



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Biología

Uso de carotenoides en dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*):
relaciones con otros nutrientes y su efecto en la calidad de la puesta

Valeria Scabini Vrsalovic

Las Palmas de Gran Canaria - 2010

TESIS DOCTORAL

Uso de carotenoides en dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*): relaciones
con otros nutrientes y su efecto en la calidad de la puesta



Valeria Scabini Vrsalovic

Las Palmas de Gran Canaria - 2010



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Biología





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Anexo I

D. JUAN LUIS GÓMEZ PINCHETTI SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA,

Que el consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha de 16 de noviembre del 2009 tomo el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: "***Uso de carotenoides en dietas para reproductores de dorada (Sparus aurata): relaciones con otros nutrientes y su efecto en la calidad de la puesta***" presentada por la doctoranda D^a. Valeria Scabini Vrsalovic y dirigida por la Doctora María Soledad Izquierdo López y el Doctor Hipólito Fernández-Palacios Barber.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 17 de noviembre del 2009



DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICO



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: BIOLOGIA

Programa de Doctorado: ACUICULTURA

Título de la Tesis

Uso de carotenoides en dietas para reproductores de dorada (Sparus aurata): relaciones con otros nutrientes y su efecto en la calidad de la puesta.

Tesis Doctoral presentada por D^a. Valeria Scabini Vrsalovic y

Dirigida por la Doctora María Soledad Izquierdo López

Codirigida por el Doctor Hipólito Fernández-Palacios Barber.

La Directora

El Codirector

La Doctoranda

(firma)

(firma)

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria a 17 de noviembre del 2009

INDICE

AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Definición de acuicultura.....	1
1.2. Antecedentes y situación actual de la acuicultura	1
1.3. Indicadores de la calidad de la puesta.....	6
1.4. Factores que afectan la calidad de la puesta.....	9
1.5. Efecto de la dieta de los reproductores sobre la puesta.....	10
1.5.1. Lípidos	11
1.5.2. Proteínas.....	21
1.5.3. Vitaminas	25
1.5.4. Otros nutrientes	31
1.5.5. Carotenoides	34
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	37
2.1. Justificación.....	37
2.2. Objetivos.....	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	38
3.1. Especie objeto de estudio	38
3.2. Condiciones experimentales	41
3.2.1. Control de las puestas	42
3.2.2. Índices de las puestas	45
3.2.3. Producciones relativas	49
3.2.4. Medida de huevos y larvas	50
3.3. Parámetros abióticos del agua de mar	50
3.4. Dietas experimentales	50
3.4.1. Formulación	50
3.4.2. Elaboración	52
3.5. Análisis proximales	53
3.5.1. Cenizas	53
3.5.2. Humedad	53
3.5.3. Proteínas	54
3.5.4. Lípidos totales	54
3.5.5. Carotenoides	56
3.5.6. Vitaminas	56
3.6. Tratamiento estadístico de los datos	59
3.7. Nombres vulgares de las especies utilizados	59

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
4.1.	Experimento I. Inclusión de carotenoides naturales en dietas para reproductores de dorada (<i>Sparus aurata</i> L.) y su efecto en la puesta	
4.1.1.	Introducción.....	60
4.1.2.	Material y métodos.....	61
4.1.3.	Resultados	67
4.1.4.	Discusión	75
4.1.5.	Bibliografía.....	80
4.2.	Experimento II. Efecto del nivel de carotenoides en dietas para reproductores de dorada (<i>Sparus aurata</i> L.) sobre la calidad de las puestas	89
4.2.1.	Introducción.....	89
4.2.2.	Material y métodos.....	90
4.2.3.	Resultados	95
4.2.4.	Discusión	105
4.2.5.	Bibliografía.....	110
4.3.	Experimento III. Calidad de la puesta en Dorada (<i>Sparus aurata</i> L., 1758) alimentados con dos niveles combinados de carotenoides y ácidos grasos esenciales.....	118
4.3.1.	Introducción.....	118
4.3.2.	Material y métodos	120
4.3.3.	Resultados	124
4.3.4.	Discusión	137
4.3.5.	Bibliografía.....	143
4.4.	Experimento IV. Niveles de carotenoides y vitamina E en dietas para reproductores de dorada (<i>Sparus aurata</i> L.) y su efecto en la calidad de la puesta y composición de los huevos	153
4.4.1.	Introducción.....	153
4.4.2.	Material y métodos.....	155
4.4.3.	Resultados	159
4.4.4.	Discusión	167
4.4.5.	Bibliografía.....	171
5.	CONCLUSIONES	179
6.	BIBLIOGRAFÍA GENERAL	181
7.	ANEXO	216
8.	LISTA DE TABLAS	220
9.	LISTA DE FIGURAS	223

10. ABREVIATURAS..... 227

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que de una u otra forma han estado acompañándome y colaborando en este largo camino de doctorante. En primer lugar quiero agradecer a mis Directores, la Dra. Marisol Izquierdo L. y el Dr. Hipólito Fernández-Palacios B. han hecho posible parte de mi formación científica y aceptarme a formar parte del grupo G.I.A. poniendo a disposición y brindando las facilidades de las instalaciones, dependencias, materiales durante mi estancia en Taliarte en el ICCM como en Bañaderos en el laboratorio IUSA. Así como también a los investigadores que laboran en este mundo “azul” siempre tuvieron un gesto y palabra amable y como no olvidarme del queridísimo personal administrativo de Taliarte por todos los momentos compartidos y siempre su ayuda incondicional y cariño.

Y tampoco me olvidare de mis queridos compañeros de doctorado, algunos emprendieron otros rumbos pero quedo impreso en mi genoma sentimental, mi afecto para ti, Eduardo, Mentor, Tatty, Gloria, Rachid, Tibi, Eyad, Eneko. y tu Patty siempre estaras muy presente en nuestras vidas Y otros becarios, compañeros y amigos, por el buen ambiente de compañerismo y solidaridad que tuvimos. Nico, Dominique, Mapi, Gercende brindando apoyo y animo.

Y para nuestros amigos canariones queridísimo Luís y Mari junto a Noelia nuestra familia adoptiva. Y por supuesto Roxana, José, Tessy, Juan y Rogelio por acogernos en sus hogares y corazones, muchísimas gracias.

Mi agradecimiento infinito para mis seres más preciados mi viejita, Vania ,Enzo y para ti Edu. una gratitud muy especial por lo que todos sabemos el esfuerzo y cambio que significo para ti como profesional. Y para el resto de mi familia que siempre estuvieron animando y apoyando, infinitas gracias.

RESUMEN

USO DE CAROTENOIDES EN DIETAS PARA REPRODUCTORES DE DORADA (*Sparus aurata*): RELACIONES CON OTROS NUTRIENTES Y SU EFECTO SOBRE LA CALIDAD DE LA PUESTA

Las necesidades nutricionales de los reproductores de dorada han sido poco estudiadas, esto unido al comportamiento reproductor imprevisible y variable de las especies en cautividad, constituyen un importante factor limitante para la producción masiva de semilla. La adecuada alimentación de los reproductores no solo puede mejorar la calidad de huevos y espermatozoides si no también aumentar la producción de semilla.

El objetivo general de este trabajo fue el de realizar una aproximación al efecto de la inclusión de sustancias bioactivas como los carotenoides, en la dieta de los reproductores de dorada (*Sparus aurata*), y su relación con otros micronutrientes (n-3 HUFA y vitamina E) sobre la calidad de la puesta de esta especie bajo condiciones de cultivo. Se evaluaron los efectos de dietas experimentales, sobre el número de huevos producidos, morfometría de los mismos, viabilidad, número de larvas eclosionadas y supervivencia larvaria, entre otros. En forma paralela se estudió, la composición bioquímica de los huevos y su relación con la dieta suministrada, y con la calidad de la puesta.

Se realizaron una serie de experimentos, todos ellos con un diseño experimental muy similar entre sí, los objetivos específicos de los experimentos realizados fueron: evaluar el efecto de la utilización de carotenoides de distinto origen; determinar el requerimiento de carotenoides en dietas isoprotéicas e isolipídicas; evaluar el efecto de la inclusión de carotenoides y distintos niveles

de n-3 HUFA y evaluar el efecto de la inclusión de Vitamina E y carotenoides en la dieta.

Los resultados de este trabajo sugieren que la calidad de la puesta de la dorada puede mejorarse por la inclusión de carotenoides dietéticos. La inclusión de carotenoides, como el pimentón en polvo, de origen vegetal, produjo mejores resultados en la calidad de la puesta que la harina de langostino, de origen animal. Esto se podría deber al tipo de carotenoides que determinan también la calidad nutricional. La calidad de la puesta de la dorada puede mejorarse con la inclusión de entre un 1 y un 2 % de carotenoides, provenientes de pimentón comercial, en la dieta de los reproductores. Los niveles de n-3 HUFA en dietas para reproductores de esta especie podrían elevarse hasta un 3,5% cuando se complementan conjuntamente con carotenoides provenientes de oleorresina del pimentón y con vitamina E, mejorando así la calidad de la puesta

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. DEFINICIÓN DE ACUICULTURA

Según la FAO, la acuicultura es la cría de organismos acuáticos, ya sean peces, moluscos, crustáceos o plantas acuáticas. El cultivo implica algún tipo de intervención en el proceso para incrementar la producción, por ejemplo el almacenamiento regular, la alimentación, la protección contra los depredadores, etc. El cultivo implica también la propiedad individual o colectiva del stock explotado. Con fines estadísticos, los organismos acuáticos que son recolectados por un individuo o un colectivo que los ha tenido, bajo su control, durante el período de cultivo constituyen la producción de la acuicultura, mientras que los organismos acuáticos que son explotables por todos como recursos de propiedad pública, con o sin licencia apropiada, constituyen la cosecha de las pesquerías.

1.2. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA

La Piscicultura como tal nació hace 4000 años en China con el cultivo de la carpa. En la Edad Media es conocida la labor de cría de trucha y carpa que realizaban diferentes monasterios y abadías europeas de una forma continuada. Un gran avance tuvo lugar en Francia cuando se realizó la primera fecundación artificial de huevos de trucha en el siglo XIV. Hay pruebas de que en Inglaterra se comenzó a cultivar peces planos en el siglo siguiente.

Hoy en día la piscicultura es una realidad asentada que ha experimentando en los últimos años un desarrollo espectacular (Halwart *et al.*, 2007), y es sin lugar a dudas la forma de ganadería especializada que se desarrolla más rápidamente teniendo ciertamente un enorme porvenir en cuanto a rendimientos, nuevas especies susceptibles de ser cultivadas y comercialización de sus productos.

Actualmente el cultivo del salmón, especialmente del salmón Atlántico (*Salmo salar*), figura como la referencia y línea a seguir para cualquier forma de piscicultura industrial moderna debido fundamentalmente al fuerte desarrollo que se ha producido en las dos últimas décadas en Noruega y Escocia, así como en otros países con condiciones ambientales similares, de los cuales el ejemplo más destacado es Chile, donde se ha convertido, al igual que en Noruega, en una de las principales actividades productivas del país. En 1912 los noruegos comenzaron a cultivar la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en el mar, sin embargo los primeros resultados exitosos no se produjeron hasta los años 50, llegándose en 1965 a una producción de 500 toneladas métricas (t).

Considerando que el 70% de los caladeros internacionales se encuentran en estado de sobreexplotación y que el nivel de capturas actual es prácticamente el máximo que puede alcanzarse permaneciendo prácticamente constante desde los '90 (Fig. 1) el aumento del consumo de estos productos, debido al incesante incremento de la población mundial en los últimos años y a su necesidad natural de alimentarse, debe fundamentarse en la acuicultura, lo que confirma las altas expectativas de crecimiento para las producciones acuícolas en un futuro próximo.

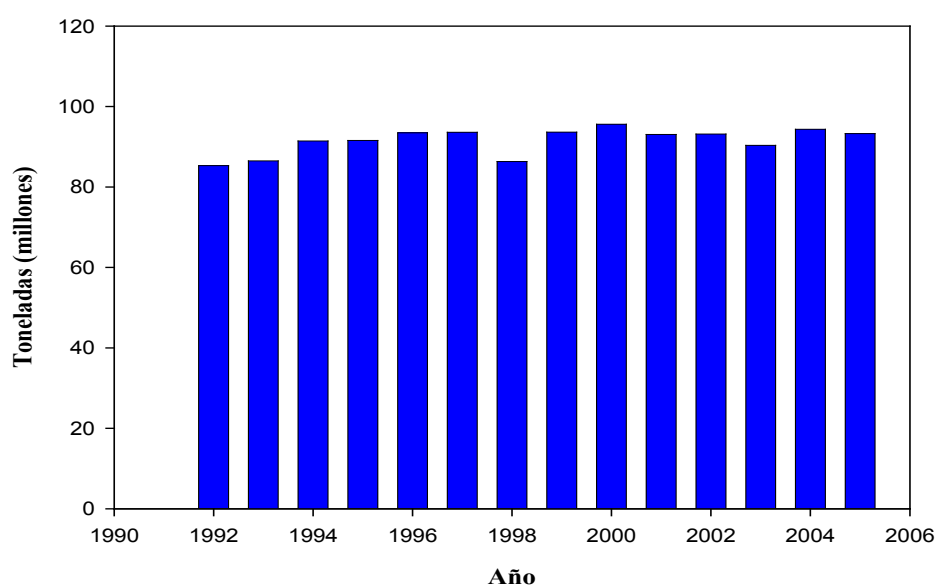


Fig. 1.- Capturas mundiales de peces, moluscos y crustáceos en las dos últimas décadas (FAO, 2007).

La acuicultura, posiblemente el sector de producción de alimentos de crecimiento más acelerado, hoy representa casi el 50% de los productos pesqueros mundiales (Fig. 2). El crecimiento de este sector es el más elevado entre los dedicados a la producción de alimentos de origen animal. En los últimos 30 años, la tasa de crecimiento anual de la acuicultura ha sido del 9,2 %, mientras que la de la pesca únicamente alcanzó el 1,4%, y la producción cárnica basada en cría de animales el 2,8%. La producción piscícola europea alcanzó el millón y medio de toneladas métricas en especies de alto valor comercial, en la Tabla I se indica la producción de las principales especies de peces de la acuicultura europea en el año 2006.

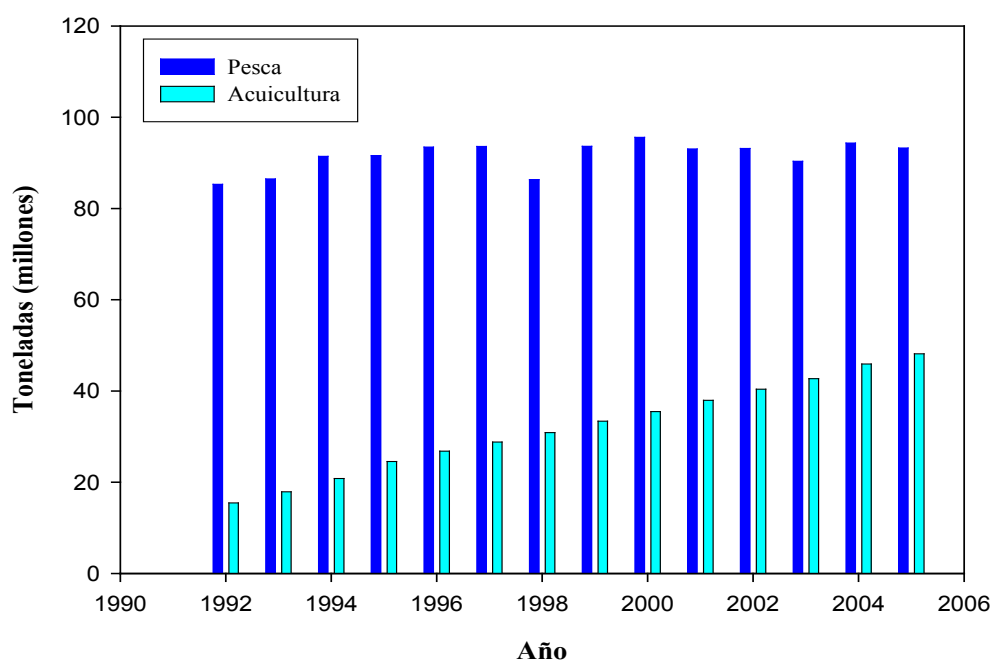


Fig. 2.- Capturas y producción de la acuicultura de peces, moluscos y crustáceos en las dos últimas décadas (FAO, 2007).

Tabla I.- Principales producciones de peces en Europa en el año 2008 (FEAP, 2008)

ESPECIE	NOMBRE CIENTÍFICO	TONELADAS METRICAS
Anguila	<i>Anguilla anguilla</i>	5.124
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	70.440
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	148.430
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	138.156
Rodaballo	<i>Psetta maxima</i>	7.962
Trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	326.843
Salmón Atlántico	<i>Salmo salar</i>	987.789
Bacalao	<i>Gadus morhua</i>	11.680

El principal grupo de peces producidos fue el de los salmónidos. Salmón Atlántico y trucha arco iris representan el 76,50% del total, siendo Noruega y Reino Unido los principales productores de salmón, y Francia, Italia, Dinamarca y España, los mayores productores de trucha arco iris. Además los ciprínidos alcanzan el 4,1% del total, y los peces marinos, principalmente dorada y lubina, producidos en los países del área mediterránea llegan al 17,31% de la producción total. El cultivo de la dorada y la lubina, desarrollado en los años 90, ha crecido de forma espectacular y está presente en la mayoría de los países de la cuenca mediterránea (Le-Breton, 1994). El país mayor productor de ambas especies es Grecia seguido por Turquía y España. Hoy por hoy la especie principalmente producida en nuestro país es la trucha arco iris. Junto a la trucha hay que destacar la producción española de dorada, especie que es engordada fundamentalmente en jaulas flotantes en el Mediterráneo y Canarias. Después, en orden de importancia, destacan los cultivos de lubina y de rodaballo (Tabla II).

