrión y larva son los más sensitivos y delicados durante la vida de un pez (Turano *et al.*, 2000; Stickney, 2000). Por eso, debe de tenerse gran cuidado con ellos, proporcionando el ambiente adecuado durante la incubación y eclosión. Entre los factores más importantes a considerarse esta la temperatura del agua, luz, calidad de agua, flujo de agua, tipo y tamaño del huevo, etc (Aviles, 2005; Mangor y Waiwood, 1995; Doi y Singhagrainwan, 1993). El flujo de agua durante la incubación es esencial para prevenir acumulación de residuos y permitir el intercambio de gases entre el huevo y el medio circundante. Para algunas especies un constante movimiento también parece ser necesario para un correcto proceso de eclosión (Watson y Chapman, 2002). Además un flujo de agua apropiado reduce los mecanismos de fricción ya que los huevos de muchos peces son sensibles a movimientos bruscos y no se deberían mover durante cierto tiempo del desarrollo. Por otro lado, los huevos durante el proceso de incubación necesitan disponer continuamente de oxígeno en concentraciones elevadas ya que el consumo de oxígeno de los huevos es insignificante en los estadios

iniciales, pero aumenta considerablemente a medida que se desarrollan (Peterson y Quinn, 1996).

De acuerdo con Watson y Chapman, (2002) las características que presentan los huevos como diámetro, adherencia, sensibilidad de los huevos a movimientos bruscos y densidades de siembra, han sido usadas para diseñar diferentes tipos de incubadoras como lo son las cónicas o jarras, usadas en huevos no adherentes que requieren de constante aireación y movimiento. El movimiento del agua asegura una buena calidad de los huevos y el reemplazo del agua evita una posible infección principalmente provocada por hongos. Para los huevos adhesivos se usan los tapetes que simulan el sustrato (plantas, rocas, etc.) y funcionan como colectores; por otra parte las incubadoras de bandeja están diseñadas para los huevos que son sensibles a movimientos durante la incubación de manera que el agua fluye de abajo hacia arriba quedando atrapados en una malla en la superficie.

Considerando las densidades de siembra y los requerimientos de incubación de los huevos (principalmente la temperatura) y en especial para pargos, las incubadoras mas usadas son las cónicas de fibra de vidrio de 400 a 600 litros donde se trabajan densidades desde 50 hasta 750 huevos por litro (Estudillo *et al.*, 2000; Duray *et al.*, 1996; Riley *et al.*, 1995); aunque hay quienes trabajan con densidades menores de 6.25 – 25 H/l en tanques de 400-1600 litros (Turano *et al.*, 2000; Emata, 2003). Pero también las hay de concreto, rectangulares para especies que requieren temperaturas bajas, las cuales son usadas tanto como incubadoras como para la cría de larvas (Morizane, 1993).

En las costas del Pacífico Mexicano los lutjánidos constituyen un gran componente de la pesca artesanal o de escama, en donde su importancia reside tanto en sus elevados volúmenes de captura, como en el beneficio económico en que redundan su pesca, la cual es destinada exclusivamente para consumo humano. En 2005, el registro de capturas de pargos a nivel nacional

fué de 10,770 toneladas, equivalente a un ingreso de 105,338,000 millones de pesos (SAGARPA-CONAPESCA, 2005). Mientras tanto, en México la producción por acuicultura esta compuesta principalmente por crustáceos (camarones), moluscos (ostión, abulón, callo de hacha y almejas), peces de agua dulce (carpa, tilapia, bagre y trucha) y encontrándose en proceso de desarrollo el cultivo de peces marinos (pargo, botete, cabrilla, jurel y atún).

2. ANTECEDENTES

La incubación de los huevos y la cría de las larvas son aspectos que a pesar de estar separados en tiempo respecto a la maduración, desove y fertilización, están íntimamente relacionados (Álvarez-Lajonchere y Hernández Molejón, 1994). De acuerdo con Álvarez-Lajonchere, (comunicación personal) en muchas ocasiones las técnicas aplicadas al desove y/o fertilización determinan en cierto modo las que se aplican en la incubación de los huevos y la cría de las larvas; además, muchos de los efectos que se aprecian en los huevos o las larvas tienen sus causas en la etapa en que estaban mantenidos los reproductores. En dependencia de los métodos de obtención de los huevos, en muchos casos se condicionan los métodos de cría de ellos. Por ejemplo, en aquellos en que la obtención fue basada en desove espontáneo, en algunas ocasiones se deja eclosionar en los estanques en donde se realizó el desove, sacando los reproductores y en otros casos se sacan los huevos y se colocan en otras instalaciones para su incubación. Otros métodos de obtención de huevos son por fertilización artificial o colectados del medio ambiente. En el estudio de la incubación de huevos y la cría de larvas es necesario determinar los efectos de los diversos factores que influyen en cada especie, para lo cual se requiere el definir, en primera instancia algunos conceptos que servirán de base y delimitarán los objetivos propuestos. En primer lugar, el objetivo central es lograr determinar las mejores condiciones en las cuales los organismos pueden desarrollarse para obtener los mejores resultados y de esta forma lograr producciones masivas en cada fase de desarrollo que permitan establecer un suministro adecuado de organismos para introducirlos en las instalaciones de cría. Basados en lo expuesto anteriormente, debemos definir que para cada factor o parámetro en cada especie o población debe tener intervalos de influencia, cuyos límites extremos se denominan letales y por dentro de éstos

los denominados biológicos, en los cuales los organismos o una parte de ellos pueden vivir, mientras que en un rango más estrecho lo hacen de forma óptima con buenos ritmos de crecimiento y eficiencia, y menor afectación de los estadios posteriores.

2.1 Diversidad de huevos en peces marinos

En el medio silvestre teleósteos marinos ovíparos liberan sus huevos con una gran variedad de formas. Muchas especies costeras tienen huevos demersales, los cuales son con frecuencia adheridos a rocas, conchas o inclusive en algas marinas (Ahlstrom y Moser, 1980). Algunos construyen nidos donde los huevos son cuidados por el macho durante el período de incubación. Algunos huevos demersales son liberados en la zona pelágica y después de que estos son fertilizados, son más densos que el agua y se hunden. Normalmente son huevos más grandes que los huevos pelágicos, generalmente con un mayor volumen y contenido nutricional en el vitelo, lo que permite un desarrollo embrionario más prolongado antes de eclosionar, ejemplo: en botete con 3-5 días para eclosionar con temperaturas alrededor de los 27 °C (huevo demersal) y pargo flamenco con 18 a 24 hrs con temperaturas de 31 a 25 °C (huevo pelágico) (comparación personal). El corion de huevos demersales es característicamente pegajoso, permitiendo a los huevos adherirse a cualquier objeto que se encuentre en el fondo y algunas especies producen solo un lote de huevos por temporada. Por otro lado los desovadores pelágicos usualmente producen lotes separados de huevos, donde los huevos son liberados directamente en la columna de agua, dispersándose libremente a merced de las corrientes (Ahlstrom y Moser, 1980). Los huevos de peces marinos pelágicos son generalmente de forma globular y varían en tamaño entre 0.5 y 5.5 mm. Se calcula que más de 40% de los tipos de huevos pelágicos son menores a 1.0 mm de diámetro, el 30% son de entre 1.0 y 1.5 mm, el 15% son de entre 1.5 y 2.0 mm, y alrededor del 14% son de más de 2.0 mm de diámetro. El corion es normalmente suave, pero puede estar distintamente ornamentado (red

poligonal, espinas, inflaciones, etc.). El espacio perivitelino es normalmente estrecho, pero es ancho en los huevos de algunos grupos primitivos de teleósteos (anguiliformes y muchos cupléidos). El vitelo puede ser segmentado u homogéneo. Las gotas de aceite varían en número desde ninguna hasta una o varias, como 25% de los huevos de peces pelágicos carecen de la gota de aceite, el 15% tienen de dos a varias gotas de aceite y el 60% tienen una sola gota de aceite (Figura 1 y 2) (Ahlstrom y Moser, 1980).

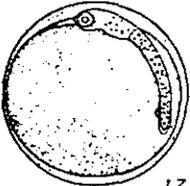
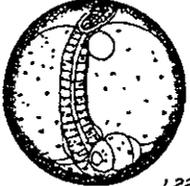
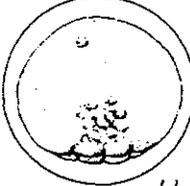
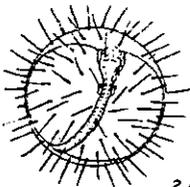
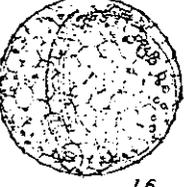
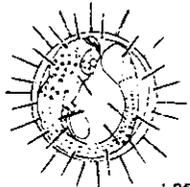
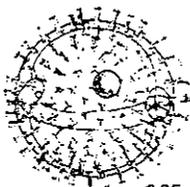
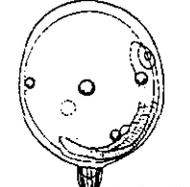
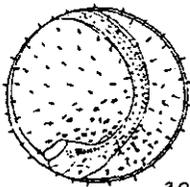
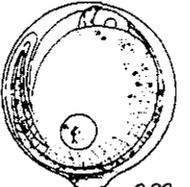
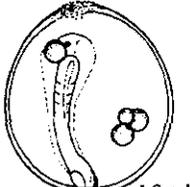
TIPOS DE ORNAMENTACIÓN DEL CORION EN HUEVOS PELÁGICOS DE PECES MARINOS		
SIN GOTA DE ACEITE	UNA GOTA DE ACEITE	2 O MAS GOTAS DE ACEITE
 <p>1.7 <i>Uranoscopus scaber</i></p>	 <p>1.22 <i>Pleuronichthys cornutus</i></p>	 <p>1.1 <i>Leuroglossus stilbius</i></p>
 <p>2.1 <i>Cheilopogon nigricans</i></p>	 <p>1.63 <i>Maurolicus muelleri</i></p>	 <p>1.6 <i>Aesopia cornuta</i></p>
 <p>1.85 <i>Cheilopogon kataptron</i></p>	 <p>0.85 <i>Myctophiform</i></p>	 <p>1.15 x 1.25 <i>Pleuronectiform</i></p>
 <p>2.0 <i>Oxyporhamphus meristocystis</i></p>	 <p>0.90 <i>Centracanthus cirrus</i></p>	 <p>1.6 x 1.9 <i>Ostraciodontid</i></p>

Figura 1. Tipos de ornamentación del corion en huevos pelágicos de peces marinos (Ahlstrom y Moser, 1980)

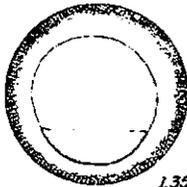
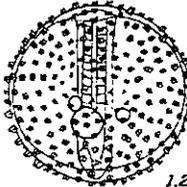
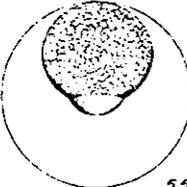
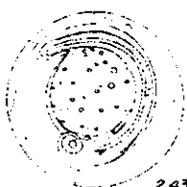
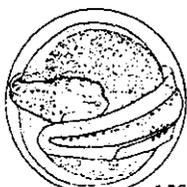
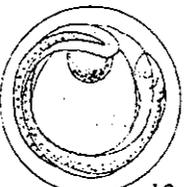
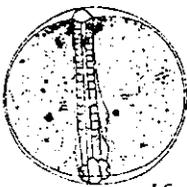
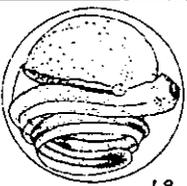
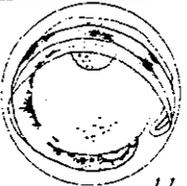
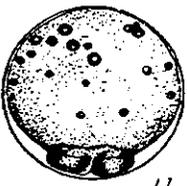
VARIEDAD DE PATRONES EN HUEVOS PELAGICOS DE PECES MARINOS				
		SIN GOTA DE ACEITE	UNA GOTA DE ACEITE	2 O MAS GOTAS DE ACEITE
CORION SUAVE	APARIENCIA DEL CORION	 1.35 <i>Synodus luciiceps</i>	 1.72 <i>Microstoma microstoma</i>	 1.2 <i>Myctophiform</i>
	ESPACIO PERVITELINO ANCHO	 5.5 <i>Muraena helena</i>	 1.7 <i>Sardinops sagax</i>	 2.43 <i>Anguillid</i>
CORION ANCHO	VITELO SEGMENTADO	 1.35 <i>Etrumeus acuminatus</i>	 1.0 <i>Trachurus symmetricus</i>	 1.6 <i>Soleid</i>
	VITELO NO SEGMENTADO	 1.9 <i>Glyptocephalus zochirus</i>	 1.1 <i>Merluccius productus</i>	 1.1 <i>Prionotus carolinus</i>

Figura 2. Variedad de patrones en huevos de peces marinos (Ahlstrom y Moser, 1980)

Por otro lado la gravedad específica es el mayor constituyente de los huevos pelágicos, donde los aminoácidos libres y los aminoácidos polimerizados en las proteínas son más altos que la gravedad específica del agua de mar. Los

huevos pelágicos de teleósteos sin gota de aceite de baja gravedad específica presentan una flotabilidad neutral a una salinidad de 32-34%, así también se ha propuesto la teoría de que cambios en la composición de la membrana afectan la permeabilidad (Riis-Vestergaard, 2002). La gota de aceite no solo permite que el embrión se desarrolle dentro del huevo y hasta que pueda alimentarse después de eclosionar, si no que también permite la flotabilidad del huevo en la columna de agua; junto con otros factores como lo es el proceso de hidratación.

El crecimiento del ovocito dentro del folículo es principalmente debido a la acumulación de la proteína hepática (vitelogenina, VTG) por endocitosis; una vez en el ovocito, la VTG se procesa y se almacena parcialmente en glóbulos de vitelo. En algunos teleósteos marinos la postura pelágica, divisiones adicionales del vitelo del huevo, las proteínas seguidas por la toma de agua ocurren concurrentemente con la maduración final del ovocito (Thyler y Sumpter, 1996). Carnevali *et al.* (1999), llegaron a la conclusión de que la flotabilidad por medio de la hidratación de los huevos, puede regularse con la activación enzimática en el momento apropiado durante la maduración del ovocito, este proceso probablemente es el acontecimiento dominante en la reproducción de los desovadores pelágicos marinos.

La hidratación de huevos y embriones en los primeros estadios llega hasta el 95 % del total de peso; lo que les da una flotabilidad positiva en la columna de agua y facilita tanto el aporte de oxígeno al embrión como su dispersión en el medio (Cerdà, 2002). En los huevos pelágicos la hidratación se da por el aumento de los aminoácidos libres, como consecuencia de la lisis de las proteínas del vitelo durante la maduración meiótica; mientras que en los huevos demersales, la presión osmótica es producida por el incremento en la concentración de solutos inorgánicos como los iones de Na^+ , K^+ o Cl^+ en el ovocito (Cerdà, 2002). Así también Nigel-Fiin *et al.* (2002) mencionan que la hidratación en los huevos de lenguado del Atlántico es del 90 % al momento del estado de ovulación y es causada por la toma de agua por osmosis provocada

por los aminoácidos libres derivados particularmente de la hidrólisis de las proteínas (KDa 110) del vitelo, las cuales contribuyen con aproximadamente el 50 % de su osmolaridad, mientras que los iones (Cl^- , K^+ , P_i , NH_4^+) aumentan el balance respecto al fluido ovárico. Al igual Thorsen, A y H.J. Fyhn (1996), en su estudio con huevos de bacalao puestos en agua salobre (14.3 %) y agua salada (33.0 %), llegan a la misma conclusión donde la hidratación se da durante la fase final de la maduración del ovocito debido al alto contenido de aminoácidos libres, Cl^- y NH_4^+ obteniendo un porcentaje de hidratación de 96.6 ± 0.47 y 92.7 ± 0.45 % respectivamente.

2.2 Desarrollo y obtención de huevos fertilizados

El desarrollo de los huevos puede ser dividido en tres etapas principales: División, Epibolia y Organogénesis. Antes de que el desarrollo comience, los huevos tienen que ser fertilizados; pero también antes de esto, se da el desarrollo de los ovocitos que comprende varios estadios; los cuales pueden ser ampliamente clasificados en seis fases o periodos acorde con el estado de su crecimiento: ovogénesis, crecimiento primario, alveolo cortical, vitelogénesis, maduración y ovulación (Bromage y Cumaratunga, 1988; Tyler y Sumpter, 1996). En las últimas fases (maduración y ovulación) el ovocito presenta una migración del núcleo hacia la periferia del ovocito, para formar el polo animal y posteriormente se da la desintegración de la membrana nuclear para formar el micrópilo por donde entrará el espermatozoide (Mayer *et al.*, 1988; Ravaglia y Maggese, 2002). El ovocito que se había detenido en la fase de diploteno de la profase de la primera división meiótica se reinicia de nuevo y se emite el primer cuerpo polar, entonces en el ovocito los cromosomas se vuelven a detener en la metafase de la segunda división meiótica, la cual se reactiva cuando el ovocito es fertilizado liberando así el segundo cuerpo polar (Patiño y Sullivan, 2002; Sorbido y Junquera, 2001).

La fertilización, que es el proceso donde un espermatozoide entra en el huevo a través del micrópilo también permite la activación de los alvéolos corticales, conocido como reacción cortical, donde la membrana vitelina que envuelve el huevo es remplazada por una nueva membrana la cual se endurece y forma el nuevo corion. Todos los huevos, fertilizados o no fertilizados, reaccionarán al contacto con el agua y comenzaran a absorber agua e hincharse aumentando de tamaño aproximadamente un 30 %. La función principal del nuevo corion es la de proteger una posible poliespermia; además de proteger al embrión contra lesiones físicas y patógenos (Yamamoto y Kobayashi, 1991; Ravaglia y Maggese, 2002; Arukwe y Goksoyr, 2003). Por lo tanto los huevos obtenidos artificialmente por presión abdominal no deben ser expuestos al agua antes de que haya ocurrido la fertilización (Nigel Finn *et al.*, 2002).

2.2.1 Primeras divisiones del huevo. El embrión comienza a desarrollarse después de la fertilización. Primero el citoplasma, un líquido descolorido de la célula, se mueve sobre la superficie del vitelo del huevo. Se concentra en el polo animal donde redondea hacia arriba y se levanta levemente para formar una bóveda hemisférica. Ésta es la primera célula del embrión, conocida como el blastodisco. La división de la célula comienza con la primera división del blastodisco para formar dos células. Cada una de las dos nuevas células se dividirá y formara cuatro células y ésta continuará con estos cuatro que se dividen en 8 células y siguiendo 16 células hasta 32 células y así sucesivamente hasta llegar al estado de mórula. Dependiendo de la especie de la que se hable y la temperatura de incubación, principalmente, será el tiempo en que se darán las divisiones de la célula (Radonic *et al.*, 2005; Suzuki y Hioki, 1979). Las primeras divisiones celulares son importantes porque en los peces en cautiverio se determinan los porcentajes de fertilización y viabilidad durante los primeros estadios. Avery y Brown, (2005) usaron patrones asimétricos de los blastómeros de los huevos de *Limanda ferruginea* durante las primeras etapas de su desarrollo, para predecir la viabilidad del embrión en los estadios de 4 y 8 células. Esta información fue usada como indicador de la anormalidad

de los huevos. Así también Rideout *et al.* (2004) hicieron esta predicción con huevos de *Melanogrammus aeglefinus* en estadios de 8 –16 células tomando 4 variables como referencia a los blastómeros donde identificaron como anormales a los huevos con células que presentaron asimetría en el acomodo de los blastómeros, desigualdad en el tamaño, poca adhesión y definición pobre en los márgenes de los blastómeros. Por otro lado, durante las primeras divisiones del huevo también puede verse afectado por variables ambientales como en el lenguado *Hipoglossos hipoglossus*, donde estudios de Kjorsvik, (1990) demostraron que el porcentaje de fertilización esta regido por la salinidad, donde el porcentaje de supervivencia es bajo cuando decrece la salinidad o cuando se incrementa. Además de que a salinidades de 3 y 7 ppm, los huevos no se desarrollaron normalmente y el blastómero se hinchó y no hubo diferenciación celular.

