

**EFECTO DE DISTINTAS DIETAS
PARA REPRODUCTORES DE DORADA (*Sparus aurata*)
SOBRE LA CALIDAD DE SUS PUESTAS**

HIPÓLITO FERNÁNDEZ-PALACIOS BARBER

MARIA SOLEDAD IZQUIERDO LÓPEZ

LIDIA ROBAINA ROBAINA

***INFORMES TÉCNICOS DEL
INSTITUTO CANARIO DE CIENCIAS MARINAS***

Número 12 (200 pp.), Telde (Gran Canaria), 2005

**EFEECTO DE DISTINTAS DIETAS PARA
REPRODUCTORES DE DORADA (*Sparus aurata*)
SOBRE LA CALIDAD DE SUS PUESTAS**

Resumen

del

**Premio de Investigación “Viera y Clavijo” (Ciencias) 2005.
Casa de Colón. Cabildo de Gran Canaria**

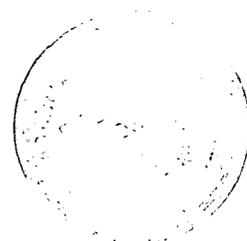
HIPÓLITO FERNÁNDEZ-PALACIOS BARBER

MARIA SOLEDAD IZQUIERDO LÓPEZ

LIDIA ROBAINA ROBAINA



**INSTITUTO CANARIO DE CIENCIAS MARINAS - UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE
GRAN CANARIA**



ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN 4

 1.1.- Indicadores de la calidad de la puesta 4

 1.2.- Factores que afectan a la calidad de la puesta 6

 1.3.- Efectos de la alimentación de los reproductores sobre la puesta 9

 1.3.1.- Efecto del nivel de ingesta10

 1.3.2.- Efecto de los componentes de la dieta12

 1.3.2.1.- Efecto sobre la fecundidad13

 1.3.2.2.- Efecto sobre la fecundación16

 1.3.2.3.- Efecto sobre el desarrollo del embrión19

 1.3.2.4.- Efecto sobre la calidad larvaria24

 1.4.- Periodo de tiempo necesario para que la dieta influya sobre la calidad
 de la puesta25

2.- MATERIAL Y MÉTODOS27

 2.1.- Tanques experimentales27

 2.2.- Condiciones de cultivo29

 2.3.- Control de las puestas30

 2.4.- Tratamiento estadístico de los datos42

2.5.- Métodos analíticos de composición	43
2.6.- Preparación de las dietas experimentales	49
2.7.- Nombres vulgares de las especies utilizados	52
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.1.- Experimento I	55
3.1.1.- Reproductores	55
3.1.2.- Composición de las dietas	56
3.1.3.- Resultados	58
3.1.4.- Discusión	70
3.2.- Experimento II	77
3.2.1.- Reproductores	77
3.2.2.- Composición de las dietas	78
3.2.3.- Resultados	82
3.2.4.- Discusión	99
3.3.- Experimento III	
3.3.1.- Reproductores	106
3.3.2.- Composición de las dietas	107
3.3.3.- Resultados	108

3.3.4.- Discusión	125
3.4.- Experimento IV	132
3.4.1.- Reproductores	132
3.4.2.- Composición de las dietas	133
3.4.3.- Resultados	135
3.4.4.- Discusión	151
4.- CONCLUSIONES	158
5.- BIBLIOGRAFÍA	160
6.- LISTA DE TABLAS	195
7.- LISTA DE FIGURAS	198

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- INDICADORES DE LA CALIDAD DE LA PUESTA

Las poblaciones de peces, tanto naturales como cultivadas, dependen de la producción de huevos de buena calidad. Las puestas de baja calidad constituyen uno de los mayores impedimentos para la expansión de la acuicultura tanto marina como de agua dulce. En la industria de la acuicultura los huevos de buena calidad han sido definidos como aquellos que tienen baja mortalidad en la fecundación, formación del embrión, eclosión, y antes de la primera alimentación exógena, cuando la larva ha reabsorbido el saco vitelino (Bromage *et al.*, 1992). La morfología de las larvas se ha usado como indicador de la calidad del gameto en algunas especies de peces (Kjørsvik, 1994). Otros autores sugieren que la apariencia de la zona pelúcida, la esfericidad del huevo, su transparencia, y el número y distribución de las gotas de grasa, pueden relacionarse con la calidad del huevo (Kjørsvik *et al.*, 1990; Bromage *et al.*, 1994). En los criaderos de especies marinas a menudo se distingue entre huevos de buena calidad y huevos de mala calidad en función, respectivamente, de si flotan o no en la superficie del agua (McEvoy, 1984; Carrillo *et al.*, 1989; Kjørsvik *et al.*, 1990). Sin embargo, la correlación positiva entre la flotación y buena calidad de los huevos no es cierta para varias especies marinas, por ejemplo para el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). En esta especie el único indicador de la calidad del huevo establecido hasta ahora, está basado en la valoración de la simetría celular en las fases tempranas del desarrollo embrionario (Bromage *et al.*, 1994; Shields *et al.*, 1997). Otros indicadores de la calidad de la puesta que se han utilizado son el tamaño y la composición bioquímica del huevo. Aunque es conocido que huevos grandes producen también larvas más grandes, no existen evidencias de que el diámetro del huevo sea un aspecto determinante de su calidad (Kjørsvik *et al.*, 1990). En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) el tamaño de los huevos no aparece como un importante indicador de la calidad

de la puesta (Springate y Bromage, 1985; Bromage *et al.*, 1992). En cuanto a la composición bioquímica del huevo, en principio podría esperarse que ese fuera el componente más determinante de la calidad de este. Sin embargo los resultados obtenidos en varias especies tanto marinas como dulce acuícolas, no han mostrado una clara relación entre la composición bioquímica del huevo y la posterior supervivencia de huevos y larvas (Craig y Harvey, 1984; Kjørsvik *et al.*, 1990).

En la mayoría de los trabajos de investigación sobre la calidad de la puesta, las tasas de fecundación y de eclosión han sido utilizadas como criterios importantes (Kjørsvik *et al.*, 2003). La supervivencia hasta un determinado estadio de desarrollo y la producción final de larvas también se han utilizado como medidas de la calidad (Fernández-Palacios *et al.*, 1995).

Recientemente se ha propuesto la utilización de nuevos indicadores de la calidad de la puesta tales como marcadores genéticos (Kestemont *et al.*, 1999; Carnevali *et al.*, 2000, 2001), peso de las cenizas del huevo (Trippel *et al.*, 2000), y el pH del fluido ovárico (Lahnsteiner *et al.*, 2000; Denson *et al.*, 2001).

Puesto que entre los diversos parámetros y características de los huevos que han sido propuestos como indicadores de la calidad de la puesta en peces ninguno de ellos por si mismo parece capaz de definir completamente la calidad de la puesta, una combinación de ellos proporcionaría mejores resultados.

1.2.-FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA PUESTA

Al igual que el crecimiento gonadal y la fecundidad son muy susceptibles a las influencias medioambientales, es claro que la calidad de los huevos producidos podría también verse afectada, limitando la producción de larvas y su supervivencia (Kjørsvik *et al.*, 1990). Factores tanto bióticos como abióticos han sido señalados como posibles determinantes de la calidad del huevo o de su supervivencia, tanto en cautividad como en el medio natural. En la bibliografía, el término "calidad del huevo" ha sido utilizado en varios sentidos, Kjørsvik *et al.* (1990) han propuesto una definición de mayor validez, definiendo el término como "el potencial del huevo para producir larvas viables". Dicha potencialidad estaría determinada por varios parámetros físicos, genéticos y químicos, así como por los procesos fisiológicos que suceden durante el desarrollo inicial del huevo. Los factores que afectan a la calidad del huevo están determinados por las propiedades intrínsecas del propio huevo y el entorno en el que son fecundados y posteriormente incubados. Algunos de los factores que afectan a la calidad del huevo son conocidos, pero muchos (probablemente más) son desconocidos. Factores que afectan a la calidad del huevo incluyen el estado endocrino de la hembra durante el crecimiento del oocito en el ovario. Hay creencia extendida de que los nutrientes aislados por el oocito, y su procesamiento durante el crecimiento y maduración del mismo es de los factores importantes que afectan a la calidad del huevo (Craik y Harvey, 1984; Kjørsvik *et al.*, 1990; Bromage *et al.*, 1992). La fisiología del reproductor y su estado hormonal, que a su vez afectan la incorporación de compuestos en los huevos, incluidas las hormonas, probablemente influyen en la calidad de los mismos por ejemplo, el estrés en los reproductores tiene efectos perjudiciales en la calidad de las puestas (Campbell *et al.*, 1994). La dieta de los reproductores ha recibido gran atención con respecto a su efecto en la calidad del huevo, y existen estudios que indican que las influencias mayores sobre la calidad la ejercen sólo unos pocos de los diferentes componentes dietéticos (Washburn *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1991a,b; Harel *et al.*, 1994).

El conocimiento de la influencia genética en la calidad de la puesta es muy limitado aunque sabemos que los genes de los padres influyen fuertemente en la calidad de la progenie. En peces, sólo muy recientemente se han empezado a estudiar las influencias genéticas en la calidad del huevo (Lam, 1994; Nagahama, 1994).

Nuestro conocimiento de los procesos que afectan a la calidad del huevo tanto en peces salvajes como en cultivados es sumamente limitado. En los pocos estudios que se han llevado a cabo en la naturaleza, se observa que la calidad del huevo puede mostrar una variabilidad considerable entre distintos ciclos reproductores (Kjørsvik *et al.*, 1990). La calidad del huevo en muchas especies de peces cultivados, especialmente marinas, es la mayor dificultad para el éxito de su cultivo (Kjørsvik *et al.*, 1990). Por ejemplo, en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y en la dorada (*Sparus aurata*) las tasas de eclosión son a menudo sólo del 10-15% del total de huevos puestos (Carrillo *et al.*, 1989). En el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), una especie comercial muy importante con un considerable potencial para la acuicultura, la tasas de eclosión son a menudo menores del 1% (Norberg *et al.*, 1991). Algunos de los problemas de la calidad del huevo en las especies marinas son probablemente función de las dificultades para mantener las condiciones de incubación óptimas para el huevo, dado que una de las causas de mayor mortalidad es la colonización bacteriana de los huevos fecundados (Barker *et al.*, 1989; Hansen y Olafsen, 1989). Incluso en salmónidos, donde los métodos de incubación de los huevos fecundados están bien establecidos, puede haber pérdidas del 50% en el momento de la eclosión (Bromage *et al.*, 1992). En peces con puestas múltiples, existen considerables variaciones en la calidad de las puestas a lo largo de un ciclo reproductivo, incluso cuando las puestas son mantenidas bajo condiciones aparentemente iguales (Manning y Crim, 1995; Kjesbu *et al.*, 1996).

En acuicultura, el manejo de los reproductores es probablemente el factor que más influye en la

calidad de la puesta en los criaderos incluyendo la sobremaduración (Springate *et al.*, 1984; Kjærsvik *et al.*, 1990).

De los numerosos factores que han sido sugeridos como posibles determinantes de la calidad de la puesta solo unos pocos de ellos han mostrado una clara influencia en la calidad de la progenie (Carrillo *et al.*, 2000) y pueden resumirse en los siguientes:

Factores que afectan a los reproductores

- Genotipo
- **Alimentación**
- Inducción a la puesta
- Estrés
- Edad
- Sobremaduración

Factores que afectan al huevo

- Propiedades físicas y fisiológicas
- Aberraciones cromosómicas
- Colonización bacteriana
- Propiedades físico-químicas del agua de la puesta e incubación

1.3.-EFECTOS DE LA ALIMENTACIÓN DE LOS REPRODUCTORES SOBRE LA PUESTA

La nutrición de los reproductores sigue siendo una de las áreas más pobremente entendidas e investigadas en el campo de la nutrición de los peces, y los estudios realizados están limitados a unas pocas especies (Brooks *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001). A grandes rasgos, esto es debido a la necesidad de grandes instalaciones, interiores o exteriores, para mantener grandes grupos de peces adultos y, consecuentemente al alto coste necesario para poder desarrollar largos experimentos de alimentación de reproductores. Sin embargo, como ocurre en la nutrición humana y en ganadería (Leboulanger, 1977), es obvio que los requerimientos nutricionales de los reproductores se diferencian claramente de los que requieren los animales juveniles en rápido crecimiento. Es más, como en otros animales, está claro que muchos de los problemas y deficiencias que aparecen en las etapas tempranas del desarrollo de las larvas recién eclosionadas están directamente relacionadas con el régimen alimenticio (tamaño de la ración, nivel de nutrientes y periodo de alimentación) de los reproductores.

Varios estudios realizados sobre las principales especies cultivadas han demostrado que la reproducción y la calidad del huevo son influenciados por nutrientes como proteínas, lípidos, minerales, vitaminas y carbohidratos, así como por el tamaño de la ración y por el periodo de alimentación de los reproductores. Esto ha sido descrito en especies como la dorada, *Sparus aurata* (Mourente y Odriozola, 1990; Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997), halibut, *Hippoglossus hipoglossus* (Bruce *et al.*, 1993; Mazorra *et al.*, 2003), lubina, *Dicentrarchus labrax* (Cerdá *et al.*, 1994b; Carrillo *et al.*, 1995; Navas *et al.*, 1997), pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 b, 1991 b), trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Washburn *et al.*, 1990; Choubert y Blanc, 1993; Blom y Dabrowski, 1995; Choubert *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1998), salmón Atlántico, *Salmo Salar* (Eskelinen, 1989; Berglund, 1995; Christiansen y Torrissen, 1997), salmón coho, *Oncorhynchus kisutch* (Hardy *et*

al., 1984, 1990), tilapia, *Oreochromis niloticus* (De Silva y Radampola, 1990; Cumaratunga y Mallika, 1991; Santiago y Reyes, 1993; Gunasekera *et al.*, 1995, 1996 a, b, 1997; Siddiqui *et al.*, 1998), carpa común, *Cyprinus carpio* (Manissery *et al.*, 2001), lenguado del Pacífico, *Paralichthys olivaceus* (Furuita *et al.*, 2003 a,b), seriola coreana, *Seriola quinqueradiata* (Agius *et al.*, 2001), lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Dinis *et al.*, 1999), chano, *Chanos chanos* (Emata *et al.*, 2000), rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Lavens *et al.*, 1999), jurel dentón, *Pseudocaranx dentex* (Vasallo-Agius *et al.*, 2001a, b), bacalao, *Gadus morhua* (Mangor-Jensen y Birkeland, 1993) y pez gato del canal, *Ictalurus punctatus* (Torrans y Lowell, 2001).

1.3.1.-EFECTO DEL NIVEL DE INGESTA

Una restricción en el nivel de ingesta afecta seriamente a la puesta. Así la reducción en la tasa de alimentación ha sido descrita como la causa de inhibición de la maduración de las gónadas en algunas especies tales como el carpín, *Carassius auratus* (Sasayama y Takahashi, 1972), lubina, *Dicentrarchus labrax* (Cerdá *et al.*, 1994 a) y machos de salmón Atlántico, *Salmo salar* (Berglund, 1995). En lubina, después de seis meses de alimentación de los reproductores con solo media ración, las tasas de crecimiento descenden, el periodo de puesta se retrasa y los huevos y larvas recién nacidas son más pequeñas que las obtenidas de peces comiendo la ración completa (Cerdá *et al.*, 1994 a). En hembras de lubina, los efectos negativos de la restricción de comida están asociados con la reducción de los niveles de estradiol en el plasma (Cerdá *et al.*, 1994 b), mientras que la expresión de los genes GtH no se ve afectada por la reducción de la ingesta en hembras maduras de carpín (Sohn *et al.*, 1998).

Algunos estudios realizados en el medio natural han mostrado que la disponibilidad de alimento

es el principal factor ambiental determinante de la fecundidad, que se puede definir como el número de huevos maduros que son producidos por una hembra durante el ciclo anual de puesta (Wotton, 1979; Bromage *et al.*, 1992.)

Algunos de estos estudios se han llevado a cabo sobre especies dulce acuícolas que habitan en ríos con diferente disponibilidad de comida, mostrando que los ejemplares que viven en los ríos con mas baja productividad muestran su fecundidad reducida, esto ha sido señalado para el rutilo, *Rutilus rutilus* (McKay y Mann, 1969; Kuznetsov y Khalitov, 1978), la brema, *Abramis brama* (Brylinska y Brylinski, 1972), el charolito, *Poeciliopsis occidentalis* (Constanz, 1975) o el espinosillo, *Gasterosteus aculeatus* (Ali y Wooton, 2000).

En referencia a las especies marinas, Bagenal (1966) señaló que las variaciones de fecundidad que se observaban en las poblaciones naturales de platija, *Pleuronectes platessa* del oeste de Europa podían estar relacionadas con diferencias en la disponibilidad de alimento, a su vez debidas a la densidad de población

Los estudios realizados en el medio natural muestran ligeras evidencias de una relación directa entre el tamaño de la ración y la reproducción, mostrando la necesidad de realizar experimentos en cautividad que estudien los efectos del tamaño de la ración sobre la fecundidad.

Experimentos realizados con la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, en condiciones de cautividad, han mostrado que restricciones en la ración tienen como consecuencia una reducción de la fecundidad, y en algunos casos, de la proporción de ejemplares que llegan a la maduración sexual (Gutsell, 1940; Phillips *et al.*, 1956; Baiz, 1978; Orr *et al.*, 1982; Jones y Bromage, 1987). Existiendo

evidencias de que largos periodos de restricción en la dieta (8 o más meses) tienen un efecto negativo sobre la reproducción de esta especie (Scott, 1962)

En estudios sobre peces marinos también se ha encontrado un efecto negativo de la baja disponibilidad del alimento sobre la fecundidad. Hislop *et al.* (1978) y Robb (1982) mostraron que la producción de huevos y los niveles de ingesta estaban positivamente correlacionados en el eglefino *Melanogrammus aeglefinus* mantenido en condiciones de laboratorio. De igual forma se ha encontrado esta correlación en otras especies como arenque, *Clupea harengus* (Ma *et al.*, 1998) medaka, *Oryzias latipes* (Hirshfield, 1980) o el bacalao, *Gadus morhua* (Karlsen *et al.*, 1995; Kjesbu *et al.*, 1998).

1.3.2.-EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA DIETA

Desde los pioneros estudios de Watanabe *et al.* (1984 a, b, c) en el pargo japonés (*Pagrus major*) se han ido incrementando las evidencias de que la composición de las dietas para reproductores, de varias especies de peces, durante el periodo de prepuesta es el factor que más influye en la calidad de sus huevos y larvas. Componentes dietéticos como lípidos polares y no polares (Watanabe *et al.*, 1991a, b), ácidos grasos (Harel *et al.*, 1994; Carillo *et al.*, 1995; Bruce *et al.*, 1999; Mazorra *et al.*, 2003), ácido ascórbico (Mangor-Jensen *et al.*, 1991; Dabrowski y Blom, 1994; Blom y Dabrowski, 1995), vitamina A (Furuita *et al.*, 2003 a), vitamina E (Emata *et al.*, 2000), carotenos (Agius *et al.*, 2001), carbohidratos (Washburn *et al.*, 1990; Mangor-Jensen y Birkeland, 1993), proteínas (Harel *et al.*, 1995; Gunasekera *et al.*, 1996 a, b) y nucleótidos (González-Vecino *et al.*, 2004) han demostrado su efecto sobre la calidad de la puesta de reproductores de peces. Lípidos y ácidos grasos son los componentes dietéticos que más influyen en la calidad de las puestas, especialmente en aquellas especies de puesta continua que presentan cortos

periodos de vitelogenesis y que son capaces de incorporar estos componentes dietéticos en los huevos incluso durante el periodo de puesta.

1.3.2.1.-EFECTO SOBRE LA FECUNDIDAD

Uno de los parámetros utilizados para evaluar la calidad de la puesta es el de la fecundidad, en especies que ponen los huevos varias veces durante la época natural de puesta, la fecundidad se considera como el producto del número de puestas por el número medio de huevos producido en cada una de ellas (Wotton, 1979). La fecundidad relativa sería la fecundidad expresada por unidad de peso.

La fecundidad se ve afectada por deficiencias nutricionales en las dietas de los reproductores. fecundidades reducidas han sido citadas en varias especies de peces marinos causadas entre otras, por la influencia de un desequilibrio de nutrientes que afecta el sistema endocrino cerebro-pituitario-gonadal o por restricciones en la disponibilidad de componentes bioquímicos para la formación de los huevos.

La elevación de los niveles de lípidos dietéticos de 12% a 18% en las dietas para reproductores del pez conejo (*Siganus guttatus*) produce un aumento en la fecundidad (Duray *et al.*, 1994), aunque este efecto también pudiera relacionarse con el aumento gradual en los ácidos grasos esenciales de la dieta. De hecho, uno de los factores nutritivos que más pueden afectar la calidad de la puesta es el contenido en ácidos grasos esenciales (AGEs) de la dieta (Watanabe *et al.*, 1984 a, b). La fecundidad en la dorada (*Sparus aurata*) aumenta significativamente con un aumento en los n-3 HUFA (ácidos grasos poliinsaturados con 20 o más átomos de carbono, esenciales para peces marinos) contenidos en la dieta (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Resultados similares han sido señalados en otros espáridos (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 a, b). Sin embargo, estudios en la reproducción de la tilapia del Nilo

(*Oreochromis niloticus*) indican que el número de hembras que ponen, la frecuencia de las puestas, número de larvas por puesta y la producción total de larvas después de un período de 24 semanas, es mucho mayor en peces alimentados con un dieta basal complementada con aceite de soja, con alto contenido en ácidos grasos de la serie n-6 esenciales para estas especies de peces (Watanabe, 1982) y relativamente bajas en peces alimentados con dietas complementada con un 5% de aceite de hígado de bacalao, con alto contenido en ácidos grasos de la serie n-3, (Santiago y Reyes, 1993). Sin embargo, los peces alimentados con la dietas conteniendo aceite de hígado de bacalao mostraron más ganancia de peso (Santiago y Reyes, 1993).

En otras especies como el bacalao (*Gadus morhua*), no se observó un claro efecto de los ácidos grasos esenciales sobre la fecundidad cuando los reproductores fueron alimentados con los gránulos de dietas comerciales recubiertos con diferentes tipos de aceites (Lie *et al.*, 1993). Un experimento de alimentación a largo plazo con el bacalao, en el que se alimentaron los reproductores con los gránulos de la dieta recubiertos con aceite de soja, de capelan o de sardina, mostró un efecto relativamente pequeño en la composición en ácidos grasos de los huevos de los reproductores alimentados con los aceites de pescado, sin embargo, la concentración en n-3 HUFA fue significativamente menor en los huevos de los peces alimentados con el aceite de soja (Lie *et al.*, 1993). Éstos resultados pueden ser debidos a los bajos requerimientos de los reproductores de bacalao en AGEs, comparados con los espáridos, que pueden ser cubiertos por los lípidos residuales presentes en la harina de pescado de las dietas experimentales.

Aparte de que las deficiencias dietéticas de AGEs causan efectos negativos en la calidad de las puestas, también se ha señalado que su exceso puede tener efecto negativo sobre la misma. Por ejemplo, niveles altos de n-3 HUFA en la dieta de los reproductores de dorada causan una disminución

de la cantidad total de huevos producidos por estos, a pesar de un aumento en el huevo de la concentración de n-3 HUFA (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Resultados similares son encontrados en lenguado del Pacífico, *Paralichthys olivaceus* (Furuita *et al.*, 2002). Así, altos niveles dietéticos de n-3 HUFA podrían afectar el eje endocrino cerebro-pituitario-gonadal. Por ejemplo, se ha encontrado que los ácidos grasos eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA) reducen “in vitro” la acción esteroidogénica de la gonadotropina en el ovario de los teleósteos (Mercure y Van Der Kraak, 1995). Esto también ocurre en mamíferos en los que un alto nivel de ácidos grasos en la dieta retrasa la aparición de la pubertad (Zhang *et al.*, 1992).

La composición proteica de la dieta de los reproductores influye en la calidad de la puesta regulando la síntesis y selección de los componentes del saco vitelino (Tandler *et al.*, 1995). Las proteínas actúan como fuente de aminoácidos y como material de reserva utilizado durante muchas actividades biosintéticas que son esenciales para las etapas tempranas de la embriogénesis (Metcoff, 1986). El desarrollo embrionario en peces depende del balance de aminoácidos presentes en el huevo (Fynh y Serigstad, 1987; Fynh, 1989). En estudios llevados a cabo en el pargo japonés (*Pagrus major*) se ha estimado que el nivel óptimo de proteínas en dietas, conteniendo harina de pescado como principal fuente de energía, está alrededor del 45% (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, e). Los reproductores alimentados por debajo de ese nivel producen aproximadamente un 30% menos de huevos. Reproductores de lubina (*Dicentrarchus labrax*), alimentados con una dieta con alto contenido en proteína muestran una fecundidad 1,5 veces mayor que los alimentados con una dieta baja en proteína (Cerdá *et al.*, 1994 b). En tilapia (*Oreochromis niloticus*), reproductores alimentados con dietas conteniendo diferentes porcentajes de proteína, la fecundidad esta positivamente correlacionada con la cantidad de proteína contenida en la dieta (El-Sayed *et al.*, 2003).



Otros nutrientes que pueden afectar la fecundidad son la vitamina E (Izquierdo y Fernández-Palacios, 1997; Fernández-Palacios *et al.*, 1998), la vitamina C (Blom y Dabrowski, 1995), la combinación de ambas vitaminas (Emata *et al.*, 2000) y los carbohidratos. Así reproductores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con una dieta baja en carbohidratos muestran una fecundidad relativa disminuida (Washburn *et al.*, 1990).

1.3.2.2.-EFECTO SOBRE LA FECUNDACIÓN

Ciertos nutrientes ejercen un marcado efecto en la fecundación. Los niveles de EPA y ácido araquidónico (20:4n-6, AA) en la dieta muestran una correlación con la tasa de fecundación en la dorada, *Sparus aurata* (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997). Igualmente puestas de reproductores de halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, alimentados con dietas con diferente contenido en AA muestran una correlación positiva entre la tasa de fecundación y el nivel de AA en la dieta (Mazorra *et al.*, 2003). Dado que la composición en ácidos grasos del esperma depende de la composición en ácidos grasos esenciales en la dieta de los reproductores, en especies como la trucha del arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Watanabe *et al.*, 1984 d, Labbe *et al.*, 1993) y la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Asturiano, 1999), es posible que la motilidad de esperma y a su vez la fecundación se viesen afectadas por el nivel dietético de estos ácidos grasos. Particularmente en salmónidos donde la criopreservación del esperma es corrientemente utilizada, la composición en ácidos grasos del esperma podría ser el factor que determinara la integridad de la membrana después de la descongelación. Sin embargo, Labbe *et al.* (1993) no encuentran ningún efecto de los ácidos grasos dietéticos (de las series n-3 y n-6) en la capacidad de fecundación del esperma descongelado. Por otro lado una baja relación colesterol-fosfolípidos en la membrana está correlacionada con una buena resistencia del esperma a la congelación (Labbe y Maisse, 1996).

Los ácidos grasos poliinsaturados también regulan la producción de eicosanoides, particularmente prostaglandinas que están implicadas en numerosos procesos reproductores (Moore, 1985), incluyendo la producción de hormonas esteroides, el desarrollo gonadal y la ovulación. Los ovarios de los peces tienen una alta capacidad de generar eicosanoides, entre ellos, las prostaglandinas E (PGEs) liberadas por la acción de las ciclooxigenasas y los leucotrienos LTB_4 y LTB_5 , liberados por la acción de las lipooxigenasas (Knight *et al.*, 1995). Los inhibidores de esta última enzima reducen la maduración de los oocitos en lubina (*Dicentrarchus labrax*) inducida por la gonadotropina (Asturiano, 1999), sugiriendo que los productos derivados de la acción de la lipooxigenasa también pueden estar involucrados en la maduración de los oocitos. Este hecho se ha demostrado en los mamíferos donde algunos leucotrienos (LTB_4) mejoran la acción esteroidogénica de la hormona luteinizante (LH) (Sullivan y Cooke, 1985). El efecto beneficioso del EPA y del AA en la fecundación han sido señalado por varios investigadores. Ambos ácidos grasos están relacionados en funciones de transmisión celular y son precursores de eicosanoides. El EPA es conocido como un precursor de prostaglandinas (PGs) de la serie III y el AA es un precursor de PGs de la serie II (Stacey y Goetz, 1982). "In vitro" el AA, pero no el EPA ni el DHA, estimula la liberación de testosterona en los testículos del carpín (*Carassius auratus*) a través de su conversión en prostaglandina PGE_2 (Wade *et al.*, 1994). Por el contrario, el EPA o el DHA bloquearon la acción esteroidogénica de ácido del araquidónico y de la PGE_2 . AA y EPA modulan la esteroidogénesis en los testículos del carpín (Wade *et al.*, 1994). Así, el momento de la espermiación puede ser retrasado y como consecuencia las tasas de fecundación pueden reducirse por una depresión de la esteroidogénesis causada por una deficiencia o desequilibrio de los AGEs en la dieta de los reproductores. Es más, también se conocen las prostaglandinas como importantes feromonas en algunos teleósteos. Algunas PGs producidas por la hembra del carpín, como las PGFs, se han mostrado como estimulantes del comportamiento sexual del macho y sincronizan la acción del macho y la hembra

en la puesta, afectando así directamente el éxito en la fecundación (Sorensen *et al.*, 1988).

El triptófano, que es un precursor de la serotonina, puede afectar la maduración de las gónadas tanto en machos como en hembras. Dietas complementadas con un 0,1% de triptófano en las dietas para reproductores del ayu (*Plecoglossus altivelis*) dan como resultado un aumento significativo de los niveles de testosterona adelantando así el tiempo de espermiación en los machos e induciendo la maduración de las hembras (Akiyama *et al.*, 1996).

Otros nutrientes conocidos por ser importantes para la fecundación son la vitamina E (Izquierdo y Fernández-Palacios, 1997; Fernández-Palacios *et al.*, 1998), los carotenos (Harris, 1984; Craik, 1985, Agius *et al.*, 2001) y la vitamina C. El ácido ascórbico ha demostrado jugar un papel importante en la reproducción de los salmónidos (Eskelinen, 1989; Blom y Dabrowski, 1995) y se ha señalado su importante papel en la esteroidogénesis y vitelogénesis (Sandnes, 1991). La función antioxidante de las vitaminas C y E juega un importante papel protector de las células del esperma durante la espermatogénesis y hasta el momento de la fecundación, reduciendo el riesgo de peroxidación de los lípidos que iría en detrimento de la motilidad del esperma. La concentración de ácido ascórbico en el fluido seminal refleja la concentración de esta vitamina en la dieta de los reproductores y no afecta la calidad de semen al principio de la estación de puesta (Ciereszco y Dabrowski, 1995). Sin embargo, una deficiencia de la concentración de ácido ascórbico, en la dieta, reduce la concentración del esperma y produce una motilidad reducida al final del periodo de puesta.

1.3.2.3.-EFECTO SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN

Varios nutrientes son esenciales para el normal desarrollo del embrión, y su nivel óptimo en las dietas de los reproductores mejora la morfología del huevo y el porcentaje de eclosión. Se ha encontrado que el porcentaje de huevos morfológicamente normales se incrementa, con un aumento de los niveles de n-3 HUFA, en las dietas de los reproductores y la incorporación de estos ácidos grasos en los huevos (Fernández-Palacios *et al.*, 1995), indicando la importancia de los ácidos grasos esenciales (AGEs) para el desarrollo normal de los huevos y embrión de la dorada (*Sparus aurata*). Por ejemplo, la alimentación de reproductores de dorada con dietas deficientes en AGEs ocasionan un aumento del número de gotas de grasa en el huevo (Fernández-Palacios *et al.*, 1997) este hecho también se ha señalado en el pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1984 a). Así mismo, la mejora en la calidad de la puesta en lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentada con una dieta enriquecida con aceite de pescado de alta calidad ha sido asociada con un alto contenido en ácidos grasos de la serie n-3 (Navas *et al.*, 1996). Por otra parte, la comparación entre huevos de bacalao (*Gadus morhua*) de agua salobre y agua marina muestran que el contenido en AA y la relación DHA/EPA de la fracción polar de los lípidos de los huevos están correlacionados positivamente con la simetría del huevo y su viabilidad (Pickova *et al.*, 1997). Estos ácidos grasos juegan un papel estructural importante como componentes de fosfolípidos en las biomembranas del pez y están asociados con su fluidez y el correcto funcionamiento de las funciones celulares y de la membrana en peces marinos (Bell *et al.*, 1986). En algunas especies, como el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), los n-3 PUFA se consideran la mayor fuente de energía durante el desarrollo embrionario temprano (Falk-Petersen *et al.*, 1989). No obstante, la composición en ácidos grasos de los lípidos de los huevos de peces no sólo es determinada por la dieta de los reproductores, si no que también esta relacionada con la especie y con diferentes lotes de la misma especie (Pickova *et al.*, 1997). En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), alimentada con una dieta deficiente en n-3,

durante los tres últimos meses de la vitelogenesis, se produce un efecto moderado en la incorporación de DHA en los lípidos del huevo, mientras que la concentración de EPA disminuye en un 50% (Fremont *et al.*, 1984). Sin embargo, los niveles de otros ácidos grasos en los huevos no son afectados por la composición en ácidos grasos de la dieta. Esta retención selectiva de DHA también se ha encontrado durante la embriogénesis (Izquierdo, 1996) y durante la inanición (Tandler *et al.*, 1989) denotando la importancia de este ácido graso para el desarrollo del embrión y de la larva. Los requisitos en ácidos grasos esenciales para reproductores de espáridos varían entre un 1,5% y un 2,5% de n -3 HUFA en la dieta (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 a, b; Fernández-Palacios *et al.*, 1995), siendo más alto que los determinados para juveniles que varía entre el 0,5% y el 0,8% de n -3 HUFA en la dieta (Izquierdo, 1996). Estos valores son también más altos que los determinados para salmónidos, aproximadamente alrededor de 1% de n -3 HUFA (Watanabe, 1990).

Los radicales libres pueden deteriorar las membranas del huevo y la integridad de las mismas. La vitaminas E y C y los carotenos (por ejemplo la astaxantina) se han mostrado como importantes agentes contra la acción de radicales libres. Aunque los efectos negativos de la deficiencia de la vitamina E en la reproducción de otros vertebrados se ha demostrado desde los años veinte, la importancia de la vitamina E en la dieta para reproductores de peces se demostró en 1990, deficiencias de esta vitamina en dietas de reproductores de la carpa común (*Cyprinus carpio*) y del ayu (*Plecoglossus altivelis*), producían la no maduración de las gónadas y reducían las tasas de eclosión y de supervivencia larvaria en el ayu (Watanabe, 1990). Un aumento de los niveles dietéticos de vitamina E (por encima de 2000 mg/kg) en las dietas del pargo japonés (*Pagrus major*) produjo un aumento en los porcentajes de huevos flotantes, de eclosión y de larvas normales (Watanabe *et al.*, 1991 a). También se han señalado tasas más bajas de fecundación y de supervivencia larvaria en puestas de reproductores alimentados con niveles dietéticos bajos en α -tocoferol. La función de vitamina E como antioxidante inter e intra celular

para mantener la homeostasis de metabolitos lábiles en la célula y en el plasma tisular es bien conocida. En ratas diabéticas, complementos de vitamina E en las dietas maternas también reducen las malformaciones congénitas, incrementándose las concentraciones de tocoferol en los tejidos maternos, del embrión y del feto (Siman y Eriksson, 1997). En la dorada (*Sparus aurata*) niveles de vitamina E de 200 mg α -tocoferol/kg en la dieta de los reproductores son suficientes para conseguir puestas de calidad, sin embargo, Hemre *et al.* (1994) han sugerido que este nivel es subóptimo para reproductores de rodaballo (*Scophthalmus maximus*). En el rodaballo (Hemre *et al.*, 1994) o salmón Atlántico, *Salmo salar* (Lie *et al.*, 1993), la vitamina E es movilizada de los tejidos periféricos durante la vitelogenesis, aunque el contenido en vitelogenina plasmática no era afectado, sugiriendo que las lipoproteínas pueden estar implicadas en el transporte de vitamina E durante este período (Lie *et al.*, 1993). La vitamina C contenida en los huevos de trucha de arco iris reflejan el nivel de este nutriente en la dieta y esta asociada con la mejora de la calidad del huevo (Sandnes *et al.*, 1984). Cambios en los contenidos de vitamina C en ovarios del bacalao no afectan significativamente la tasa de eclosión (Mangor-Jensen *et al.*, 1993). De nuevo, estos resultados sugieren que la composición bioquímica de los huevos no debe ser usada como el único criterio para determinar la calidad de los huevos, a pesar del hecho de que varios autores (Sandnes *et al.*, 1984; Craik, 1985; Harel *et al.*, 1994) han sugerido que la composición química de los huevos está relacionada con el éxito de la puesta, desde el momento en que los nutrientes almacenados en el huevo deben satisfacer las demandas nutricionales para el desarrollo del embrión y su crecimiento.

El contenido en carotenos de las dietas de reproductores también se ha señalado como importante para el desarrollo normal de embrión y larvas. Sin embargo, durante 50 años ha habido una gran controversia sobre la relación entre el contenido de carotenos del huevo y la calidad de los mismos en salmónidos. Para una revisión de los carotenos y sus funciones (incluyendo su efecto en la calidad del huevo) veáse Tacon (1981), Craik (1985), Choubert (1986), Torrissen (1990) y Torrissen y Christiansen

(1995). Los trabajos sobre el efecto de la concentración de carotenos en la calidad del huevo en salmónidos han sido contradictorios. Algunos los autores han señalado una relación positiva entre la pigmentación del huevo y la fecundación así como con la tasa de supervivencia en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Harris, 1984; Craik, 1985). Otros autores, sin embargo, no han encontrado evidencias de esta relación (Torrissen, 1984; Craik y Harvey, 1986; Torrissen y Christiansen, 1995). Las diferencias en la metodología empleada por los diferentes autores incluyen la edad de los reproductores, diferencias en las cantidades de carotenoides de los huevos, diferencias en el carotenoide utilizado (astaxantina, cantaxantina, etc.) en la dieta o determinado en el huevo, tamaño de la muestra e incluso diferencias en el indicador usado para determinar la calidad huevo. Muy pocos estudios se han realizado controlando el nivel de carotenos utilizado en las dietas de los reproductores (Harris, 1984; Choubert y Blanc, 1993; Watanabe y Kiron, 1995). La adición de astaxantina purificada en las dietas de reproductores de pargo japonés (*Pagrus major*) mejoró claramente los porcentajes de huevos flotantes y de eclosión, así como el porcentaje de larvas normales (Watanabe y Kiron, 1995). Por el contrario, la inclusión de β -caroteno no tenía efecto en estos parámetros. Miki *et al.* (1984) han demostrado la incorporación de cantaxantina o astaxantina en los huevos del pargo japonés y la no conversión de estos carotenoides en β -caroteno. Es posible que la más baja absorción intestinal de β -caroteno comparada con la de la cantaxantina o de la astaxantina pueda haber afectado estos resultados. Una absorción y deposición preferente de hidroxí y keto carotenoides ha sido señalada en peces por Torrissen y Christiansen (1995). Los carotenoides constituyen uno de los pigmentos más importantes en peces, con una amplia variedad de funciones incluyendo protección frente a condiciones de iluminación adversas, fuente de provitamina A, quimiotaxis de espermatozoides y funciones antioxidantes mucho más altas que las vitaminas A y E.

También se ha demostrado que la supervivencia del embrión puede ser afectada por el contenido en vitamina C de las dietas de los reproductores. Esta vitamina es necesaria para la síntesis de colágeno

durante el desarrollo del embrión. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) los requisitos de los reproductores en vitamina C son ocho veces superiores que el de los juveniles (Blom y Dabrowski, 1995). Otros autores encuentran menores requisitos para reproductores de bacalao, *Gadus morhua* (Mangor-Jensen *et al.*, 1993).

A pesar de que los requerimientos de vitamina A son poco conocidos, durante la maduración gonadal y la puesta, esta vitamina es considerada importante para el embrión y el desarrollo larvario debido a su importante papel en el desarrollo del esqueleto, formación de la retina y diferenciación de las células inmunes. En el hígado de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) se ha observado un aumento de la concentración de retinol durante la maduración de las gónadas que se incrementa a lo largo del día, mientras que el volumen del retinol en las gónadas se reduce durante la maduración (Hemre *et al.*, 1994).

Otras investigaciones con el pargo japonés (*Pagrus major*) han mostrado que los fosfolípidos dietéticos también mejoran la calidad del huevo (Watanabe *et al.*, 1991 a, b). Aunque los efectos beneficiosos de los fosfolípidos se han atribuido a su actividad inhibidora y capacidad para estabilizar los radicales libres (Watanabe y Kiron, 1995), en algunas especies de peces son importantes durante el desarrollo larvario y son preferentemente catabolizados después de la eclosión y antes del primer alimento exógeno (Rainuzzo *et al.*, 1997).

Otro nutriente que afecta la calidad de las puestas de peces son las proteínas dietéticas. Por ejemplo, una dieta con baja proteína-alta energía causó una reducción en la calidad de la puesta del pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1984 e). En otro espárido, la dorada (*Sparus aurata*), una dieta para reproductores bien equilibrada en los aminoácidos esenciales, mejora la síntesis de vitelogenina (Tandler *et al.*, 1995). Es más, la reducción de los niveles de proteína dietética del 51% al

34% junto con un aumento de los niveles de hidratos de carbono del 10% al 32% produce un aumento en las deformidades larvarias en la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Cerdá *et al.*, 1994b). Estas dietas causan alteraciones en la secreción de GnRH en reproductores de lubina durante la puesta (Kah *et al.*, 1994) y de los niveles hormonales de gonadotropina GtH II en el plasma, que juega un papel importante en la maduración del oocito y la ovulación (Navas *et al.*, 1996).

Finalmente, otro componente dietético que ha demostrado ser importante para el normal desarrollo del embrión y de las larvas, al menos en salmónidos, es la tiamina (vitamina B₁). Por ejemplo, inyecciones de tiamina en hembras grávidas de salmón Atlántico (*Salmo salar*) reducen la mortalidad de su descendencia (Ketola *et al.*, 1998). También la concentración de tiamina en el huevo o en el saco vitelino de la larva se relaciona con la reducción del síndrome de mortalidad temprano en la trucha lacustre, *Salvelinus namaycush* (Brown *et al.*, 1998), trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* y salmón coho, *Oncorhynchus kisutch* (Hornung *et al.*, 1998) y salmón Atlántico, *Salmo salar* (Wooster y Bowser, 2000).

1.3.2.4.-EFECTO SOBRE LA CALIDAD LARVARIA

Pocos estudios han podido demostrar la mejora de calidad de la semilla a través de la dieta de los reproductores. El incremento en los niveles de los lípidos del 12% al 18% en dietas para reproductores del pez conejo (*Signatus guttatus*) producen más larvas recién eclosionadas y un aumento en la supervivencia a los 14 días después de la eclosión (Duray *et al.*, 1994). Los incrementos en los n-3 HUFA (particularmente del ácido docosahexaenoico) en las dietas de reproductores de perca de río (*Perca fluviatilis*) mejoran significativamente el peso de las larvas y su resistencia al shock osmótico (Aby-Ayad *et al.*, 1997). De una manera similar, incrementos en los niveles de n-3 HUFA en las dietas

de reproductores de dorada (*Sparus aurata*) mejoran significativamente el porcentaje de larvas vivas después de la reabsorción del saco vitelino. Es más, el crecimiento, supervivencia e inflación de la vejiga natatoria en larvas de dorada mejora cuando se usa aceite de pescado, en lugar de aceite de soja, en las dietas para los reproductores (Tandler *et al.*, 1995). En esta misma especie, larvas de 28 días de vida tras la eclosión, mostraron un mayor peso seco y crecimiento que aquellas que procedían de reproductores alimentados con dietas con un alto contenido en n-3 HUFA (Bueno, 2001).

1.4.-PERIODO DE TIEMPO NECESARIO PARA QUE LA DIETA INFLUYA SOBRE LA CALIDAD DE LA PUESTA

En algunas especies de peces como la dorada (*Sparus aurata*) o el pargo japonés (*Pagrus major*) la composición del huevo es rápidamente afectada por la dieta en pocas semanas de alimentación de los reproductores (Watanabe *et al.*, 1985b; Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Tandler *et al.*, 1995). En estas especies, con puestas continuas con periodos cortos de vitelogénesis, es posible mejorar la calidad de la puesta por la modificación de la calidad nutritiva de las dietas de los reproductores incluso durante la estación de puesta (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997, 1998; Tandler *et al.*, 1995). Igualmente, es posible mejorar la calidad del huevo y el porcentaje de eclosión en puestas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentando los reproductores con las cantidades apropiadas de HUFA, durante el período de la vitelogénesis que es ligeramente más largo que en los espáridos (Navas *et al.*, 1997). En peces con más de seis meses de vitelogénesis (Frémont *et al.*, 1984), como en salmónidos, los reproductores deben ser alimentados con una dieta de buena calidad, varios meses antes de la época de puesta, para mejorar la calidad de la misma (Watanabe *et al.*, 1984 d; Corraze *et al.*, 1993). Aunque los perfiles de ácidos grasos del músculo del pez y de los huevos en vías de desarrollo del salmón coho, *Oncorhynchus kisutch* (Hardy

et al., 1990) reflejen los perfiles de los ácidos grasos dietéticos después de sólo 2 meses de alimentación, Harel *et al.* (1992) han demostrado que los lípidos tisulares de reproductores de dorada alcanzan un equilibrio con los lípidos dietéticos tras sólo 15 días de alimentación. El rodaballo podría ser una excepción a esta observación y es importante la alimentación de los reproductores con dietas de alta calidad nutritiva durante la vitelogénesis y el período de puesta. La composición de los ovarios del rodaballo se ve más afectada por la dieta durante las fases tempranas de desarrollo gonadal (Lie *et al.*, 1993).

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.-TANQUES EXPERIMENTALES

Los tanques donde se llevaron a cabo todas las experiencias estaban fabricados en poliéster reforzado con fibra de vidrio y fueron de tres tipos:

Tanques de 6000 litros

Estos tanques eran de sección rectangular de 3,25 x 2,25 x 1 m y fondo en plano inclinado tienen una capacidad individual de unos 6000 l y descansan sobre una base de madera. Disponían de una abertura lateral superior, en uno de los lados menores, de 25 x 5 cm provista de una rampa que desemboca en un colector de huevos constituido por un bastidor de madera de 0,5 m de lado del que pendía una malla de 500 μm de luz. Cada colector descansaba sobre un tanque de fibrocemento de sección rectangular y 200 l de capacidad, con salida por rebosadero en la parte superior, que aseguraba que los huevos no quedaran en seco, aun en el caso de fallo del suministro de agua.

En el lado opuesto a la abertura se encontraba una entrada múltiple de agua de mar, en sistema de circuito abierto, con un flujo de unos 960 l/h, lo que aseguraba una renovación diaria de aproximadamente 4 veces el volumen del tanque y que además establecía una corriente superficial que coadyuvaba al depósito de los huevos en el colector.

Tanques de 1000 litros

De forma cilíndrica de 1,5 m de diámetro y 0,75 m de altura, estos tanques poseían una entrada de agua en la superficie y desagüe por rebosadero, en el que una tubería guiaba el agua saliente hasta un depósito plástico de 100 l situado al lado, donde estaba colocado un colector de huevos. Los colectores consistían en un marco de tubo hueco de policloruro de vinilo (PVC) de 50 cm de lado, al que se sujetaba una malla de 500 μm de luz con un volumen de unos 100 l de forma que el marco se encajaba en el depósito haciendo que el extremo superior de la malla quedase fuera del agua para que no se salieran los huevos. La tasa de renovación en estos tanques era similar a la de los tanques de 6000 l.

Tanques de digestibilidad

En el Experimento II, para comparar la digestibilidad de las harinas utilizadas en la composición de las dietas experimentales, se utilizaron tanques diseñados a partir del Sistema Guelph (CYAQ-2) propuesto por Cho *et al.* (1975, 1982), en los que se aplicaron una serie de modificaciones con el fin de facilitar el manejo de las heces y minimizar la pérdida de nutrientes de las mismas. En este caso, los tanques tenían forma cilíndrica con fondo en tronco de cono invertido, con 125 l de capacidad cada uno y desagües centrales hacia una columna de decantación.

Agua de mar

La toma de agua de mar se realizaba a través de un pozo de captación excavado en el espigón del Muelle de Taliarte. El agua era elevada mediante un grupo de bombas que suministraba un caudal de 180 m^3/h y era conducida hasta un depósito regulador principal situado en el exterior en una zona

anexa a las instalaciones propias de la planta. Todo el sistema de conducción de agua de mar estaba montado en PVC. Desde este depósito el agua de mar era distribuida directamente, por gravedad, a los tanques experimentales de reproductores. La salinidad y el pH del agua de los tanques de reproductores se mantuvieron siempre constantes ($S\text{ ‰} = 36,70 \pm 0,001$ y $\text{pH} = 8,14 \pm 0,03$).

Aireación

El suministro de aire a toda la instalación para conseguir una oxigenación adecuada del agua se realizaba mediante tres turbinas ventiladores (Siemens-Elmo, Alemania) de funcionamiento continuo que suministran aire a baja presión. El sistema de aireación tenía además la función de crear una corriente de abajo hacia arriba y desde el centro a la periferia de los tanques, para evitar así la sedimentación de los huevos y ayudar a la recolección de los mismos por los sistemas ya descritos.

2.2.-CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los Experimentos fueron realizados utilizando individuos reproductores de dos, tres, cuatro y cinco años de edad, nacidos y criados en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) y mantenidos fuera de la época de puesta en la instalación de jaulas flotantes del Instituto situada en la bocana del muelle de Taliarte.

Previo al inicio de cada experimento y tras pesar y medir los animales, una vez anestesiados con una solución que contenía 300 g de clorobutanol (1,1,1-tricloro 2-metil 2-propanol) en 1 l de alcohol etílico en la proporción de 70 ml por 100 l de agua de mar, estos eran distribuidos en los tanques para reproductores evitando desviaciones estadísticamente significativas entre el peso medio de los peces de

los tanques. En el Experimento I, en el que se utilizaron los tanques rectangulares de 6000 l, se intentó mantener una proporción entre sexos de 2 ♂ a 1 ♀ (Fernández-Palacios *et al.*, 1990). Dicha proporción se mantuvo exacta en los tanques de 1000 l para los Experimentos II, III y IV. En los tanques de 6000 l se mantuvieron lotes múltiples es decir constituidos por varias hembras y aproximadamente el doble de machos. En los tanques de 1000 l se mantuvieron lotes simples de una hembra y dos machos. El sexo de los reproductores se determinó sometiendo a los ejemplares a masaje abdominal hasta la emisión de productos sexuales.

La biomasa en los dos tipos de tanque se mantuvo entre 4-8 kg /m³. Las condiciones de fotoperiodo y temperatura fueron siempre las naturales.

Los reproductores se alimentaron con un 1 % de su biomasa, repartido en dos tomas diarias. Los restos de comida y residuos fecales eran limpiados diariamente del fondo de los tanques por aspiración.

2.3.-CONTROL DE LAS PUESTAS

Durante la época de puesta los colectores de huevos, de cada tanque, se controlaron diariamente a partir de las 07:00 a.m. y cada media hora con el objetivo de determinar la hora aproximada de puesta, que siempre tuvo lugar en las primeras horas de la mañana.

Las puestas fueron espontáneas, la primera recogida de las mismas se realizaba cuando habían transcurrido aproximadamente dos horas desde el momento en que se observaban por primera vez huevos en el correspondiente colector. En ese momento los huevos se encontraban en el estadio de desarrollo de 4 y 8 células. Durante este proceso de recogida, para evitar la pérdida de huevos y no

alterar así el parámetro del número total de huevos de la puesta, se cerraba el circuito de los tanques mientras se manipulaba el colector de huevos; una vez transferidos los huevos a un vaso de precipitado de plástico de 5 l de capacidad se volvía a colocar el colector de huevos en su correspondiente recipiente y se reabría el circuito.

Las puestas así recogidas se dejaban reposar aproximadamente 20 minutos en los vasos de 5 l y una vez decantadas se procedía a separar la fracción flotante (FF) de la no flotante (FNF), esta obtenida mediante aspiración del fondo era transferida a un vaso de precipitado de plástico de 2 l. Por último se completaban los volúmenes con agua de mar de tal manera que los huevos de la primera recogida quedaban en 5 l los de la FF y en 2 l los de la FNF. Como parámetros para determinar la calidad de las puestas experimentales se utilizaron los siguientes:

ÍNDICES DE LAS PUESTAS

- % de huevos vivos
- % de huevos muertos
- % de huevos no fecundados
- % de huevos anormales (morfología)
- % de huevos anormales (con más de una gota de grasa)
- % de eclosión
- % larvas anormales (morfología)
- % de supervivencia larvaria

PRODUCCIONES RELATIVAS

Número de huevos puestos por kg de hembra y por puesta

Número de huevos vivos por puesta y por kg de hembra

Número de larvas nacidas (eclosionadas) por puesta y por kg de hembra

Número de larvas con el saco vitelino reabsorbido por puesta y por kg de hembra

MEDIDAS DE HUEVOS Y LARVAS

Diámetro de los huevos

Diámetro de la gota de grasa

Longitud de larvas con un día de vida

Longitud de larvas con el saco vitelino reabsorbido (larvas de tres días de vida)

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LOS HUEVOS

Proteínas

Lípidos

Ácidos grasos

Vitamina E

Los cálculos de los Índices de las puestas y las Medidas de huevos y larvas se realizaron utilizando los huevos de la primera recogida y que en el caso de los tanques de 6000 l representaba el $77,60 \pm 13,26$ % del total y en los tanque de 1000 l el $47,82 \pm 12,22$ %; en las Figs. 1 y 2 se muestra la relación existente entre el número de huevos recogidos y el tiempo transcurrido desde el momento de la puesta así como las ecuaciones que definen esta relación en los tanques de 6000 l y de 1000 l respectivamente. El resto de la puesta, utilizado para determinar el número total de huevos por puesta

y por tanto para el cálculo de las Producciones Relativas, se recolectaba en una segunda recogida, trascurridas aproximadamente 22 horas de la puesta cuando ya había salido el 100% de los huevos en ambos tipos de tanque (Figs. 1 y 2). Las puestas en las que sólo se determinó el número total de huevos se recogieron a las 22 horas del inicio de la puesta y se contaron cinco muestras de 5 ml en un volumen único de 5 l.