Tabla II.- Principales producciones de peces en España en el año 2007 (Jacumar, 2008)

ESPECIE	NOMBRE CIENTÍFICO	TONELADAS METRICAS
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	19.855, 41
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	10.040, 21
Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i>	6.035, 17
Anguila	<i>Anguilla anguilla</i>	278, 13
Atún Atlántico	<i>Thunnus thynnus</i>	3.101, 58
Corvina	<i>Argyrosomus regius</i>	260, 76
Trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	24.029, 64
Besugo	<i>Pagellus bogaraveo</i>	195, 35
Lenguado senegales	<i>Solea senegalensis</i>	58,13

En Canarias la producción de peces del año 2007 ascendió a 8.123,94 t, de las cuales 3.547, 61 corresponden a lubina, lo que representó el 35,33 % de la producción nacional, y 4.576, 33 a dorada, lo que representó el 23,04 % de la producción nacional. En la Tabla III se señalan las producciones de estas dos especies por Comunidades Autónomas.

Tabla III.- Producción, en toneladas métricas, de dorada y lubina en España en el año 2007 (Jacumar, 2008)

COMUNIDAD AUTÓNOMA	LUBINA	DORADA
ANDALUCÍA	3.209, 70	3.620, 68
MURCIA	1.476, 56	3.450, 84
C. VALENCIANA	1.336, 11	6.507, 02
CATALUÑA	470, 23	1.538, 42
BALEARES		162, 17
CANARIAS	3.547, 61	4.576, 33
TOTAL	10.040, 21	19.855, 46

Se calcula que para producir 20 millones de toneladas métricas de peces es necesaria la obtención de 80 billones de juveniles (Lee, 2003). El rendimiento en la cadena de producción viene determinado en gran parte por la cantidad, calidad y salud de las larvas y alevines que producen los reproductores. En el caso de la dorada, la producción de semilla en Europa el año 2008 ascendió a un total de 485, 21 millones de unidades repartidas entre ocho países (Tabla IV).

Tabla IV.- Producción de semilla de dorada en Europa (FEAP, 2008)

PAÍS	UNIDADES (millones)
CROACIA	7, 00
CHIPRE	13, 00
FRANCIA	31, 31
GRECIA	214, 00
ITALIA	48, 00
PORTUGAL	20, 00
ESPAÑA	71, 90
TURQUÍA	80, 00
TOTAL	485, 21

1.3. 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 pelucida, 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; Mansour *et al.*, 2007). 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, esta 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. Así, el contenido en lípidos (Sargent, 1995; Bell y Sargent, 2003; Tveiten *et al.*, 2004; Bransden *et al.*, 2007), n -3 HUFA (Ling *et al.*, 2006), aminoácidos (Rønnestad y Fyhn, 1993) vitaminas (Rønnestad *et al.*, 1997, 1999; Maeland *et al.*, 2003) o carbohidratos (Giménez *et al.*, 2006) han sido considerados como indicadores de calidad de los huevos. Sin embargo en cuanto a la composición bioquímica del huevo, que en principio podría esperarse que fuera el parámetro más determinante de la calidad de este, 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 (Craik y Harvey, 1984; Kjørsvik *et al.*, 1990).

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 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). Por otro lado, varios compuestos y enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos han sido identificadas como excelentes indicadores de la calidad en los huevos de algunos espáridos; como la dorada (*Sparus aurata*) o el sargo picudo (*Puntazzo puntazzo*) (Lahnsteiner y Patarnello, 2004 a,b).

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. Los indicadores comúnmente utilizados en los trabajos de investigación referente a la calidad de la puesta, pueden agruparse en dos categorías:

a) Características de los huevos: medidas de huevos y larvas, esfericidad y transparencia del huevo, flotabilidad del huevo, número y distribución de las gotas de grasa, composición bioquímica de los huevos, tasa de fecundación, apariencia del corión y simetría de los blastómeros.

b) Parámetros productivos: porcentaje de huevos flotantes, de fecundación, de eclosión, y de supervivencia larvaria (desde la eclosión hasta la primera alimentación exógena). Producciones por kg de hembra de huevos totales, huevos viables, larvas nacidas y larvas con el saco vitelino reabsorbido.

1.4. FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA PUESTA

Diversos factores, bióticos y abióticos, han sido propuestos como posibles determinantes de la calidad del huevo o de su supervivencia, tanto en condiciones naturales como en cautividad. Sin embargo, no existe un acuerdo sobre que niveles de mortalidad pueden considerarse como indicadores de buena calidad o sobre que factores del huevo o del reproductor pueden incidir en la calidad del huevo (Bromage *et al.*, 1992). 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.

De todos de los factores que han sido sugeridos como determinantes de calidad de la puesta sólo unos pocos de estos han mostrado una clara influencia en la calidad de la descendencia (Carrillo *et al.*, 2000, modificado por Álvarez-Lajonchère, 2006) y se pueden resumir en:

Factores que afectan a los reproductores: genotipo, nutrición, métodos de inducción a la puesta, estrés, edad (pubertad y vejez) y sobremaduración de los huevos.

Factores que afectan al huevo: propiedades físicas y fisiológicas, aberraciones cromosómicas, colonización bacteriana, propiedades físico-químicas del agua de la puesta e incubación.

1.5. EFECTO DE LA DIETA DE LOS REPRODUCTORES SOBRE LA PUESTA

Aunque hace tiempo que se reconoce la importancia de una adecuada alimentación en la reproducción y calidad de las puestas en los teleósteos (Luquet y Watanabe, 1986), los requerimientos nutritivos de los reproductores sigue siendo una de las áreas menos estudiadas en el campo de la nutrición de los peces. Además, los escasos trabajos de los que se dispone están limitados a unas pocas especies (Brooks *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001). En gran medida, esto es debido a la necesidad de grandes instalaciones, interiores o exteriores, para mantener grupos numerosos de reproductores, y al alto coste tanto para la construcción como para el mantenimiento de las instalaciones requeridas para realizar experimentos de alimentación de larga duración, con peces de gran tamaño. Sin embargo, como ocurre en nutrición humana ó en ganadería (Leboulanger, 1977), es obvio que los requerimientos nutricionales de los reproductores se diferencian claramente de los que requieren los animales jóvenes o los adultos fuera de la etapa reproductiva. Es más, como en otros animales, parece evidente que muchos de los problemas y deficiencias que aparecen en las etapas tempranas del desarrollo de huevos y larvas están directamente relacionadas con el régimen alimenticio de los reproductores. Así, los componentes nutricionales de la dieta afectan directamente la calidad de las puestas como sugieren las investigaciones realizadas en algunas de las principales especies cultivadas: dorada (*Sparus aurata*) (Mourente y Odriozola, 1990; Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997, 2005), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Cerdá *et al.*, 1994; Carrillo *et al.*, 1995; Navas *et al.*, 1997), pargo japonés, (*Pagrus major*) (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 b, 1991 a, 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), 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) o rodaballo

(*Scophthalmus maximus*) (Lavens *et al.*, 1999).

Los pioneros trabajos de Watanabe y colaboradores en el año 1984 mostraron que la composición de las dietas para los reproductores del pargo japonés (*Pagrus major*) constituye un factor determinante de la calidad de sus puestas. Investigaciones posteriores indican que son varios los tipos de nutrientes capaces de influir en la reproducción, tales como: los lípidos polares ó no polares (Watanabe *et al.*, 1991a, b), los ácidos grasos esenciales (Harel *et al.*, 1994; Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Carrillo *et al.*, 1995; Bruce *et al.*, 1999; Mazorra *et al.*, 2003), los carbohidratos (Mangor-Jensen y Birkeland, 1993), las proteínas (Harel *et al.*, 1995; Gunasekera *et al.*, 1996 a, b), la vitamina E (Emata *et al.*, 2000; Fernández-Palacios *et al.*, 2005), el ácido ascórbico (Dabrowski y Blom, 1994; Blom y Dabrowski, 1995), la vitamina A (Furuita *et al.*, 2003 a), los carotenoides (Vasallo-Agius *et al.*, 2001 a, b, c) ó los nucleótidos (González-Vecino *et al.*, 2004).

1.5.1. LIPIDOS

Los lípidos constituyen el componente dietético mejor estudiado en nutrición de reproductores. Trabajos como los de Watanabe *et al.* (1984 a), Mourente *et al.* (1989), Dhert *et al.* (1991), Bruce *et al.* (1993), Fernández-Palacios *et al.* (1995), Navas *et al.* (1997), Rodríguez *et al.* (1998), Lavens *et al.* (1999), Furuita *et al.* (2002, 2003 b), Mazorra *et al.* (2003) y Aijun *et al.* (2005) muestran que el contenido dietético en lípidos totales ó de ácidos grasos esenciales constituye el factor nutricional que más influye en la calidad de las puestas, especialmente en aquellas especies de puestas continuas que presentan periodos vitelogenéticos cortos y que son capaces de incorporar estos componentes dietéticos en los huevos incluso durante el periodo de puesta (Fernández-Palacios *et al.*, 1995).

La elevación de los niveles de lípidos dietéticos de 12% a 18% en las dietas para reproductores del pez conejo (*Siganus guttatus*) produce una notable mejora en su fecundidad, determinada por el número total de huevos producidos (Duray *et al.*, 1994). Aunque este efecto podría ser debido al

incremento energético en la dieta, parece estar estrechamente relacionado con un aumento gradual en los ácidos grasos esenciales de la dieta. De hecho, uno de los factores nutritivos que más afectan la calidad de la puesta es el contenido en ácidos grasos esenciales (AGEs) de la dieta (Watanabe *et al.*, 1984 a, b). En la dorada (*Sparus aurata*), Fernández-Palacios *et al.* (1995) indican que la calidad de la puesta, que constituye un factor limitante para la producción masiva de juveniles de esta especie, se ve directamente afectada por los niveles de n-3 HUFA (ácidos grasos poliinsaturados con 20 o más átomos de carbono, esenciales para peces marinos) en las dietas de los reproductores. Así, por ejemplo, la fecundidad mejora significativamente con un aumento en los n-3 HUFA dietéticos en la dorada (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 2005) y otros espáridos (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 a, b). En otras especies, como el bacalao (*Gadus morhua*), algunos autores como Lie *et al.* (1993) no han podido demostrar un claro efecto de los ácidos grasos esenciales sobre la fecundidad utilizando dietas comerciales enriquecidas con diferentes tipos de aceites (soja, capellán o sardina). De hecho, ni siquiera la composición del huevo se vio marcadamente afectada cuando los reproductores de esta especie fueron alimentados con dichas dietas durante un largo periodo de tiempo (Lie *et al.*, 1993). Éstos resultados, que parecen contradictorios con los obtenidos en espáridos, podrían ser debidos a unos menores requerimientos de AGEs en los reproductores de bacalao que parecen ser cubiertos por los lípidos residuales presentes en la harina ó el aceite de pescado que contenía la dieta comercial basal a la que se añadieron los distintos tipos de aceites.

Otros ácidos grasos distintos de los n-3 HUFA parecen jugar un papel importante en la producción de huevos en los peces. Así, la presencia de ácido araquidónico (20:4 n-6, ARA) en las dietas para reproductores de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) incrementa la fecundidad (Bruce *et al.*, 1999). También en el lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) el incremento dietético de ARA de 0,1 a 0,6% (peso seco) mejora la fecundidad, mientras que elevaciones hasta el 1,2% inhiben esta mejora (Furuita *et al.*, 2003b). Sin embargo, Mazorra *et al.* (2003) no encuentran diferencias en la fecundidad de

reproductores de halibut alimentados con una dieta conteniendo aceite orbital de atún, muy rico en ARA y ácido docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA) y otra dieta basada en harina de krill. Aunque la dieta aceite orbital de atún tiene un contenido en DHA significativamente mayor que la dieta a base de krill, no aparecen diferencias significativas en su concentración en los huevos, probablemente debido a una acumulación selectiva del DHA independientemente de su nivel dietético. En especies de agua dulce, los ácidos grasos de la serie n-6 parecen jugar también un papel principal en la reproducción. Así, estudios en la reproducción de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) indican que el número de hembras que ponen, la frecuencia de las puestas, el número de larvas obtenido por cada puesta y la producción total de larvas tras 24 semanas, es mucho mayor en peces alimentados con una 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), que cuando la dieta se complementa con aceite de hígado de bacalao, rico en ácidos grasos de la serie n-3 (Santiago y Reyes, 1993). Sin embargo, los reproductores alimentados con aceite de hígado de bacalao mostraron una mayor ganancia de peso (Santiago y Reyes, 1993). Pero no solo el contenido total en ácidos grasos de la serie n-6, sino su proporción con respecto a los de la serie n-3 parece ser importante para la reproducción en los peces de agua dulce. Así, por ejemplo, Meinelt *et al.* (1999) señalan el incremento de la tasa de fecundación en puestas del pez cebra (*Danio rerio*) cuando la relación n-3/n-6 disminuye en la dieta de los reproductores. En otra de estas especies la catla (*Catla catla*) se ha demostrado que es esencial complementar las dietas de reproductores con ácidos grasos de ambas series para completar la maduración gonadal y obtener una buena calidad de puesta (Nandi *et al.*, 2001).

En general, los n-3 HUFA parecen ser determinantes en la tasa de fecundación o fertilización de los huevos (Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 2001). En dorada, el porcentaje de fecundación es menor en una dieta deficiente en n-3 HUFA (Rodríguez *et al.*, 1998). Esta reducción en la tasa de fecundación puede ser debida, al menos en parte, a una menor

calidad del esperma (Watanabe *et al.*, 1984d). Así, Vassallo-Agius *et al.* (2001d) encuentran una reducción en la motilidad de los espermatozoides de machos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), alimentados con una dieta deficiente en n-3 HUFA asociada a una disminución en la tasa de fecundación, al fertilizar con este esperma huevos procedentes de hembras alimentadas con una dieta control con n-3 HUFA. En particular, ciertos ácidos grasos como el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y el ARA muestran una marcada correlación positiva con la tasa de fecundación en la dorada, *Sparus aurata* (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997, 2005). Igualmente, el contenido de ARA en dietas para reproductores de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) se encuentra directamente relacionado con la tasa de fecundación (Mazorra *et al.*, 2003).

Dado que la composición en ácidos grasos del esperma depende de la composición en ácidos grasos esenciales de la dieta de los reproductores (Leray y Pelletier 1985), en especies como la trucha arco iris (Watanabe *et al.*, 1984 e; Labbe *et al.*, 1993) o la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Asturiano, 1999), es posible que la motilidad de esperma y a su vez la fecundación se vean afectadas por el nivel dietético de estos ácidos grasos. Así, el contenido de EPA en el esperma regula la fluidez de las membranas celulares y podría afectar directamente la actividad del espermatozoide y a su vez la tasa de fertilización (Watanabe *et al.*, 1984d). Particularmente en salmónidos, dónde la criopreservación del esperma es empleada frecuentemente, la composición en ácidos grasos del esperma constituye un factor determinante de la integridad de la membrana después de la descongelación. Por otra parte, tanto EPA como ARA son precursores de eicosanoides, entre ellos prostaglandinas (PG) de las series III (Stacey y Goetz 1982), una de las PG mayoritariamente sintetizadas por los peces marinos (Ganga *et al.*, 2005), y II (Bell *et al.*, 1994), respectivamente. Puesto que estos ácidos grasos regulan la producción de eicosanoides, están indirectamente implicados en numerosos procesos reproductores (Moore, 1985), incluyendo la producción de hormonas esteroideas, 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 LTB₄ y LTB₅, 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 las lipooxigenasas también pueden estar involucrados en la maduración de los oocitos. Este hecho se ha demostrado en los mamíferos donde algunos leucotrienos (LTB₄) mejoran la acción esteroidogénica de la hormona luteinizante (LH) (Sullivan y Cooke, 1985). “In vitro” el ARA, 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 PGE₂ (Wade *et al.*, 1994). Por el contrario, el EPA o el DHA bloquearon la acción esteroidogénica del ARA y de la PGE₂. Así, ambos ácidos grasos, ARA y EPA modulan la esteroidogénesis en los testículos del carpín (Wade *et al.*, 1994). Por ello, una deficiencia o un desequilibrio de los AGEs en la dieta de los reproductores puede ocasionar una cierta inhibición de la esteroidogénesis que retrase la espermiación, y como consecuencia reduzca las tasas de fecundación. Es más, también se conocen las prostaglandinas como importantes feromonas en algunos teleósteos (Mustafa y Srivastava, 1989; Sorensen y Goetz, 1993; Rosenblum *et al.*, 1995), estimulando el comportamiento sexual masculino y sincronizando las puestas de la hembra y el macho, afectando directamente así al éxito de la fecundación (Sorensen *et al.*, 1988).

Varios autores (Sandnes *et al.*, 1984; Craik 1985; Harel *et al.*, 1992; Parrish *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1997; Almansa *et al.*, 1999) han sugerido que la composición química de los huevos de peces está relacionada con la calidad de las puestas, ya que la composición del huevo debe satisfacer las demandas nutritivas del embrión para su desarrollo y crecimiento. Fernández-Palacios *et al.* (1995) señalan que la composición en ácidos grasos de los huevos de dorada 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 EPA.