2.2.2 Epibolia. La formación del embrión inicia la segunda etapa. Durante esta etapa las células se forman en el comienzo de la fase de la división para especializarse y formar tejidos. El borde del blastodisco se expande y crece hacia abajo, cubriendo la superficie del vitelo. El borde sobrecrecido, a veces llamado el anillo germinal, eventualmente envuelve el vitelo, este proceso es la epibolia real (crecimiento de lo que será el ectodermo sobre la mayor superficie del embrión). El tejido formado por este anillo germinal se convertirá en el saco del vitelo y después los tejidos envolverán a la cavidad del cuerpo. Durante este proceso, la organización de las células comenzará a ser más clara. La cabeza del embrión desarrollándose, es el polo animal original y el principio de la cola está cerca del borde del anillo germinal. En algunas especies la cabeza puede ser vista cuando 1/3 del vitelo esta sobrecrecida por la capa germinal. Los futuros tejidos del músculo están formados en la región del cuerpo en cualquier lado de la médula espinal. Las vesículas ópticas y los ojos desarrollándose, son visibles a la mitad de la epibolia (Radonic *et al.*, 2005; Suzuki y Hioki, 1979). Dependiendo de la temperatura, la epibolia es completada cuando los bordes se encuentran en el lado opuesto de donde inicio, envolviendo el blastoporo.

Una nueva membrana del epitelio celular ahora envuelve el vitelo. El manejo de huevos durante la epibolia debe evitarse, incluso el movimiento más leve de huevos puede causar la pérdida de la membrana, conduciendo a la pérdida de sales y a la desnaturalización de las proteínas del citoplasma. El resultado final es la reducción de la supervivencia de los huevos. Al final de esta etapa las células formadas durante la división han tornado en tejidos que forman las estructuras básicas del embrión (López *et al.*, 2002).

2.2.3 Organogénesis. Cuando la epibolia ha finalizado comienza la formación de órganos internos y el cuerpo embrionario aparece libre sobre la superficie del vitelo, es el inicio de la formación de la aleta caudal. Cerebro, ojos, arco neural, músculos (miómeros), corazón, sistema circulatorio, intestinos e hígado comienzan a desarrollarse. Los vasos sanguíneos están cubiertos por el vitelo, se inicia la llamada vascularización. Cuando tres cuartas partes del vitelo está vascularizado se libera la cabeza. Posteriormente el corazón comienza a latir, durante este estado la actividad muscular se incrementa, el embrión está listo para eclosionar. El proceso y la aparición de los órganos varía de acuerdo con la especie y la temperatura del agua durante la incubación ya que éstas afectan directamente el desarrollo del embrión (Saka *et al.*, 2003). Por ejemplo para la especie *Pagrus pagrus*, Radonic *et al.*, (2005) probaron la incubación a tres diferentes temperaturas obteniendo como resultado que en la temperatura de 25 °C el desarrollo embrionario fue más acelerado que en las temperaturas de 20 °C y 15 °C; a las 11 hr post-fertilización se da la aparición del embrión, aparece un corazón rudimentario a las 15 hr, el embrión presenta motilidad a las 22 hr y se da la eclosión a las 26.25 hr, 11 y 23 hr antes que la incubación a 20 °C y 15 °C respectivamente. Suzuki y Hioki, (1979) siguieron el desarrollo embrionario de la especie *Lutjanus kasmira* incubando a una temperatura de 24.8-27.9 °C, la aparición del cuerpo embrionario ocurrió a las 8 hr 30 min, a las 15 hr aparece el corazón, el embrión comienza a moverse a las 16 hr 20 min y se dan las primeras eclosiones a las 18 hr después de la fertilización. Mientras que para los huevos de la especie *Lutjanus campechanus* incubados a 27 ± 1

°C el embrión completo aparece hasta las 12 hr post fertilización, el primer latido ocurre a las 15 hr, dándose la eclosión a las 20 hr después de la fertilización (Vernon-Minton *et al.*, 1983); así también Rabalais *et al.*, (1980) hacen la descripción del desarrollo embrionario para la misma especie pero usan una temperatura de incubación de 23-25 °C ocasionando una prolongación en el tiempo del desarrollo hasta la eclosión de 25 hr. Doi y Singhagraiwan, (1993), tuvieron temperaturas de incubación mas altas para la especie de pargo *Lutjanus argentimaculatus* las cuales variaron en el periodo desde la fertilización a la eclosión de 34.5 °C a 25 °C, obteniendo las primeras eclosiones a las 15 hr después de la fertilización y a las 17 hr 30 min la eclosión total.

Finalmente es durante esta etapa donde los huevos son fuertes y la manipulación de huevos individuales es posible. Es durante esta etapa que una parte de la gota de aceite es destinada en la diferenciación craneal y al desarrollo de fibras musculares (a las 6-9 horas post-fertilización en larvas de *Lutjanus campechanus*) de la larva en desarrollo (Williams *et al.*, 2004). Dependiendo de la especie y la temperatura se determina el tiempo de la colecta y siembra de los huevos, por ejemplo para *Lutjanus guttatus* el tiempo de colecta es entre 10 y 14 hr dependiendo de la temperatura (Ibarra, 2005).

2.3 Diferencias morfológicas entre los huevos desovados

Al principio cuando se presenta el desove, todos los huevos parecen sanos y bien desarrollados. Con forme transcurre el tiempo, algunos se vuelven blancuzcos u opacos a causa de daños sufridos durante el desove de manera natural o en desoves obtenidos de manera artificial y finalmente pueden ser huevos que no fueron fertilizados. En el primer momento, los huevos no fertilizados no se distinguen de los fertilizados. Se dilatan del mismo modo y la polarización progresa de igual forma, pero se retrasan en la primera segmentación y el polo animal, que de ordinario aparece como un promontorio, adquiere una forma poco usual, haciéndose alargado y puntiagudo. La primera

segmentación es anormal y los dos blastómeros resultantes tienen forma y tamaño diferentes. Lo mismo sucede en las segmentaciones posteriores. Después del estadio de 16 o 32 blastómeros, algunas células empiezan a separarse de la masa celular y pueden apreciarse claramente en el espacio perivitelino en huevos de bacalao *Gadus morhua* (Vallin y Nissling, 1998).

También los huevos fertilizados (por ejemplo, si han sufrido trastornos mecánicos, como fricción, sacudidas, etc.) pueden tener células que se han desprendido y han pasado al espacio perivitelino. Esos huevos no sobrevivirán. Los huevos sanos son transparentes o brillantes y su contenido es claro. Pueden distinguirse perfectamente de los huevos malogrados, que son blancuzcos, opacos y tienen el contenido turbio. Se ha emprendido mucho esfuerzo de evaluar los criterios para el huevo marino y la calidad larval. Aunque el porcentaje de la fertilización parece ser un indicador posible de la calidad de huevo en salmónidos, no se correlaciona siempre con calidad de huevo en peces marinos Kjørsvik *et al.*, (1990). Cuando los huevos sanos llegan al estadio de cierre del blastoporo, los huevos en buen y mal estado pueden distinguirse claramente. En ese momento es cuando puede determinarse el índice de fertilización, lo que algunos autores como Watanabe *et al.*, (1998) lo expresan como el éxito de fertilización. Mientras que fertilización se considera a los huevos que han sido fecundados por el esperma y han tenido una activación nuclear. Es por eso que algunos autores toman el porcentaje de fertilización de los huevos flotantes, en los cuales se realiza un conteo de aproximadamente 100 huevos y se obtiene el número de huevos fertilizados y no fertilizados de la muestra, (Sund y Falk-Petersen, 2005). Algunos otros autores solo sacan un porcentaje de los huevos flotantes que toman como vivos con respecto de los fondeados o precipitados que toman como muertos (Panini *et al.*, 2001; Saka *et al.*, 2003).

2.3.1 Calidad de huevos. La variación en la calidad de huevos es uno de los factores limitantes para la producción exitosa de larvas de peces. En la

literatura el término de calidad de huevos ha sido definido y usado de diversas maneras. Para efecto del presente trabajo la calidad de huevos se puede definir como el potencial de los huevos para producir larvas viables (Kjorsvik, *et al.*, 1990). Entendiendo que la producción de huevos viables puede verse influenciada por factores físicos, químicos, genéticos y durante el proceso fisiológico de producción de los huevos (Kjorsvik, *et al.*, 1990). Los huevos de buena calidad en acuicultura son aquellos que exhiben niveles bajos de mortalidad durante la fertilización, la aparición de estructuras oculares del embrión, eclosión, primera alimentación y aquellos que produzcan los animales de mejor y mayor crecimiento (Bromage *et al.*, 1994). Generalmente existe poco acuerdo en lo que se relaciona con métodos confiables para la valoración de la calidad de huevos, que es un prerequisite esencial para dar una conclusión firme relacionada con los factores que determinan la calidad de huevos y larvas (Bromage, 1995). Además no hay una estandarización de los parámetros a medir, por lo tanto los resultados obtenidos no son congruentes o comparables. Kjorsvik, *et al.* (1990), proponen los siguientes criterios para determinar la calidad de huevos en peces: 1) Porcentaje de fertilización, 2) Propiedades físicas y fisiológicas del huevo, 3) Morfología del huevo, 4) Tamaño del huevo, 5) Contenido químico (Pigmentos, Vitamina C, Componentes inorgánicos, Componentes orgánicos del huevo y edad de la hembra) y 6) Aberraciones cromosómicas. Bromage *et al.* (1994), analizaron otros factores importantes en la calidad de huevos como es la sobremaduración, con especial referencia en el tiempo de extracción de los huevos después de la ovulación en *Hipoglossous hipoglossous*. Durante la sobremaduración los huevos experimentan una serie de cambios morfológicos y de composición, así como también una pérdida progresiva en la viabilidad (Sakai *et al.*, 1975; Springate *et al.*, 1984; Bromage *et al.*, 1994). Los resultados muestran que para obtener huevos de buena calidad en *Hipoglossous hipoglossous*, el tiempo óptimo para la extracción manual de los huevos, es de 4-6h después de la ovulación; después de este tiempo la calidad disminuye considerablemente. Mylonas *et al.* (2003) evaluaron la calidad de huevos en hembras de *Dicentrarchus labrax* un desovador serial,

utilizando repetidas inyecciones de LHRHa. Las variables: peso de la hembra, número de desoves, número de huevos, fecundidad relativa y porcentaje de fertilización, demostraron que la lobina europea puede producir cuatro desoves sucesivos con huevos de alta calidad, en respuesta al tratamiento de inyecciones repetidas de LHRHa y sugiere que tratamientos pulsátil (en pequeñas cantidades) de LHRHa podría ser necesario para inducir a un ciclo apropiado de los cambios hormonales para el reposo, maduración y ovulación de múltiples lotes de huevos viables. Kjorsvik *et al*, (2003), con el objetivo de determinar criterios que permitan una producción de juveniles en *Scophthalmus maximus* evaluaron parámetros como el porcentaje de fertilización, porcentaje de eclosión, supervivencia al día 37 y el número de organismos con una metamorfosis normal como los de mayor importancia para la calidad de huevos. Mientras que Furuita *et al*, (2002) determinaron el efecto de altos valores de n-3HUFA contenidos en la dieta de reproductores, sobre la calidad de huevos del lenguado japonés *Paralichthys olivaceos*, evaluando la producción de huevos por hembra, porcentaje de huevos flotando, porcentaje de eclosión, larvas normales y supervivencia al tercer día de la eclosión, donde los resultados sugieren que un alto nivel de n-3 HUFA en la dieta de los reproductores afecta negativamente la calidad de huevos del lenguado japonés. Otro factor que puede afectar la calidad de los huevos es el fotoperiodo. Ramos *et al*, (2002), trabajaron con exposición de reproductores de lubina al fotoperiodo y sus resultados en viabilidad, calidad de huevos y larvas fueron que; con fotoperiodo expandido la calidad fue de aproximadamente 50 % menor que las obtenidas con el grupo control (Natural), por lo tanto concluye que con condiciones inadecuadas de factores ambientales se producen alteraciones en los procesos endocrinos que afectan la calidad de huevos y larvas.

Por otro lado también deben considerarse correlaciones entre las variables medidas como por ejemplo, Kjorsvik, (1990) en su trabajo con *Hippoglossus hippoglossus* encontró una relación entre el huevo y el tamaño de larva. Además de que las larvas nacidas de huevos grandes tienden a ser más

grandes y a sobrevivir más tiempo antes de la primera alimentación de aquellos que nacieron de huevos pequeños. Mientras que Papanikos *et al*, 2003 compararon la calidad de huevos y larvas provenientes de desoves inducidos y desoves naturales, y obtuvieron como resultados que los huevos de desoves naturales fueron más viables en términos de fertilización, eclosión y supervivencia. También los tamaños de los huevos y la gota de aceite fueron más grandes en desoves naturales que inducidos, por lo tanto también las larvas fueron de mejor calidad en desoves naturales.

2.4 Incubación

Después de que los huevos se fertilizan experimentan un proceso que endurece el corion. Los disturbios mecánicos durante este período pueden causar daño severo al huevo y como resultado se tiene una disminución en la tasa de supervivencia (Watson y Chapman, 2002). Los huevos deben de ser trasferidos a incubadoras antes o después del proceso de endurecimiento del corion. Si son transferidos antes del endurecimiento del corion, esto deberá tener lugar después del ultimo lavado con agua, cuando el exceso de esperma sea removido durante el proceso de fertilización artificial (Narvarte y Pascual, 2003) y durante las primeras divisiones celulares (32 células) en especies con huevos pelágicos y de importancia comercial, o esperar por varias horas (entre 10 y 14 hr después de la fertilización en ciertas especies tropicales), sin disturbios hasta que el embrión este completamente formado. Durante este periodo los huevos son fuertes y soportan el manejo. Por lo tanto durante este tiempo pueden ser manejados y la transferencia a las incubadoras puede ser factible sin muchas consecuencias en la perdida y afectación de los huevos. Johnston, (2002) cree que los huevos deben ser movidos tan rápido como sea posible después de la fertilización u optar por incubar después del endurecimiento del corion. Lo más importante es quizás el tratar los huevos con gran cuidado en cualquier momento de la transferencia.

2.5 Tipos de incubadoras

Las incubadoras cónicas o jarras son usadas para huevos de peces de aguas templadas, no adhesivos y que requieren de constante movimiento. En este tipo de incubadoras debido a su forma, el agua puede fluir tanto del fondo como de la superficie por lo tanto esto asegura una buena calidad del agua y buena oxigenación de los huevos. El flujo del fondo o la misma aireación, mantiene los huevos suspendidos de tal manera que evita que los huevos muertos precipiten y provoquen un crecimiento bacteriano (Watson y Chapman, 2002). Para huevos más pesados, con poco espacio perivitelino, se utilizan embudos o recipientes más cónicos, que necesariamente tienen menor diámetro (16–20 cm) y volumen. A la hora de decidir sobre el número de incubadoras es preciso tener presente que sólo el 25–30 por ciento del volumen total de la incubadora puede utilizarse para contener huevos. Para los huevos flotantes o semiflotantes es mejor incubarlos en incubadoras cónicas, las cuales pueden ser grandes o muy grandes (100–300 l) y se utilizan en los trabajos de propagación en gran escala (piloto y comercial).

Las incubadoras de bandeja consisten en un contenedor perforado a través del cual fluye el agua y permite la oxigenación de los huevos y retira los cascarones (en peces de agua dulce). Están diseñadas para que el agua fluya de abajo hacia arriba, de esta forma los huevos no se dañan por el movimiento y proporciona un fácil acceso para remover los embriones muertos y cascarones. Este tipo de incubadoras fueron diseñadas originalmente para la incubación de huevos de salmón. Otro tipo de incubación son los tapetes y se utilizan para los huevos que presentan adherencia. Este tipo de incubadora simula el sustrato que se presentaría en ambiente natural. Estos sirven como colectores y también funcionan como estimulantes para los desoves. Los materiales y formas son muy variables, desde tiras de plástico hasta musgos, fibras de coco y pelo de caballo (Watson y Chapman, 2002). St Mary *et al*, (2004) al incubar huevos de *Jordanilla floridae* hacen uso de tapetes de plástico de 100 cm² entretejidos con

100 % hilo acrílico verde y después de 24 hr del desove los remueve y los pasa a jarras de vidrio de 100 ml con aireación; con esto intentaron demostrar los efectos del ambiente en el desarrollo del embrión y eclosión de los huevos con lo que obtuvieron que la temperatura solo tiene efecto en el desarrollo del embrión pero no en la eclosión así también la salinidad no tuvo efecto tanto en el desarrollo como en la eclosión pero si tuvo efecto en la presencia de hongos y virus que afectan los huevos, donde a mayor salinidad la presencia de estos se redujo.

Las incubadoras que más se utilizan para los huevos pelágicos son los tanques cónicos de fibra de vidrio donde las densidades son muy variables así como también los tamaños de los tanques que van desde los 100, 400, 600 hasta los 1600 litros (Turano, 2000; Duray *et al.*, 1996; Estudillo *et al.*, 2000; Riley *et al.*, 1995). Algunos otros hacen la incubación directamente en el tanque de cultivo larvario dentro de pequeñas bolsas con aireación, donde una vez que abren la boca son liberados al tanque y por lo tanto están listos para comenzar a alimentarse con microalgas y rotíferos (Turano *et al.*, 2000; Duray *et al.*, 1996; Ostrowski *et al.*, 1996)

2.6 Densidad de incubación de los huevos

La densidad de siembra es uno de los principales factores biológicos que afecta el crecimiento y la supervivencia de las larvas de peces marinos, por lo que su estudio para cada sistema de cultivo, es una tarea fundamental si se pretende lograr la producción masiva de larvas de buena calidad a precios aceptables para los productores (Houde, 1975). Los estudios relacionados con la densidad de siembra en la cría de larvas de peces marinos son escasos, sobre todo para las especies relacionadas filogenéticamente con la familia Lutjanidae.

Algunos estudios se han llevado a cabo principalmente con especies de la familia Sparidae, como es el estudio de Houde, (1975), quien determinó el

efecto de la densidad de larvas y del alimento en el desarrollo de *Archosargus rhomboidalis*, encontrando que la densidad óptima de siembra de larvas fue de 8-16 individuos por litro. Teng *et al*, (1983) probaron dos sistemas de cultivo de larvas de *Acanthopagrus cuvieri* en diferentes densidades (15 y 60 individuos por litro), observando una supervivencia de 4 % a partir de la siembra inicial con un mejor inflado de la vejiga natatoria, pero con un crecimiento ligeramente menor con la densidad más alta. Al Ameer *et al*, (1982) realizaron una investigación más formal acerca de las densidades de cultivo de larvas de *Acanthopagrus cuvieri*, utilizando 15, 30, 60 y 120 individuos por litro en tanques circulares de 0.5 m³, reportando que el mejor crecimiento y la mejor supervivencia se obtienen con 30 individuos por litro. Fernández-Palacios *et al*, (1995) quienes experimentaron con *Dentex gibbosus*, obtuvieron los primeros desoves espontáneos y el cultivo de larvas con densidades de 100 individuos por litro reportando una tasa específica de crecimiento de 0.03975 %/d. Leu y Chou, (1996) investigaron la densidad de siembra más adecuada para el cultivo de larvas de *Acanthopagrus latus*, determinando que no existió diferencia significativa en el crecimiento y la supervivencia de larvas utilizando densidades entre 10 – 25 individuos por litro, aunque se encontró que a mayor densidad la frecuencia de problemas relacionados con la columna vertebral aumentaba. En cuanto a la familia Moronidae, Coves *et al*, (1991) determinaron que es adecuado el uso de una densidad de 100 individuos por litro con larvas de *Dicentrarchus labrax*, obteniendo supervivencias por arriba del 7 % sobre la cantidad de huevos sembrados. Álvarez González, (1999) evaluó el efecto de la densidad de siembra en larvas de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* sobre el crecimiento y la supervivencia, donde las densidades de 50 y 100 individuos por litro fueron las que registraron la mayor aceptación.