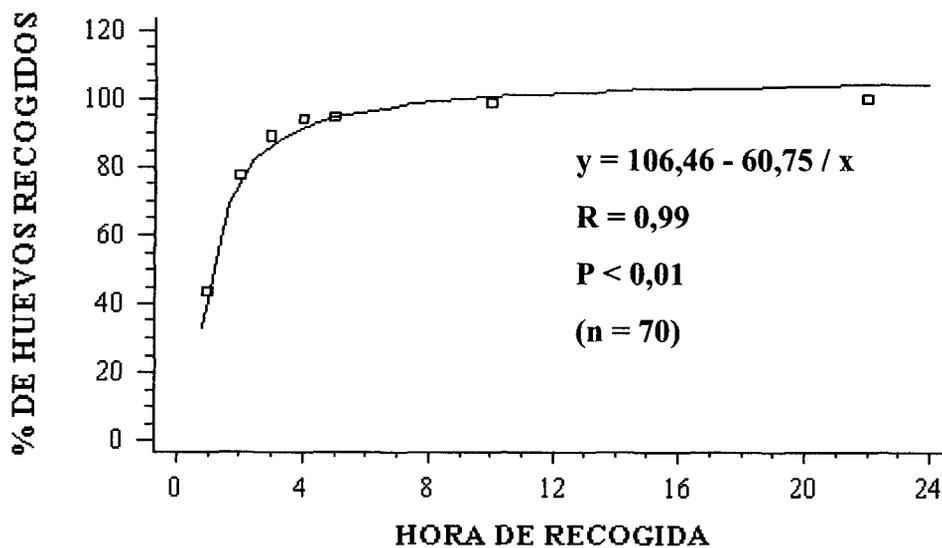


Fig. 1.- Relación entre la hora de recogida y el número de huevos recogidos en los tanques de 6000 l.

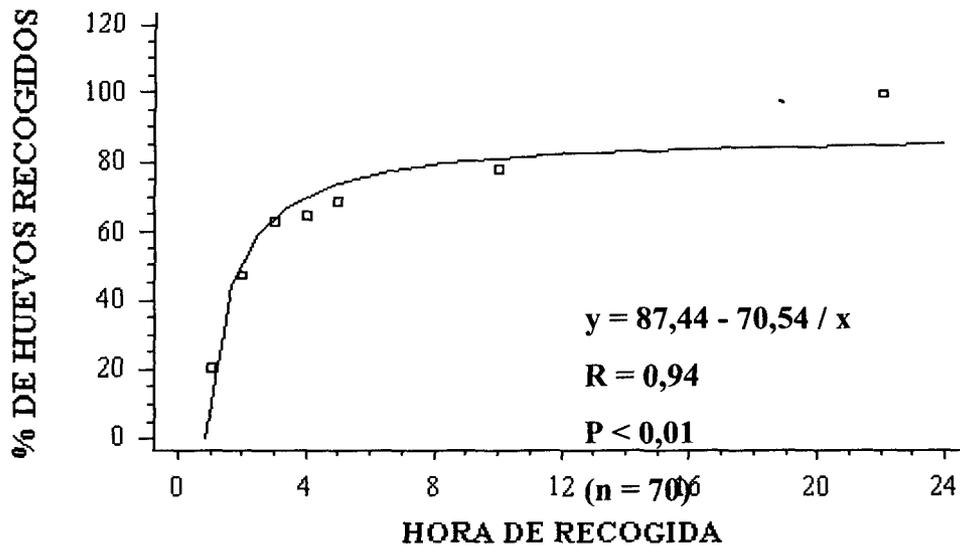


Fig. 2.- Relación entre la hora de recogida y el número de huevos recogidos en los tanques de 1000 l.

A los recipientes de plástico que contenían los huevos se les suministraba aireación continua, para asegurar una buena homogeneización, y se tomaban, tras remover vigorosamente, cinco muestras de 5 ml que eran contadas en placa mediante lupa binocular para determinar el número de huevos de cada categoría en cada una de las puestas controladas. En el caso de la segunda recogida solo se contaba el número de huevos, para conocer la producción total, sin distinción de categorías.

Los huevos y larvas se clasificaron, siguiendo los criterios definidos por Divanach (1985) y por

Kjørsvik *et al.* (1990) en las siguientes categorías:

Huevos vivos: huevos morfológicamente normales, transparentes, perfectamente esféricos, y con blastómeros claros y simétricos. Estas características continúan a lo largo de todo el desarrollo hasta la eclosión (Fig. 3).

Huevos muertos: huevos con iridiscaciones en el vitelo, con vitelo opaco o con perforaciones en la membrana que permiten la penetración del medio exterior haciendo que el vitelo se condense y precipite (Fig.4A).

Huevos no fecundados: huevos con forma esférica, consistencia blanda, de aspecto general incoloro y traslúcido. La gota de grasa se aprecia de forma difuminada. Con arrugas en la superficie del corion que le dan un aspecto mate. Con un espacio perivitelino bien aparente a nivel de polo animal. Estas características continúan a lo largo de todo el desarrollo (Fig. 4B).

Huevos anormales: huevos con morfología irregular no esférica, condensaciones parciales del vitelo en forma de manchas opalescentes excéntricas. Con cuñas citoplasmáticas entre el polo animal y vegetal. Con aberraciones de segmentación o blastómeros irregulares. (Fig. 4C). Huevos con más de una gota de grasa.

Larvas anormales: Larvas con el eje longitudinal del cuerpo no recto. Larvas con la gota de grasa en posición anormal (Fig. 4C).

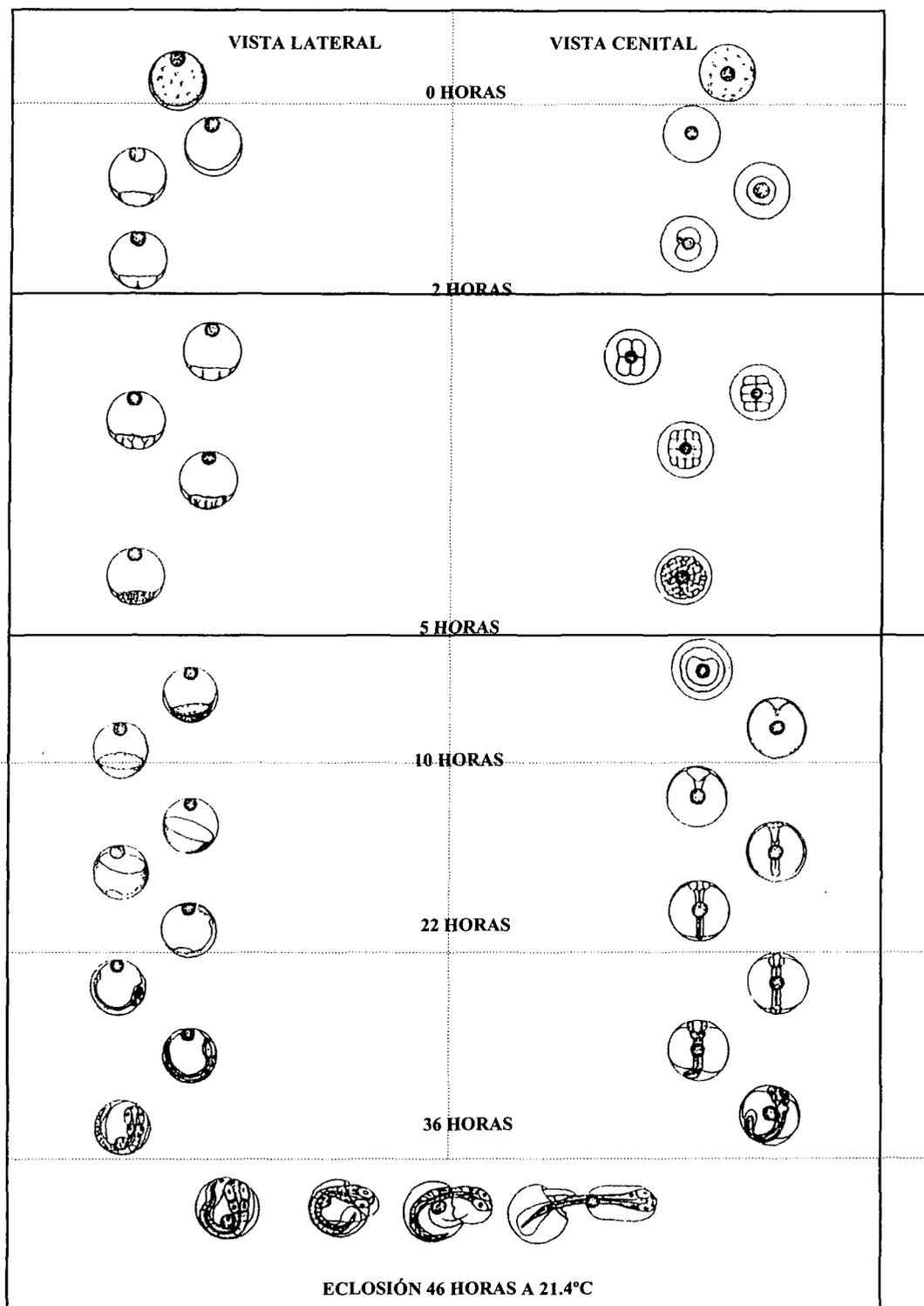


Fig. 3.- Huevos vivos a lo largo del desarrollo embrionario (modificada de Divanach, 1985).

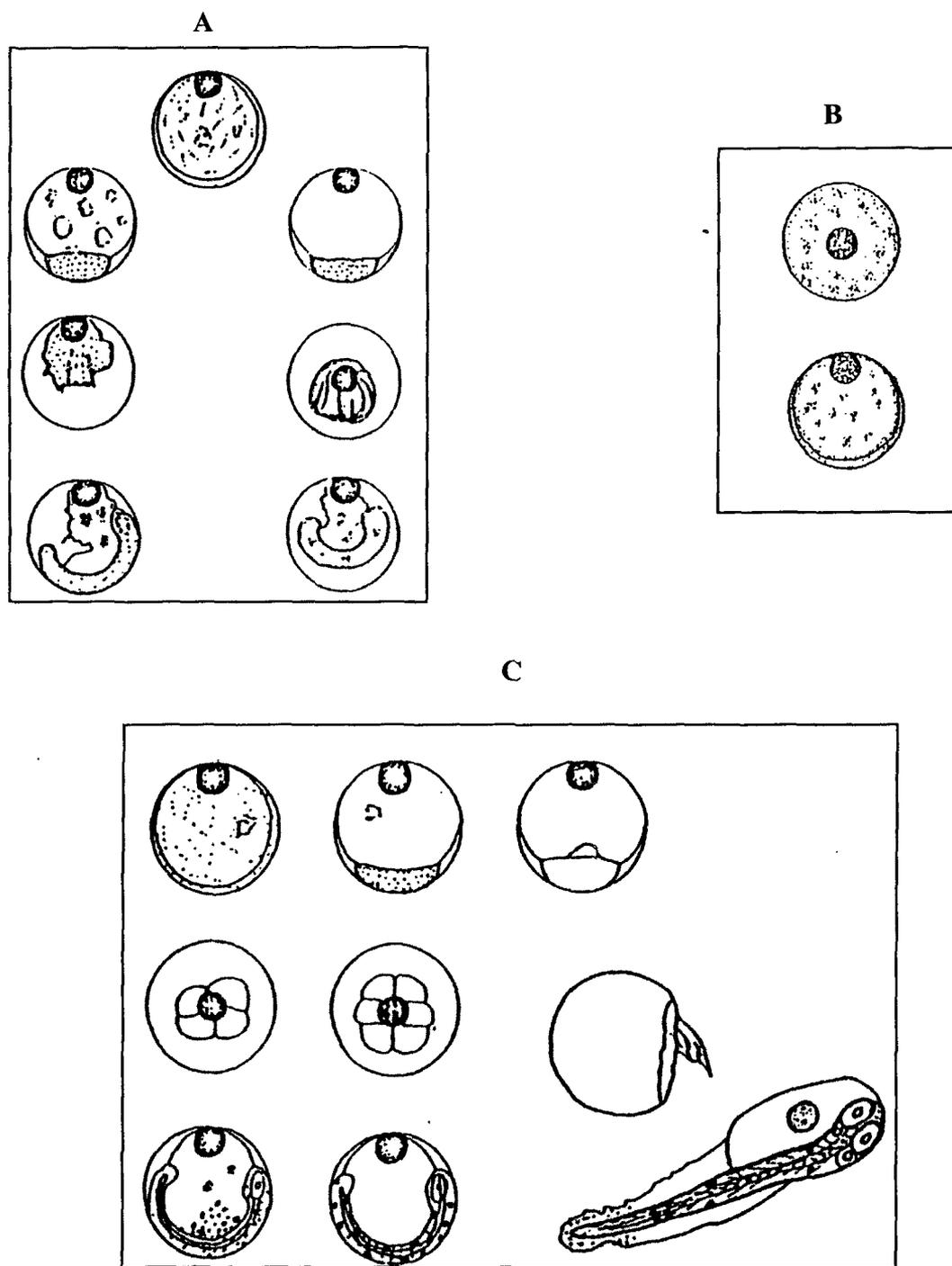


Fig. 4.- Huevos muertos (A), huevos no fecundados (B) y huevos y larvas anormales (C) (modificada de Divanach, 1985).

Índices de las puestas

Una vez determinado el número de huevos de cada categoría existente en cada una de las muestras de 5 ml controladas se procedió al cálculo de los Índices de las puestas mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Huevos vivos} = (H_{VFF} + H_{VFNF} / H_{TFF} + H_{TFNF}) \times 100$$

$$\% \text{ Huevos muertos} = (H_{MFF} + H_{MFNF} / H_{TFF} + H_{TFNF}) \times 100$$

$$\% \text{ Huevos no fecundados} = (H_{NFFF} + H_{NFNF} / H_{TFF} + H_{TFNF}) \times 100$$

$$\% \text{ Huevos anormales (morfología)} = (H_{AFF} + H_{AFNF} / H_{TFF} + H_{TFNF}) \times 100$$

$$\% \text{ Huevos anormales (con más de una gota de grasa)} = (H_{GGFF} + H_{GGNF} / H_{TFF} + H_{TFNF}) \times 100$$

H_{VFF} = Total de huevos vivos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{VFNF} = Total de huevos vivos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

H_{MFF} = Total de huevos muertos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{MFNF} = Total de huevos muertos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

H_{NFFF} = Total de huevos no fecundados en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{NFNF} = Total de huevos no fecundados en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

H_{AFF} = Total de huevos anormales en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{AFNF} = Total de huevos anormales en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

H_{GGFF} = Total de huevos con más de una gota en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{GGNF} = Total de huevos con mas de una gota en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

H_{TFF} = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{TFNF} = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

Para el cálculo de las tasas de eclosión y supervivencia larvaria se procedió a transferir un número conocido de huevos, de 25 a 250, a cubiletes de PVC para su incubación. Esta variación en el número de huevos sembrados se debía a que se aprovechaban los contajes realizados para determinar las categorías de huevos (una vez comprobado que el número de huevos incubados no influía en la

eclosión y supervivencia larvaria). Estos cubiletes medían 9 cm de diámetro y 20 cm de longitud y tenían un volumen útil de aproximadamente 1 l. El fondo estaba constituido por una malla de plancton de 500 μm de luz, si eran utilizados para el cálculo de la tasa de eclosión y de 165 μm de luz, si eran utilizados para el cálculo de la supervivencia larvaria. Esta diferente tela de plancton con menor luz de malla se utilizaba para evitar la pérdida de larvas. Una vez sembrados eran dispuestos en el interior de un tanque rectangular de plástico de 500 l de capacidad, dotado de circuito abierto con cuatro renovaciones diarias y con aireación permanente, de tal manera que la renovación del agua y la oxigenación de la misma en el interior de los cubiletes se realizaba a través de la tela de plancton sin aportación de agua ni de aire a cada cubilete individualmente. El agua era pasada por un cartucho de filtración, de 1 μm de poro, con el objetivo de eliminar partículas en suspensión que dificultasen el conteo de huevos y larvas para el cálculo de las tasas de eclosión y supervivencia larvaria. Para cada una de las puestas en que se determinaron las tasas de eclosión y supervivencia larvaria, se sembraron tres cubiletes para el cálculo de cada uno de los dos índices. Durante todo el periodo de incubación se mantuvo fotoperiodo natural. Para el cálculo de las tasas de eclosión y supervivencia larvaria se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Eclosión} = (H_{VFF} + H_{MFF} + H_{NFF} + H_{AFF}) - (H_{MFF} + H_{NFF} + H_{AFF} + H_{MINC}) / H_{VFF} \times 100$$

$$\% \text{ Larvas anormales} = (L_A / H_{VFF})$$

$$\% \text{ Supervivencia larvaria} = (L_C / H_{VFF}) \times 100$$

H_{VFF} = Total de huevos vivos en una muestra de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{MFF} = Total de huevos muertos en una muestra de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{NFF} = Total de huevos no fecundados en una muestra de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{AFF} = Total de huevos anormales en una muestra de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{MINC} = Total de huevos muertos durante la incubación

L_A = Número de larvas anormales

L_C = Número de larvas con el saco vitelino reabsorbido

El procedimiento seguido para la determinación de la tasa de eclosión fue el siguiente: aproximadamente a las 48 horas de haber sido sembrados, los cubiletes de PVC fueron sacados del tanque de incubación e introducidos en un vaso de precipitado de plástico de 2 l de capacidad asegurándose que el contenido de los cubiletes en ningún momento quedase en seco. Tras remover todo el conjunto, el agua contenida en el cubilete con las larvas recién eclosionadas y con los huevos no eclosionados (huevos muertos y no fecundados sembrados originalmente, y los que han muerto durante la incubación) era trasvasada a un cristalizador de vidrio. Sobre este se procedía a lavar cuidadosamente el cubilete de PVC, con un frasco lavador conteniendo agua salada, con el objeto de asegurar que no quedase ningún huevo adherido bien a la malla o bien a la pared del cubilete.

Una vez que estaba todo el contenido del cubilete en el cristalizador, éste se situaba sobre una lámina de plástico negro y con la ayuda de una luz lateral, y por contraste se procedía a contar el número de huevos no eclosionados decantados en el fondo del cristalizador, que con la ayuda de una pipeta eran sacados fuera del mismo, determinando así el número total de huevos no eclosionados. Para el cálculo del índice de eclosión se utilizaba la fórmula ya descrita

Para el cálculo de la tasa de supervivencia larvaria se procedía de igual manera, una vez transcurridas aproximadamente 96 horas desde el momento de la siembra, aunque en este caso lo que se contaban, sacándose fuera del cristalizador, eran larvas vivas y larvas vivas de morfología anormal que existían en ese momento en el cubilete de PVC y posteriormente se aplicaban las fórmulas para el cálculo de las tasas de larvas anormales y de supervivencia larvaria

Producciones Relativas

También se utilizaban como indicadores de la calidad de la puesta la producción total de huevos, de huevos vivos, de larvas nacidas y de larvas con el saco vitelino reabsorbido, calculados utilizando los índices medios de las puestas y referidos a kilogramo de hembra reproductora y a puesta, según las siguientes formulas:

$$\text{N}^\circ \text{ huevos} = (H_{\text{TFF}} / 25 \times 5000) + (H_{\text{TFNF}} / 25 \times 2000) + (H_{\text{T2REC}} / 25 \times 2000)$$

$$\text{N}^\circ \text{ huevos} = H_{\text{T}} / 25 \times 5000^1$$

$$\text{N}^\circ \text{ huevos vivos} = \text{N}^\circ \text{ huevos} \times \% \text{ huevos vivos} / 100$$

$$\text{N}^\circ \text{ larvas nacidas} = \text{N}^\circ \text{ huevos vivos} \times \% \text{ eclosión} / 100$$

$$\text{N}^\circ \text{ larvas con saco vitelino reabsorbido} = \text{N}^\circ \text{ larvas nacidas} \times \% \text{ supervivencia larvaria} / 100$$

H_{TFF} = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

H_{T} = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml

H_{TFNF} = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

H_{T2REC} = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la segunda recogida

¹ Fórmula utilizada en aquellas puestas en que solo se determinaba el número total de huevos.

Medida de huevos y larvas

En todos los Experimentos se midieron a lo largo del periodo de puesta diferentes lotes de huevos y larvas para controlar el diámetro de los huevos, diámetro de la gota de grasa y longitud de larvas de 1 y 3 días de vida. Las larvas se midieron tras ser anestesiadas con una solución al 1% en agua de mar preparada de una solución madre que contenía 300 g de clorobutanol (1,1,1-tricloro 2- metil 2-

propanol) en 1 l de alcohol etílico. Para ello larvas procedentes de los cubiletes de PVC se introducían en un vaso de plástico de 100 ml de capacidad con agua de mar y se añadía la mínima cantidad de la solución al 1%, necesaria para que las larvas se anestesiasen y evitar las deformaciones que se producen en las larvas al morir. Las medidas se realizaron utilizando un proyector de perfiles (Nikon V -128, Nikon Co., Tokio, Japón).

2.4.-TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos se han expresado siempre como media \pm desviación estándar de la media. Los datos de un mismo experimento se compararon estadísticamente utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) o, cuando había solo dos replicados, el test t de Student (Sokal y Rohlf, 1979). Una vez habían sido detectadas diferencias estadísticamente significativas con el ANOVA, las diferencias entre medias fueron puestas de manifiesto mediante el test de comparación múltiple de las medias de Tukey (como criterio general se tomó el 5 % de nivel de significación). Para otros niveles de significación se utilizó el test de comparación múltiple de las medias de Duncan.

Cuando las varianzas eran heterogéneas y/o los datos no se distribuían normalmente se intentaba hacerlas homocedásticas y/o que los datos se distribuyesen normalmente transformando las variables en sus logaritmos o bien con la función arco seno. Si la heterogeneidad o la no distribución normal de los datos persistía, se empleaba el test no paramétrico de Kruskal-Wallis o de Kolmogorov-Smirnov cuando solo había dos replicados (Sokal y Rohlf, 1979). Detectadas diferencias estadísticamente significativas con el test de Kruskal-Wallis, se utilizaba el procedimiento gráfico de caja y bigotes con muescas para determinar las diferencias entre los replicados. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS (versión 3.1 Plus for Windows; Graphic Software Systems, Inc. USA).

2.5.-MÉTODOS ANALÍTICOS DE COMPOSICIÓN

En todos los experimentos se guardaron muestras de huevos, recogidas a lo largo del periodo experimental, para su posterior análisis bioquímico. Estas muestras se lavaron cuidadosamente con agua destilada. Posteriormente fueron bien secadas con papel de filtro y guardadas a -80°C en atmósfera de nitrógeno. También se guardaron muestras tanto de las dietas experimentales como de la dieta comercial utilizadas.

En este apartado se describen los métodos de análisis utilizados con las diferentes muestras. Todos los análisis se hicieron por triplicado para asegurar el error analítico mínimo en los datos obtenidos. Las muestras de las dietas fueron homogeneizadas en un Cyclotec (1093 Sample Mill) de Tecator, Hoganas, Suecia, a través de una rejilla de 0,5 mm de luz de malla. Las muestras de huevos fueron homogeneizadas en un baño de ultrasonidos (P Selecta, Barcelona, España).

Humedad.

La humedad de las muestras se determinó por desecación en estufa a 105°C hasta peso constante según el método de la Asociación Oficial de Analistas Químicos (AOAC,1995).

Ceniza.

El contenido en ceniza fue determinado mediante la incineración de la muestra en horno de mufla a 450°C hasta peso constante según el método de la AOAC (1995).

Proteínas.

El contenido en proteínas (AOAC, 1995) se calculó a partir de la composición en nitrógeno total de las muestras determinada mediante la técnica Kjeldhal. El método consiste en la digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado a 420°C en presencia de un catalizador de mercurio, seguido de una destilación con Na(OH) al 40%, con ácido bórico como sustancia receptora, en una unidad destiladora Tecator (Hoganas, Suecia, Kjeltec System 1003 Por último se realiza una valoración con HCl 0,1N. La conversión a porcentaje de proteína bruta se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteínas} = (V - P) \times N \times P_m \times F / M$$

V = Volumen de HCl usado en la valoración en ml

P = Media de la valoración de los patrones en ml

N = Normalidad del HCl

P_m = Peso molecular del nitrógeno que es 14,007

F = Factor de conversión empírico que tiene un valor de 6,25

M = Peso de la muestra en mg

Lípidos

El contenido en lípidos totales de las muestras fue determinado mediante el método Soxhlet de extracción en caliente de grasas usando éter de petróleo (40-60°) con una unidad Tecator (Hoganas, Suecia, Kjeltec System 1043). En aquellas muestras en las que se necesitó extraer los lípidos en frío, para la determinación de su composición en ácidos grasos, o bien en las que se disponía de una pequeña cantidad de muestra como en el caso de los huevos, el método utilizado fue el de extracción de los lípidos con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) (Folch *et al.*, 1957), filtrándose a continuación la solución a través de lana de vidrio y añadiendo sal (ClK) para aumentar la polaridad de la fase acuosa.

Por decantación se separan las fases acuosa y orgánica, el contenido en lípidos totales de la muestra se determina después de la evaporación completa del cloroformo con una corriente de nitrógeno. Los lípidos se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en viales etiquetados, disueltos en cloroformo y en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación.

Para la determinación de ácidos grasos, los lípidos obtenidos por el método de Folch se transesterificaron con ácido sulfúrico al 1% en metanol (Christie, 1982), y se añadió tolueno para favorecer la disolución de los lípidos neutros, diluyendo los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) en hexano a una concentración de 20 mg por ml de hexano. Los ésteres metílicos fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases (Fig. 5A), bajo las condiciones operativas descritas en la Tabla I.

Tabla I.- Condiciones operativas para la determinación de los ácidos grasos

Aparato	Shimadzu GC-14-A (Shimadzu instrument division, Kyoto, Japan)
Integrador	Shimadzu C-R5A
Columna	Capilar de sílice fundida, de 30 x 0,32 mm. D.I. (Supelco, Inc., Bellefonte, EE.UU.)
Gas portador	Helio
Presión de los gases	He 1, H ₂ 0,5, N ₂ 0,5 y aire 0,5 kg/cm ²
Detector	FID a 250 °C
Temperatura en inyector	250 °C
Horno	Temperatura inicial 180 °C durante 10 minutos, tasa de incremento de temperatura de 2,5 °C / minuto y temperatura final de 215 °C durante 12 minutos

Oxido crómico

El porcentaje de óxido crómico contenido en las muestras fue determinado mediante la digestión de las mismas con ácido nítrico y ácido perclórico concentrados, evaluando en espectrofotómetro a 350 nm la coloración amarilla obtenida (Furukawa y Tsukahara, 1966).

Vitaminas

La vitamina E (α -tocoferol) fue determinada en dietas y huevos mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, Fig. 5B), según el método modificado por Lambertsen (1983) y Lie *et al.* (1994).

Las muestras fueron homogeneizadas, saponificadas y extraídas con n-hexano. Muestras homogeneizadas (0,1-0,5 g) fueron saponificadas en 4 ml de etanol, 0,5 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) saturado y 0,5 ml 20 % KOH en un bloque de calentamiento (P. SELECTA, Barcelona, España) a 100°C durante 20 minutos. Antes de la saponificación fueron añadidos ácido ascórbico y pirogalol para prevenir la oxidación de las muestras. La saponificación fue realizada en tubos ámbar (Pyrex, Inglaterra) de 10 ml con tapón de rosca. Después de 20 minutos la saponificación era completada y se enfriaban los tubos en agua fría y el material no saponificado era extraído en n-hexano. El volumen final extraído era evaporado, hasta secarlo, con un chorro de nitrógeno. El residuo seco fue disuelto en n-hexano hasta una concentración estable (normalmente 0,5-5 ml) para su análisis en HPLC. El Equipo de cromatografía líquida empleado (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) se describe en la Tabla II.

A



B

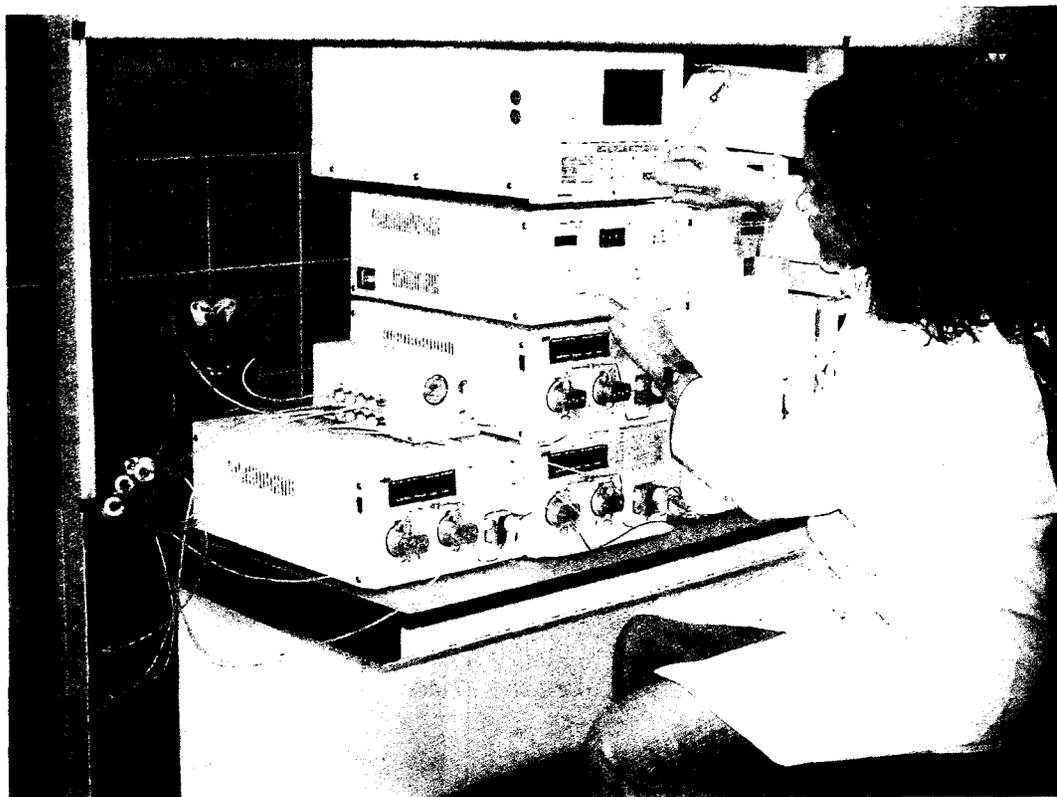


Fig.5.- Cromatógrafos utilizados para la determinación de ácidos grasos (A) y vitamina E (B).

Tabla II.- Equipamiento utilizado para los análisis de vitamina E

Bomba de alta presión	Shimadzu LC-9A
Unidad desgasificadora de helio	Shimadzu DGU-2A
Detector de fluorescencia	Shimadzu UV-VIS SPD-6AV
Horno	Shimadzu CTO-6A
Unidad de control	Shimadzu SCL-6B
Autoinyector	Shimadzu SIL-6B
Integrador	Chromatopac C- R6A Shimadzu
Programa procesador de datos	Class-Unipac Shimadzu

Las condiciones cromatográficas para determinar la vitamina E se señalan en la Tabla III.

Tabla III.- Condiciones operativas para la determinación de la vitamina E

Columna analítica	150 x 4,6 mm Spherisorb W, 3 μ m (Tracer Analítica, España)
Solvente	N-hexano: isopropanol (98:2, v/v)
Flujo	1 ml/minuto
Detección	Fluorescencia
Longitud de onda	Excitación 289 nm. Emisión 331 nm
T. de la columna	Temperatura ambiente
Volumen de inyección	20-80 μ l

La concentración de vitamina E en las muestras fue determinada mediante estándar externo. El estándar dl- α -tocoferol de fue preparado por saponificación y extracción de 50 mg de dl- α -tocoferol acetato (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). Todos los estándares fueron preparados el día del análisis y las concentraciones (μ g/ml) fueron verificadas por espectrometría UV.

Los estándares de dl- α -tocoferol fueron disueltos en etanol y leídos en tres longitudes de onda:

280, 292 y 301 nm. La concentración ($\mu\text{g/ml}$) fue calculada según la siguiente fórmula (Lambertsen y Braekkan, 1959) basada en los coeficientes de extinción:

$$\alpha\text{-tocoferol } (\mu\text{g/ml}) = (2,778 \times E_{292} - (1,152 \times E_{280} + 1,626 \times E_{301}) \times 135$$

donde E_{292} , E_{280} y E_{301} representan la absorvancia del estándar a 292, 280 y 301 nm.

2.6.-PREPARACIÓN DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

Formulación

Los ingredientes utilizados en la elaboración de las distintas dietas experimentales se obtuvieron a nivel local, excepto la harina y el aceite de pescado, que fueron suministrados por la empresa Agramar S.A., Lanzarote, España y la harina de calamar que lo fue por Rieber and Son Ltd., Bergen, Noruega.

Las dietas experimentales se formularon en base a los análisis de los ingredientes a utilizar. El único ingrediente que necesitó de un tratamiento previo fue la grasa de vaca empleada para completar el nivel de lípidos en las dietas experimentales. Esta se calentó por encima de los 80 °C para purificarla, esperandose hasta que bajase de los 40 °C poder mezclarla con el resto de los ingredientes de la dieta. En algunas dietas se utilizó harina de pescado o de calamar desengrasadas previamente con cloroformo-metanol (2:1 v/v). Todas las dietas experimentales fueron formuladas para tener el mismo contenido en proteínas y lípidos.

Las mezclas de vitaminas y de minerales (Tablas IV, V y VI) fueron las mismas en todas las

dietas experimentales. En los Experimentos III y IV las dietas fueron suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E. Los minerales (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA.) se mezclaron usando como base alfa-celulosa, y la mezcla se conservó a -20°C hasta el momento de ser utilizada. Las vitaminas (Sigma Chemical Co., St.Louis, U.S.A.) se mezclaron de forma diferente. Las vitaminas hidrosolubles, excepto el cloruro de colina y el ácido ascórbico, se mezclaron con alfa-celulosa y al igual que los minerales, se conservaron a -20°C hasta su uso. Las vitaminas liposolubles, junto con la etoquinina, se mezclaron en el momento de elaborar cada dieta, usando aceite de pescado como solvente. El cloruro de colina se diluyó en agua y se añadió a la mezcla total de los ingredientes. El ácido ascórbico se añadió al final de la mezcla total de ingredientes para minimizar las pérdidas de esta vitamina por oxidación.

Tabla IV.- Mezcla de minerales utilizada en las dietas experimentales

COMPUESTO	g/kg DE MEZCLA
$(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \text{Ca}$	160
CaCO_3	4
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	160
K_2HPO_4	28
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{Al}(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	12
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8
KI	2
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8

Tabla V.- Mezcla de vitaminas hidrosolubles utilizada en las dietas experimentales

COMPUESTO	g/kg DE MEZCLA
Tiamina (B ₁)	4
Riboflavina (B ₂)	5
Piridoxina (B ₆)	4
Pantotenato cálcico	12
Ácido nicotínico	2
Biotina (H)	1
Cianocobalamina (B ₁₂)	5
Ácido fólico	1
Mio-inositol	2
Ácido ascórbico	2
Colina	2

Tabla VI.- Mezcla de vitaminas liposolubles y antioxidante utilizados en las dietas experimentales

COMPUESTO	g/kg DE MEZCLA
α -tocoferol (E)	25
Menadiona (K ₃)	2
Colecalciferol (D ₃)	5
Retinol acetato (A)	25
Etoxiquina	1

Elaboración

Para la elaboración de las dietas se mezclaron en primer lugar los ingredientes secos: harinas, fuentes de carbohidratos, mezclas de minerales y de vitaminas hidrosolubles y aglutinantes, utilizando una mezcladora ECYCH MA-60 (Azpeitia, Gipuzcua, España, Fig. 6) durante 30 minutos. A

continuación se añadieron los aceites con la mezcla de vitaminas liposolubles y la etoxiquina, y posteriormente se añadió la cantidad de agua necesaria para permitir el granulado, incluyendo el cloruro de colina. Para las dietas utilizadas en los Experimentos I y II se utilizó una granuladora MOBBA de 2 HP (Mod. 8.3, Badalona, España), usando una matriz de 7 mm. de diámetro de gránulos. En los dos experimentos restantes se utilizó una granuladora CPM (California Pellet Mill, USA) (Fig. 7) con una matriz del mismo tamaño de gránulo. Los gránulos obtenidos con el primer sistema se secaron durante 12 horas a una temperatura inferior a 40 °C en un armario secador (Reisma, Las Palmas, España, Fig. 8), mientras que los gránulos obtenidos con el segundo procedimiento (Fig 9) no necesitaron secado posterior. Los piensos se guardaron a -20 °C, desde donde una vez por semana se iba sacando (y conservando a 4 °C) la cantidad necesaria con la que ir alimentando a los peces.

2.7.- NOMBRES VULGARES DE LAS ESPECIES UTILIZADOS

Los nombres vulgares de las especies, utilizados en este trabajo fueron tomados del “Diccionario multilingüe de especies marinas para el mundo hispano” de Vera, (1992). En caso de no figurar, la especie, en dicho diccionario se utilizó la denominación FAO en español de la base de datos “Fishbase” y en el caso de no existir el nombre en español, se utilizó la denominación FAO en inglés de esa base de datos.

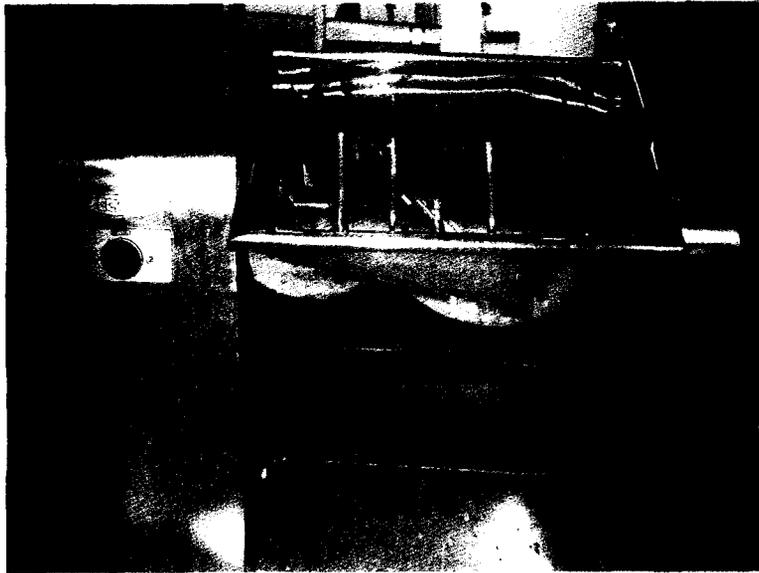


Fig. 6.- Mezcladora utilizada para la preparación de las dietas experimentales.



Fig. 7.- Granuladora utilizada en la preparación de los gránulos de las dietas de los Experimentos III y IV.



Fig. 8.- Armario secador para los piensos experimentales



Fig. 9.- Granúlos experimentales obtenidos con la granuladora CPM

3.- RESULTADOS

3.1.-EXPERIMENTO I

3.1.1.- REPRODUCTORES

Ciento veinte reproductores de dorada (*Sparus aurata*), procedentes de la granja de jaulas flotantes del Instituto Canario de Ciencias Marinas, fueron seleccionados al azar y distribuidos en ocho tanques de fibra de 6000 l. La proporción de machos: hembras en cada tanque fue de 2:1 (10 ♂: 5 ♀). Las características biométricas de los reproductores utilizados se indican en la Tabla VII. Los tanques estaban dotados de un circuito de agua con un flujo de 960 l/hora de agua de mar, lo que aseguraba una renovación diaria de unas cuatro veces el volumen total, y de aireación fuerte. La temperatura durante el experimento osciló entre 18,9 ° y 21,8° C. Desde el momento en que los reproductores fueron estabulados en los tanques se alimentaron con una dieta comercial y tras asegurarse que no había diferencias significativas en ninguno de los Partámetros de Calidad de las puestas, se procedió a alimentar a los reproductores dos veces al día con una de las cuatro dietas experimentales. La ración diaria era del 1% de la biomasa de cada tanque. Cada una de las cuatro dietas fue suministrada a dos tanques elegidos aleatoriamente.

Tabla VII.- Características biométricas de los reproductores alimentados con cuatro dietas diferentes en el Experimento I (media \pm desviación típica)

DIETA	PESO		TALLA	
	♂	♀	♂	♀
1	758,70 \pm 261,45	1394,50 \pm 338,65	33,48 \pm 3,78	43,33 \pm 3,85
2	761,55 \pm 305,78	1292,90 \pm 168,78	33,16 \pm 2,90	41,87 \pm 2,55
3	745,77 \pm 310,34	1231,48 \pm 187,27	33,61 \pm 3,15	40,72 \pm 3,10
4	697,31 \pm 205,61	1236,10 \pm 202,61	33,50 \pm 3,85	41,31 \pm 3,60

3.1.2.- COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS

La composición de las dietas experimentales y el análisis de las mismas se indican en la Tabla VIII. Se formularon cuatro dietas experimentales con diferentes niveles de n-3 HUFA (entre 1,3 y 3,15%, en peso seco) combinando diferentes porcentajes de grasa de vaca y de aceite de sardina. La proteína dietética y nivel de lípidos fueron aproximadamente de 50 % y 15%, respectivamente. La Tabla IX muestra la composición en ácidos grasos de las dietas.

Tabla VIII.- Ingredientes y composición analítica de las dietas experimentales del Experimento I

INGREDIENTES	DIETA			
	1	2	3	4
Harina de pescado	64,42	64,42	64,42	64,42
Aceite de sardina	----	2,31	4,57	8,35
Grasa de vaca	8,35	6,04	3,78	----
Almidón-dextrina	7,40	7,40	7,40	7,40
Salvado de trigo	12,83	12,83	12,83	12,83
α -Celulosa	2,50	2,50	2,50	2,50
Carboximetil celulosa	0,50	0,50	0,50	0,50
Mezcla de minerales	2,00	2,00	2,00	2,00
Mezcla de vitaminas	2,00	2,00	2,00	2,00
Vitamina E	0,0025	0,0025	0,0025	0,0025
COMPOSICIÓN ANALÍTICA				
Proteínas	49,60	50,04	51,23	50,81
Lípidos	14,36	14,22	15,18	14,99
Humedad	7,06	5,10	3,71	3,91
Cenizas	12,63	12,11	12,26	12,19
n-3 HUFA (% peso seco)	1,13	1,60	2,18	3,15

* Las mezclas de vitaminas y minerales fueron preparadas con α -Celulosa e incluidas en un 2% en las dietas experimentales.

Tabla IX.- Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de las dietas experimentales del Experimento I

ÁCIDOS GRASOS	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4
14: 0	3,80	4,99	5,87	7,37
14: 1	0,45	0,46	0,34	0,17
15: 0	0,37	0,43	0,46	0,49
16: 0	23,75	23,79	23,37	21,28
16: 1n-7	3,57	5,13	6,40	9,07
16: 1n-5	-	-	-	0,18
16: 2	0,43	0,70	0,92	0,14
17: 0	0,92	0,75	0,60	0,35
17: 1	0,72	0,93	1,11	1,53
16: 4-n-3	0,54	0,92	1,13	1,84
18: 0	18,65	15,07	11,31	3,93
18: 1n-9	26,32	20,56	16,73	9,90
18: 1n-7	3,00	3,01	2,85	3,03
18: 2n-9	-	0,38	0,34	0,41
18: 2n-6	3,01	3,13	3,13	3,20
18: 3n-9	0,29	0,36	0,45	0,57
18: 3n-6	0,19	-	0,26	0,31
18: 3n-3	0,41	0,50	0,57	0,72
18: 4n-3	0,74	-	1,68	2,66
18: 4n-1	-	-	0,16	0,27
20: 1n-9	0,84	1,12	1,47	2,04
20: 2n-9	-	0,20	0,28	0,48
20: 2n-6	-	-	-	-
20: 4n-6	0,32	0,45	0,57	0,82
20: 4n-3	0,24	0,37	0,50	0,81
20: 5n-3	3,92	6,16	8,23	12,75
22: 1n-11	0,42	0,79	1,09	1,77
22: 1n-9	-	0,18	0,23	0,39
22: 3n-6	0,18	0,31	0,44	0,68
22: 5n-6	-	-	-	-
22: 5n-3	0,25	0,66	0,92	1,34
22: 6n-3	3,45	4,08	4,72	6,11
Saturados	48,00	46,47	42,15	33,85
Monoinsaturados	35,52	32,18	30,22	28,08
n-3	9,55	12,69	17,75	26,23
n-6	3,70	4,10	4,64	5,36
n-9	26,61	22,14	18,38	12,10
n-3 HUFA	7,86	11,27	14,37	21,01

3.1.3.- RESULTADOS

Calidad de la puesta

Todos los grupos de reproductores aceptaron y comieron muy bien las dietas experimentales. Durante las primeras tres semanas de alimentación con las dietas experimentales no se observaron diferencias significativas en ninguno de los Parámetros de Calidad de las puestas de los cuatro grupos de reproductores establecidos (dos tanques por cada dieta experimental ensayada), ni tampoco entre las puestas de los replicados de cada dieta, obteniéndose puestas en todos los tanques experimentales. Sin embargo, después de tres semanas de alimentación el porcentaje de huevos no fecundados (Tabla X) se redujo significativamente en las puestas de los grupos de reproductores alimentados con las dietas con más altos niveles dietéticos de n-3 HUFA (Tabla VIII) y mostró una correlación negativa con el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y con el ácido araquidónico (20:4n-6, AA) (Tabla IX) (Fig. 10). Los niveles dietéticos de EPA y ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) (Tabla IX), mejoraron significativamente el porcentaje de huevos vivos (Tabla X), mostrando unas correlaciones positivas con este índice de la puesta (Fig. 11). Asimismo se encontró una relación positiva entre los niveles dietéticos de n-3 HUFA (Tabla VIII) y el porcentaje de huevos vivos (Fig. 12). Por el contrario, no se encontró ninguna relación entre los n-3 HUFA dietéticos (Tabla VIII) y los porcentajes de eclosión y de supervivencia larvaria (Tabla X). Las larvas procedentes de los reproductores alimentados con las Dietas 3 y 4 (con los niveles n-3 HUFA más altos) mostraron hipertrofia del saco vitelino debido principalmente a una acumulación de lípidos, que las obligó a flotar en la superficie de agua perturbando sus actividades natatorias y aumentando la mortalidad larvaria.

Tabla X.- Índices de las puestas de los reproductores de dorada, alimentados con diferentes niveles de n-3 HUFA, en el Experimento I (media \pm desviación típica)

DIETA	% HUEVOS VIVOS	% HUEVOS MUERTOS	% HUEVOS NO FECUNDADOS
	(P < 0,01)	(P < 0,01)	(P < 0,01)
1	70,80 \pm 11,52 ^b (n = 103)	26,00 \pm 10,71 ^b (n = 103)	1,89 \pm 2,82 ^b (n = 103)
2	74,83 \pm 11,97 ^{ab} (n = 106)	22,16 \pm 11,29 ^{ab} (n = 106)	1,77 \pm 2,98 ^b (n = 106)
3	77,13 \pm 11,84 ^a (n = 107)	20,22 \pm 11,20 ^a (n = 107)	1,55 \pm 2,39 ^{ab} (n = 107)
4	78,54 \pm 12,30 ^a (n = 97)	19,62 \pm 11,42 ^a (n = 97)	0,85 \pm 1,03 ^a (n = 97)
	% HUEVOS ANORMALES (MORFOLOGÍA)	% ECLOSIÓN	% SUPERVIVENCIA LARVARIA
	(P < 0,01)	(P = 0,73)	(P < 0,01)
1	1,31 \pm 0,54 ^b (n = 103)	96,96 \pm 4,54 ^a (n = 68)	47,54 \pm 23,99 ^a (n = 84)
2	1,21 \pm 0,62 ^{ab} (n = 106)	96,44 \pm 4,80 ^a (n = 66)	46,92 \pm 24,51 ^{ab} (n = 91)
3	1,08 \pm 0,60 ^{ab} (n = 107)	94,83 \pm 5,70 ^b (n = 67)	36,44 \pm 21,23 ^c (n = 86)
4	0,98 \pm 0,57 ^a (n = 97)	96,88 \pm 3,76 ^a (n = 60)	37,30 \pm 28,05 ^{bc} (n = 85)

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

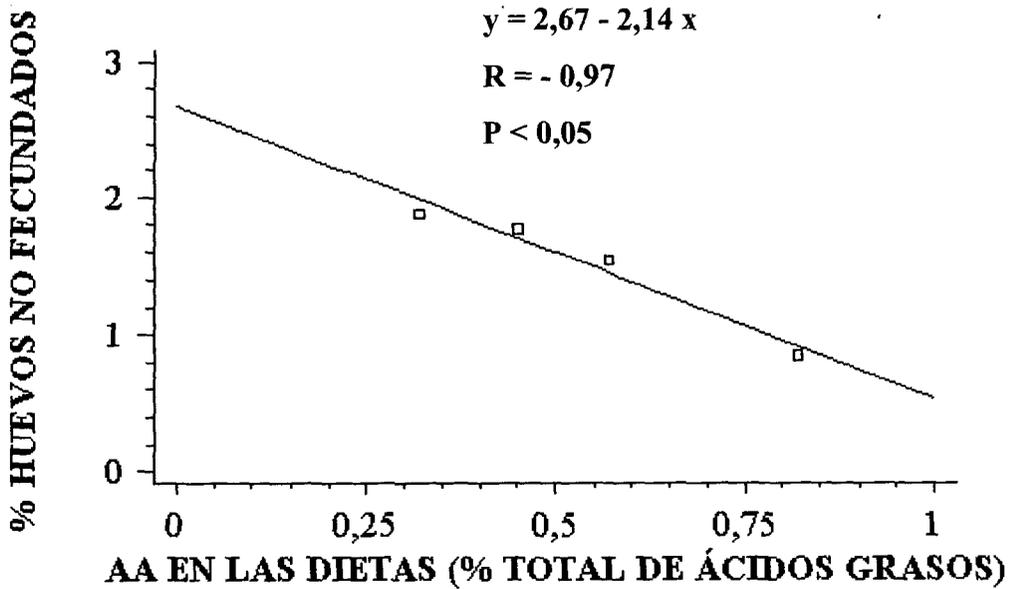
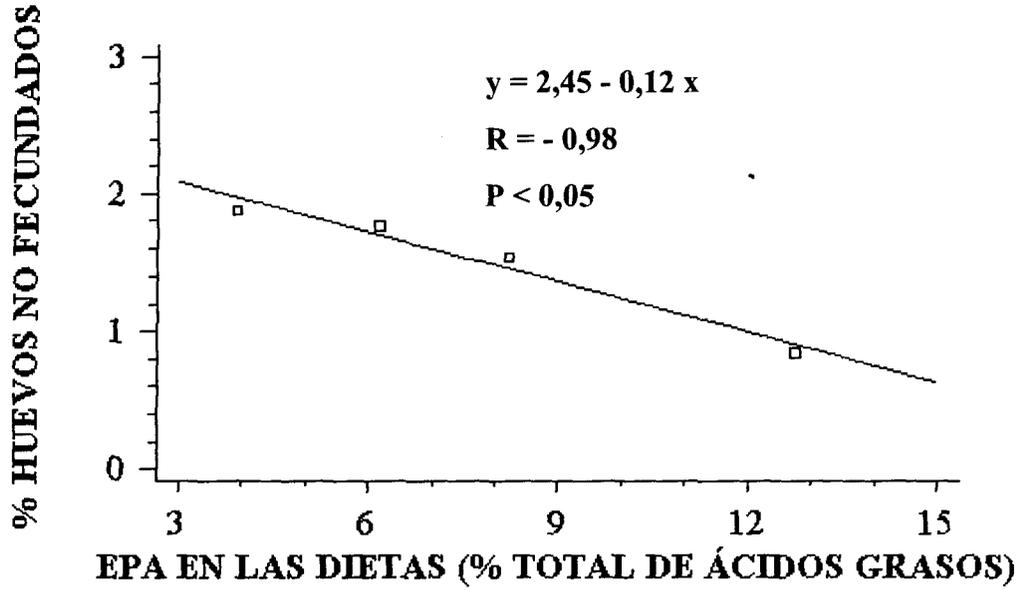


Fig.10.- Relación del EPA y del AA contenido en las dietas experimentales con el porcentaje de huevos no fecundados en el Experimento I.