Sin embargo, un alto contenido de n-3 HUFA en el huevo no siempre está asociado a una buena calidad de puesta (Izquierdo *et al.*, 2001). Además, 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), o con las condiciones ambientales en las que se produce la gametogénesis (Dantagnan *et al.*, 2007). En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), alimentada con una dieta deficiente en ácidos grasos de la serie n-3 durante los tres últimos meses de la vitelogénesis, se produce sólo una ligera reducción del contenido de DHA en el huevo, mientras que la concentración de EPA disminuye drásticamente en un 50% (Fremont *et al.*, 1984). Esta retención selectiva de DHA también se ha encontrado durante la embriogénesis (Izquierdo, 1996) y durante la inanición en los estadíos larvarios (Tandler *et al.*, 1989) denotando la importancia de este ácido graso para el desarrollo del embrión y de la larva.

La viabilidad de los huevos también se ve claramente afectada por el contenido en n-3 HUFA de las dietas de los reproductores. Fernández-Palacios *et al.* (1995, 2005) indican que el porcentaje de huevos viables, definidos como huevos morfológicamente normales, 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), utilizando dos dietas comerciales y dos dietas húmedas (calamar-gambas y calamar-caballa) encontró que el incremento de los niveles de n-3 HUFA en los huevos implicaba un aumento en el porcentaje de huevos viables, independientemente del ingrediente utilizado.

Así, por ejemplo, la alimentación de reproductores de dorada con dietas

deficientes en AGEs ocasiona un aumento del número de gotas de grasa en el huevo (Fernández-Palacios *et al.*, 1997, 2005) como también se ha señalado en el pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1984 a). Makino *et al.* (1999) observaron que era frecuente en las puestas del robalo 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 cápsulas ópticas en el embrión en desarrollo, teniendo estos huevos altos porcentajes de eclosión y de larvas normales. Así mismo, la mejora en la viabilidad 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.*, 1997). De manera semejante, la viabilidad de los huevos del cherne americano (*Morone chrypsos*), expresada en términos de altos porcentajes de eclosión, están asociados a un mayor contenido de n-3 HUFA en las dietas y en los huevos (Lane y Kholer, 2006).

Por otra parte, la comparación entre huevos de bacalao (*Gadus morhua*) de agua salobre y agua marina muestran que el contenido en ARA 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, en algunas especies, constituyen importantes fuentes de energía durante el desarrollo embrionario temprano (Tocher *et al.*, 1985 a, b; Falk-Petersen *et al.* 1986, 1989; Rainuzzo, 1993; Sargent, 1995). Además, tienen diferentes funciones en los peces, tales como un importante papel estructural como componentes de los fosfolípidos en las biomembranas del pez, regulando la fluidez de las mismas y su correcto funcionamiento fisiológico (Bell *et al.*, 1986, 1997; Takeuchi, 1997; Sargent, 1995; Sargent *et al.*, 1999). En concreto, la estructura particular del DHA confiere a este ácido graso unas características físico-químicas muy particulares que le permiten jugar un papel esencial en diversos aspectos del metabolismo en los peces. Su incorporación a las membranas en los distintos tipos celulares del organismo regula la integridad y funcionamiento de las mismas, siendo un componente principal de los fosfoglicéridos, particularmente

de las fosfatidiletanolaminas y fosfatidilcolinas. Este ácido graso es especialmente importante en el tejido neural, retina, nervio óptico y estructuras relacionadas con los órganos de los sentidos (Sargent *et al.*, 1993, Benítez *et al.*, 2007). Además puede ser un sustrato adecuado para las lipoxigenasas que sintetizan eicosanoides (Asturiano, 1999) que regulan muchos aspectos del metabolismo de los peces incluidos la esteroidogénesis (Ganga *et al.*, 2006). En muchas especies marinas el DHA ha demostrado ser más determinante que el EPA como ácido graso esencial (Watanabe *et al.*, 1989; Watanabe, 1993). Puesto que ambos ácidos grasos compiten entre ellos por las enzimas que regulan la síntesis de eicosanoides, fosfoglicéridos, etc., la relación entre ambos en la dieta (EPA/DHA) será determinante para las distintas funciones fisiológicas que regulan, incluida la reproducción.

Algunos autores también han señalado la importancia de la relación ARA/EPA en el desarrollo larvario (Sargent *et al.*, 1999; Koven *et al.*, 2001). Esta relación es además importante para muchas funciones fisiológicas que dependen del estado evolutivo de la especie y de sus requerimientos (Pickova *et al.*, 2007). Bell *et al.* (1997), Bruce *et al.* (1999) y Omnes *et al.* (2004) han sugerido la importancia de las relaciones ARA/EPA y EPA/DHA contenidas en dietas para reproductores para mejorar la calidad de las puestas. Estos tres ácidos grasos ARA, 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. El ARA es un importante precursor de eicosanoides en las células de los peces (Bell y Sargent, 2003) en competencia con el EPA que parece ejercer una influencia moduladora sobre la producción de eicosanoides derivados del ARA. Puesto que estos eicosanoides juegan un papel fundamental en la regulación del desarrollo embrionario y larvario, del sistema inmune ó en la osmoregulación, entre otras muchas funciones, pero presentan diferente actividad fisiológica según sean derivados del EPA ó el ARA, la relación dietaria, y por lo tanto tisular, ARA/EPA constituye un factor nutricional crítico en dietas para larvas y reproductores. Así, el incremento de la relación dietética ARA/EPA mejora los porcentajes de huevos viables, eclosión y

supervivencia larvaria en la dorada (*Sparus aurata*), (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 2005), de eclosión en lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Navas *et al.*, 2001) y de huevos viables y eclosión en puestas del halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Mazorra *et al.*, 2003). Este último estudio sugiere tasas de 3-4:1 EPA/ARA como más adecuadas en las dietas para reproductores de esta especie. Sin embargo, un exceso en ARA o en su relación con el EPA puede ocasionar efectos perjudiciales para la reproducción. En dorada, Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentran que un nivel dietario de ARA del 0,38% mejora la calidad de las puestas, mientras que niveles superiores influyen negativamente en dicha calidad, encontrando que la relación EPA/ARA más adecuada para la mejora de la calidad de las puestas es de 13:1. También Furuita *et al.* (2003 b) señalan el efecto negativo de altos niveles de ARA en dietas para lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) en la calidad de las puestas, posiblemente debido a un potencial efecto inhibitorio en la bioconversión del EPA. Por otra parte, de manera general, Sargent *et al.* (1999) indican que la relación EPA/ARA óptima en alimentos para larvas de lubina es de 1:1, mientras que para rodaballo ó halibut son de 10:1 o mayores.

Pocos estudios han podido demostrar la mejora de calidad de la semilla a través de la dieta de los reproductores. En pez conejo (*Signatus guttatus*) se ha comprobado que es posible mejorar la supervivencia de las larvas de 14 días de edad incrementando los lípidos dietéticos en la dieta de los progenitores (Duray *et al.*, 1994). También la elevación de los niveles dietéticos de n-3 HUFA (particularmente del DHA) en las dietas de reproductores de perca de río (*Perca fluviatilis*) mejora significativamente el peso de las larvas producidas y su resistencia al shock osmótico (Aby-Ayad *et al.*, 1997). De una manera similar, el aumento en los niveles de n-3 HUFA en las dietas de reproductores de dorada mejora significativamente la supervivencia de larvas con saco vitelino reabsorbido. Es más, el crecimiento, supervivencia e inflación de la vejiga natatoria en larvas de dorada mejoran 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, la alimentación de los progenitores con niveles altos lípidos ocasiona un incremento en el peso y la

talla de larvas de 28 días de edad (Bueno, 2001).

No solamente las deficiencias dietéticas de AGEs causan efectos negativos en la calidad de las puestas, sino que, en ciertas condiciones, su exceso también podría tener un efecto negativo sobre la misma. Por ejemplo, niveles altos de n-3 HUFA en la dieta de los reproductores de dorada acompañados de un aumento de su concentración en el huevo, ocasionan una disminución en la cantidad total de huevos producidos (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 2005). Similares resultados, en cuanto a la producción de semilla, son encontrados en el espada, *Xiphophorus helleri*, por Ling *et al.* (2006). Li *et al.* (2005) encuentran en el crescent sweetlips (*Plectorhynchus cinctus*) que dietas con exceso o deficiencia de n-3 HUFA, tienen efectos negativos en la calidad de huevos y larvas. Furuita *et al.* (2002) señalan en el lenguado del Pacífico, *Paralichthys olivaceus*, una disminución de los porcentajes de huevos flotantes, eclosión y de larvas normales al aumentar los n-3 HUFA dietéticos de 2,1 a 6,2%. Esta inhibición en la producción de huevos podría ser debida a la acción directa de los niveles tisulares de n-3 HUFA en el eje endocrino cerebro-pituitario-gonadal. Por ejemplo, se ha encontrado que los ácidos grasos EPA y 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). Aunque este efecto negativo de un exceso de n-3 HUFA podría estar relacionado con una carencia de antioxidantes en la dieta (Fernández-Palacios *et al.*, 2005).

En general, los requerimientos 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, 2005), siendo más altos que los determinados para juveniles que varían 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).

1.5.2. PROTEINAS

La maduración ovárica en los peces implica cambios bioquímicos considerables que resultan en una masiva incorporación de lípidos y proteínas en los oocitos durante la vitelogénesis (Frémont *et al.*, 1984). En la dorada (*Sparus aurata*), que desova continuamente durante 3-4 meses, estos componentes bioquímicos deben proporcionarse continuamente a través de dietas de alta calidad nutritiva.

Las proteínas constituyen el componente más abundante de los nutrientes contenidos en los huevos de peces (Watanabe y Kiron, 1994). Además, son la principal fuente de energía durante el desarrollo embrionario de muchas especies de teleósteos (Fynh y Serigstad, 1987; Rønnestad *et al.*, 1992; Sivaloganathan *et al.*, 1998). Las proteínas tienen un papel particularmente importante en la fecundación y desarrollo normal del embrión (Fynh y Serigstad, 1987; Srivastava y Brown, 1992; Srivastava *et al.*, 1995). Por ejemplo, las proteínas que envuelven el vítelo desempeñan un papel muy importante durante la fecundación (Hart, 1990). La vitelogenina es la principal proteína precursora de vitelo en los teleósteos y su composición en aminoácidos se caracteriza por altos contenidos en alanina, ácido glutámico y leucina y bajos contenidos en serina. Por otra parte, la composición en aminoácidos de las proteínas que envuelven el vítelo 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). Los aminoácidos libres también aparecen en altas cantidades en los huevos de peces pelágicos, contabilizándose por encima de 43 nmol por huevo en dorada, incluyendo leucina, lisina, valina, isoleucina, alanina y serina como principales aminoácidos (Rønnestad, 1993).

Por ello, no es de extrañar que la composición proteica de la dieta de los reproductores influya en la calidad de la puesta regulando la síntesis y selección de los componentes del saco vitelino. Así, en la dorada una dieta para reproductores bien equilibrada en aminoácidos esenciales mejora la síntesis de vitelogenina (Tandler *et al.*, 1995). Estas proteínas constituyen una

importante fuente de aminoácidos y de reserva energética utilizadas durante la intensa actividad biosintética en las etapas tempranas de la embriogénesis (Metcoff, 1986). Por ello, el correcto desarrollo embrionario en los peces depende en gran medida del contenido de aminoácidos presentes en el huevo (Fynh y Serigstad, 1987; Fynh, 1989). En estudios llevados a cabo en reproductores del 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.*, 1984a, b, d, e). Los reproductores alimentados por debajo de ese nivel producen aproximadamente un 30% menos de huevos. La fecundidad también se ve afectada por las proteínas dietéticas en los reproductores de lubina (*Dicentrarchus labrax*), que al ser alimentados con altos porcentajes de proteínas muestran una fecundidad 1,5 veces mayor que cuando la dieta es baja en proteínas (Cerdá *et al.*, 1994). 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 incremento en las deformidades larvarias en la lubina (Cerdá *et al.*, 1994). Durante la puesta de los reproductores de lubina, estas dietas bajas en proteína alteran la secreción de GnRH (Kah *et al.*, 1994) y de gonadotrofina GtH II, que juegan un importante papel regulador de la maduración del oocito y la ovulación (Navas *et al.*, 1996). La fecundidad de los reproductores también se ve afectada por el nivel de proteína dietética en otras especies como tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Al Hafedh *et al.*, 1999; El-Sayed *et al.*, 2003) ó espada (*Xiphophorus helleri*) (Chong *et al.* 2004). Además, en esta última especie, la elevación de los niveles de proteína incrementa la producción total de larvas (Ling *et al.*, 2006). En concordancia con estos resultados, la fecundidad de los reproductores del labeo roho (*Labeo rohita*) incrementa con la elevación de los niveles de proteína dietaria de 20 a 25 y 30%, mientras que su incremento hasta el 35 ó 40% reduce la fecundidad (Khan *et al.*, 2005). Los niveles óptimos de proteína dietética en las dietas para obtener la máxima fecundidad en reproductores del pez gato *Mystus nemurus* se sitúan entorno al 35% de proteína (Abidin *et al.*, 2006). En el caso del rodaballo (*Scophthalmus maximus*), parece ser necesario elevar los contenidos de proteína y lípidos por

encima de 45 y 10%, respectivamente, con contenidos de 2% de HUFA para obtener las mayores fecundidades (Aijun *et al.*, 2005). Así, vemos que los requerimientos de proteína encontrados en la bibliografía para las distintas especies estudiadas varían entre 30 y 45%.

Pero no solamente el contenido total de proteínas dietéticas, sino también el tipo de fuente de proteína utilizada en las dietas para reproductores parece ser determinante de la calidad de las puestas. Varios estudios han puesto de manifiesto el efecto beneficioso de la alimentación de los reproductores de espáridos con sepia, calamar o las harinas preparadas de estos cefalópodos (Watanabe *et al.*, 1984 a, b; Mourente *et al.*, 1989; Zohar *et al.*, 1995), sugiriendo que presentan componentes nutritivos esenciales para la reproducción. Por ejemplo, la alimentación de reproductores de pargo japonés (*Pagrus major*) con una dieta a base de harina de sepia, en lugar de harina de pescado, incrementa la producción total de huevos y la viabilidad de los mismos (Watanabe *et al.*, 1984 a, b). Incluso la sustitución parcial del 50% de la harina de pescado por harina de sepia (Watanabe *et al.*, 1984 a, b) mejora la viabilidad de los huevos, aunque sin alterar la tasa de fertilización de los mismos. Mourente *et al.* (1989) relacionaron este efecto beneficioso con el elevado contenido en ácidos grasos esenciales de la sepia, mientras que Watanabe *et al.* (1984a) sugirieron que el alto valor dietético de la sepia es debido principalmente a algún componente presente en la fracción hidrosoluble de la misma. 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 no incrementó el número de huevos producidos por hembra (Vassallo-Agius *et al.*, 2001 c). Emata y Borlongan (2003) señalan que los porcentajes de eclosión y de supervivencia larvaria mas altos, en puestas del pargo del manglar (*Lutjanus argentimaculatus*), corresponden a los reproductores alimentados con harina y aceite de calamar, en sustitución de la harina y aceite de pescado.

Fernández-Palacios *et al.* (1997) realizaron algunas experiencias encaminadas a discernir qué componentes de la harina de calamar son

responsables de la mejor calidad nutritiva de esta harina en comparación con la de pescado, una de las principales fuentes de proteína utilizadas para la alimentación de los reproductores de peces. Para ello alimentaron reproductores de dorada (*Sparus aurata*) con cuatro tipos de dietas basadas en harina calamar, harina de pescado, harina de calamar desengrasada con solventes orgánicos y completada con aceite de pescado o harina de pescado desengrasada con solventes orgánicos y completada con aceite de harina de calamar. Los resultados mostraron una mejora significativa en la calidad de las puestas cuando los reproductores eran alimentados con las dietas que contenían harina de calamar ó harina de calamar desengrasada, principalmente en términos de número total de huevos producidos por kg de hembra al día, y porcentajes de huevos viables y fertilizados.

Por tanto, la proteína de la harina de calamar, como componente principal tanto de la harina de calamar como, especialmente, de la harina de calamar desengrasada, parece ser el principal nutriente responsable del alto valor nutritivo de estos ingredientes para los reproductores de distintas especies y la mejora que su inclusión dietética origina en la calidad de las puestas (Fernández-Palacios *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001). Puesto que los perfiles de aminoácidos fueron muy similares entre las distintas dietas, el valor superior de la proteína de calamar frente a la de pescado fue atribuido por dichos autores, al menos en parte, a la mejor digestibilidad que encontraron para la primera fuente de proteínas en comparación con la de la harina de pescado. De hecho, el contenido proteico de los huevos obtenidos de los reproductores alimentados con proteína de calamar fue ligeramente superior al de los alimentados con harina de pescado.

Por otra parte, a pesar de que se había sugerido que el bajo contenido en calcio de las harinas de calamar en comparación con las de pescado podría ser una característica de este ingrediente determinante de su gran valor nutritivo para los reproductores, la adición de calcio a una dieta basada en harina de calamar no afecta la calidad de la puesta de otro espárido, el pargo japonés (*Pagrus major*) (Watanabe *et al.*, 1991b).

La sustitución de la proteína ó la grasa dietética proveniente de la harina de calamar por proteína ó grasa obtenida de la soja en las dietas para dorada origina una reducción significativa en los porcentajes de eclosión y de supervivencia al tercer día de vida de las larvas (Zohar *et al.*, 1995). Pero este detrimento en la calidad de las puestas puede ser ocasionado no solo por la reducción en la cantidad de harina de calamar, sino que bien podría deberse a un efecto perjudicial de la harina de soja. Aunque varios autores (Robaina *et al.*, 1995) han señalado el interés de la harina de soja como fuente de proteínas para el engorde de la dorada y este ingrediente es utilizado de forma generalizada en los piensos comerciales, la posible presencia de factores antinutritivos puede limitar su inclusión en altos niveles. Mas aún, un desequilibrio en la relación de ácidos grasos polinsaturados n-3/n-6 junto con la reducción en la disponibilidad del fósforo en las dietas para reproductores basadas en harina de soja podría directamente reducir la calidad de las puestas, pues tanto los ácidos grasos como el fósforo son esenciales para la reproducción de los espáridos (Watanabe *et al.*, 1984a; Watanabe y Kiron, 1995).