2.7 Causas de mortalidad de huevos durante la incubación

En la práctica, sin embargo, sucede a menudo que algunos huevos mueren tras un breve período de desarrollo, bien durante el estadio de mórula o antes del cierre del blastoporo. Una de las causas de esas muertes puede ser la deficiencia de oxígeno en aquellas partes de los aparatos de incubación donde el recambio de agua es poco o nulo. También las temperaturas inadecuadas pueden acabar con los huevos, de ordinario durante el desarrollo embrional (Rennie *et al.*, 2005). Según St Mary *et al.*, (2004) la temperatura no tiene efecto en la probabilidad de que los embriones de *Jordanella Floridae* eclosionen, pero sí tiene efecto en el tiempo de eclosión y en la supervivencia, ya que las temperaturas calidas aumentan la posibilidad de enfermedades. Otra de las causas de mortalidad en huevos se refiere a enfermedades durante la incubación, donde la aireación y la circulación del agua reducen la posibilidad de dichas enfermedades, (St Mary *et al.*, 2004). Turano *et al.*, (2000) indican que el balance nutricional en los reproductores indica fragilidad en las larvas y están propensas a sufrir el síndrome de shock el cual está asociado con la deficiencia de ácidos grasos. Peterson y Quinn, (1996) atribuyen la mortalidad de embriones de salmón, a pequeños cambios en la concentración de sedimentos en el agua.

2.7.1 Condiciones de incubación. La reproducción de peces es altamente sensible a la temperatura del agua (Van der Kraak y Pankhurst, 1997). Ya que la temperatura puede regular la acción de las hormonas en todos niveles del sistema reproductivo, así como ser un determinante en el desarrollo de los embriones ya sea que retrase o adelante su desarrollo (Polo *et al.*, 1991). Por otro lado la temperatura durante la incubación modifica la supervivencia y calidad de las larvas y determina las características morfológicas, así como también el crecimiento bacteriano, es por eso que durante la incubación esta debe mantenerse con la mínima fluctuación ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) a partir de la óptima (Watson y Chapman, 2002). Las consideraciones más importantes que deben

tomarse durante la incubación son la calidad del agua, temperatura del agua, luz, flujo, prevención de movimientos bruscos y tener referencia de la calidad de los huevos desovados; como lo demostró Kjorsvik, (1990) quien describe condiciones de incubación para huevos de lenguado y reporta algunas propiedades biológicas de los huevos de buena y baja viabilidad en comparación con resultados en otros huevos de peces pelágicos; concluyendo que el tamaño de huevo y el tamaño de larva tienen correlación, donde las larvas grandes tienden a sobrevivir más tiempo sin alimento de aquellas que nacieron de huevos chicos. Schneider *et al.*, (2003) en su estudio con huevos de *Stizostedion vitreum* observaron que las altas temperaturas causaron altos porcentajes de deformidad. Aunque otros autores argumentan que la temperatura es un indicador del desarrollo embrionario y del tiempo de eclosión de los huevos (Estudillo *et al.*, 2000; Doi y Singhagraiwan, 1993; Radonic *et al.*, 2005). Estudios anteriores han demostrado la necesidad de requerimientos altos de oxígeno a partir de la fertilización a la eclosión (Rombough, 2007).

2.8 Tratamientos profilácticos en huevos

Independientemente del tiempo de transferencia, los huevos pueden ser desinfectados antes o un poco después de que la incubación comience. La desinfección removerá las bacterias que traen los huevos del pez hembra que los originó. Éstos pueden ser no infecciosos, pero aún tienen efecto negativo en el equilibrio químico y lo intercambian entre el huevo y el ambiente. Algunos patógenos virales o bacterianos pueden estar presentes en la superficie del huevo (e.g. IPNV, IHNV y VHS), y aunque la desinfección no elimina los patógenos totalmente, puede reducir significativamente la posibilidad de infección. Usualmente para huevos de *Ocyurus chrysurus* se utiliza formalina al 1% expuestos por una hora antes de la incubación (Turano *et al.*, 2000).

Normalmente, la membrana del huevo protege al embrión durante su desarrollo. Sin embargo, algunos embriones pueden morir debido a ataques de bacterias,

hongos (*Saprolegnia*) y crustáceos carnívoros (*Cyclops*) o a depredación de larvas de insectos u otros animales (Vallin y Nissling, 1998). Todos estos organismos atacan los huevos desde el exterior y destruyen la cubierta. Si el agua en que se incuban los huevos contiene mucha materia orgánica en disolución, las bacterias proliferan activamente entre los huevos. Con sus enzimas atacan la cubierta proteínica del huevo, que pierde su solidez, y el embrión muere o nace prematuramente. Las esporas microscópicas de los hongos acuáticos, como *Saprolegnia*, se encuentran en todas partes. Se fijan sobre los huevos maleados o ya muertos y se desarrollan con rapidez, atacando a continuación a los huevos sanos, que quedan enredados en los densos filamentos de los hongos. Zaror *et al*, (2004) reportan que en pisciculturas de Chile la mortalidad de huevos de salmón fluctúan entre un 15 y 25 % debido al crecimiento del hongo *Saprolegnia sp* proveniente de los reproductores; este crecimiento micótico puede ser causado por cambios en la temperatura la cual reduce la secreción de mucus y baja la formación de anticuerpos; este hongo puede ser combatido con el aumento en la concentración de la salinidad a 30 gr por litro, azul de metileno a 10 ppm y permanganato de potasio a 10 ppm por 30-60 min. CONAPESCA, (2001) recomienda utilizar sustancias que contengan yodo como principio activo a una concentración de 50-200 ppm de 10- 15 min y cuando se tiene la certeza de ser *Saprolegnia parasítica*, *Achlya hoferi* o *Dictyuncus sp*, debe hacerse una limpieza con cloruro de sodio a 1-5 % por 30 segundos, ácido acético al 5 % por un minuto o formalina a 1: 10000. Sund y Falk-Petersen, (2005) recomiendan 150 ppm de glutaraldehído para el caso de huevos de la carpa *Anarhichas minor*.

2.9 Trabajos de incubación en pargo

No se tiene un registro estricto de incubación de los huevos en especies de pargo, si no lo que se ha hecho de manera general durante la reproducción y cría de algunas especies. Por ejemplo, para los huevos de la especie *L. analis*

fueron incubados a una temperatura de 27.7 °C, eclosionando 17 hr después de la fertilización. Al día 2 post eclosión la densidad de larvas fue de 8.61 larvas/l, los huevos fueron colectados del desove y transferidos a 3 tanques de 500 l c/u (1 a 2 horas después de la fertilización) con una densidad de 10.5 H/l (Watanabe *et al.*, 1998). Mientras que los huevos de pargo (*L. argentimaculatus*) fueron transferidos a 6 tanques circulares de fibra de vidrio con capacidad de 4 toneladas; fueron previamente incubados en una malla (350 μ m) equipadas con un sistema de aireación para mantener los huevos en suspensión. Los huevos fueron mantenidos a una densidad de 5-16.4 H/l, 10 horas después de la fertilización. Las condiciones de incubación y cultivo fueron con una salinidad de 30 ± 2 ppm. Con un rango de temperatura de 24 a 30 °C, manteniendo el agua como un sistema estático y con aireación suave. Se obtuvieron larvas con una longitud total de 1.62 – 1.94 mm y en el cultivo de 50 días se obtuvo una longitud de 49.4 ± 4.3 mm y una supervivencia del 21.1 % (Leu *et al.*, 2003). Para los huevos de pargo (*L. johni*), la transferencia de los huevos al tanque de cultivo de larvas es efectuada de 1 a 2 hr antes de la eclosión. Durante este proceso, la aireación en los tanques de incubación es suspendida por 15 a 20 min. Para separar los huevos flotantes de los viables; El cultivo de los huevos es realizado en tanques circulares de fibra de vidrio con capacidad de 5 m³ operando a 4 m³ de agua con una densidad de 80-100 H/l con aireación suave considerando los siguientes parámetros físico-químicos: temperatura de 27.7 – 30 °C, salinidad de 30 ppm, oxígeno disuelto de 6.6 – 8.0 mg/l y un pH de 7.85 – 8.17, (Lim *et al.*, 1985). Otro estudio realizado por Ogle y Lotz, (2006) para pargo *Lutjanus campechanus* demuestra que se obtiene una supervivencia del 16.5 % en el cultivo de estas larvas, para tal resultado fueron utilizados 4 tanques de fibra de vidrio con un volumen de 1,000 l de agua. 10,000 larvas fueron transferidas del tanque de incubación de huevos a los de cultivo larvario donde la variación de supervivencia para cada tanque individual fue de 1 a 31 %. Utilizaron una densidad de siembra de 5000 H/l. Finalmente Vernon Minton *et al.*, (1983) obtuvieron huevos y esperma de *L. campechanus* previamente inducidos hormonalmente mediante “striping” y los

gametos se fertilizaron en una cacerola plástica de 35 cm x 30 cm x 15 cm a la cual se le adiciono 300 ml de agua de mar a una salinidad de 28 a 44 ppm. Se dejaron reposar durante 3 a 4 min y posteriormente se vaciaron dentro de un eclosionador de 7.6 l (incubadora de jarra Mac Donald) a una densidad de 400 H/l y manteniéndose con flujo de 0.5 l/min. La eclosión ocurrió 20 hr post fertilización a una temperatura de 27 °C con un porcentaje de eclosión del 70 % y una longitud total de 1.5 mm de las larvas eclosionadas.

3. JUSTIFICACIÓN

En México se encuentran en proceso de desarrollo el cultivo de peces marinos (pargo, botete, cabrilla, jurel y atún entre otros). El objetivo final de todas estas investigaciones es el de abastecer juveniles de manera continua, para que se desarrolle el cultivo de peces a escala comercial. Bajo este contexto, se entiende que los estudios biológicos para desarrollar la tecnología de cultivo para una especie en particular son amplios. Por lo tanto, en el presente estudio los esfuerzos se han encaminado hacia la masificación durante el proceso de incubación de huevos del pargo flamenco. Dicha necesidad de producción masiva de larvas de peces, requiere de mejorar las técnicas de incubación, que por lo general son cultivos intensivos y con frecuencia resultan en condiciones favorables para el crecimiento microbiano donde estos pueden afectar negativamente los porcentajes de eclosión e incluso estar relacionados con altas mortalidades de los huevos de peces marinos. Por lo tanto el objetivo principal se enfocó en determinar el efecto de diversos factores durante el periodo de incubación de los huevos; como es el caso de densidades de siembra, flujo de agua y tratamiento profiláctico de los huevos tratando de mejorar los porcentajes de eclosión, tamaño de larvas y supervivencia de larvas hasta el inicio de la primera alimentación.

4. HIPÓTESIS

Densidades de 250 H/l con flujo del 30 % de recambio de agua por hora y previamente tratados profilácticamente mejoran los porcentajes de eclosión y supervivencia de larvas del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* en incubadoras de 100 litros.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto del flujo de agua, densidad y tratamiento profiláctico durante el periodo de incubación y hasta las 48 horas post-eclosión sobre los porcentajes de eclosión, supervivencia y tamaño de larva del pargo flamenco.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar si el flujo de agua de 0.5 ℓ /min en incubadoras de 100 litros mejora la obtención de larvas viables del pargo flamenco *L. guttatus*.
- Determinar la eficiencia de incubación del pargo flamenco a concentraciones de 250 y 1000 H/ ℓ en incubadoras cónicas mediante la evaluación de larvas viables obtenidas.
- Evaluar la eficiencia del uso de un tratamiento profiláctico (formalina 10 ppm) aplicado previo a la incubación, sobre la supervivencia de larvas viables del pargo flamenco.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán, Sinaloa (CIAD). Los reproductores de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), que se emplearon para el presente trabajo de investigación, fueron capturados en Sayulita, Nayarit en los meses de mayo - junio del 2004 y se mantuvieron en cautiverio bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura. Los huevos utilizados durante el periodo de trabajo fueron obtenidos por desoves naturales, durante los meses de julio a diciembre del 2006.

6.1 Mantenimiento de reproductores

Los reproductores se mantuvieron en dos tanques (B1 y B2) de 3.5 m de diámetro y 2 m de altura con 18 m³ de capacidad (Figura 3a). El agua de mar fue obtenida de playa Cerritos a través de una bomba de 10 hp, con una distancia 600 m desde la playa hasta 2 tinacos rotoplas negros con capacidad de 10m³ puestos sobre una base de concreto de 4 x 2 x 3 metros. Posteriormente el agua pasa por gravedad a todo el sistema de agua salada distribuido en el centro de investigación CIAD. El tanque de reproductores se mantuvo con un flujo de 4-6 recambios al día y con una fuerte aireación (60 l/min a 0.17 barómetros de presión).



Figura 3. (a) Tanque de reproductores (b) Reproductores.

6.1.1 Alimentación y preparación de la dieta. Desde que los peces se colocaron en los tanques B1 y B2 en julio del 2004, fueron alimentados con una dieta hecha en el laboratorio que consistió en una mezcla de 15 % de pescado oleaginoso principalmente barrilete (*Katsuwonus pelamos*) y 50 % de calamar congelado, así como el 35 % de harina comercial INVE que contenía 40 % de proteína y 12 % de lípidos. Durante este periodo los peces se alimentaron una vez al día y 6 días por semana a razón del 3 % del peso corporal. Mientras que de julio 2005 a diciembre 2006 los peces fueron alimentados con una mezcla de pescado oleaginoso, calamar y camarón en proporciones iguales, junto con 0.3

% de vitamina C, 0.1 % vitamina E y 6 % de aceite de arenque, alimentándose una vez al día y 6 días a la semana a saciedad (Figura 4).



Figura 4. Alimentación de los reproductores.

6.1.2 Limpieza de tanques. La limpieza de los tanques se realizó dos horas después de que se alimentó, para excluir del tanque los residuos de la alimentación. Se usó un sifón hecho de PVC de $\frac{3}{4}$ de pulgada, 3 m de largo y con una manguera en el extremo superior para la salida del agua sucia; esto permitió limpiar los residuos del fondo, principalmente desechos de alimento, cáscaras de camarón, escamas de los reproductores y excretas; eliminando así el posible sustrato para bacterias y parásitos.

Para una limpieza completa, el nivel del tanque se bajó gradualmente conforme se realiza la limpieza de las paredes utilizando un cepillo. Una vez limpio el tanque se mantuvieron abiertos tanto la entrada como la salida de agua para que los residuos en el agua salgan por completo, ya que se limpió paredes y fondo del tanque, se recuperó el nivel a las condiciones normales de mantenimiento.

6.2 Sistema de colecta de huevos

El sistema de suministro de agua al tanque esta conformado por un tubo de PVC de 2 pulgadas que va directamente al fondo del tanque (Figura 5a). A 25 cm de la superficie del tanque se encuentra una perforación de 2 pulgadas (Figura 5b) y de este, un tubo en codo (Figura 5c), los cuales permiten la salida de agua que va directamente al colector con capacidad de 60 litros (Figura 5d). Las colectas de huevos se realiza por medio del sistema de rebozo ya mencionado anteriormente a través del cual se desborda el agua y cae a los colectores, que son cubetas de 20 litros con perforaciones a los costados cubiertos por mallas de 500 μm para retener los huevos (Figura 5e). Las cubetas de colecta fueron colocadas dentro del colector de 60 litros que permite mantener flotando la cubeta, la cual retiene los huevos que están saliendo por rebozo hacia el colector.

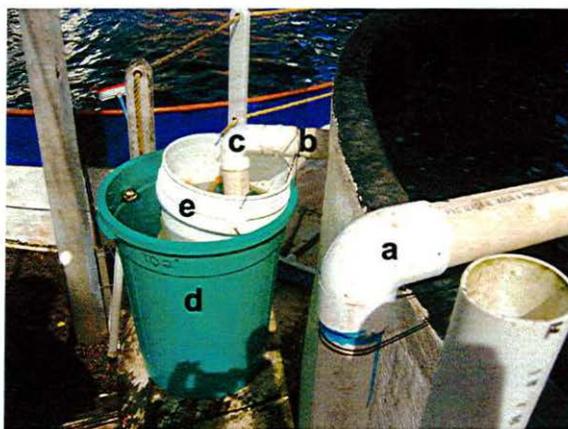


Figura 5. Sistema de colecta: (a) Entrada principal de agua al tanque (b) Salida de rebozo para facilitar la colecta (c) Tubo para lograr que la caída de agua sea dentro del colector de huevos (d) Colector de 60 litros (e) Colector con malla de 500 μm , con capacidad de 20 litros

6.2.1 Colecta de huevos. Para la colecta se utilizó una red de acuario (ACUATIC ECO-SISTEM) con una luz de malla de 1/64 pulgadas, la cual se pasó lentamente por la superficie del tanque para colectar los huevos remanentes que aún quedaban dentro del tanque. Los huevos colectados de la superficie del tanque, fueron puestos en un vaso de 1 litro el cual se llenó previamente con agua del mismo tanque de desove. Una vez que la colecta en la superficie del tanque fué nula o insignificante entonces se procedió a colectar los huevos retenidos en la cubeta colectora.

La cubeta se extrajo del colector de 60 litros y se pasó inmediatamente al tanque de desove, procediendo a concentrar los huevos en el menor volumen de agua posible dentro de la cubeta; para posteriormente, con la malla de acuario pasar los huevos al vaso de 1 litro, repitiendo esto hasta estar seguros de haber colectado todos los huevos. Después de dejarlos reposar ± 3 minutos, se pasaron a la malla colectora y esta se introdujo en el vaso de 1 litro para transportarlos al laboratorio y realizar su evaluación (Figura 6a).

Inmediatamente después de la colecta se procedió a medir el volumen de la colecta en una probeta de 500 ml, para esto se adicionó un poco de agua a la probeta, y posteriormente se transfirieron los huevos de la malla a la probeta (Figura 6b). Una vez puestos los huevos en la probeta, se dejaron aproximadamente de 5 a 7 minutos para que se separaran; para así medir el volumen flotante y el volumen no flotante (Figura 6c). Para el cálculo del número de huevos se utilizó la siguiente formula:

$$E = -18.648 D + 16645; P = 0.05, r^2 = 0.9013$$

Donde E es el número total de huevos en 1 ml y D es el diámetro promedio de 50 huevos (Ibarra y Álvarez-Lajonchere, in press). De los huevos flotantes se tomó una muestra ± 0.1 ml y se colocó en un portaobjetos. Posteriormente bajo el microscopio óptico OLIMPUS CX31 se procedió a contar embriones vivos y

huevos no fertilizados con un contador manual (Counting Devices, Inc) para determinar así el porcentaje de fertilización.