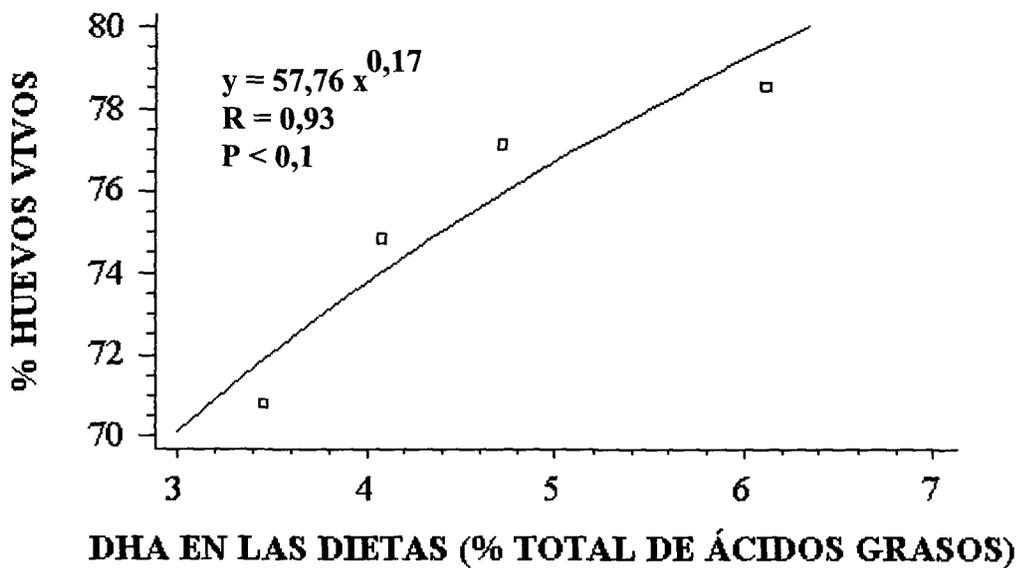
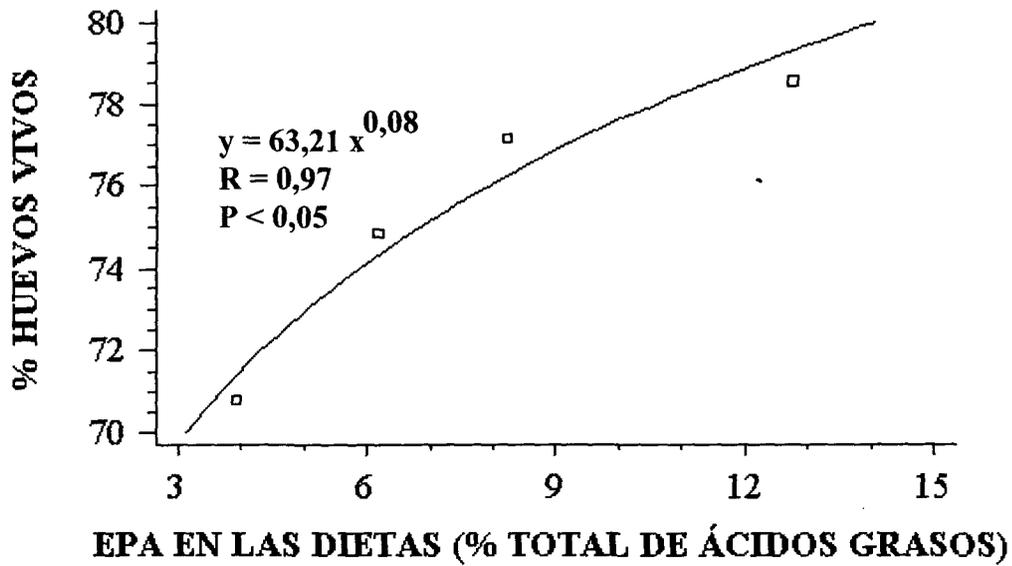


Fig.11.- Relación del EPA y del DHA contenido en las dietas experimentales con el porcentaje de huevos vivos en el Experimento I.

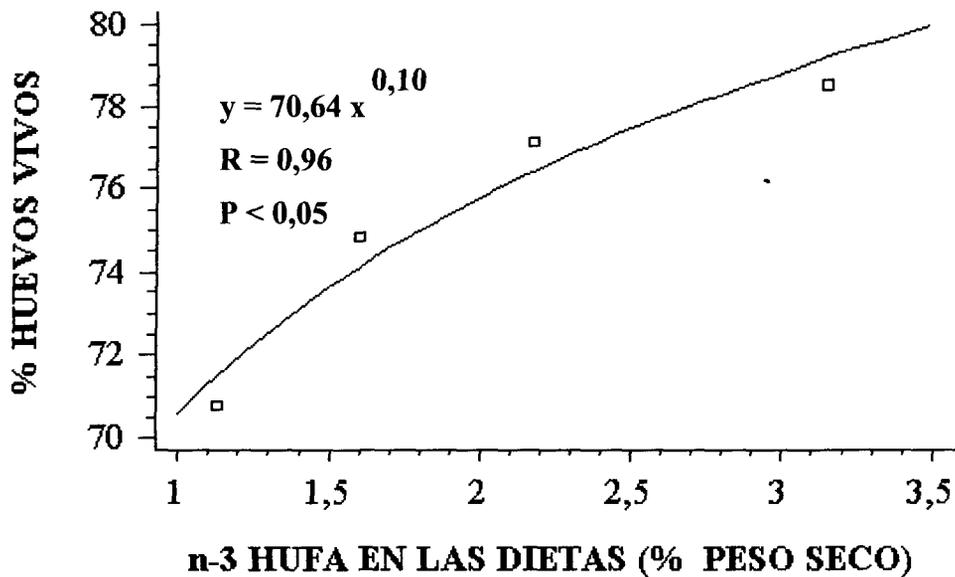
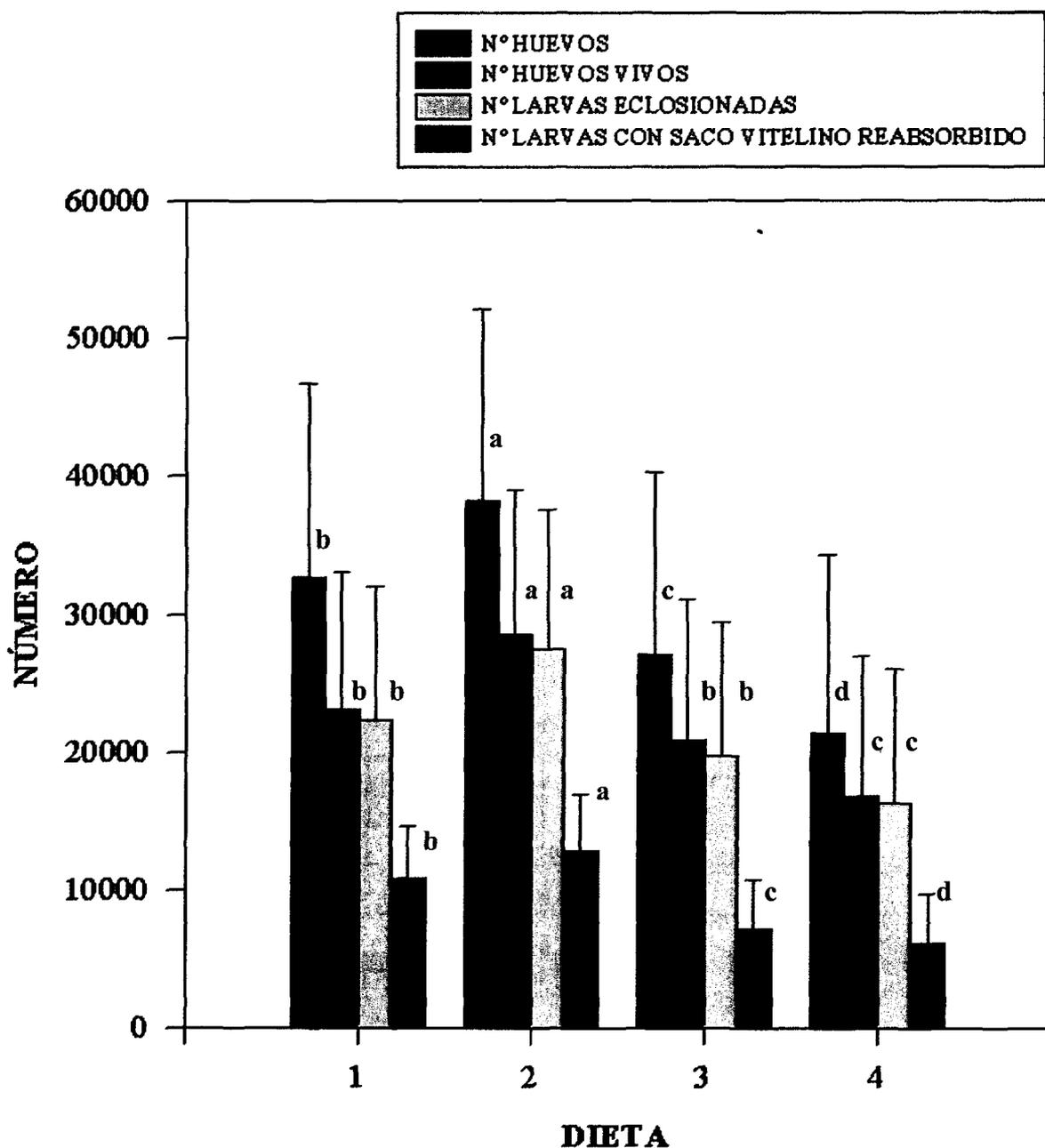


Fig. 12.- Relación entre los n-3 HUFA de las dietas experimentales y el porcentaje de huevos vivos en el Experimento I.

Las dietas experimentales también afectaron las Producciones relativas principalmente en lo que se refiere al número de huevos (Fig. 13). Los grupos de reproductores alimentados con la dieta conteniendo un 1,6% de n-3 HUFA produjeron un número significativamente mayor de huevos por kg de hembra y por puesta que los reproductores alimentados con una dieta conteniendo un 1,13% de n-3 HUFA. Sin embargo, los reproductores alimentados con las dietas que contenían niveles de n-3 HUFA superiores a 1,6% produjeron un menor número de huevos por kg de hembra y por puesta que los reproductores alimentados con las Dietas 1 y 2. Así, la cantidad más alta de huevos producida por kg de hembra fue obtenida cuando se alimentaron reproductores con la Dieta 2 (1,6% n-3 HUFA) y este hecho junto con las altas tasas de eclosión y supervivencia larvaria obtenidas con esta dieta (Tabla X) produjo el número más alto de larvas con el saco vitelino reabsorbido, a pesar de que el porcentaje de huevos vivos de esta dieta fue inferior al de las Dietas 3 y 4 (Fig. 13).



*Barras, del mismo color, sin o con una misma letra no presentan diferencias significativas. Barras del mismo color, con diferentes letras presentan diferencias significativas.

Fig.13.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada, del Experimento I, alimentados con dietas conteniendo diferentes niveles de n-3 HUFA.

El diámetro de los huevos de los reproductores alimentados con la Dieta 2 fue significativamente mayor que el del resto de los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las otras tres dietas (Tabla XI), pero ninguna correlación se encontró entre los niveles dietéticos de n-3 HUFA y el diámetro del huevo. El diámetro de la gota de grasa fue superior en los tratamientos 1 y 3, que también mostraron los niveles de DHA más bajos en los huevos. La longitud de las larvas de un día era superior en los tratamientos 3 y 4, que también mostraron los contenidos de n-6 más altos en los huevos. La longitud de las larvas con el saco vitelino reabsorbido fue mayor cuando procedían de los tratamientos 2 y 4 que mostraron los niveles de DHA más altos en los huevos.

Tabla XI.- Medidas de los huevos y larvas producidos por los reproductores, alimentados con las dietas experimentales, en el Experimento I (media \pm desviación típica)

DIETA	DIÁMETRO HUEVO (mm)	DIÁMETRO GOTA DE GRASA (mm)	LONGITUD LARVAS 1 DIA (mm)	LONGITUD LARVAS 3DIAS (mm)
	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,01
1	0,981 \pm 0,019 ^b (n = 150)	0,242 \pm 0,0090 ^a (n = 150)	2,77 \pm 0,148 ^b (n = 150)	3,71 \pm 0,11 ^{ab} (n = 150)
2	0,990 \pm 0,017 ^a (n = 150)	0,238 \pm 0,0088 ^b (n = 150)	2,74 \pm 0,188 ^b (n = 150)	3,79 \pm 0,11 ^a (n = 150)
3	0,983 \pm 0,019 ^b (n = 150)	0,241 \pm 0,0098 ^a (n = 150)	2,79 \pm 0,189 ^{ab} (n = 150)	3,64 \pm 0,17 ^b (n = 150)
4	0,982 \pm 0,0016 ^b (n = 150)	0,239 \pm 0,0087 ^{ab} (n = 150)	2,84 \pm 0,181 ^a (n = 150)	3,74 \pm 0,17 ^{ab} (n = 150)

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Composición bioquímica de los huevos

El incremento de los niveles dietéticos de n-3 HUFA tiene como resultado un alto nivel de lípidos en los huevos (Tabla XII). Los ácidos grasos más abundantes en los lípidos totales de los huevos fueron: 16:0 (ácido palmítico), 18:1n-9 (ácido oleico), y 22:6n-3 (DHA), seguidos por 16:1n-7 (ácido palmitoleico), 18:0 (ácido esteárico) y 20:5n-3 (EPA) independientemente de la dieta utilizada. Los ácidos grasos n-3 y n-3 HUFA se incrementan significativamente con el aumento de sus niveles dietéticos (Tabla IX), principalmente debido al aumento del 18:3n-3 (ácido linolénico), 18:4n-3 (ácido estearidónico) y EPA en los huevos. Así, una correlación positiva se encontró entre los niveles dietéticos y contenido de los huevos en n-3 y n-3 HUFA (Fig. 14). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en el contenido de los huevos de los otros grupos de ácidos grasos: saturados, monoinsaturados, n-6 y n-9 (Tabla XII), aunque los niveles dietéticos de algunos ácidos grasos tales como 18:0 (ácido esteárico), 18:1n-9 (ácido oleico) y 20:4n-6 (AA) difirieron claramente entre las dietas experimentales (Tabla IX). Los huevos de la Dieta 2 mostraron los niveles más bajos de ácidos grasos monoinsaturados (Tabla XII).

La composición bioquímica de los huevos mostro relación con algunos de los Índices de las puestas de los reproductores de dorada (Tabla X), así, el porcentaje de huevos vivos muestra correlaciones positivas con los contenidos en n-3 HUFA y EPA de los huevos (Fig. 15). Asimismo, los porcentajes de huevos no fecundados y de huevos anormales mostraron una correlación negativa con los niveles de EPA en los huevos (Fig. 16).

Tabla XII.- Composición (% peso seco) de los huevos producidos por los reproductores, alimentados con las dietas experimentales, en el Experimento I (media \pm desviación típica)

ÁCIDOS GRASOS	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4
12: 0	0,02 \pm 0,02	-	-	0,03 \pm 0,03
14: 0	0,29 \pm 0,05	0,32 \pm 0,04	0,36 \pm 0,03	0,41 \pm 0,06
14: 1	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01
15: 0	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01
16: 0	1,87 \pm 0,34	2,01 \pm 0,35	2,20 \pm 0,20	2,12 \pm 0,34
16: 1n-7	0,69 \pm 0,11	0,77 \pm 0,08	0,85 \pm 0,09	0,86 \pm 0,14
16: 1n-5	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,01
16: 2	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,05,0,01 \pm	0,06 \pm 0,01
17: 0	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01
17: 1	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
16: 4 n-3	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00
18: 0	0,38 \pm 0,08	0,44 \pm 0,10	0,47 \pm 0,06	0,39 \pm 0,07
18: 1n-9	1,77 \pm 0,40	1,79 \pm 0,26	1,84 \pm 0,22	1,49 \pm 0,28
18: 1n-7	0,21 \pm 0,04	0,22 \pm 0,03	0,26 \pm 0,03	0,26 \pm 0,05
18: 2n-9	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
18: 2n-6	0,30 \pm 0,05	0,32 \pm 0,02	0,34 \pm 0,05	0,32 \pm 0,05
18: 3n-9	0,01 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
18: 3n-6	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
18: 3n-3	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
18: 4n-3	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
18: 4n-1	-	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
20: 1n-9	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,001
20: 2n-9	-	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
20: 2n-6	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
20: 4n-6	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01
20: 4n-3	0,03 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01
20: 5n-3	0,29 \pm 0,04	0,39 \pm 0,06	0,43 \pm 0,07	0,54 \pm 0,10
22: 1n-11	-	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
22: 1n-9	-	-	-	0,01 \pm 0,01
22: 3n-6	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01
22: 5n-6	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00
22: 5n-3	0,11 \pm 0,02	0,13 \pm 0,12	0,14 \pm 0,02	0,16 \pm 0,03
22:6 n-3	1,04 \pm 0,21	1,21 \pm 0,16	1,14 \pm 0,16	1,23 \pm 0,20
Saturados	2,62 \pm 0,50	2,85 \pm 0,51	3,10 \pm 0,29	3,02 \pm 0,51
Monoinsaturados	2,80 \pm 0,58	2,57 \pm 0,64	3,11 \pm 0,34	2,78 \pm 0,49
n-3	1,57 \pm 0,27 ^a	1,87 \pm 0,24 ^{ab}	1,87 \pm 0,24 ^{ab}	2,14 \pm 0,35 ^b
n-6	0,40 \pm 0,07	0,44 \pm 0,04	0,46 \pm 0,06	0,46 \pm 0,07
n-9	1,87 \pm 0,42	1,88 \pm 0,26	1,96 \pm 0,24	1,62 \pm 0,30
n-3 HUFA	1,48 \pm 0,26 ^a	1,77 \pm 0,24 ^{ab}	1,76 \pm 0,23 ^{ab}	1,99 \pm 0,33 ^b
Lípidos	17,85 \pm 2,79	19,11 \pm 2,62	20,31 \pm 1,63	20,06 \pm 3,04
Humedad	92,41 \pm 0,27	92,37 \pm 0,61	92,41 \pm 0,22	92,64 \pm 0,33

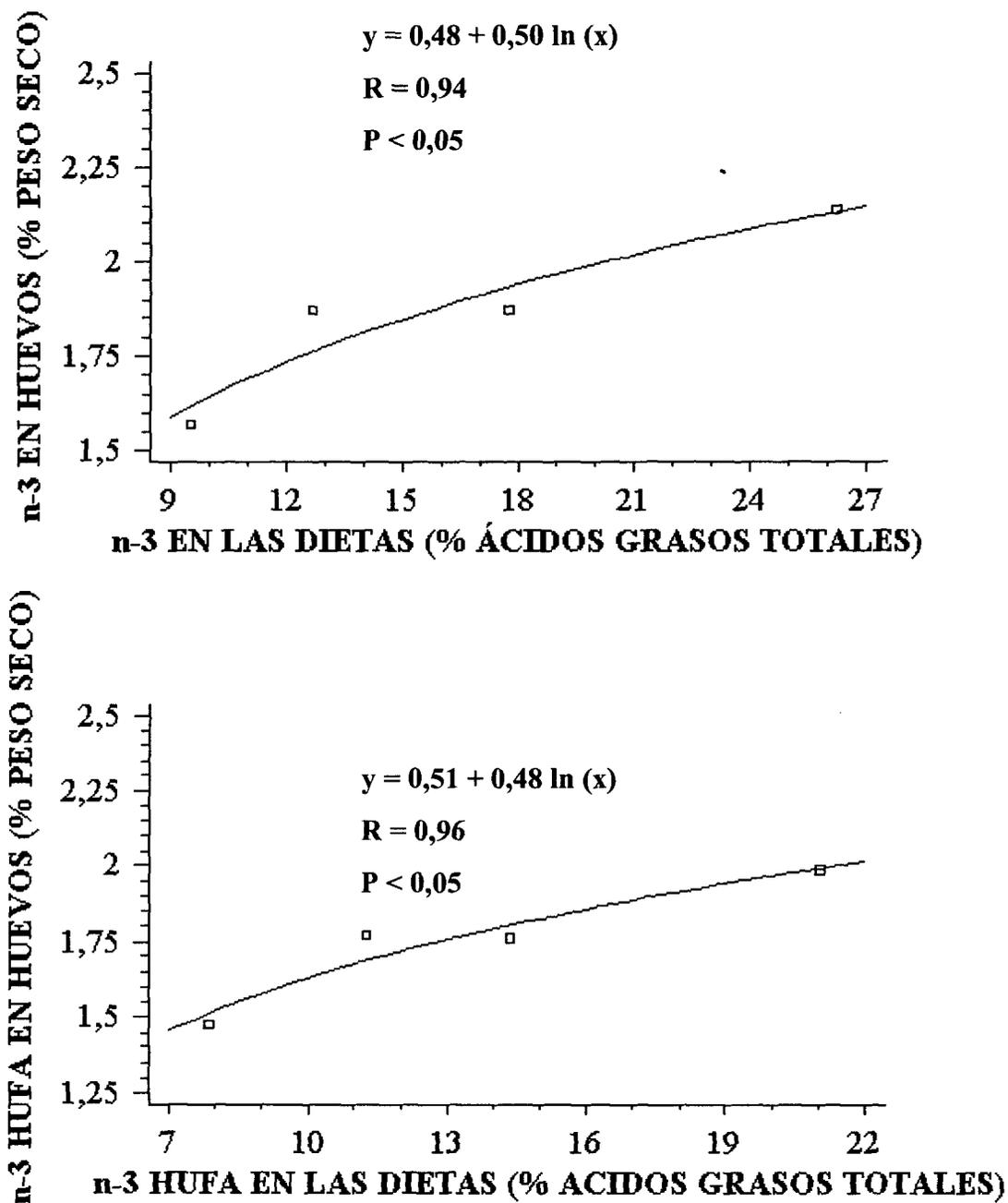


Fig. 14.- Relacion entre los ácidos grasos de la serie n-3 y n-3 HUFA contenidos en las dietas experimentales y sus niveles en los huevos en el Experimento I.

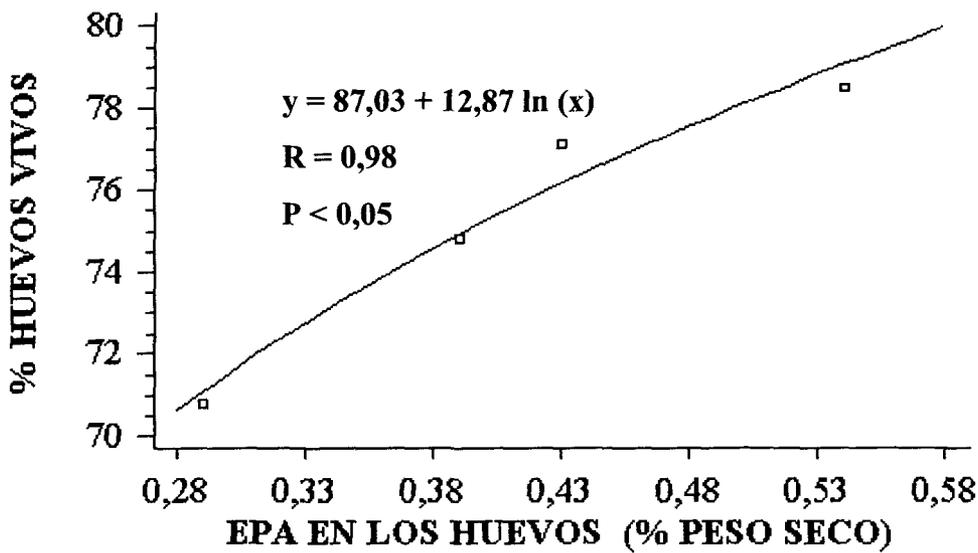
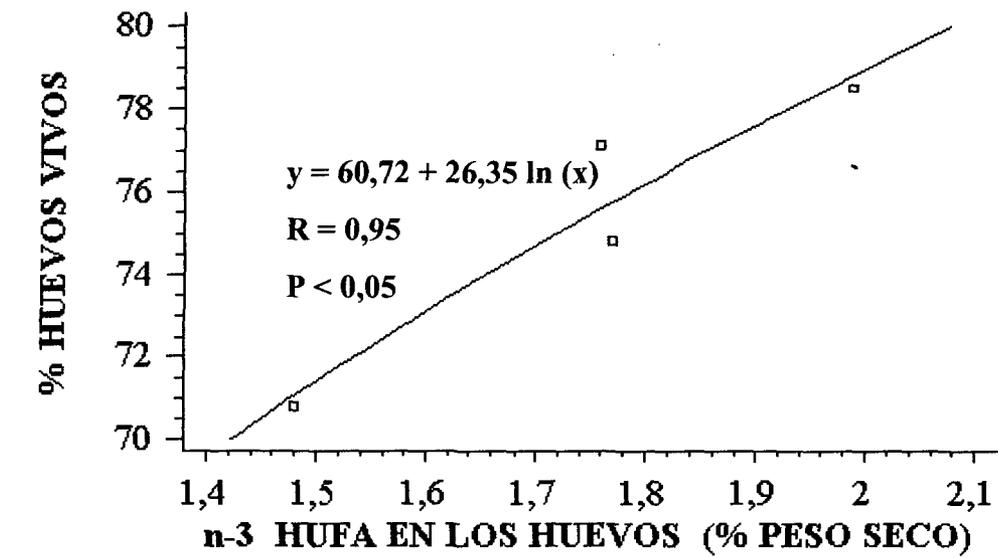


Fig.15.- Relación entre el porcentaje de huevos vivos y el contenido en n-3 HUFA y EPA de los huevos, procedentes de los reproductores alimentados con las dietas experimentales, en el Experimento I.

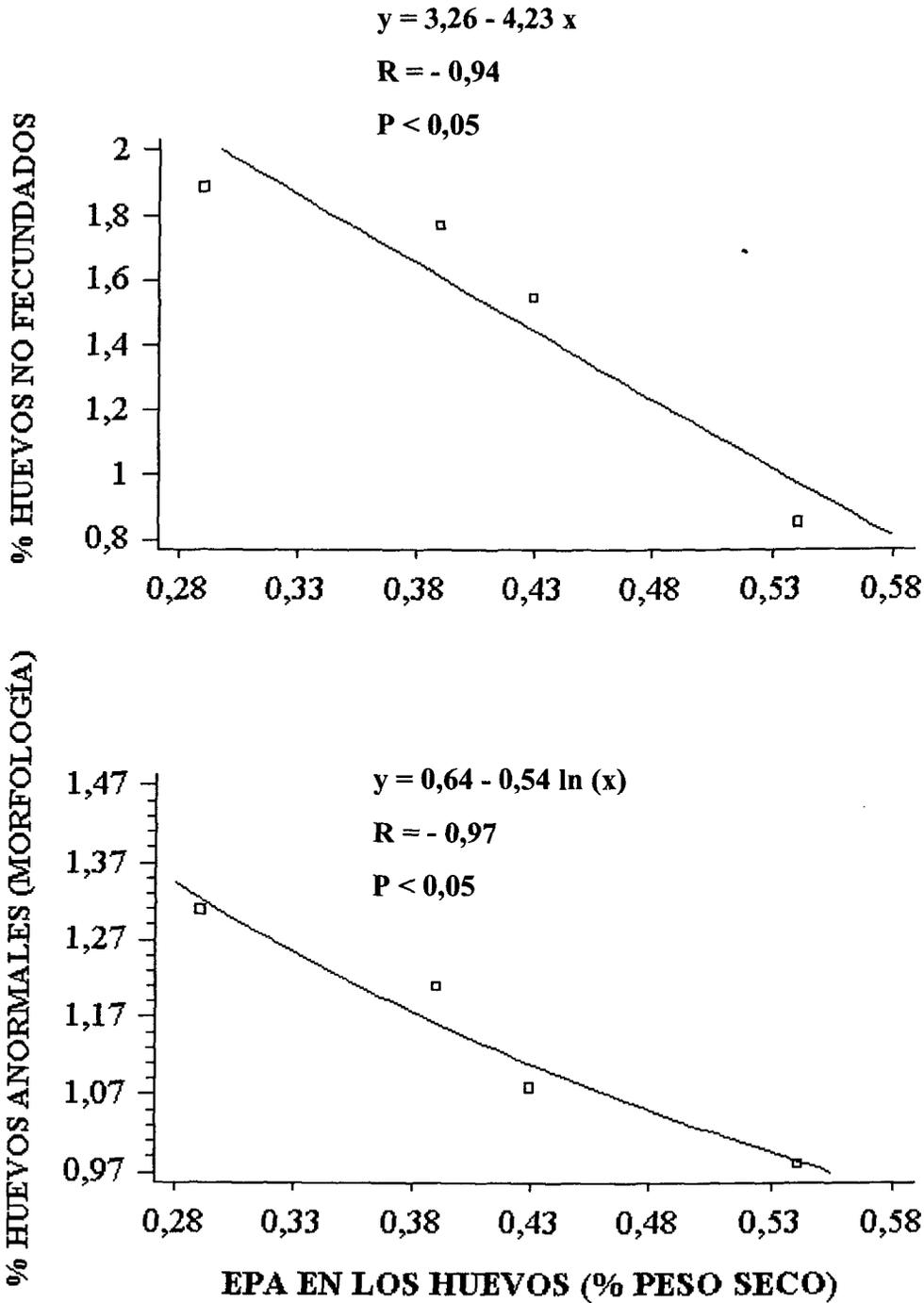


Fig. 16.- Relación entre los porcentajes de huevos no fecundados y anormales morfológicamente con el nivel de EPA en los huevos, procedentes de los reproductores alimentados con las dietas experimentales, en el Experimento I.

3.1.4.-DISCUSIÓN

Los resultados de este experimento indican que la calidad de la puesta de la dorada (*Sparus aurata*), que es un factor limitante para la producción masiva de semilla de esta especie, se ve directamente afectada por los niveles de n-3 de HUFA de las dietas de los reproductores. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Watanabe *et al.* (1984 a,b,c;1985 a,b) para el pargo japonés (*Pagrus major*), Furuita *et al.* (2000; 2002) para el lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*), Cerdá *et al.* (1994 b), Navas *et al.* (1997) y Bruce *et al.* (1999) para lubina (*Dicentrarchus labrax*), Harel *et al.* (1994) Rodríguez *et al.* (1998), Almansa *et al.* (1999; 2001) y Domarco (2001) para dorada.

Los ácidos grasos más abundantes en los lípidos totales de los huevos no se diferencian en los huevos de los diferentes tratamientos y son los mismos descritos para varias especies de peces marinos (Falk-Petersen *et al.*, 1989; Izquierdo *et al.*, 1989; Mourente y Odriozola, 1990; Bruce *et al.*, 1999; Lavens *et al.*, 1999, Morehead *et al.*, 2001; Cejas *et al.*, 2003 y Furuita *et al.*, 2003b)

Aunque los perfiles de ácidos grasos en el músculo del pez y en los huevos en desarrollo del salmón coho, *Oncorhynchus kisutch* (Hardy *et al.*, 1990) reflejen los ácidos grasos dietéticos después de dos meses de alimentación, en los espáridos, la composición en ácidos grasos de las gónadas de la hembra es muy afectada por el contenido en ácidos grasos de la dieta que a su vez afecta significativamente la calidad del huevo en un período corto de tiempo. Harel *et al.* (1992) y Tandler *et al.* (1995) han demostrado que la composición lipídica de los tejidos de reproductores de dorada alcanza un equilibrio con los lípidos dietéticos después de sólo 15 días de alimentación. Muchas especies de peces tienden a disminuir su tasa de ingesta durante la maduración sexual, el mecanismo responsable de

la reducción de la ingesta durante el periodo de puesta no esta claro, pero afecta también a los peces en el medio natural (Trippel *et al.*, 1995; Link y Burnett, 2001). Quizás este relacionado con el hinchamiento de las hembras cuando comienzan la hidratación de los huevos en el ovario. Esto restringe espacio en la cavidad corporal y consecuentemente el volumen de alimento que puede ser ingerido. Otros factores como el nivel de hormonas pueden jugar un papel estrechamente relacionado con la regulación del apetito (Thorsen *et al.*, 2003). En consecuencia la energía y nutrientes necesarios para el desarrollo gonadal la toman de sus reservas corporales. La trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, moviliza las reservas lipídicas de la carcasa y vísceras (Nassour y Leger, 1989). El pez gato africano, *Clarius batrachus*, usa la grasa abdominal como la mayor fuente de energía para la maduración sexual (Lal y Singh, 1987). El salmón Atlántico, *Salmo salar*, utiliza las proteínas y lípidos del músculo (Aksnes *et al.*, 1986) y el bacalao, *Gadus morhua*, utiliza las reservas acumuladas en el hígado (Tocher y Harvie, 1988). Los reproductores de dorada continúan alimentándose durante la maduración sexual y a lo largo del periodo de puesta llegando a producir una biomasa de huevos equivalente a su propio peso corporal. Bajo estas circunstancias los lípidos depositados en los ovarios deben proceder de la dieta de los reproductores y/o de las reservas endógenas. Considerando estas características, la mayoría de los ácidos grasos esenciales de los huevos pueden ser cambiados durante la época de desove y por consiguiente afectar a la calidad de la puesta (Almansa *et al.*, 1999). De acuerdo con el presente experimento, la composición del huevo y la calidad de la puesta de la dorada fueron afectadas por los niveles de ácidos grasos esenciales en las dietas experimentales después de tres semanas de alimentación, sugiriendo que los ácidos grasos esenciales de las dietas son incorporados rápidamente a los huevos. La calidad de la puesta en esta especie puede modificarse variando la calidad nutritiva de dietas de los reproductores incluso durante la época de puesta (Harel *et al.*, 1994; Zohar *et al.*, 1995). En especies de puestas continuas con periodos cortos de vitelogénesis como los espáridos (Zohar *et al.*, 1984) la calidad de la puesta parece ser afectada por los lípidos dietéticos justo antes del inicio del periodo de puesta (Watanabe *et al.*, 1985 b;

Watanabe y Kiron, 1995) o incluso durante el periodo de puesta como en el presente estudio. En contraste, en especies con más de 6 meses de vitelogénesis (Frémont *et al.* 1984) como los salmónidos, para mejorar la calidad de la puesta los reproductores deben alimentarse con una dieta de buena calidad durante varios meses antes de la estación de desove (Watanabe *et al.*, 1984d; Leray *et al.*, 1985; Corraze *et al.*, 1993).

El número de huevos producido por kg de hembra y por puesta y el porcentaje de huevos vivos fueron los indicadores de la calidad de la puesta más sensibles de todos los estudiados para determinar la calidad de la puesta. En la dorada, algunos criterios morfológicos usados en este experimento parecen ser buenos indicadores tempranos de la viabilidad de los huevos tales como, la simetría de los blastómeros en las primeras divisiones celulares, también usado en puestas del pargo japonés, *Pagrus major* (Sakai *et al.* 1985), halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (Bromage *et al.*, 1994), bacalao, *Gadus morhua* (Buckley *et al.*, 2000), rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Kjørsvik *et al.*, 2003), eglefino, *Melanogrammus aeglefinus* (Rideout *et al.*, 2004) y la transparencia del huevo, usado en puestas del ayu, *Plecoglossus altivelis* (Hirose *et al.*, 1977), lenguado, *Solea solea* (Dinis, 1982) y rodaballo, *Scophthalmus maximus* (McEvoy, 1984). En el presente experimento, se ha mostrado que el porcentaje de huevos vivos aumenta con la elevación de los niveles de n-3 HUFA en las dietas de los reproductores y con la incorporación de estos ácidos grasos en los huevos, lo que indica la importancia de estos ácidos grasos esenciales para el desarrollo normal de huevos y embriones de dorada. Resultados similares para esta especie han sido descritos por Domarco (2001) en un experimento en que el incremento de los niveles de n-3 HUFA en los huevos implicaba un aumento en el porcentaje de huevos vivos. Estos ácidos grasos tienen diferentes funciones en los peces, tales como su importante papel estructural como componentes de los fosfolípidos en las biomembranas del pez, estando relacionados con la fluidez de las mismas y su correcto funcionamiento fisiológico (Bell *et al.*, 1986, 1997; Takeuchi, 1997; Sargent,

1995; Sargent *et al.*, 1999). En algunas especies, los n-3 PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) también se consideran como las mayores fuentes de energía durante el desarrollo embrionario temprano (Tocher *et al.*, 1985 a, b; Falk-Petersen *et al.*, 1986, 1989; Rainuzzo, 1993; Sargent, 1995).

Por el contrario, la supervivencia larvaria no está positivamente correlacionada con los niveles dietéticos de n-3 HUFA. Un exceso de n-3 HUFA en la dietas de los reproductores produjo un alto porcentaje de larvas con hipertrofia del saco vitelino y causó una reducción del 10% en la supervivencia larvaria a día 3 después de la eclosión.

Como se ha sugerido por varios autores (Sandnes *et al.*, 1984; Craik 1985; Harel *et al.*, 1992; Parrish *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1997; Almansa *et al.*, 1999), la composición química de los huevos de peces está relacionada con la calidad de las puestas, y la composición del huevo debe satisfacer las demandas nutritivas del embrión para su desarrollo y crecimiento. Pero los resultados del presente estudio mostraron que el porcentaje de n-3 HUFA de los huevos no debe usarse como el único criterio para determinar calidad de las puestas de los reproductores de dorada. En general, bajos niveles de n-3 HUFA disminuyen la calidad de las puestas, sin embargo pocos autores, Lavens *et al.* (1999) y Furuita *et al.* (2002) han señalado los efectos negativos sobre las puestas de un exceso de n-3 HUFA. En este experimento ambos niveles de n-3 HUFA, altos y bajos, están asociados con baja calidad de las puestas en términos de fecundidad relativa y supervivencia larvaria. Resultados similares son obtenidos para esta misma especie por Rodríguez *et al.* (1998), en lo referente a la fecundidad relativa con reproductores alimentados con una dieta deficiente en n-3 HUFA.

Los niveles de lípidos de los huevos fueron superiores a los descritos por Mourente *et al.* (1989) para dorada (10% en peso seco), esta diferencia puede ser debida a una inclusión de comida natural en

las dietas de reproductores usadas por esos autores y a su menor contenido en lípidos dietéticos, y comparables a los descritos para esta misma especie por Almansa *et al.* (1999) y Domarco (2001). Índices de eclosión o de viabilidad muy bajos han sido asociados con altos contenidos de lípidos en huevos de rodaballo, lenguado y lubina (Devauchelle *et al.*, 1982; Serrano *et al.*, 1989), en el presente estudio la elevación de los niveles de lípidos en los huevos de dorada no afectó el porcentaje de eclosión o la proporción de huevos vivos. Similares resultados en cuanto al porcentaje de eclosión son señalados por Furuita *et al.* (2000) para el lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*).

La composición en ácidos grasos de los huevos está directamente afectada por el contenido en n-3 HUFA de la dieta de los reproductores. Los ácidos grasos de la serie n-3 y los n-3 HUFA contenidos en los huevos de dorada se incrementan cuando se incrementan los n-3 HUFA de la dieta, debido principalmente al aumento de 18:3n-3 (ácido linolénico), 18:4n-3 (ácido estearidónico) y 20:5n-3 (ácido eicosapentanoico, EPA) contenidos en los huevos (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Una correlación positiva se observó entre los niveles de n-3 HUFA en la dieta y los huevos con la concentración de EPA más rápidamente afectada por los n-3 HUFA de la dieta que la del ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA). En reproductores de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, alimentados con una dieta deficiente en ácidos grasos de la serie n-3, durante los últimos tres meses de vitelogénesis, se producía un efecto moderado en la incorporación de DHA en los lípidos del huevo mientras que el EPA disminuyó un 50% (Frémont *et al.*, 1984).

Los resultados de este experimento sugieren un efecto del EPA y del ácido araquidónico (AA) dietéticos en el porcentaje de huevos fecundados de los reproductores de dorada existiendo una clara correlación entre el contenido de los huevos en EPA y el porcentaje de huevos no fecundados. Almansa *et al.* (1999) señalan que el porcentaje de fecundación está negativamente afectado por la composición

en ácidos grasos de una dieta deficiente en n-3 HUFA aunque no encuentran relación entre el contenido de EPA en los huevos y el porcentaje de fecundación. El EPA se conoce por ser un precursor de prostaglandinas (PGs) de la serie III, una de las PGs mayoritariamente sintetizadas por los peces marinos (Stacey y Goetz 1982). El AA también es precursor de PGs de la serie II. Algunas PGs, tales como la PGFs, tienen un papel importante como feromonas (Mustafa y Srivastava 1989; Sorensen y Goetz, 1993; Rosenblum *et al.*, 1995), estimulando el comportamiento sexual masculino y sincronizando y la puestas de la hembra y el macho, afectando directamente así al éxito de la fecundación (Sorensen *et al.*, 1988). La distribución del EPA en el espermatozoide también puede ser afectada por los ácidos grasos dietéticos, como se ha demostrado en la trucha arco iris (Watanabe *et al.*, 1984d; Leray y Pelletier 1985; Labbe *et al.*, 1993) y es responsable de la actividad del espermatozoide y de la tasa de fertilización como han sugerido algunos autores (Watanabe *et al.*, 1984d).

En cuanto a las Medidas de huevos y larvas, existen diferencias significativas entre el diámetro de los huevos de la Dieta 2 y el del resto de huevos de las otras tres dietas, sin embargo no encontramos ninguna relación entre esta medida y el resto de los Parámetros de Calidad de las puestas. Esto está de acuerdo con lo señalado en la bibliografía para peces de agua dulce (Thorpe *et al.*, 1984; Springate y Bromage, 1985). Aunque es conocido que el tamaño de los huevos y larvas está correlacionado (Kjørsvik *et al.*, 1990) no sucede lo mismo en este experimento entre el diámetro del huevo y la longitud de las larvas recién eclosionadas. Similares resultados son señalados por Morehead *et al.* (2001) en el trompetero australiano (*Latris lineata*). Tampoco existe una correlación entre el diámetro de los huevos y la longitud de las larvas con el saco vitelino reabsorbido, aunque los huevos con mayor diámetro (Dieta 2) si producen las larvas con saco vitelino reabsorbido más grandes y éstas tienden a sobrevivir más sin comida lo que les da ventaja durante la primera fase de alimentación (Lavens *et al.*, 1999).

Los resultados de este trabajo sugieren que la calidad de la puesta de la dorada puede mejorarse por la elevación de los *n-3* HUFA dietéticos a 1,6%. Este nivel dietético es superior que aquéllos requeridos por los salmónidos (alrededor del 1% *n-3* HUFA) y similar a aquéllos obtenidos para esta misma especie por Tandler y colaboradores (1995) y para lenguado del Pacífico por Furuita y colaboradores (2000). Sin embargo, niveles altos de *n-3* HUFA redujeron el número total de huevos producido y causó la hipertrofia del saco vitelino en algunas larvas, disminuyendo las proporciones de supervivencia larvaria. El número de huevos por kg de hembra y por puesta y el porcentaje de huevos vivos son buenos indicadores de la calidad de la puesta en esta especie.

3.2.- EXPERIMENTO II

3.2.1.-REPRODUCTORES

Cuarenta y cinco reproductores (2-4 años de edad) de dorada (*Sparus aurata*) procedentes de la granja de jaulas flotantes del Instituto Canario de Ciencias Marinas situada en el muelle de Taliarte, fueron seleccionados al azar y distribuidos en quince tanques de fibra de vidrio de 1000 l de capacidad. La proporción de machos y hembras en cada tanque fue de 2:1 (2 ♂: 1 ♀). Las características biométricas de los reproductores utilizados se muestran en la Tabla XIII. Los tanques estaban dotados de un circuito de agua de mar con un flujo de 165 l/hora, lo que aseguraba una renovación diaria de su volumen de unas cuatro veces, y de aireación. La temperatura durante el experimento osciló entre 18,7° C y 21,6° C. Desde el momento en que los reproductores fueron estabulados en los tanques se alimentaron con un pienso comercial. Tras un periodo de alimentación común con dicho pienso y de asegurarse que no había diferencias significativas en ninguno de los Parámetros de Calidad de las puestas se procedió a alimentar a los reproductores dos veces por día, la ración diaria era del 1 % de la biomasa de cada tanque. Cada una de las cinco dietas, las cuatro experimentales y la dieta comercial, fue suministrada a tres grupos de peces elegidos aleatoriamente.

Tabla XIII.- Características biométricas de los reproductores utilizados en el Experimento II (media ± desviación típica)

REPLICADOS	♀		♂	
	PESO	TALLA	PESO	TALLA
1	1221,33±204,6	42,66±3,05	854,50±295,4	36,66±4,22
2	1182,67±199,4	42,00±2,64	819,66±291,8	36,83±4,79
3	1250,67±271,6	44,66±3,05	761,66±279,1	35,83±3,76
4	1156,33±207,0	42,66±3,05	799,33±254,0	36,16±4,35
5	1229,67±132,2	43,66±4,04	759,66±239,0	35,50±4,23

En una segunda parte de este experimento, 180 peces de $76,31 \pm 8,95$ g fueron distribuidos al azar en doce tanques troncocónicos de 100l dotados con un sistema de recolección de heces. Cada dieta experimental conteniendo un 3% de óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador inerte fue suministrada a mano dos veces al día (09:00 y 15:00h), durante 31 días, a una ración del 2% del peso inicial, por cada triplicado. Las heces fueron colectadas diariamente durante los últimos 10 días según el método descrito por Robaina *et al.* (1995). La digestibilidad aparente de los nutrientes fue calculada utilizando la siguiente ecuación (Cho y Kaushik, 1990):

$$\text{CDA (\%)} = 100 - [\text{Nh (\%)} \times \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ (\%)} \text{ en la dieta}] / \text{Nd (\%)} \times \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ (\%)} \text{ en las heces} \times 100$$

donde Nh es nutriente en las heces y Nd es nutriente en la dieta.

3.2.2.- COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS

La composición de las dietas experimentales y el análisis de su contenido, así como el de la dieta comercial, se indican en la Tabla XIV, la composición en ácidos grasos en porcentaje total de ácidos grasos y en peso seco se indican en las Tablas XV y XVI, respectivamente. Se formularon cuatro dietas isoproteicas, isolipídicas e isocalóricas. Las Dietas 1 y 2 conteniendo, respectivamente, harina de pescado (sardina) (Agramar, S.A., Lanzarote, España) o harina de calamar (Rieber and Son Ltd., Bergen, Noruega). La Dieta 3 conteniendo harina de pescado desengrasada y aceite de calamar y la Dieta 4 conteniendo harina de calamar desengrasada y aceite de la sardina. Las harinas de pescado y calamar fueron desengrasadas por extracción con cloroformo según el método descrito por Salhi (1997). La Dieta 5 fue la dieta comercial previamente usada.

Tabla XIV.- Composición de las dietas experimentales y contenido analizado de las dietas experimentales y de la dieta comercial usadas en el Experimento II

	DIETA				
	1	2	3	4	5
INGREDIENTES					
Harina de pescado	64,42	---	---	---	---
Harina de pescado desengrasada	---	---	64,42	---	---
Harina de calamar	---	61,73	---	---	---
Harina de calamar desengrasada	---	---	---	63,72	---
Aceite de pescado	2,31	---	---	7,28	---
Aceite de calamar	---	---	8,53	---	---
Grasa de vaca	6,04	7,16	5,29	6,18	---
Minerales	2	2	2	2	---
Vitaminas	2	2	2	2	---
Carboximetil celulosa	1	1	1	1	---
Alfa celulosa	3	6,9	---	---	---
Almidón y dextrina	7,4	7,4	7,4	7,4	---
Salvado de trigo	12,83	12,83	10,4	11,45	---
COMPOSICIÓN ANALÍTICA					
Proteínas	53,94	54,01	54,96	53,65	55,21
Lípidos	15,59	15,09	16,37	15,63	16,04
Cenizas	12,64	11,99	13,14	12,17	9,74
Humedad	7,38	6,74	6,75	5,94	11,73
n-3 HUFA (% de peso seco)	1,08	1,58	1,77	2,3	1,66

* Las mezclas de vitaminas y minerales fueron preparadas con α -Celulosa e incluidas en un 2% en las dietas experimentales.

Tabla XV.- Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de las dietas del Experimento II

ÁCIDOS GRASOS	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5
12: 0	0,07	---	---	---	---
14: 0	4,01	5,22	6,1	7,83	6,1
14: 1	0,44	0,37	0,27	---	0,28
15: 0	0,39	0,41	0,43	0,46	0,49
16: 0	24,25	24,22	23,6	21,64	17,06
16: 1n-7	3,7	5,19	6,82	8,98	4,51
16: 1n-5	---	0,13	---	0,19	0,21
16: 2	0,45	0,76	0,98	1,46	0,67
17: 0	0,93	0,77	0,63	0,35	0,37
17: 1	0,81	1,05	1,28	1,62	0,51
16: 4-n-3	0,51	1,01	1,31	2,15	0,33
18: 0	17,85	14,58	11,02	4,01	3,6
18: 1n-9	28,08	23,01	16,57	9,46	14,98
18: 1n-7	---	---	2,81	2,9	2,1
18: 2n-9	0,14	0,17	0,31	0,37	0,12
18: 2n-6	3	0,8	3,07	3,05	13,96
18: 3n-9	0,3	0,35	0,45	0,51	0,2
18: 3n-6	0,19	0,21	0,25	0,28	0,16
18: 3n-3	0,41	0,51	0,57	0,7	2,58
18: 4n-3	0,73	1,29	1,74	2,71	2,3
18: 4n-1	0,08	0,14	0,2	0,31	---
20: 1n-7	0,82	1,05	1,41	1,85	5,29
20: 2n-9	0,11	0,18	0,29	0,41	---
20: 2n-6	---	---	---	---	0,22
20: 4n-6	0,33	0,49	0,6	0,84	0,54
20: 4n-3	0,24	0,37	0,49	0,73	0,62
20: 5n-3	3,81	6,4	8,3	13,06	5
22: 1n-11	0,4	0,61	0,92	1,37	7,1
22: 1n-9	---	0,14	0,21	---	0,39
22: 3n-6	0,18	0,27	0,42	0,61	0,23
22: 5n-6	0,08	---	---	0,18	0,19
22: 5n-3	0,45	0,67	0,86	1,3	0,78
22: 6n-3	3,69	4,76	5,18	7,32	6,8
Saturados	47,7	45,36	41,77	34,29	27,61
Monoinsaturados	34,44	31,56	31,28	26,38	35,37
n-3	9,84	15,01	18,46	27,96	18,3
n-6	3,85	1,78	4,33	4,96	15,3
n-9	28,63	23,85	17,82	10,76	15,69
n-3 HUFA	8,19	12,2	14,83	22,4	13,09

Tabla XVI.- Composición en ácidos grasos (% peso seco) de las dietas del Experimento II

ÁCIDOS GRASOS	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5
12: 0	0,01	---	---	---	---
14: 0	0,53	0,68	0,73	1,01	0,77
14: 1	0,06	0,05	0,03	---	0,03
15: 0	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06
16: 0	3,2	3,13	2,81	2,79	2,16
16: 1n-7	0,49	0,67	0,81	1,16	0,57
16: 1n-5	---	0,02	---	0,02	0,03
16: 2	0,06	0,1	0,12	0,19	0,09
17: 0	0,12	0,1	0,08	0,05	0,06
17: 1	0,11	0,14	0,15	0,21	0,07
16: 4n-3	0,07	0,13	0,16	0,28	0,04
18: 0	2,36	1,89	1,31	0,52	0,45
18: 1n-9	3,71	2,98	1,97	1,22	1,89
18: 1n-7	---	---	0,33	0,37	0,27
18: 2n-9	0,02	0,02	0,04	0,06	0,02
18: 2n-6	0,4	0,1	0,37	0,39	1,77
18: 3n-9	0,04	0,05	0,05	0,07	0,03
18: 3n-6	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02
18: 3n-3	0,05	0,07	0,07	0,09	0,33
18: 4n-3	0,1	0,17	0,21	0,35	0,29
18: 4n-1	0,01	0,02	0,02	0,04	---
20: 1n-7	0,11	0,14	0,17	0,24	0,67
20: 2n-9	0,01	0,02	0,03	0,05	---
20: 2n-6	---	---	---	---	0,03
20: 4n-6	0,04	0,06	0,07	0,11	0,03
20: 4n-3	0,03	0,05	0,06	0,09	0,07
20: 5n-3	0,5	0,83	0,99	1,68	0,63
22: 1n-11	0,05	0,08	0,11	0,18	0,9
22: 1n-9	---	0,02	0,02	---	0,05
22: 3n-6	0,02	0,04	0,06	0,08	0,03
22: 5n-6	0,01	---	---	0,02	0,02
22: 5n-3	0,06	0,09	0,1	0,17	0,1
22: 6n-3	0,49	0,62	0,62	0,94	0,88
Saturados	6,3	5,87	4,98	4,42	3,49
Monoinsaturados	4,55	4,08	3,61	3,4	4,47
n-3	1,3	1,94	2,2	3,8	2,31
n-6	0,51	0,23	0,52	0,64	1,34
n-9	3,78	3,08	2,12	1,39	1,98
n-3 HUFA	1,08	1,58	1,77	2,89	1,66

3.2.3.- RESULTADOS

Calidad de la puesta

La aceptación de todas las dietas experimentales fue excelente y ninguna mortalidad fue observada durante el periodo experimental. No hubo ninguna diferencia significativa en la ingesta diaria de las dietas, y ésta no estuvo influenciada por el tipo de harina de las dietas experimentales. Se obtuvieron puestas en los quince replicados. Durante las primeras siete semanas del experimento se alimentaron todos los tanques con la dieta comercial observándose que no hubo diferencias significativas en ninguno de los Índices de las puestas (Tabla XVII). Después de ese periodo de alimentación común, cuatro grupos de reproductores fueron alimentados con las dietas experimentales y un quinto grupo continuó alimentándose con la dieta comercial. Después de tres semanas de alimentación, tras constatar que no hubo diferencias significativas entre los replicados de una misma dieta, se observó que los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con la dieta conteniendo harina de calamar (Dieta 2) y harina de calamar desengrasada con aceite de sardina (Dieta 4) mejoraron significativamente en todos los índices estudiados, excepto en el porcentaje de huevos morfológicamente anormales de las dos dietas y en el porcentaje de huevos con más de una gota de grasa y porcentaje de supervivencia larvaria obtenidos con la Dieta 2 (Tablas XVII y XVIII). Los reproductores alimentados con las dietas conteniendo harina de pescado (Dieta 1) y harina de pescado desengrasada con aceite de calamar (Dieta 3) también mejoraron significativamente la calidad de sus puestas. El porcentaje de larvas anormales descendió del 2,68% al 1,17% en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 y del 4,08% al 0,92% en las puestas de los reproductores que comieron la Dieta 3, mientras que se incrementó el porcentaje de eclosión de las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 3 desde el 91,83% al 97,71% (Tablas XVII y XVIII).