1.5.3. VITAMINAS

Se reconocen 15 vitaminas establecidas como esenciales para los peces al igual que lo son para vertebrados terrestres (Woodward, 1994). Los requerimientos de vitamina A (retinol), vitamina D (colecalfiferol), vitamina E (tocoferol), vitamina K (menadiona) y vitamina C (ácido ascórbico), han sido determinados sólo para algunas especies de teleósteos (National Research Council, NRC, 1993) y su efecto sobre la reproducción y la calidad de las puestas ha sido poco estudiado.

La vitamina E actúa como un potente antioxidante natural, previniendo la degeneración peroxidativa de las grasas en las células animales y la consecuente formación de radicales libres (Huber, 1988). Mediante la captura de radicales libres de oxígeno producidos habitualmente por el metabolismo, la vitamina E repara la oxidación de las membranas celulares (Horton *et al.*, 1996). Los radicales de oxígeno, en especial el radical hidroxilo, tienen gran

afinidad por los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares. 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, creándose una verdadera reacción en cascada 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). Además, la vitamina E juega un papel fundamental en la reproducción. Así, su deficiencia causa tasas bajas de crecimiento muscular y degeneraciones en los embriones de vertebrados, bajas tasas de eclosión, degeneración y expulsión de las células germinativas epiteliales de los testículos, esterilidad y descenso en la producción de prostaglandinas por los microsomas de los testículos (Lehninger *et al.*, 1993).

Aunque los efectos negativos de la deficiencia de la vitamina E en la reproducción de otros vertebrados se conocen desde principios del siglo pasado, la importancia de la vitamina E en la dieta para reproductores de peces no se demostró hasta 1990. Deficiencias de esta vitamina en dietas de reproductores de carpa común (*Cyprinus carpio*) y de ayu (*Plecoglossus altivelis*), inhiben la maduración de las gónadas y reducen las tasas de eclosión y de supervivencia larvaria en el ayu (Watanabe, 1990). También en pargo japonés (*Pagrus major*) la elevación de los niveles dietéticos de vitamina E (por encima de 2000 mg/kg) en las dietas de los reproductores incrementa la calidad de las puestas aumentando los porcentajes de huevos flotantes con desarrollo normal, de huevos eclosionados y de larvas con desarrollo normal (Watanabe *et al.*, 1991 a), lo que mejora notablemente la supervivencia larvaria. Esta mejora en el desarrollo normal del embrión y la larva está en concordancia con los resultados obtenidos en ratas diabéticas, donde se ha demostrado que los complementos de vitamina E en las dietas maternas reducen las malformaciones congénitas, incrementándose las concentraciones de tocoferol en los tejidos maternos, del embrión y del feto (Siman y Eriksson,

1997). Estos resultados parecen estar relacionados con 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.

En la actualidad se reconoce que la vitamina E es uno de los nutrientes mas importantes para la reproducción de los peces (Izquierdo *et al.*, 2001), y se ha demostrado que su inclusión dietética mejora la calidad de las puestas en un amplio rango de especies como carpa común, *Cyprinus carpio* (Watanabe y Takashima, 1977; Watanabe, 1990), ayu, *Plecoglossus altivelis* (Takeuchi *et al.*, 1981a), carpín, *Carassius auratus* (Sutjaritvongsanon, 1987), pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1985b; 1991 a, b), pez gato, *Heteropneustes fossilis* (Dube, 1996), tilapia, *Oreochromis niloticus* (Schimittou, 1993), seriola coreana *Seriola quinqueradiata* (Mushiake *et al.*, 1993), el pearlspot, *Etroplus suratensis* (Shiranee y Natarajan, 1996), la dorada *Sparus aurata* (Izquierdo *et al.*, 2001) y el mero de manchas naranjas, *Epinephelus coioides* (Xiao *et al.*, 2003), así como en otras especies marinas (Verakunpiriya *et al.*, 1997 a, b). Así mismo, su exclusión, junto con la de la vitamina C, en dietas para trompetero australiano, *Latris linneata*, reduce de manera importante la calidad de las puestas (Morehead *et al.*, 2001).

En concreto, en la dorada, la alimentación con dietas deficientes en vitamina E reduce los porcentajes de huevos fecundados (Fernández-Palacios *et al.*, 2005) lo cual podría estar relacionado con la reducción en el número y motilidad de los espermatozoides que ha sido descrita para otros vertebrados (Donnelly *et al.*, 1999; Danikowski *et al.*, 2002) y en peces como el ayu (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 esperma se ve seriamente comprometida. Además, la alimentación con niveles insuficientes de vitamina E reduce el porcentaje de huevos viables con morfología normal en especies como trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*

(King, 1985), pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1991a, b), dorada (Fernández-Palacios *et al.*, 2005) y, en el chano, *Chanos chanos* (Emata *et al.*, 2000), cuando los niveles de vitamina C también son bajos. Así mismo, la supervivencia larvaria mejora significativamente con la inclusión de vitamina E en las dietas de reproductores de ayu, *Plecoglossus altivelis* (Takeuchi *et al.*, 1981a), trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (King, 1985) ó seriola coreana, *Seriola quinqueradiata* (Mushiake *et al.*, 1993). Las deficiencias en vitamina E en la dieta para reproductores también ocasionan la pérdida de la coloración sexual en especies como tilapia (*Oreochromis niloticus*) y reducen la actividad reproductora (Schimittou, 1993).

El contenido de vitamina E es generalmente alto en los huevos y bajo en los tejidos de los reproductores después del periodo de puesta (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). Así, durante la vitelogénesis en rodaballo *Scophthalmus maximus*, (Hemre *et al.*, 1994) o salmón Atlántico, *Salmo salar* (Lie *et al.*, 1994) la vitamina E es movilizada desde los tejidos periféricos hacia el ovario mediante lipoproteínas (Lie *et al.*, 1994). Por otra parte, Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentran un incremento significativo en la composición en lípidos totales en el huevo de dorada (*Sparus aurata*), cuando suplementan las dietas con niveles elevados de vitamina E, acompañado con un incremento en el contenido de EPA si esos niveles eran iguales o superiores a 125 mg/kg, en concordancia con la función protectora antioxidante de la vitamina E. También se encuentran relaciones entre el contenido de ácidos grasos y vitamina E en los huevos de seriola coreana (Verakunpiriya *et al.*, 1996) y róbalo japonés *Lateolabrax japonicus* (Chou y Chien, 2006).

Por su función antioxidante sobre los lípidos corporales, y debido al incremento en la susceptibilidad a la oxidación ocasionado por el grado de insaturación de los ácidos grasos, los requerimientos de vitamina E son dependientes del contenido dietético de ácidos grasos poliinsaturados, considerados como esenciales para los teleósteos. Así, un mayor contenido de ácidos grasos en la dieta requiere la inclusión de niveles superiores de vitamina E (Watanabe *et al.*, 1991a) y se ha sugerido que la presencia en la dieta de

antioxidantes como la vitamina E es esencial para mantener la integridad estructural de los fosfolípidos en salmónidos alimentados con dietas ricas en n-3 HUFA (Cowey *et al.*, 1983). Por ejemplo, mientras que la elevación de los niveles de n-3 HUFA de 1,6 a 2,2 en dietas, para reproductores de dorada (*Sparus aurata*), con 125 mg/kg de vitamina E, no solo no mejora la calidad de las puestas sino que además ocasiona un alto porcentaje de larvas deformes con hipertrofia del saco vitelino (Fernández-Palacios *et al.*, 1995), la elevación conjunta de los niveles de n-3 HUFA de 1,7 a 2,5 y de vitamina E de 125 a 190 mg/kg, mejora significativamente la calidad de las puestas y previene la formación de larvas deformes (Fernández-Palacios *et al.*, 2005). De manera semejante, niveles altos de DHA en las dietas junto con bajos niveles de vitamina E causan anormalidades en larvas de bacalao (Takeuchi *et al.*, 1994). Koprucu y Seker (2003) encontraron que la suplementación con vitamina E en dietas para reproductores de guppy (*Poecilia reticulata*) ó espada (*Xiphophorus helleri*) aumenta la fecundidad de las dos especies, obteniendo los mejores resultados con 150 mg α -tocoferol/kg. Dube (1996) también obtiene la mayor fecundidad en el pez gato *Heteropneustes fossilis* alimentando con dietas suplementadas con 150 mg/kg de vitamina E. En la dorada, la elevación del contenido de vitamina E, en dietas prácticas para reproductores, hasta 190 mg α -tocoferol/kg mejora notablemente la calidad de las puestas (Fernández-Palacios *et al.*, 1998, 2005), mientras que estos niveles aún son subóptimos para reproductores de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Hemre *et al.*, 1994).

El ácido ascórbico juega también un papel relevante en la reproducción de los peces, como se ha visto particularmente en los salmónidos (Eskelinen, 1989; Blom y Dabrowski, 1995) en donde se ha señalado su importancia en la esteroidogénesis y vitelogénesis (Sandnes, 1991). La función antioxidante de la vitamina C, junto con la vitamina E, es fundamental para la protección 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. De hecho, el contenido de ácido ascórbico en la dieta de los reproductores afecta a la concentración de esta vitamina en el fluido seminal y, aunque no ocurre así al principio de la puesta,

está directamente relacionada con la concentración y motilidad del espermatozoides producido al final de la época de puesta (Ciereszco y Dabrowski, 1995). También el contenido de vitamina C en los huevos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), refleja el nivel de este nutriente en la dieta y está asociado con la mejora de la calidad del huevo (Sandnes *et al.*, 1984). Así, el incremento en los niveles dietéticos de vitamina C hasta 1200 mg/kg incrementa el porcentaje de eclosión de sus puestas (Ridelman, 1981). Sin embargo, en bacalao (*Gadus morhua*) no se pudo demostrar una relación entre los cambios en el contenido de vitamina C en el ovario y la calidad en términos de tasas de eclosión de los huevos (Mangor-Jensen *et al.*, 1993). Estos mismos porcentajes dietéticos en dietas para reproductores incrementan también el porcentaje de eclosión y de larvas normales en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Soliman *et al.*, 1986). De esta manera, la supervivencia del embrión se ve claramente afectada por el contenido en vitamina C de las dietas de los reproductores, siendo esta vitamina particularmente importante en la síntesis de colágeno durante el desarrollo del embrión. Los estudios sobre requerimientos específicos de vitamina C son escasos y muestran grandes diferencias para las distintas especies. Así, mientras que en la trucha arco iris los requerimientos de vitamina C en los reproductores son ocho veces superiores que los de juveniles (Blom y Dabrowski, 1995), en otras especies, como bacalao, se han citado requerimientos menores (Mangor-Jensen *et al.*, 1993). Además, la calidad de las puestas en términos de fecundidad se ve afectada no sólo por el contenido dietético de vitamina C (Blom y Dabrowski, 1995) ó vitamina E (Izquierdo y Fernández-Palacios, 1997; Fernández-Palacios *et al.*, 1998, 2005) como se ha visto anteriormente, sino incluso por la relación entre ambas vitaminas (Silveira *et al.*, 1996; Emata *et al.*, 2000).

La vitamina A es necesaria para el crecimiento, la reproducción y el desarrollo embrionario de los peces y éstos deben obtenerla de la dieta porque no son capaces de sintetizarla (Craik, 1985, Madden, 2001). La vitamina A esta presente en los peces en varias formas incluyendo la vitamina A₁ o Retinol y la vitamina A₂ o Dehidroretinol (Palace y Werner, 2006). A pesar de que los

requerimientos de vitamina A durante la maduración gonadal y la puesta son poco conocidos, esta vitamina es considerada importante para el embrión y el desarrollo larvario debido a su importante papel en el desarrollo del esqueleto, la formación de la retina y la diferenciación de las células del sistema inmune. En el hígado de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) se ha observado un aumento de la concentración de retinol durante la maduración de las gónadas, lo cual sugiere la importancia de esta vitamina en la reproducción (Hemre *et al.*, 1994). De hecho, Furuita *et al.* (2003a) señalan que la alimentación de reproductores de lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) con vitamina A, aumenta la fecundidad, porcentaje de huevos viables y porcentaje de larvas normales obtenidas de dichos reproductores. Así mismo, la vitamina A, junto con la C, es importante para la fecundidad expresada en términos de producción de larvas de tres días en carpa cabezuda (*Aristichthys nobilis*) (Santiago y Gonzal, 2000), y junto con C y E para la maduración gonadal y la mejora del porcentaje de eclosión de esta misma especie.

Finalmente, otro componente dietético que parece ser importante para el desarrollo normal 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 temprana 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 (Wooster y Bowser, 2000).

1.5.4. OTROS NUTRIENTES

Algunos ingredientes dietéticos han sido frecuentemente utilizados en la dieta para reproductores de peces por su alto valor nutritivo. Este es el caso del krill, cuya inclusión en las dietas para reproductores mejora notablemente la calidad de las puestas del pargo japonés (*Pagrus major*) (Watanabe *et al.*,

1991a). El estudio de los factores nutricionales responsables de esta mejora demostró que los lípidos que componen este ingrediente, tanto en su fracción polar como en la apolar tienen un gran valor nutritivo para los reproductores. Así, Watanabe *et al.* (1991a) identificaron como principales nutrientes funcionales a la fosfatidilcolina y astaxantina presentes en las fracciones polar y apolar, respectivamente. Otras investigaciones con el pargo japonés (*Pagrus major*) también corroboran que los fosfolípidos dietéticos mejoran la calidad del huevo (Watanabe *et al.*, 1991 a, b). Los efectos beneficiosos de los fosfolípidos se han atribuido a su actividad inhibidora y a su capacidad para estabilizar los radicales libres (Watanabe y Kiron, 1995), teniendo una importante misión durante el desarrollo larvario (Izquierdo, 1996) y siendo catabolizados preferentemente después de la eclosión y antes del primer alimento exógeno (Rainuzzo *et al.*, 1997).

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

La taurina es uno de los aminoácidos libres más abundantes en los tejidos de peces y mamíferos y está implicada en procesos de antioxidación, osmorregulación, modulación de neurotransmisores, de los niveles de calcio en las células, en la liberación de hormonas, y formación de sales biliares (Huxtable, 1992). Aunque se sabe poco de su valor nutricional para los reproductores de peces, se ha determinado que la inclusión de al menos 1% de taurina en dietas para reproductores de seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*) mejora la calidad de las puestas en términos de fecundidad, porcentajes de huevos viables y de fecundación (Matsunari *et al.*, 2006).

A pesar de no constituir nutrientes esenciales en la dieta, los

carbohidratos realizan importantes funciones biológicas en los peces, constituyendo una fuente energética elemental en algunos tejidos. Por ello, su inclusión en la dieta para reproductores, dentro de niveles moderados que permitan su buena utilización por los peces, ha sido considerada interesante por algunos autores. Washburn *et al.* (1990) encuentran una reducción en la fecundidad relativa de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando los reproductores son alimentados con dietas bajas en carbohidratos. Sin embargo, la alimentación de reproductores de bacalao (*Gadus morhua*) con distintos niveles de carbohidratos en sus dietas tienen un efecto pobre o incluso nulo sobre la calidad de las puestas (Mangor-Jensen y Birkeland, 1993).

Otros nutrientes que pueden afectar la calidad de la puesta son los nucleótidos. Así dietas enriquecidas con nucleótidos producen una mejora en la supervivencia de las larvas de eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) determinada diez días después de la eclosión, como resultado de un mejor desarrollo del intestino y, en consecuencia, de la mejor utilización posterior del alimento exógeno (Gonzalez-Vecino *et al.*, 2004). Además, los reproductores de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) y de eglefino alimentados con dietas enriquecidas con nucleótidos tienen una fecundidad relativa mas alta (González-Vecino, 2004).

Existen muy pocos trabajos publicados sobre el efecto de los minerales, en las dietas de reproductores, sobre la calidad de la puesta. Takeuchi *et al.* (1981 b) señalan que reproductores de trucha arco iris alimentados con una dieta no complementada con minerales tienen puestas de peor calidad, en términos de bajos porcentajes de huevos viables y eclosión, que reproductores alimentados con una dieta complementada con minerales. En concreto, Watanabe *et al.* (1984a,b) señalan que deficiencias en el contenido en fósforo de las dietas de reproductores de pargo japonés (*Pagrus major*) están relacionadas con una disminución de la fecundidad, los porcentajes de huevos viables y eclosión y un incremento del número de larvas anormales. En el mismo sentido Luquet y Watanabe (1986) correlacionan una menor fecundidad en el ayu (*Plecoglossus altivelis*) con una deficiencia en fósforo en la dieta. Sin

embargo, en otros estudios con el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) Hardy *et al.* (1984) y con el salmón Atlántico (*Salmo salar*) Ketola (1985) no encuentran cambios en la calidad de las puestas de estas especies cuando suplementan con minerales las dietas de los reproductores.