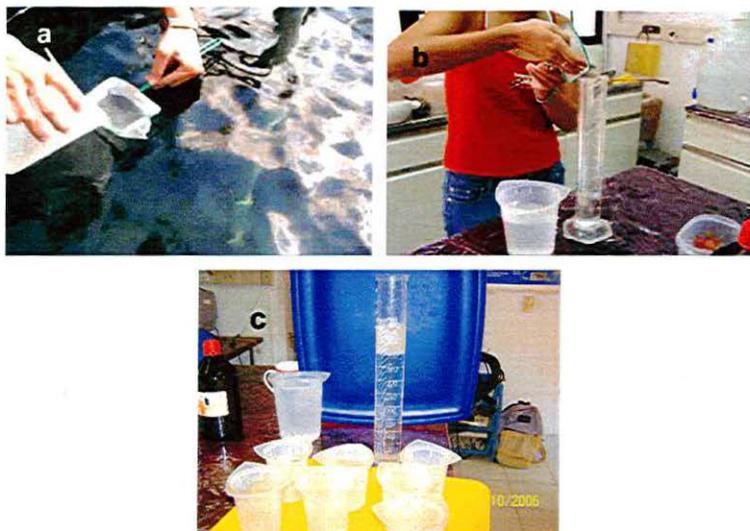


Figura 6. (a) Colecta de huevos (b) Traspaso de huevos colectados a la probeta de 500 ml (c) Medición del volumen total colectado.

Posterior a la colecta de los huevos se realizó la limpieza de colectores, poniéndolos una hora en agua con hipoclorito de sodio, para realizar su desinfección, posteriormente se enjuagaron con agua dulce y se pusieron al sol. El sistema de colecta se colocó en el tanque de desove al atardecer ya que los hábitos de desove natural del pargo flamenco al igual que la mayoría de las especies de la familia Lutjanidae, son desovar durante la noche.

6.3 Diseño experimental

Se probaron tres tratamientos de incubación de huevos utilizando seis incubadoras de fibra de vidrio cónicas con capacidad de 100 litros. Cada tratamiento se realizó por separado, teniendo tres repeticiones por tratamiento y repetición de tres veces el mismo tratamiento:

- (a) Incubación de huevos utilizando tres incubadoras con flujo 0.5 litros/minuto y tres incubadoras sin flujo, a una densidad de 250 huevos/litro.
- (b) Incubación a dos diferentes densidades, tres incubadoras con 250 H/l y tres incubadoras con 1000 H/l, ambos tratamientos sin flujo.
- (c) Incubación de huevos con tratamiento profiláctico (formalina a una concentración de 10 ppm), tres incubadoras con huevos tratados y tres incubadoras con huevos sin tratamiento profiláctico, incubando a una densidad de 250 H/l y sin flujo.

6.4 Registro de parámetros durante los experimentos

Se registraron parámetros ambientales al momento de siembra y posteriormente cada 24 horas, tomando como referencia la hora de siembra; hasta las 48 horas de incubación. Los parámetros medioambientales registrados fueron temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación. Se utilizó un oxímetro YSI 550^a, para medir temperatura, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación, para el caso de salinidad se utilizó un refractómetro VITAL-SINE SR-6 escala 1-100 ppm (Figura 7). Se realizó el mismo procedimiento para todos los experimentos.

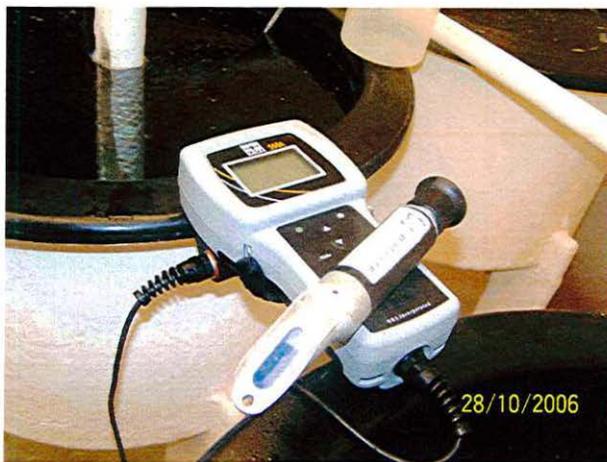


Figura 7. Refractómetro y espectrómetro para la toma de parámetros.

6.5 Incubación con flujo y sin flujo

Se usaron 6 incubadoras de fibra de vidrio de color negro, con base cónica y una capacidad de 100 litros, las cuales se instalaron dentro de la hatchery del CIAD, Mazatlán (Figura 8 II). Las incubadoras designadas con flujos de 0.5 litros/min fueron la 1, 2 y 3 donde se les colocó un filtro a cada incubadora; los filtros utilizados se hicieron con malla de 100 μm que cubrieron un tubo de PVC de 2 pulgadas y 40 cm de largo, y las incubadoras utilizadas para el tratamiento sin flujo fueron las designadas con los números 4, 5 y 6. Se midió la entrada y salida de agua de la incubadora utilizando un cronómetro Sper Scientific 810015 y un vaso graduado de 1 litro de capacidad.

El suministro de agua principal se obtuvo de la red de cultivo larvario la cual es tratada previamente por un sistema de UV EMPEROR AQUATICS Inc. Modelo COM6260-STD de 260 Watt de 4 lámparas; a un tanque rotoplas de 500 litros puesto en una plataforma con altura de 2 metros (Figura 8 Ia). Al tanque rotoplas se le colocó una manguera de rebozo para mantener siempre el mismo

volumen dentro del tanque, con el objetivo de mantener una presión constante en el sistema distribuidor de agua (Figura 8 Ib). Al mantener siempre el tanque a su máxima capacidad, se mantuvo la misma presión y por consecuencia los flujos constantes en las incubadoras.

A cada incubadora se le suministro el agua por medio de una manguera de plástico transparente de 1 pulgada conectada al fondo del tanque rotoplas de 500 litros (Figura 8 Ic) y de la manguera paso a un sistema de tubería de PVC de 1 pulgada a cada incubadora (Figura 8 II).

El sistema de aireación para todas las incubadoras durante el proceso de los experimentos consistió en una conexión por medio de una tubería de PVC de ½ pulgada proveniente de la red general de aireación del centro de investigación. Posteriormente se suministro aire a cada una de las incubadoras por medio de mangueras de 3/16 pulgadas y cada uno con una piedra difusora de aire (Figura 8 II).



Figura 8. (I) Tanque de suministro de agua para las incubadoras: (a) Manguera de suministro principal, (b) Manguera de rebozo, (c) Manguera de suministro para las incubadoras. (II) Disposición de Incubadoras, sistema de distribución de agua y aire.

6.6 Incubación a dos diferentes densidades

Para el efecto de densidad durante el periodo de incubación se usaron las mismas 6 incubadoras del tratamiento anterior, las cuales también utilizaron el mismo sistema de agua y aireación. Para este experimento se mantuvieron los

flujos cerrados. El diseño experimental fue para probar dos densidades de siembra: la primera de 1000 huevos por litro sembrados en las incubadoras 1, 2 y 3 y una segunda de 250 huevos por litro en las incubadoras 4, 5 y 6; manteniéndolas con aireación constante durante el proceso (figura 8 II).

6.7 Incubación con tratamiento profiláctico y sin tratamiento profiláctico

Se usó formalina a una concentración de 10 ppm en agua salada, para las siembras de las incubadoras 1, 2 y 3, y la incubación sin tratamiento profiláctico se realizó en las incubadoras 4, 5 y 6 (figura 8 II).

6.7.1 Tratamiento de los huevos. En tres vasos de 250 ml se vertieron 150 ml de la solución de formalina a una concentración de 10 ppm (tratamiento) y en otros tres se colocó agua salada (sin tratamiento), se tomaron 10 ml de los huevos flotantes con una pipeta de precisión Finn timer R de 1-5 ml (Figura 9a y 9b), para cada uno de los seis vasos; los vasos se mantuvieron con aire durante una hora, utilizando una bomba Resune® air-pump AC-9602. Para medir el tiempo se utilizó un cronómetro Sper Scientific 810015. Después de una hora, cada vaso con huevos tratados y sin tratar fueron tamizados utilizando un tamiz de 80 μm y lavados con agua esterilizada. Posteriormente los huevos se regresaron al vaso con agua salada esterilizada y fueron puestos a incubar.



Figura 9. (a y b) Toma de muestras de huevos para la siembra.

6.8 Procedimiento de la toma de muestras utilizado en todos los experimentos

Al día siguiente de la incubación de los huevos y utilizando un vaso de 250 ml se tomaron 4 muestras de 4 puntos diferentes de cada incubadora; después de homogenizar el tanque con una fuerte aireación, las muestras se tamizaron con una malla de 80 μm y se pusieron en 4 cajas de petri por separado (Figura 10a y b).

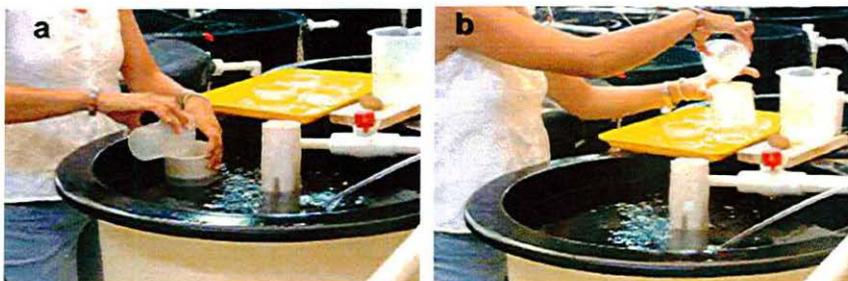


Figura 10. (a y b) Toma de muestras de larvas.

En el Laboratorio de Genética y Reproducción de Peces del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán, se acondicionó una caja negra de madera con luz interior suministrada por 4 focos de 60 watts para observar las larvas a contra luz (Figura 11a).

6.9 Calidad de larvas

Con una pipeta Pasteur se fueron separando larvas normales, larvas deformes, larvas muertas y huevos muertos, llevando la contabilidad utilizando un contador manual, Counting Devices, Inc (Figura 11 b).

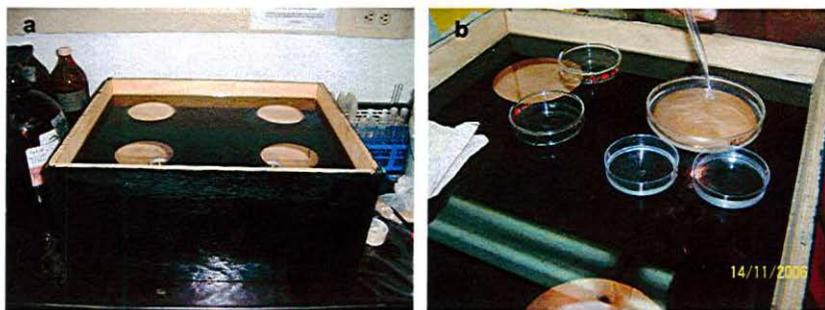


Figura 11. (a) Caja negra (b) conteo y separación de larvas.

6.9.1 Criterio para la separación de larvas

6.9.1.1 Larvas normales. Fueron contabilizadas todas aquellas larvas vivas que presentaron una estructura corporal perfectamente recta (Figura 12 a).

6.9.1.2 Larvas deformes. Fueron contabilizadas todas aquellas larvas vivas que presentan torsión de cuerpo y por lo tanto presentaron dificultad al nadar (Figura 12 b).

6.9.1.3 Larvas muertas. Fueron contabilizadas todas aquellas larvas que vistas al microscopio presentan ausencia de pulsaciones del corazón o que a simple vista presenta un color blancuzco y no transparente (Figura 12c). Se realizó el mismo procedimiento para el conteo a las 48 horas, tomando como larvas muertas todas aquellas larvas sin movimiento y sin latido de corazón, con la característica principal de que poseían ojos pigmentados para evitar así, contabilizar larvas muertas del momento de eclosión (Figura 13).

6.9.1.4 Huevos. Todos los huevos que se encontraron como no eclosionados al momento de medir eclosión fueron considerados como huevos muertos (Figura 12a).

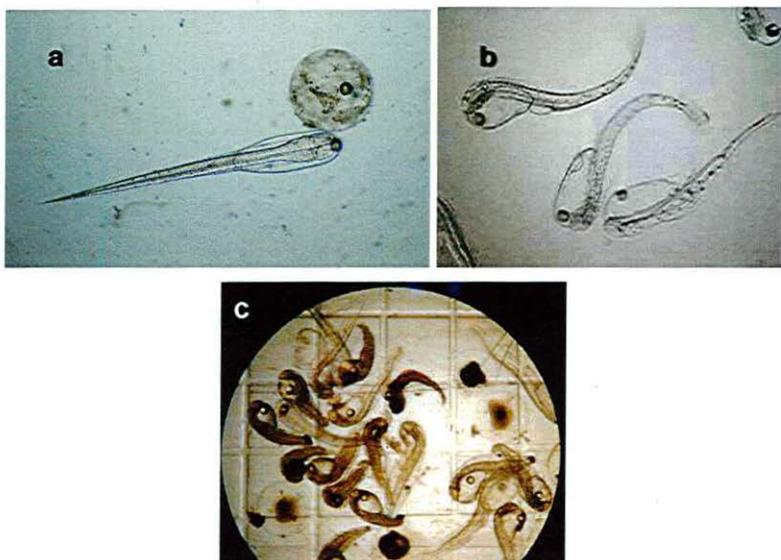


Figura 12. (a) Larva normal y huevo no eclosionado, (b) Larvas deformes y (c) Larvas muertas.

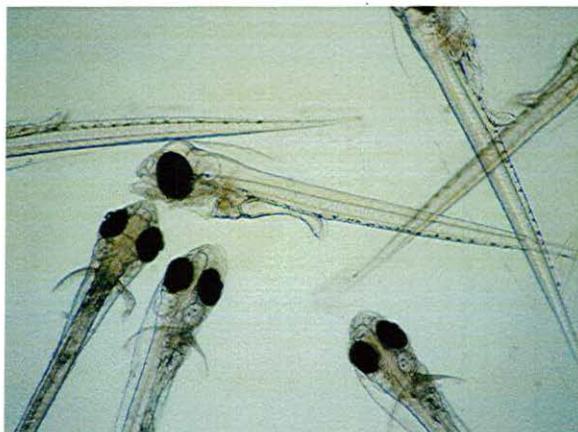


Figura 13. Larvas a las 48 horas de la eclosión.

6.9.2 Evaluación de variables

6.9.2.1 Calculo de variables al momento de la eclosión

$$A) \% \text{ de Eclosión} = \left(\frac{LV + LM}{LV + LM + H} \right) X (100)$$

$$B) \% \text{ de Supervivencia} = \left(\frac{LV}{LV + LM} \right) X (100)$$

$$C) \% \text{ de Larvas Normales} = \left(\frac{LN}{LV} \right) X (100)$$

$$D) \% \text{ de Larvas Deformes} = \left(\frac{LD}{LV} \right) X (100)$$

Donde:

LV: Larvas Vivas

LM: Larvas Muertas

LD: Larvas Deformes

H: Huevos

6.9.2.2 Calculo de variables a las 48 horas post-eclosión

$$A) \% \text{ de Supervivencia} = \left(\frac{LV_{48}}{Hs} \right) X (100)$$

$$B) \% \text{ de Larvas Normales}_{48} = \left(\frac{LN_{48}}{LV_{48}} \right) X (100)$$

$$C) \% \text{ de Larvas Deformes}_{48} = \left(\frac{LD_{48}}{LV_{48}} \right) \cdot X (100)$$

Donde:

LV₄₈: Larvas Vivas a las 48 horas post-eclosión

H_s : Huevos Sembrados

LD₄₈: Larvas Deformes a las 48 horas post-eclosión

LN₄₈: Larvas Normales a las 48 horas post-eclosión

6.9.2.3 Tamaño de larvas. De las larvas vivas normales al momento de la eclosión y a las 48 hr post-eclosión, se midieron 25 larvas de cada repetición (75 por tratamiento) en un microscopio óptico OLIMPUS CX31 con aumento de 40 X, el objetivo cuenta con un micrómetro ocular integrado donde cada unidad de medición equivale a 0.025 µm. Para realizar la medición, las larvas fueron anestesiadas previamente con una pequeña gota de 2- Phenoxyethanol, para evitar que se movieran y hacer mas fácil la determinación de la longitud total de las larvas (Figura 14 a). Para esto es necesario realizar desenfocajes para descubrir donde termina la aleta caudal ya que esta es completamente transparente en esta etapa del desarrollo (Figura 14 b).

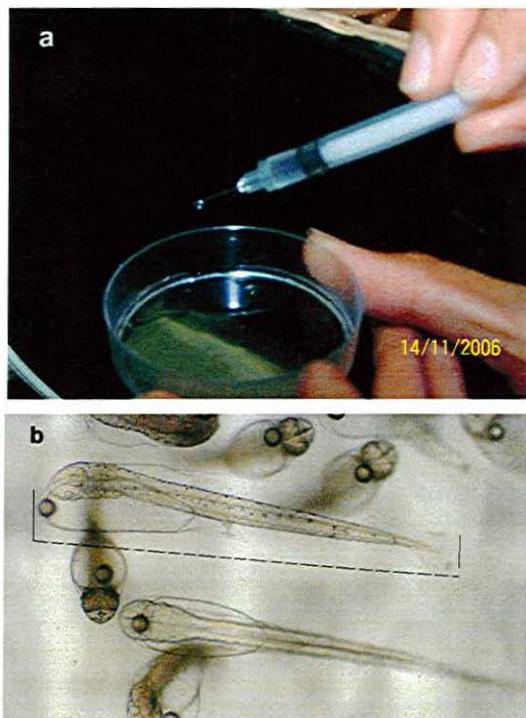


Figura 14. (a) Gota de anestésico para la medición de larvas (b) Larvas al microscopio.

6.10 Análisis estadístico de los datos

Todos los datos fueron procesados estadísticamente utilizando el software SigmaStat 3.1 para Windows. Los resultados se presentan como \pm la desviación estándar y para el caso de longitud de larvas de pargo se presenta como el error estándar de la media. La homogeneidad de las varianzas y distribución normal de los datos fueron realizados siguiendo los procedimientos estadísticos del software. En el caso de datos paramétricos las diferencias entre los tratamientos fueron analizados por el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y cuando este fue significativo se continuó con una prueba de comparación múltiple (Tukey). Para datos no paramétricos se realizó un (ANOVA) de rangos

Kruskal-Wallis y cuando este fue significativo se continuó con la prueba de comparación múltiple (Método de Dunn's). Las diferencias estadísticas significativas fueron reportadas cuando ($p < 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1 Calidad de huevos usados en los procedimientos de incubación

Durante los experimentos de el presente trabajo de investigación (incubación de huevos con flujo de agua (0.5 l/min) y sin flujo, incubación a 500 H/l y 1000 H/l, tratamiento profiláctico con formalina y sin formalina), se utilizaron huevos obtenidos por desoves naturales en condiciones de cautiverio en el periodo comprendido de julio a diciembre del 2006. El número de huevos totales obtenidos por desove durante el tiempo de experimentación varió de 237,669 huevos a 871,316 huevos. Mientras que el porcentaje de viabilidad de los desoves fluctuó entre 92 % y 99 % con un promedio de 96.49 ± 2.32 %. Por otro lado el porcentaje de fertilización promedio en huevos flotantes fue de 96.47 ± 6.25 %, con un mínimo del 85 % y un máximo de 100 %, mientras la fertilización general de todos los desoves utilizados en los experimentos fue de 93.13 ± 6.83 %. El diámetro de huevo varió de 718 ± 12.41 a 757 ± 11.34 μm con un promedio de 742.4 ± 12.94 μm , con una gota de aceite de 125 a 125 ± 4.95 μm (tabla 1).