Tabla XVII.- Índices de las puestas de los reproductores de dorada, del Experimento II, alimentados previamente con la dieta comercial (media \pm desviación típica)

GRUPO	% HUEVOS VIVOS	% HUEVOS MUERTOS	% HUEVOS NO FECUNDADOS	% HUEVOS ANORMALES (MORFOLOGÍA)
	P = 0,88	P = 0,61	P = 0,97	P = 0,75
1 (n = 14)	75,14 \pm 13,31	20,40 \pm 13,13	3,62 \pm 5,49	0,83 \pm 0,83
2 (n = 13)	76,81 \pm 10,42	16,35 \pm 5,82	5,18 \pm 8,53	1,64 \pm 1,96
3 (n = 10)	80,82 \pm 9,09	13,28 \pm 6,66	3,34 \pm 4,86	2,54 \pm 4,55
4 (n = 14)	78,67 \pm 15,98	15,55 \pm 12,63	4,55 \pm 6,53	1,21 \pm 0,94
5 (n = 11)	76,38 \pm 18,62	17,53 \pm 12,23	4,22 \pm 8,15	1,84 \pm 3,26
	% HUEVOS ANORMALES (N° GOTAS)	% ECLOSIÓN	% LARVAS ANORMALES	% SUPERVIVENCIA LARVARIA
	P = 0,16	P = 0,12	P = 0,79	P = 0,83
1 (n = 14)	1,45 \pm 1,59	96,60 \pm 4,26	2,68 \pm 1,95	24,08 \pm 16,33
2 (n = 13)	1,67 \pm 0,90	96,09 \pm 6,12	2,43 \pm 2,64	24,33 \pm 17,89
3 (n = 10)	1,09 \pm 1,72	91,83 \pm 6,97	4,08 \pm 2,99	19,18 \pm 10,27
4 (n = 14)	1,18 \pm 0,50	95,21 \pm 5,42	3,85 \pm 5,49	24,93 \pm 16,69
5 (n = 11)	2,82 \pm 3,00	91,64 \pm 2,77	3,36 \pm 2,43	20,16 \pm 8,95

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Tabla XVIII.- Índices de las puestas de los reproductores, del Experimento II, alimentados con las dietas experimentales y con la dieta comercial (media \pm desviación típica)

DIETA	% HUEVOS VIVOS	% HUEVOS MUERTOS	% HUEVOS NO FECUNDADOS	% HUEVOS ANORMALES (MORFOLOGÍA)
	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,01
1 (n = 21)	78,23 \pm 9,30 ^b	12,06 \pm 5,72 ^{ab}	8,35 \pm 9,11 ^b	1,35 \pm 1,45 ^a
2 (n = 20)	82,97 \pm 8,13 ^{ab}	12,38 \pm 7,35 ^{ab}	1,93 \pm 2,57 ^a	2,71 \pm 1,68 ^{ab}
3 (n = 18)	78,41 \pm 6,08 ^b	13,81 \pm 7,50 ^{ab}	2,04 \pm 2,44 ^a	5,72 \pm 3,72 ^b
4 (n = 21)	87,94 \pm 4,67 ^a	9,02 \pm 4,08 ^a	0,98 \pm 1,21 ^a	2,05 \pm 1,45 ^a
5 (n = 23)	78,14 \pm 4,52 ^b	16,23 \pm 4,08 ^b	3,03 \pm 4,17 ^{ab}	2,59 \pm 2,28 ^{ab}
	% HUEVOS ANORMALES (Nº GOTAS)	% ECLOSIÓN	% LARVAS ANORMALES	% SUPERVIVENCIA LARVARIA
	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,05	P = 0,12
1 (n = 21)	4,80 \pm 6,26 ^b	93,10 \pm 4,93 ^{bc}	1,17 \pm 1,33 ^{ab}	23,54 \pm 17,13
2 (n = 20)	3,73 \pm 4,47 ^{ab}	99,00 \pm 1,52 ^a	0,60 \pm 0,61 ^a	17,04 \pm 9,42
3 (n = 18)	1,72 \pm 2,06 ^{ab}	97,71 \pm 2,91 ^{ab}	0,92 \pm 0,93 ^{ab}	24,07 \pm 11,78
4 (n = 21)	0,44 \pm 0,51 ^a	98,70 \pm 1,56 ^a	0,94 \pm 0,89 ^{ab}	28,11 \pm 12,73
5 (n = 23)	3,77 \pm 1,81 ^b	91,19 \pm 3,91 ^c	2,58 \pm 1,79 ^b	21,14 \pm 10,37

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Sin embargo los porcentajes de huevos no fecundados y anormales con más de una gota de grasa se incrementaron significativamente en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 (Tablas XVII y XVIII). Las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 5 (pienso comercial) no mostraron diferencias en los Índices de las puestas durante todo el periodo experimental indicando que las diferencias observadas en la calidad de las puestas entre los tratamientos están relacionadas con la calidad nutricional de las dietas más que con la duración del periodo de puesta.

El porcentaje de huevos vivos (Tabla XVIII) fue superior en las puestas de los reproductores alimentados con las dietas que contienen la fracción insoluble de los lípidos de la harina de calamar (Dietas 2 y 4), siendo significativamente diferentes en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 4 en relación a las de los reproductores alimentados con dietas basadas en la harina de pescado o con la dieta comercial.

El número de huevos con más de una gota lipídica fue más alto en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 y fue reduciéndose progresivamente en las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 2, 3 y 4 (Tabla XVIII). Se observó una relación inversa significativa entre el porcentaje de huevos con más de una gota de grasa y el contenido en n-3 HUFA de las dietas (Fig.17). El porcentaje de huevos no fecundados fue más alto en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 que contenía el nivel más bajo de n-3 HUFA, pero no se diferenció significativamente del porcentaje de las puestas de los reproductores alimentados con la dieta comercial. Se encontraron correlaciones negativas entre el porcentaje de huevos no fecundados y el nivel dietético del AA y del EPA (Fig.18). Además, se obtuvieron un número elevado de huevos morfológicamente anormales en las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 2 y 3, aunque no presentaron diferencias significativas con los producidos por los reproductores alimentados con la dieta comercial.



Por otra parte, se obtuvieron altos porcentajes de eclosión en las puestas de los reproductores alimentados con las dietas conteniendo cualquiera de las preparaciones de harina de calamar (Dietas 2 y 4), aunque no difirieron significativamente de los obtenidos con la Dieta 3, basada en harina de pescado desengrasada y aceite de calamar. Sin embargo, el tipo de harina incluida en las dietas experimentales no tuvo un efecto significativo en los porcentajes de larvas anormales ni en el de supervivencia larvaria (Tabla XVIII).

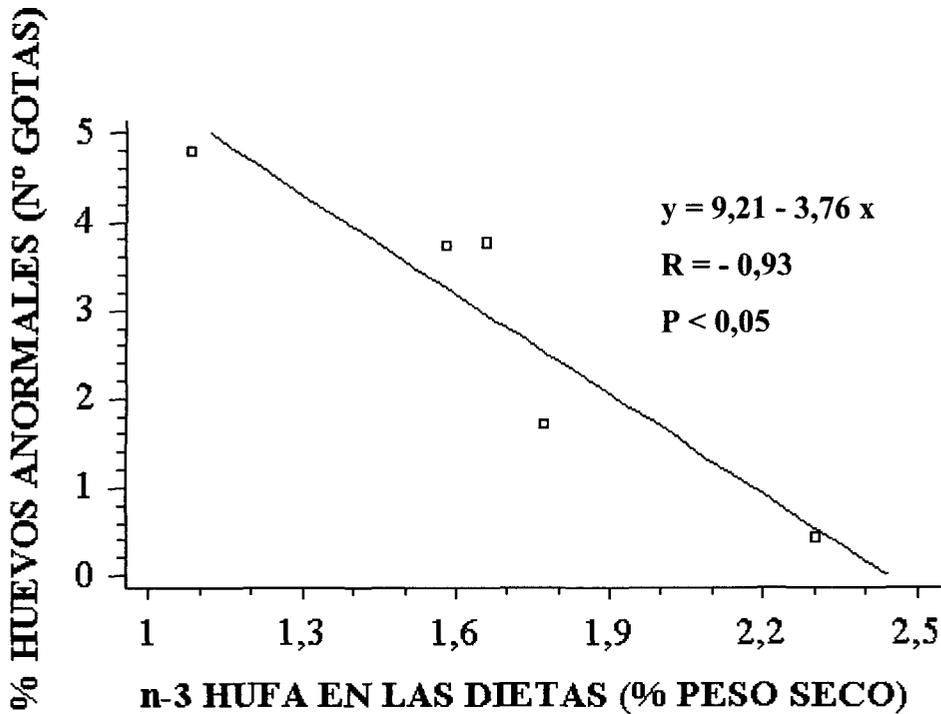


Fig. 17.- Relación entre el porcentaje de huevos anormales con más de una gota de grasa y el contenido en n-3 HUFA de las dietas del Experimento II.

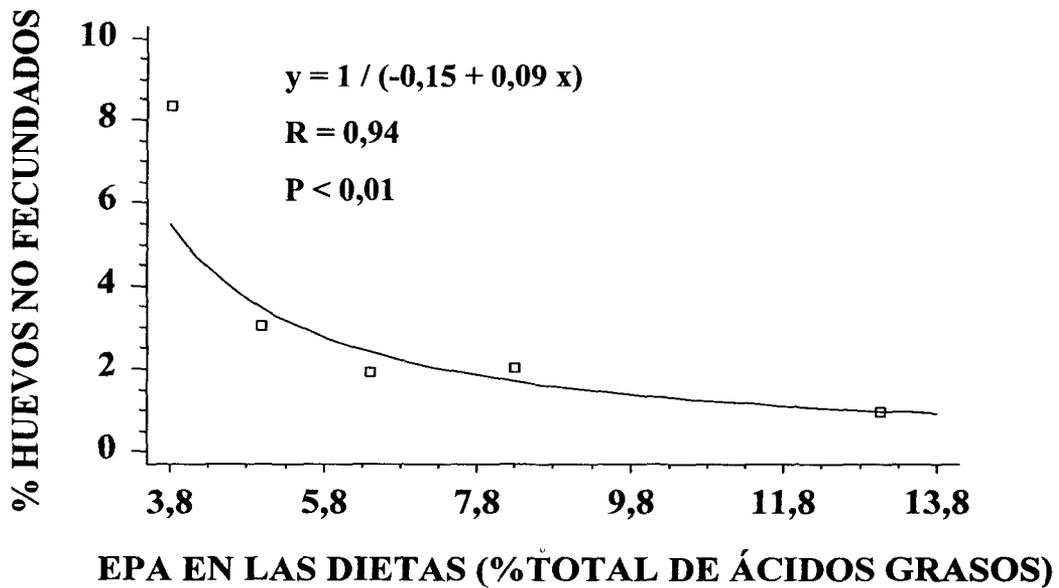
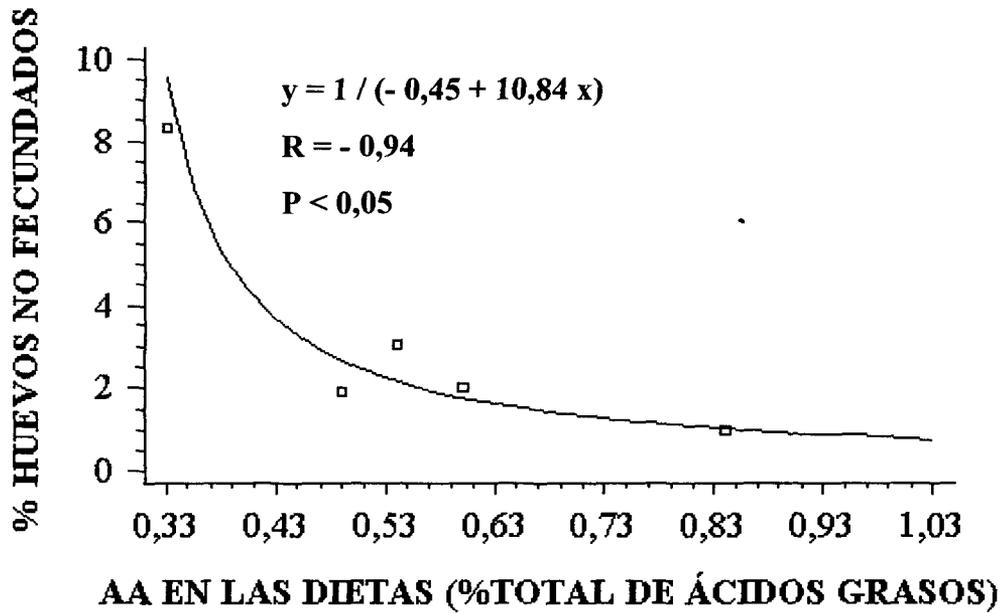
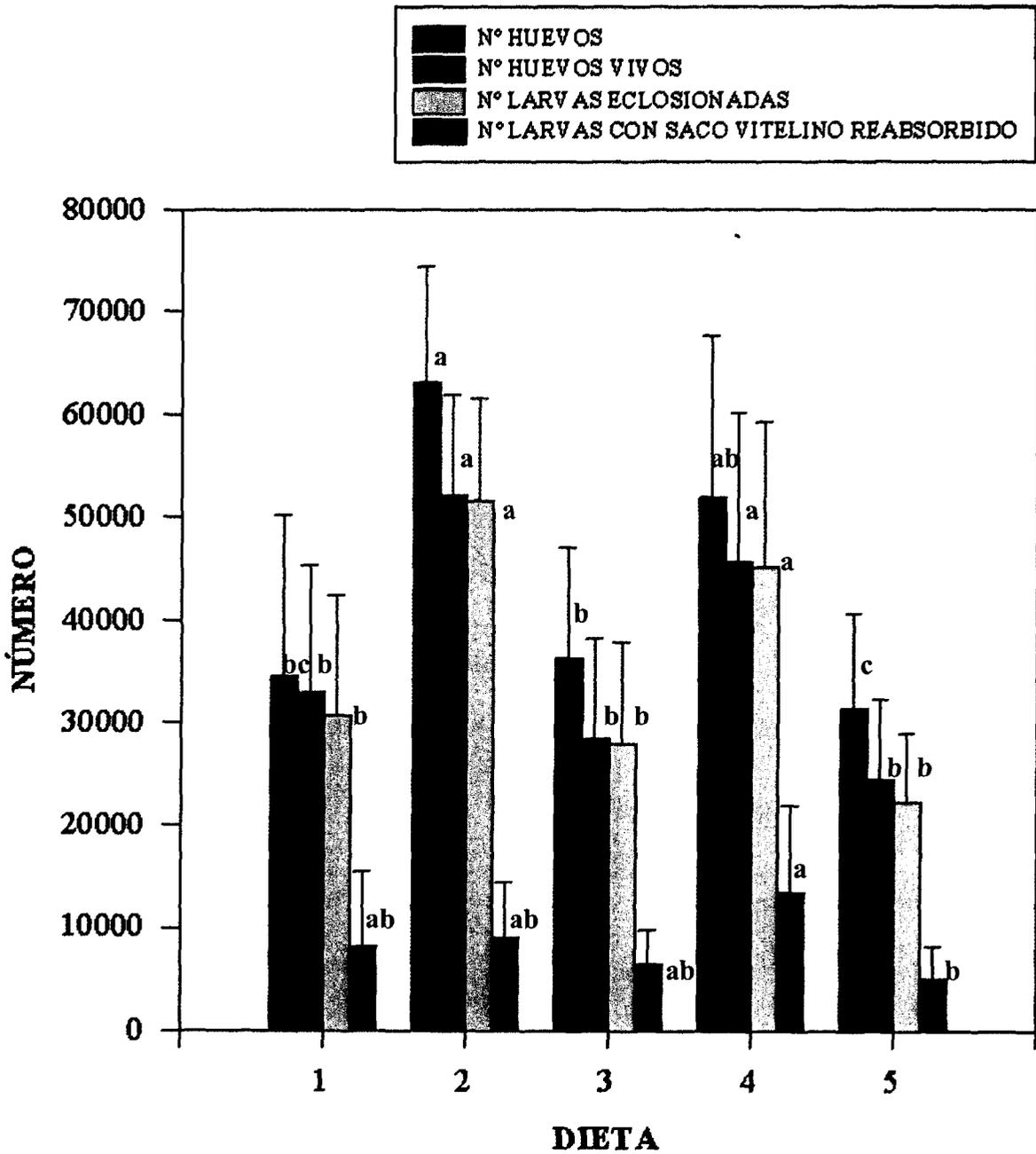


Fig. 18.- Relación entre el porcentaje de huevos no fecundados y el contenido en AA y EPA de las dietas del Experimento II.

La fecundidad relativa (producción de huevos por puesta y kg de hembra reproductora) se incrementó significativamente por la inclusión en las dietas de harina de calamar o harina de calamar desengrasada (Dietas 2 y 4) (Fig. 19). Este hecho, junto con los altos porcentajes de huevos vivos, eclosión y supervivencia larvaria resulta en la producción más alta, por puesta y kg de hembra reproductora, de larvas con el saco vitelino reabsorbido en los reproductores alimentados con una dieta basada en harina de calamar desengrasada y aceite de pescado (Dieta 4, Fig. 19). La producción de huevos vivos (por puesta y kg de hembra reproductora) de los reproductores alimentados con la Dieta 2 (basada en harina de calamar) fue significativamente mayor que la de los reproductores alimentados con la Dieta 3 (basada en harina de pescado desengrasada), la única diferencia, en la composición, entre las dos dietas fue la fracción lipídica insoluble.

Para aclarar los efectos de las fracciones lipídicas insolubles de las harinas de calamar y pescado se compararon las medias de los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con la Dietas 1 y 3 (basadas en harina de pescado, desengrasada y sin desengrasar) con las medias de los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con la Dietas 2 y 4 (basadas en harina de calamar, desengrasada y sin desengrasar) (Tabla XIX). Se observó que los porcentajes de huevos vivos, huevos fecundados y eclosión fueron significativamente mayores en las puestas de los reproductores alimentados con las dietas que contenían la fracción proteica de la harina de calamar. La Tabla XX muestra los resultados de la comparación de las medias de los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con fracción lipídica de la harina de pescado (Dietas 1 y 4) con las medias de los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con la fracción lipídica de la harina de calamar (Dietas 2 y 3). Se observó que los reproductores alimentados con dietas conteniendo lípidos de calamar tienen puestas con unos porcentajes de huevos fecundados y de eclosión significativamente mayores, pero sin embargo producen puestas con un alto porcentaje de huevos anormales.



*Barras, del mismo color, sin o con una misma letra no presentan diferencias significativas. Barras, del mismo color, con diferentes letras presentan diferencias significativas.

Fig. 19.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada, del Experimento II, alimentados con las dietas experimentales y con la dieta comercial.

Tabla XIX.- Comparación mediante el test de la t de Student de los Índices de las puestas de reproductores de dorada alimentadas con dietas conteniendo distintas fuentes de proteína (media \pm desviación típica)

	PROTEÍNA DE PESCADO	PROTEÍNA DE CALAMAR	t	P
% HUEVOS VIVOS	78,31 \pm 7,87	85,52 \pm 6,97	4,33	P < 0,01
% HUEVOS MUERTOS	12,87 \pm 6,57	10,66 \pm 6,07	1,56	P = 0,12
% HUEVOS NO FECUNDADOS	5,44 \pm 7,51	1,44 \pm 2,02	3,28	P < 0,01
% HUEVOS ANORMALES (morfología)	3,37 \pm 3,49	2,37 \pm 1,58	1,65	P = 0,10
% HUEVOS ANORMALES (nº gotas grasa)	3,38 \pm 4,99	2,05 \pm 3,52	1,38	P = 0,17
% ECLOSIÓN	95,27 \pm 4,67	98,84 \pm 1,52	4,4	P < 0,01
% LARVAS ANORMALES	3,38 \pm 1,15	2,37 \pm 0,77	1,65	P = 0,23
% SUPERVIVENCIA LARVARIA	23,80 \pm 23,80	22,72 \pm 12,42	0,34	P = 0,73

Tabla XX.- Comparación mediante el test de la t de Student de los Índices las puestas de reproductores de dorada alimentadas con dietas conteniendo distintas fuentes de lípidos (media \pm desviación típica)

	ACEITE DE PESCADO	ACEITE DE CALAMAR	t	P
% HUEVOS VIVOS	83,09 \pm 8,77	80,81 \pm 7,50	1,24	P = 0,21
% HUEVOS MUERTOS	10,54 \pm 5,14	13,06 \pm 7,35	1,79	P < 0,1
% HUEVOS NO FECUNDADOS	4,66 \pm 7,42	1,98 \pm 2,47	2,12	P < 0,05
% HUEVOS ANORMALES (morfología)	1,70 \pm 1,48	4,14 \pm 3,18	4,46	P < 0,01
% HUEVOS ANORMALES (nº gotas grasa)	2,62 \pm 4,90	2,77 \pm 3,64	0,16	P = 0,17
% ECLOSIÓN	95,97 \pm 4,55	98,39 \pm 2,33	2,77	P < 0,01
% LARVAS ANORMALES	1,06 \pm 1,11	0,75 \pm 0,77	1,33	P = 0,19
% SUPERVIVENCIA LARVARIA	25,88 \pm 14,99	20,46 \pm 11,06	1,73	P < 0,1

El diámetro de los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con la Dietas 1 y 5 fue significativamente mayor que el de los huevos de los reproductores alimentados con las otras tres dietas y el diámetro de los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 2 fue significativamente menor que el de los huevos de los reproductores alimentados con el resto de las dietas (Tabla XXI). El diámetro de la gota de grasa fue mayor en los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 1 y 5, existiendo diferencias significativas entre todos los diámetros de las gotas de grasa, excepto en los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 2 y 4 que no mostraron diferencias significativas entre ellos. No se encontró ninguna relación entre los diámetros de los huevos y de las gotas de grasa. La longitud de las larvas de 1 día de los reproductores alimentados con las Dietas 3 y 4 fue la mayor aunque que solo difirieron significativamente de las larvas de los reproductores alimentados con la Dieta 2. La longitud de las larvas con el saco vitelino reabsorbido fue mayor en las larvas de los reproductores alimentados con de las Dietas 1 y 3 que difirieron significativamente de las larvas producidas por los reproductores alimentados con las Dietas 2 y 5.

Tabla XXI- Medidas de los huevos y larvas producidos por los reproductores, del Experimento II

DIETA	DIÁMETRO HUEVO (mm) P < 0,01	DIÁMETRO GOTA DE GRASA (mm) P < 0,01	LONGITUD LARVAS 1 DÍA (mm) P < 0,05	LONGITUD LARVAS 3 DIAS (mm) P < 0,05
1	0,992±0,028 ^a (n = 225)	0,242±0,0045 ^a (n = 225)	2,73±0,134 ^{ab} (n = 70)	3,69±0,15 ^b (n = 59)
2	0,959±0,018 ^b (n = 175)	0,229±0,0095 ^b (n = 175)	2,68±0,139 ^a (n = 60)	3,59±0,20 ^a (n = 58)
3	0,970±0,023 ^c (n = 200)	0,223±0,0134 ^c (n = 200)	2,76±0,120 ^b (n = 70)	3,68±0,16 ^b (n = 71)
4	0,973±0,024 ^c (n = 200)	0,229±0,0076 ^b (n = 200)	2,76±0,163 ^b (n = 70)	3,67±0,15 ^{ab} (n = 64)
5	0,991±0,028 ^a (n = 200)	0,232±0,0072 ^a (n = 200)	2,74±0,154 ^{ab} (n = 50)	3,60±0,15 ^a (n = 70)

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Composición bioquímica de los huevos

Los ácidos grasos presentes en mayor proporción en los lípidos de los huevos de las puestas de los reproductores de dorada fueron: ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1n-9), ácido palmitoleico (16:1 n-7) y ácido docosahexaenoico (22:6 n-3) (Tablas XXIII y XXIV), independientemente de los ácidos grasos contenidos en las dietas (Tabla XV). Estos fueron seguidos en importancia por el ácido eicosapentaenoico (22:5 n-3) y por el ácido esteárico (18:0), excepto en los huevos procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con la dieta comercial (Dieta 5) que fueron el ácido mirístico (14:0) y el ácido linoléico (18:2 n-6) o de las puestas de los reproductores alimentados con dietas con lípidos originarios de la harina de pescado (Dietas 1 y 4) que se caracterizaron por un más alto contenido en EPA y un más bajo contenido en DHA. Además, los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con dietas con lípidos originarios de la harina de calamar (Dietas 2 y 3) mostraban unas bajas relaciones EPA/DHA (0,29 y 0,32 respectivamente), independientemente de los niveles de la relación EPA/DHA en las dietas.

Los huevos procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con la dieta comercial (Dieta 5) se caracterizaron por tener los contenidos en DHA más bajos y los de ácidos grasos de la serie n-6 más altos. Los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 3 (basada en harina de pescado desengrasada y aceite de calamar) mostraron el nivel más bajo de ácidos grasos monoinsaturados que se diferenciaron significativamente de los procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 4 (basada en harina de calamar desengrasada y aceite de pescado). Los huevos procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con las dietas basadas en harina de calamar o de calamar desengrasada (Dietas 2 y 4) muestran un contenido en ácidos grasos de la serie n-9 significativamente más alto que los huevos procedentes de las puestas de los reproductores

alimentados con la dieta comercial (Dieta 5). Se encontró una relación positiva significativa entre el contenido en ácidos grasos de la serie n-9 de los huevos y los porcentajes de huevos vivos y de eclosión (Fig. 20). Así mismo, se encontró una correlación positiva entre el contenido en AA de los huevos y el diámetro de los mismos (Fig. 21). También se observó una correlación positiva entre el contenido en EPA en los huevos y el diámetro de las gotas de grasa (Fig. 22).

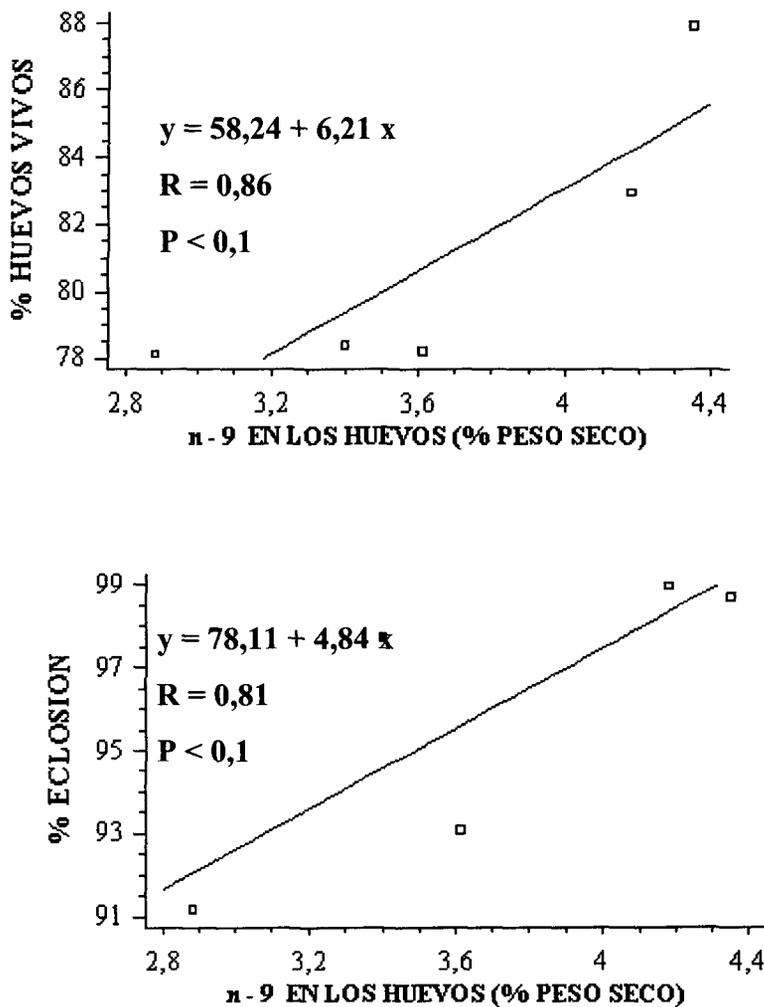


Fig. 20.- Relación entre los porcentajes de huevos vivos y de eclosión y el contenido en ácidos grasos de la serie n-9 de los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las dietas del Experimento II.

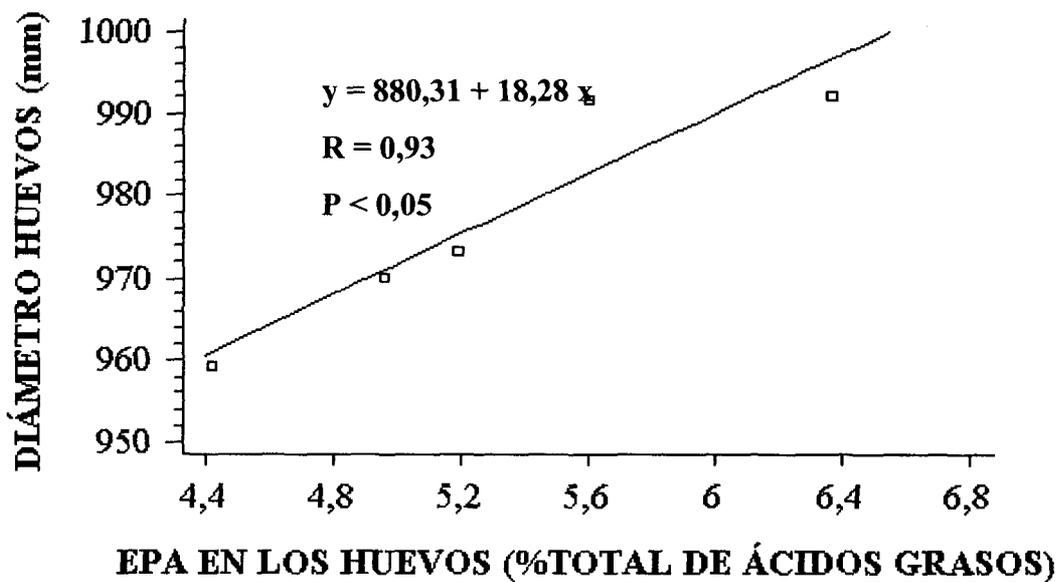
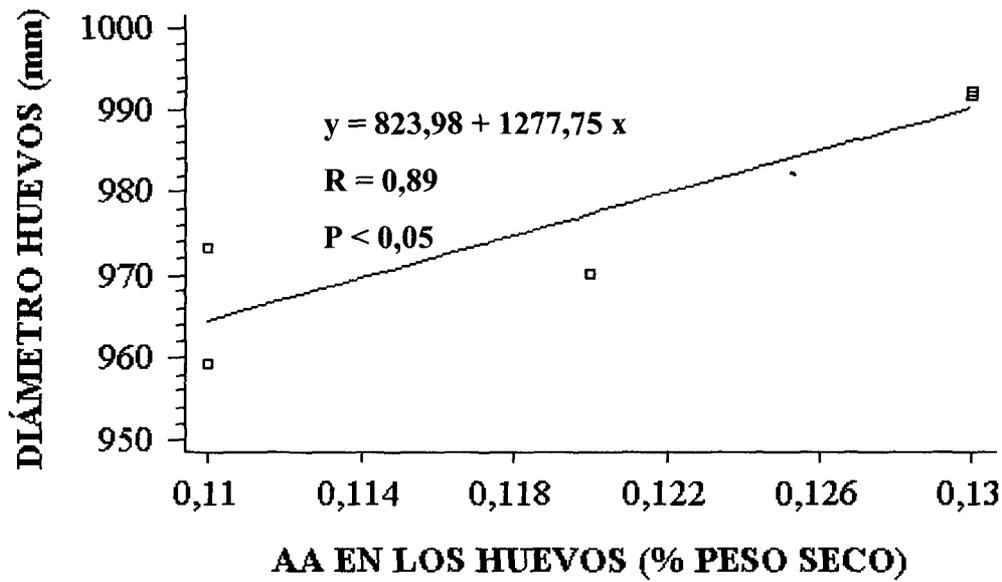


Fig. 21.- Relación entre el contenido en AA y EPA de los huevos y el diámetro de los mismos en el Experimento II.

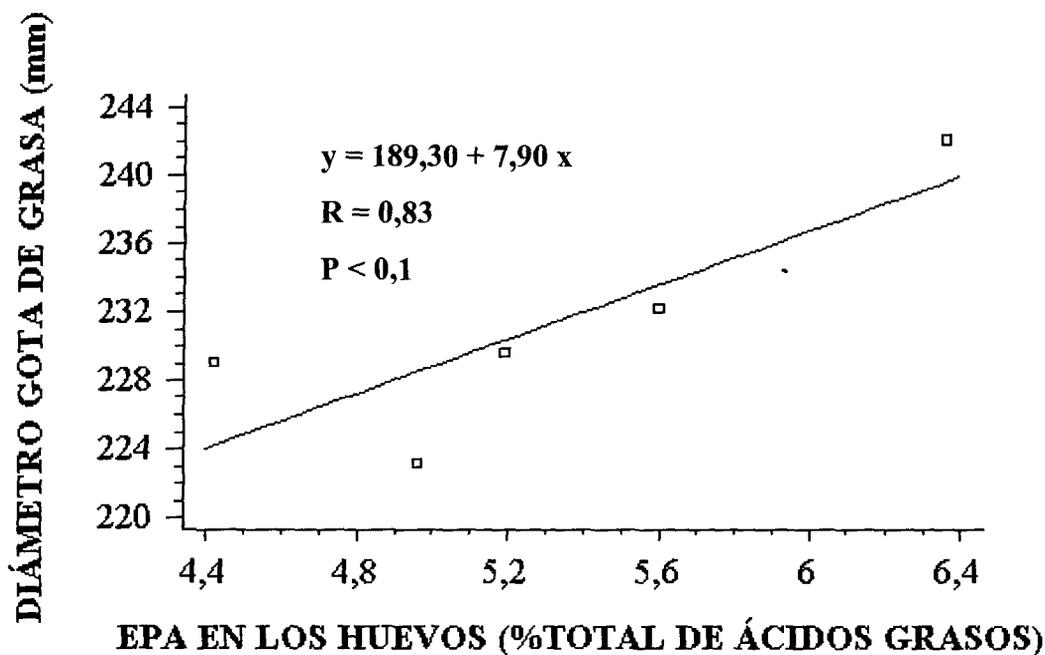


Fig. 22.- Relación entre el EPA contenido en de los huevos y el diámetro de las gotas de grasa en el Experimento II.

El contenido en proteínas de los huevos de las puestas procedentes de los reproductores alimentados con las dietas basadas en harina de calamar o de calamar desengrasada (Dietas 2 y 4) fue ligeramente superior que el de los otros grupos pero no existieron diferencias significativas entre ellos (Tabla XXII).

Tabla XXII.- Lípidos, proteína y humedad de los huevos de las puestas de reproductores de dorada alimentados con diferentes dietas en el Experimento II (media \pm desviación típica)

	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5
Lípidos	22,61 \pm 1,63	21,77 \pm 2,91	22,05 \pm 1,37	21,83 \pm 1,83	22,80 \pm 1,22
Proteína	64,35 \pm 4,63	67,20 \pm 2,40	65,37 \pm 1,22	66,34 \pm 0,43	65,15 \pm 2,03
Humedad	91,93 \pm 0,22	91,18 \pm 1,21	91,77 \pm 0,39	91,59 \pm 0,67	92,03 \pm 0,22

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Tabla XXIII.- Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos de reproductores alimentados con diferentes dietas en el Experimento II (media ± desviación típica)

ÁCIDOS GRASOS	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5
12: 0	---	0,07±0,10	0,07±0,07	---	0,15±0,03
14: 0	4,89±0,16	4,05±0,21	3,62±0,02	4,43±0,61	6,42±0,27
14: 1	0,34±0,12	0,49±0,08	0,42±0,02	0,35±0,06	0,38±0,04
15: 0	0,47±0,04	0,60±0,07	0,60±0,04	0,48±0,04	0,60±0,03
16: 0	21,81±0,72	23,78±0,30	23,98±1,31	21,26±0,67	21,01±0,84
16: 1n-7	8,89±0,48	7,17±0,50	7,11±0,50	8,97±0,01	10,52±0,69
16: 1n-5	0,25±0,04	0,15±0,11	---	---	0,36±0,04
16: 2	0,79±0,07	0,73±0,05	0,63±0,02	0,62±0,17	0,77±0,07
17: 0	0,43±0,03	0,49±0,03	0,52±0,02	0,45±0,03	0,42±0,01
17: 1	1,05±0,09	0,84±0,12	0,51±0,38	0,99±0,16	0,77±0,05
16: 4n-3	0,30±0,06	---	0,10±0,10	0,17±0,03	0,20±0,02
18: 0	5,66±0,44	5,12±0,41	5,51±0,09	6,15±0,67	3,93±0,39
18: 1n-9	19,77±0,58	24,27±1,94	20,00±0,37	24,85±0,39	16,35±0,43
18: 1n-7	2,76±0,08	---	2,04±0,07	---	2,62±0,11
18: 2n-9	0,38±0,07	0,10±0,07	0,18±0,02	0,38±0,14	0,24±0,05
18: 2n-6	4,43±0,24	4,28±0,19	3,63±0,16	4,19±0,14	5,77±0,38
18: 3n-9	0,38±0,08	0,18±0,14	0,21±0,01	0,31±0,04	0,22±0,04
18: 3n-6	0,24±0,04	0,10±0,07	---	0,22±0,05	0,24±0,04
18: 3n-3	0,60±0,06	0,59±0,03	0,48±0,05	0,61±0,04	1,18±0,10
18: 4n-3	1,08±0,14	0,33±0,09	0,38±0,16	0,87±0,04	1,79±0,10
18: 4n-1	0,21±0,02	---	---	0,16±0,01	0,13±0,01
20: 1n-7	0,58±0,09	0,82±0,04	0,99±0,29	0,65±0,03	1,44±0,13
20: 2n-9	0,04±0,06	---	---	---	0,02±0,03
20: 2n-6	---	0,09±0,06	0,14±0,01	0,14±0,01	0,19±0,00
20: 4n-6	0,77±0,03	0,62±0,09	0,75±0,03	0,66±0,05	0,74±0,03
20: 3n-3	---	0,18±0,01	0,16±0,00	---	0,07±0,05
20: 4n-3	0,60±0,04	0,31±0,04	0,27±0,05	0,55±0,05	0,82±0,07
20:5 n-3	6,36±0,47	4,42±0,80	4,86±0,66	5,19±0,28	5,60±0,16
22: 1n-11	0,05±0,07	0,09±0,07	0,41±0,26	0,08±0,12	0,42±0,05
22: 1n-9	0,05±0,07	---	0,07±0,07	0,07±0,10	0,03±0,04
22: 3 n-6	0,29±0,01	0,08±0,06	0,15±0,01	0,23±0,02	0,25±0,02
22: 4n-9	0,12±0,09	---	0,12±0,12	0,07±0,09	---
22: 5n-6	0,11±0,08	0,12±0,09	0,22±0,01	0,16±0,03	0,10±0,08
22: 5n-3	1,93±0,16	1,13±0,04	1,13±0,08	1,62±0,019	1,29±0,06
22: 6 n-3	11,61±0,08 ^{ab}	15,03±1,52 ^{ac}	16,52±0,15 ^c	11,77±1,82 ^{ab}	10,70±1,29 ^b
Saturados	35,45±0,46	34,33±0,42	34,51±1,42	32,98±1,23	32,79±1,17
Monoinsaturados	33,74±0,23 ^{ab}	33,82±2,35 ^{ab}	31,55±0,59 ^a	35,96±0,39 ^b	32,89±0,86 ^{ab}
n-3	22,40±0,43	21,99±2,31	23,89±1,24	20,78±2,09	21,64±1,16
n-6	5,88±0,24 ^a	5,40±0,23 ^a	5,34±0,53 ^a	5,73±0,25 ^a	7,50±0,21 ^b
n-9	20,74±0,74 ^a	24,54±2,13 ^a	20,58±0,40 ^{ab}	25,68±0,32 ^a	16,87±0,52 ^b
n-3 HUFA	20,41±0,47	21,07±2,32	22,93±0,94	19,13±2,14	18,47±1,33
EPA / DHA	0,55±0,05	0,29±0,03	0,32±0,04	0,45±0,07	0,53±0,08

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Tabla XXIV.- Composición en ácidos grasos (% peso seco) de los huevos de reproductores de dorada alimentados con diferentes dietas en el Experimento II (media ± desviación típica)

ÁcidoS GRASOS	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5
12: 0	---	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	---	0,02 ± 0,00
14: 0	0,85 ± 0,09	0,70 ± 0,12	0,60 ± 0,03	0,76 ± 0,20	1,07 ± 0,00
14: 1	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,00
15: 0	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,00
16: 0	3,81 ± 0,43	4,06 ± 0,50	3,96 ± 0,02	3,61 ± 0,57	3,84 ± 0,00
16: 1n-7	1,56 ± 0,21	1,23 ± 0,20	1,17 ± 0,02	1,52 ± 0,21	1,72 ± 0,00
16: 1n-5	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,02	---	---	0,06 ± 0,00
16: 2	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,00
17: 0	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02
17: 1	0,18 ± 0,00	0,14 ± 0,03	0,08 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,12 ± 0,00
16: 4-n-3	0,05 ± 0,01	---	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00
18: 0	0,98 ± 0,04	0,87 ± 0,12	0,91 ± 0,03	1,04 ± 0,17	0,78 ± 0,00
18: 1n-9	3,44 ± 0,25	4,13 ± 0,55	3,31 ± 0,11	4,20 ± 0,56	2,82 ± 0,00
18: 1n-7	0,48 ± 0,03	---	0,34 ± 0,03	---	0,43 ± 0,00
18: 2n-9	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,00
18: 2n-6	0,78 ± 0,10	0,73 ± 0,11	0,60 ± 0,05	0,71 ± 0,11	0,91 ± 0,00
18: 3n-9	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00
18: 3n-6	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,01	---	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00
18: 3n-3	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,18 ± 0,00
18: 4n-3	0,19 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,29 ± 0,00
18: 4n-1	0,04 ± 0,00	---	---	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
20: 1n-7	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,22 ± 0,00
20: 2n-9	0,01 ± 0,01	---	---	---	---
20: 2n-6	---	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
20: 4n-6	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,00
20: 3n-3	---	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	---	0,02 ± 0,00
20: 4n-3	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,00
20: 5 n-3	1,10 ± 0,02	0,76 ± 0,19	0,81 ± 0,15	0,87 ± 0,10	0,94 ± 0,00
22: 1n-11	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,05	0,01 ± 0,02	0,06 ± 0,00
22: 1n-9	0,01 ± 0,01	---	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	---
22: 3 n-6	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
22: 4n-9	0,02 ± 0,01	---	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,02	---
22: 5n-6	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	---
22: 5n-3	0,32 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,23 ± 0,00
22: 6 n-3	2,02 ± 0,16	2,58 ± 0,49	2,73 ± 0,16	1,95 ± 0,05	2,14 ± 0,00
Saturados	5,83 ± 0,54	5,87 ± 0,75	5,70 ± 0,05	5,60 ± 0,91	5,93 ± 0,00
Monoinsaturados	5,88 ± 0,49	5,77 ± 0,77	5,22 ± 0,17	6,09 ± 0,85	5,50 ± 0,00
n-3	3,90 ± 0,23	3,78 ± 0,72	3,96 ± 0,41	3,47 ± 0,17	3,96 ± 0,00
n-6	1,03 ± 0,12	0,92 ± 0,14	0,89 ± 0,13	0,97 ± 0,14	1,18 ± 0,00
n-9	3,61 ± 0,21	4,18 ± 0,56	3,40 ± 0,11	4,35 ± 0,62	2,88 ± 0,00
n-3 HUFA	3,55 ± 0,20	3,62 ± 0,70	3,60 ± 0,35	3,19 ± 0,12	3,46 ± 0,00

Con respecto a la digestibilidad de las dietas, la media del coeficiente aparente de digestibilidad de la proteína de las dietas basadas en harina de calamar ($96,5 \pm 0,43\%$) fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que la de las dietas basadas en harina de pescado ($88,3 \pm 0,26\%$).

3.2.4.- DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron una mejora en la calidad de las puestas, en términos de fecundidad relativa (número de huevos por kg de hembra reproductora y puesta), y porcentajes de huevos vivos y huevos fecundados, cuando los reproductores fueron alimentados con la fracción proteica de la harina de calamar (Dietas 2 y 4). La proteína contenida en los huevos de los reproductores alimentados con la fracción proteica de la harina de calamar fue ligeramente mayor que la contenida en los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con la fracción proteica de la harina de pescado (Dietas 1 y 3), aunque no mostraron diferencias significativas.

La proteína de calamar es el mayor componente de la fracción no liposoluble de la harina de calamar y podría ser la responsable del efecto positivo de esta fracción en la calidad de las puestas de los reproductores alimentados con ella. La calidad de la fuente de proteína depende tanto de su perfil de aminoácidos como de su coeficiente de digestibilidad para cada especie. El perfil de aminoácidos (calculado según Tacon, 1990) fue muy similar entre las dietas experimentales (Tabla XLIII), excepto en el más alto contenido en isoleucina de las dietas basadas en harina de pescado ($3,64 \text{ g} / 100 \text{ g}$ y $3,71 \text{ g} / 100 \text{ g}$ en las Dietas 1 y 3, respectivamente) que en las dietas basadas en harina de calamar ($2,08 \text{ g} / 100 \text{ g}$ y $2,07 \text{ g} / 100 \text{ g}$ en las Dietas 2 y 4, respectivamente).

El perfil de aminoácidos de todas las dietas experimentales cumple los requerimientos de

aminoácidos esenciales calculados para la dorada (*Sparus aurata*) en base a la composición corporal de la misma calculada por Vergara (1992), según Tacon y Cowey (1985) (Tabla XXV). De este modo, el valor nutricional superior de las dietas basadas en la harina de calamar para mejorar la calidad de las puestas de dorada podría estar relacionado con el mayor coeficiente de digestibilidad de esta proteína para esta especie. De hecho, los reproductores de dorada alimentados con la fracción proteica de la harina de calamar (Dietas 2 y 4), con un nivel de proteína en los huevos ligeramente mayor que el de los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con la fracción proteica de la harina de pescado (Dietas 1 y 3), produjeron aproximadamente un 40% más de huevos por kilogramo de hembra.

Tabla XXV.- Requerimientos calculados de aminoácidos para dorada (*Sparus aurata*) y perfiles teóricos de aminoácidos de las dietas experimentales del Experimento II (en g por 100 g de peso seco)

AMINOÁCIDO	REQUERIMIENTO*	DIETA			
		1	2	3	4
ARGININA	2,39	3,17	3,23	3,72	3,69
HISTIDINA	1	1,84	1,87	1,16	1,15
ISOLEUCINA	2,07	3,64	3,71	2,08	2,07
LEUCINA	2,89	4,66	4,74	4,09	4,06
LISINA	3,02	4,95	4,94	4,11	4,08
METIONINA	1,1	1,62	1,65	1,68	1,67
FENILALANINA	1,39	2,52	2,57	1,89	1,87
TREONINA	2,03	3,23	3,29	2,47	2,45
VALINA	1,5	3	3,06	2,06	2,05
CISTINA	0,38	0,81	0,83	0,49	0,49
TIROSINA	1,18	1,97	2,01	1,91	1,9

*Requerimientos de aminoácidos esenciales calculados para la dorada (*Sparus aurata*) en base a la composición corporal de la misma, Vergara (1992).

Las proteínas son el componente más abundante de los nutrientes contenidos en los huevos de muchas de especies de peces estudiadas (Watanabe y Kiron, 1994). Además son el mayor sustrato de energía en muchas especies de teleósteos durante el desarrollo embrionario (Fynh y Serigstad, 1987; Rønnestad *et al.*, 1992; Sivaloganathan *et al.*, 1998). Las proteínas tienen un papel particularmente importante en la fecundación y normal desarrollo del embrión (Fynh y Serigstad, 1987; Srivastava y Brown, 1992; Srivastava *et al.*, 1995). Por ejemplo, las proteínas que envuelven el vitelo desempeñan un papel muy importante durante la fecundación (Hart, 1990). La composición en aminoácidos de las proteínas que envuelven el vitelo en los huevos de la dorada está caracterizada por un alto contenido en prolina y en ácido glutámico y un relativamente bajo contenido en cistina (Hyllner *et al.*, 1995). La vitelogenina es la principal proteína precursora de vitelo en los teleósteos. Su composición en aminoácidos se caracteriza por altos contenidos en alanina, ácido glutámico y leucina y bajos contenidos en serina. Los aminoácidos libres también aparecen en altas cantidades en los huevos de peces pelágicos, contabilizándose por encima de 43 nmol por huevo en dorada (Rønnestad, 1992). La leucina, lisina, valina, isoleucina, alanina y serina son los principales aminoácidos detectados (Rønnestad, 1992). Los aminoácidos libres removidos del "pool" durante la fase de huevo son usados principalmente para síntesis de proteínas o producción de energía.

El alto contenido en calcio de las harinas de pescado no parece ser el responsable de la menor calidad de las puestas de los reproductores alimentados con dietas basadas en esta harina en comparación con las puestas de los reproductores alimentados con dietas basadas en harina de calamar, una adición de calcio a una dieta basada en harina de calamar no afectó la calidad de la puesta de otro espárido, el pargo japonés (*Pagrus major*) (Watanabe *et al.*, 1991b). Un incremento en la producción de huevos y en la viabilidad fue también observada por Watanabe *et al.* (1984a) cuando el pargo japonés fue alimentado con una dieta basada en harina de calamar. Además, el reemplazo del 50% de la harina de

pescado por harina de calamar en dietas para el pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984a,b) mejoró la viabilidad del huevo, aunque no hizo que se incrementara el número de huevos producido por hembra. De una manera similar, la sustitución del 50% de la harina de pescado por harina de calamar en dietas para el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*) mejoró los porcentajes de huevos fecundados y eclosión aunque tampoco incrementó el número de huevos producidos por hembra (Vassallo-Agius *et al.*, 2001b). El reemplazo de proteína o de lípidos de la harina de calamar por proteína o lípidos de harina de soja en las dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) causó una reducción en los porcentajes de eclosión y supervivencia larvaria (Zohar *et al.*, 1995). Esto pudo ser debido tanto a un efecto beneficioso de la harina de calamar como a un efecto perjudicial de la harina de soja.

Aunque se ha demostrado (Robaina *et al.*, 1995) que la proteína de la soja es una interesante fuente de proteína como sustitutivo parcial, de la harina de pescado, en las dietas para dorada, hay algunos factores que pueden limitar su uso en las dietas para esta especie. Una composición desequilibrada en ácidos grasos en términos de un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6, y bajos contenidos en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, junto con una menor disponibilidad del fósforo (Robaina, 1995) en dietas para reproductores basadas en harina de soja, podrían reducir directamente la calidad de las puestas ya que ambos nutrientes son esenciales para la reproducción en los espáridos (Watanabe *et al.*, 1984a; Watanabe y Kiron, 1995). Aunque ambos, el fósforo y los ácidos grasos esenciales deben corregirse en las dietas comerciales, este no suele ser el caso para las dietas de dorada. Los niveles de ácido linoleico (18:2n -6) en las dietas comerciales son tan altos como 9,8 (% total de ácidos grasos) (Bell *et al.*, 1996) o 13,96 (% total de ácidos grasos) en el presente experimento (Tabla XLII).

Watanabe *et al.* (1984a,b) encuentran una reducción, en las puestas, del porcentaje de huevos

anormales cuando la harina de pescado se reemplazó por harina de calamar en las dietas para reproductores del pargo japonés (*Pagrus major*). Este efecto no se observó en el presente experimento cuando la harina de pescado se reemplazó por harina de calamar en las dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*). El porcentaje de huevos anormales fue muy bajo en las puestas de todos los tratamientos.

El contenido en n-3 HUFA de la Dieta 1 (1,08% en peso seco) puede ser insuficiente para cubrir el requisito dietético de los reproductores de dorada, que está aproximadamente sobre 1,60% n-3 HUFA en peso seco (ver Experimento I). De este modo, los altos porcentajes de huevos no fecundados obtenidos en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 están probablemente relacionados con los bajos contenidos en n-3 HUFA en general y del ácido eicosapentaenoico (EPA) (0,5% en peso seco) en particular (Tabla XLIII). Este efecto no puede relacionarse con la proteína dietética o la fuente lipídica ya que no se observó en las Dietas 3 o 4 que contuvieron, respectivamente, la misma proteína o fuente lipídica que la Dieta 1, pero con superiores niveles de n-3 HUFA. Como se observó en el Experimento I, los niveles dietéticos bajos de EPA, uno de precursores de las prostaglandinas en peces (Henderson *et al.*, 1985), están relacionados con una reducción en la tasa de fecundación de los huevos. De hecho, los reproductores alimentados con la dieta comercial que tenía también bajos niveles de EPA (0,63% en peso seco), dieron lugar a una alta proporción de huevos no fecundados (3,03%).

El alto porcentaje de huevos con más de una gota lipídica en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 también parece estar relacionado con el bajo contenido en n-3 HUFA de esta dieta, existiendo una correlación negativa significativa entre este parámetro y el contenido en n-3 HUFA de las dietas. La alimentación del pargo japonés (*Pagrus major*) con una dieta deficiente en ácidos

grasos esenciales produjo un aumento en el número de gotas de grasa en los huevos (Watanabe *et al.*, 1984a).

Una acumulación de ácidos grasos de la serie n -9 se observó en los lípidos de los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con dietas basadas en harina de calamar o harina de calamar desengrasada (Dietas 2 y 4), encontrándose correlaciones positivas entre los ácidos grasos de la serie n -9 contenidos en los huevos y los porcentajes de huevos vivos y eclosión. El ácido oleico (18: 1 n -9) es un ácido graso abundante en los lípidos totales y en los lípidos polares de los peces marinos (Izquierdo, 1996) lo que hace pensar en la importancia de este ácido graso para el desarrollo normal del embrión y de la larva. Este ácido graso también se ha considerado como una importante fuente de energía durante el desarrollo larvario de los peces marinos (Van der Meeren *et al.*, 1991).

Los dos harinas, de pescado y de calamar, parecen ser buenas fuentes de lípidos para dietas de reproductores de dorada, con un alto contenido en ácidos grasos esenciales dado que no existieron diferencias significativas en los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 2 y 4, que contenían la misma fuente proteica pero diferían en la fuente lipídica.

En cuanto a las Producciones relativas ya se ha indicado que los peces alimentados con las Dietas 2 y 4 produjeron aproximadamente un 40% más de huevos por kg de hembra, este hecho, unido a los más altos porcentajes de huevos vivos y de huevos fecundados, tiene como consecuencia que los reproductores alimentados con estas dietas basadas en harina de calamar tengan las producciones más altas en larvas con el saco vitelino reabsorbido, aún a pesar de que el porcentaje de supervivencia larvaria de la Dieta 2 sea el más bajo de todos. Resultados similares son obtenidos por Domarco (2001) para esta misma especie utilizando dietas basadas en calamar fresco.