1.5.5. CAROTENOIDES

Los carotenoides constituyen uno de los pigmentos más importantes en peces, con una amplia variedad de funciones incluyendo la protección frente a condiciones de iluminación adversas, la de actuar como provitamina A, la de regular la quimiotaxis en los espermatozoides y la de constituir potentes antioxidantes. Por todo ello son muy importantes en la reproducción de los peces y en el desarrollo normal de embriones y larvas. Sin embargo, durante más de cinco décadas ha habido una gran controversia sobre la relación entre el contenido de carotenos del huevo y la calidad de los mismos en salmónidos, encontrándose en la bibliografía varias revisiones sobre este tema (Tacon, 1981, Craik, 1985, Choubert, 1986, Torrissen, 1990 y Torrissen y Christiansen, 1995). Así, los trabajos publicados sobre el efecto de la concentración de carotenos en la calidad del huevo en salmónidos han sido frecuentemente contradictorios. Mientras que algunos autores señalan una relación positiva entre la pigmentación del huevo y la fecundación ó la tasa de supervivencia en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Harris, 1984; Craik, 1985), otros no han encontrado evidencias de esta relación (Torrissen, 1984; Craik y Harvey, 1986; Torrissen y Christiansen, 1995). Estas contradicciones parecen ser debidas a diferencias en la metodología empleada por los distintos autores incluyendo la edad de los reproductores, el contenido total de carotenoides de los huevos, el tipo de carotenoide (astaxantina, cantaxantina, etc.) utilizado en la dieta o determinado en el huevo, el tamaño de la muestra e incluso diferencias en el indicador empleado en la determinación de la calidad huevo.

La importancia de los carotenoides en la reproducción se puso claramente de manifiesto con los estudios controlados de alimentación de reproductores con distintos contenidos en carotenoides (Harris, 1984; Choubert y Blanc, 1993; Watanabe y Kiron, 1995). Tveranger (1986) alimentando

reproductores de trucha arco iris con dietas complementadas con un 10% de harina de krill encuentra una mejora en el porcentaje de fecundación en las puestas de estos reproductores comparadas con las de otros reproductores alimentados con una dieta no complementada, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. En el pargo japonés (*Pagrus major*) la adición de astaxantina purificada en las dietas de reproductores mejora notablemente los porcentajes de huevos flotantes y de eclosión, así como el porcentaje de larvas normales (Watanabe y Kiron, 1995). También en especies de agua dulce, como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), la inclusión de astaxantina en dietas para reproductores tiene efectos positivos en los porcentajes de fecundación, de supervivencia del huevo y de eclosión (Ahmadi *et al.*, 2006). Pero el efecto de los carotenoides parece depender de la especie en estudio. Así, Vassallo-Agius *et al.* (2001 a) muestran que la astaxantina dietética aumenta la fecundidad pero no mejora la calidad del huevo del jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*). Resultados similares se obtienen para la seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*) por Verakunpiriya *et al.* (1997 b).

Por otra parte, por su elevado poder antioxidante, el contenido adecuado de carotenoides en las dietas para reproductores podría estar relacionado con los niveles dietéticos de otros nutrientes. En la dorada (*Sparus aurata*), el incremento conjunto de los niveles de n-3 HUFA de 2.5 a 4% junto con la elevación del contenido de carotenoides de 30 a 60 mg/kg, mejora significativamente la calidad de la puesta en términos de producción relativa y porcentajes de huevos viables, de eclosión y de supervivencia larvaria Scabini *et al.* (2006).

Sawanboonchun *et al.* (2008) encontraron mejoras en la calidad de la puesta y en la producción de larvas cuando suplementaron con astaxantina las dietas de reproductores de bacalao (*Gadus morhua*). Los reproductores fueron alimentados con una dieta control sin adición de astaxantina, y una dieta complementada con astaxantina (73,7 mg/kg de peso seco) durante 2 meses antes de la puesta. Los resultados indicaron que la absorción de la astaxantina en los huevos de reproductores de la dieta fue muy eficiente. La dieta con

astaxantina incremento la producción un 20% en el número de huevos totales, un 37% en el número de huevos viables (flotantes) y un 47% en el número de huevos fecundados por kg de hembra con respecto a la dieta control. Diferencias en concentración de carotenoides han sido identificados entre reproductores procedentes del medio natural y procedentes de acuicultura (Salze *et al.*, 2005). Estas diferencias se correlacionaron con las diferencias en la calidad de los huevos, lo que sugiere que niveles sub-óptimo de carotenoides pueden causar algunos problemas de la calidad de los huevos en el bacalao (Salze *et al.*, 2005). Ellos además encontraron que las concentraciones de carotenoides en huevos provenientes de reproductores procedentes de acuicultura fueron inferiores que en los huevos de bacalao silvestres. Por lo tanto, las mejoras observadas en la calidad huevos y larvas de bacalao, cuando la dieta se complementa con astaxantina, podría explicarse por una mejor protección antioxidante en la dieta, en los huevos y larvas, al igual que ocurre en salmones, Cowey *et al.*(1985) y peneidos, Pangantihon-Kuhlmann *et al.* (1998).

También se han ensayado distintas fuentes de carotenoides, como el pimentón, cuya inclusión en dietas para reproductores de jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), mejora la fecundidad, fecundación, eclosión y supervivencia larvaria (Vassallo-Agius *et al.*, 2001b, c). Sin embargo, la inclusión de β -caroteno no parece ejercer un efecto importante sobre la reproducción. Es posible que la pobre absorción intestinal de β -caroteno comparada con la de cantaxantina o astaxantina sea causante de la ausencia de efecto de este pigmento en la reproducción de los peces, ya que en estos vertebrados se ha encontrado una absorción y deposición preferente de hidroxil y keto carotenoides (Torrissen y Christiansen, 1995). Además, Miki *et al.* (1984) demostraron que aunque cantaxantina y astaxantina de la dieta de los reproductores se pueden incorporar a los huevos en el pargo japonés (*Pagrus major*), no se convierten en β -caroteno.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

Las necesidades nutricionales de los reproductores de dorada (*Sparus aurata*) han sido poco estudiadas. El objetivo general de este trabajo fue el de realizar una aproximación al efecto de sustancias bioactivas como aditivo nutricional, para dietas de reproductores de esta especie. Para ello se estudiaron las consecuencias de la inclusión de carotenoides en la dieta de los reproductores, y su relación-efecto con otros micronutrientes (n-3 HUFA y vitamina E) sobre la calidad de la puesta de esta especie, bajo condiciones de cultivo. Se evaluaron los resultados de la alimentación sobre el número de huevos producidos, morfometría de los mismos, viabilidad, número de larvas eclosionadas y supervivencia larvaria, entre otros. En forma paralela se estudió la composición bioquímica de los huevos y su relación con la dieta suministrada. Se realizaron cuatro experimentos, todos ellos con un diseño experimental muy similar entre sí, siendo los objetivos específicos de cada uno de los experimentos realizados los siguientes:

2.2. OBJETIVOS

Experimento I

Evaluar el efecto de la utilización de carotenoides de distinto origen, en dietas para reproductores con niveles diferentes de lípidos.

Experimento II

Determinar el requerimiento de carotenoides en dietas isoprotéicas e isolipídicas.

Experimento III

Evaluar el efecto de la inclusión de carotenoides y distintos niveles de n-3 HUFA, sobre las puestas y calidad larvaria.

Experimento IV

Evaluar el efecto de la inclusión y deficiencias de Vitamina E y carotenoides en la dieta.

3. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

3.1. Especie objeto de estudio

Nomenclatura:

Nomenclatura científica : *Sparus aurata* Linnaeus, 1758
Denominación (FAO) : Dorada
Español : Dorada
Inglés : Gilthead seabream

Posición taxonómica:

Phylum : *Chordata*
Superclase : *Gnathostomata*
Clase : *Osteichthyes*
Superorden : *Acanthopterygi*
Orden : *Perciformes*
Suborden : *Percoidei*
Familia : *Sparidae*

Género : *Sparus*
Especie : *S. aurata* (L., 1758)

Distribución geográfica

Es una especie muy común en el Mediterráneo, que se extiende también por el Mar Negro, el Mar Rojo y las costas orientales del Océano Atlántico, desde Inglaterra hasta las costas de Mauritania (Suau y López, 1976; Bauchot y Hureau, 1986). En las Islas Canarias, la Familia Sparidae se encuentra representada por 10 géneros y 24 especies, y la dorada está citada como nativa segura (NSE) (Moro *et al.*, 2003) (Fig. 3).

Es una especie típicamente litoral, eurihalina (entre 4 a 37 ‰ de salinidad) y euriterma (entre 5 a 32 °C), los alevines y juveniles permanecen en aguas someras (30 m) mientras que los ejemplares adultos pueden alcanzar aguas más profundas (150 m).



Fuente: www.fao.org/fishery/species/2384

Fig. 3. Dorada (*Sparus aurata* L., 1785)

Alimentación y reproducción

Su dieta natural es preferentemente carnívora, depredadora de especies de fondo (bivalvos y gasterópodos), crustáceos y pequeños peces. En general, se considera como una especie de crecimiento rápido en estado silvestre, que consigue los 300 g en el segundo año y 600 g en el tercero, pudiendo alcanzar un tamaño de 70 cm y un peso de 5 kg (Castelló, 1993).

Con respecto a su reproducción, entre los teleósteos, los espáridos son considerados como una de las familias más diversas en lo que concierne a la sexualidad. Ambas formas de hermafroditismo secuencial (protoginia y protandria), han sido descritas. Este variable patrón de sexualidad está probablemente unido al carácter bisexual de la gónada, la "ovotestis", que es característica entre los espáridos (Kokokiris *et al.*, 1999).

La dorada (*Sparus aurata*) es una especie hermafrodita proterándica cuya estación reproductiva tiene lugar durante un periodo más o menos extenso, a partir de octubre hasta diciembre en el Mediterráneo Occidental (Arias, 1980) o un poco más tarde, entre noviembre y febrero, en el Mediterráneo Oriental (Ben-Tuvia, 1979). La primera maduración sexual la alcanza entre el primer y segundo año, observándose notables diferencias entre autores que trabajan con poblaciones distintas. El peso con que la dorada alcanza la madurez sexual es variable, debido a que éste depende de muchos factores además de la edad. Castelló (1993) señala valores entre 250 y 400 g, mientras que Micale y Perdichizzi (1990) indican que los machos llegan a ser totalmente funcionales entre 200 y 250 g. Seguidamente, se inicia la transformación en hembra de parte de la totalidad de los individuos; conservando otra parte de ellos el sexo masculino. Pudiéndose presentarse nuevamente el cambio de sexo, de hembra a macho, después de varias temporadas de desoves sucesivos, en este caso los nuevos machos ralentizan su crecimiento.

Los desoves se producen cerca de la costa, entre los 5 y 35 m de profundidad. En aguas del Mediterráneo la época de puesta abarca desde octubre hasta febrero, es decir, cuando el fotoperíodo es corto y la temperatura desciende por debajo de los 19 °C, cesando por debajo de los 14 °C (Suau y López, 1976).

En las Islas Canarias no existe información de la época de desove en medio natural. En cautividad: el periodo de puesta comienza generalmente en diciembre, extendiéndose normalmente hasta mayo (Rivas *et al.*, 1987; Cejas *et al.*, 1992; Fernández- Palacios, 2005). Aunque en ocasiones se han registrado periodos de puesta que se extienden desde mediados de diciembre hasta finales de julio (Fernández-Palacios *et al.*, 2009).

Los huevos de dorada son pelágicos, esféricos (de 1 mm de diámetro aproximadamente) y transparentes, con una o varias gotas de aceite en su interior (permitiéndole una gran flotabilidad), pudiendo una hembra llegar a poner, por kilo, cantidades que fluctúan entre los 500.000 y 6.000.000 huevos (Cejas *et al.*, 1992), llegando a veces hasta los casi 9.000.000 (Fernández-Palacios *et al.*, 2009).

3.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Los experimentos llevados a cabo en el presente estudio se realizaron en la nave experimental de cultivos marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), perteneciente a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Comunicación de la Presidencia del Gobierno de Canarias.

Los peces utilizados en los experimentos fueron individuos reproductores entre dos y cuatro años nacidos y criados en las instalaciones del ICCM. Al inicio de cada experimento los peces fueron anestesiados con una solución que contenía 300 g de clorobutanol (1,1,1-tricloro 2-metil 2- propanol) disuelto en 1l de alcohol etílico y utilizado en una proporción de 70 ml por 100 l de agua de mar, también se utilizó esencia de clavo en una proporción de 35 ml/100 l de agua de mar. Los peces seleccionados eran pesados en forma individual con una balanza Mettler PM3000 ($\pm 0,1$ g precisión) (Gottingen, Alemania), también fueron medidos (longitud estándar, LS) con un ictiómetro. El sexo de los peces se determinó mediante masaje abdominal hasta la emisión de los productos sexuales. Los peces seleccionados fueron distribuidos en tanques circulares de 1000 l, con flujo de agua de unos 3 l min^{-1} y aireación constante (Fig. 4). La

proporción entre sexos en todos los experimentos fue de 2 machos:1 hembra (Fernandez-Palacios *et al.*, 1990). Los datos biométricos de los reproductores utilizados y la biomasa en cada tanque se detallan en cada uno de los subcapítulos experimentales. Las condiciones de foto y termo período fueron siempre las naturales. Las dietas se ensayaron por triplicado en cada uno de los experimentos realizados. La cantidad de alimento fue establecida en base al 1,5 % del peso corporal de los reproductores, repartida en tres tomas diarias. Los restos de comida y residuos fecales eran limpiados diariamente abriendo la válvula de descarga de los tanques experimentales.



Fig. 4. Tanque experimental de 1000 l y tanque auxiliar con el colector de huevos.

3.2.1. 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.

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 (Fernández-Palacios, 2005):

a) 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

b) 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

c) 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

Los cálculos de los índices de las puestas y las medidas de huevos y larvas se realizaron utilizando los huevos de la primera recogida. 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, transcurridas aproximadamente 22 horas de la puesta cuando ya había salido el 100% de los huevos de los tanques. 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.

A los recipientes de plástico que contenían los huevos se le 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.

Huevos muertos: huevos con iridisaciones en el vitelo, con vitelo opaco o con perforaciones en la membrana que permite la penetración del medio exterior haciendo que el vitelo se condense y precipite.

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.

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. 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.

En el anexo se detalla la descripción del desarrollo embrionario y larvario de la dorada, se ha seguido la realizada por Ezzat *et al.* (1982).

3.2.2. 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:

$$\% \text{ Huevos vivos} = (HVFF + HVFNF / HTFF + HTFNF) \times 100$$

$$\% \text{ Huevos muertos} = (HMFF + HMFNF / HTFF + HTFNF) \times 100$$

$$\% \text{ Huevos no fecundados} = (HNFFF + HNFFNF / HTFF + HTFNF) \times 100$$

$\% \text{ Huevos anormales (morfología)} = (\text{HAFF} + \text{HAFNF} / \text{HTFF} + \text{HTFNF}) \times 100$

$\% \text{ Huevos anormales (con más de una gota de grasa)} = (\text{HGGFF} + \text{HGGFNF} / \text{HTFF} + \text{HTFNF}) \times 100$

HVFF = Total de huevos vivos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HVFNF = Total de huevos vivos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

HMFF = Total de huevos muertos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HMFNF = Total de huevos muertos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

HNFFF = Total de huevos no fecundados en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HNFNFF = Total de huevos no fecundados en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

HAFF = Total de huevos anormales en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HAFNF = Total de huevos anormales en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

HGGFF = Total de huevos con más de una gota en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HGGFNF = Total de huevos con más de una gota en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

HTFF = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HTFNF = 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, dado que el número de huevos incubados no influye en

la eclosión y supervivencia larvaria (Fernández-Palacios, 2005). 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, en cada una de las puestas en que se determinaron, se sembraron tres cubiletes para cada uno de los 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:

$$\% \text{ Eclosión} = \frac{(\text{HVFF} + \text{HMFF} + \text{HNFFF} + \text{HAFF}) - (\text{HMFF} + \text{HNFFF} + \text{HAFF} + \text{HMINC})}{\text{HVFF}} \times 100$$

$$\% \text{ Larvas anormales} = (\text{LA} / \text{HVFF})$$

$$\% \text{ Supervivencia larvaria} = (\text{LC} / \text{HVFF}) \times 100$$

HVFF = Total de huevos vivos en una muestra de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HMFF = Total de huevos muertos en una muestra de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HNFFF = Total de huevos no fecundados en una muestra de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HAFF = Total de huevos anormales en una muestra de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HMINC = Total de huevos muertos durante la incubación

LA = Número de larvas anormales

LC = Número de larvas con el saco vitelino reabsorbido

El procedimiento seguido para la determinación de las tasas de eclosión y supervivencia larvaria 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 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, y luego con 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 formula ya descrita.

Para el cálculo de las tasas de larvas anormales y 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 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.

3.2.3. Producciones Relativas

También se utilizaron 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, calculado utilizando los índices medios de las puestas y referidos a kilogramo de hembra reproductora y a puesta, según las siguientes formulas:

$$\text{N}^\circ \text{ huevos} = (\text{HTFF} / 25 \times 5000) + (\text{HTFNF} / 25 \times 2000) + (\text{HT2REC} / 25 \times 2000)$$

$\text{N}^\circ \text{ huevos} = \text{HT} / 25 \times 5000$ (Fórmula utilizada en aquellas puestas en que solo se determinaba el número total de huevos).

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

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

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

HTFF = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción Flotante

HT = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml

HTFNF = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la Fracción no Flotante

HT2REC = Número total de huevos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la segunda recogida

3.2.4. Medida de huevos y larvas

En los experimentos, se midieron a lo largo del periodo de puesta diferentes lotes de huevos y larvas para controlar el diámetro de los huevos, de la gota de grasa y de la longitud de larvas de 1 y con el saco vitelino reabsorbido. 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 1l 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).

3.3. PARÁMETROS ABIÓTICOS DEL AGUA DE MAR

En todos los experimentos se llevo a cabo el registro diario de concentración de oxígeno disuelto y temperatura del agua, utilizando un Oxímetro (YSI 95 Dissolved Oxygen, YSI Incorporated, modelo 95/10 FT CE, Ohio,USA). El agua utilizada en todos los experimentos es agua bombeada directamente del mar, cuya salinidad no sufre variaciones y permanece constante en torno a los $36‰ \pm 0,001$ al igual que el $pH= 8,14 \pm 0,03$.