Tabla 1. Descripción de la calidad de huevos utilizados durante cada uno de los experimentos.

		Huevos Totales	Huevos Flotantes	Fertilización En huevos flotantes	Diámetro Huevo (μm)	Diámetro Gota de aceite (μm)	Fertilización total (%)
Flujos	Exp 1	237669	227902	100	718 ± 12.41	125	96
	Exp 2	372002	342242	100	733.5 ± 16.45	125	92
	Exp 3	270817	267841	100	733 ± 11.78	125	99
Densidades	Exp 1	590969	576555	100	738 ± 13.59	125	98
	Exp 2	636014	627646	100	743.5 ± 14.12	125	99
	Exp 3	871316	858114	100	751.5 ± 14.65	125	98
Tratamientos	Exp 1	487494	474666	86	755 ± 15.15	125 ± 4.95	84
	Exp 2	332956	314604	85	752.5 ± 13.60	125 ± 4.95	80
	Exp 3	252846	240204	97	757 ± 11.34	125	92

7.2 Parámetros fisicoquímicos

7.2.1 Tratamientos con flujo (0.5 ℓ/min) y sin flujo Los parámetros fisicoquímicos del agua registrados durante los experimentos de incubación de huevos, utilizando 3 incubadoras con flujo de 0.5 litros por minuto y tres incubadoras sin flujo; mostraron que la salinidad se mantuvo constante en 35 ppm durante los 3 experimentos de ambos tratamientos. Mientras que la temperatura promedio \pm desviación estándar para los experimentos 1, 2 y 3 con flujo, fué de 29.83 ± 0.14 °C, 28.84 ± 0.68 °C y 29.16 ± 0.41 °C respectivamente. En las incubadoras sin flujo los promedios fueron 29.3 ± 0.31 °C, 28.23 ± 0.70 °C y 28.42 ± 0.39 °C para los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente. Los promedios del tratamiento sin flujo fueron ligeramente menores respecto a los experimentos con flujo, presentando diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p < 0.001$). Por otro lado los promedios de oxígeno disuelto \pm desviación estándar, se mantuvieron entre 4.37 ± 0.74 ppm y 4.50 ± 0.30 ppm durante los 3 experimentos con flujo, mientras que en las incubadoras sin flujo el promedio varió de 4.76 ± 0.31 ppm a 4.99 ± 0.42 ppm durante los tres experimentos. Finalmente el porcentaje promedio de saturación de oxígeno \pm desviación estándar, durante los experimentos con flujo fué de 69.17 ± 3.36 % y para los experimentos sin flujo 77.60 ± 3.58 % (Tabla 2).

7.2.2 Incubación a 1000 H/ℓ y a 250 H/ℓ. Para los experimentos de densidades (1000 H/ℓ y 250 H/ℓ), mostraron que la salinidad varió entre 34 y 35 ppm para los tres experimentos de cada tratamiento. Mientras que los promedios de temperaturas \pm desviación estándar, registradas durante los experimentos 1, 2 y 3 para la densidad de 1000 H/ℓ fué de 28.16 ± 0.83 °C, 27.92 ± 0.88 °C y 26.48 ± 1.45 °C respectivamente. Para los experimentos 1, 2 y 3 con densidad de 250 H/ℓ fueron 27.89 ± 0.83 °C, 27.83 ± 0.83 °C y 26.24 ± 1.47 °C respectivamente; no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.430$) entre las temperaturas de los dos tratamientos. El promedio general de

oxígeno disuelto \pm desviación estándar, para los experimentos con densidad de 1000 H/l varió de 4.37 ± 0.37 mg/l a 4.80 ± 0.20 mg/l; mientras que para los experimentos con 250 H/l el promedio general varió de 4.40 ± 0.23 mg/l a 4.58 ± 0.31 mg/l. Por último el porcentaje de saturación de oxígeno \pm desviación estándar, varió desde 64.62 ± 4.22 % a 74.89 ± 4.86 % para los experimentos con 1000 H/l y de 62.85 ± 3.19 a 69.27 ± 5.42 % para los experimentos con 250 H/l (Tabla 3).

Tabla 2. Parámetros del agua durante los experimentos de flujos.

Experimento 1																												
Incubadoras con flujo												Incubadoras sin flujo																
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6								
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Temperatura (°C)	30	29.8	29.7		30	29.9	29.7		29.9	29.9	29.6		29.7	29.4	29.1		29.7	29.3	29		29.7	29.2	28.9		29.7	29.2	28.9	
Oxígeno Disuelto (mg/l)	5.22	3.71	4.8		5.27	3.65	4.04		5.2	3.49	3.94		5.62	4.7	4.69		5.6	4.88	4.78		5.27	4.42	4.97					
Porcentaje de saturación																												

Experimento 2																												
Incubadoras con flujo												Incubadoras sin flujo																
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6								
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Temperatura (°C)	29.3	28.5	29.6	27.8	29.2	28.6	29.6	27.9	29.3	28.7	29.6	28	29.1	28	28.7	27.4	29.1	27.9	28.5	27.3	29.2	27.9	28.4	27.3				
Oxígeno Disuelto (mg/l)	4.17	4.67	4.21	4.63	4.55	4.76	4.66	5.03	4.44	4.13	4.04	4.65	4.32	4.88	4.72	4.49	4.62	4.98	5.21	5.13	4.63	4.87	4.25	4.99				
Porcentaje de saturación				69.9				73				69.8				67				79.2				79.9				

Experimento 3																												
Incubadoras con flujo												Incubadoras sin flujo																
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6								
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Temperatura (°C)	28.7	29.2	29.9	28.7	28.8	29.2	29.7	29	28.9	29.1	29.7	29	28.8	28.3	28.7	27.9	28.8	28.2	28.7	27.9	28.9	28.2	28.7	27.9				
Oxígeno Disuelto (mg/l)	4.3	4.45	4.19	4.87	4.46	4.43	4.4	4.58	4.55	4.15	4.43	4.6	4.98	4.86	4.9	5.42	5.09	4.91	5.07	5.05	4.98	4.86	4.88	4.79				
Porcentaje de saturación	69.1	66.3	63.6	65.4	70.7	69.5	68.6	72.7	62.9	72.5	69.5	74	79.1	81.6	77.4	78.3	80.9	77.3	76	75.9	81.5	77.7	74.7	77.5				

Tabla 3. Parámetros del agua durante los 3 experimentos de densidades.

DENSIDADES																								
Experimento 1																								
1000 H/l												250 H/l												
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6				
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	35	35	34	34	35	35	34	34	35	35	34	34	35	35	34	34	35	35	34	34	35	35	34	34
Temperatura (°C)	29.4	28.5	28.4	27.1	29.3	27.9	28	27.2	29.3	27.7	27.9	27.2	29.2	27.6	27.7	27.1	29.2	27.5	27.7	27.1	29.2	27.5	27.8	27.1
Oxígeno Disuelto (mg/l)	4.65	4.56	4.66	5.09	4.95	5.15	4.74	4.81	4.8	4.89	4.87	4.46	4.66	4.71	4.82	4.74	4.73	5.06	4.29	4.45	4.14	4.92	4.32	4.13
Porcentaje de saturación	79.3	76.1	64.7	77	79.1	77.4	68.4	75.1	73	82	75	71.6	76.2	75.2	72.4	69.1	68.5	72.3	68.2	62.9	68.6	75.7	60.3	61.8

Experimento 2																								
1000 H/l												250 H/l												
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6				
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	34	34	35	35	34	34	35	35	34	34	35	35	34	34	35	35	34	34	35	35	34	34	35	35
Temperatura (°C)	29.3	28	27.3	27	29.3	28.1	27.3	27.1	29.1	28	27.3	27.2	29.1	27.9	27.2	27.1	29.1	27.9	27.3	27.1	29.1	27.9	27.2	27.1
Oxígeno Disuelto (mg/l)	4.7	3.89	3.8	4.07	4.64	4.24	4.57	4.21	5.1	4.32	4.31	4.59	4.73	4.15	4.4	4.12	4.54	4.47	4.45	4.43	4.21	4.71	5	4.58
Porcentaje de saturación	72.9	72.6	64	72.1	73.1	68.6	60.6	78.1	77.3	67.4	63.5	65.8	78.3	59.8	65.8	72.2	73.9	73.9	65.3	71.7	70.8	59.8	73.7	61.9

Experimento 3																								
1000 H/l												250 H/l												
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6				
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35
Temperatura (°C)	28.5	26.9	26.2	24.7	28.6	26.6	25.9	24.8	28.6	26.4	25.7	24.8	28.5	26.2	25.5	24.8	28.5	26.2	25.5	24.8	28.6	26.1	25.4	24.8
Oxígeno Disuelto (mg/l)	4.48	3.91	4.01	4.57	4.18	3.85	4.71	4.94	4.04	4.43	4.31	5.05	4.59	4.51	4.66	4.32	3.8	4.44	4.38	4.55	4.24	4.26	4.45	4.61
Porcentaje de saturación	74.7	66.5	58.7	62.4	62.8	65.8	64.7	59.4	66.4	67.4	64.8	61.8	56.9	62.7	66.8	62.1	58.8	61.6	63	66.1	60	63.8	66.1	66.3

7.2.3 Tratamiento profiláctico y sin tratamiento. Durante los tres experimentos el tratamiento profiláctico usado en huevos de pargo antes de la incubación fue formalina disuelta en agua salada a una concentración de 10 ppm. La salinidad tuvo un promedio \pm desviación estándar de 35.2 ± 0.56 ppm para los tres experimentos con formalina y los tres experimentos sin formalina. Mientras que el valor promedio \pm desviación estándar, de temperatura registrada para cada uno de los experimentos con tratamiento profiláctico fué de 24.92 ± 1.64 °C, 25.55 ± 1.18 °C y 23.6 ± 1.07 °C y para los experimentos 4, 5 y 6 sin tratamiento profiláctico fué de 25 ± 1.68 °C, 25.53 ± 1.28 °C y 23.76 ± 1.34 °C respectivamente. Entre estas temperaturas no hubo diferencias significativas ($p = 0.888$). El promedio de oxígeno disuelto \pm desviación estándar durante los experimentos varió de 4.92 ± 0.63 a 5.40 ± 0.22 mg/l para los experimentos con tratamiento profiláctico, mientras que para los experimentos sin tratamiento varió de 4.88 ± 0.56 a 5.17 ± 0.24 mg/l. Por último el porcentaje de saturación \pm desviación estándar, que se registró para los experimentos con tratamiento varió de 69.83 ± 8.32 a 75.87 ± 4.05 % y para los experimentos sin tratamiento el rango del porcentaje de saturación fué de 70.21 ± 5.78 a 76.71 ± 4.20 % (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros del agua durante los experimentos de tratamiento profiláctico.

Experimento 1																												
Con tratamiento												Sin tratamiento																
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6								
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35	34	35	35	35
Temperatura (°C)	27.3	24.7	24.1	23.2	27.5	24.9	24.2	23.2	27.5	25	24.2	23.2	27.5	25	24.2	23.2	27.5	25.1	24.2	23.2	27.6	25.1	24.2	23.2	27.6	25.1	24.2	23.2
Oxígeno Disuelto (mg/l)	4.07	5.42	5.53	5.46	4.02	5.02	5.14	5.13	3.82	4.72	5.05	5.68	4.12	5.1	4.55	5.58	3.78	4.86	5.29	5.1	4.34	5.17	5.45	5.18	4.34	5.17	5.45	5.18
Porcentaje de saturación	65.9	70	72.7	77.4	66.7	70.9	79.2	79.9	58.8	70.3	73.4	75.6	60.5	73.2	76	77	59.8	73.2	74	73	65.3	66.6	71.1	72.8	65.3	66.6	71.1	72.8

Experimento 2																												
Con tratamiento												Sin tratamiento																
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6								
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Temperatura (°C)	26.8	26.2	24.4	24.6	27.3	26	24.4	24.7	27.4	25.8	24.4	24.6	27.5	25.7	24.4	24.6	27.5	25.6	24.4	24.6	27.5	25.5	24.4	24.6	27.5	25.5	24.4	24.6
Oxígeno Disuelto (mg/l)	4.15	5.49	5.42	5.62	3.84	5.14	5.05	5.2	3.74	5.23	5.24	5.27	4.02	5.58	4.88	5.25	4.18	5.48	5.27	5.07	4.2	5.58	5.07	4.92	4.2	5.58	5.07	4.92
Porcentaje de saturación	60.4	78.2	73.6	68.4	58.5	77.4	66.8	71.6	55.7	83.2	71.4	72.7	62.8	80.7	73.6	73.9	62.3	84.2	77.7	72.4	64.2	82.1	72.8	68	64.2	82.1	72.8	68

Experimento 3																												
Con tratamiento												Sin tratamiento																
Replica 1				Replica 2				Replica 3				Replica 4				Replica 5				Replica 6								
Día de experimento	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Salinidad (ppm)	35	36	36	36	35	36	36	36	35	36	36	36	35	36	36	36	35	36	36	36	35	36	36	36	35	36	36	36
Temperatura (°C)	25.8	23.2	23.6	23.2	25.9	23.1	23.3	23.2	22.6	23.2	23.1	23.2	25.9	23.1	23	23.1	26	23.1	22.9	23	26	23	22.8	23	26	23	22.8	23
Oxígeno Disuelto (mg/l)	5.32	5.88	5.41	5.59	5.12	5.39	5.35	5.29	5.13	5.32	5.31	5.65	5.05	5.54	5.25	5.21	5.14	5.35	5.18	5.44	4.87	5.11	5.28	4.66	4.87	5.11	5.28	4.66
Porcentaje de saturación	75.4	74.8	83.4	69.6	71.9	80.3	75.6	79.7	70.8	77.1	74.2	77.6	71.7	81.8	82.2	81.9	70.8	76.5	79.8	75	75.8	74.1	79.2	71.7	75.8	74.1	79.2	71.7

7.3 Calidad de larvas

7.3.1 Experimento de flujo (0.5 ℓ/min y sin flujo). Los porcentajes de eclosión mostraron que no hubo diferencias significativas entre las repeticiones ni tampoco entre los experimentos realizados para ambos tratamientos ($p < 0.05$). Al hacer el pool de datos ($n = 36$) por tratamiento, mostraron que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos (Figura 15).

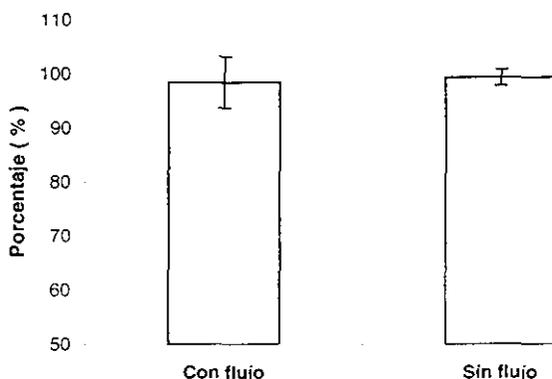


Figura 15. Porcentaje de eclosión. Cada barra muestra el promedio de los datos obtenidos en los tres experimentos ($n = 36$) \pm desviación estándar para cada tratamiento.

Por otro lado el porcentaje de supervivencia mostró que no hubo diferencias significativas entre las repeticiones ni tampoco entre los experimentos realizados para ambos tratamientos ($p < 0.05$). Mientras que al comparar los tratamientos si hubo diferencias significativas ($p = 0.012$) en el porcentaje de supervivencia de larvas al momento de la eclosión y a las 48 horas post-eclosión ($p = 0.040$) (Figura 16).

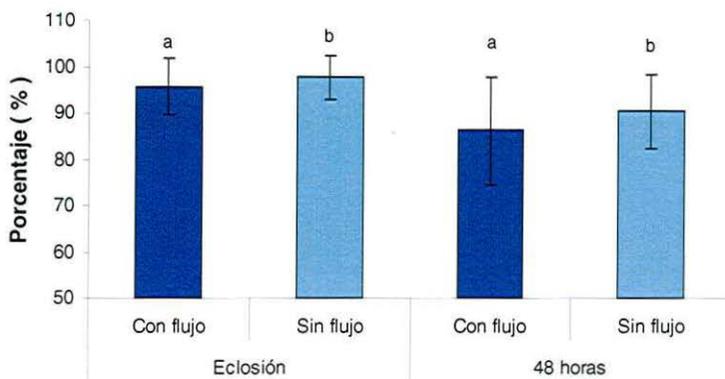


Figura 16. Porcentaje de supervivencia. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ su desviación estándar al momento de la eclosión y el promedio de $n = 9 \pm$ su desviación estándar a las 48 horas post-eclosión respectivamente. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$) en cada etapa del desarrollo.

Los porcentajes de larvas normales y larvas deformes al momento de la eclosión no presentaron diferencias significativas entre las repeticiones de cada experimento, así como tampoco hubo diferencias significativas entre cada uno de los experimentos de cada tratamiento. Tampoco hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Para los porcentajes de larvas normales y larvas deformes a las 48 horas no hubo diferencia significativa entre las repeticiones ($p < 0.05$), pero si hubo diferencias significativas entre los experimentos, principalmente para el tratamiento con flujo donde se encontraron diferencias entre el experimento 1 y 2 ($p = 0.008$) en larvas normales y larvas deformes. Mientras que para el tratamiento sin flujo no hubo diferencia significativa entre los experimentos en ambos casos ($p = 0.056$). Al comparar el efecto de los tratamientos entre experimentos (exp 1 con flujo Vs exp 1 sin flujo; exp 2 con flujo Vs exp 2 sin flujo; exp 3 con flujo Vs exp 3 sin flujo) no hubo diferencias significativas en los porcentajes de larvas normales y larvas deformes ($p < 0.05$) (Figura 17).

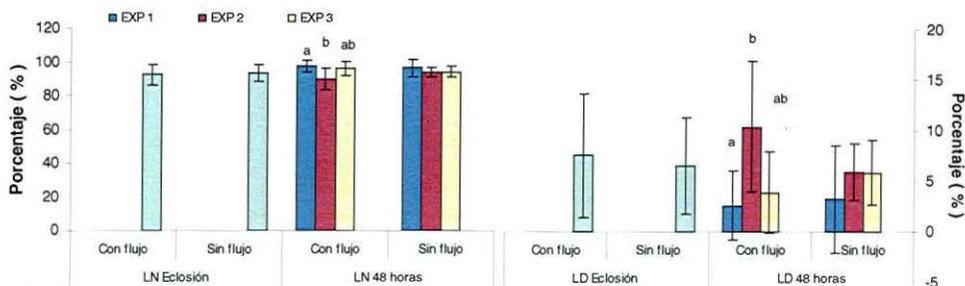


Figura 17. Porcentajes de larvas normales y larvas deformes. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ desviación estándar de cada variable y para cada tratamiento. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre experimentos ($p < 0.05$).

La longitud de larvas de *Lutjanus guttatus* al momento de la eclosión mostraron que no hay diferencias significativas ($p = 0.943$) entre los 3 experimentos que se realizaron con flujo. Mientras que los experimentos sin flujo mostraron que hubo diferencias significativas ($p = 0.004$) entre los experimentos 1 y 3. Al analizar el efecto de los tratamientos comparando experimentos (exp 1 con flujo Vs exp 1 sin flujo; exp 2 con flujo Vs exp 2 sin flujo; exp 3 con flujo Vs exp 3 sin flujo); mostró que hubo diferencia significativa durante el primero ($p = 0.034$) y segundo experimento realizado ($p = 0.023$); pero durante el experimento 3 no hubo diferencias significativas ($p = 0.200$) (Figura 18). Por otro lado la longitud de larvas a las 48 horas post-eclosión fue más variable. Los datos mostraron que hubo diferencias significativas entre la longitud de larvas de los experimentos 1 y 2 del tratamiento con flujo. Mientras que el experimento sin flujo, los 3 experimentos fueron diferentes. Al comparar el efecto de los tratamientos (exp 1 con flujo Vs exp 1 sin flujo; exp 2 con flujo Vs exp 2 sin flujo; exp 3 con flujo Vs exp 3 sin flujo) se encontraron diferencias significativas en los experimentos 2 y 3 ($p < 0.001$) (Figura 19).