En referencia a las Medidas de huevos y larvas no encontramos ninguna relación entre estas y el resto de los Parámetros de Calidad de las puestas tal como sucedió en el Experimento I. Asimismo, no encontramos correlación entre el tamaño de los huevos y el de las larvas, aunque los huevos de mayor tamaño (Dieta 1) produjeron las larvas con el saco vitelino reabsorbido mayores y los de menor diámetro (Dieta 2) dieron las larvas de menor tamaño. A pesar de que no encontramos ninguna correlación entre el tamaño del huevo y la fecundidad los reproductores alimentados con la Dieta 2, que produjeron los huevos con el menor diámetro, produjeron el máximo número de huevos. Los huevos de menor diámetro fueron producidos por los reproductores alimentados con dietas basadas en calamar, Watanabe *et al.* (1984c) encuentran que los huevos de reproductores de pargo japonés alimentados con una dieta basada en calamar muestran menores diámetros que los huevos de reproductores alimentados con dietas basadas en harina de pescado.

Similares correlaciones a las encontradas entre el contenido en las dietas y huevos de determinados ácidos grasos y de proteínas en los huevos con el diámetro de los huevos y gota de grasa, son señaladas por Domarco (2001) entre el diámetro de los huevos y el contenido en ácido araquidónico de los mismos para dorada, y por El-Sayed *et al.* (2003) entre el contenido en proteínas de las dietas y el tamaño del huevo en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

La maduración ovárica en los peces involucra cambios bioquímicos mayores que resultan en una masiva incorporación de lípidos y proteínas en los oocitos (Frémont *et al.*, 1984). En la dorada que desova continuamente durante 3-4 meses estos componentes bioquímicos deben proporcionarse continuamente en dietas de alta calidad. Los resultados de este estudio mostraron la buena calidad nutritiva de la harina de calamar como fuente de lípidos y proteínas para dietas de reproductores de dorada.

3.3.- EXPERIMENTO III

3.3.1.-REPRODUCTORES

Cuarenta y cinco reproductores (3-5 años de edad) de dorada (*Sparus aurata*) procedentes de la granja de jaulas flotantes del Instituto Canario de Ciencias Marinas, situada en el muelle de Taliarte fueron seleccionados al azar y distribuidos en quince tanques de fibra de vidrio de 1000 l de capacidad. La proporción de machos y hembras en cada tanque fue de 2:1 (2 ♂: 1 ♀). Las características biométricas de los reproductores utilizados se muestran en la Tabla XXVI. Los tanques estaban dotados de un circuito abierto de agua de mar con un flujo de 165 l/hora, lo que aseguraba una renovación diaria de su volumen de unas cuatro veces, estando además dotados de aireación. La temperatura durante el experimento osciló entre 18,8° C y 21,5° C. Desde el momento en que los reproductores fueron estabulados en los tanques se alimentaron con un pienso comercial. Tras un periodo de alimentación común con dicho pienso y asegurarse que no había diferencias significativas en ninguno de los Parámetros de Calidad de las puestas, se procedió a alimentar a los reproductores, con las dietas experimentales, dos veces por día. La ración diaria fue del 1% de la biomasa de cada tanque. Cada una de las cinco dietas experimentales fue suministrada a tres tanques elegidos aleatoriamente.

Tabla XXVI.- Características biométricas de los reproductores utilizados en el Experimento III (media \pm desviación típica)

REPLICADOS	♀		♂	
	PESO	TALLA	PESO	TALLA
1	1503,67 \pm 341,7	43,33 \pm 3,05	962,50 \pm 165,7	37,00 \pm 1,26
2	1397,00 \pm 254,5	40,66 \pm 2,51	947,83 \pm 206,5	36,66 \pm 2,80
3	1569,67 \pm 74,2	44,33 \pm 1,52	1004,83 \pm 213,4	38,161 \pm 2,85
4	1660,33 \pm 631,2	41,66 \pm 0,57	1032,83 \pm 216,1	38,66 \pm 2,80
5	1711,00 \pm 196,5	46,33 \pm 1,52	937,66 \pm 163,5	36,83 \pm 2,04

3.3.2.- COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS

La composición de las dietas experimentales se indica en la Tabla XXVII y el análisis de su contenido se señala en la Tabla XXVIII. Se formularon cinco dietas isoproteicas, isolipídicas e isocalóricas. Las Dietas 1 a 4 conteniendo el mismo nivel de n-3 HUFA (1,6% que fue el que proporcionó los mejores resultados en el Experimento I) y añadiéndose cantidades crecientes de vitamina E, 25, 250 y 2000 mg por kg de dieta a las Dietas 2, 3 y 4 respectivamente, y la Dieta 1 sin aditamento de vitamina E. La Dieta 5 con un contenido en n-3 HUFA del 2,5 % y 250 mg de vitamina E por kg.

Tabla XXVII.- Composición de las dietas experimentales del Experimento III

	DIETA				
	1	2	3	4	5
Harina de pescado	67	67	67	67	67
Aceite de pescado	---	---	---	---	2,75
Grasa de vaca	9,15	9,15	9,15	9,15	6,4
Minerales	2	2	2	2	2
Vitaminas	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Carboximetil celulosa	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Alfa celulosa	0,15	0,148	0,14	---	0,14
Almidón	5,55	5,55	5,55	5,55	5,55
Dextrina	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85
Salvado de trigo	12,83	12,83	12,83	12,83	12,83
Vitamina C	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Colina	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
Vitamina E (mg/kg)	---	0,003	0,025	0,2	0,025
Etoxiquin	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Tabla XXVIII.- Composición analizada de las dietas experimentales del Experimento III

	DIETA				
	1	2	3	4	5
Proteínas	54,62	54,45	55,78	55,76	54,91
Lípidos	17,25	17,41	17,52	17,32	17,62
Cenizas	11,47	12,44	11,87	11,94	12,32
Humedad	7,58	8,07	7,98	8,15	7,08
Vitamina E (mg/kg)	22,3	55,75	125,01	2010,54	190,98
n-3 HUFA (% peso seco)	1,64	1,71	1,74	1,41	2,48
Vitamina E/n-3 HUFA	13,94	32,6	71,84	1425,91	77,01

3.3.3.- RESULTADOS

Calidad de la puesta

La aceptación de todas las dietas experimentales fue excelente y no hubo diferencias significativas en la ingesta diaria de las dietas, obteniéndose puestas en todos los replicados de todas las dietas. Durante las primeras cinco semanas del experimento se alimentaron los tanques con la dieta comercial, observándose que no hubo diferencias significativas en ninguno de los Parámetros de Calidad. En la tabla XXIX se indican los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con las diferentes dietas experimentales se refiere, observándose que los mejores porcentajes de huevos vivos y supervivencia larvaria son obtenidos con la Dieta 5 que contiene 190,98 mg/kg de vitamina E y un 2,48% en peso seco de n-3 HUFA y los peores son los obtenidos en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 (22,30 mg/kg de vitamina E y un 1,64 % de n-3 HUFA) (Tabla XXVIII). También las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 5 muestran los porcentajes más bajos de huevos no fecundados, huevos morfológicamente anormales y larvas anormales y los huevos procedentes de la Dieta 1 los porcentajes más altos en estos mismos índices.

Tabla XXIX.- Índices de las puestas de los reproductores del Experimento III, alimentados con las dietas experimentales (media \pm desviación típica)

DIETA	% HUEVOS VIVOS	% HUEVOS MUERTOS	% HUEVOS NO FECUNDADOS	% HUEVOS ANORMALES (MORFOLOGÍA)
	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,01
1 (n = 22)	53,52 \pm 16,48 ^c	28,19 \pm 14,86 ^b	11,72 \pm 13,63 ^b	6,50 \pm 4,68 ^b
2 (n = 23)	64,17 \pm 12,17 ^{bc}	28,22 \pm 10,60 ^b	4,39 \pm 4,17 ^{ab}	3,19 \pm 3,36 ^{ab}
3 (n = 22)	70,22 \pm 9,26 ^{ab}	20,33 \pm 9,33 ^{ab}	6,40 \pm 6,14 ^a	3,01 \pm 2,44 ^{ab}
4 (n = 24)	71,22 \pm 14,84 ^{ab}	22,97 \pm 12,54 ^{ab}	3,73 \pm 5,56 ^a	2,05 \pm 2,85 ^a
5 (n = 25)	80,46 \pm 10,79 ^a	16,18 \pm 9,61 ^a	1,87 \pm 2,30 ^a	1,46 \pm 1,38 ^a
	% HUEVOS ANORMALES (Nº GOTAS)	% ECLOSIÓN	% LARVAS ANORMALES	% SUPERVIVENCIA LARVARIA
	P < 0,01	P = 0,13	P = 0,47	P < 0,05
1 (n = 22)	0,04 \pm 0,19 ^a	91,33 \pm 10,12	1,77 \pm 6,64	23,28 \pm 12,99 ^b
2 (n = 23)	1,81 \pm 3,26 ^a	88,69 \pm 7,01	1,41 \pm 3,73	24,43 \pm 12,36 ^b
3 (n = 22)	9,44 \pm 13,52 ^b	93,31 \pm 5,42	0,81 \pm 1,94	25,77 \pm 15,47 ^{ab}
4 (n = 24)	0,63 \pm 1,26 ^a	92,47 \pm 7,47	0,81 \pm 1,72	25,55 \pm 14,61 ^{ab}
5 (n = 25)	2,85 \pm 5,22 ^{ab}	92,69 \pm 5,93	0,18 \pm 0,44	40,04 \pm 17,85 ^a

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Con el fin de comprobar el efecto de la vitamina E contenida en las dietas experimentales sobre los Índices de las puestas en la Tabla XXX se indican los principales índices obtenidos en las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 1 a 4 que contienen niveles muy similares de n-3 HUFA, entre 1,40 y 1,75 % en peso seco y diferentes niveles de vitamina E (Tabla XXVIII).

Tabla XXX.- Índices de las puestas de los reproductores alimentados con dietas similares en n-3 HUFA y diferentes niveles de vitamina E (media ± desviación típica)

DIETA	% HUEVOS VIVOS	% HUEVOS NO FECUNDADOS	% HUEVOS ANORMALES (MORFOLOGÍA)
	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01
1 (n = 22)	53,52±16,48 ^b	11,72±13,63 ^b	6,50±4,68 ^b
2 (n = 23)	64,17±12,17 ^a	4,39±4,17 ^{ab}	3,19±3,36 ^a
3 (n = 22)	70,22±9,26 ^a	6,40±6,14 ^{ab}	3,01±2,44 ^a
4 (n = 24)	71,22±14,84 ^a	3,73±5,56 ^a	2,05±2,85 ^a
	% ECLOSIÓN	% LARVAS ANORMALES	% SUPERVIVENCIA LARVARIA
	P = 0,19	P < 0,01	P = 0,93
1 (n = 22)	91,33±10,12	1,77±6,64 ^b	23,28±12,99
2 (n = 23)	88,69±7,01	1,41±3,73 ^a	24,43±12,36
3 (n = 22)	93,31±5,42	0,81±1,94 ^a	25,77±15,47
4 (n = 24)	92,47±7,47	0,81±1,72 ^a	25,55±14,61

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

En la Tabla XXX se observa que existen diferencias significativas entre los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1, sin adición de vitamina E (Tabla XXVII), y los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 2, 3 y 4 que si fueron complementadas con diferentes cantidades de vitamina E (Tabla XXVII). Estas diferencias se refieren a los porcentajes de huevos vivos que fue menor y de huevos morfológicamente anormales y larvas anormales que fue superior. En el porcentaje de huevos no fecundados solo hubo diferencias significativas entre los huevos de las Dietas 1 y 4. Se encontraron correlaciones positivas entre el contenido en vitamina E de las dietas y el porcentaje de huevos vivos (Fig. 23) y negativas con los porcentajes de huevos no fecundados y huevos morfológicamente anormales (Fig. 24). En cuanto a las larvas se encontró una correlación negativa con el porcentaje de larvas anormales y positiva con el de supervivencia larvaria (Fig. 25).

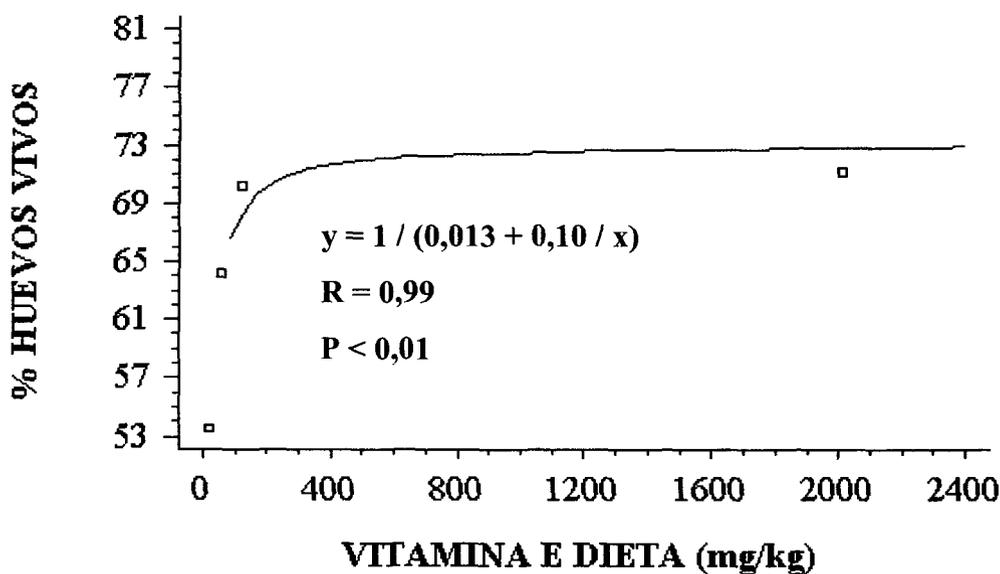


Fig. 23.- Relación entre el contenido en vitamina E de las Dietas 1, 2, 3 y 4 y el porcentaje de huevos vivos.

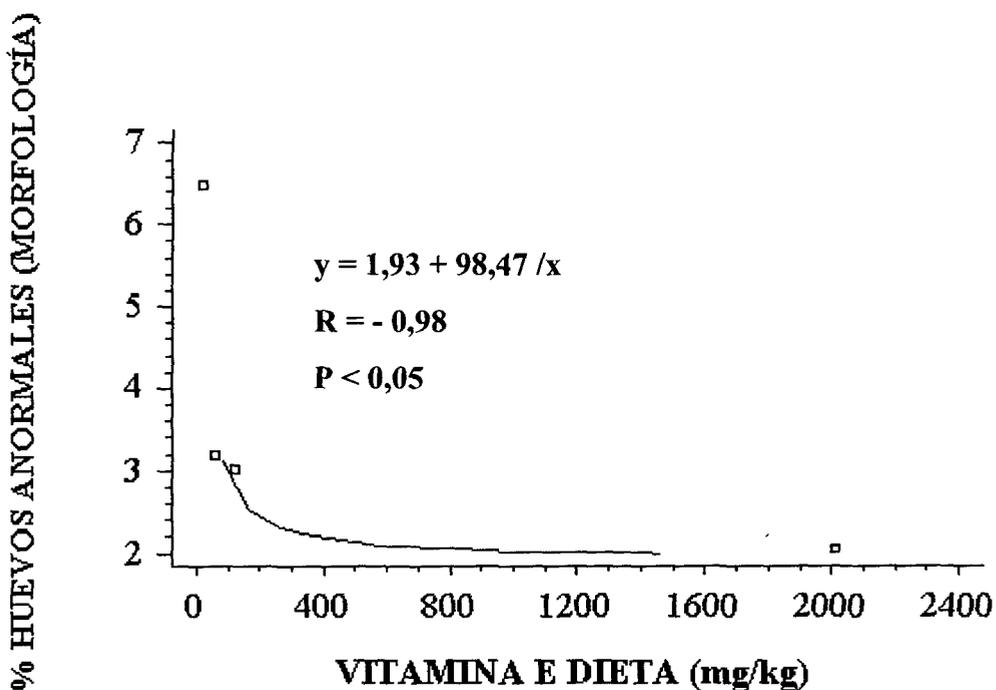
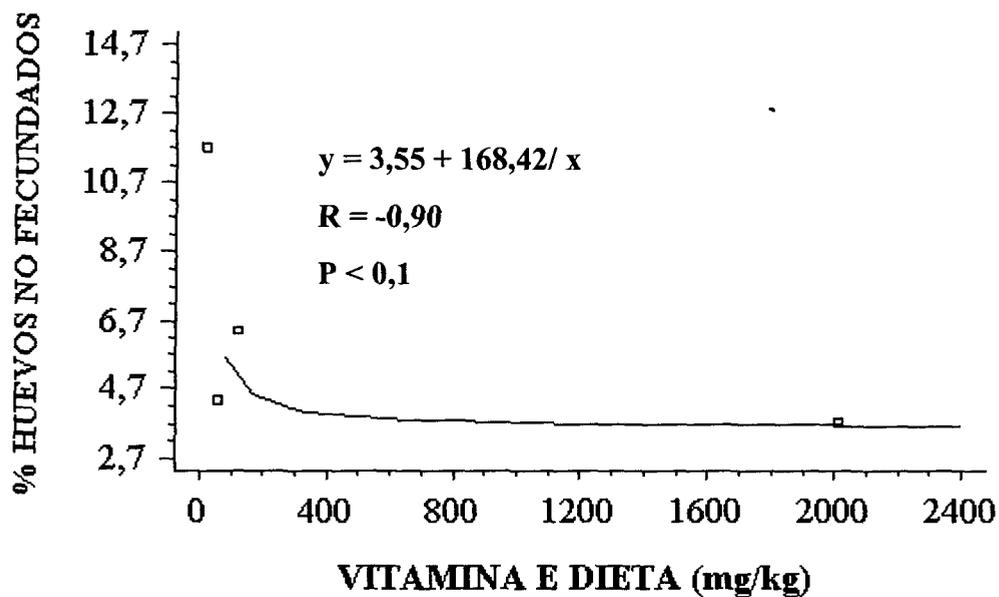


Fig. 24.- Relacion entre el contenido de vitamina E en las Dietas 1, 2, 3 y 4 y los porcentajes de huevos no fecundados y morfológicamente anormales.

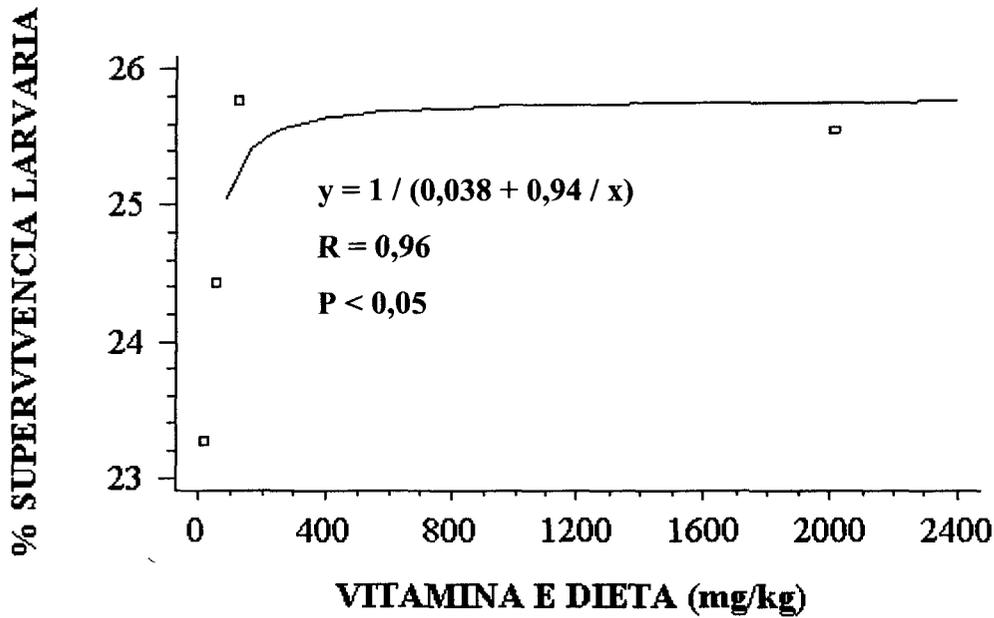
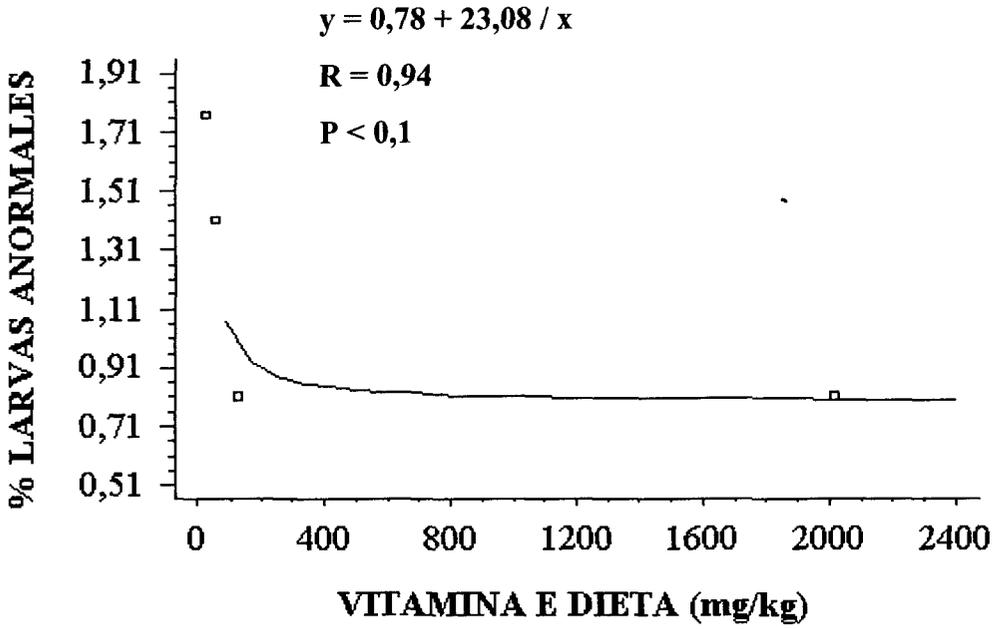


Fig. 25.- Relacion entre el contenido de vitamina E en las Dietas 1, 2, 3 y 4 y los porcentajes de larvas morfológicamente anormales y supervivencia larvaria.

Para comprobar el efecto conjunto de los niveles dietéticos de vitamina E y n-3 HUFA sobre los Índices de las puestas en la Tabla XXXI se comparan los resultados obtenidos con las Dietas 1, 2, 3 y 5 que contienen niveles crecientes de vitamina E, entre 20 y 200 mg/kg y diferentes niveles de n-3 HUFA entre 1,6 y 2,5 % en peso seco.

Tabla XXXI.- Índices de las puestas de los reproductores alimentados con dietas con diferentes niveles de adición de vitamina E y de n-3 HUFA (media ± desviación típica)

DIETA	% HUEVOS VIVOS	% HUEVOS NO FECUNDADOS	% HUEVOS ANORMALES (MORFOLOGÍA)
	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01
1 (n = 22)	53,52±16,48 ^c	11,72±13,63 ^b	6,50±4,68 ^b
2 (n = 23)	64,17±12,17 ^b	4,39±4,17 ^{ab}	3,19±3,36 ^b
3 (n = 22)	70,22±9,26 ^b	6,40±6,14 ^{ab}	3,01±2,44 ^b
5 (n = 25)	80,46±10,79 ^a	1,87±2,30 ^a	1,46±1,38 ^a
	% ECLOSIÓN	% LARVAS ANORMALES	% SUPERVIVENCIA LARVARIA
	P = 0,16	P < 0,01	P < 0,01
1 (n = 22)	91,33±10,12	1,77±6,64 ^b	23,28±12,99 ^b
2 (n = 23)	88,69±7,01	1,41±3,73 ^b	24,43±12,36 ^b
3 (n = 22)	93,31±5,42	0,81±1,94 ^b	25,77±15,47 ^b
5 (n = 25)	92,69±5,93	0,18±0,44 ^a	40,04±17,85 ^a

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Al analizar los resultados obtenidos se observa en la Tabla XXXI que existen diferencias significativas entre los porcentajes de huevos vivos, huevos morfológicamente anormales, larvas anormales y de supervivencia larvaria de los reproductores alimentados con la Dieta 5, con un contenido en vitamina E y n-3 HUFA de 190,98 mg/kg y 2,48 % respectivamente y una relación vitamina E / n-3 HUFA de 77,01 (Tabla XXVIII) con el resto de los porcentajes de las puestas de los reproductores alimentados con las otras dietas. En cuanto al porcentaje de huevos no fecundados existen diferencias significativas entre las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 5 y las de los reproductores alimentados con la Dieta 1. Encontrándose correlaciones positivas entre la relación vitamina E/n-3 HUFA contenida en las dietas experimentales y el porcentaje de huevos vivos (Fig. 26) y negativas entre dicha relación y los porcentajes de huevos no fecundados y huevos morfológicamente anormales (Fig. 27) y también con el porcentaje de larvas anormales (Fig. 28).

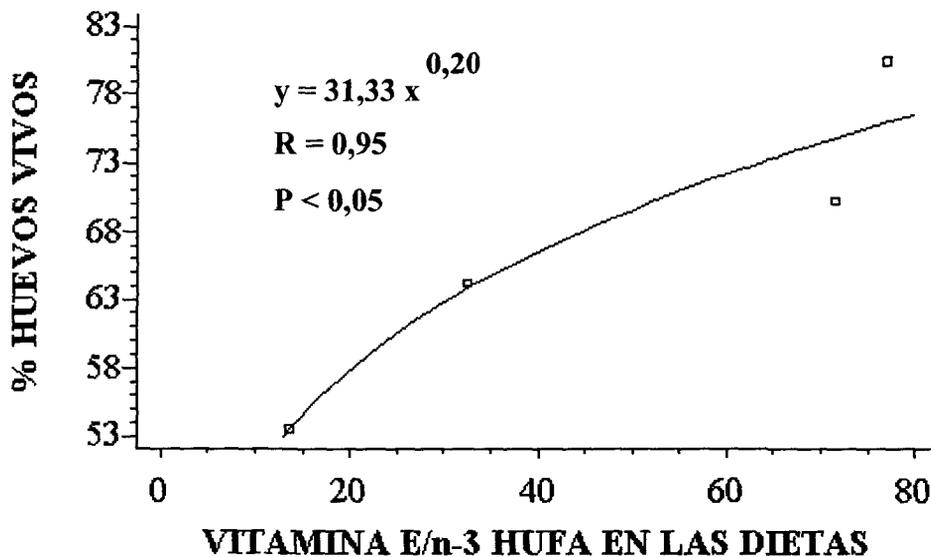


Fig. 26.- Correspondencia entre la relación vitamina E/n-3 HUFA de las Dietas 1, 2, 3 y 5 y el porcentaje de huevos vivos.

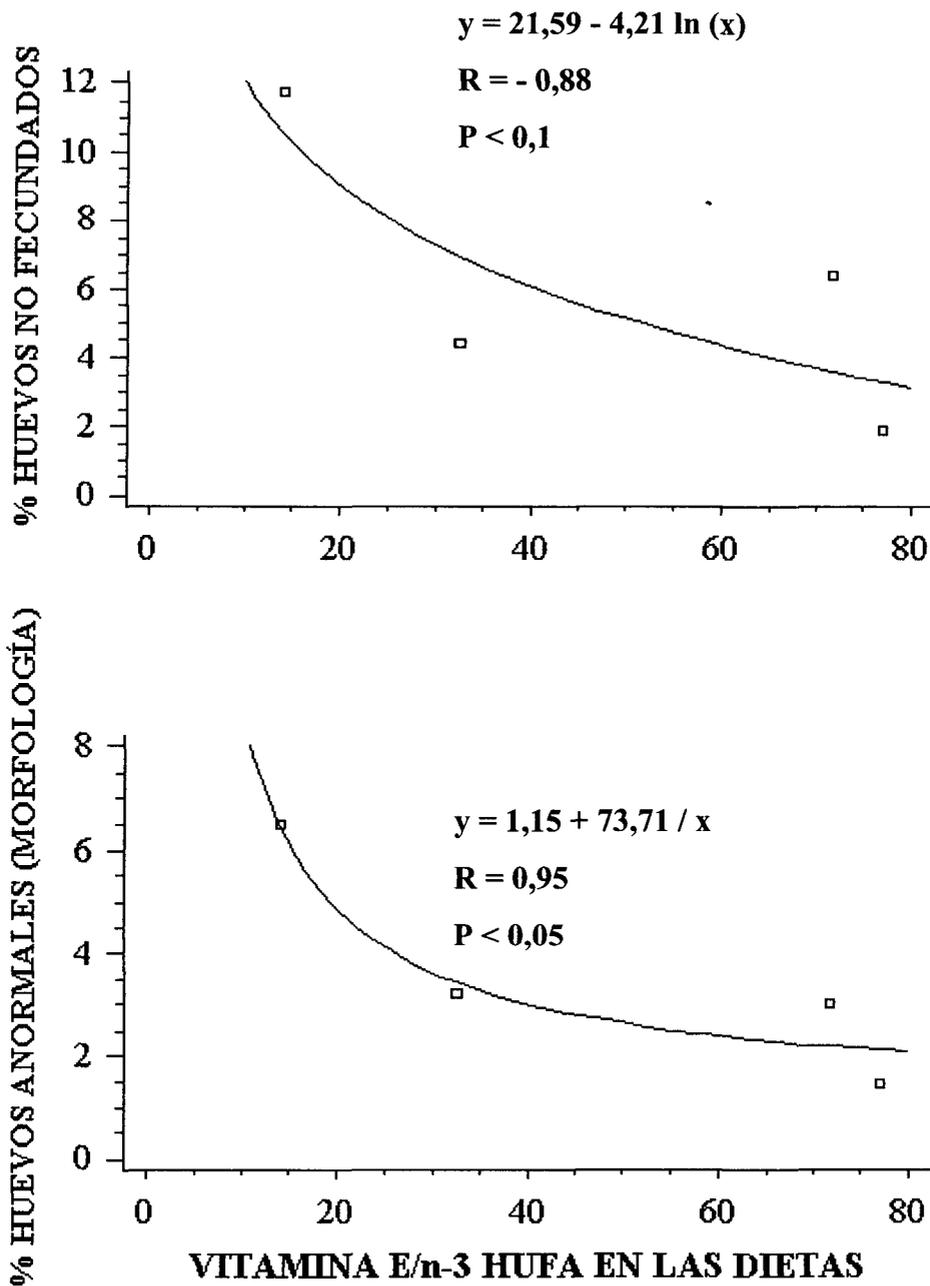


Fig. 27.- Correspondencia entre la relación vitamina E/n-3 HUFA de las Dietas 1, 2, 3 y 5 y los porcentajes de huevos no fecundados y morfológicamente anormales.

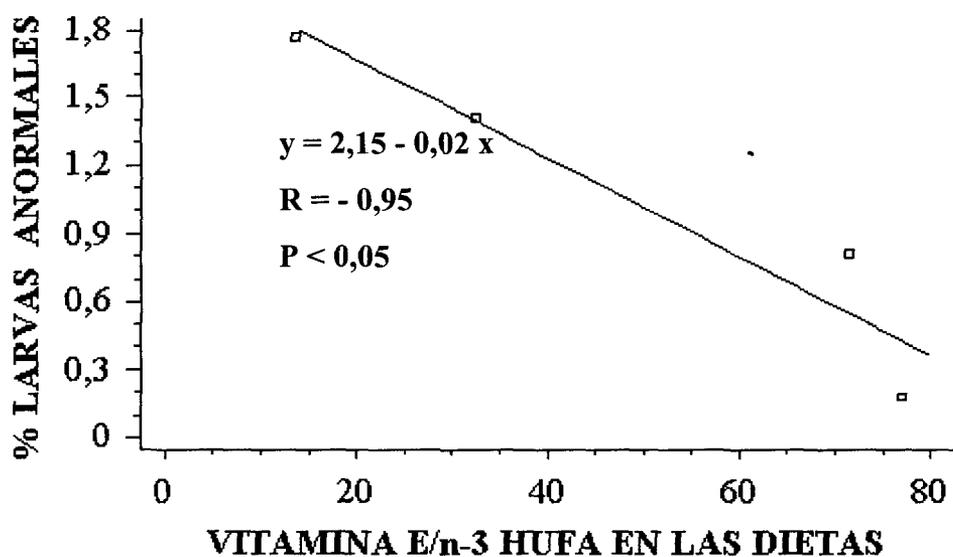
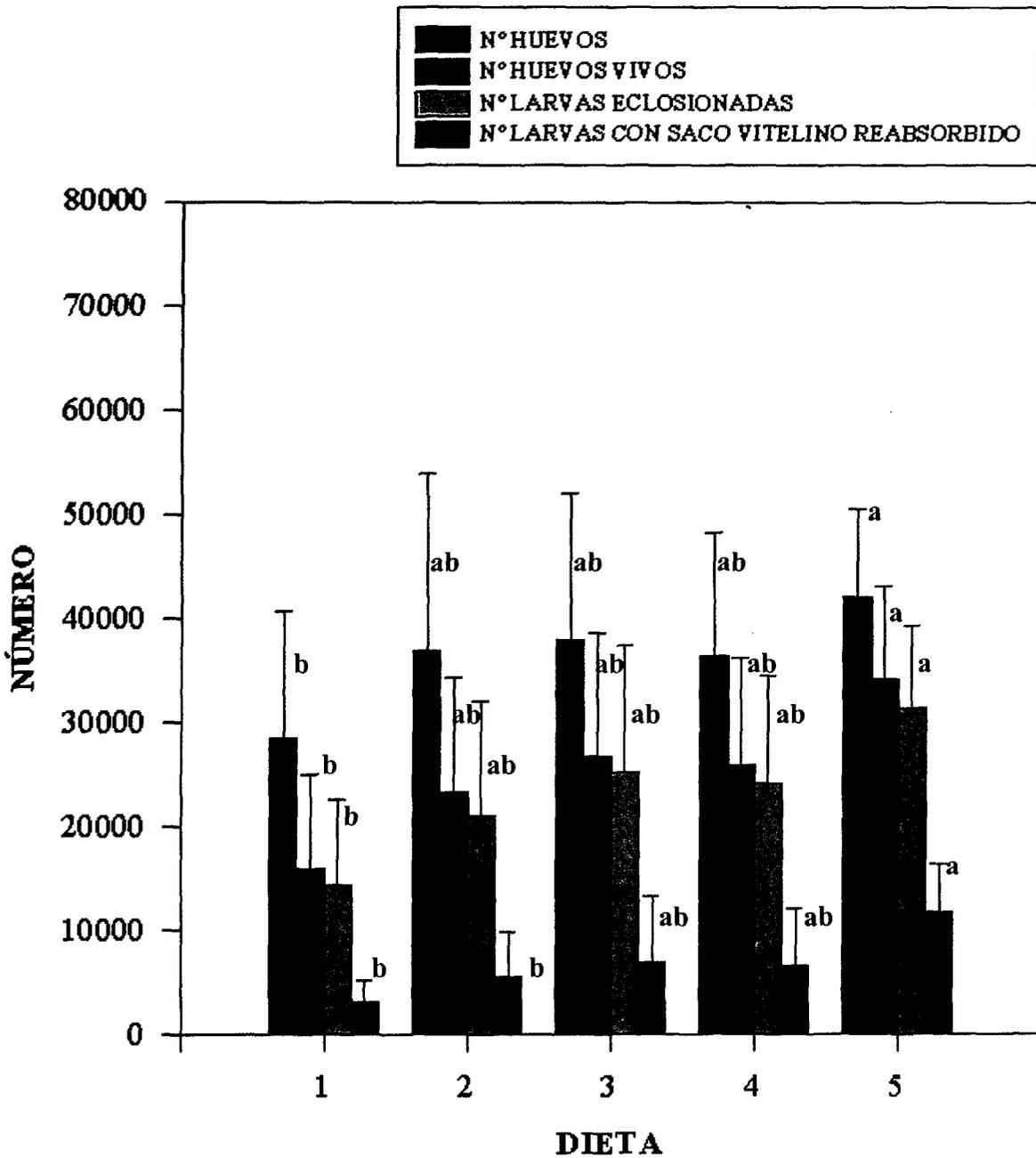


Fig. 28.- Correspondencia entre la relación vitamina E/n-3 HUFA de las Dietas 1, 2, 3 y 5 y el porcentaje de larvas anormales.

Las Producciones relativas de huevos, huevos vivos, número de larvas eclosionadas y número de larvas con el saco vitelino reabsorbido se indican en la Fig. 29, en la que se observa que la producción de los reproductores alimentados con la Dieta 5 es la más elevada mostrando diferencias significativas ($P < 0,01$) con las producciones de los reproductores alimentados con la Dieta 1 y en el número de larvas con el saco vitelínico reabsorbido producido por los reproductores alimentados con la Dieta 2.



*Barras, del mismo color, sin o con una misma letra no presentan diferencias significativas. Barras, del mismo color, con diferentes letras presentan diferencias significativas.

Fig. 29.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada, del Experimento III, alimentados con las dietas experimentales.

En la Tabla XXXII se indican los resultados obtenidos en las medidas del diámetro de los huevos y de las gotas de grasa, y longitud de las larvas de un día y con el saco vitelino reabsorbido procedentes de los reproductores alimentados con las diferentes dietas experimentales. Se observó que los huevos de la Dieta 2 son significativamente más pequeños que los del resto de las dietas y que el diámetro de la gota de grasa de la Dieta 1 es significativamente menor que el del resto de las dietas y el de las Dietas 4 y 5 es significativamente mayor que el del resto de las dietas. No se encontraron diferencias significativas entre el tamaño de las larvas de las diferentes dietas, ni relaciones entre el tamaño del huevo, gota de grasa y larvas.

Tabla XXXII.- Medidas de los huevos y larvas producidos por los distintos grupos de reproductores alimentados con las dietas experimentales del Experimento III (media \pm desviación típica)

DIETA	DIÁMETRO HUEVO (mm)	DIÁMETRO GOTA DE GRASA (mm)	LONGITUD LARVAS 1 DÍA (mm)	LONGITUD LARVAS 3DIAS (mm)
	P < 0,01	P < 0,01	P = 0,10	P = 0,11
1	1,002 \pm 0,020 ^a (n = 200)	0,235 \pm 0,0062 ^c (n = 200)	2,686 \pm 0,163 (n = 100)	3,48 \pm 0,19 (n = 100)
2	0,974 \pm 0,023 ^b (n = 200)	0,239 \pm 0,0077 ^b (n = 200)	2,984 \pm 0,137 (n = 100)	3,56 \pm 0,96 (n = 100)
3	1,002 \pm 0,023 ^a (n = 200)	0,241 \pm 0,0062 ^b (n = 200)	2,903 \pm 0,207 (n = 100)	3,53 \pm 0,19 (n = 100)
4	0,998 \pm 0,020 ^a (n = 200)	0,246 \pm 0,0101 ^a (n = 200)	2,907 \pm 0,126 (n = 100)	3,47 \pm 0,19 (n = 100)
5	1,002 \pm 0,021 ^a (n = 200)	0,246 \pm 0,0103 ^a (n = 200)	2,854 \pm 0,152 (n = 100)	3,66 \pm 0,23 (n = 100)

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Composición bioquímica de los huevos

En la Tabla XXXIII se muestra la composición, en sus principales componentes, de los huevos de dorada producidos por los reproductores alimentados con las diferentes dietas experimentales.

Tabla XXXIII.- Composición de los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las dietas experimentales del Experimento III

COMPOSICION	DIETA				
	1	2	3	4	5
Lípidos	28,2 ^a	27,4 ^{ab}	24,9 ^{ab}	24,8 ^b	23,0 ^b
n-3 HUFA (% ácidos grasos)	27,1	27,1	25,9	25,3	27,5
EPA (% ácidos grasos totales)	3,72 ^b	3,60 ^b	4,58 ^{ab}	4,04 ^b	5,32 ^a
DHA (% ácidos grasos totales)	21,36	21,23	19,18	19,03	19,62
Vitamina E (mg/kg)	101,35 ^b	106,71 ^b	106,82 ^b	207,16 ^a	115,50 ^b
EPA/DHA	0,174	0,169	0,238	0,212	0,271
Vitamina E/n-3 HUFA	3,73	3,94	4,12	8,18	4,2

* Filas sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Al analizar los resultados obtenidos se observa que el contenido en lípidos totales es mayor en los huevos procedentes de los reproductores alimentados con la Dieta 1, diferenciándose significativamente de los huevos de los reproductores alimentados con las Dietas 4 y 5. El contenido en n-3 HUFA de los huevos es similar en las todas las dietas, no habiendo diferencias significativas entre ellos. Tampoco existen diferencias significativas en el contenido en DHA de los huevos, pero si en el

contenido en EPA que en los huevos de la Dieta 5 se diferenciaron significativamente de los huevos de las Dietas 1, 2 y 4 pero no de los de la Dieta 3. En cuanto al contenido de vitamina E, la Dieta 4 se diferencia significativamente del resto. Existe una correlación positiva entre el contenido en vitamina E de las dietas y el contenido de esta vitamina en los huevos (Fig. 30). No se encontró ninguna correlación entre la vitamina E de los huevos y cualquiera de los Parámetros de Calidad de las puestas.

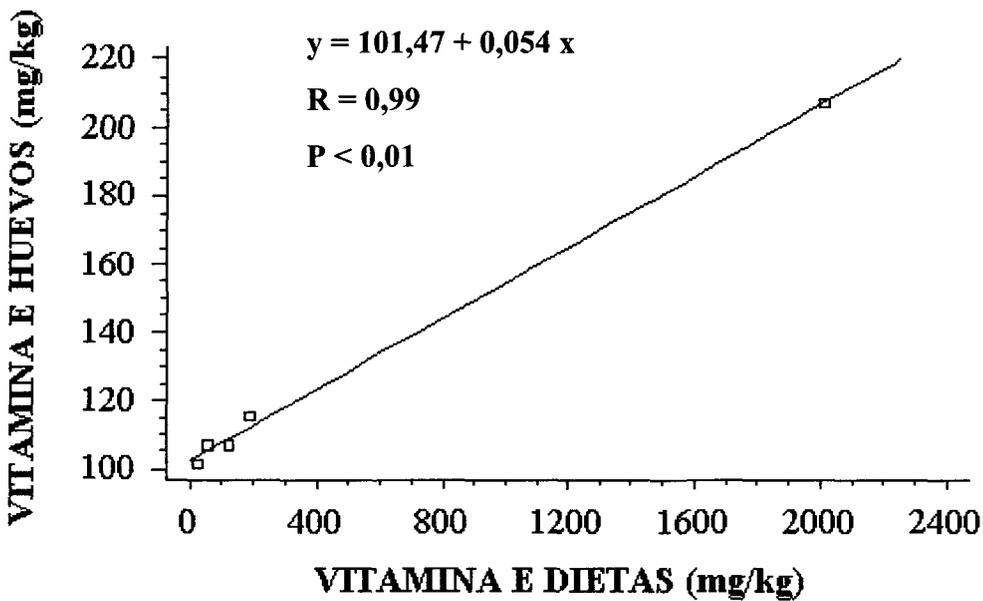


Fig. 30.- Relación entre el contenido en vitamina E de las dietas experimentales y el nivel de está en los huevos.

Se encontraron correlaciones positivas entre la relación EPA/DHA y los porcentajes de huevos vivos (Fig. 31), eclosión y supervivencia larvaria (Fig. 32) y negativas con los porcentajes de huevos morfológicamente anormales y larvas anormales (Fig. 33).

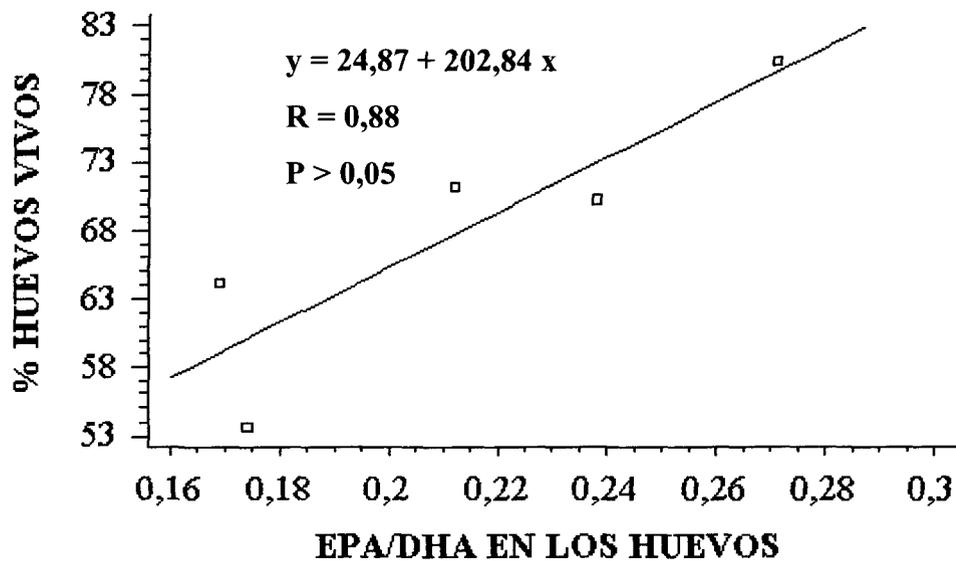


Fig. 31.- Relación entre la proporción EPA/DHA de los huevos y el porcentaje de huevos vivos en el Experimento III.

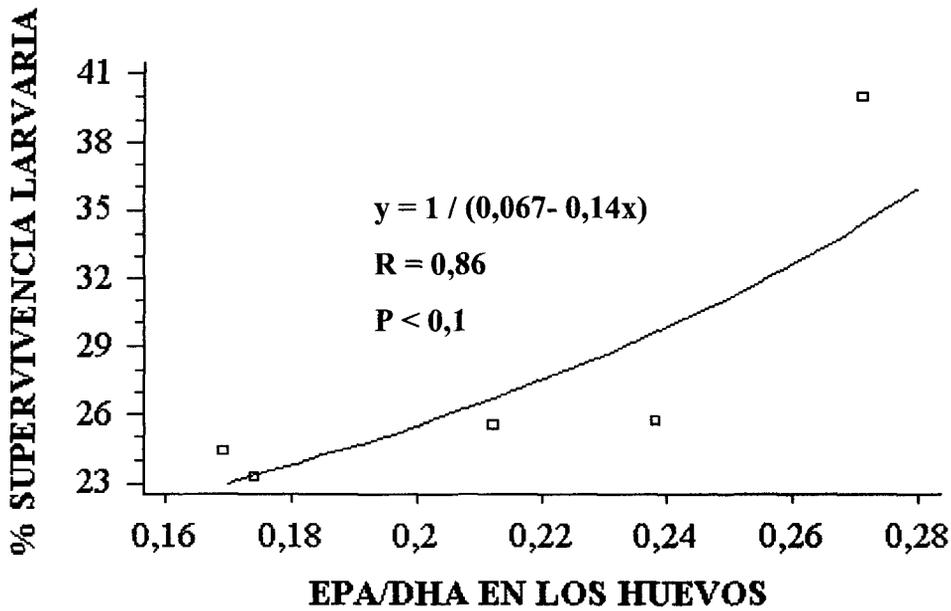
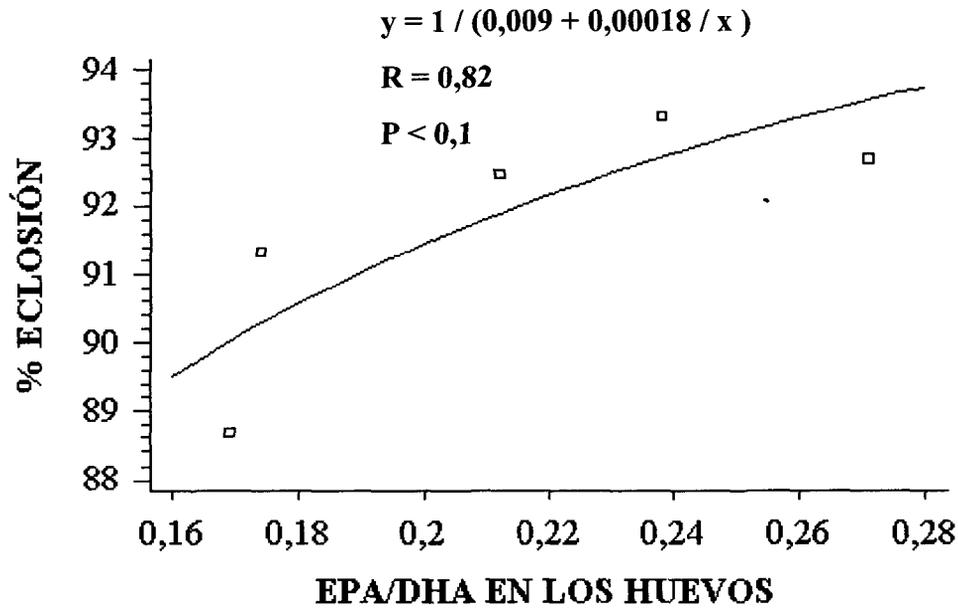


Fig. 32.- Relación entre la proporción EPA/DHA de los huevos y los porcentajes de eclosión y de supervivencia larvaria en el Experimento III.

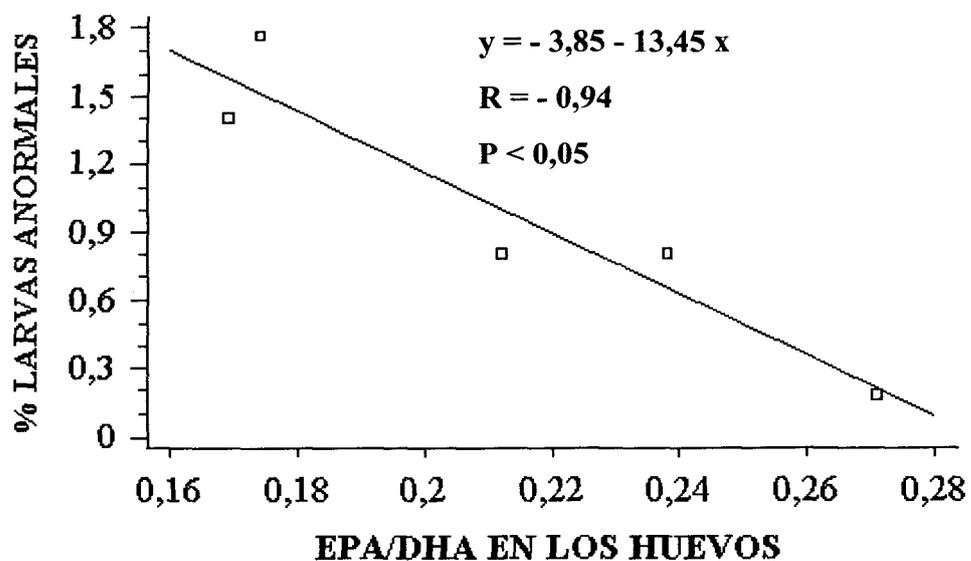
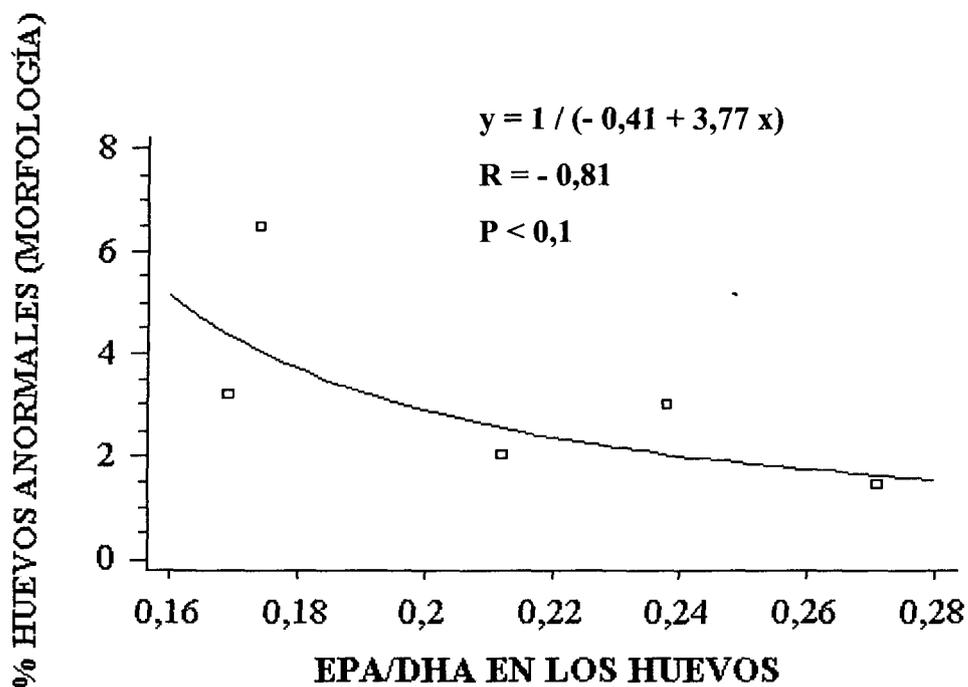


Fig. 33.- Relación entre la proporción EPA/DHA de los huevos y los porcentajes de huevos y larvas morfológicamente anormales, en el Experimento III.