3.4. DIETAS EXPERIMENTALES

3.4.1. Formulación

Para la elaboración de las dietas se utilizaron: harina de langostino, harina de calamar, aceite de pescado y pimentón, en las cantidades que se detallan en cada una de los subcapítulos experimentales.

Las mezclas de vitaminas y de minerales (Tablas I, II y III) fueron las mismas en todas las dietas experimentales. Los minerales (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA.) se mezclaron usando como base alfa-celulosa, y la mezcla se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Las vitaminas liposolubles, junto con la etoxiquina, se mezclaron en el momento de elaborar cada dieta, usando aceite de pescado como solvente, de igual manera fueron agregados los carotenoides ya sea en polvo en el caso del pimentón (experimentos I y II) o como oleorresina (experimentos III y IV). 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.

TablaV.- Mezcla de minerales utilizados en las dietas experimentales

COMPUESTO	g / kg DIETA
$(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{Ca}$	160
Ca CO_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
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	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 VI.- Mezcla de vitaminas hidrosolubles utilizada en las dietas experimentales

COMPUESTO	g / kg DIETA
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
Acido fólico	1
Mio-inositol	2
Ácido ascórbico	2
Colina	2

Tabla VII.- Mezcla de vitaminas liposolubles y antioxidantes utilizada en las dietas experimentales

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

3.4.2. 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 DANAMIX BM 330 (Azpeitia, Gipuzcua, España) 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 la elaboración de los granos se utilizó una granuladora CPM (California Pellet Mill, CA.,USA) con una matriz de 7 mm. 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.

3.5. ANALISIS PROXIMALES

En este apartado se describen los métodos utilizados para el análisis de la composición de los huevos y dietas de los distintos experimentos realizados. Todos los análisis se hicieron por triplicado para asegurar el error analítico mínimo en los datos obtenidos. Las muestras de huevos, recogidas a lo largo del período experimental fueron lavadas con agua destilada y luego secadas con papel filtro y guardadas en atmósfera de nitrógeno. También se guardaron en nitrógeno muestras de las dietas a -80 °C en un congelador, Thermo Electron Corporation, modelo Genesys 10UV (Texas, USA). Todas las muestras fueron homogenizadas antes de ser analizadas, las dietas experimentales fueron homogenizadas con un mortero de porcelana, y los huevos fueron homogenizados con un Ultra Turrax IKA, modelo T25(Frankfurt, Alemania) a 11 000 rpm durante 5 min.

3.5.1. Cenizas

El contenido en cenizas de las muestras fue determinado mediante incineración de las mismas en un horno Mufla CARBOLITE, modelo ELF 11/6B (Londres, Inglaterra) a 450 °C, hasta alcanzar un peso constante según el método de la AOAC (1995).

3.5.2. Humedad

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

3.5.3. Proteínas

El contenido en proteínas se calculó mediante el método Kjeldhal (AOAC,1995), a partir de la composición en nitrógeno total de las muestras. El método consiste en la digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado (10 ml) a 420 °C en presencia de un catalizador de cobre, seguido de una destilación con Na(OH) al 40%, con ácido bórico como sustancia receptora, en una unidad de destilación Kjeltex System 1003 (Hoganas, Suecia). Por último, se realiza una valoración con HCl 0.1 N. La conversión a porcentaje de proteína bruta se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Proteínas(\%)} = \{(V - P) \times 0.1 \times 14.007 \times 6.25 \times 100\} / M$$

V = Son los ml de HCl utilizados en la valoración de la muestra

P = Media de la valoración de los patrones expresado en ml

N = Normalidad del HCl

14,007 = Peso molecular del nitrógeno

6,25 = Factor de conversión empírico de la proteína

M = peso de la muestra expresada en mg

3.5.4. Lípidos totales

El contenido en lípidos de las muestras de dietas y huevos fueron extraídas en frío para la determinación de su composición en ácidos grasos, el método utilizado fue el descrito por Folch *et al.* (1957), usando una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) conteniendo 0,01% de BHT (2,6-Di-tert-Butyl-p-cresol), la que es filtrada añadiendo una 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 guardan a – 80 ° 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 Folch se transesterificaron con ácido sulfúrico al 1% en metanol según la técnica desarrollada por Christie (1982), y modificada por Izquierdo *et al.* (1990) y luego se añade tolueno para favorecer la disolución de los lípidos neutros, diluyendo las FAMES en hexano HPLC a una concentración de 20 mg por ml de hexano. Los ésteres metílicos fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases Shimadzu Instrument Division (I Kyoto, Japón), e integrador Shimadzu, en los experimentos I, II, III, bajo las siguientes condiciones operativas:

- Columna: capilar de sílice fundida de 30 x 0,32 mm x 0,25 µm D.I. (Supelco, Bellefonte, E.E.U.U.)
- Gas carrier o portador : (Helio)
- Presión de gas: constante 100 k Pa
- Temperatura: inicial 180° C durante 10 min, rampa de 2,5 ° C/min hasta llegar a 215 °C a los 14 min
- Flujo : 1.0 std cc/min
- Velocidad : 29.5 cm/sec
- Duración de análisis. 14 min 35/2,5
- Detección F I D (Flame Ionisation Detector)

Mientras que los ésteres metílicos del experimento IV fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases Shimadzu (Instrument Division, Kyoto, Japón), e integrador Shimadzu bajo las siguientes condiciones operativas:

Se uso He como gas portador (a presión constante de 100 KPa) usando una columna 10 Supelcowax (28 mm x 0.32 mm y 0,25 i.d.). La temperatura inicial de la columna fue 270 °C (10 min), luego la temperatura del horno es mantenida a 220 °C a una tasa de 2,5 °C min⁻¹ y luego mantenida a 220 °C (5 min) temperatura final. Duración total del análisis fue 35 min. La temperatura del inyector fue de 250 °C. Los ácidos grasos fueron identificados por comparación con un estandar externo.

3.5.5. Carotenoides

Los carotenoides totales de huevos y de las dietas fueron extraídos con hexano siguiendo el método de Barua *et al.* (1993). La cuantificación del contenido de carotenoides totales se determinó por espectrofotometría. Todos los sobrenadantes conteniendo los carotenoides extraídos se evaporan a sequedad en atmósfera de nitrógeno. El extracto de carotenoides fue resuspendido en un volumen de hexano cuya absorbancia este comprendida entre 0,2 y 0,8. Una vez extraídos los carotenoides de un determinado peso de muestra, se procede a la cuantificación, previa medición de la absorbancia se filtraron los carotenoides haciendo uso de pipetas Pasteur rellenas algodón. A continuación se obtiene el espectro de absorción y el valor de la extinción E, a la longitud máxima de absorción (λ max). de 470 nm. y con un coeficiente de extinción de 2500 para astaxantina en hexano (Britton, 1995).

El total de carotenoides en gramo de muestra fue determinado con la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g} / \text{g} = 10000 \times V \times A / P \times E \quad \text{1\% 1cm} \quad \text{donde}$$

V = volumen total de la extracción en ml

P = peso de la muestra en gr

A = valor de absorbancia medida en el espectrofotómetro

2500 = coeficiente de extinción de la astaxantina en hexano

3.5.6. Vitaminas

Las vitaminas A (retinol) y E (α -tocoferol) fueron determinadas en dietas y huevos mediante HPLC, según el método modificado por Lambertsen (1983) y Lie *et al.* (1994). Las muestras fueron homogeneizadas y extraídas con hexano

mediante el método de Barua *et al.* (1993). El extracto de carotenoides fue resuspendido en Diclorometano/Acetonitrilo/Metanol (5:75:20).

Preparación de materiales y estándares

- Lavar todos los materiales con hexano y secar
- Calibrar todas la pipetas con agua
- Poner los reactivos en un matraz de 10 ml ; la preparación de los estándares de mayor concentración a menor.

Estandares

- a) (+/-) – α –Tocoferol
- b) (+/-) – γ - Tocoferol
- c) Retinol all trans
- d) DL- Tocoferol Acetato (estándar interno)

Soluciones Stock

- a) (+/-) – α –Tocoferol 1.5009 g en 100 mL (Etanol +0.05%BHT)
- b) (+/-) – γ - Tocoferol.... 5 mg en 25 mL (Etanol + 0.05 %BHT)
- c) Retinol all trans 0.1 g en 100 ml (Etanol + 0.05%BHT), 500ul en 5mL con (Etanol + 0.05%BHT)
- d) DL- Tocoferol Acetato (estándar interno)...1.016 g en 100 mL (Etanol + 0.05%BHT)

Soluciones estándares

A partir de las soluciones stock preparar las soluciones estándares en matraces de 10 mL

- Secar con nitrógeno
- Añadir 0.5 mL de Diclorometano al matraz y mezclar
- Enrasar con (acetonitrilo : metanol) (15 mL ACN ; 4mL Metanol)
- Guardar a –80 °C

Condiciones cromatograficas

El equipo de cromatografía líquida empleado Shimadzu Corp. (Kyoto, Japón) y las condiciones para la determinación de la vitamina E se describe a continuación:

Equipo : HPLC tipo :espectro lote 074/13110-5 marca :Thermo

Fase móvil : Diclorometano/Acetonitrilo/Metanol (5:75:20)

Columna : Hypurity C18 dim(mm) 1500x4.6

Flujo :1ml/min

Longitud de onda : 280nm

Volumen de inyección : 50uL

Tiempo del cromatograma : 15 min.

La concentración de la vitamina E en las muestras fue determinada mediante estándar externo, que fueron preparados el día del análisis y las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) fueron cuantificadas por espectrometría UV.

Compuesto	Identificación número	t_r^a (min)	λ (nm)
Retinol all trans	2.5	2.00	280
γ - Tocoferol	9.1	9.40	280
α -Tocoferol	9.9	14.50	280
Tocoferol Acetato	11.7	15.90	280

Fase móvil

Solvente A : Diclorometano

Solvente B : Metanol

Solvente C : Acetonitrilo

Time (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)
0	5.0	20.0	75.0
15	5.0	20.0	75.0

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos en este estudio se expresan como media de los valores con sus correspondientes desviaciones estándar. Los datos de un mismo experimento se compararon estadísticamente utilizando el análisis de varianza (ANOVA) (Sokal y Rohlf, 1979). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

Detectadas las diferencias estadísticamente significativas con el ANOVA, las diferencias entre medias fueron comparadas mediante el test de comparación múltiple de 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 o los datos no tenían una distribución normal 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 persistían, se empleaba el test no paramétrico de rangos múltiples de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1979). Detectadas diferencias estadísticamente significativas con el test de Kruskal-wallis, se utilizó el procedimiento de caja y bigotes con muescas para determinar la diferencia entre las réplicas. Los datos se analizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS 8 Versión 3.1 Plus for Windows; Graphic software Systems, Inc.USA).

3.7. 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.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 INCLUSIÓN DE CAROTENOIDES NATURALES EN DIETAS PARA REPRODUCTORES DE DORADA (*Sparus aurata* L.) Y SU EFECTO EN LA PUESTA

4.1.1. INTRODUCCIÓN

Es sabido que numerosos factores nutricionales están relacionados con la reproducción en Teleósteos, siendo el tamaño de la ración y los niveles y tipo de nutrientes empleado los más importantes. Estos factores afectan a varios parámetros reproductivos, siendo los principales: el desarrollo gonadal, la fecundidad, la calidad del huevo y la calidad larvaria (Izquierdo *et al.*, 2001; Watanabe y Vassallo-Agius, 2003).

Las tendencias más recientes en la investigación nutricional en peces están basadas en la búsqueda de ingredientes alternativos a los comúnmente usados: harina y aceite de pescado obtenidos de stocks naturales, y cuyas pesquerías muestran signos de sobreexplotación (Brandsen *et al.*, 2003). Hoy en día la industria de piensos para la acuicultura continúa en la búsqueda de fuentes alternativas de alta calidad basada en ingredientes provenientes de plantas. Incorporando además ingredientes bioactivos, también llamados nutraceuticos que otorgan beneficios sanitarios a los peces mantenidos en condiciones adversas. Asimismo, muchos de estos nutrientes estabilizan la microflora intestinal y mantienen el estatus antioxidativo de los peces (Castro-González *et al.*, 2007). Entre ellos, y junto con el α -tocoferol, los carotenoides ejercen una función antioxidativa importante. Varios estudios han puesto de manifiesto la importancia de los carotenoides en los procesos reproductivos de organismos marinos como crustáceos (Liñan-Cabello *et al.*, 2002) y peces tanto marinos (Watanabe y Kiron, 1995; Verakunpiriya *et al.*, 1997; Vassallo-Agius *et al.*, 2001 a,b,c, 2002; Watanabe y Vassallo-Agius 2003) como de agua dulce (Choubert y Blanc, 1993; Watanabe y Kiron, 1995; Ahmadi *et al.*, 2006). Por ejemplo, la astaxantina dietética mejora la fecundidad en especies como jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*) (Vassallo-Agius *et al.*, 2001a) o seriola coreana (*Seriola*

quinqueradiata) (Verakunpiriya *et al.*, 1997). En algunos espáridos, como el pargo japonés (*Pagrus major*), se ha demostrado que la inclusión de astaxantina purificada en dietas para reproductores incrementa el porcentaje de huevos flotantes, eclosionados y larvas viables (Watanabe y Kiron, 1995). Sin embargo, no hay datos suficientes sobre la importancia de los carotenoides en las dietas para dorada.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la inclusión en la dieta para reproductores de dorada de carotenoides naturales, tanto de origen animal como vegetal, en la calidad de la puesta de esta especie.

4.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Reproductores

Treinta y seis reproductores de dorada (*Sparus aurata*) de 2-4 años de edad, provenientes de la granja de jaulas del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), fueron seleccionados y distribuidos al azar en doce tanques circulares de fibra de 1000 l con circuito abierto de 160 l/h lo que implicaba una renovación diaria de 4 veces el volumen del tanque y provistos de aireación complementaria. La temperatura del agua de los tanques de reproductores durante la experiencia se registro en forma diaria y fue de $19,5 \pm 0,5$ °C (media \pm DE), mientras que la salinidad y saturación de oxígeno del agua se registraron semanalmente, siendo los valores de salinidad de $36,8 \pm 0,001$ ppm, y de 67 a 90 % la saturación de oxígeno. El foto periodo fue natural, siguiendo la extensión del día respecto a la posición geográfica local (27° 59' 31.46" N; 15° 22' 08.50" W). La relación macho: hembra fue 2:1, Fernández-Palacios *et al.* (1990). El peso medio fue de 1,68 kg y 0,91 kg para las hembras y para los machos, respectivamente. Las características biométricas de los reproductores se especifican en la Tabla VIII. Las puestas fueron espontáneas, y la calidad de las mismas fue determinada según Fernández-Palacios *et al.* (1995).

Tabla VIII.- Características biométricas de los reproductores utilizados en el experimento

Grupo experimental	20	20 P	15	15 L
<i>Machos</i>				
Peso Corporal (kg)	1,02 ± 0,35	1,01 ± 0,31	0,94 ± 0,27	0,79 ± 0,1
Long.estándar (cm)	34,3 ± 1,63	35,3 ± 0,84	36,2 ± 1,43	32,4 ± 0,79
Factor Condición	23,2 ± 3,8	22,1 ± 4,2	21,9 ± 2,81	23,4 ± 2,7
<i>Hembras</i>				
Peso Corporal (kg)	1,79 ± 0,07	1,66 ± 0,18	1,89 ± 0,10	1,85 ± 0,07
Long.estándar (cm)	42,9 ± 1,1	43,1 ± 2,2	43,4 ± 2,5	44,15 ± 1,2
Factor Condición	22,8 ± 0,9	20,8 ± 1,3	22,6 ± 3,0	21,3 ± 1,9
Densidad (kg/m ³)	3,74 ± 0,62	3,63 ± 0,41	3,94 ± 0,54	3,70 ± 0,42

(Media ± (DE); Factor de Condición = [Peso corporal(g)x1000]/[longitud Estándar (cm)]³).

Dietas

Se formularon cuatro dietas isoprotéicas, usando harina de calamar y de pescado como fuente de proteínas. Con dos niveles de lípidos (20 Y 15 %) utilizando como fuente aceite de sardina. Además, se incluyeron dos tipos de carotenoides naturales: pimentón en polvo y harina de langostino. La denominación e ingredientes utilizados en la composición de las dietas experimentales se indica a continuación:

20: Sin carotenoides añadidos

20 P: Con carotenoides, pimentón en polvo (P)

15 : Dieta comercial para reproductores (PROAQUA)

15 L: Con carotenoides, harina de langostino (L)

La composición y análisis proximal de las dietas experimentales se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX.- Composición y análisis proximal de las dietas experimentales

Ingredientes (g /100g dieta)	Grupo experimental			
	20	20 P	15	15 L
Harina de pescado ^a	28,86	28,34	--	24,38
Harina de calamar ^b	27,85	27,34	--	23,52
Harina de carcasa de langostino ^c	--	--	--	13,74
Aceite de pescado	12,37	12,14	--	7,91
Almidón de maíz ^d	13,12	12,88	--	12,92
Vitaminas (mezcla) ^e	1,86	1,82	--	1,83
Minerales (mezcla) ^e	1,86	1,82	--	1,83
Pimentón ^f	--	1,82	--	--
α – Celulosa ^g	13,15	12,93	--	12,96
Carboximetil celulosa	0,93	0,91	--	0,91
Análisis Proximal (% peso seco)				
Proteína	48,81	48,69	48,7	48,77
Lípidos	20,94	20,94	14,61	15,8
Ceniza	5,37	5,31	7,43	5,31
Carotenoides totales (µg/g)	1,05	8,78	4,0	4,5
Humedad	6,16	6,58	11,6	7,36
Carbohidratos ¹	24,88	25,06	29,26	30,12

^a Norsildmel, Bergen, Noruega

^b Rieber & Son Ltd., Bergen, Noruega

^c Sopropeche

^d Merigel 100 Amylum Group

^e Fernández-Palacios *et al.* (1998).