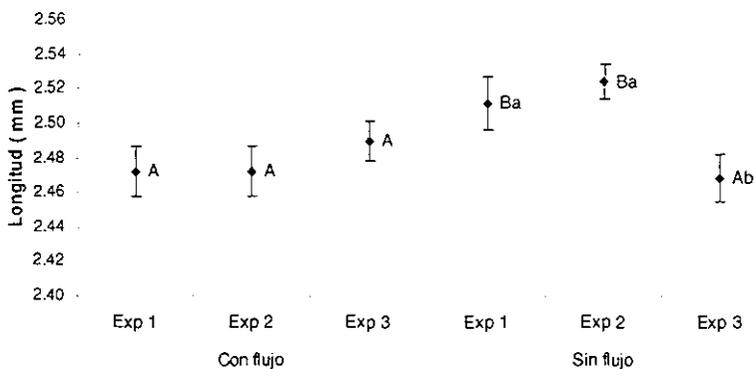


Figura 18. Longitud promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con flujo Vs exp 1 sin flujo; exp 2 con flujo Vs exp 2 sin flujo; exp 3 con flujo Vs exp 3 sin flujo).

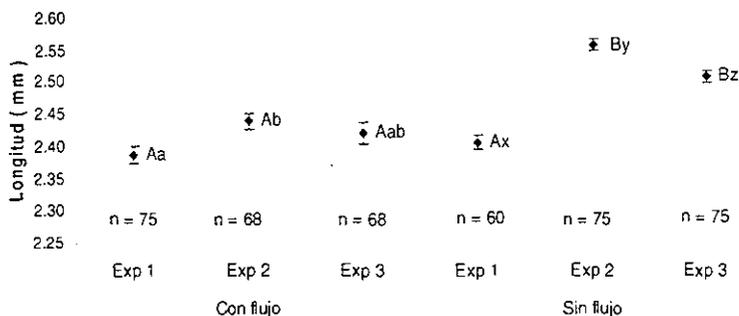


Figura 19. Longitud promedio \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento (con flujo a, b) (sin flujo x, y, z); letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con flujo Vs exp 1 sin flujo; exp 2 con flujo Vs exp 2 sin flujo; exp 3 con flujo Vs exp 3 sin flujo).

7.3.2 Incubación a una densidad de 1000 H/ℓ y 250 H/ℓ. Los porcentajes de eclosión mostraron que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las repeticiones. Por otro lado al comparar los porcentajes de eclosión obtenidos en el experimento 1, 2 y 3, para el tratamiento de 1000 H/ℓ mostró que hubo diferencias significativas ($p < 0.001$). Mientras tanto en la densidad de 250 H/ℓ no hubo diferencias significativas ($p = 0.013$) entre los experimentos 1, 2 y 3. Al comparar el efecto de los tratamientos hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) durante los 3 experimentos realizados (Figura 20).

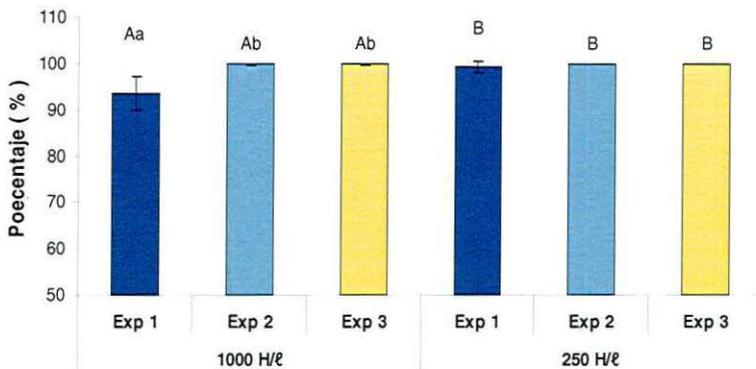


Figura 20. Porcentaje de eclosión. Cada barra muestra el promedio de los datos obtenidos en cada experimento ($n = 12$) \pm desviación estándar para cada tratamiento. Letras minúsculas muestran diferencia significativa entre experimentos de un mismo tratamiento, mientras que letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar entre tratamientos (exp 1 1000 H/ℓ Vs exp 1 250 H/ℓ; exp 2 1000 H/ℓ Vs exp 2 250 H/ℓ; exp 3 1000 H/ℓ Vs exp 3 250 H/ℓ).

Para el porcentaje de supervivencia, se obtuvo que no hubo diferencias significativas entre las repeticiones, ni entre experimentos al momento de la eclosión, ni a las 48 horas post-eclosión en ambos tratamientos ($p < 0.05$). Finalmente al comparar los tratamientos hubo diferencias significativas ($p = 0.042$) al momento de la eclosión, pero no a las 48 horas ($p = 0.804$) (Figura 21).

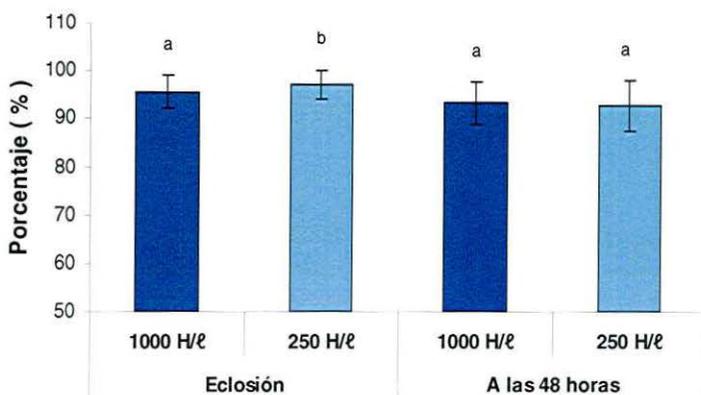


Figura 21. Porcentaje de supervivencia a la eclosión y las 48 horas post-eclosión. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ su desviación estándar al momento de la eclosión y el promedio de $n = 9 \pm$ su desviación estándar a las 48 horas post-eclosión respectivamente. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$) en cada etapa del desarrollo.

Los porcentajes de larvas normales a la eclosión y a las 48 horas mostraron que no hubo diferencias significativas entre las repeticiones, pero si hubo diferencias entre experimentos. Para el tratamiento de 1000 H/l a la eclosión mostró que hubo diferencias significativas entre los experimentos, siendo diferente el experimento 2 del 1 y el 3 ($p = 0.012$), mientras que en la densidad de 250 H/l al momento de la eclosión no mostraron diferencias significativas entre los experimentos ($p = 0.199$). A las 48 horas el porcentaje de larvas normales en el tratamiento de 1000 H/l mostró que hubo diferencias significativas entre los experimentos 1 y 3 ($p = 0.003$), mientras que en el tratamiento de 250 H/l los tres experimentos fueron diferentes ($p < 0.001$). Al comparar el efecto de los tratamientos al momento de la eclosión para larvas normales, mostró que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento de 1000 H/l y 250 H/l, mientras que a las 48 horas post-eclosión durante el experimento 1 la densidad de 1000 H/l fue diferente ($p < 0.001$) del experimento 1 con la densidad de 250 H/l (Figura 22).

Los porcentajes de larvas deformes al momento de la eclosión y a las 48 horas post eclosión, no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las repeticiones, pero si entre los experimentos. El tratamiento de 1000 H/l al momento de la eclosión mostró que el experimento 2 fue diferente del experimento 1 y 3 ($p = 0.012$); por otro lado el tratamiento de 250 H/l al momento de la eclosión no presento diferencias significativas ($p = 0.199$) entre experimentos. Mientras que los porcentajes de larvas deformes a las 48 horas durante el experimento de 1000 H/l presento diferencias significativas entre experimentos, siendo diferente el experimento 1 del experimento 2 y del 3 ($p < 0.001$); así también durante el tratamiento de 250 H/l el experimento que fue diferente el experimento 1 del 2 y del 3 ($p < 0.001$). Al hacer la comparación entre los experimentos de cada tratamiento (exp 1 de 1000 H/l Vs exp 1 de 250 H/l; exp 2 de 1000 H/l Vs exp 2 de 250 H/l; exp 3 de 1000 H/l Vs exp 3 de 250 H/l), al momento de la eclosión se encontró que no hubo diferencias significativas; mientras que a las 48 horas solo durante el experimento 1 se encontraron diferencias entre los tratamientos ($p < 0.001$) (Figura 22).

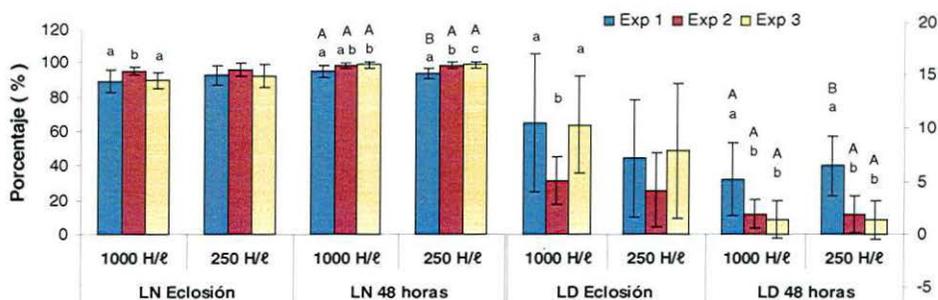


Figura 22. Porcentajes de larvas normales y larvas deformes. Cada barra muestra el promedio de las repeticiones \pm desviación estándar para cada tratamiento ($n = 12$). Las letras minúsculas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) entre experimentos de cada tratamiento. Letras mayúsculas muestran diferencias significativa entre experimentos (exp 1 1000 H/l Vs exp 1 250 H/l; exp 2 1000 H/l Vs exp 2 250 H/l; exp 3 1000 H/l Vs exp 3 250 H/l).

La longitud de larvas al momento de la eclosión mostró que el experimento 1 fue diferente de los experimentos 2 y 3 ($p = 0.034$), entre los experimentos que se realizaron del tratamiento de 1000 H/ℓ; mientras que en la longitud de las larvas para el tratamiento de 250 H/ℓ se encontraron diferencias significativas ($p = 0.014$) del experimento 3 con respecto a los experimentos 1 y 2. Al analizar el efecto de los tratamientos comparando experimentos; mostró que la longitud de las larvas fue diferente significativamente ($p < 0.001$) durante los tres experimentos realizados (Figura 23).

Por otro lado la longitud de larvas a las 48 horas post-eclosión fue similar. Los datos mostraron que hubo diferencias significativas ($p < 0.001$) entre la longitud de larvas de los 3 experimentos del tratamiento de 1000 H/ℓ. Así como también para el tratamiento de 250 H/ℓ. Al comparar el efecto de los tratamientos se encontraron diferencias significativas en los experimentos 1 y 3 ($p < 0.001$) (Figura 24).

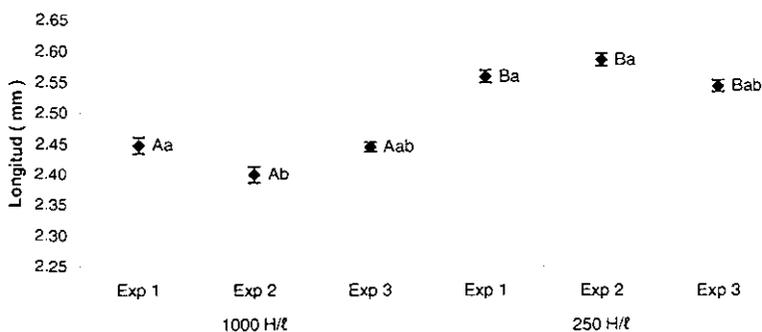


Figura 23. Longitud de larvas a la eclosión, promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 1000 H/ℓ Vs exp 1 250 H/ℓ; exp 2 1000 H/ℓ Vs exp 2 250 H/ℓ; exp 3 1000 H/ℓ Vs exp 3 250 H/ℓ).

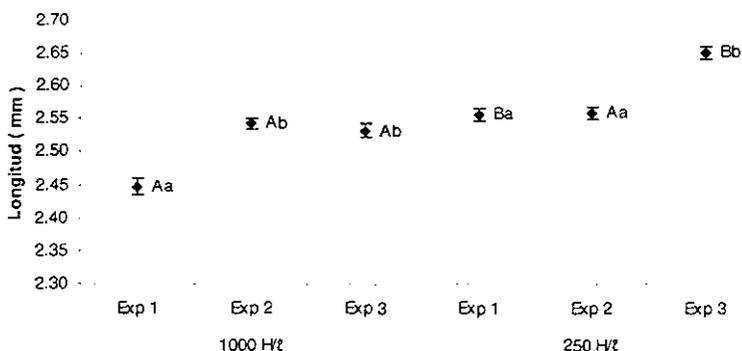


Figura 24. Longitud de larvas a las 48hr post-eclosión, promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 1000 H/l Vs exp 1 250 H/l; exp 2 1000 H/l Vs exp 2 250 H/l; exp 3 1000 H/l Vs exp 3 250 H/l).

7.3.3 Incubación con tratamiento profiláctico y sin tratamiento profiláctico.

Los porcentajes de eclosión para los experimentos con tratamiento profiláctico y sin tratamiento mostraron que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las repeticiones ni tampoco entre los experimentos de cada tratamiento. Finalmente al comparar el efecto de los tratamientos no hubo diferencias significativas ($p = 0.113$) entre ellos (Figura 25).

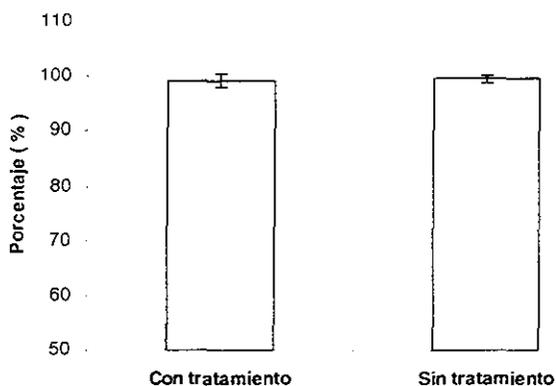


Figura 25. Porcentaje de eclosión. Cada barra muestra el promedio de los datos obtenidos en los tres experimentos ($n = 36$) \pm desviación estándar para cada tratamiento.

Los porcentajes de supervivencia para los experimentos con tratamiento profiláctico y sin tratamiento profiláctico, mostraron que no hubo diferencia significativa entre las repeticiones ni entre los experimentos de cada tratamiento ($p < 0.05$). Por otro lado al comparar los tratamientos no se detectaron diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia con tratamiento profiláctico y sin tratamiento profiláctico al momento de la eclosión ni a las 48 horas post-eclosión ($p < 0.05$) (Figura 26).

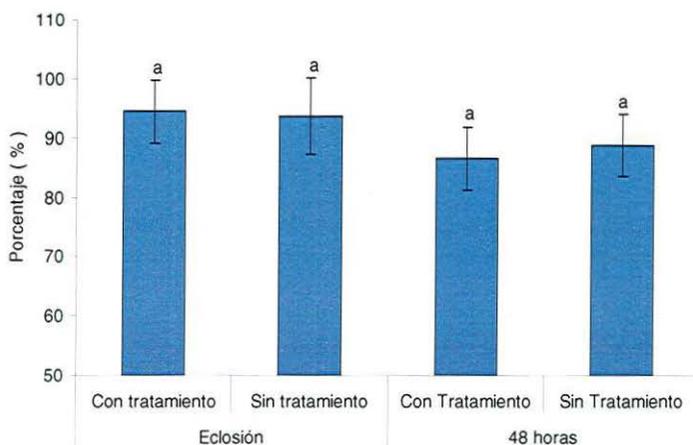


Figura 26. Porcentaje de supervivencia. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ su desviación estándar al momento de la eclosión y el promedio de $n = 9 \pm$ su desviación estándar a las 48 horas post-eclosión respectivamente. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$) en cada etapa del desarrollo.

Los porcentajes de larvas normales y larvas deformes mostraron que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las repeticiones ni entre los experimentos al momento de la eclosión; pero si hubo diferencias entre experimentos a las 48 horas post-eclosión. A las 48 horas el porcentaje de larvas normales en los experimentos con tratamiento profiláctico mostró que el experimento 1 fue diferente del 2 y del 3 ($p < 0.001$); mientras que en los experimentos sin tratamiento profiláctico el experimento 2 fue diferente del 1 y 3 ($p < 0.001$). Al comparar el efecto de los tratamientos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento) a las 48 horas post-eclosión para larvas normales, mostró que hubo diferencias significativas ($p = 0.046$) durante el experimento 1. A las 48 horas el porcentaje de larvas deformes en los experimentos con tratamiento profiláctico mostró que el experimento 1 fue diferente del 2 y del 3; mientras que en los experimentos sin tratamiento profiláctico el experimento 2 fue diferente del 1 y 3. Al comparar el efecto de los

tratamientos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento) a las 48 horas post-eclosión para larvas deformes, mostró que hubo diferencias significativas ($p = 0.046$) durante los experimentos 1 (Figura 27).

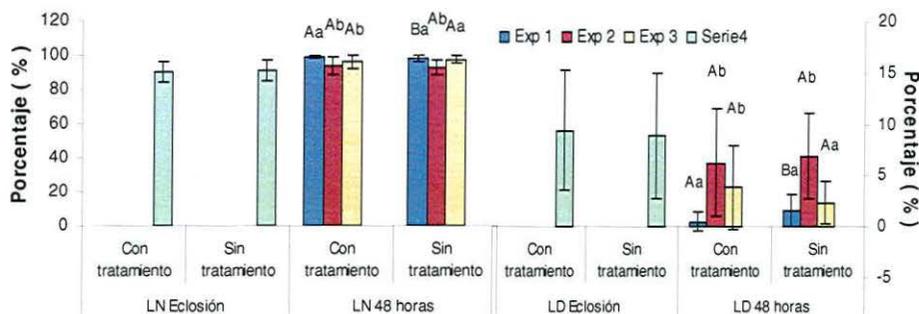


Figura 27. Porcentajes de larvas normales y larvas deformes. Cada barra muestra el promedio de $n = 36 \pm$ desviación estándar de cada variable y para cada tratamiento. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento).

La longitud de larvas al momento de la eclosión mostró diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los 3 experimentos que se realizaron con tratamiento profiláctico. Por otro lado los experimentos sin tratamiento profiláctico mostraron que las longitudes de las larvas al momento de la eclosión del experimento 1 fueron diferentes de las longitudes de los experimentos 2 y 3. Al analizar el efecto de los tratamientos comparando experimentos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento); mostró que hubo diferencia significativa durante los experimentos 1 ($p < 0.001$) y 3 ($p = 0.042$) (Figura 28). Por otro lado la longitud de larva a las 48 horas post-eclosión fue similar. Los datos mostraron que hubo diferencias significativas ($p < 0.001$) entre la longitud de

larvas de los 3 experimentos en ambos tratamientos. Al comparar el efecto de los tratamientos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento) se encontraron diferencias significativas en los 3 experimentos; 1, 2 ($p < 0.001$) y 3 ($p = 0.047$) (Figura 29).