3.3.4.- DISCUSIÓN

La importancia de una adecuada alimentación en la reproducción y calidad de las puestas en los teleósteos es bien conocida desde el punto de vista de la nutrición, así como el papel de los componentes liposolubles tales como los ácidos grasos, vitamina E o carotenos (Luquet y Watanabe, 1986). Existen 15 vitaminas establecidas como esenciales para los animales terrestres y también para varias especies de peces marinos (Woodward, 1994). Los requerimientos para las vitaminas liposolubles incluyendo vitamina A (retinol), vitamina D (colecalfiferol), vitamina K (menadiona) y vitamina E (tocoferol) han sido establecidas para una variedad de especies de peces (National Research Council, 1993). El papel más importante de la vitamina E es el de antioxidante natural. La vitamina E puede prevenir la degeneración peroxidante de las grasas en la células animales y la consecuente formación de radicales libres (Huber, 1988). Mediante la limpieza de radicales libres de oxígeno, moléculas que son producidas por el metabolismo normal, la vitamina E repara la oxidación de las membranas celulares (Horton *et al.*, 1996). Los radicales de oxígeno, en especial el radical hidroxilo, tienen mucha afinidad por los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de los fosfolípidos de la membrana celular. Durante esta unión el radical hidroxilo sustrae un hidrógeno del ácido graso para dar lugar a la formación de un nuevo radical orgánico. Seguidamente este radical orgánico, en busca de una pareja para su electrón, ataca el lípido vecino y da lugar a un nuevo radical, y así sucesivamente, para crear una verdadera reacción en cadena que daña de manera prácticamente irreversible la membrana celular. La vitamina E, que normalmente, se encuentra formando parte de las membranas biológicas, es un potente inhibidor de la lipoperoxidación (Coelho, 1991; Chew, 1996).

El papel esencial de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en el desarrollo del ovario y la viabilidad de los embriones ha sido señalado para varias especies de peces marinos por

Verakunpiriya *et al.* (1996) quienes también señalan el importante papel de la vitamina E en el desarrollo de las gonadas. La vitamina E y los ácidos grasos esenciales son necesarios para la maduración de las gonadas y la dosis de vitamina E, en el alimento de los reproductores de peces, depende del contenido de ácidos grasos esenciales de la dieta. A mayor contenido de ácidos grasos en la dieta mayores niveles de vitamina E son requeridos (Watanabe *et al.*, 1991a). Al mismo tiempo, la presencia de antioxidantes en las dietas es considerada como esencial para mantener la integridad estructural de los fosfolípidos en salmónidos alimentados con dietas altas en HUFA (Cowey *et al.*, 1983). El aumento del requerimiento de α -tocoferol durante el desarrollo embrionario y el periodo de utilización del saco vitelino en salmón Atlántico (*salmo salar*) ha sido demostrado (Cowey *et al.*, 1985). La vitamina E es conocida por jugar un papel crucial en la reproducción de los peces (Izquierdo *et al.*, 2001) aun cuando su mecanismo directo aun no ha sido elucidado. La vitamina E es conocida por incrementar la capacidad reproductiva en peces tales como la carpa común, *Cyprinus carpio* (Watanabe y Takashima, 1977; Watanabe, 1990), el ayu, *Plecoglossus altivelis* (Takeuchi *et al.*, 1981), el carpín, *Carassius auratus* (Sutjaritvongsanon, 1987), el pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1985b; 1991 a, b), el pez gato, *Heteropneustes fossilis* (Dube, 1996), la seriola, *Seriola quinqueradiata* (Mushiake *et al.*, 1993), el pearlspot, *Etroplus suratensis* (Shiranee y Natarajan, 1996) y la dorada *Sparus aurata* (Izquierdo *et al.*, 2001). La deficiencia de vitamina E en animales causa tasas bajas de crecimiento muscular, degeneraciones en los embriones, bajas tasas de eclosión, degeneración y expulsión de las células germinativas epiteliales de los testículos, esterilidad, descenso en la producción de prostaglandinas por los microsomas de los testículos, músculos y bazo, descenso de la permeabilidad celular, incremento de la mortalidad y trastornos nerviosos (Lehninger *et al.*, 1993). Por otra parte, deficiencias en vitamina E en la dieta de tilapia (*Oreochromis niloticus*) causan pérdida de la coloración sexual y reducen la actividad reproductora (Schmittou, 1993). Así mismo, severas deficiencias en el contenido de vitamina E y C reducen la calidad de las puestas en el trompetero australiano, *Latris linneata* (Morehead *et al.*, 2001).

Los Índices de las puestas de los reproductores alimentados con los niveles más bajos de vitamina E muestran los más bajos porcentajes de huevos vivos. Este índice aumenta con la elevación de los niveles dietéticos de vitamina E por encima de los 125 mg/kg mientras los niveles dietéticos de n-3 HUFA se mantienen alrededor de 1,6%. Watanabe *et al.* (1991a, b) indican un aumento del porcentaje de huevos vivos en puestas de reproductores del pargo japonés alimentados con dietas complementadas con vitamina E. Este aumento del porcentaje de huevos vivos es señalado para puestas de reproductores del chano, *Chanos chanos* alimentado con dietas complementadas con vitamina C y E (Emata *et al.*, 2000) y para trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (King, 1985). El porcentaje de huevos vivos más alto fue obtenido en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 5 que contenía los niveles más altos de n-3 HUFA. La dieta con más bajo contenido en vitamina E también produjo el más alto porcentaje de huevos no fecundados lo que puede estar relacionado con la reducción en el número y movilidad de los espermatozoides descrita para otros vertebrados (Donnelly *et al.*, 1999; Danikowski *et al.*, 2002) y en peces como el ayu, *Plecoglossus altivelis* (Hsiao y Mak, 1978). Lee y Dabrowski (2004) alimentando reproductores de perca americana (*Perca flavescens*) con dietas deficientes en vitamina E encuentran que el nivel de tocoferol en el plasma espermático decrece significativamente y la viabilidad del espermatozoide se ve seriamente comprometida. Además el contenido de vitamina E es generalmente alto en los huevos y bajo en los tejidos de los reproductores después del periodo de puesta sugiriendo el papel de esta vitamina en la fertilización (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). La elevación de los niveles dietéticos de n-3 HUFA produjo los porcentajes más bajos de huevos no fecundados de acuerdo con los resultados obtenidos en el Experimento I.

En el Experimento I la elevación de los niveles dietéticos de n-3 HUFA de 1,6 a 2,2 no mejoró los porcentajes de huevos vivos ni fecundados, además las larvas recién eclosionadas que procedían de puestas de los reproductores alimentados con la dieta que contenía un 2,2% de n-3 HUFA mostraron

hipertrofia del saco vitelínico lo que las forzaba a flotar en la superficie del agua perturbando sus actividades natatorias y produciendo un incremento en la mortalidad que redujo el porcentaje de supervivencia larvaria. Sin embargo, en el presente experimento, la elevación de los niveles dietéticos de n-3 HUFA de 1,7 a 2,5 junto con la elevación del contenido dietético en vitamina E de 125 a 190 mg/kg produjo una mejora de la calidad de la puesta en términos de aumento del porcentaje de huevos vivos y supervivencia larvaria y disminución del porcentaje de huevos no fecundados, anormales morfológicamente y larvas anormales (Tabla LXI). No se observaron larvas con hipertrofia del saco vitelínico cuando los niveles de n-3 HUFA se elevaron al 2,5% y los niveles de vitamina E también se incrementaron hasta 190 mg/kg. Altos niveles dietéticos de DHA junto con bajos niveles dietéticos de vitamina E causan anomalías en larvas de bacalao (Takeuchi *et al.*, 1994). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de niveles adecuados de vitamina E en las dietas para la efectiva utilización de los ácidos grasos esenciales. El principal papel de la vitamina E es la protección de las membranas biológicas frente a los radicales libres producidos por la auto oxidación de los lípidos dietéticos. Por esta razón, altas ingestas de lípidos conteniendo ácidos grasos poliinsaturados aumentan las necesidades de vitamina E en el animal. Una relación directa entre los requerimientos de vitamina E y el contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la dieta ha sido señalada también para humanos por Horwitt *et al.* (1961) y por Horwitt (1962), indicando que un nivel dietético elevado de linoleato aumenta los requerimientos en vitamina E, sin embargo hay pocos datos de estas relaciones en peces. Por ejemplo, Watanabe *et al.* (1981) señalan en carpa común (*Cyprinus carpio*) que la elevación de los lípidos dietéticos al nivel del 15% resulta en un incremento de los requerimientos de tocoferol y en una reducción en el almacenamiento de vitamina E en los tejidos. La cantidad de tocoferol requerida por la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es mayor cuando se alimenta con dietas conteniendo aceite de pescado que contiene más ácidos grasos poliinsaturados y monoenoicos que en truchas alimentadas con dietas conteniendo grasa de cerdo que contiene más ácidos grasos saturados. El pez gato del canal (*Ictalurus*

punctatus) alimentado con aceite oxidado sin aditamento de tocoferol o etoxiquin muestra numerosos síntomas de deficiencias (Murai y Andrews, 1974). Estas deficiencias pueden ser levemente mejoradas con la adición de etoxiquin y manifiestamente mejoradas con la adición de tocoferol. El aumento de lípidos instaurados (especialmente los contenidos en el aceite de pescado) en las dietas del pacu *Colossoma macropomen* y de la cachama blanca *Piractus brachypomus*, necesita ir acompañado de un aumento en la vitamina E (Lochman, 2001). De igual manera, hay estudios que demuestran que dietas para reproductores conteniendo altos niveles de vitamina E tienen efectos positivos cuando son suministradas justo antes del comienzo de la puesta (Kanazawa, 1988).

Resultados similares a los obtenidos en este experimento, en el porcentaje de supervivencia larvaria, son señalados por Takeuchi *et al.*, 1981 para el ayu (*Plecoglossus altivelis*), para la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por King (1985) y para la seriola (*Seriola quinqueradiata*) por Mushiake *et al.* (1993). Emata *et al.* (2000) trabajando con reproductores del chano (*Chanos chanos*) alimentados con dietas complementadas con vitaminas E y C señalan altos porcentajes de supervivencia larvaria con respecto a las puestas de los reproductores alimentados con la dieta control no complementada Watanabe *et al.* (1991a) encuentran un aumento en el porcentaje de larvas normales en puestas de reproductores alimentados con dietas complementadas con vitamina E al igual que sucedió en este experimento.

El análisis de la composición bioquímica de los huevos muestra que existen diferencias significativas, en la composición en lípidos totales, entre los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las Dietas 4 y 5 con más alto contenido en tocoferol y la Dieta 1 con el menor contenido en vitamina E, incrementos en el contenido en lípidos totales en peces alimentados con dietas no complementadas con tocoferol pueden ser relacionados con un incremento del transporte de los lípidos en sangre (Lie *et al.*, 1993). No se encontraron diferencias en la composición de ácidos grasos de los lípidos

de los huevos excepto en el bajo contenido en EPA de los huevos de los reproductores alimentados con dietas con niveles más bajos de 125 mg/kg. Es bien conocido que los peces marinos tienen un alto requerimiento dietético de n-3 HUFA principalmente EPA y DHA en relación con su proceso reproductivo (Sargent, 1995). Este requerimiento es consecuencia de la deficiencia de las enzimas (Δ -desaturasa) necesarias para la formación de ambos ácidos grasos a partir de su precursor (ácido linolénico), la limitada habilidad de los peces marinos para convertir el EPA en DHA (Mourente y Tocher, 1993) ilustra la dificultad para establecer los requerimientos de estos importantes ácidos grasos, siendo necesario determinar no solo los valores absolutos si no también el valor de la relación EPA/DHA de tal manera que las dietas suministradas a los reproductores deben producir huevos con el correcto equilibrio EPA/DHA para asegurar una adecuada calidad de puesta. En el presente experimento se han encontrado correlaciones entre esta relación y la mayoría de los índices de las puestas. En cuanto a lo que se refiere al contenido en vitamina E de los huevos, elevaciones del nivel dietético de tocoferol hasta 190 mg/kg no aumentan significativamente el tocoferol contenido en los huevos. Solamente cuando el nivel sobrepasa los 2000 mg/kg de tocoferol en la dieta el nivel de tocoferol en los huevos se incrementa hasta el doble que en el resto de los tratamientos. Existe una clara correlación entre los niveles dietéticos de vitamina E y los niveles de esta vitamina contenidos en los huevos. El perfil de ácidos grasos y vitamina E contenido en los huevos de seriola (*Seriola quinqueradiata*) está relacionado con su disposición en las dietas de los reproductores (Verakunpiriya *et al.*, 1996), iguales resultados encuentran Chou y Chien (2001), en el róbalo japonés *Lateolabrax japonicus*. La deposición de las vitaminas liposolubles aparece como dependiente de los niveles dietéticos estando esto demostrado para la vitamina D (Horvli *et al.*, 1998) y para la vitamina E (Bai y Gatlin, 1993; Sigurgisladottir *et al.*, 1994; Hamre y Lie 1997).

En cuanto a las producciones de huevos, número de huevos vivos, número de larvas nacidas y

número de larvas con el saco vitelínico reabsorbido, por kg de hembra y puesta, las de los reproductores alimentados con la Dieta 5 fueron las más altas, diferenciándose significativamente en todos los parámetros con las producciones de los reproductores alimentados con la Dieta 1 que no fue complementada con vitamina E y en el número de larvas con el saco vitelínico reabsorbido también se diferenció significativamente de las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 2 complementada con 55,75 mg /kg de vitamina E. Koprucu y Seker (2003) encontraron que dietas complementadas con vitamina E para el guppy *Poecilia reticulata* y para el espada *Xiphophorus helleri* aumentaron la fecundidad de las dos especies con respecto a una dieta control sin complementar, aunque no hubieron diferencias significativas en las producciones de semilla entre los reproductores alimentados con dietas complementadas con 50, 100, 150 y 300 mg/kg de vitamina E. Los mejores resultados se obtuvieron con una complementación de 150 mg/kg. Dube (1996) también obtiene la mayor fecundidad en el pez gato *Heteropneustes fossilis* alimentando con dietas complementadas con 150 mg/kg de vitamina E. Emata *et al.* (2000) trabajando con reproductores del chano (*Chanos chanos*) con dietas complementadas con vitaminas E y C señalan la no afectación de la fecundidad relativa pero si un aumento del número de puestas con respecto al control no complementado.

El diámetro de los huevos no aparece relacionado con la dieta. Emata *et al.* (2000) señalan la no afectación de este parámetro en puestas del chano (*Chanos chanos*) alimentados con dietas complementadas con vitaminas C y E. En cambio el diámetro de la gota de grasa es significativamente mayor en los huevos de los reproductores alimentados con las dietas con mayor complemento de vitamina E. Similares resultados son obtenidos por Lavens *et al.* (1999) en rodaballo (*Scophthalmus maximus*). En cuanto a las medidas de las larvas no existen diferencias significativas entre las larvas procedentes de las distintas dietas experimentales ni hemos encontrado ninguna relación entre el tamaño del huevo y las talla de las larvas tal como ocurrió en los dos experimentos anteriores.

3.4.- EXPERIMENTO IV

3.4.1.-REPRODUCTORES

Cuarenta y cinco reproductores (3-5 años de edad) de dorada (*Sparus aurata*) procedentes de la granja de jaulas flotantes del Instituto Canario de Ciencias Marinas, situada en el muelle de Taliarte fueron seleccionados al azar y distribuidos en quince tanques de fibra de vidrio de 1000 l de capacidad. La proporción de machos y hembras en cada tanque fue de 2:1 (2 ♂: 1 ♀). Las características biométricas de los reproductores utilizados se muestran en la Tabla XXXIV. Los tanques estaban dotados de un circuito de agua de mar con un flujo de 165 l/hora, lo que aseguraba una renovación diaria de su volumen de unas cuatro veces y estando además dotados de aireación. La temperatura durante el experimento osciló entre 18,8° C y 21,5° C. Desde el momento en que los reproductores fueron estabulados en los tanques se procedió a alimentarlos dos veces por día con las dietas experimentales, la ración diaria era del 1% de la biomasa de cada tanque. Cada una de las cinco dietas experimentales fue suministrada a tres tanques elegidos aleatoriamente.

Tabla XXXIV.- Características biométricas de los reproductores utilizados en el Experimento IV (media \pm desviación típica).

DIETA	PESO		TALLA	
	♂	♀	♂	♀
1	1259,75 \pm 664,72	1525,0 \pm 106,06	38,5 \pm 7,59	45,5 \pm 0,70
2	1391,0 \pm 451,44	1645,0 \pm 207,88	41,5 \pm 4,79	44,0 \pm 1,41
3	1454,25 \pm 189,23	1621,5 \pm 168,99	42,5 \pm 1,29	45,0 \pm 0,0
4	1139,67 \pm 383,26	1917,33 \pm 191,27	38,0 \pm 5,25	47,33 \pm 2,30
5	1126,67 \pm 429,39	1836,67 \pm 48,00	38,66 \pm 5,31	46,33 \pm 0,57

3.4.2.- COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS

La composición de las dietas experimentales se indica en la Tabla XXXV y el análisis de su contenido se señala en la Tabla XXXVI. Se formularon cinco dietas isoproteicas, isolipídicas e isocalóricas con harina de calamar y aceite de pescado como fuentes proteicas y de lípidos, con un contenido de 250 mg/kg de vitamina E y cantidades crecientes de n-3 HUFA 0,40, 1,54 2,00, 2,50 y 4,00. La Tabla XXXVII muestra la composición de las dietas en los principales ácidos grasos así como algunas relaciones entre ellos.

Tabla XXXV.- Composición de las dietas experimentales del Experimento IV

	DIETA				
	1	2	3	4	5
Harina de calamar	---	60,85	64,98	64,98	64,98
Harina de calamar desengrasada	61,52	5,82	---	---	---
Aceite de pescado	---	---	1,11	3,43	4,8
Grasa de vaca	13,32	8,47	7,09	4,77	---
EPA (28)	---	---	---	---	3,4
Minerales	2	2	2	2	2
Vitaminas	2	2	2	2	2
Vitamina E	25	25	25	25	25
Carboximetil celulosa	1	1	1	1	1
Alfa celulosa	0,3	0	1,96	1,96	1,96
Almidón	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
Dextrina	2,46	2,46	2,46	2,46	2,46
Salvado de trigo	10	10	10	10	10

Tabla XXXVI.- Composición analizada de las dietas experimentales del Experimento IV

	DIETA				
	1	2	3	4	5
Proteínas	52,35	54,62	54,69	53,87	54,05
Lípidos	19,45	18,12	19,18	19,23	16,5
Cenizas	5,37	5,74	5,46	5,48	5,15
Humedad	6,97	7,85	9,99	7,82	14,12
Vitamina E (mg/kg)	270,23	265,35	272,23	256,54	269,25
n-3 HUFA (% peso seco)	0,36	1,9	2,84	4,38	6,67

Tabla XXXVII.- Composición en los principales ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de las dietas experimentales del Experimento IV

ÁCIDOS GRASOS	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5
14: 0	2,69	2,52	2,9	3,87	5,32
16: 0	25,4	26,62	25,72	24,74	19,3
16: 1n-7	1,62	1,21	2,02	3,49	6,54
18: 0	27,47	22,11	18,59	13,8	2,58
18: 1n-9	31,51	24,61	22,47	18,78	7,06
18: 2n-6	3,42	3,37	3,25	3,23	3,16
18: 3n-3	0,29	0,3	0,34	0,49	0,81
18: 4n-3	0,14	0,09	0,37	1,12	3,15
20: 4n-6	0,02	0,12	0,38	0,57	0,96
20: 5n-3	0,65	3,15	4,91	9,32	19,47
22: 6n-3	1,02	7,46	8,9	12,65	17,84
Saturados	56,78	52,29	48,19	43,77	25,74
Monoinsaturados	34,09	28,67	26,46	24,91	16,9
n-3	2,71	12,91	16,05	25,02	40,91
n-6	4,08	4,04	4,54	4,54	5,21
n-9	32,31	27,29	24,2	20,99	10,33
n-3 HUFA	1,87	11,11	14,84	22,78	40,45
AA/EPA	0,03	0,038	0,077	0,061	0,049
OLEICO/n-3 HUFA	16,85	2,21	1,51	0,82	0,17

3.4.3.- RESULTADOS

Calidad de la puesta

La aceptación de todas las dietas experimentales fue excelente y no se observaron mortalidades durante el periodo experimental. No hubo ninguna diferencia significativa en la ingesta diaria de las dietas. Se obtuvieron puestas en 12 de los 15 replicados de tal manera que de los reproductores alimentados con las Dietas 1, 2 y 3 solo pusieron 2 replicados y los tres replicados de las Dietas 4 y 5. Se comprobó la inexistencia de diferencias significativas, en los Parametros de Calidad, entre los replicados de una misma dieta. En la Tabla XXXVIII se indican los resultados obtenidos tras tres semanas de alimentación con las dietas experimentales, observándose que el porcentaje de huevos vivos significativamente más alto corresponde a las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 3 que contenía un 2,84% de n-3 HUFA en peso seco, y el más bajo a las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 que contenía el nivel de n-3 HUFA más bajo 0,36% en peso seco. Los reproductores alimentados con las Dietas 4 y 5 con contenidos en n-3 HUFA superiores al 2,84% en peso seco, tuvieron porcentajes de huevos vivos significativamente menores que los de la Dieta 3. Las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 5 no se diferenciaron significativamente de las puestas de los reproductores alimentados con de la Dieta 2, encontrándose una correlación polinómica altamente significativa entre los niveles dietéticos de n-3 HUFA y el porcentaje de huevos vivos (Fig. 33) y una correlación lineal entre este porcentaje y la relación AA/EPA de las dietas (Fig. 35).

El porcentaje menor de huevos no fecundados corresponde a las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 5, que contenía el nivel más alto de n-3 HUFA, y el mayor a las puestas de los

reproductores alimentados con la Dieta 1, que contenía el nivel más bajo de n-3 HUFA, existiendo diferencias significativas entre las puestas de los reproductores alimentados con esta dieta y el resto de las puestas, y de las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 2 y 3 con las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 4 y 5. Se encontró una correlación negativa altamente significativa entre este índice y los niveles dietéticos de n-3 HUFA (Fig. 35). También se encontraron correlaciones positivas entre el porcentaje de huevos no fecundados con el ácido oleico y con la relación oleico/n-3 HUFA (Fig. 36).

Los reproductores alimentados con cualquiera de las dietas experimentales tuvieron puestas con huevos con más de una gota de grasa, aunque no hubo diferencias significativas en este índice entre las puestas de los grupos experimentales.

Las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 3 muestran el porcentaje de eclosión más elevado y las de la Dieta 2 el más bajo existiendo diferencias significativas entre las puestas de esta dieta y el resto de las puestas y entre las puestas de la Dieta 3 y las puestas de las Dietas 1 y 5, pero no con la Dieta 4 que a su vez difiere de la Dieta 1. Existe una correlación positiva entre este índice y el nivel dietético de la relación AA/EPA (Fig. 38). El porcentaje de supervivencia larvaria también es mayor en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 3 y el menor porcentaje tal como sucedía con el porcentaje de huevos vivos, el de la Dieta 1. Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia larvaria entre las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 3 y el de las puestas de los otros grupos de reproductores. Al igual que sucedió con el porcentaje de eclosión, existe una correlación positiva de la tasa de supervivencia larvaria con el nivel dietético de la relación AA/EPA (Fig. 39).

Tabla XXXVIII.- Índices de las puestas de los reproductores del Experimento IV, alimentados con las dietas experimentales (media \pm desviación típica)

DIETA	% HUEVOS VIVOS	% HUEVOS MUERTOS	% HUEVOS NO FECUNDADOS	% HUEVOS ANORMALES (MORFOLOGÍA)
	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01
1 (n = 84)	56,50 \pm 11,71 ^d	22,38 \pm 5,11 ^c	15,57 \pm 9,13 ^c	5,54 \pm 3,25 ^c
2 (n = 96)	72,15 \pm 7,49 ^c	19,69 \pm 6,58 ^c	5,22 \pm 2,92 ^b	2,94 \pm 1,65 ^b
3 (n = 97)	81,05 \pm 6,71 ^a	12,14 \pm 5,26 ^a	4,67 \pm 3,77 ^b	2,12 \pm 1,04 ^{ab}
4 (n = 107)	77,94 \pm 7,55 ^b	18,35 \pm 7,74 ^b	2,77 \pm 2,83 ^a	0,93 \pm 0,54 ^a
5 (n = 118)	67,99 \pm 8,98 ^c	29,86 \pm 7,98 ^d	1,98 \pm 4,88 ^a	0,16 \pm 0,11 ^a
	% HUEVOS ANORMALES (N° GOTAS)	% ECLOSIÓN	% LARVAS ANORMALES	% SUPERVIVENCIA LARVARIA
	P = 0,12	P < 0,01	P = 0,25	P < 0,01
1 (n = 84)	0,58 \pm 3,85	92,61 \pm 5,41 ^c	1,96 \pm 1,02	22,62 \pm 14,86 ^{ac}
2 (n = 96)	0,44 \pm 4,76	88,26 \pm 5,12 ^d	2,02 \pm 0,99	26,23 \pm 16,79 ^c
3 (n = 97)	0,83 \pm 3,27	98,00 \pm 2,51 ^a	2,16 \pm 1,52	38,75 \pm 17,64 ^a
4 (n = 107)	0,43 \pm 5,43	97,53 \pm 3,19 ^{ab}	1,98 \pm 1,25	30,58 \pm 18,20 ^b
5 (n = 118)	0,62 \pm 3,84	94,86 \pm 5,66 ^b	1,89 \pm 1,86	27,71 \pm 16,7 ^b

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

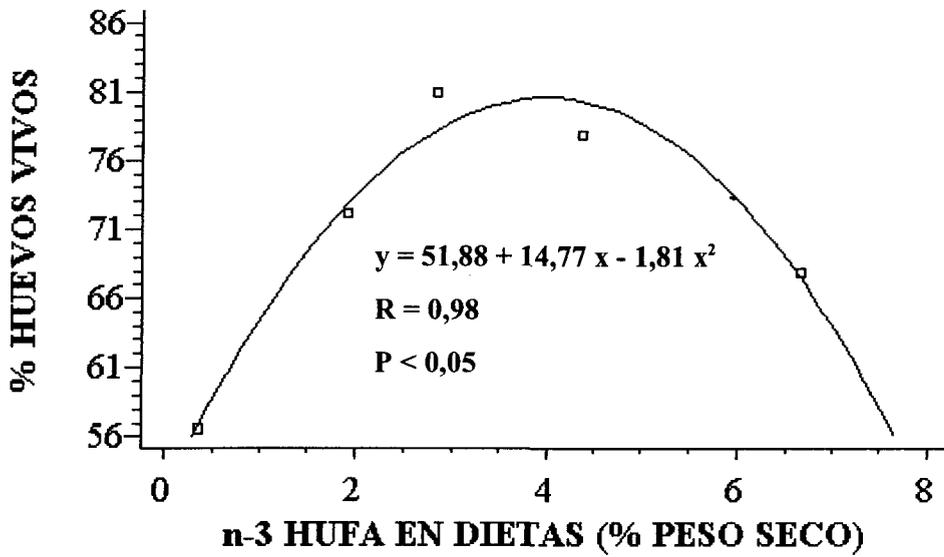


Fig. 34.- Relación entre el porcentaje de huevos vivos y el nivel dietético de n-3 HUFA en el Experimento IV.

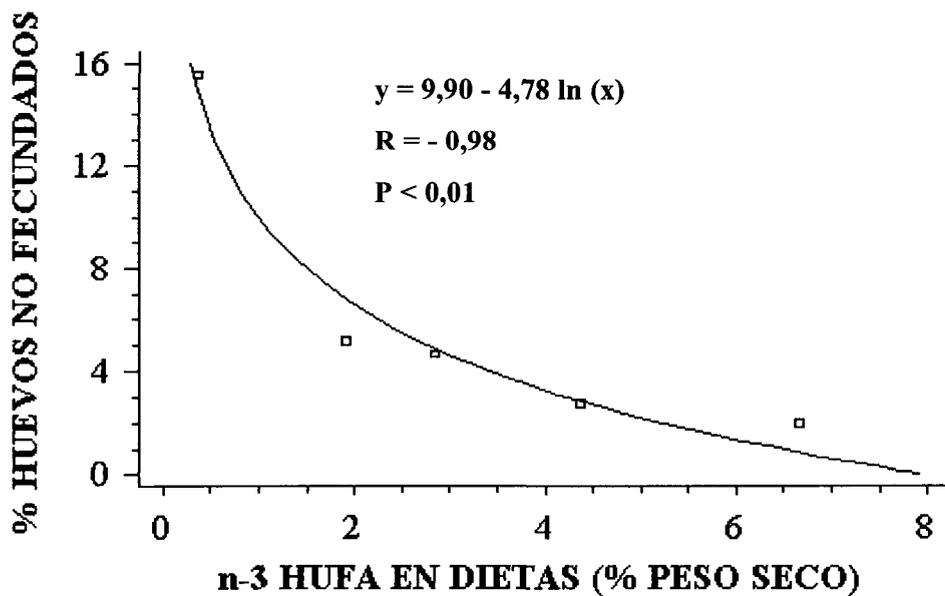


Fig. 35.- Relación entre el porcentaje de huevos no fecundados y el nivel dietético de n-3 HUFA en el Experimento IV.

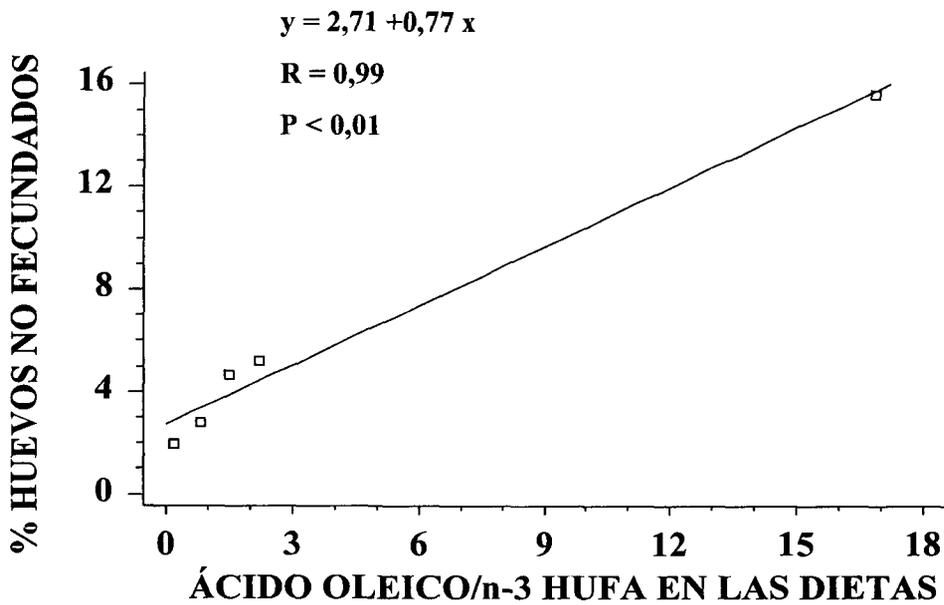
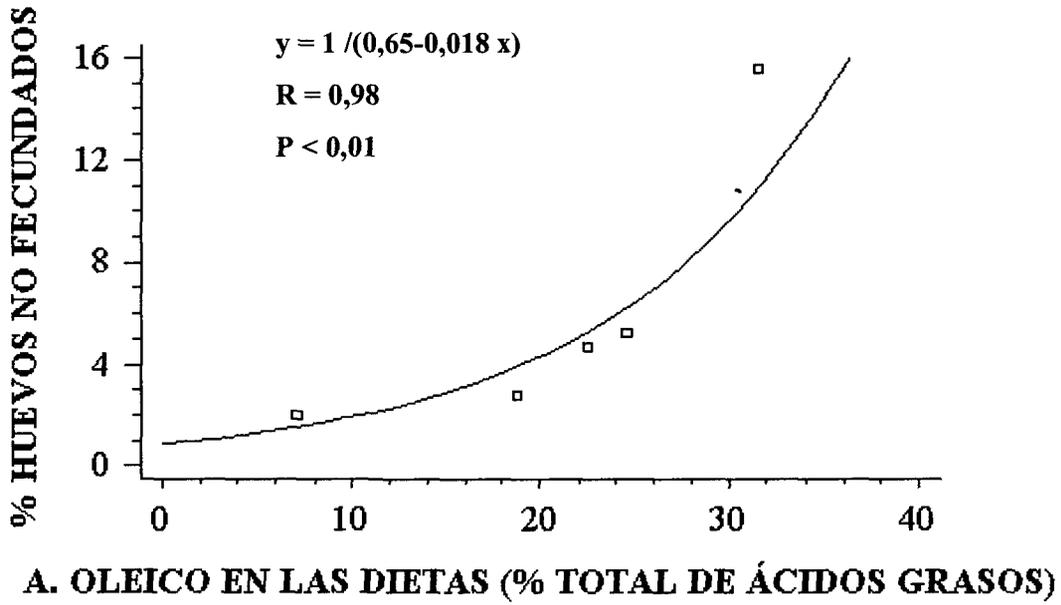


Fig. 36.- Relación entre el porcentaje de huevos no fecundados con el nivel dietético de oleico y con la relación oleico/n-3 HUFA.

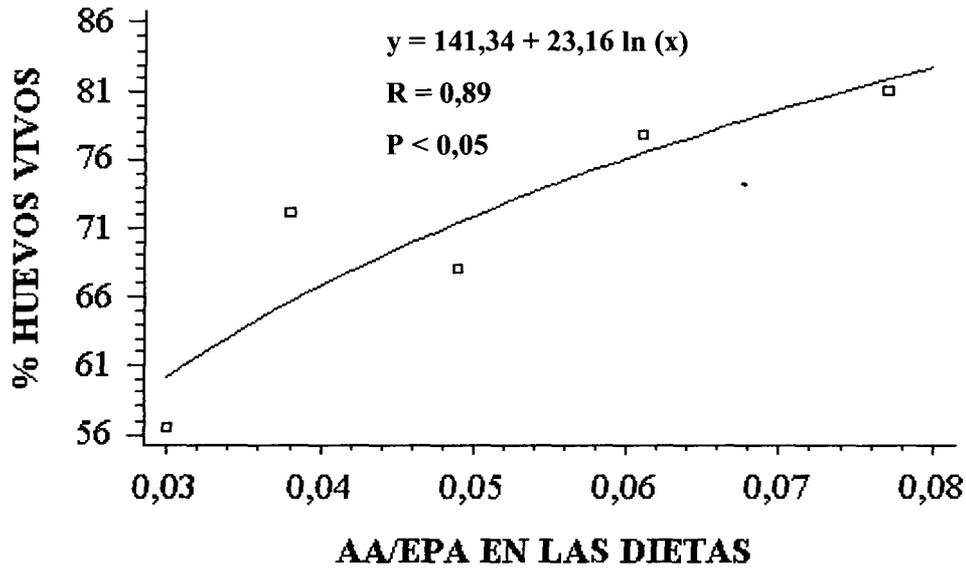


Fig. 37.-Relación entre el porcentaje de huevos vivos y el nivel dietético de la proporción AA/EPA.

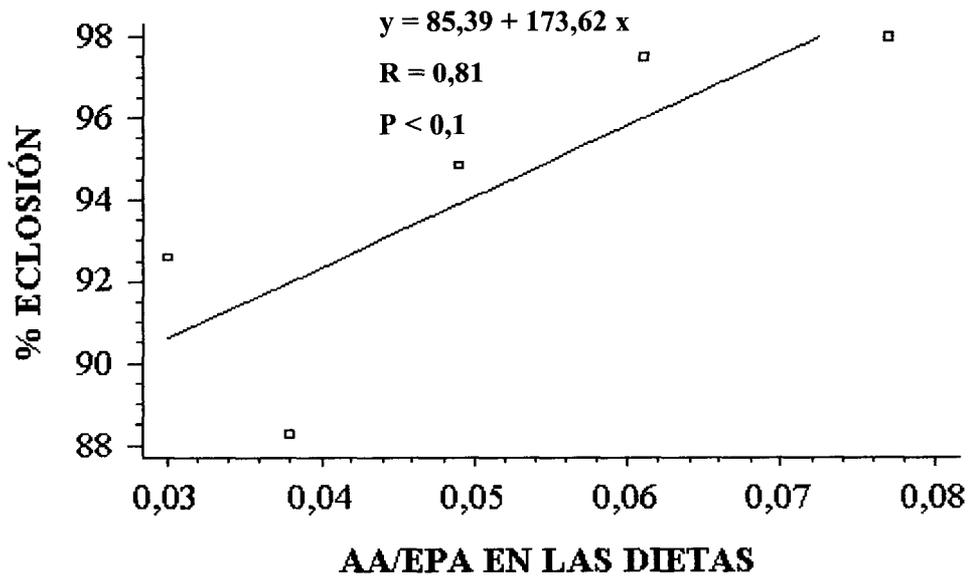


Fig. 38.- Relación entre el porcentaje de eclosión y el nivel dietético de la proporción AA/EPA.

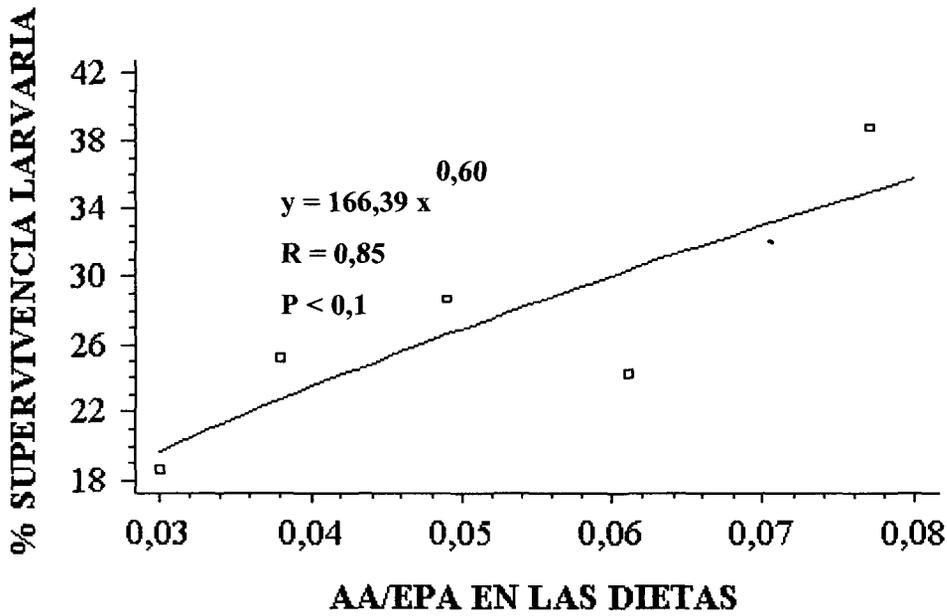
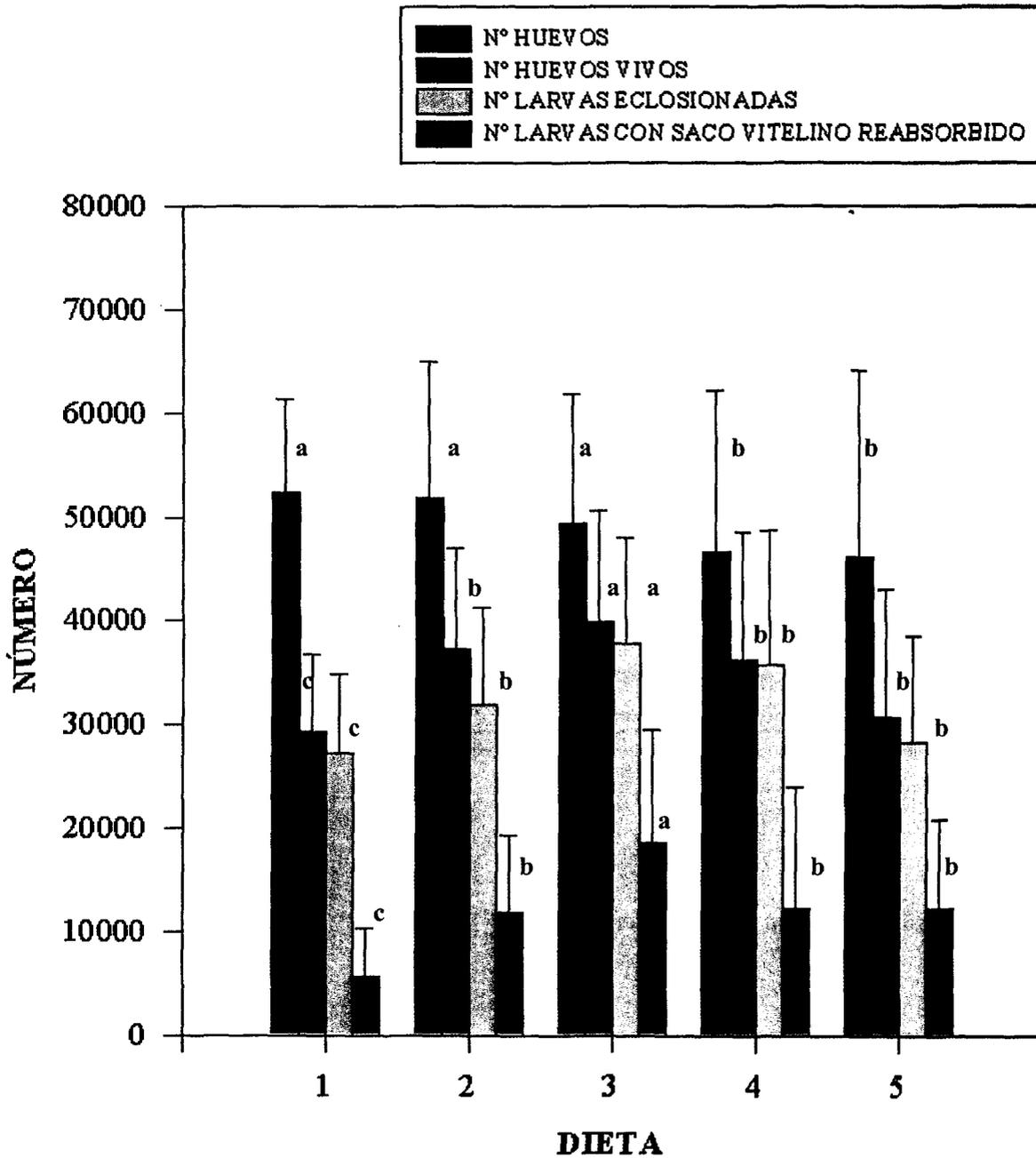


Fig. 39.- Relación entre el porcentaje de supervivencia larvaria y el nivel dietético de la proporción AA/EPA.

En la Fig. 40, se indican las Producciones relativas de los grupos experimentales, observándose que los reproductores alimentados con la Dieta 1 son los que pusieron mayor número de huevos diferenciándose significativamente de las producciones de los reproductores alimentados con las Dietas 4 y 5, pero no de las producciones de los reproductores alimentados con las Dietas 1 y 2. Debido a los bajos porcentajes de huevos vivos obtenidos en las puestas de los reproductores alimentados con las Dietas 1 y 5, el número de huevos vivos producidos por los reproductores alimentados con ambas dietas se diferencian significativamente de los producidos por los alimentados con las Dietas 2, 3 y 4. El número de larvas eclosionadas sigue la misma pauta que el número de huevos vivos. El mayor número de larvas

con el saco vitelino reabsorbido obtenido corresponde a los reproductores alimentados con la Dieta 3 que se diferencia significativamente de las obtenidas con las otras dietas, y el menor corresponde a la Dieta 1 que a su vez se diferencia significativamente de las obtenidas de los reproductores alimentados con las Dietas 2, 4 y 5.

En la Tabla XXXIX se especifican las Medidas de huevos y larvas de las puestas de los reproductores alimentados con las dietas experimentales observándose que los huevos con mayor tamaño son los producidos por los reproductores alimentados con las Dietas 4 y 5, que se diferenciaron significativamente de los puestos por los reproductores alimentados con la Dieta 3 que a su vez se diferencian significativamente de los de las Dietas 1 y 2. El diámetro de la gota de grasa sigue una pauta similar diferenciándose significativamente el diámetro de la gota de grasa de los huevos de los reproductores alimentados con las Dietas 3, 4 y 5 con los de las Dietas 1 y 2. Las larvas con un día de vida de menor tamaño fueron las producidas por los reproductores alimentados con la Dieta 5 que no se diferenciaron significativamente de las de la Dieta 1 pero sí de las producidas por los reproductores alimentados con las otras tres dietas. Las larvas más grandes de un día de vida fueron producidas por los reproductores de la Dieta 4 que se diferenciaron significativamente del resto. Las larvas mayores de tres días fueron producidas por los reproductores alimentados con la Dieta 2 que se diferencian significativamente del resto, no diferenciándose significativamente las de las Dietas 3 y 4 ni las de las Dietas 1 y 5 pero sí hubo diferencias significativas entre estos dos grupos.



*Barras, del mismo color, sin o con una misma letra no presentan diferencias significativas. Barras, del mismo color, con diferentes letras presentan diferencias significativas.

Fig. 40.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada, del Experimento IV, alimentados con las dietas experimentales.

Tabla XXXIX. Medidas de huevos y larvas de las puestas de los reproductores del Experimento IV (media \pm desviación típica)

DIETA	DIÁMETRO	DIÁMETRO	LONGITUD	LONGITUD
	HUEVO	GOTA DE GRASA	LARVAS 1 DÍA	LARVAS 3 DÍAS
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01
1	0,974 \pm 0,013 ^c (n = 520)	0,232 \pm 0,006 ^b (n = 520)	3,024 \pm 0,151 ^{bc} (n = 452)	3,482 \pm 0,214 ^c (n = 322)
2	0,971 \pm 0,023 ^c (n = 560)	0,228 \pm 0,007 ^b (n = 556)	3,028 \pm 0,166 ^b (n = 412)	3,573 \pm 0,211 ^a (n = 452)
3	0,980 \pm 0,016 ^b (n = 620)	0,235 \pm 0,008 ^a (n = 620)	3,036 \pm 0,124 ^b (n = 385)	3,549 \pm 0,166 ^b (n = 360)
4	0,986 \pm 0,017 ^a (n = 860)	0,235 \pm 0,007 ^a (n = 860)	3,082 \pm 0,148 ^a (n = 602)	3,529 \pm 0,157 ^b (n = 486)
5	0,987 \pm 0,0153 ^a (n = 790)	0,237 \pm 0,009 ^a (n = 770)	3,002 \pm 0,151 ^c (n = 439)	3,457 \pm 0,181 ^c (n = 472)

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas.

Composición bioquímica de los huevos

La composición bioquímica de los huevos se indica en la Tabla LXIX, en la que se observa que los ácidos grasos más abundantes en los lípidos totales de los huevos son el ácido palmítico (16:0), el oleico (18:1n-9), el DHA (22:6n-3) y el palmitoleico (16:1n-7) independientemente de la dieta utilizada. El nivel de ácidos grasos n-3 y n-3 HUFA en los huevos aumenta con el aumento de estos mismos ácidos grasos en las dietas, existiendo correlaciones positivas entre ambos contenidos (Fig.41).

En cuanto a la composición bioquímica de los huevos y su relación con los Índices de las puestas se han encontrado correlaciones polinómicas entre el porcentaje de huevos vivos y el contenido en n-3 HUFA y DHA de los huevos (Fig. 42); correlaciones lineales positivas entre los porcentajes de eclosión y de supervivencia larvaria y la relación AA/EPA (Fig.43) y correlaciones lineales negativas entre el porcentaje de huevos no fecundados y los niveles de EPA y ácidos grasos saturados en los huevos (Fig. 44).

También se han encontrado correlaciones lineales positivas entre el contenido en AA y en EPA de los huevos y el diámetro de los mismos (Fig. 45) y del contenido en EPA con el diámetro de la gota de grasa (Fig. 46).

Tabla XL.- Composición en los principales ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos del Experimento IV

ÁCIDOS GRASOS	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4	DIETA 5
14: 0	243	273	284	202	297
16: 0	2388	2389	2430	2397	2404
16: 1n-7	933	885	796	804	757
18: 0	625	698	783	840	705
18: 1n-9	2325	2350	2124	2035	1726
18: 2n-6	325	340	370	355	381
18: 3n-3	30	40	65	76	84
18: 4n-3	50	56	84	75	49
20: 4n-6	35	24	76	81	85
20: 5n-3	370	337	385	417	587
22: 6n-3	1455	1630	1758	1856	1957
Saturados	3395	3405	3533	3589	3621
Monoinsaturados	3505	3245	2956	2880	2532
n-3	2015	2169	2350	2490	2723
n-6	910	978	1042	930	925
n-9	2412	2425	2174	2055	1876
n-3 HUFA	1925	2022	2225	2320	2652
AA/EPA	9	7	20	19	14

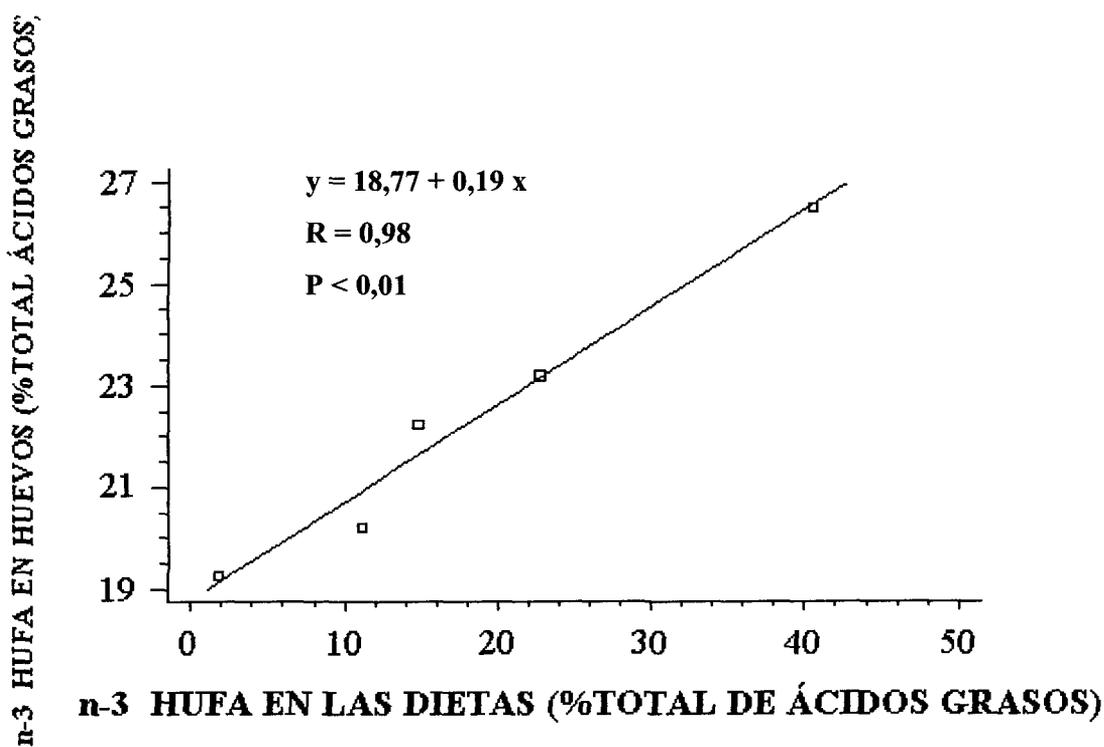
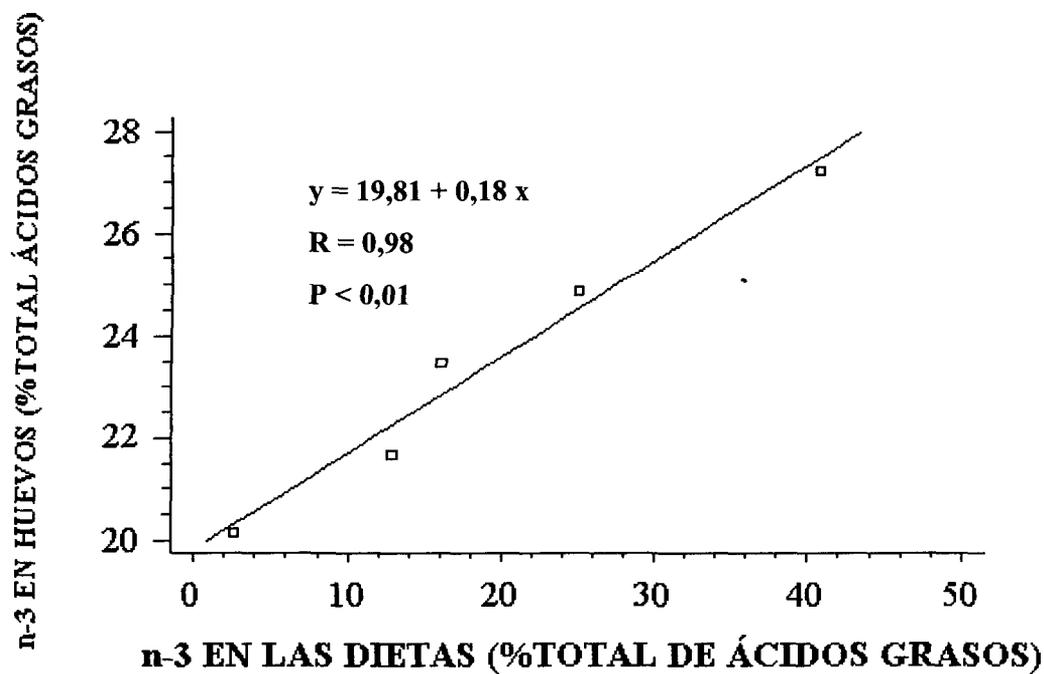


Fig. 41.- Relacion entre los niveles dietéticos de los ácidos grasos de la serie n-3 y de n-3 HUFA y su contenido en los huevos.