^f Pimentón "Titán" José Martínez y Cía. S.A. (Murcia, España)

^g Carboximetil celulosa CMC (Sal de sodio, Sigma C-5678)

¹ Calculados como $100 - (\% \text{Proteína} + \% \text{Lípidos} + \% \text{Ceniza}) \%$

En la Tabla X se muestran los ácidos grasos de las dietas así como algunas relaciones entre ellos.

Tabla X.- Composición y relación entre algunos ácidos grasos de las dietas experimentales (% total de ácidos grasos)

ACIDOS GRASOS	Grupo experimental			
	20	20 P	15	15 L
14:0	5,74	5,54	5,72	5,57
15:0	-	-	0,37	-
16:0	18,64	18,35	16,46	19,70
16:1n-7	6,58	6,80	7,05	6,54
16:1n-5	-	-	1,11	-
17:0	0,43	-	-	-
16:4n-1	-	-	-	0,31
18:0	2,10	2,09	2,90	2,23
18:1n-9	14,31	14,32	22,49	15,05
18:1n-7	0,55	0,64	11,19	0,22
18:2n-9	0,04	-	0,07	0,02
18:2n-6	1,39	2,44	0,07	1,76
18:3n-9	0,07	-	0,14	0,07
18:3n-6	0,08	-	2,24	-
18:4n-6	0,63	-	0,15	-
18:3n-3	0,09	-	1,50	-
18:4n-3	1,74	1,82	5,76	1,60
18:4n-1	0,12	0,13	0,03	0,09
20:1n-9	0,16	0,17	-	0,16
20:1n-7	11,60	11,46	-	11,28
20:2n-6	0,18	0,18	-	-
20:4n-6	0,41	0,43	0,50	0,46
20:3n-3	0,18	0,17	-	0,19
20:4n-3	0,31	0,33	0,03	0,30
20:5n-3	7,89	8,25	6,97	8,07
22:1n-11	14,45	13,81	6,17	13,52
22:4n-6	0,08	-	0,12	0,08
22:5n-3	0,32	0,37	0,79	0,31
22:6n-3	11,87	12,70	8,10	12,42
Saturados	26,48	25,99	25,47	27,68
Monoenoicos	48,07	47,20	46,89	46,61
n-3	22,40	23,64	23,15	22,90
n-6	2,82	3,04	3,13	2,34
n-9	14,58	14,49	22,70	26,42
n-3 HUFA	20,57	21,82	15,89	21,29
AA / EPA	0,05	0,05	0,07	0,06
EPA / DHA	0,66	0,65	0,86	0,65
Oleico / DHA	1,21	1,13	2,77	1,21
Oleico / n-3HUFA	0,70	0,66	1,42	0,71
n-3 / n-6	7,95	7,76	7,40	9,80

Una vez distribuidos los reproductores en los tanques, se les alimentó con el pienso comercial durante tres semanas. Posteriormente se comenzó con las dietas experimentales, estas fueron suministradas diariamente al 1,5 % de la biomasa del tanque, repartida en tres tomas 08:00, 12:00 y 15:00 h durante el periodo experimental.

Análisis bioquímicos

Muestras de huevos, recogidas a lo largo del período experimental, fueron guardadas a - 80 °C en atmósfera de nitrógeno y protegidas de la luz para su posterior análisis bioquímico. Con este mismo objetivo también se guardaron muestras de las dietas.

Las muestras de dietas y huevos fueron analizadas por triplicado de acuerdo con los siguientes procedimientos: humedad y proteínas siguiendo los protocolos de AOAC (1995). Los lípidos totales fueron extraídos por el método descrito por Folch *et al.* (1957) y guardados disueltos en cloroformo en viales etiquetados a - 80 ° C y en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación, hasta su metilación para identificación de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos de las dietas y huevos fueron obtenidos por transesterificación con el método descrito por Christie (1982). Los FAME fueron separados, identificados y cuantificados por cromatografía de gases, Shimadzu (Instrument Division, Kyoto, Japón), e integrador Shimadzu bajo las condiciones operativas descritas por Izquierdo *et al.* (1990).

El contenido de carotenoides fue analizado de acuerdo a Barua *et al.* (1993). La cuantificación total de carotenoides se determinó por espectrofotometría, la absorbancia fue leída a una longitud de onda λ -max de 470 nm. El coeficiente de extinción (E1%.1cm) usado fue 2500 para astaxantina en hexano (Britton, 1995). El total de carotenoides en gramo de muestra fue determinado con la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g} / \text{g} = 10000 \times V \times A / P \times E \quad 1\% \quad 1\text{cm} \quad \text{donde}$$

V = volumen total de la extracción en mililitro

P = peso de la muestra en gramo

A = valor de absorbancia medida en el espectrofotómetro

2500 = coeficiente de extinción de la astaxantina en hexano

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se han expresado siempre como media \pm desviación estándar de la media. Los datos se compararon estadísticamente utilizando el análisis de la varianza ANOVA (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).

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 con la función arco seno. Si la heterogeneidad o la no distribución normal de los datos persistía, se empleaba el test no paramétrico de rangos múltiples de Kruskal-Wallis (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).

4.1.3. RESULTADOS

Parámetros biológicos de las puestas

Los reproductores aceptaron y comieron bien las dietas experimentales, no existiendo mortalidad durante el desarrollo del experimento. Durante las primeras tres semanas de alimentación común, con la dieta comercial, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los indicadores de la calidad de las puestas de los grupos experimentales. Tras este periodo de alimentación común se comenzó a alimentar con las dietas experimentales a tres de los grupos de reproductores experimentales, un cuarto grupo continuo alimentándose con la dieta comercial. Se compararon los datos de parámetros de calidad entre los replicados de una misma dieta y se encontró que no había diferencias significativas entre ellos. Después de tres semanas de alimentación el porcentaje de huevos vivos de los reproductores alimentados con la dieta 20 P, que contenía el nivel más alto de carotenoides y el nivel más alto de lípidos, fue significativamente mejor que el porcentaje de huevos vivos de las puestas de los reproductores alimentados con la dieta 20 que contenía el mismo nivel de lípidos pero sin carotenoides (Tabla XI). Se encontraron correlaciones significativas entre el contenido en carotenoides de las dietas con el porcentaje de huevos vivos (Fig. 5) y con el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido (Fig. 6).

Tabla XI.- Índices de las puestas de los reproductores de dorada, alimentados con las dietas experimentales (media \pm DE)

Grupo experimental	% Huevos Vivos	% Huevos muertos	% Huevos no fecundados
20 (n=21)	80,28 \pm 12,25 ^b	19,08 \pm 11,90 ^b	0,62 \pm 1,87
20 P (n=21)	90,67 \pm 5,64 ^a	9,01 \pm 5,59 ^{ab}	0,31 \pm 0,89
15 (n=23)	88,90 \pm 7,71 ^{ab}	11,52 \pm 7,68 ^{ab}	0,03 \pm 0,08
15 L (n=22)	88,68 \pm 9,85 ^{ab}	10,91 \pm 9,39 ^a	0,40 \pm 0,76
	% Con más de una gota lipídica	% Eclosión	% Larvas saco vitelino reabsorbido
20 (n=21)	0	73,01 \pm 21,80 ^a	41,54 \pm 27,16
20 P (n=21)	0	77,30 \pm 10,01 ^a	49,98 \pm 21,39
15 (n=23)	0	68,73 \pm 17,87 ^b	44,81 \pm 21,46
15 L (n=22)	0	79,30 \pm 10,41 ^a	43,84 \pm 27,99

Valores en la misma columna sin o con igual superíndice no tienen diferencias significativas.

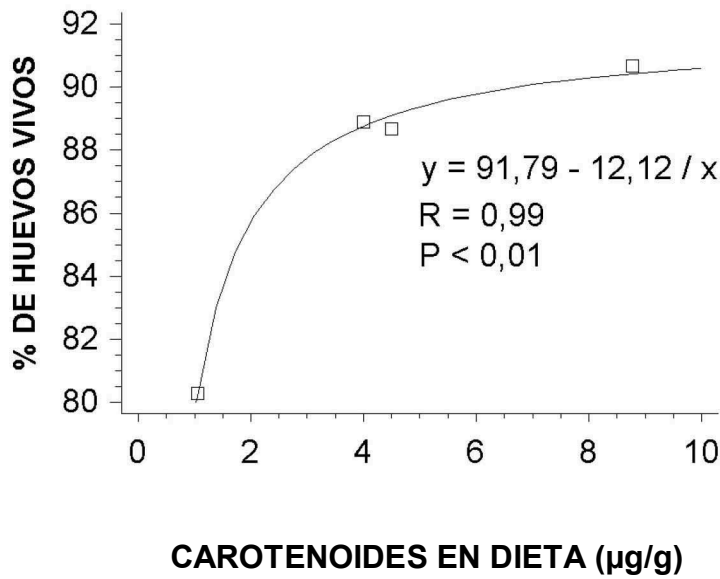


Fig. 5. - Relación entre el contenido en carotenoides de las dietas y el porcentaje de huevos vivos.

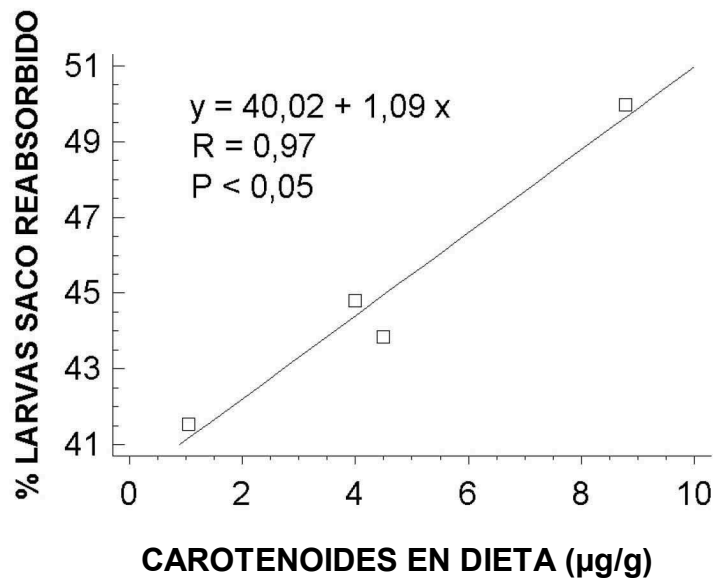


Fig. 6.- Relación entre el contenido en carotenoides de las dietas y el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido.

El porcentaje significativamente más bajo de eclosión correspondió a las puestas de los reproductores que fueron alimentados con la dieta comercial. Se encontraron correlaciones significativas entre este índice y el contenido dietético de n – 3 HUFA, DHA, y EPA (Fig. 7).

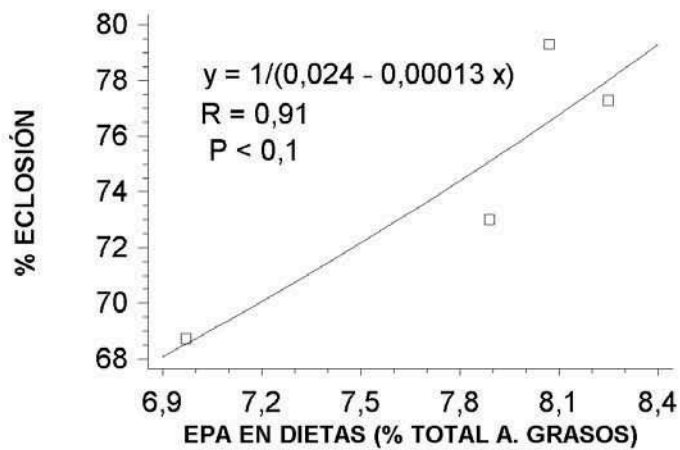
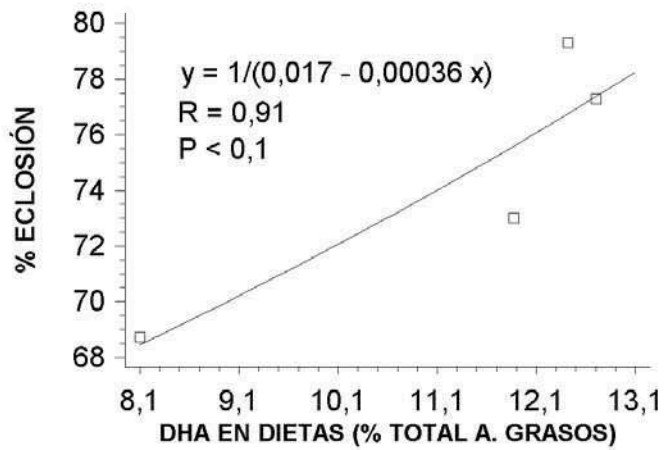
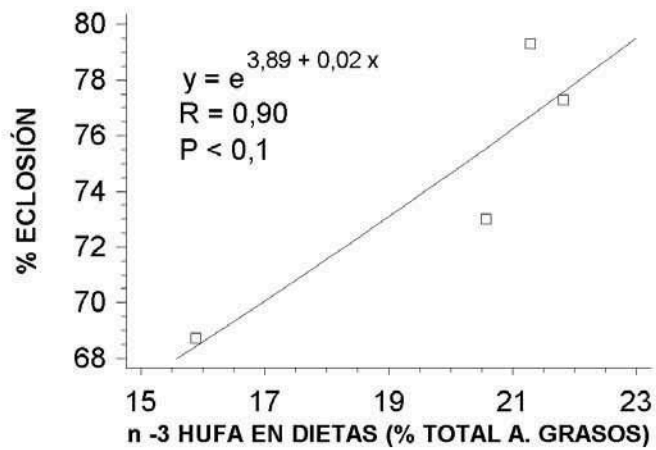
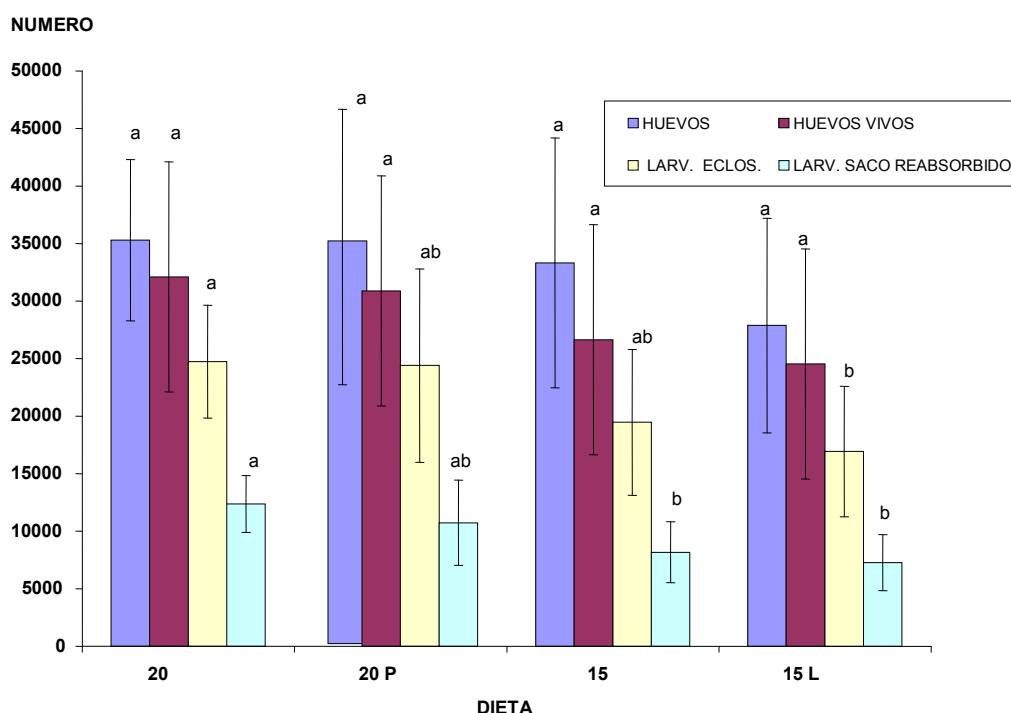


Fig. 7.- Relación entre el porcentaje de eclosión y el contenido en n – 3 HUFA, DHA y EPA de las dietas.

Las dietas experimentales también afectaron las producciones relativas (por kg de hembra y por puesta). Así los reproductores alimentados con la dieta 20P produjeron un número significativamente más alto de larvas eclosionadas que los reproductores alimentados con la dieta 15. De la misma forma los reproductores alimentados con esta dieta (20P) produjeron un número significativamente mayor de larvas con saco vitelino reabsorbido que los reproductores alimentados con las dietas 20 y 15 (Fig. 8).



* 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.8.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada alimentados con dietas experimentales.

Composición bioquímica de los huevos

En la Tabla XII se indica el contenido en proteína, lípidos, carotenoides y humedad en los huevos producidos por los reproductores alimentados con las distintas dietas. Se encontraron diferencias significativas en el contenido lipídico de los huevos, siendo mayor el de los huevos de los reproductores alimentados con las dietas con más bajo contenido lipídico. No se encontraron relaciones entre el contenido dietético en proteínas, lípidos o carotenoides y su nivel en los huevos. Tampoco se encontraron relaciones entre el contenido, en los huevos de estos componentes y los parámetros de calidad de las puestas.