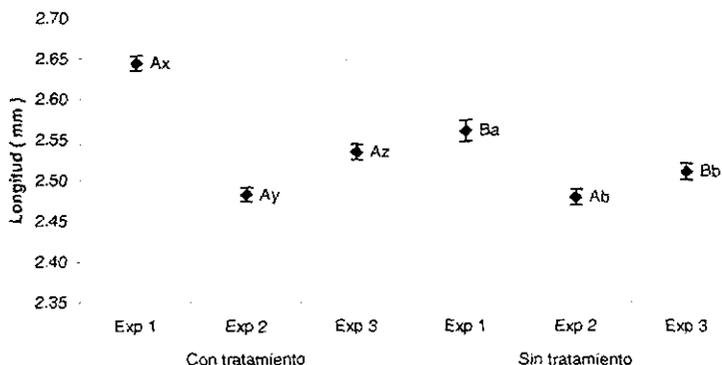


Figura 28. El gráfico muestra la longitud promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento).

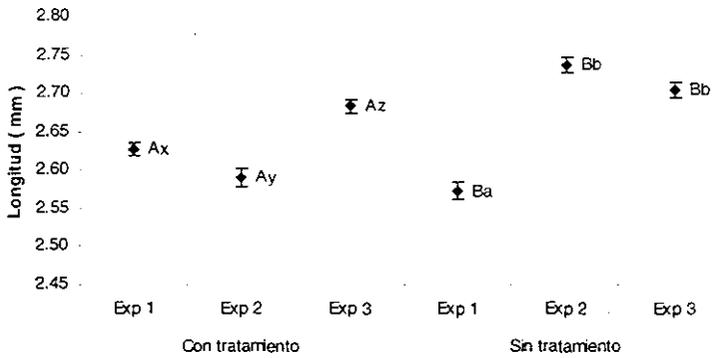


Figura 29. El gráfico muestra la longitud promedio de $n = 75$ larvas \pm error estándar para cada experimento en ambos tratamientos. Mientras letras minúsculas muestran diferencia significativa entre cada uno de los experimentos del respectivo tratamiento; letras mayúsculas muestran diferencia significativa al comparar experimentos (exp 1 con tratamiento Vs exp 1 sin tratamiento; exp 2 con tratamiento Vs exp 2 sin tratamiento; exp 3 con tratamiento Vs exp 3 sin tratamiento).

8. DISCUSIONES

De manera general la calidad de los huevos obtenidos por desoves naturales han sido encontrados de mayor calidad que los desoves inducidos artificialmente, como en el pargo huachinango o también llamado pargo del golfo (*Lutjanus campechanus*) donde los desoves naturales contribuyen no solo con una alta calidad de huevos si no que también influyeron en una alta supervivencia a las 36 hr post-eclosión permitiendo que mayores cantidades de larvas lleguen a la primera alimentación (Papanikos *et al.*, 2003). Por otro lado los desoves naturales permiten tener un adelanto en el cultivo de peces marinos como se dio en el Japón cuando las especies de cultivo en cautiverio empezaron a desovar sin el uso de hormonas (Fukuhara, 1987; Fukusho, 1991; Imaizumi, 1993). En otras regiones de importancia en el área de acuicultura de peces marinos como lo es el Mediterráneo también se alcanzó los desoves rutinarios de manera natural (Moretti *et al.*, 1999) y los resultados en la producción de juveniles fueron en aumento. Los resultados del presente trabajo demuestran que la calidad de los huevos provenientes de desoves naturales se mantuvo durante todos los experimentos realizados. Por ejemplo los porcentajes de eclosión siempre se mantuvieron mayor al 90 % independientemente del tratamiento (flujos, densidades y tratamiento profiláctico), sucediendo lo mismo con los porcentajes de supervivencia al momento de la eclosión y a las 48 hr post-eclosión, por lo tanto durante el tiempo de experimentación se contó con una fuente de huevos de buena calidad que permitió trabajar en las siguientes etapas, como lo es la incubación y el cultivo larvario.

De los factores ambientales que se consideran con un mayor efecto sobre el desarrollo de los embriones son la luz, temperatura y oxígeno. La luz directa

puede tener un efecto sobre el desarrollo normal de los huevos, sobre todo antes de la formación de los ojos y la pigmentación del embrión (Piper *et al.*, 1989). Mientras que está bien establecido que la temperatura tiene influencia sobre el desarrollo de los embriones y el tiempo de eclosión de muchas especies. Por lo tanto el enlace entre los aspectos medioambientales y el tiempo de eclosión esta probablemente relacionado con la ecología de cada especie (Downing y Litvak, 2002; Dimichele y Taylor, 1980) ejemplificado por la estrategia de eclosión de larvas que se presenta cuando el medio ambiente le es favorable para sobrevivir. Finalmente las mejores condiciones para un óptimo desarrollo de los embriones y larvas es cerca del 100 % de saturación de oxígeno. Mientras que la circulación de agua es vital para el transporte de oxígeno a la superficie del corion del huevo y para remover los metabolitos propios de los huevos (Piper *et al.*, 1989). Basados en lo expuesto anteriormente, debemos definir que para cada factor o parámetro en cada especie o población debe tener intervalos de influencia, cuyos límites extremos se denominan letales y por dentro de éstos los denominados biológicos, en los cuales los organismos o una parte de ellos pueden vivir, mientras que en un rango más estrecho lo hacen de forma óptima con buenos ritmos de crecimiento y eficiencia y menor afectación de los estadios posteriores. En el medio natural tenemos que a pesar de la importancia comercial de *L. guttatus*, se conoce poco sobre su biología reproductiva. Rojas (1997) reporta que *L. guttatus* en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, presenta un prolongado periodo de desove, con dos picos principales, uno en abril y otro en octubre. Cruz-Romero *et al.* (1991) determinaron dos picos reproductivos para *L. guttatus* en las costas de Colima, México. Uno durante la época de lluvias que coincide con la presencia de temperaturas altas (julio-noviembre) y otro más corto de febrero a abril. Mientras que Arellano-Martínez. (2001) reporta que en las costas de Guerrero México, *L. guttatus* presenta actividad reproductiva todo el año con dos principales picos reproductivos. El primero de marzo-abril y el segundo de agosto-noviembre. De manera general *L. guttatus* tiene actividad reproductiva prácticamente todo el año pero sus picos reproductivos coinciden primero

cuando inicia la primavera y parte del verano, ya que las temperaturas no alcanzan su punto más alto de la época, mientras que el segundo pico de desove coincide a la inversa; cuando las temperaturas después del verano empiezan a disminuir, la actividad reproductiva aumenta y cuando las temperaturas de invierno empiezan a bajar a su punto máximo en estas latitudes, la actividad reproductiva disminuye. Para los huevos y embriones de *L. gutatus* los parámetros ambientales durante el tiempo de experimentación se corrieron en tres diferentes rangos de temperatura naturales. Los experimentos de flujo se corrieron del día 13 al 31 de octubre, a una temperatura promedio de 28.81 ± 0.72 , mientras que los experimentos de densidad se corrieron entre el día 07 y 23 de noviembre a una temperatura de 27.42 ± 1.31 y finalmente los tratamientos profilácticos se corrieron entre el 27 de noviembre y 15 de diciembre a una temperatura de 24.73 ± 1.55 , esto fue, siguiendo los desoves naturales de los reproductores. Los resultados mostraron que hay diferencias significativas entre los tres tiempos de experimentación ($p = 0.05$), encontrando que las mejores condiciones de desove, desarrollo embrionario y obtención de larvas a las 48 horas post-eclosión son temperaturas entre 26 y 28 °C en condiciones de cautiverio, lo cual coincide con los picos reproductivos del medio natural.

A diferencia de los tratamientos en las especies de agua dulce, la circulación abierta no era común en la incubación de los huevos de las especies marinas hasta la década de los 90 y a pesar de que en un principio se probó en pocas especies, siempre es recomendable su prueba. El mantener los huevos con flujo de agua durante el proceso de incubación es de vital importancia porque mejora la calidad del agua y puede prevenir de algún desarrollo de bacterias, hongos y algunos otros microorganismos que puedan desarrollarse en aguas estáticas durante dicho periodo. Como ya se menciono anteriormente los huevos pelágicos después de la fertilización tienden a hincharse por la absorción de agua y usualmente son más flotantes, por eso es crítico mantener siempre ajustado el flujo de agua a través de la incubadora durante el tiempo de

incubación manteniendo en suspensión los huevos en toda la columna de agua. Por lo tanto mantener una constante presión y volumen de agua es crucial. Los flujos son vitales en especies donde su tiempo de incubación es largo como en *Hippoglossus hippoglossus*, 13 días después de la fertilización (Mangor-Jensen y Waiwood, 1995), bacalao *Gadus morhua*, 18 días después de la fertilización (Rani, 2005), hadock *Melanogrammus aeglefinus*, 8-10 días después de la fertilización (Treasurer *et al.*, 2005). En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de eclosión con flujo y sin flujo, lo cual pudo deberse a que el periodo de incubación es relativamente corto (18-24 hrs) post-fertilización y una densidad de huevos relativamente baja (250 H/l). Mientras que Blaxter, (1962) demostró que si hay un efecto marcado en el porcentaje de eclosión pero en relación con la densidad de los huevos, lo que directamente puede tener un efecto a través del oxígeno disponible en una agua con flujo y una agua sin flujo. De los resultados anteriores se destaca la importancia de la oxigenación, sobretodo en el período próximo a la eclosión, y en éste en particular, con el objetivo de mejorar aún más la aireación durante la incubación, Alessio *et al.* (1975) usaron la circulación abierta en la incubación de *Sparus aurata*, con lo cual mejoró, notablemente la incubación. Mientras que Walsh *et al.* (1989) demuestra que el consumo de oxígeno de los huevos, se incrementó linealmente desde 0,024 $\mu\text{l O}_2/\text{H}/\text{h}$ en blástula a 0,177 $\mu\text{l O}_2/\text{H}/\text{h}$ antes de la eclosión y que no variaba significativamente con la salinidad entre 20 y 35 %. Por lo tanto de acuerdo con lo anterior se ve necesaria una mayor concentración de oxígeno en la parte final del periodo de incubación. En el presente trabajo los niveles de oxígeno estuvieron con promedio de 5.09 ± 0.57 y 5.00 ± 0.48 los experimentos con flujo y sin flujo respectivamente. Mientras que los porcentajes de saturación de oxígeno fueron en promedio de 72.48 ± 6.71 y 73.27 ± 6.39 en el mismo orden anterior y no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.05$) en ambos parámetros con flujo y sin flujo. Respecto al porcentaje de eclosión tampoco hubo diferencias entre los tratamientos (figura 16). Respecto al porcentaje de supervivencia al momento de la eclosión y a las 48 hr post-eclosión los dos tratamientos fueron diferentes. Lo anterior muestra

que las condiciones ambientales y fisicoquímicas del agua en las incubadoras pudieron ser diferentes. En las incubadoras sin flujo el agua fue más estable hasta el momento de que las larvas abrieron la boca a las 48 hr. Además la temperatura del agua fue estadísticamente diferente en los dos tratamientos. En las incubadoras sin flujo el agua solo tenía el movimiento provocado por la aeración mientras que en las incubadoras con flujo pudo haberse presentado un cambio constante en las características fisicoquímicas del agua durante el día y la noche, por tener el flujo abierto. Lo anterior puede verse con mayor efecto en las longitudes de las larvas donde al momento de la eclosión y a las 48 hr post-eclosión, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en al menos dos experimentos y al igual que en la eclosión y supervivencia las larvas de las incubadoras sin flujo presentaron las mayores longitudes y menor variación. Por otro lado la mayor variabilidad en los porcentajes en larvas normales y deformes se registro en las incubadoras con flujo. Lo anterior demuestra que las condiciones de incubación con solo aireación en el tanque son suficientes y no se requiere de usar flujo abierto durante la incubación de los huevos ha una densidad de 250 H/ℓ del pargo flamenco para mantener altos porcentajes de eclosión y supervivencia a la primera alimentación.

Los trabajos de incubación a altas densidades se dan por la necesidad de ahorrar espacio y la intensificación de los cultivos principalmente. Las densidades de incubación de huevos de especies de importancia comercial y que actualmente se están produciendo de forma masiva varía, por ejemplo para dorada y lobina (*Sparus aurata* y *Dicentrarchus labrax*), en la zona del mediterráneo va de 6000 a 10,000 H/ℓ (Moretti *et al.*, 1999), el robalo asiático (*Lates calcarifer*) 1000 y 2000 H/ℓ (comunicación personal) en *Hippoglossus hippoglossus* el promedio es ≈50,000H/ℓ (Mangor-Gensen *et al.*, 1998). En todos los casos se practica la incubación con flujo abierto. Particularmente no se tiene un registro estricto de incubación de los huevos en es especies de pargo como tal, si no lo que se ha hecho de manera general durante la reproducción y cría de algunas especies es directamente en los tanques de

cultivo o transferencias de huevos con embriones vivos o larvas eclosionadas, (Watanabe *et al.*, 1998; Leu *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 1985; Vernon Minton *et al.*, 1983). En el presente estudio las densidades de incubación de 250 H/l y 1000 H/l fueron diferentes en el porcentaje de eclosión, a pesar de que en ambos casos fueron superiores al 99 % de eclosión en cinco de los 6 experimentos realizados. Estadísticamente pueden encontrarse diferencias, pero en términos prácticos es mucho mejor la densidad de 1000 H/l, por la cantidad de larvas disponibles para el cultivo larvario. El mismo patrón se observa en la supervivencia de las larvas al momento de la eclosión, con diferencias entre los dos tratamientos, pero la medición a las 48 hrs nos muestra que no hay diferencias entre los dos tratamientos. A pesar de que los tamaños de las larvas sean mas pequeños al momento de la eclosión en la densidad de 1000 H/l, es comprensible por el espacio disponible que tienen los organismos a esta densidad; por otro lado el espacio también pudo haber influido en las variaciones de los porcentajes de larvas normales y deformes. Respecto a lo anterior la identificación y disponibilidad de organismos apropiados para la primera alimentación son de interés primario, así como optimizar la eficiencia del uso de las reservas endógenas a través de los parámetros ambientales. Por lo tanto El periodo de transición de alimentación en larvas es definido como el intervalo en el cual inicia la habilidad para alimentarse, con algunas reservas de vitelo que aun están presentes para servirle de reserva energética en la demanda de energía cuando se da la captura de presas (Moteki *et al.*, 2001). Los cambios en la longitud durante la alimentación endógena han sido usados como una medición relativa de la eficiencia de la conversión del vitelo (Watanabe *et al.*, 1998). Rogers y Westin (1981), sugieren que el tejido de larvas de striped bass puede ser movilizado por la demanda metabólica antes de que el glóbulo de aceite sea completamente consumido, indicando con esto la estrategia de conversión de lípidos. Entonces los cambios en la morfometría pueden ser usados como indicadores de la movilización del tejido y de la tasa de utilización del vitelo, dando información real acerca de la condición relativa de la larva. El monitoreo de la longitud de las larvas revela un periodo de

estática y aparente pérdida de longitud antes de la primera alimentación, la cual se reanuda con un rápido crecimiento cuando se da la primera alimentación, como se ha visto en varias especies de peces marinos (Mihelakakis *et al.*, 2001; Moteki *et al.*, 2001). Una reducción en la longitud de larvas antes de la primera alimentación ha sido reportada por Doi & Singhagrain (1993) para mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus* y para John's snapper *Lutjanus johni* (Lim *et al.*, 1985).

Las altas densidades y en algunos casos los largos periodos de incubación han hecho necesario los tratamientos profilácticos antes y durante el periodo de incubación. Una gran variedad de productos han sido utilizados como desinfectantes con diferentes características químicas y sustancias activas por ejemplo, dentro del grupo de los aldehídos, la formalina, es un producto ampliamente usado, además de ser eficiente es aceptado por la administración de alimentos y drogas de Estados Unidos (Meyer, 1991 y Fitzpatrick *et al.*, 1995). Es uno de los pocos fungicidas acuáticos registrados para ser utilizado en acuicultura, y su uso como reemplazante del verde de malaquita a ido incrementándose. Se han realizado varias experiencias utilizando este químico, principalmente en huevos de salmón (*Salmo salar*) (Marking *et al.*, 1994), en huevos de catfish (*Ictalurus punctatus*) (Walser y Phelps, 1994), salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Waterstrat y Marquin, 1995), Carpa común (*Cyprinus carpio*) (Froelich, 1996); trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Schreier *et al.*, 1996), crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) (Celada *et al.*, 2004). El tratamiento con formalina no tuvo un efecto significativo en los porcentajes de eclosión, supervivencia a la eclosión y supervivencia a las 48 hrs, siendo este ultimo el más importante porque serian las larvas que estarían disponibles para el cultivo larvario. Lo anterior demuestra que las condiciones de manejar los huevos sin tratamiento profiláctico antes de la incubación podrían ser suficientes para obtener altos porcentajes de eclosión y supervivencia de larvas del pargo flamenco a la primera alimentación, incubando los huevos a una densidad de 250 H/ℓ.

9. CONCLUSIONES

- Los mejores resultados se obtuvieron con temperaturas de incubación de 26-28 °C.
- Incubando a una densidad de 250 H/ℓ, no se requiere de flujo en las incubadoras de 100 ℓ.
- Es factible la incubación de hasta 1000 H/ℓ sin flujo en incubadoras de 100 ℓ.
- Pueden obtenerse buenos porcentajes de eclosión y supervivencia de larvas a las 48 hrs post-eclosión, sin tratamiento profiláctico previo de los huevos.
- Por lo tanto los resultados sugieren que no es necesaria la incubación a 250 H/ℓ con flujo del 30 % de recambio por hora ni el tratamiento previo de los huevos para mejorar los porcentajes de eclosión y supervivencia de larvas del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

10. RECOMENDACIONES

Los resultados del presente trabajo dan la pauta para iniciar otra serie de experimentos a mayor escala como:

- Incubación a 3000 y 10,000 H/l.
- Ambas densidades trabajarlas con flujo y sin flujo.
- Realizar una observación detallada del periodo de incubación para determinar si se requiere de tratamiento profiláctico a altas densidades.
- Evaluar el efecto de la temperatura, salinidad y concentración de oxígeno sobre la talla de las larvas y la sobrevivencia y porcentaje de eclosión de los huevos.

11. LITERATURA CITADA

Al-Ameeri, A; A. Al-Marzouk, S.K. Teng; M.H. Khamis. 1982. Effects of stocking density on sobaity (*Acanthopagrus cuvieri*). Ann. Res. Rep. Kuwait Inst. Sci. Res. 1981:60-62.

Alessio, G., Gandolfi, G. & Schreiber, B. 1975. Tecniche e metodiche generali di riproduzione artificiale dell'orata, *Sparus aurata* (L.) (Osteichthyes, Sparidae). Invest. Pesqu. 39 (2): 417-428.

Ahlstrom, E. H; H. G. Moser. 1980. Characters useful in identification of pelagic marine fish eggs. Report of California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations 21: 121–131.

Álvarez González, C.A. 1999. Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de maestría CICIMAR-IPN.

Álvarez-Lajonchere L., O. G. Hernández Molejón. 1994. Manual de Técnicas para la Producción Piloto de Juveniles de Peces Marinos. Centro de investigaciones pesqueras. CUBA. 102.

Arellano Martínez M., Rojas Herrera A., García Domínguez F., Cevallos Vázquez B.P. y Villalejo Fuerte M. 2001. Ciclo reproductivo del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en las costas de Guerrero, México. Revista de Biología Marina y Oceanografía 36 (1): 1-8, julio de 2001.