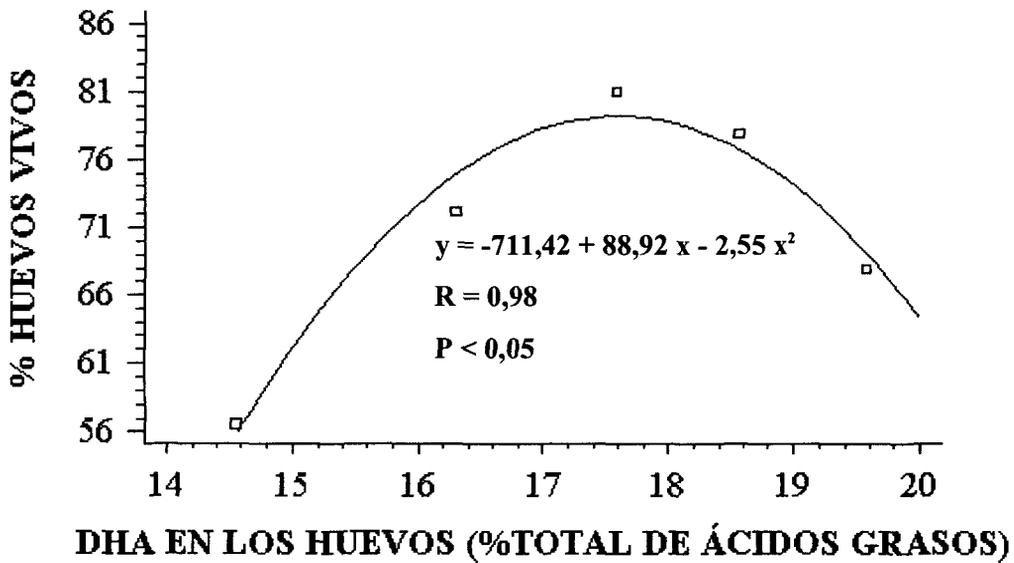
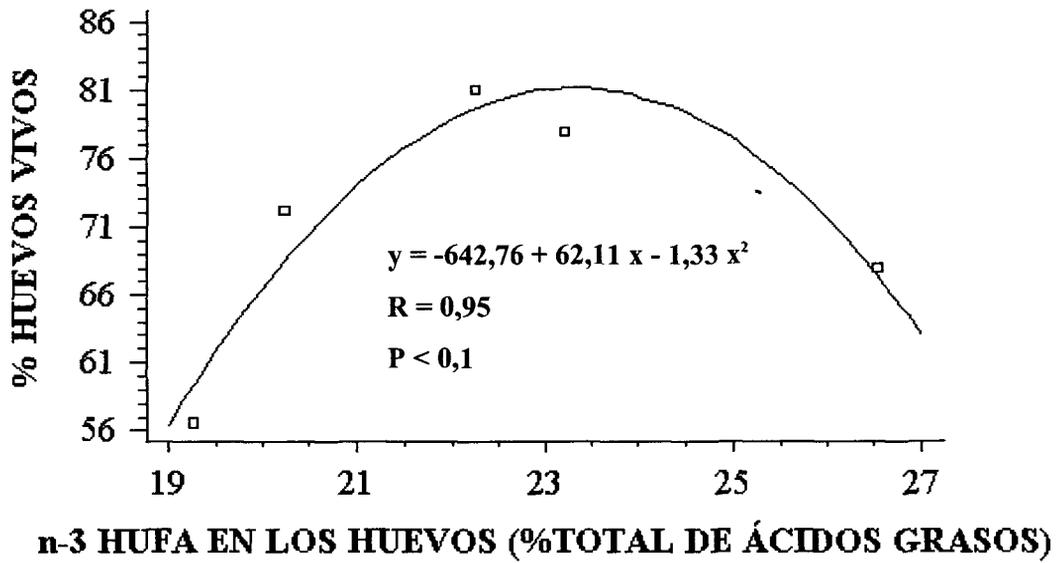


Fig.42.- Relación entre el porcentaje de huevos vivos y los niveles de n-3 HUFA y de DHA en los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las dietas experimentales del Experimento IV.

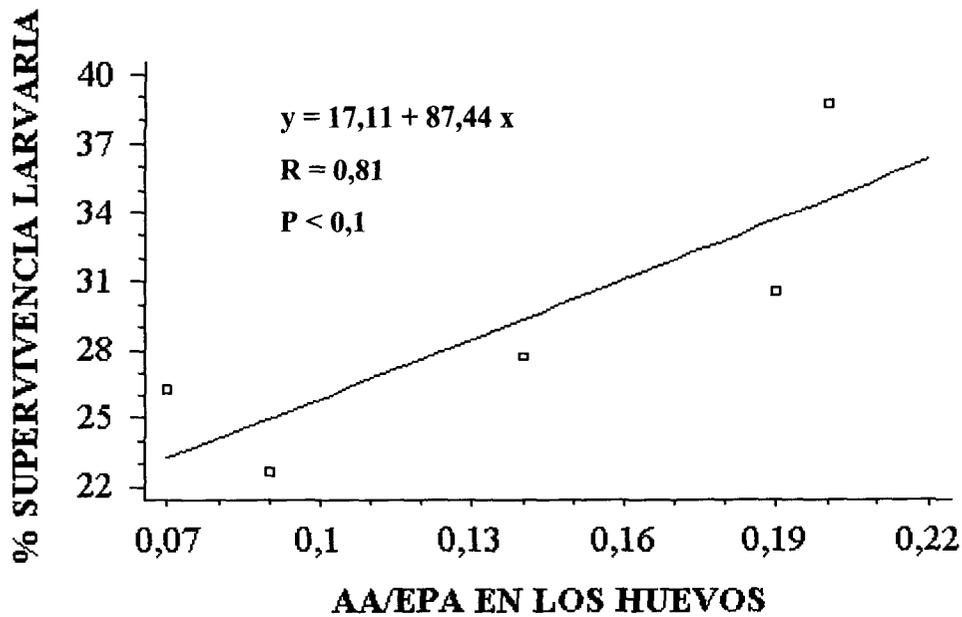
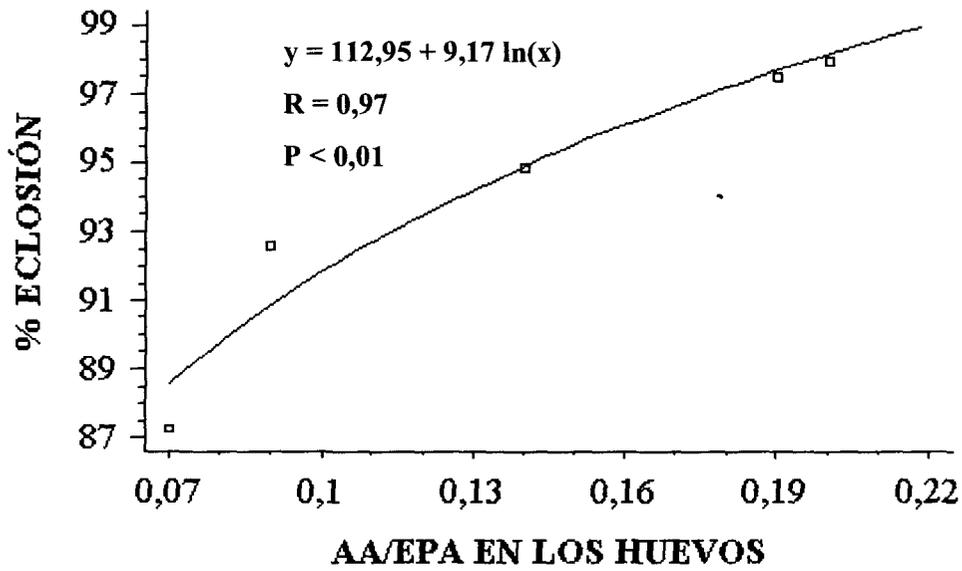


Fig. 43.- Relación entre los porcentajes de eclosión y de supervivencia larvaria con el nivel de la proporción AA/EPA en los huevos.

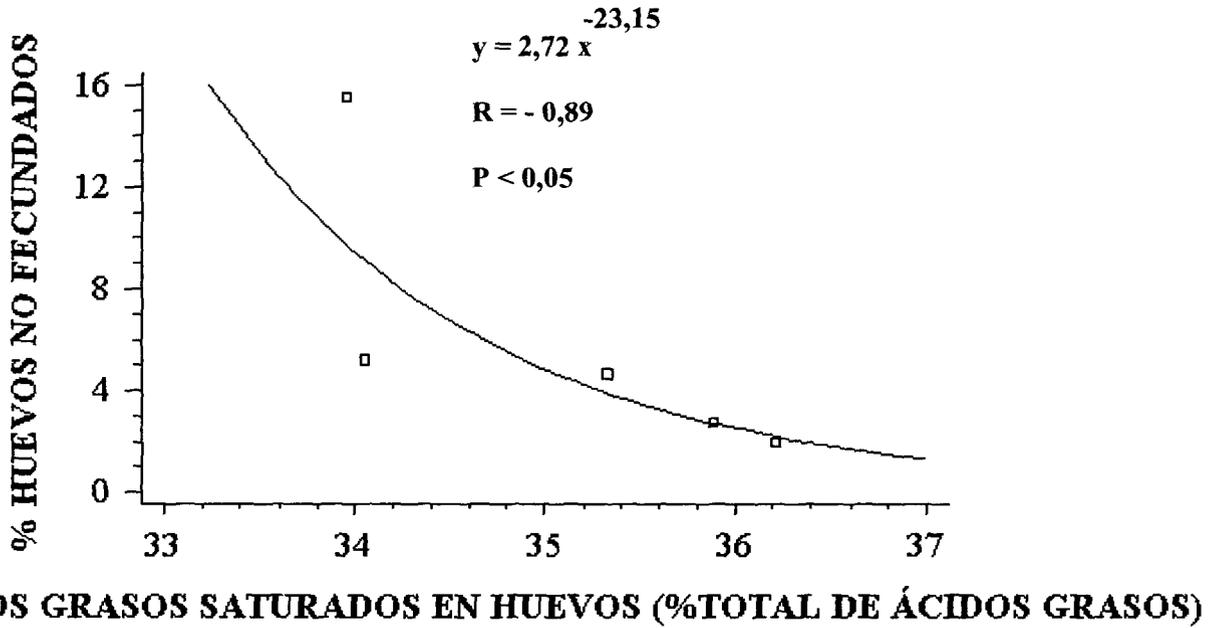
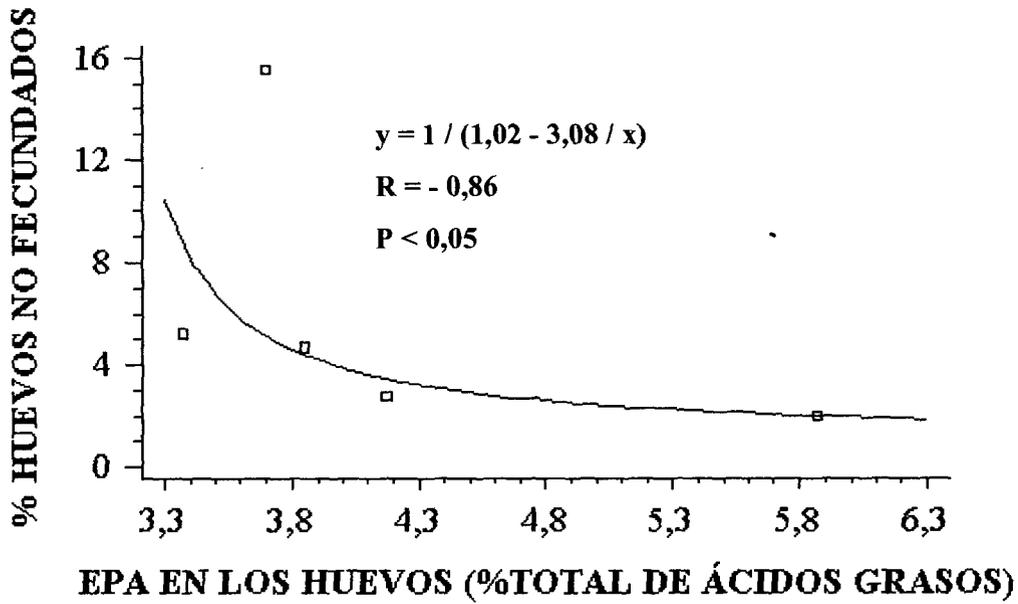


Fig. 44.- Relación entre el porcentaje de huevos no fecundados y el contenido en EPA y en ácidos grasos saturados de los huevos del Experimento IV.

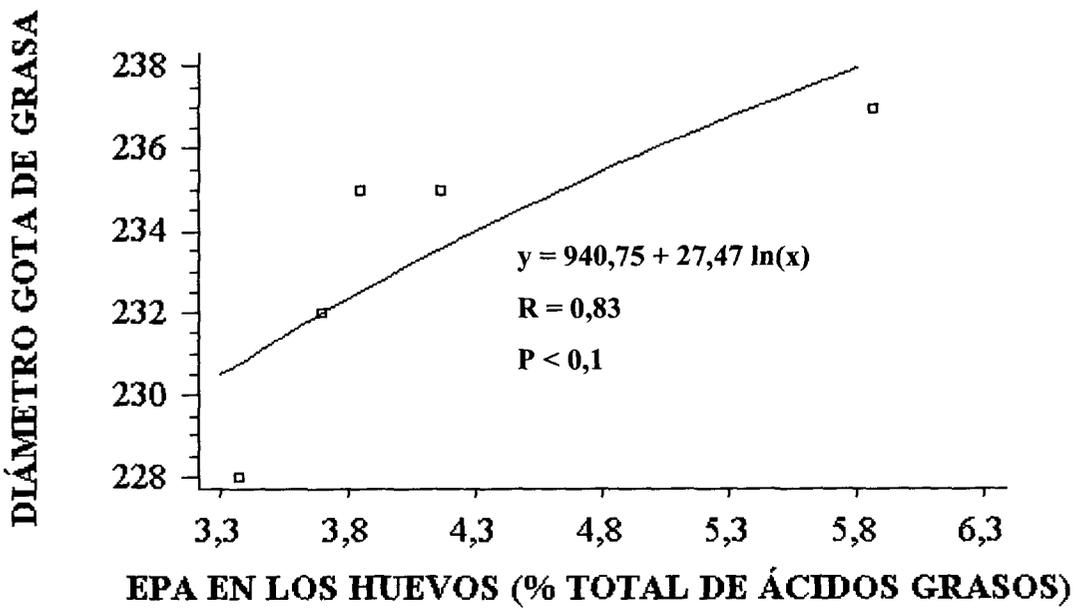
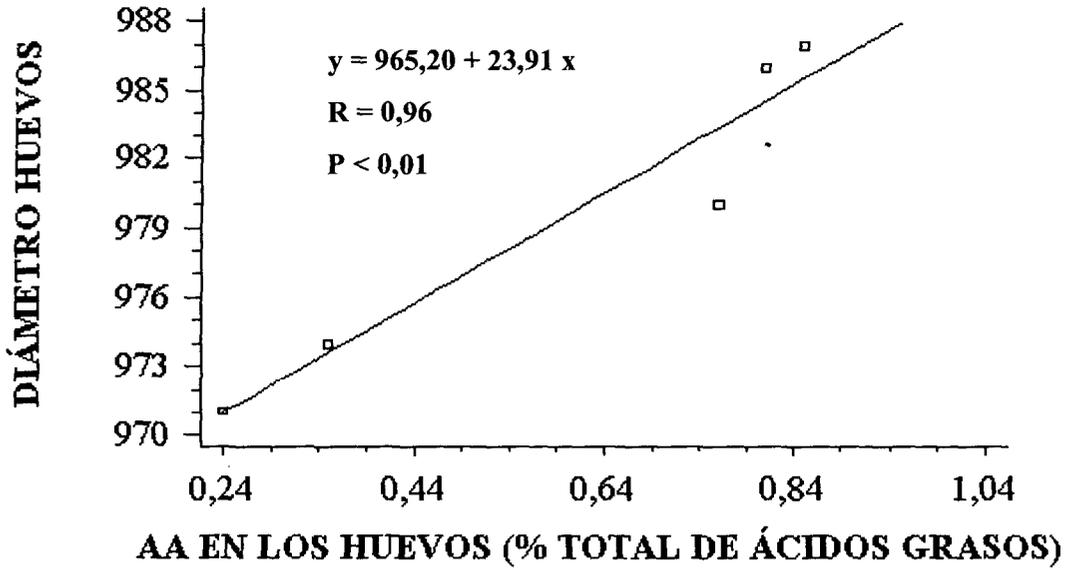


Fig. 45.- Relación entre el diámetro de los huevos y el nivel de AA y EPA en los mismos.

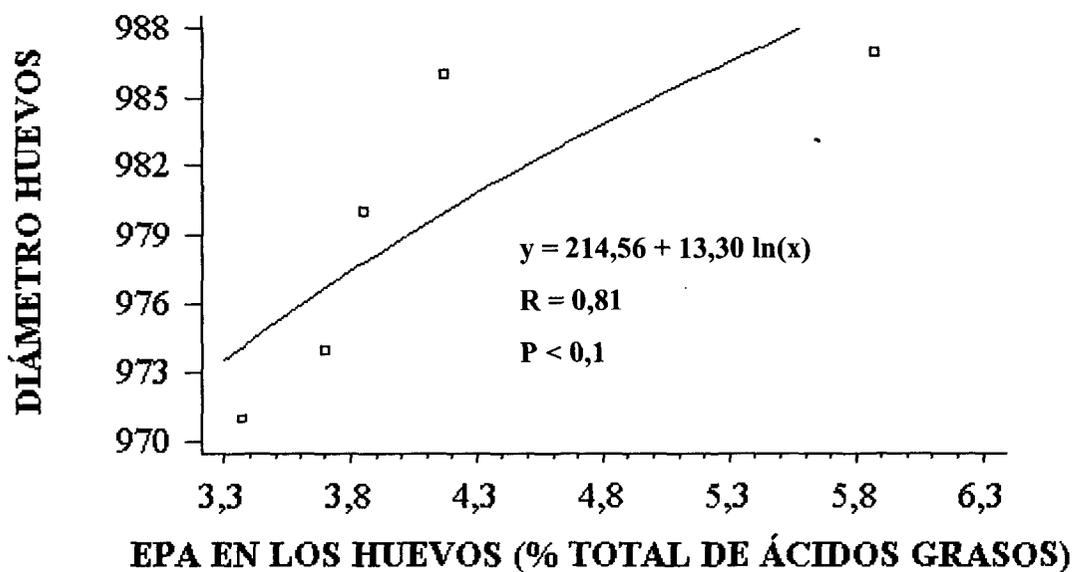


Fig. 46.- Relación entre el diámetro de la gota de grasa y el nivel de EPA en los huevos del Experimento IV.

3.4.4.- DISCUSIÓN

Los efectos de los niveles dietéticos de n-3 HUFA en la calidad de las puestas han sido estudiados en varias especies (Watanabe *et al.*, 1984 a; Mourente *et al.*, 1989; Dhert *et al.*, 1991; Bruce *et al.*, 1993; Navas *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998; Lavens *et al.*, 1999; Furuita *et al.*, 2002, 2003 b; Mazorra *et al.*, 2003). La mayoría de estos trabajos investigan el efecto de una deficiencia de los n-3 HUFA dietéticos en la calidad de las puestas y en la composición bioquímica de los huevos. En esos trabajos la calidad de la puesta disminuye con la disminución de los n-3 HUFA dietéticos. El porcentaje de huevo

vivos es un parámetro importante para evaluar la calidad de la puesta (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, d; Rodríguez *et al.*, 1998; Furuita *et al.*, 2000). En el Experimento I el porcentaje de huevos vivos fue más bajo en las puestas de los reproductores alimentados con las dietas con más bajo contenido en n-3 HUFA (1,13 % peso seco) y más elevado en las puestas de los reproductores alimentados con las dietas con más alto contenido en n-3 HUFA (3,15% peso seco). En el presente experimento el porcentaje de huevos vivos más alto fue el de las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 3 (2,84% n-3 HUFA en peso seco) en comparación con las puestas de reproductores alimentados con dietas conteniendo tanto más bajas como más altas cantidades de n-3 HUFA confirmando los resultados de las experiencias anteriores. Sin embargo, niveles superiores a 2,84 % de n-3 HUFA redujeron considerablemente el porcentaje de huevos vivos. Así, estos resultados sugieren que niveles, tanto excesivos como insuficientes, de n-3 HUFA en las dietas de reproductores tienen un efecto negativo sobre las puestas de la dorada (*Sparus aurata*). Resultados similares son encontrados por Furuita *et al.* (2000, 2002), que en dos experimentos con reproductores de lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) alimentados con dietas conteniendo diferentes niveles de n-3 HUFA (entre 0,42 y 6,2% peso seco) encuentran que el mayor porcentaje de huevos vivos se obtiene con una dieta conteniendo un 2,11% de n-3 HUFA.

Tal como sucedió en los Experimentos I y II encontramos una clara correlación entre el porcentaje de huevos no fecundados y los niveles dietéticos de n-3 HUFA. Almansa *et al.*, (1999) encuentran que el porcentaje de fertilización está negativamente afectado por la composición en ácidos grasos de una dieta deficiente en HUFA, observando además una correlación negativa entre los ácidos linolénico y oleico, y la relación oleico/n-3 HUFA con el porcentaje de fecundación lo que sugiere la importancia del mantenimiento de los niveles de n-3 HUFA en los fosfolípidos de la membrana de los huevos y también del balance entre los HUFA y otros ácidos grasos tales como el oleico y el linolénico para obtener altas calidades de puesta. Rodríguez *et al.* (1998) señalan que el porcentaje de fecundación

de los huevos en puestas de dorada es menor con una dieta deficiente en n-3 HUFA. El bajo porcentaje de fecundación puede ser debido no solo a la calidad del huevo sino además a la calidad del espermatozoide lo que fue sugerido por Watanabe *et al.* (1984d). Vassallo-Agius *et al.* (2001c) encuentran una reducción en la movilidad de los espermatozoides de machos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con una dieta deficiente en n-3 HUFA implicando una disminución del porcentaje de fecundación al fertilizar con este espermatozoide huevos procedentes de hembras alimentadas con una dieta control con n-3 HUFA.

En el presente experimento se obtuvieron huevos con más de una gota de grasa en las puestas de los reproductores alimentados con cualquiera de las dietas experimentales. Makino *et al.* (1999) observaron que era frecuente en las puestas del róbalo japonés (*Lateolabrax japonicus*) la existencia de huevos con más de una gota de grasa y siguiendo su desarrollo comprobaron que la fusión en una sola gota lipídica, en la mayoría de las ocasiones, ocurría durante la formación de las capsulas ópticas en el embrión en desarrollo, teniendo estos huevos altos porcentajes de eclosión y de larvas normales.

En el Experimento I se encontró un significativo descenso del porcentaje de supervivencia larvaria cuando los reproductores fueron alimentados con una dietas conteniendo niveles de n-3 HUFA superiores al 1,6 % sin embargo en el Experimento III con un porcentaje de 2.5% HUFA se obtuvieron los mejores resultados al igual que en el presente experimento en el que se obtuvieron con un nivel de 2,84 %; en ambos experimentos estas dietas fueron complementadas con 250mg/kg de vitamina E. Esto sugiere que los resultados obtenidos en el Experimento I pueden ser explicados por una inadecuada protección de los lípidos a la oxidación durante el desarrollo embrionario (Lavens *et al.*, 1999). Esta sugerencia está apoyada por el hecho de que el porcentaje de eclosión del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) alimentado con dietas ricas en n-3 HUFA es mejorado con la adición de vitaminas C y E en



las dietas (Lavens *et al.*, 1999). Lavens *et al.* (1999) indican que un 22-26% de n-3 HUFA en la fracción lipídica de las dietas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) cubren los requerimientos necesarios para una óptima calidad de los gametos. En el lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) Furuita *et al.* (2002) señalan que un 20% de n-3 HUFA en la fracción lipídica de las dietas es el óptimo para una alta calidad de las puestas. De acuerdo con los experimentos de este trabajo, en el caso de la dorada este porcentaje es del 15-20 % dependiendo de la complementación de la dieta con vitamina E.

Recientemente la atención se ha centrado sobre los ácidos grasos de la serie n-6, especialmente del ácido araquidónico (AA, 20: 4n-6). Algunos autores han señalado la importancia de la relación AA/EPA en el desarrollo larvario (Sargent *et al.*, 1999; Koven *et al.*, 2001). Bell *et al.* (1997) y Bruce *et al.* (1999) han sugerido la importancia de las relaciones AA/EPA y EPA/DHA contenidas en dietas para reproductores para mejorar la calidad de las puestas. El AA es el mayor precursor de eicosanoides en las células de los peces (Bell *et al.*, 1994; Bell y Sargent, 2003) y estos tres ácidos grasos AA, EPA y DHA son importantes para el control de la ovulación (Mustafa y Srivastava, 1989) y están probablemente implicados en la embriogénesis, desarrollo del sistema inmune, eclosión y desarrollo larvario inicial. Sin embargo, el EPA compite con el AA en la producción de eicosanoides, ejerciendo una influencia moduladora sobre la cantidad y eficiencia de los eicosanoides derivados del AA. Por consiguiente, la relación dietaria AA/EPA puede ser un factor nutricional crítico en dietas para larvas y reproductores. Así, en este experimento encontramos correlaciones positivas entre esta relación y los porcentajes de huevos vivos, eclosión y supervivencia larvaria. Navas *et al.* (2001) indican en lubina (*Dicentrarchus labrax*), un aumento en el porcentaje de eclosión al aumentar la relación AA/EPA. Mazorra *et al.* (2003) señalan un aumento en el porcentaje de huevos vivos y eclosión en puestas del halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) al incrementar el contenido en AA de las dietas, señalando como una adecuada relación EPA/AA, en las dietas para esta especie, la de 3-4:1. En el presente experimento

un nivel dietético de AA del 0,38% mejora la calidad de las puestas, sin embargo niveles superiores influyen negativamente en dicha calidad, encontrándose que la relación EPA/AA más adecuada para la mejora de la calidad de las puestas es de 13:1.

Sargent *et al.* (1999) indican que los requerimientos dietéticos óptimos de la relación EPA/AA para larvas de lubina es de 1:1 y de 10:1 o mayores para larvas de rodaballo y halibut. Furuita *et al.* (2003 b) señalan el efecto negativo de altos niveles de AA en dietas del lenguado del Pacífico (*Parlichthys olivaceus*) en la calidad de las puestas, posiblemente debido a un potencial efecto inhibitor en la bioconversión del EPA.

Tal como sucedió en el Experimento I, existen claras correlaciones entre el contenido dietético en los ácidos grasos de la serie n-3 y de los n-3 HUFA y su nivel en los huevos, y entre este nivel y el porcentaje de huevos vivos. También, en el Experimento I encontramos una relación entre el contenido en EPA y DHA, principales contribuidores de los HUFA, de los huevos y dicho porcentaje. El nivel de DHA contenido en los huevos aparece correlacionado con el porcentaje de huevos vivos y se encuentra en niveles más elevados que el EPA. Similares resultados son obtenidos por Nocillado *et al.* (2000) para perca gigante (*Lates calcarifer*), y por Pickova *et al.* (1997) para el bacalao (*Gadus morhua*). Los ácidos grasos poliinsaturados particularmente los de la serie n-3, y especialmente el DHA, proveen la energía demandada por los huevos y larvas en desarrollo (Watanabe, 1993; Sargent, 1995; Wiegand, 1996). El DHA tiene funciones estructurales y su principal papel es la formación de membranas especialmente en cerebro y ojos. En muchas especies marinas, el DHA ha demostrado ser más importante que el EPA como ácido graso esencial (Izquierdo *et al.*, 1989; Watanabe, 1993). Rainuzzo *et al.* (1997) sugieren que el DHA debe ser relativamente más alto que el EPA para prevenir un desequilibrio en la composición estructural de los fosfolípidos. Al igual que en el presente experimento, Nocillado *et al.* (2000) trabajando con huevos de la perca gigante encuentran una correlación positiva entre el contenido de los

ácidos grasos saturados y el porcentaje de fecundación, sugiriendo la importancia de estos ácidos grasos en las etapas tempranas del desarrollo. En arenque *Cuplea harengus*, (Tocher *et al.*, 1985b) y en halibut *Hippoglossus hippoglossus*, (Parrish *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1996) también se ha sugerido la importancia de los ácidos grasos saturados en la fecundación y desarrollo embrionario temprano. La reducción de los niveles de n-3 HUFA en los huevos, de la dieta deficiente, implica un decrecimiento de los niveles de EPA y DHA sugiriendo la importancia de ambos ácidos grasos en la calidad de las puestas. Sin embargo, Tveiten *et al.* (2004) señalan correlaciones negativas entre los porcentajes de huevos vivos y de eclosión con el contenido en AA y en EPA, y con la relación AA/DHA en huevos del pez lobo moteado (*Anarhichas minor*). Asimismo, encuentran una correlación negativa entre el porcentaje de huevos vivos con la relación AA/EPA señalando que no es un requerimiento universal altos contenidos en la relación AA/EPA para asegurar altas calidades en las puestas.

El número de huevos por puesta y kg de hembra fue mayor en las puestas de los reproductores alimentados con la Dieta 1 y descendió progresivamente con el aumento de los n-3 HUFA dietéticos, existiendo una correlación negativa ($y = 52829,0 - 1099,31 x$, $R = - 0,94$, $P < 0,05$) entre ambos parámetros. Similares resultados son reportados por Furuita *et al.* (2000) para el lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*). Bruce *et al.* (1999) alimentando reproductores del halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) con dos dietas ricas en DHA y AA respectivamente, señalan una mayor fecundidad realtiva en las hembras alimentadas con la dieta complementada con AA mientras que la complementada con DHA tiene similares resultados que la dieta control de pescado fresco. Furuita *et al.* (2003 b) encuentran que una dieta conteniendo un 0,6% de AA mejora la fecundidad del lenguado del Pacífico en relación con otra dieta que contiene el 0,1% de AA y otra conteniendo un 1,2%. Mazorra *et al.* (2003) no encuentran diferencias en la fecundidad de reproductores de halibut alimentados con una dieta conteniendo aceite de ojos de atún muy rico en AA y DHA y otra dieta basada en harina de krill. En el presente experimento,

los reproductores alimentados con la Dieta 3 fueron los que tuvieron los más altos porcentajes de huevos vivos, eclosión y supervivencia larvaria , aún a pesar de no poner el mayor número de huevos por puesta y kg, fueron los que tuvieron mejores resultados en los otros parámetros indicativos de las Producciones relativas es decir: número de huevos vivos, número de larvas eclosionadas y número de larvas con el saco vitelino reabsorbido, diferenciándose significativamente del resto de los reproductores.

A pesar de que el tamaño del huevo es la más simple y extendida medida de la calidad de las puestas (Thorsen *et al.*, 2003), tal como sucedió en los experimentos anteriores no encontramos relación entre dichas medidas y alguno de los Parámetros de Calidad de las puestas, ni entre el tamaño de los huevos y el de las larvas, aunque si y tal como sucedió en el Experimento II existen correlaciones entre los diámetros de los huevos y de la gota de grasa con el contenido en AA y EPA en los huevos. Diferencias de cierta magnitud en el tamaño de los huevos influyen en el tamaño de las larvas producidas (Knutsen y Tilseth , 1985; Gisbert *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001) y se piensa que puede alterar la probabilidad de supervivencia durante las sensibles etapas iniciales del desarrollo. Estudios en el medio natural indican la existencia de una correlación positiva entre el tamaño del huevo y la supervivencia larvaria en algunos años (Meekan y Fortier, 1996), esto, sin embargo, es muy difícil de confirmar bajo condiciones de laboratorio (Thorpe *et al.*, 1984; Gisbert *et al.*, 2000; Jonsson y Svavarsson, 2000; Oullet *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001).

4.- CONCLUSIONES

1.- La calidad de la puesta de la dorada y la composición bioquímica de los huevos está directamente afectada por los niveles de n-3 HUFA en las dietas de los reproductores después de tan solo tres semanas de alimentación con dichas dietas.

2.- Niveles de hasta el 1,6 % de n-3 HUFA en las dietas mejoran la calidad de puesta en términos de porcentaje de huevos vivos y de fecundación y producción de huevos y larvas con el saco vitelino reabsorbido. Un exceso de n-3 HUFA, por encima del 2,2%, en las dietas de los reproductores reducen la calidad produciendo un alto porcentaje de larvas con hipertrofia del saco vitelino y causando una reducción del 10% en la supervivencia larvaria. No se observaron larvas con hipertrofia del saco vitelino cuando los niveles de n-3 HUFA se elevaron al 2,5-2,8% y los niveles de vitamina E se incrementaron hasta 200-250 mg/kg. Cuando se elevan juntos los niveles dietéticos de n-3 HUFA y vitamina E se obtiene la mejor calidad de puesta poniendo de manifiesto la importancia de adecuados niveles de vitamina E en las dietas para la efectiva utilización de los ácidos grasos esenciales.

3.- En dietas con, una adecuada suplementación de vitamina E, un 15-20 %, de n-3 HUFA en la fracción lípida de las dietas cubren los requerimientos necesarios de la dorada para una óptima calidad de los gametos.

4.- El porcentaje de huevos vivos aumenta con la elevación de los niveles de n-3 HUFA en las dietas de los reproductores y con la incorporación de estos ácidos grasos en los huevos lo que indica la importancia de estos ácidos grasos esenciales para el desarrollo normal de huevos y embriones de dorada. Los niveles de EPA en los huevos fueron más directamente afectados por los n-3 HUFA de las dietas experimentales que los niveles de DHA.

5.- Un nivel dietético de ácido araquidónico del 0,38% mejora la calidad de la puesta, sin embargo niveles superiores influyen negativamente en dicha calidad

6.- En el presente estudio se han encontrado correlaciones entre las relaciones EPA/DHA y AA/EPA y la mayoría de los Índices de las puestas. Las dietas suministradas a los reproductores deben producir huevos con el correcto balance entre estos ácidos grasos; una relación EPA/DHÀ de 1 a 4 y AA/EPA de 1 a 13 aseguran una adecuada calidad de puesta

7.- Reproductores alimentados con la fracción lipídica insoluble de la harina de calamar mostraron una mejora en la calidad de sus puestas, en términos de fecundidad relativa y porcentaje de huevos vivos y de huevos fecundados. La proteína es uno de los factores nutricionales más importantes de la harina de calamar y es la responsable de la buena calidad de las puestas de los reproductores alimentados con dietas que la contienen. Las dos harinas, de pescado y de calamar, parecen ser buenas fuentes de lípidos para dietas de reproductores de dorada, con un alto contenido en ácidos grasos esenciales.

8.- La digestibilidad de la proteína de las dietas con harina de calamar es superior a la de la harina de sardina. De este modo, el superior valor nutricional de las dietas basadas en la harina de calamar, para mejorar la calidad de las puestas de dorada, podría estar relacionado con un más alto coeficiente de digestibilidad de esta proteína para esta especie. De hecho, los reproductores de dorada alimentados con la fracción lipídica insoluble de la harina de calamar, con un nivel de proteína en los huevos ligeramente mayor que el de los huevos de las puestas de los reproductores alimentados con la fracción lipídica insoluble de la harina de pescado, produjeron aproximadamente un 40% más de huevos por kilogramo de hembra.

9.- En la dorada criterios morfológicos como la simetría de los blastómeros en las primeras divisiones celulares y la transparencia del huevo, son buenos indicadores tempranos de la viabilidad de los huevos.

5.-BIBLIOGRAFÍA

- ABY-AYAD, S.-M. E.-A., C. MELARD y P. KESTEMONT. 1997. Effects of fatty acids in Eurasian perch broodstock diet on egg fatty acid composition and larvae stress resistance. *Aquacult. Int.*, 5: 161-168.
- AGIUS, R.V., T. WATANABE, S. SATOH, V. KIRON, H. IMAIZUMI, T. YAMAZAKI y K. KAWANO. 2001. Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research*, 32 (1): 263-272.
- AKIYAMA, T., M. SHIRAAISHI, T. YAMAMOTO y T. UNUMA. 1996. Effect of dietary tryptophan on maturation of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.*, 62 (5): 776-782.
- AKSNES, A., B. GJERDE y S.O. ROALD. 1986. Biological, chemical and organoleptic changes during maturation of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 53 (1): 7-20.
- ALI, M. y R.J. WOOTTON. 2000. Variation in rates of food consumption and evidence for compensatory responses in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. in relation to growth and reproduction. *Ecology of Freshwater Fish*, 9 (1-2): 103-108.
- ALMANSA, E., M.J. PEREZ, J.R. CEJAS, P. BADIA, J.E. VILLAMANDOS y A. LORENZO. 1999. Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season *Aquaculture*, 170 (3-4): 323-336.
- ALMANSA, E., M.V. MARTIN, J.R. CEJAS, P. BADIA, S. JEREZ y A. LORENZO. 2001. Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *Journal of Fish Biology*, 59 (2): 267-286.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemist. U.S.A., 1018 pp.

- ASTURIANO, J.F. 1999. El proceso reproductivo de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax* L.). Efectos de los ácidos grasos de la dieta: estudios "in vivo" e "in vitro". Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España, 251 pp.
- BAGENAL, T. M. 1966. The ecological and geographical aspects of the fecundity of the plaice. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 46:161-186.
- BAI, S.C. y D.M. GATLIN III. 1993. Dietary vitamin E concentration and duration of feeding affect tissue alpha-tocopherol concentrations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 113: 129-135.
- BAIZ, M. 1978. Fecundity of reared rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Ecologia*, 3: 57-64.
- BARKER, G.A., S.N. SMITH y N.R. BROMAGE. 1989. The bacterial flora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson and brown trout, *Salmo trutta* L. eggs and its relationship to developmental success. *Journal of Fish Diseases*, 12: 281-293.
- BELL, J.G. y J.R. SARGENT. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, 218 (1-4): 491-499.
- BELL, M.V., R.J. HENDERSON y J.R. SARGENT. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83 B: 711-719.
- BELL, J.G., D.R. TOCHER, F.M. MACDONALD y J.R. SARGENT. 1994. Effects of diets rich in linoleic (18:2n - 6) and alpha -linolenic (18:3n - 3) acids on the growth, lipid class and fatty acid compositions and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 13 (2): 105-118.

- BELL, M. V., J.R. DICK, M. TRUSH y J.C. NAVARRO.1996. Decreased 20:4n-6/20:5n-3 ratio in sperm from cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, broodstock compared with wild fish. *Aquaculture*,144 (1-3): 189-199.
- BELL, J.G., B.M. FARNDALE, M.P. BRUCE, J.M. NAVAS y M. CARILLO.1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 149 (1-2): 107-119.
- BERGLUND, L. 1995. Effects of spring temperature and feeding regime on sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) male parr. In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish. Fish Symp.* 95, Austin, 1995, pp. 170-172.
- BLOM, J.H. y K. DABROWSKI. 1995. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod.*, 52: 1073-1080.
- BROMAGE, N., J. JONES, C. RANDALL, M. THRUSH, M. DAVIES, J. SPRINGATE, J. DUSTON y G. BAKER.1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 141-166.
- BROMAGE, N.R., M. BRUCE, N. BASAVARAJA y K. RANA. 1994. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25: 13 -21.
- BROOKS, S., C.R. TYLER y J.P. SUMPTER .1997. Egg quality in fish: What makes a good egg?. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 387-416.

- BROWN, S.B., J.O. FITZSIMONS, V.T. PALACE y L. VANDENBILLAARDT. 1998. **Thiamin and** early mortality syndrome in lake trout. In: McDonald, G., Fitzsimons, J.O., Honeyfield, O.C. (Eds.), *Early Life Stage Mortality Syndrome in Fishes of the Great Lake and Baltic Sea*. American Fisheries Society, Symposium, vol. 21, pp. 18-25, Bethesda, MD, USA.
- BRUCE, M.P., R.J. SHIELDS, M.V. BELL y N.R. BROMAGE. 1993. Lipid class and fatty acid composition of eggs of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), in relation to egg quality in captive broodstock. *Aquacult. Fish. Manage.*, 24 (3): 417-422.
- BRUCE, M., F. OYEN, G. BELL, J.F. ASTURIANO, B. FARNDAL, J. RAMOS, N. BROMAGE, M. CARRILLO y S. ZANUY. 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 HUFA to reproductive performance. *Aquaculture*, 117 (1-4): 85-97.
- BRYLINSKA, M. y E. BRYLINSKI. 1972. Methods for estimation of fish fecundity on the example of bream (*Abramis brama* L.). *Rocz. nauk roln.*, 94-H-2: 7-40
- BUENO, D. 2001. Evaluación del cultivo larvario de la dorada (*Sparus aurata* L.) en función de la calidad de puesta. Tesis de Master, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, 63 pp.
- BUCKLEY, L.J., T.M. BRADLEY y J. ALLEN-GUILMETTE. 2000. Production, quality, and low temperature incubation of eggs of Atlantic cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31(1): 22-29.
- CAMPBELL, P.M., T.G. POTTINGER y J.P. SUMPTER. 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, 120: 151-169.

- CARNEVALI, O., I. MEIRI, V. POLZONETTI, A. CAMBI y S. RIDOLFI. 2000. *Sparus aurata* eggs: Maturation and quality. In Norberg, B.; Kjesbu, O.S.; Taranger, G.L.; Andersson, E.; Stefansson, S.O. (Ed.). *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, p. 312.
- CARNEVALI, O., G. MOSCONI, A. CAMBI, S. RIDOLFI, S. ZANUY y A.M. POLZONETTI-MAGNI. 2001. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. *Aquaculture*, 202 (3-4): 249-256.
- CARRILLO, M., N. BROMAGE, S. ZANUY, R. SERRANO y F. PRAT. 1989. The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 81: 351-365.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. PRAT, J. CERDA, E. MAÑANOS, N. BROMAGE, J. RAMOS y O. KAH. 1995. Nutritional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Netherlands Journal of Zoology*, 45 (1-2): 204-209.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. OYEN, J. CERDÁ, J.M. NAVAS y J. RAMOS. 2000. Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstock fitness. *Cah. Options Mediterr.*, 47: 61-73.
- CEJAS, J.R., E. ALMANSA, J.E. VILLAMANDOS, P. BADIA, A. BOLAÑOS y A. LORENZO. 2003. Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture*, 216 (1-4): 299-313.
- CERDÁ, J., M. CARRILLO, S. ZANUY y J. RAMOS. 1994a. Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: Preliminary observations. *Aquat. Living Resour.*, 7: 255-266.

- CERDÁ, J., M. CARRILLO, S. ZANUY, J. RAMOS y M. DE LA HIGUERA. 1994b. Influence of nutritional composition of diet on sea bass *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larvae quality. *Aquaculture*, 128: 345-361.
- CHEW, B. P. 1996. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 59: 103-114.
- CHO, C.Y. y S.J. KAUSHIK. 1990. Nutritional energetics in fish: Energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev. Nutr. Diet.*, 61: 132-172.
- CHOU, Y.H. y Y.H. CHIEN. 2001. Effects of astaxanthin and vitamin E supplement in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* brood stock diet on their fecundity and egg quality. *6th Asian Fisheries Forum*, Book of Abstracts. p. 60.
- CHOUBERT, G. 1986. Pigments caroténoides et reproduction des poissons. *Bull. Fr. Peche Piscic.*, 300: 25-32.
- CHOUBERT, G. y J.M. BLANC. 1993. Muscle pigmentation changes during and after spawning in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, red dietary carotenoids. *Aquat. Living Resour.*, 6: 163-168.
- CHOUBERT, G., J.M. BLANC y H. POISSON. 1998. Effects of dietary keto-carotenoids (canthaxanthin and astaxanthin) on the reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 4 (4): 249-254.
- CHRISTIANSEN, R. y O.J. TORRISSEN. 1997. Effects of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 153 (1-2): 51-62.
- CHRISTIE, W.W. 1982. Lipid Analysis. Pergamon Press, Oxford. (Second revised edition) 207 pp.

- CIERESZCO, A. y K. DABROWSKI. 1995. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across season study. *Biol. Reprod.* 52: 982-988.
- COEHLO, M. B. 1991. Functions of vitamin E. In: M.B. Coehlo (ed.) *Vitamin E in Animal Nutrition and Management*. pp 11-17.
- CONSTANZ, G. D. 1975. Behavioral ecology of mating in the male Gila topminnow, *Poeciliopsis occidentalis* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Ecology*, 56: 966-973.
- CORRAZE, G., L. LARROQUET, G. MAISSE, O. BLANC y S. KAUSHIK. 1993. Effect of temperature and of dietary lipid source on female broodstock performance and fatty acid composition of the eggs of rainbow trout. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz (France), Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, no. 61), pp. 61-66.
- COWEY, C.B., J.W. ADRON y A. YOUNGSTON. 1983. The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture*, 30: 85-93.
- COWEY, C.B., J.B. BELL, D. KNOX, A. FRASER y A. YOUNGSON. 1985. Lipids and antioxidant systems in developing eggs of salmon (*Salmo salar*). *Lipids*, 20: 567-572.
- CRAIK, J.C.A. 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, 47: 61-88.
- CRAIK, J.C.A. y S.M. HARVEY. 1984. Egg quality in rainbow trout. The relation between egg viability, selected aspects of egg composition, and time of stripping. *Aquaculture*, 40: 115-134.
- CRAIK, J.C.A. y S.M. HARVEY. 1986. Egg quality in the Atlantic salmon. *Ices Council Meeting 1986* (Collected Papers), Ices, Copenhagen (Denmark), 10 pp.

- CUMARANATUNGA, P.R. y K.L. MALLIKA. 1991. Effects of different levels of dietary protein and a legume vigna catiang on gonadal development in *Oreochromis niloticus* (L.). Proceedings of The Fourth Asian Fish Nutrition Workshop. *Special publication. Asian Fisheries Society*, 5: 125-133.
- DABROWSKI, K. y J.H. BLOM. 1994. Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108 A: 129-135.
- DANIKOWSKI, S., H.P. SALLMANN y G. FLACHOWSKY. 2002. Influence of high levels of vitamin E on sperm parameters of cock. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 86: 376-382.
- De SILVA, S.S. y K. RADAMPOLA. 1990. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of *Oreochromis niloticus*. *Proceedings of The Second Asian Fisheries Forum*, Tokyo, Japan. pp. 559-563.
- DENSON, M.R., T.I.J. SMITH y D. BERLINSKY. 2001. Ovarian fluid pH, an indicator of egg quality in southern flounder *Paralichthys lethostigma* and Black Sea bass *Centropristis striata*. *Conference Aquaculture 2001*, Lake Buena Vista, FL (USA), Book of Abstracts. p.181.
- DEVAUCHELLE, N., G. BRICHON, F. LAMOUR y G. STEPHAN. 1982. Biochemical composition of ovules and fecund eggs of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Proc. Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish.* Wageningen, The Netherlands pp. 155-157.
- DHERT, P., L.C. LIM, P. LAVENS, T.M. CHAO, R. CHOU, P. LAVENS, P. SORGELOOS, E. JASPERS y F. OLLEVIER. 1991. Effect of dietary essential fatty acids on egg quality and larviculture success of the greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). LARVI '91. *Special Publication, European Aquaculture Society*, 15: 58-62.

- DINIS, M. T. 1982 . Methods of incubating Dover sole (*Solea solea* L.) eggs. *Relatorios de Actividades do Aquario Vasco da Gama* 12, 8 pp.
- DINIS, M.T., L. RIBEIRO, F. SOARES y C. SARASQUETE. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176 (1-2): 27-38.
- DIVANACH, P., 1985. Contribution a la connaissance de la biologie et de l'elevage de 6 sparides Mediterraneens: *Sparus arata*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus annularis*, *Lithognathus mormyrus* et *Puntazzo puntazzo* (Poissons teleosteens). These de doctorat es Sciences. Université de Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier. 479 pp.
- DOMARCO, E. 2001. Efecto de la calidad de la dieta sobre las puestas de dorada (*Sparus aurata*). Tesis de Master, Universidad de Las Palmas de Gran canaria, España. 67 pp.
- DONNELLY, E.T., N. McCLURE, y S.E.M. LEWIS. 1999. The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, 14: 505-511.
- DUBE, K. 1996. Effect of vitamin E on the fecundity and maturity of *Heteropneustes fossilis* (Bloch.). *Proceedings of the The Third Indian Fisheries Forum*, Pant Nagar, U.P. pp. 101-103.
- DURAY, M., H. KOHNO y F. PASCUAL. 1994. The effect of lipid enriched broodstock diets on spawning and on egg and larval quality of hatchery bred rabbitfish (*Siganus guttatus*). *Philipp. Sci.*, 31: 42-57.
- EL-SAYED, A.M., C.R. MANSOUR y A.A. EZZAT. 2003. Effects of dietary protein level on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture*, 220 (1-4):619-632.

- EMATA, A., I. BORLONGAN y J. DARNASO. 2000. Dietary vitamin C and E supplementation and reproduction of milkfish *Chanos chanos* Forsskal. *Aquaculture Research*, 31(7): 557-564.
- ESKELINEN, P. 1989. Effects of different diets on egg production and egg quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 79 (1-4): 275-281.
- EVANS, R.P., C.C. PARRISH, J.A. BROWN y J. DAVIS, 1996.-Biochemical composition from repeat and first-time spawning captive Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 139: 139-149.
- FALK-PETERSEN, S., Y. FALK-PETERSEN, J.R. SARGENT y T. HANG. 1986. Lipid class and fatty acid composition of eggs from the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 52: 207-211.
- FALK-PETERSEN, S., J.R. SARGENT, C. FOX, L.B. FALK-PETERSEN, T. HAUG y E. KJØRSVIK. 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar. Biol.*, 101: 553-556.
- FERNANDEZ-PALACIOS, H., C.M. HERNANDEZ, J.E. FERNANDEZ-PALACIOS, J.M. VERGARA y L. ROBAINA. 1990. Influencia de distintas proporciones hembra: macho en la puesta de dorada (*Sparus aurata* L.). Actas del III Congreso Nacional de Acuicultura, A. Landín y A. Cerviño (eds.) pp. 27-31
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., M. S. IZQUIERDO, L. ROBAINA, A. VALENCIA, M. SALHI y J.M. VERGARA. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) *Aquaculture*, 132 (3-4): 325-337.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., M. S. IZQUIERDO, L. ROBAINA, A. VALENCIA, M. SALHI y D. MONTERO. 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 148 (2-3): 233-246.

- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., M.S. IZQUIERDO, M. GONZALEZ, L. ROBAINA y A. VALENCIA. 1998. Combined effect of dietary α -tocopherol and n-3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 161: 475-476.
- FOLCH, J., M. LEES, y G.H.S. STANLEY, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- FRÉMONT, L., C. LÉGER, B. PETRIDOU y M.T. GOZZELINO. 1984. Effects of a polyunsaturated fatty acid deficient diet on profiles of serum vitellogenin and lipoprotein in vitellogenic trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 19 (7): 522-528.
- FURUITA, H., H. TANAKA, T. YAMAMOTO, M. SHIRAISHI y T. TAKEUCHI. 2000. Effects of n-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 187 (3-4): 387-398.
- FURUITA, H., H. TANAKA, T. YAMAMOTO, N. SUZUKI y T. TAKEUCHI. 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 210 (1-4): 323-333.
- FURUITA, H., H. TANAKA, T. YAMAMOTO, N. SUZUKI y T. TAKEUCHI. 2003a. Supplemental effect of vitamin A in diet on the reproductive performance and egg quality of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T&S). *Aquaculture Research*, 34(6): 461-468.
- FURUITA, H., T. YAMAMOTO, T. SHIMA, N. SUZUKI y T. TAKEUCHI. 2003b. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220 (1-4): 725-735.
- FURUKAWA, A. y H. TSUKAHARA. 1966. On the digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 32: 502-506.

- FYHN, H.J. 1989. First feeding of marine fish larvae: Are free amino acids the source of energy?. *Aquaculture*, 80: 111-120.
- FYHN, H. J. y B. SERIGSTAD. 1987. Free amino acids as energy substrate in developing eggs and larvae of the cod *Gadus morhua*. *Mar. Biol.* 96: 335-341.
- GISBERT, E., P. WILLIOT y F. CASTELLO-ORVAY. 2000. Influence of egg size on growth and survival of early stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions. *Aquaculture*, 183: 83-94.
- GONZALEZ-VECINO, J. L., C. J. CUTIS, R.S. BATTY, C. MAZORRA de QUERO, P. L. GREENHAFF y S. WADSWORTH. 2004. Short & long term effects of a nucleotide enriched broodstock diet on the reproductive performance of haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *11th International Symposium on nutrition and Feeding in Fish*. Phuket. Thailand. p. 99.
- GUNASEKERA, R.M., K.F. SHIM y T.J. LAM. 1995. Effect of dietary protein level on puberty, oocyte growth and egg chemical composition in the tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) *Aquaculture*, 134 (1-2): 169-183.
- GUNASEKERA, R.M., K.F. SHIM y T.J. LAM. 1996a. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 146 (1-2): 121-134.
- GUNASEKERA, R.M., K.F. SHIM y T.J. LAM. 1996b. Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 146 (3-4): 245-259.
- GUNASEKERA, R.M., K.F. SHIM y T.J. LAM. 1997. Influence of dietary protein content on the distribution of amino acids in oocytes, serum and muscle of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 152 (1-4): 205-221.

- GUTSELL, J.S. 1940. The feeding of trout broodstock. *Prog. Fish Cult.*, 50:19-28.
- HAMRE, K. y Ø. LIE. 1997. Retained levels of dietary α - γ - and δ -tocopherols in tissues and body fluids of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Aquacult. Nutr.*, 3: 99-107.
- HANSEN, G.H. y J.A. OLAFSEN. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1435-1446.
- HARDY, R.W., K.D. SHEARER y I.B. KING. 1984. Proximate and elemental composition of developing eggs and maternal soma of pen-reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed production and trace element fortified diets. *Aquaculture*, 43 (1-3): 147-165.
- HARDY, R.W., T. MATSUMOTO, W.T. FAIRGRIEVE y R.R. STICKNEY. 1990. The effects of dietary lipid source on muscle and egg fatty acid composition and reproductive performance of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Japan Translation Center, Tokyo, pp. 347-356.
- HAREL, M., A. TANDLER y G.W. KISSIL. 1992. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. *Isr. J. Aquacult. Bamidgeh*, 44 (4):127.
- HAREL, M., A. TANDLER, G.W. KISSIL y S.W. APPLEBAUM. 1994. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. *British Journal of Nutrition*, 72: 45-58.