Arukwe A; A. Goksøyr. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *BioMed Central*. 1-21

Avery S. T; J. A. Brown. 2005. Investigating the relationship among abnormal patterns of cell cleavage, egg mortality and early larval condition in *Limanda ferruginea*. *Journal of fish biology*. 67: 890-896.

Aviles M. 2005. Calidad de huevos y larvas según el manejo de los reproductores de la cabrilla (*Paralabrax maculatofasciatus*, Pises: Serranidae). Memoria para obtener el título de doctorado. Universidad de Barcelona. 199.

Blaxter, J. H. S. 1962. Herring Rearing-IV. Rearing beyond the yolk sac stage. *Mar. Res. Scot.* 1: 18 pp.

Bromage, N. 1995. Broodstock management and seed quality-general Considerations. In: Bromage NR y RJ Roberts (eds). *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Oxford. 1-24.

Bromage, N; P. Cumaranatunga. 1988. Egg production in the rainbow trout. En: *Recent Advances in Aquaculture*. J. F. Muir y R. J. Roberts (eds.). Gromm Helm (Timber Press). Sidney; Portland (Oregón), EE UU. 3: 63-138

Bromage, N; M. Bruce; M. Basavaraja; K. Rana; R. Shields; C. Young; J. Dye; P. Smith; M. Gillespie; J. Gamble. 1994. Egg quality determinants in finfish: The role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 25: 13–21.

Brooks, S., C. R Tyler., J. P. Sumpter. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 387–416.

Camevali O; R, Carletta; A, Cambi; A, Vita; N. Bromage. 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases. *Biology of reproduction*. 60: 140-146.

Celada J.D., J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, P.M. Melendre, A. Aguilera. 2004. Effects of different antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs. *Aquaculture* 239, 249–259.

Cerdà, J. 2002. Mecanismos fisiológicos durante la hidratación del huevo de teleósteos: hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación. *Boletín: Instituto español de oceanografía*. 18 (1-4): 145-152.

Cerdà, J; M. Carrillo; S. Zanuy; J. Ramos; M. de la Higuera. 1994. Influence of nutritional composition of diet on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg larval quality. *Aquaculture* 128: 345-361.

CONAPESCA. 2001. Manual de Enfermedades de Peces. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. 3(15): 14

Coves, D.; Dewavrin, G.; Breuil, G.; Devauchelle, N. (1991), Culture of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). In: Handbook of Mariculture: Finfish Aquaculture, ed. J. P. McVey. CRC Press Inc., Boca Raton, 3-20.

Cruz-Romero M., Espinoza-Bar E., Mimbela-Lopez J., García-Boa A., Obregón-Alcaráz L. y Girón-Botello E. 1991. Biología reproductiva de tres especies del género *Lutjanus* en las costas de Colima, México. Reporte de investigación del CRIP de Manzanillo, Colima. Instituto Nacional de Pesca. 118 pp.

Dimichele, L. & Taylor, M.H. 1980. The environmental control of hatching in *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Experimental Zoology* 214, 181-187.

Downing, G., & Litvik, M.K. 2005. Effects of light intensity, spectral composition and photoperiod on development and hatching of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) embryos. *Aquaculture* 213, 265-278.

Doi, M; T. Singhagriwan. 1993. Biology and culture of the red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. The research project of fishery resource development in the kingdom of Thailand, The Eastern marine fisheries, Ministry of aquaculture and cooperatives. Thailand. 51.

Duray, M.N; L. G. Aplazan; C. B. Estudillo. 1996. Improved hatchery rearing of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*, in large tanks with small rotifer (*Brachionus plicatilis*) and artemia. *The Israel journal of aquaculture-Bamidgeh* 48(3):123-132.

Emata A. 2003. Reproductive performance in induced and spontaneous spawning of the mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus*: a potential candidate species for sustainable aquaculture. *Aquaculture research*. 34: 849-857.

Estudillo, C.B; M.N. Duray; E.T. Marasigan; A.C. Emata. 2000. Salinity tolerance of larvae of the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) during ontogeny. *Aquaculture* 190:155-167.

FAO. 2006. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. [Soporte electrónico] www.fao.org [Consulta: 07 noviembre 2008]

Fernandez-Palacios, H; M. S. Izquierdo; L. Robaina; A. Valencia; M. Salhi; J. Vergara. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 132: 325-337.

Fitzpatrick, M.S., C.B. Schreck, R.L. Chitwood. 1995. Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. *Prog. Fish-Cult.* 57: 153-155.

Froelich, S., T. Engelhardt. 1996. Comparative effects of Formalin and Salt Treatments on Hatch Rate of Koi Carp Eggs. *The Prog. Fish-Cult.* 58: 209-211.

Fukuhara, O., 1987. Seed production of red sea bream *Pagrus major* (Sparidae) in Japan. In: C. J. Sinderman (Editor), *Reproduction, maturation, and seed production of cultured species*. NOAA Tech.Rep. NMFS 47,13-16.

Fukusho, K., 1991. Red sea bream culture in Japan. In: J. P. McVey (Editor), *CRC Handbook of mariculture, vol. II, Finfish aquaculture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 73-87.

Furuita, H; H. Tanaka; T. Yamamoto; N. Suzuki; T. Takeuchi. 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 210: 323– 333.

FROELICH, S., T. ENGELHARDT. 1996. Comparative effects of Formalin and Salt Treatments on Hatch Rate of Koi Carp Eggs. *The Prog. Fish-Cult.* 58: 209-211.

Hansen G.H; Ø. Bergh; J. Michaelsen; D. Knappskog. 1992. *Flexibacter ovolysticus* sp. nov., pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 451–458.

Houde, E. D. 1975. Effects of stocking density and food density on survival, growth and yield of laboratory-reared larvae of sea bream *Archosargus rhomboidalis* (L.) (Sparidae). *Journal of Fish Biology* 7: 115–127.

Ibarra C. L. 2005. Desarrollo gonadal e inducción a la maduración final de *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), silvestres y de cautiverio por implante e inyección de la hormona LHRHa. Tesis de maestría. Mazatlán, Sinaloa. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. 162.

Imaizumi, K., 1993. Recent progress of Japan Sea-Farming Association in marine finfish hatchery activities. In: C. S. Lee, M. S. Su y I. C. Liao (Eds.), *Finfish hatchery in Asia: Proceedings of finfish hatchery in Asia'91*. TUNGKANG MARINE LABORATORY Conference Proceedings 3, 173-177.

Johnston 2002. Incubation of Eggs. Bjorn Steinar Saether NIFA (Norway). [Soporte electrónico] http://www.northernaquafarms.com/knowledglibrary/NAF_PDF_Files/Incubation_of_charEggs.pdf . [Consulta: 08 diciembre 2006]

Kjørsvik, E. 1990. The effect of different incubation conditions on the eggs of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L). *Journal of fish biology*. 37: 655-657.

Kjørsvik, E; Mangor-Jensen, A; Holmefjord, I. 1990. Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.* 26, 71-113.

Kjørsvik E; K. Hoehne-Reitan; KI Reitan. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*. 227: 9-20.

Leu, M.-Y; I-H Chen; L.-S Fang. 2003. Natural spawning and rearing of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*, larvae in captivity. *Bamidgeh* 55: 22-30.

Leu, M.- Y. ; Y.- H. Chou, 1996. Induced spawning and larval rearing of captive yellowfin porgy, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn). *Aquaculture*, 143: 155-166.

Lim L.C; L. Cheong; H.B. Lee; H.H. Heng. 1985. Induced breeding studies of the John's snapper *Lutjanus johni* (Bloch), in Singapore. *Singapore Journal of Primary Industries* 13:70-83.

Lønning, S., E. Kjørsvik., I. Falk-Petersen. 1988. A comparative study of pelagic and demersal eggs from common marine fishes in Northern Norway. *Sarsia* 73: 49-60.

López P; J. Rosas; A. Velásquez; T. Cabrera; C. Maneiro. 2002. Desarrollo embrionario y larval del bolo *Diplectrum Radiale* Quoy y Gaimard, 1824 (Pises: Serranidae). *Revista de biología marina y oceanográfica*. 37(2):127-137.

Mangor-Jensen, A; K. G. Waiwood. 1995. The effect of light exposure on buoyancy of halibut eggs. *Journal of fish biology*. 47: 18-25.

Mangor-Jensen A., Harboe T., Henno J.S. and Troland R. 1998. Design and operation of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., egg incubators. *Aquaculture Research*. 29, 887-892.

Marking, L.L., Rach, J.J., and Schreier, T.M. 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Prog. Fish-Cul.* 56(4): 225-231.

Meyer, F.P. 1991. *Aquaculture disease and health management*. J. Anim. Sci. 69: 4201-4208.

Mayer. I; S. E. Shackley; J. S. Ryland. 1988. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. I. An histological and histochemical study of oocyte development. J. Fish Biol. (33)609-622.

Mihelakakis A, Yoshimatsu T, Tsoikas C. 2001. Spawning in captivity and early life history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. Aquaculture 199:333–352.

Moteki M, Yoseda K, Sahin T, Ustundag C, Kohno H. 2001. Transition from endogenous to exogenous nutritional sources in larval Black Sea turbot *Psetta maxima*. Fish Sci 67:571–578.

Morreti Alessandro, Mario Pedini, Giancarlo Cittolin and Ruggero Guidastrì. 1999. Manual on hatchery production of sea bass and gilthead seabream, volume 1. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome.

Morizane T. 1993. The present state of finfish seed production in Ehime prefecture. TML Conference proceeding. 3: 41-49.

Mylonas C. C; M. Papadaki; M. Pavlidis; P. Divanach. 2003. Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. Aquaculture. 232: 637-649.

Narvarte M. A; M. S. Pascual. 2003. Fertilization, larval rearing and post-larval growth of the Tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus* (D'Orb., 1846). Aquaculture. 217: 259–274

Nelson E. J; W. C. Ghiorse. 1999. Isolation and identification of *Pseudoalteromonas piscicida* strain Cura-d associated with diseased damselfish (Pomacentridae) eggs. Journal of Fish Diseases. 22(4): 253-260.

Nigel Finn R; G. C. Ostby; B. Norberg; H. J. Fyhn. 2002. *In vivo* oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. The journal of experimental biology. 205: 211-224.

Ogle. J. T; J. M. Lotz. 2006. Characterization of an experimental indoor larval production system for red snapper. North American journal of aquaculture. 68 (1): 86-91.

Ostrowski A. C; T. Iwai; S. Monahan; S. Unger; D. Dagdagan; P. Murakawa; A. Schivell; C. Pigao. 1996. Nursery production technology for Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*). Aquaculture. 139:19-29.

Panini E. B; C. C. Mylonas; S. Zanuy; M. Carrillo; J. Ramos; M. P. Bruce. 2001. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. Aquaculture international. 9: 189-195.

Papanikos, N ; R. P. Phelps; K. Williams; A. Ferry; D. Maus. 2003. Egg and larval quality of natural and induced spawns of red snapper, *Lutjanus campechanus*. Fish physiology and biochemistry. 28: 487-488.

Patiño, R; C. V. Sullivan. 2002. Ovarian Follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish. Physiol. Biochem. 26: 57–70.

Peterson, N.P; T.P.Quinn. 1996. Spatial and temporal variation in dissolved oxygen in natural egg pockets of chum salmon, in Kennedy Creek, Washington. Journal of Fish Biology. 48: 131–143.

Piper, R.G., I.B. Mc Elwain, L.E. Orme, J.P. Mc Crearem, L.G. Fowler & J.R. Leonard. 1989. Broodstock, Spawning, and egg handling. Proceedings of the Fish Hatchery Management. Washington. p. 173-207.

Polo, A., Yufera M., Pascual, E. 1991. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture*. 92: 367-375.

Radonic, M; A. V. Lopez; M. Oka; E. O. Aristizábal. 2005. Effect of the incubation temperature on the embryonic development and hatching time of eggs of the red porgy *pagrus pagrus* (Linne, 1758) (Pisces:Sparidae). *Revista de biología marina y oceanografía*. 40 (2): 91-99.

Rabalais, N; S. C. Rabalais ; C. R. Arnold. 1980. Description of eggs and larvae of laboratory reared red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Copeia* 4:704-708.

Ramos, J; L. Rodríguez; S. Zanuy; M. Carrillo. 2002. Influencia del fotoperiodo sobre la aparición de la primera madurez sexual, comportamiento reproductivo y calidad de puestas en hembras de lubina *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Instituto español de oceanografía*. 18(1-4): 175-182.

Rani Sultana Manira. 2005. Prediction of larval viability based on egg quality parameters and early cleavage patterns in the experiments of triploidy induction in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. M. Sc thesis. Department of Aquatic Biosciences Norwegian College of Fishery Science University of Tromsø Norway.

Ravaglia. M. A; M. C. Maggese. 2002. Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei; synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte development and micropyle structure. *BIOCELL*. 26(3): 325-337.

Rennie Shona, T, Felicity A. Huntingford, Anne-Lise Loeland Martin Rimbach. 2005. Long term partial replacement of dietary fish oil with rapeseed oil; effects on egg quality of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture* 248 135– 146.

Rideout R. M; E. A. Trippel; M. K. Litvak. 2004. Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. *Aquaculture*. 230: 215-228.

Riis-Vestergaard, J. 2002. Energy density of marine pelagic fish eggs. *Journal of fish biology*. 60: 1511-1528.

Riley, C.M; G.J. Holt; C.R. Arnold. 1995. Growth and morphology of larval and juvenile captive bred yellowtail snapper, *Ocyurus chrysurus*. *Fishery bulletin* 93(1): 179-185.

Rogers BA, Westin DT. 1981. Laboratory studies on effects of temperature and delayed initial feeding on development of striped bass larvae. *Trans Am Fish Soc* 110:100–110.

Rojas M.J.R. 1997. Fecundidad y épocas de reproducción del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Piscis: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 44 (3): 447-487.

Rombough, P. 2007. The functional ontogeny of the teleost: Which comes first, gas or ion exchange?. *ScienceDirect*. Canada. 148. 732-742

SAGARPA-CONAPESCA. 2005. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. México. Comisión nacional de acuicultura y pesca. [Soporte electrónico] <http://www.oeidrus-veracruz.gob.mx/pbi/Anuario2003-CONAPESCA.pdf>. [Consulta: 01 noviembre 2008]

Saka S; K. Firat; D. Coban. 2003. Embryonic development of common dentex (*Dentex dentex L*) eggs. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 35-40.

Sakai, K; Nomura, M; Takashima, F; Oto, H. 1975. The over-ripening phenomenon of rainbow trout-II changes in the percentage of eyed eggs,

hatching rate and incidence of abnormal alevins during the process of over-ripening. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 41, 855–860.

Schreier, T.M., J.J. Rach, G.E. Howe. 1996. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture*. 140 (4): 323-331.

Sorbido, Fran; Junquera, Susana. 2001. Ecología de la reproducción y potencial reproductivo en las poblaciones de peces marinos. Universidad de Vigo, España. Curso duotoramiento do bienio, 2001-2003. 72.

Springate, J. R. C; N. R. Bromage; J. A. K. Elliot; D.L. Hudson. 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*. 43: 313– 322.

St Mary, C. M; E. Gordon; R. E. Hale. 2004. Environmental effects on egg development and hatching success in *Jordanella Floridae*, a species with parental care. *Journal of fish biology*. 65: 760-768.

Stickney, R. R. 2000. *Encyclopedia of aquaculture*. EUA. John Wiley and sons, inc. 1063.

Sund T; I. B. Falk-Petersen. 2005. Effects of incubation temperature on development and yolk sac conversion efficiencies of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) embryos until hatch. *Aquaculture research*. 36: 1133-1143.

Suzuki, K; S. Hioki. 1979. Spawning behavior, eggs and larvae of the Lutjanid fish, *Lutjanus kasmira* in an aquarium. *Japanese journal of ichthyology*. 26(2): 161-166.

Teng, S.K; Akatsu, S; Al-Abdul-Elah, K.M; Al-Almeeri, A.-A; Downing, N; Al-Marzouk, A; El-Z&r, C. 1983. Studies towards the improvement of larval rearing and fingerling production of sobaity (*Acanthopagrus cuvieri*). I. Refinement of large-scale fingerling production techniques. 1982 Annual Research Report, Kuwaiti Institute for Scientific Research, pp. 59-60.

Thorsen, A; H. J. Fyhn. 1996. Final oocyte maturation in vivo and in vitro in marine fishes with pelagic eggs; yolk protein hydrolysis and free amino acid content. *Journal of Fish Biology* 48: 1195–1209.

Treasurer W. James, Eileen Cochrane and Andrew Grant. 2005. Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with bronopol. *Aquaculture* 250, 27– 35.

Tucker, J. W., Jr., 1998. *Marine fish culture*. Boston, Kluwer Academic Publishers. 750.

Turano, M. J; D. A. Davis; C.R. Arnold. 2000. Observations and techniques for maturation, spawning and larval rearing of the yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus*. *Journal of the world aquaculture society*. 31(1):59-68.

Tyler, C. R; J. P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6: 287– 318.

Vallin, L; A. Nissling. 1998. Cell morphology as an indicator of viability of cod eggs, result from an experimental study. *Fisheries research* 38(3):247-255.

Van Der Kraak, G; N. W. Pankhurst. 1997. Temperature effects on the reproductive performance of fish. In *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish. Society for Experimental Biology Seminar Series* 61 (Wood, C. M. & McDonald, D. G., eds). Cambridge. Cambridge University Press. 159–176.

Vernon-Minton, R; J. P. Hawke; W. M. Tatum. 1983. Hormone-induced spawning of red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Aquaculture*. 30: 363-368.

Walsh, W.A. and Lund Jr., W.A., 1989. Oxygen consumption by eggs of the grubby, *Myoxocephalus aeneus*, and the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecemspinosus*. *Can. J. Zool.* 67, pp. 1613–1619.

Walser, C. A. and R. P. Phelps. 1994. The use of formalin and iodine to control *Saprolegnia* sp. infections on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs. In: D. Tave and C. S. Tucker (eds.); *Recent developments in catfish aquaculture*. Haworth Press, New York: 269–278

Watanabe, T; A. Itoh; S. Satoh; S. Kitajima; S. Fujita. 1985. Effect of dietary protein levels on chemical components of egg produced by red bream broodstock . *Nippon Suisan Gakkaishi* 51: 1501-1509.

Watanabe, W. O; E. P. Ellis; S. C. Ellis; J. Chaves ; C. Manfredi. 1998. Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish for aquaculture. *Journal of the world aquaculture society*. 29(2):176-187.

Waterstrat, P.R., Marking, L.L., 1995. Clinical evaluation of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride for the treatment of *Saprolegnia parasitica* on fall chinook salmon eggs. *Prog. Fish-Cult.* 57, 287– 291.

Watson, C.A; F.A. Chapman. 2002. *Artificial Incubation of Fish Eggs*. Institute of food and agricultural sciences, University of Florida. 1-5.

Williams, K. N. Papanikos; R. P. Phelps; J. D. Shardo. 2004. Development, growth and yolk utilization of hatchery-reared red snapper *Lutjanus campechanus* larvae. *Marine ecology progress series*. 275: 231-239.

Yamamoto T. S; W. Kobayashi. 1991. Closure of the micropyle during embryonic development of some pelagic fish eggs. *Journal of fish biology*. 40: 225-241.

Zaror L; L. Collado; H. Bohle; E. Landskron; J. Montaña; F. Avendaño. 2004. *Saprolegnia parasitica* en salmones y truchas del sur de Chile. *Archivo médico veterinario*. 36(1): p. 71-78. ISSN 0301-73X.