- HAREL, M., A. TANDLER, G.W. KISSIL y S.W. APPLEBAUM. 1995. The role of broodstock dietary protein in vitellogenin synthesis and oocyte development, and its effect on reproductive performance and egg quality in gilthead seabream *Sparus Aurata*. *Proceedings of The Fifth International Symposium on The Reproductive Physiology of Fish*, The University of Texas at Austin, (USA), pp. 105-107.
- HARRIS, L.E. 1984. Effects of a broodfish diet fortified with canthaxanthin on female fecundity and egg color. *Aquaculture*, 43: 179-183.
- HART, N.F. 1990. Fertilization in teleost fishes: Mechanism of sperm-egg interactions. *Int. Rev. Cytol.*, 121: 1-66.
- HEMRE, G.I., A. MANGOR-JENSEN y O. LIE. 1994. Broodstock nutrition in turbot (*Scophthalmus maximus*) effect of dietary vitamin E. *Fiskeridir. Skr., Ser. Emaer.*, 8:21-29.
- HENDERSON, R.J., M.V. BELL y J.R. SARGENT. 1985. The conversion of polyunsaturated fatty acids to prostaglandins by tissue homogenates of the turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 85: 93-99.
- HIROSE, K., R. ISHIDA y K. SAKAI. 1977. Induced ovulation of ayu using human chorionic gonadotropin (HGG), with special reference to changes in several characteristics of eggs retained in the body cavity after ovulation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 43 (4): 409-416.
- HIRSHFIELD, M. F. 1980. An experimental analysis of reproductive effort and cost in the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. *Ecology*, 61: 282-292.
- HISLOP, J.R.G., A.P. ROBB y J.A. GAULD. 1978. Observations on effects of feeding level on growth and reproduction in haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.) in captivity. *J. Fish Biol.*, 13 (1): 85-98.

- HORNUNG, M.W., L. MILLER, R.E. PETERSON, S. MARCQUENSKI y S.B. BROWN. 1998. Efficacy of thiamine, astaxanthin, beta -carotene, and thyroxine treatments in reducing early mortality syndrome in Lake Michigan salmonid embryos. *American Fisheries Society Symposium*, 21: 124-134.
- HORTON, H.R., L. A. MORAN, R. S. OCHS, J. D. RAWN y K. G. SCRIMGEOUR. 1996. Mechanisms of enzymes. In: P. Carey (ed.) *Principles of Biochemistry*, 2nd ed. p 149. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. USA.
- HORVLI, O., Ø. LIE y L. AKSNES., 1998. Tissue distribution of vitamin D₃ in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effect of dietary level. *Aquacult. Nutr.*, 4 (2): 127-133.
- HORWITT, M. K. 1962. Interrelations between vitamin E and polyunsaturated fatty acids in adult men. *Vitamina Horm.*, 20: 541-549.
- HORWITT, M. K., C. HARVEY, B. CENTURY y L. WITTING. 1961. Polyunsaturated lipids and tocopherol requirements. *J. Am. Diet Ass.*, 38: 231-235.
- HSIAO, S.M. y W.C. MAK. 1978. Artificial fertilization and incubation of fertilized eggs of ayu fed on artificial food. *China Fish. Mon.*, 305: 2-11.
- HUBER, J. T. 1988. Vitamins in ruminant nutrition. In: D. C. Church (ed.) *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. pp 313-325. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. USA.
- HYLLNER, S.J., H. FERNÁNDEZ-PALACIOS, D.O.J. LARSSON y C. HAUX. 1995. Amino acid composition and endocrine control of vitelline envelope proteins in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Reprod. Dev.*, 41: 339-347.
- IZQUIERDO, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.*, 2: 183-191.

- IZQUIERDO, M.S., T.WATANABE, T. TAKEUCHI, T.ARAKAWA y C. KITAJIMA. 1989. Requirement of larval sea bream for essential fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 55 (5): 859-867.
- IZQUIERDO, M.S. y H. FERNÁNDEZ-PALACIOS. 1997. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cah. Options Mediterr.*, 22: 243-264.
- IZQUIERDO, M.S., H. FERNÁNDEZ-PALACIOS y A.G.J. TACON. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.
- JONES, J. y N.R. BROMAGE. 1987. The influence of ration size in the reproductive performance of female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Proceedings of the Third International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, Memorial University of Newfoundland St. John's, Newfoundland, Canada, p. 202.
- JONSSON, B. y E. SVAVARSSON. 2000. Connection between egg size and early mortality in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture*, 187: 315-317.
- KAH, O., S. ZANUY, P. PRADELLES, J. CERDÁ y M. CARRILLO. 1994. An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effects of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 95: 464-474.
- KANAZAWA, A. 1988. Broodstock nutrition. In: T. Watanabe (Editor), *Fish Nutrition and Mariculture*. Kangawa International Fisheries Training Centre, Japan International Cooperation Agency, pp. 147-159.
- KARLSEN, O., J.C. HOLM y O.S. KJESBU. 1995. Effects of periodic starvation on reproductive investment in first time spawning Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 133 (2): 159-170.

- KESTEMONT, P., J. COOREMANS, A. ABI-AYAD y C. MELARD. 1999. Cathepsin L in eggs and larvae of perch *Perca fluviatilis*: variations with developmental stage and spawning period. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21 (1): 59-64.
- KETOLA, H.G., P.R. BOWSER, L.R. WOOSTER, L.R. WEDGE y S. HURST. 1998. Thiamin remediation of early mortality in fry of Atlantic salmon from Cayuga Lake. *Great Lakes Res. Rev.*, 3: 21-26.
- KING, I.B. 1985. Influence of vitamin E in reproduction in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Diss. Abst. Int. Pt. B - Sci. & Eng.*, 46 (2) 185 pp.
- KJESBU, O.S., P. SOLEMDAL, P. BRATLAND y M. FONN. 1996. Variation in annual egg production in individual captive atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 610-620.
- KJESBU, O.S., P.R. WITTHAMES, P. SOLEMDAL y M.G. WALKER. 1998. Temporal variations in the fecundity of Arcto-Norwegian cod (*Gadus morhua*) in response to natural changes in food and temperature. *Journal of Sea Research*, 40 (3-4): 303-321.
- KJØRSVIK, E. 1994. Egg quality in wild and broodstock cod *Gadus morhua* L. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25: 22-31.
- KJØRSVIK, E., A. MANGOR-JENSEN y L. HOLMEFJORD. 1990. Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology*, 26: 71-113.
- KJØRSVIK, E., K. HOEHNE-REITAN y K.I. REITAN. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 227 (4): 9-20.

- KNIGHT, J., J.W. HOLLAND, L.A. BOWDEN, K. HALLIDAY y A.F. ROWLEY. 1995. Eicosanoid generating capacities of different tissues from the rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Lipids*, 30 (5): 451-458.
- KNUTSEN, G. M. y S. TILSETH. 1985. Growth, development, and feeding success of Atlantic cod larvae *Gadus morhua* related to egg size. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 114: 507-511.
- KOPRÜCÜ, K. y E. SEKER. 2003. Effect of supplemental dietary vitamin E on the fecundity of guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1895) and swordtail (*Xiphophorus helleri* Heckel, 1848). *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 15 (1): 83-88.
- KOVEN, W., Y. BARR, S. LUTZKY, I. BEN-ATIA, R. WEISS, M. HAREL, P. BEHRENS y A. TANDLER. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 193 (1-2): 107-122.
- KUZNETZOV, V. A. y N. K. KHALITOV. 1978. Alterations in the fecundity and egg quality of the roach, *Rutilus rutilus*, in connection with different feeding conditions. *Journal of Ichthyology*, 18: 63-70.
- LABBE, C. y G. MAISSE. 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*, 145: 281-294.
- LABBE, C., M. LOIR, S. KAUSHIK y G. MAISSE. 1993. The influence of both rearing and dietary lipid origin on fatty acid composition of spermatozoan polar lipids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Effect on sperm cryopreservation tolerance. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz (France), Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n° 61), pp. 49-59.

- LAHNSTEINER, F., B. URBANYI, T.H. WEISMANN y A. HORVATH. 2000. Possibilities for egg quality determination on salmonids and cyprinids. *Osterreichs Fischerei. Salzburg*, 53 (7): 224-233.
- LAL, B. y T.P. SINGH. 1987. Changes in tissue lipid levels in the freshwater catfish *Clarias batrachus* associated with the reproductive cycle. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3 (4): 191-201.
- LAM, TJ. 1994. Hormones and egg/larval quality in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25 (1): 2-12.
- LAMBERTSEN. G.1983. Some comments on the analisis of fat soluble vitamins in fish products by HPLC-chromatography. *Proc. 12th Scand. Lipid Symp.* Gotheburg, Sweden. 21-26.
- LAMBERTSEN. G y BRAEKKAN O.R. 1959. The spectrophotometric determination of alpha-tocopherol. *Analyst*, 84:705-711
- LAVENS, P., E. LEBEGUE, H. JAUNET, A. BRUNEL, P. DHERT y P. SORGELOOS. 1999. Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. *Aquaculture International*, 7(4): 225-240.
- LEBOULANGER, J., 1977. Les vitamines. Biochemie. Mode d'action intérêt thérapeutique. Ed. Roche, Neuilly-sur-Seine, France, 194 pp.
- LEE, K. y K. DABROWSKI. 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230 (1-4): 377-389.
- LEHNINGER A.L., D.L. NELSON y M.M. COX. 1993. Principles of Biochemistry, 2nd Edition, New York: Worth Publishers. pp. 542-571.
- LERAY, C. y X. PELLETIER.1985. Fatty acid composition of trout phospholipids: Effect of (n-3) essential fatty acid deficiency. *Aquaculture*, 50 (1-2): 51-59.

- LERAY, C., G. NONNOTTE, P. ROUBAND y C. LEGER. 1985. Incidence of (n-3) essential fatty acid deficiency on trout reproductive processes. *Reprod. Nutr. Develop.* 25: 567-581.
- LIE, O., A. MANGOR-JENSEN y G.I. HEMRE. 1993. Broodstock nutrition in cod (*Gadus morhua*) effect of dietary fatty acids. *Fiskeridir. Skr., Ser. Emaer.*, 6: 11-19.
- LIE, O., A. SANDVIN y R. WAAGBO. 1994. Transport of alpha tocopherol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during vitellogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* 13 (3): 241-247.
- LINK, J. y J. BURNETT. 2001. The relationship between stomach contents and maturity state for major northwest Atlantic fishes: new paradigms?. *J. Fish Biol.*, 59: 783-794.
- LOCHMANN, R. 2001. Practical diet development for broodstock of *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*. In: A. Gupta, K. McElwee, D. Burke; J. Burreight, X. Cummings, and H. Eгна (Editors), *Eighteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP*, Oregon State University, Corvallis, Oregon, pp. 65-66.
- LUQUET, P. y T. WATANABE. 1986. Interaction "nutrition-reproduction" in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2 (1-4): 121-129.
- MA, Y., O.S. KJESBU y T. JORGENSEN. 1998. Effects of ration on the maturation and fecundity in captive Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55 (4): 900-908.
- MAKINO, N., M. UCHIYAMA, S. IWANAMI, T. TOHYAMA y M. TANAKA. 1999. Developmental changes in multiple oil globules of Japanese sea bass eggs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 65 (2): 268-277.
- MANGOR-JENSEN, A. y R.N. BIRKELAND. 1993. Effects of dietary carbohydrate on broodstock maturation and egg quality in cod. Milestone Rapp. Senter For Havbruk. *Inst. Mar. Res.*, 9, 14 pp.

- MANGOR-JENSEN, A., K. SANDNESS, H. HAALAND, G. ROSENLUND, P. LAVENS, P. SORGELOOS, E. JASPERS y F. OLLEVIER. 1991. Effects of vitamin C in broodstock diets on egg quality of cod (*Gadus morhua* L.). *Larvi '91. Special Publication, European Aquaculture Society*, 15, p. 226.
- MANGOR-JENSEN, A., R.N. BIRKELAND y K. SANDNES. 1993. Effects of cod broodstock dietary vitamin C on embryonic growth and survival. Milestone. Rapp. Sent. Havbruk. *Inst. Mar. Res.*, 18, 8 pp.
- MANISSERY, J.K., D. KRISHNAMURTHY, B. GANGADHARA y M.C. NANDEESHA. 2001. Effect of varied levels of dietary protein on the breeding performance of common carp *Cyprinus carpio*. *Asian Fisheries Science*, 14 (3): 317-323.
- MANNING, A.J. y L.W. CRIM. 1995. Variability in egg quality and production in a batch spawning flounder, *Pleuronectes ferrugineus*. In Goetz, F. W. and Thomas, P., eds. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Austin, Texas, USA: Fish Symposium '95, Austin, p. 238.
- MAZORRA, C., M. BRUCE, J.G. BELL, A. DAVIE, E. ALOREND, N. JORDAN, J. REES, N. PAPANIKOS, M. PORTERO y N. BROMAGE. 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 227 (1-4): 21-33.
- McEVOY, L.A. 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot. *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.*, 24: 437-448.
- McKAY, I. y K.H. MANN, 1969. Fecundity of two cyprinid fishes in the River Thames, Reading, England. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 26: 2795-2805.
- MEEKAN, M.G. y L. FORTIER. 1996. Selection for fast growth during the larval life of Atlantic cod *Gadus morhua* on the Scotian Shelf. *Marine Ecology Progress Series*, 137 (1-3): 25-37.

- MERCURE, F. y G. VAN DER KRAAK. 1995. Inhibition of gonadotropin stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish. *Lipids*, 30: 547-554.
- METCOFF, J. 1986. Intracellular amino acid levels as predictors of protein synthesis. *J. Am. Coll. Nutr.*, 5 (2): 107-20.
- MIKI, W., K. YAMAGUCHI, S. KONOSU y T. WATANABE. 1984. Metabolism of dietary carotenoids in eggs of red sea bream. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77 B (4): 665-668.
- MOORE, P.K. 1985. Prostanoids: pharmacological, physiological and clinical relevance. Cambridge Univ.Press, Cambridge. 263 pp.
- MOREHEAD, D.T., P.R. HART, G.A. DUNSTAN, M. BROWN y N.W. PANKHURST. 2001. Differences in egg quality between wild striped trumpeter (*Latris lineata*) and captive striped trumpeter that were fed different diets. *Aquaculture*, 192 (1): 39-53.
- MOURENTE, G. y J.M. ODRIOZOLA. 1990. Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 8 (2): 93-101.
- MOURENTE, G. y D.R. TOCHER. 1993. Incorporation and metabolism of ¹⁴C-labelled polyunsaturated fatty acids in wild caught juveniles of golden grey mullet, *Liza aurata*, in vivo. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12 (2): 119-130.
- MOURENTE, G., M.A. CARRASCOSA, C. VELASCO, J.M. ODRIOZOLA, R. BILLARD y N. De PAUW. 1989. Effect of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) broodstock diets on egg lipid composition and spawning quality. *Aquaculture Europa '89. Special Publication, European Aquaculture Society*, 10: 179-180.
- MUKHOPADHYAY, P.K., D.N. CHATTOPADHYAY y G. MITRA. 2003. Broodstock nutrition, the key to quality seed production. *Infofish International*, 3: 25-3.

- MURAI, T. y J.W. ANDREWS. 1974. Interactions of dietary alpha-tocopherol, oxidized menhaden oil and ethoxyquin on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Nutrition*, 104 (11): 1416-1431.
- MUSHIAKE, K., S. ARAI, A. MATSUMOTO, H. SHIMMA y I. HASEGAWA. 1993. Artificial insemination from 2 year old cultured yellowtail fed with moist Pellets. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 59 (10): 1721-1726.
- MUSTAFA, T. y K.C. SRIVASTAVA. 1989. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Adv. Comp. Env. Physiol.*, 5: 157-207.
- NAGAHAMA, N. 1994. Molecular biology of oocyte maturation in fish. In Davey, K.G., Peter, R.E. and Tobe, S.S., eds. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada, pp. 193-198.
- NASSOUR, I. y C.L. LEGER. 1989. Deposition and mobilisation of body fat during sexual maturation in female trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquatic living resources*, 2 (3): 153-159.
- NAVAS, J., M. THRUSH, J. RAMOS, M. BRUCE, M. CARRILLO, S. ZANUY y N. BROMAGE. 1996. The effect of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In Goetz, F. W. and Thomas, P., eds. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Austin, Texas, USA: Fish Symposium '95, Austin, pp. 108-110.
- NAVAS, J.M., M. BRUCE, M. TRUSH, B.M. FARNDALE, N. BROMAGE, S. ZANUY, M. CARRILLO, J.G. BELL y J. RAMOS. 1997. The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish Biol.*, 51: 760-773.

- NAVAS, J.M., M. THRUSH, S. ZANUY, J. RAMOS, N. BROMAGE y M. CARRILLO. 2001. Total lipid in the broodstock diet did not affect fatty acid composition and quality of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Scientia Marina (Barcelona)*, 65 (1):11-19.
- NOCILLADO, J.N., V.D. PEÑAFLORES y I.G. BORLONGAN. 2000. Measures of egg quality in induced spawns of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* Bloch. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22 (1): 1-9.
- NORBERG, B., V. VALKNER, J. HUSE, L. KARLSEN y G.L. GRUNG. 1991. Ovulatory rhythms and egg viability in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 97: 365-371.
- NRC (National Research Council). 1993. Nutrient requirements of fish. National Academic Press. Washington D. C. 144pp.
- ORR, W., J. CALL, J. BROOKS, E. HOLT y J. MAINWARING. 1982. Effects of feeding rates on spawning performance of two year old rainbow trout broodstock. U.S. Fish & Wildlife Service. *Bozeman Fish Technology Center Publication*. 6pp.
- OUELLET, P., Y. LAMBERT y I. BÉRUBÉ. 2001. Cod egg characteristics and viability in relation to low temperature and maternal nutritional condition. *ICES J. Mar. Sci.*, 58: 672-686.
- PARRISH, C.C., J.D. CASTELL, J.A. BROWN, L. BOSTON, J.S. STRICKLAND y D.C. SOMERTON. 1994. Fatty acid composition of Atlantic halibut eggs in relation to fertilization. *Bull. Aquacult. Assoc. Canada*, 942 (2): 36-38.
- PEREIRA, J.B., M.A. REIS-HENRIQUES, J.L. SANCHEZ y J.M. COSTA. 1998. Effect of protein source on the reproductive performance of female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29 (10): 751-760.
- PHILLIPS, A.M., D.R. BROCKWAY y G.C. BALZER. 1956. The chemistry of developing brown trout eggs. *Prog. Fish Cult.*, 18 (3): 104-106.

- PICKOVA, J., P.C. DUTTA, P.O. LARSSON y A. KIESSLING. 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 2410-2416.
- RAINUZZO, J.R. 1993. Fatty acid and lipid composition of fish egg and larvae. *Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology*, Trondheim, Norway, pp. 43-49.
- RAINUZZO, J.R., K.I. REITAN y Y. OLSEN. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155: 105-118.
- RIDEOUT, R.M., E.A. TRIPPEL y M.K. LITVAK. 2004. Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. *Aquaculture*, 230: 215-228.
- ROBAINA, L. 1995. Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*). Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España. 214 pp.
- ROBAINA, L., M.S. IZQUIERDO, F.J. MOYANO, J. SOCORRO, J.M. VERGARA, D. MONTERO y H. FERNÁNDEZ-PALACIOS. 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 130: 219-233.
- ROBB, A.P. 1982. Histological observations on the reproductive biology of the haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.). *Journal of Fish Biology*, 20 (4): 397-408.
- RODRIGUEZ, C., J.R. CEJAS, M.V. MARTIN, P. BADIA, M. SAMPER y A. LORENZO. 1998. Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18 (2): 177-187.
- RØNNESTAD, I. 1992. Utilization of free amino acids in marine fish eggs and larvae. Tesis Doctoral, Universidad de Bergen, Noruega.

- ROSENBLUM, P., H. HORNE, G. GARWOOD, T. BRANDT y B. VILLARREAL. 1995. Delayed ovarian development and reduced fecundity in largemouth bass raised on a pelleted feed containing high levels of steroids and low levels of archidonic acid. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, The University of Texas, Austin (USA), p. 138
- SAKAI, K., M. NOMURA y F. TAKASHIMA. 1985. Characteristics of naturally spawned eggs of red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51:1395-1399.
- SALHI, M. 1997. Estudio de los requerimientos lipídicos de larvas de dorada (*Sparus aurata*) alimentadas con microdietas. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España. 178 pp.
- SANDNES, K. 1991. Vitamin C in fish nutrition a review. *Fiskeridir. Skr., Ser. Emaer.*, 4: 3-32.
- SANDNES, K., Y. ULGENES, O.R. BRAEKKAN y F. UTNE. 1984. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43: 167-177.
- SANTIAGO, C.B. y O.S. REYES. 1993. Effect of dietary lipid source on reproductive performance and tissue lipid levels of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) broodstock. *J. Appl. Ichthyol.*, 9: 33-40.
- SARGENT, J.R. 1995. Origin and functions of eggs lipids: nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, pp. 353-372.
- SARGENT, J., L. McEVOY, A. ESTEVEZ, G. BELL, M. BELL, J. HENDERSON y D. TOCHER. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179 (1-4): 217-229.

- SASAYAMA, Y. y H. TAKAHASHI. 1972. Effect of starvation and unilateral astration in male goldfish, *Carassius auratus*, and a design of bioassay for fish gonadotropin using starved goldfish. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, 22: 267-283.
- SCOTT, D.P. 1962. Effect of food quantity on fecundity of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 19: 715-731.
- SERRANO, R., S. ZANUY y M. CARRILLO. 1989. Determinación de la calidad de huevos fertilizados de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) por medio de parámetros bioquímicos. In: M. Yúfera (Editor), *Acuicultura Intermareal*. Inst. Cien. Mar. Andalucía, Cádiz, pp. 229-235.
- SHIELDS, R.J., N.P. BROWN y N.R. BROMAGE. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture*, 155 (1-4): 1-12.
- SHIRANEE, P. y P. NATARAJAN. 1996. Crude palm oil as a source of carotenoids and tocopherols to enhance reproductive potential in pearlspot *Etroplus suratensis*. *Asian Fisheries Science*, 9 (1): 35-44.
- SIDDIQUI, A.Q., Y.S. AL-HAFEDH y S.A. ALI. 1998. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 29 (5): 349-358.
- SIGURGISLADOTTIR, S., C.C. PARRISH, R.G. ACKMAN y S.P. LALL. 1994. Tocopherol deposition in the muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Sci.*, 59: 256-259.
- SIMAN, C.M. y U.J. ERIKSSON. 1997. Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes*, 46: 1054-1061.
- SIVALOGANATHAN, B., J. WALFORD y T.J. LAM. 1998. Free aminoacids and energy metabolism in eggs and larvae of sea bass, *Lates calcarifer*. *Mar. Biol.*, 131: 695-702.

- SOHN, Y.C., H. SUETAKE, Y. YOSHIURA, M. KOBAYASHI y K. AIDA. 1998. Structural and expression analysis of gonadotropin I-beta subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene*, 222, 257-267.
- SOKAL, R.R. y J. ROLF. 1979. *Biometría*. Editorial Blume. Madrid. 832 pp.
- SORENSEN, P.W. y F.W. GOETZ. 1993. Pheromonal function of prostaglandin metabolites in teleost fish. *J. Lipid Mediat.*, 6: 385
- SORENSEN, P.W., T.J. HARA, N.E. STACEY y F.W. GOETZ. 1988. F prostaglandins function as potent stimulants that comprise the post-ovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol. Reprod.*, 39: 1039-1050.
- SPRINGATE, J.R.C. y N. BROMAGE. 1985. Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 47: 163-172.
- SPRINGATE, J.R.C., N.R. BROMAGE, J.A.K. ELLIOT y D.L. HUDSON. 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilisation and survival to eyeing, hatching and swimup in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In Cowey, C.B., Mackie, A.M. and Bell, J.A., eds. *Nutrition and Feeding in Fish*. London: Academic Press, pp. 371-391.
- SRIVASTAVA, R.K. y J.A. BROWN. 1992. Assessment of egg quality in Atlantic salmon, *Salmo salar*, treated with testosterone-II. Amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 103 A: 397-402.
- SRIVASTAVA, R.K., J.A. BROWN y F. SHAHIDI. 1995. Changes in the amino acid pool during embryonic development of cultured and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 131: 115-124.
- STACEY, N.E. y F.W. GOETZ. 1982. Role of prostaglandins in fish reproduction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 92-98.
- SULLIVAN, M.H.F. y B.A. COOKE. 1985. Effects of calmodulin and lypoxigenase inhibitors on LH and LHRH-agonist stimulated steroidogenesis in rat leydig cells. *Biochem. J.*, 232: 55-59.

- SUTJARITVONGSANON, S. 1987. Level of vitamin E content suitable for gonad developing and spawning of goldfish, *Carassius auratus* (Linn.). Kasetsart Univ., Bangkok, Abstracts of Master of Science Theses Fisheries Science, *Notes Fac. Fish.*, no. 12, p.2.
- TACON, A.G. J. 1981. Speculative review of possible carotenoid function in fish. *Prog. Fish-Cult.*, 43 (4): 205-208.
- TACON, A.G. J. 1990. Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. Argent Laboratories Press. Redmon, W A. 454 pp.
- TACON, A.G. J. y C. COWEY. 1985. Protein and amino acid requirements. In: P. Tytler and P. Calow (Editors) *Fish Energetics. New Perspectives*. Croom Helm, London, pp. 155-184.
- TAKEUCHI, T. 1997. Essential fatty acid requirements of aquatic animals with emphasis on fish larvae and fingerlings. *Reviews in Fisheries Science*, 5 (1): 1-25.
- TAKEUCHI, M., S. ISHII y T. OGISO. 1981. Effect of dietary vitamin E on growth, vitamin E distribution, and mortalities of the fertilized eggs and fry in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*, 104: 111-122.
- TAKEUCHI, T., Z. FENG, K. YOSEDA, J. HIROKAWA y T. WATANABE. 1994. Nutritive value of DHA enriched rotifer for larval cod. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 60 (5): 641-652.
- TANAKA, Y. 1990. Change in the egg buoyancy of Japanese anchovy *Engraulis japonicus* during embryonic development. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 56 (1) p.165.
- TANDLER, A., M. HAREL, W.M. KOVEN y S. KOLKOVSKI. 1995. Broodstock and larvae nutrition in gilthead seabream *Sparus aurata* new findings on its mode involvement in improving growth, survival and swimbladder inflation. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, 47 (3-4): 95-111.
- THORPE, J.E., M.S. MILES y D.S. KEAY. 1984. Developmental rate, fecundity and egg size in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 43(1-3): 289-305.

- THORSEN, A., E.A. TRIPPEL y Y. LAMBERT.2003. Experimental methods to monitor the production and quality of eggs of captive marine fish. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 33: 55-70.
- TOCHER, D.R. y D.G. HARVIE. 1988. Fatty acid compositions of the major phosphoglycerides from fish neural tissues; (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cod (*Gadus morhua*) brains and retinas. *Fish Physiology and Biochemistry*, 5 (4): 229-239.
- TOCHER, D., A.J. FRASER, J.R. SARGENT y J.C. GAMBLE.1985a. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 20 (2): 69-74.
- TOCHER, D., A.J. FRASER, J.R. SARGENT y J.C. GAMBLE.1985b. Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 20 (2): 84-89.
- TORRANS, L. y F. LOWELL. 2001. Use of tilapia as supplemental forage for channel catfish broodstock. *North American Journal of Aquaculture*, 63 (3): 215-221.
- TORRISSEN, O.J. 1984. Pigmentation of salmonids effects of carotenoids in eggs and start feeding diet on survival and growth rate. *Aquaculture*, 43: 185-193.
- TORRISSEN, O.J. 1990. Biological activities of carotenoids in fishes. In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. Japan Translation Center, Tokyo, Japan, pp. 387-399.
- TORRISSEN, O.J. y R. CHRISTIANSEN. 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. *J. Appl. Ichthyol.*, 11: 225-230.
- TRIPPEL, E.A., J. J. HUNT, y M.I. BUZETA. 1995. Evaluation of the cost of reproduction of Georges Bank Atlantic cod (*Gadus morhua*) using otolith back calculation. In: *Recent developments in fish otolith research*. D. H. Secar, J. M. Dean, and S. E. Campana (eds.). University of South Carolina Press, Columbia, SC, p. 599-616.



- TRIPPEL, E.A., J.D. CASTELL, S.R.E. NEIL y T.J. BLAIR. 2000. Assessment of egg quality of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in paired matings. In Norberg, B.; Kjesbu, O.S.; Taranger, G.L.; Andersson, E.; Stefansson, S.O. (Ed.): Bergen, Norway. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, pp. 405-407.
- TVEITEN, H., M. JOBLING y I. ANDREASSEN. 2004. Influence of egg lipids and fatty acids on egg viability, and their utilization during embryonic development of spotted wolffish, *Anarhichia minor* Olafsen. *Aquaculture Research*, 35 (2): 152-162.
- VAN DER MEEREN, T., J. KLUNGSOYR, S. WILBELMSEN y P.O. KVENSENTH. 1991. Fatty acid composition of unfed and growing cod larvae, *Gadus morhua* L., feeding on natural plankton in large enclosures. In: B.T. Walther and HJ. Fyhn (Editors), *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. University of Bergen, Norway, pp. 34-35.
- VASSALLO-AGIUS. R., H. IMAIZUMI, T. WATANABE, T. YAMAZAKI, S. SATOH y V. KIRON. 2001a. The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fisheries science*, 67: 260-270.
- VASSALLO-AGIUS. R., H. IMAIZUMI, T. WATANABE, T. YAMAZAKI, S. SATOH y V. KIRON. 2001b. Effect of squid meal in dry pellets on the spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Fisheries science*, 67: 271-280.
- VASSALLO-AGIUS, R., T.WATANABE, G. YOSHIZAKI, S. SATOH y Y. TAKEUCHI. 2001c. Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed an n-3 essential fatty acid deficient diet and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, semen and livers. *Fisheries Science*, 67 (5): 818-825.
- VERA, J. 1992. Diccionario multilingue de especies marinas para el mundo hispanico. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion*. Madrid, España. 1282 pp.

- VERAKUNPIRIYA, V., T. WATANABE, K. MUSHIAKE, V. KIRON, S. SATOH y T. TAKEUCHI. 1996. Effect of broodstock diets on the chemical components of milt and eggs produced by yellowtail. *Fisheries Science*, 62 (4): 610-619.
- VERGARA, J.M.. 1992. Studies on the utilization of dietary protein and energy by gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Tesis Doctoral, Universidad de Stirling, Reino Unido. 162 pp.
- WADE, M.G., G. VAN DER KRAAK, M.F. GERRITS y J.S. BALLANTYNE. 1994. Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in the goldfish testis. *Biol. Reprod.*, 51: 131-139.
- WASHBURN, B.S., D.J. FRYE, S.S.O. HUNG, S.I. DOROSHOV y F.S. CANTE. 1990. Dietary effects on tissue composition, oogenesis and the reproductive performance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 90: 179-195.
- WATANABE, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73 (1): 3-15.
- WATANABE, T. 1990. Effect of broodstock diets on reproduction of fish. *Actes Colloq. IFREMER*, 9: 542-543.
- WATANABE, T. 1993. Importance of docosahexanoic acid in marine larval fish. *J. World. Aquacult. Soc.*, 24: 152-161.
- WATANABE, T. y V. KIRON. 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, 124: 223-251.
- WATANABE, T. y KIRON, V. 1995. Broodstock management and nutritional approaches for quality offsprings in the Red Sea Bream. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 424 pp.
- WATANABE, T. y F. TAKASHIMA. 1977. Effect of alpha-tocopherol deficiency on carp. 6. Deficiency symptoms and changes of fatty acid and triglyceride distributions in adult carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43 (7): 819-830.

- WATANABE, T., T. TAKEUCHI y M. WADA.1981. Dietary lipid levels and alpha -tocopherol requirement of carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47 (12): 1585-1590.
- WATANABE, T., T. ARAKAWA, C. KITAJIMA y S. FUJITA.1984a. Effect of nutritional quality of broodstock diet on reproduction of red seabream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50 (3): 495-501.
- WATANABE, T., A. ITOH, A. MURAKAMI, Y. TSUKASHIMA, C. KITAJIMA, y S. FUJITA. 1984b. Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red seabream broodstocks and eggs produced. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50 (3): 503-515.
- WATANABE, T., A. ITOH, A. MURAKAMI, Y. TSUKASHIMA, C. KITAJIMA y S. FUJITA. 1984c. Effect of nutritional quality of diets given to broodstock on the verge of spawning on reproduction of red seabream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50 (6): 1023-1028.
- WATANABE, T., T. TAKEUCHI, M. SAITO y K. NISHIMURA.,1984d. Effect of low protein-high calorie or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50 (7): 1207-1215.
- WATANABE, T., A. ITOH, KITAJIMA, C. y S. FUJITA, , 1984e. Effect of protein levels on reproduction of red sea bream. *Bull. Jpn. Soco Sci. Fish.* 50 (6): 1015-1022.
- WATANABE, T., A. ITOH, S. SATOH, C. KITAJIMA y S. FUJITA. 1985a. Effect of dietary protein levels and feeding period before spawning on chemical components of eggs produced by red sea bream broodstock. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51 (9): 1501-1509.

- WATANABE, T., T. KOIZUMI, H. SUZUKI, S. SATOH, T. TAKEUCHI, N. YOSHIDA, T. KITADA e Y. TSUKASHIMA. 1985b. Improvement of quality of red sea bream eggs by feeding broodstock on a diet containing cuttlefish meal or on raw krill shortly before spawning. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51 (9): 1511-1521.
- WATANABE, T., M.J. LEE, J. MIZUTANI, T. YAMADA, S. SATOH, T. TAKEUCHI, N. YOSHIDA, T. KITADA y T. ARAKAWA. 1991a. Nutritional studies in the seed production of fish. 20. Effective components in cuttlefish meal and raw krill for improvement of quality of red seabream *Pagrus major* eggs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 57: 681-694.
- WATANABE, T., T. FUJIMURA, M.J. LEE, K. FUKUSHO, S. SATOH y T. TAKEUCHI. 1991b. Nutritional studies in the seed production of fish. 21. Effect of polar and nonpolar lipids from krill on quality of eggs of red seabream *Pagrus major*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 57: 695-698.
- WIEGAND, M.O. 1996. Utilization of yolk fatty acids by goldfish embryos and larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 21-27.
- WOODWARD, B. 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture*, 124 (1-4): 133-168.
- WOOSTER, G.A. y BOWSER, P.R. 2000. Remediation of Cayuga Syndrome in landlocked Atlantic Salmon *Salmo salar* using egg and sac fry bath treatments of thiamin hydrochloride. *J. World Aquacult. Soc.*, 31: 149-157.
- WOOTTON, R.J. 1979. Energy costs of egg production and environmental determinants of fecundity in teleost fishes. *Symp. Zool. soc. Lond.*, 44: 133-159.
- ZHANG, L., B. BENSON y J.L. LOGAN. 1992. Dietary fish oil delays puberty in female rats. *Biol. Reprod.*, 47: 998-1003.

- ZHAO, Y., Y. CHEN y J. A. BROWN. 2001. Impacts of egg and larval size on survival and growth of Atlantic cod under different feeding conditions. *J. Fish Biol.*, 59: 569-581.
- ZOHAR, Y., R. BILLARD y C. WEIL. 1984. La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et controle de la gamétogenéseet de la ponte. In *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*. pp. 3- 24. Edited by G. Barnabé and R. Billard. INRA, Paris.
- ZOHAR, Y., M. HAREL, S. HASSIN y A. TANDLER. 1995. Gilthead seabream. In: Bromage, N .R., Roberts, R.J. (Eds.) *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, pp. 94-117.

6.- LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Condiciones operativas para la determinación de los ácidos grasos	45
Tabla II.- Equipamiento utilizado para los análisis de vitamina E	48
Tabla III.- Condiciones operativas para la determinación de la vitamina E	48
Tabla IV.- Mezcla de vitaminas hidrosolubles utilizada en las dietas experimentales	50
Tabla V.- Mezcla de vitaminas hidrosolubles utilizada en las dietas experimentales	51
Tabla VI.- Mezcla de vitaminas liposolubles y antioxidante utilizados en las dietas experimentales	51
Tabla VII.- Características biométricas de los reproductores alimentados con cuatro dietas diferentes en el Experimento I (media \pm desviación típica)	55
Tabla VIII.- Ingredientes y composición analítica de las dietas experimentales del Experimento I	56
Tabla IX.- Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de las dietas experimentales del Experimento I	57
Tabla X.- Índices de las puestas de los reproductores de dorada, alimentados con diferentes niveles de n-3 HUFA, en el Experimento I, (media \pm desviación típica)	59
Tabla XI.- Medidas de los huevos y larvas producidos por los reproductores, alimentados con las dietas experimentales, en el Experimento I (media \pm desviación típica)	64
Tabla XII.- Composición (% peso seco) de los huevos producidos por los reproductores, alimentados con las dietas experimentales, en el Experimento I (media \pm desviación típica)	66
Tabla XIII.- Características biométricas de los reproductores utilizados en el Experimento II (media \pm desviación típica)	77
Tabla XIV.- Composición de las dietas experimentales y contenido analizado de las dietas experimentales y de la dieta comercial usadas en el Experimento II	79
Tabla XV.- Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de las dietas del Experimento II	80
Tabla XVI.- Composición en ácidos grasos (% peso seco) de las dietas del Experimento II ..	81
Tabla XVII.- Índices de las puestas de los reproductores de dorada, del Experimento II, alimentados previamente con la dieta comercial (media \pm desviación típica)	83

Tabla XVIII.- Índices de las puestas de los reproductores, del Experimento II, alimentados con las dietas experimentales y con la dieta comercial (media \pm desviación típica)	84
Tabla XIX.- Comparación mediante el test de la t de Student de los Índices de las puestas de reproductores de dorada alimentadas con dietas conteniendo distintas fuentes de proteína (media \pm desviación típica)	90
Tabla XX.- Comparación mediante el test de la t de Student de los Índices de las puestas de reproductores de dorada alimentadas con dietas conteniendo distintas fuentes de lípidos (media \pm desviación típica)	91
Tabla XXI.- Medidas de los huevos y larvas producidos por los reproductores, del Experimento II, alimentados con las dietas experimentales y con la dieta comercial (media \pm desviación típica)	92
Tabla XXII.- Lípidos, proteína y humedad contenidos en los huevos de las puestas de los reproductores de dorada, alimentados con diferentes dietas en el Experimento II (media \pm desviación típica)	96
Tabla XXIII.- Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos de los reproductores de dorada, alimentados con diferentes dietas en el Experimento II (media \pm desviación típica)	97
Tabla XXIV.- Composición en ácidos grasos (% peso seco) de los huevos de los reproductores de dorada, alimentados con diferentes dietas en el Experimento II (media \pm desviación típica)	98
Tabla XXV.- Requerimientos calculados de aminoácidos para dorada (<i>Sparus aurata</i>) y perfiles teóricos de aminoácidos de las dietas experimentales del Experimento II (en g por 100 g de peso seco)	100
Tabla XXVI.- Características biométricas de los reproductores utilizados en el Experimento III (media \pm desviación típica)	106
Tabla XXVII.- Composición de las dietas experimentales del Experimento III	107
Tabla XXVIII.- Composición analizada de las dietas experimentales del Experimento III ..	108
Tabla XXIX.- Índices de las puestas de los reproductores del Experimento III, alimentados con las dietas experimentales (media \pm desviación típica)	109
Tabla XXX.- Índices de las puestas de los reproductores alimentados con dietas similares en n-3 HUFA y diferentes niveles de adición de vitamina E (media \pm desviación típica)	110

Tabla XXXI.- Índices de las puestas de los reproductores alimentados con dietas con diferentes niveles de adición de vitamina E y de n-3 HUFA (media \pm desviación típica)	114
Tabla XXXII.- Medidas de los huevos y larvas producidos por los distintos grupos de los reproductores, alimentados con las dietas experimentales del Experimento III (media \pm desviación típica)	119
Tabla XXXIII.- Composición de los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las dietas experimentales del Experimento III	120
Tabla XXXIV.- Características biométricas de los reproductores utilizados en el Experimento IV (media \pm desviación típica)	132
Tabla XXXV.- Composición de las dietas experimentales del Experimento IV	133
Tabla XXXVI.- Composición analizada de las dietas experimentales del Experimento IV ..	134
Tabla XXXVII.- Composición en los principales ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de las dietas experimentales del Experimento IV	134
Tabla XXXVIII.- Índices de las puestas de los reproductores, del Experimento IV, alimentados con las dietas experimentales (media \pm desviación típica) ..	137
Tabla XXXIX.- Medidas de huevos y larvas de las puestas de los reproductores del Experimento IV (media \pm desviación típica)	144
Tabla XL.- Composición en los principales ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos del Experimento IV	145

7.- LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.- Relación entre la hora de recogida y el número de huevos recogidos en los tanques de 6000	33
Fig. 2.- Relación entre la hora de recogida y el número de huevos recogidos en los en los tanques de 1000 l	34
Fig. 3.- Huevos vivos a lo largo del desarrollo embrionario (modificada de Divanach, 1985 ..	36
Fig. 4.- Huevos muertos (A) y huevos, huevos no fecundados (B) y huevos y larvas anormales (C) modificada de Divanach, 1985)	37
Fig. 5.- Cromatógrafos utilizados para la determinación de los ácidos grasos (A) y vitamina E (B)	47
Fig. 6.- Mezcladora utilizada para la preparación de las dietas experimentales	53
Fig. 7.- Granuladora utilizada en la preparación de los gránulos de las dietas de los Experimentos III y IV	53
Fig. 8.- Armario secador para los piensos experimentales	54
Fig. 9.- Gránulos experimentales obtenidos con la granuladora CPM	54
Fig. 10.- Relación del EPA y del AA contenido en las dietas experimentales con el porcentaje de huevos no fecundados en el Experimento I	60
Fig. 11.- Relación del EPA y del DHA contenido en las dietas experimentales con el porcentaje de huevos vivos en el Experimento I	61
Fig. 12.- Relación entre los n-3 HUFA de las dietas experimentales y el porcentaje de huevos vivos en el Experimento I	62
Fig. 13.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada, del Experimento I, alimentados con dietas conteniendo diferentes niveles de n-3 HUFA	63
Fig. 14.- Relación entre los ácidos grasos de la serie n-3 y n-3 HUFA contenidos en las dietas experimentales y sus niveles en los huevos en el Experimento I	67
Fig. 15.- Relación entre el porcentaje de huevos vivos y el contenido en n-3 HUFA y EPA de los huevos, procedentes de los reproductores alimentados con las dietas experimentales, en el Experimento I	68
Fig. 16.- Relación entre los porcentajes de huevos no fecundados y anormales morfológicamente con el nivel de EPA en los huevos, procedentes de los reproductores alimentados con las dietas experimentales, en el Experimento I	69

Fig. 17.- Relación entre el porcentaje de huevos anormales con mas de una gota de grasa y el contenido en n-3 HUFA de las dietas del Experimento II	86
Fig. 18.- Relación entre el porcentaje de huevos no fecundados y el contenido en AA y EPA de las dietas del Experimento II	87
Fig. 19.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada, del experimento II, alimentados con las dietas experimentales y con la dieta comercial	89
Fig. 20.- Relación entre los porcentajes de huevos vivos y de eclosión y el contenido en ácidos grasos de la serie n-9 de los huevos de los reproductores alimentados con las dietas del Experimento II	94
Fig. 21.- Relación entre el contenido en AA y EPA de los huevos y el diámetro de los mismos en el Experimento II	95
Fig. 22.- Relación entre el EPA contenido en de los huevos y el diámetro de las gotas de grasa en el Experimento II	96
Fig. 23.- Relación entre el contenido en vitamina E de las Dietas 1, 2, 3 y 4 y el porcentaje de huevos vivos	111
Fig. 24.- Relación entre el contenido de vitamina E en las Dietas 1, 2, 3 y 4 y los porcentajes de huevos no fecundados y morfológicamente anormales	112
Fig. 25.- Relación entre el contenido de vitamina E en las Dietas 1,2, 3 y 4 y los porcentajes de larvas morfológicamente anormales y de supervivencia larvaria ...	113
Fig. 26.- Correspondencia entre la relación vitamina E/n-3 HUFA de las Dietas 1, 2, 3 y 5 y el porcentaje de huevos vivos	115
Fig. 27.- Correspondencia entre la relación vitamina E/n-3 HUFA de las Dietas 1, 2, 3 y 5 y los porcentajes de huevos no fecundados y morfológicamente anormales	116
Fig. 28.- Correspondencia entre la relación vitamina E/n-3 HUFA de las Dietas 1, 2, 3 y 5 y el porcentaje de larvas anormales	117
Fig. 29.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada, del Experimento III, alimentados con las dietas experimentales	118
Fig. 30.- Relación entre el contenido en vitamina E de las dietas experimentales y el contenido de está en los huevos	121
Fig. 31.- Relación entre la proporción EPA/DHA de los huevos y el porcentaje de huevos vivos en el Experimento III	122

Fig. 32.- Relación entre la proporción EPA/DHA de los huevos y los porcentajes de eclosión y de supervivencia larvaria en el Experimento III	123
Fig. 33.- Relación entre la proporción EPA/DHA de los huevos y los porcentajes de huevos y larvas morfológicamente anormales en el Experimento III	124
Fig. 34.- Relación entre el porcentaje de huevos vivos y el nivel dietético de n-3 HUFA en el Experimento IV	138
Fig. 35.- Relación entre el porcentaje de huevos no fecundados y el nivel dietético de n-3 HUFA en el Experimento IV	138
Fig. 36.- Relación entre el porcentaje de huevos no fecundados con el nivel dietético de oleico y con la relación oleico/n-3 HUFA	139
Fig. 37.- Relación entre el porcentaje de huevos vivos y el nivel dietético de la proporción AA/EPA	140
Fig. 38.- Relación entre el porcentaje de eclosión y el nivel dietético de la proporción AA/EPA	140
Fig. 39.- Relación entre el porcentaje de supervivencia larvaria y el nivel dietético de la proporción AA/EPA	141
Fig. 40.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada, del Experimento IV, alimentados con las dietas experimentales	143
Fig. 41.- Relación entre los niveles dietéticos de los ácidos grasos de la serie n-3 y n-3 HUFA y su contenido en los huevos	146
Fig. 42.- Relación entre el porcentaje de huevos vivos y los niveles de n-3 HUFA y DHA en los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las dietas experimentales del Experimento IV	147
Fig. 43.- Relación entre los porcentajes de eclosión y de supervivencia larvaria con el nivel de la proporción AA/EPA en los huevos	148
Fig. 44.- Relación entre el porcentaje de huevos no fecundados y el contenido en EPA y en ácidos grasos saturados de los huevos del Experimento IV	149
Fig. 45.- Relación entre el diámetro de los huevos y el nivel de AA y EPA en los mismos ..	150
Fig. 46.- Relación entre el diámetro de la gota de grasa y el nivel de EPA en los huevos del Experimento IV	151

INFORMES TÉCNICOS DEL INSTITUTO CANARIO DE CIENCIAS MARINAS

(Números publicados)

1. **Descripción de la pesquería de enmalle en el sector norte-noroeste de Gran Canaria.** José A. GONZÁLEZ, José I. SANTANA, Vicente RICO, Víctor M. TUSET y M. Mercedes GARCÍA-DÍAZ. Diciembre 1995. Págs. 1-58.
2. **Diez años de observaciones desde el B/H Esperanza del mar, 1985-1995.** O. LLINÁS, M.J. RUEDA, A. GONZÁLEZ-MUNOZ, R. SANTANA, J. PÉREZ-MARRERO, E. PÉREZ-MARTELL, C. RODRÍGUEZ, A. CIANCA, E. DELGADO y P. CLEMENTE-COLON. Diciembre 1996. Págs. 1-80.
3. **ESTOC data report 1994.** Editors: O. LLINÁS, A. RODRÍGUEZ DE LEÓN, G. SIEDLER & G. WEFER. Agosto 1997. Págs. 1-72.
4. **Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*).** Lidia Esther ROBAINA ROBAINA. Mayo 1998. Págs. 1-195.
5. **Epi and mesopelagic fishes, acoustic data, and sst images collected off Lanzarote, Fuerteventura, and Gran Canaria, Canary Islands, during Cruise "La Bocaina 04-97".** F. BORDES, F. UIBLEIN, R. CASTILLO, A. BARRERA, J.J. CASTRO, J. MORENO, F. PÉREZ, A. RAMOS, T. SUTTON & M. YAMAGUCHI. Diciembre 1998. Págs. 1-45.
6. **Estudio de la dinámica del ecosistema del Charco de Maspalomas (1992-1998), Gran Canaria.** N. GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ, E. SOLER-ONÍS, T. MORENO-MORENO, J.J. CASTRO-HERNÁNDEZ & M.J. BETANCORT-VILLALBA. Enero 1999. Págs. 1-76.
7. **ESTOC data report 1995-96.** Editors: O. LLINÁS, A. RODRÍGUEZ DE LEÓN, G. SIEDLER & G. WEFER. Agosto 1999. Págs. 1-152.
8. **Bioeconomía del cultivo de dorada (*Sparus aurata*).** E. GASCA-LEYVA. Enero 2000. Págs. 1-88.
Economic of commercial gilthead seabream (*Sparus aurata*) production. E. GASCA-LEYVA. Enero 2000. Págs. 89-106.
9. **Species composition of mesopelagic fishes in the area of the Canary Island, eastern central Atlantic.** R.M. WIENERROITHER. Julio 2000. Págs. 1-110.
10. **Las jaulas de cultivo de peces y el impacto ambiental: El caso de la bahía de Melenara.** L. MOLINA DOMÍNGUEZ. Marzo 2004. Págs. 1-126.
11. **Prospección con nasa para crustáceos y peces en aguas profundas de las islas Cabo Verde. Resultados de la campaña "Taliarte 2003-08".** J.A. GONZÁLEZ, A.M. GARCÍA-MEDEROS, J.A. PÉREZ-PEÑALVO, S. CORREIA, C. MONTEIRO, A. MEDINA, R. GONZÁLEZ-CUADRADO, M. RABASSÓ, R. DOMÍNGUEZ-SEOANE, M. GIMENO, V.M. TUSET, L.F. LÓPEZ-JURADO Y J.I. SANTANA. Julio 2004. Págs. 1-76.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

TEXTO

El original se mecanografiará en DIN-A4, letra tipo Times New Roman 13 pt, a 1 espacio, dejando un margen de 2,5 cm de margen por cada lado. La paginación irá centrada en el margen inferior. Las mayúsculas también se acentuarán. La estructura de los informes debe ajustarse lo más posible a los siguientes apartados:

RESUMEN-SUMMARY
ÍNDICE
INTRODUCCIÓN
MATERIAL Y MÉTODOS
RESULTADOS Y DISCUSIÓN
CONCLUSIONES
AGRADECIMIENTOS
BIBLIOGRAFÍA
ANEXOS

En la primera página irá el título del Informe (en negrita y mayúscula) y el(los) nombre(s) del (los) autor(es) (en negrita, minúscula el nombre y versalita el apellido); su(s) dirección(es), institución, dirección, ciudad, país (en mayúscula), la fecha de envío y la referencia del Informe a pie de página en negrita, mayúscula y cursiva.

El **RESUMEN** y **SUMMARY** irán solos, con los títulos centrados (en español e inglés) y sin numeración. El **ÍNDICE** va sin numerar y contendrá los títulos de los apartados y subapartados con la página donde comienzan. La numeración comenzará en la página 4 con la **INTRODUCCIÓN**. Los títulos de los apartados irán centrados, en negrita y mayúscula. Se comenzará a escribir dejando una tabulación. En los puntos y aparte se dejará un espacio y entre apartados se dejarán dos espacios. Entre un título y el texto se dejará un espacio. Los subapartados se numerarán siguiendo su orden correspondiente. Se mecanografiarán en mayúscula, negrita y sin tabulación.

El nombre vulgar de las especies cuando se cite por primera vez en el trabajo debe ir seguido por su nombre científico, el autor y el año entre paréntesis (pesquería artesanal de la vieja *Sparisoma cretense* (Linnaeus, 1758). Los nombres científicos tienen que ir en cursiva (*Sparisoma*).

Las referencias a otros trabajos se harán citando entre paréntesis sólo el apellido del (los) autor(es) en versalita y el año de publicación, separados por una coma (GONZÁLEZ Y LOZANO, 1992).

Los símbolos y signos químicos, físicos o matemáticos, se escribirán ateniéndose a las normas internacionales vigentes. SI (Sistema Internacional de Unidades). Se escribirán sin punto y sin plural. Las abreviaturas de las publicaciones científicas se ajustarán a lo que indica la "World List of Scientific Publications". Los números decimales se escribirán con punto (0.25), los números mayores de tres cifras no llevan punto sino un espacio (1 034) y los años irán sin espacio (1995).

BIBLIOGRAFÍA

Las citas bibliográficas se harán por orden alfabético según el siguiente orden: autor (apellido e iniciales del nombre con versalita), año de publicación (si hay más de una del mismo autor se citarán añadiendo letras minúsculas al lado del año, 1994a, 1994b), título completo del trabajo, nombre de la publicación en cursiva (completo o abreviado), número y páginas. Si es un libro su título debe ir en cursiva especificando la editorial y la ciudad.

FIGURAS, TABLAS Y MAPAS

Las figuras, tablas o mapas no deben sobrepasar una vez reducidos los 17X22.5 cm incluyendo la leyenda del pie. Los pies de figuras, tablas o mapas irán en hoja aparte si no están incluidos en la reducción. Los títulos y pies de las figuras, tablas y mapas irán en español e inglés (en cursiva) separados por un espacio. Tanto las figuras como las tablas se numerarán con números arábigos; si hubiese llamadas irán debajo del pie separadas por un espacio y una línea (letra tipo Times New Roman 10 pt).

ENVÍO Y ACEPTACIÓN

Solo se aceptarán trabajos originales que no hayan sido editados ni enviados simultáneamente a otras publicaciones. Los trabajos (original y dos copias) y el soporte informático en Word Perfect 6.0 Win deberán dirigirse a la Secretaría Técnica de Informes Técnicos del ICCM. Apdo. 56, 35200 Telde, Gran Canaria, Islas Canarias, España, mediante correo certificado con acuse de recibo. El (los) autor(es) al enviar el original aceptan que los derechos de copyright de su trabajo son transferidos al editor de los Informes Técnicos si es aceptado para su publicación, esto abarca los derechos de exclusivos para reproducir y distribuir el trabajo.

Los informes serán revisados por el Comité Editorial y al menos por dos evaluadores del Consejo Editor. En caso de existir correcciones, se remite de nuevo al autor para que introduzca las modificaciones en el original en un plazo de 10 días. Los autores recibirán 10 ejemplares del Informe, si hay más de un autor se le enviará al que figura como primer autor.