Tabla XII.- Contenido en proteína, lípidos, carotenoides y humedad en los huevos (media \pm desviación típica)

Composición analítica	Grupo experimental			
	20	20 P	15	15 L
Proteínas	44,10 \pm 1,27	44,29 \pm 0,42	40,57 \pm 0,46	39,99 \pm 0,07
Lípidos	21,47 \pm 0,65 ^c	26,66 \pm 1,56 ^b	30,36 \pm 0,66 ^a	31,45 \pm 1,55 ^a
Carotenoides	3,8 \pm 2,1	8,5 \pm 3,4	3,8 \pm 1,9	6,4 \pm 2,8
Humedad	93,07 \pm 0,57	93,45 \pm 0,52	94,09 \pm 0,25	94,48 \pm 0,29

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

Los ácidos grasos encontrados en mayor proporción, en los lípidos totales, en los huevos de los reproductores alimentados con las diferentes dietas (Tabla XIII), fueron: DHA, observándose una correlación significativa entre el nivel dietético de n – 3 HUFA y este ácido graso en los huevos (Fig. 9), 16:0 (ácido Palmítico) y 18:1n9 (ácido Oleico). Los valores más altos de estos tres ácidos grasos, correspondieron a los huevos producidos por los reproductores alimentados con la dieta que contenía el nivel más alto de carotenoides (20 P). Se encontró una correlación significativa entre los niveles de ácido oleico contenido en los huevos y el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido (Fig. 10).

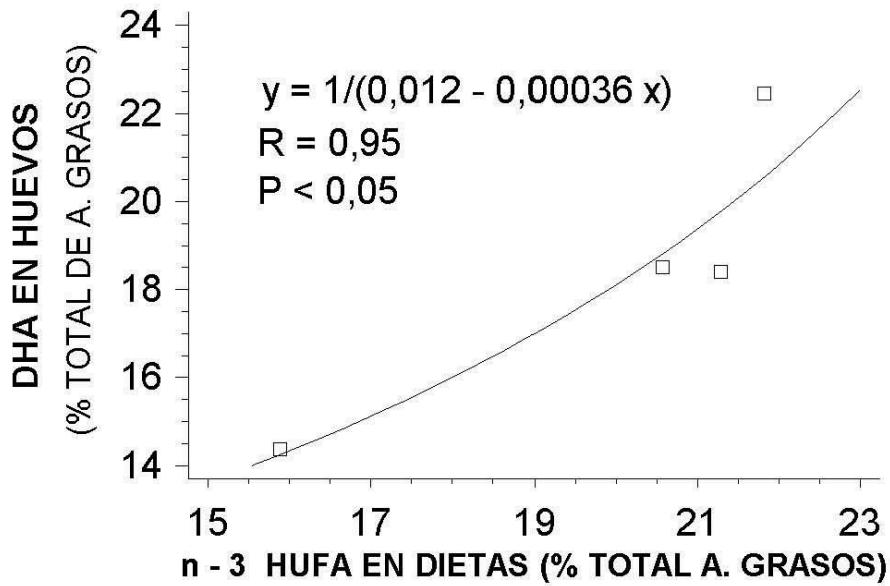


Fig. 9.- Relación entre el nivel dietético de n – 3 HUFA y el contenido en DHA en los huevos.

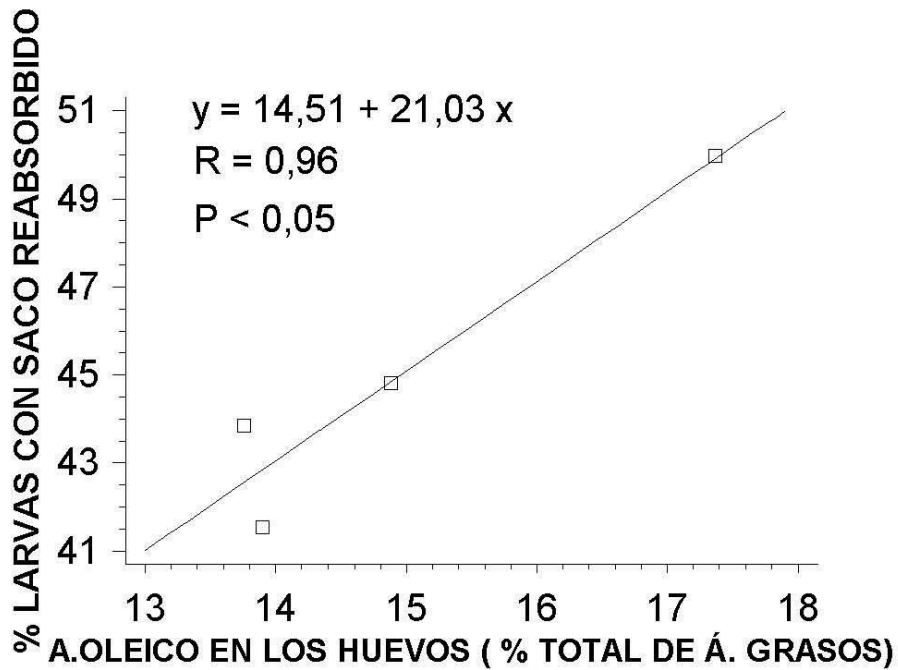


Fig. 10.- Relación entre el contenido en ácido Oleico de los huevos y el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido.

Los ácidos grasos que siguen en orden de abundancia son el 20:5 n-3 (ácido Eicosapentaenoico, EPA) y 16:1n-7 (ácido Palmitoleico). Los valores más altos de estos ácidos grasos corresponden, de nuevo, a los huevos de los reproductores alimentados con la dieta con mas alto contenido en carotenoides. Se observó una correlación significativa entre los niveles dietéticos de carotenoides y los niveles de n-3 HUFA en los huevos de los reproductores alimentados con las diferentes dietas (Fig 11), y del contenido en n-3 HUFA de los huevos con el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido (Fig. 12).

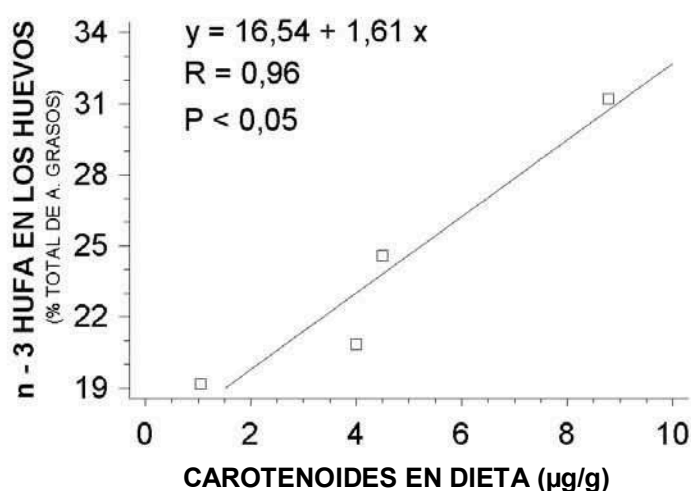


Fig.11.- Relación entre el contenido dietético en carotenoides, y el contenido en n -3 HUFA de los huevos.

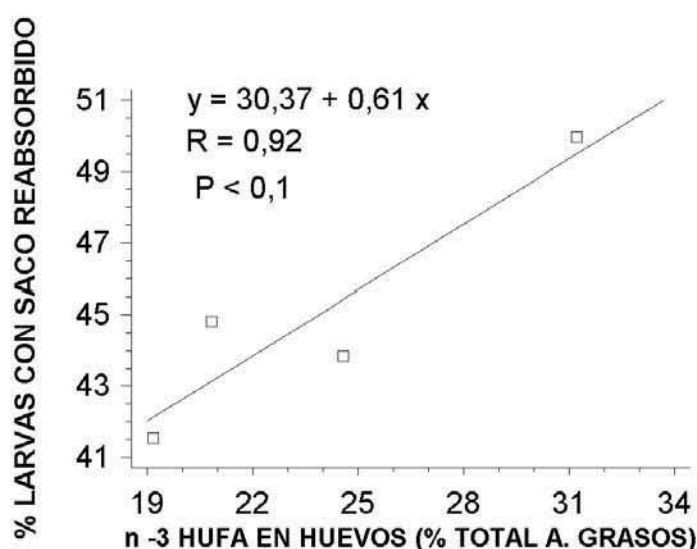


Fig. 12.- Relación entre el contenido en n-3 HUFA en los huevos y el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido.

Tabla XIII.- Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos de los reproductores alimentados con diferentes dietas

Ácidos Grasos	Grupo experimental			
	50/15 HL	50/20	50/20 Pn	50/15 PR
14:0	2,69	4,21	2,74	3,30
14:1	0,05	0,12	0,08	0,05
15:0	0,21	0,25	0,26	0,24
16:0iso	0,25	0,30	0,44	0,19
16:0	15,49	16,89	20,79	15,68
16:1 n-7	4,22	4,59	5,42	4,31
16:1n-5	0,15	0,19	0,21	0,16
17:0	0,16	-	-	0,44
17:1	-	0,18	0,32	-
16:2n-4	-	0,44	0,47	0,04
16:2n-3	-	-	0,16	-
16:3n-4	0,26	-	-	0,12
16:4n-3	0,0	0,28	0,10	0,04
18:0	2,58	2,68	3,70	3,12
18:1n-9	13,76	13,90	17,37	14,88
18:1n-7	2,00	2,12	2,45	2,16
18:1n-5	0,20	0,21	0,23	0,15
18:2n-9	0,15	0,02	0,19	0,13
18:2n-6	4,10	2,94	4,51	7,45
18:3n-6	0,09	0,11	0,14	0,16
18:4 n-6	0,16	0,07	0,07	0,02
18:3 n-3	0,67	0,58	0,76	1,34
18:4n-3	0,39	0,63	0,61	0,59
20:1n-9	1,36	1,75	1,71	1,02
20:1n-7	0,09	0,10	0,11	0,08
20:2n-6	0,11	0,11	0,13	0,13
20:4n-6	0,49	0,56	0,61	0,55
20:4n-3	0,41	0,48	0,48	0,44
20:5n-3	4,38	6,31	6,79	4,64
22:1n-11	0,41	0,52	0,46	0,28
22:1n-9	0,11	0,11	0,11	0,07
22:4n-6	0,10	0,12	0,04	0,06
22:5n-6	0,10	0,10	0,15	0,13
22:5n-3	1,26	1,17	1,31	1,27
22:6 n-3	18,41	18,50	22,46	14,36
Saturados	21,43	22,95	28,33	23,05
Monoenoicos	22,61	21,48	28,27	23,11
n-3	25,64	21,19	32,70	22,80
n-6	5,20	11,69	5,72	8,58
n-9	15,46	14,22	19,45	16,22
n-3HUFA	24,58	19,16	31,22	20,83
AA/EPA	0,11	0,09	0,09	0,12
EPA/DHA	0,24	0,34	0,30	0,32
oleico/DHA	0,75	0,75	0,77	1,04
oleico/n-3HUFA	0,56	0,73	0,56	0,71
n-3/n-6	4,93	1,81	5,72	2,66

4.1.4. DISCUSIÓN

Los estudios que relacionan el contenido en carotenoides con la calidad de la puesta son escasos y de resultados contradictorios, aunque se sabe que influyen marcadamente en la calidad de las puestas de peces marinos (Harris, 1984; Watanabe y Kiron, 1995). La importancia de los carotenoides en la reproducción de peces, se manifestó claramente en los estudios llevados a cabo con reproductores en ambiente controlado (Harris, 1984; Choubert y Blanc, 1993; Watanabe y Kiron, 1995).

Una mejora en la calidad de las puestas se observó cuando los reproductores fueron alimentados con dietas que contenían carotenoides, especialmente astaxantina (AST) en: pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1991a, b), seriola coreana, *Seriola quinqueradiata* (Verakunpiriya *et al.*, 1997) jurel dentón, *Pseudocaranx dentex* (Vassallo-Agius *et al.*, 2001 b, c) y trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Ahmadi *et al.*, 2006). Tveranger (1986), encontró en puestas de trucha arco iris alimentadas con dietas complementadas con 10% de harina de krill, una mejora en el porcentaje de fecundación, comparado con el de otros reproductores alimentados con una dieta no complementada, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas

En el presente estudio, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el porcentaje de huevos vivos, entre las puestas de los reproductores alimentados con la dieta con mas alto contenido en carotenoides (8,78 $\mu\text{g/g}$), y las puestas de los reproductores alimentados con la dieta sin complementar con carotenoides (1,05 $\mu\text{g/g}$). De hecho, se encontró una correlación positiva entre el contenido en carotenoides de las dietas y los porcentajes de huevos vivos y de larvas con el saco vitelino reabsorbido. Sawanboonchun *et al.* (2008), señalan una mejora en el porcentaje de huevos vivos, cuando reproductores de bacalao (*Gadus morhua*), son alimentados con una dieta complementada con carotenoides en comparación con las puestas de reproductores alimentados con una dieta sin complementar.

Los mejores resultados en cuanto al porcentaje de eclosión, se obtuvieron en las puestas de los reproductores a los que se suministraron las dietas complementadas con carotenoides (20 P y 15 L), y se diferenciaron significativamente, de las de los reproductores alimentados con la dieta sin complementación, y, por ello, con más bajo contenido en carotenoides (20). En pargo japonés (*Pagrus major*), El porcentaje de eclosión se incrementa notablemente en puestas de reproductores alimentados con una dieta complementada con carotenoides (Watanabe y Kiron, 1995).

Se encontraron correlaciones positivas entre los niveles dietéticos de n – 3 HUFA, DHA y EPA y el porcentaje de eclosión. La complementación de dietas de reproductores, con nutrientes específicos especialmente con determinados ácidos grasos y micronutrientes liposolubles, como los carotenoides, incrementan de manera notable la calidad de las puestas (Verakunpiriya *et al.*, 1997; Czesny y Dabrowski, 1998; Sargent *et al.*, 2002; Fernández-Palacios *et al.*, 2009).

Estudios realizados con reproductores de seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*) utilizando dietas secas elaboradas con otra fuente de carotenoides (ésteres de pimentón) pusieron de manifiesto la mejora de la calidad de las puestas (Vassallo-Agius *et al.*, 2001a, 2002). Así, niveles dietéticos de pimentón en polvo de alrededor de 30mg/kg mejoraron el rendimiento de las puestas en términos de producción. Resultados similares se observaron en el presente experimento utilizando como fuente de carotenoides el pimentón en polvo.

La mejora en la calidad de las puestas, podría deberse a las habilidad de los ésteres pimentón como potentes eliminadores de radicales libres (Matsufuji *et al.*, 1998). Estos ésteres son capaces de sustituir a la astaxantina como fuente de carotenoides, tal como fue observado en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) (Wyban *et al.*, 1997). Los carotenoides tienen una serie de funciones biológicas (Latscha, 1990) y su capacidad de inhibir la formación de oxígeno depende de la duración de los dobles enlaces conjugados y la de los grupos funcionales (Hirayama *et al.*, 1994). Especies reactivas del oxígeno (ERO), tales como: aniones superóxidos, peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete pueden

inducir la inactivación de enzimas, división DNA y peroxidación lipídica de las membranas (Hirayama *et al.*, 1994). Por lo tanto, es importante que estos carotenoides neutralicen a los radicales libres deteniendo la cadena de propagación resultando productos finales inocuos.

Matsufuji *et al.* (1998) sugieren que la capacidad anti-radicales libres de la capsoburina que junto con la capsantina son los principales carotenoides del pimentón, es debida a su conjugado del grupo ceto y a la cadena de polienos. Estos autores especularon que se trataba de la razón por la que la capsoburina, que ha conjugado dos grupos ceto, mostraba una actividad más potente. El superior rendimiento en las puestas de peces alimentados con dietas complementadas con pimentón confirma el hecho de que la capsoburina y la capsantina pueden tener una mejor capacidad que la AST para eliminar los radicales libres (Hirayama *et al.*, 1994).

Se encontraron diferencias significativas, en el contenido lipídico, entre los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las diferentes dietas. Mostrándose en el presente estudio, que los niveles de lípidos en los huevos son independientes de los niveles de lípidos dietéticos. Similares resultados han sido observados en lubina, *Dicentrarchus labrax* (Navas *et al.*, 1997), en pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1984) y en el crescent sweetlips, *Plectorhynchus cinctus* (Li *et al.*, 2005). No se encontraron relaciones entre los componentes principales de los huevos y los parámetros de calidad de las puestas. Resultados similares son señalados por Fernández-Palacios *et al.* (1997) en lo que se refiere a lípidos y proteínas.

Los niveles de lípidos de los huevos fueron superiores a los descritos por Mourente *et al.* (1989) para dorada (10% en p.s.) pero comparables a los descritos para esta misma especie por Almansa *et al.* (1999) y Domarco (2001), en condiciones de mantenimiento de los reproductores más parecidas a las de este estudio. Por otro lado, índices de eclosión o de viabilidad muy bajos han sido asociados con altos contenidos de lípidos en huevos de *Scophthalmus maximus* (rodaballo), *Solea solea* (lenguado) y *Dicentrarchus labrax* (lubina) (Devauchelle *et al.*, 1984; Serrano *et al.*, 1989), en el presente estudio la elevada

cantidad de niveles de lípidos en los huevos de dorada no afectó el porcentaje de eclosión o al de huevos vivos. Resultados similares respecto al porcentaje de eclosión fueron reportados por Furuita *et al.* (2000) en lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*).

Los ácidos grasos mas abundantes en los lípidos totales de los huevos no se diferencian entre los distintos 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; Fernández-Palacios *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1999; Lavens *et al.*, 1999; Morehead *et al.*, 2001; Vassallo-Agius *et al.*, 2001 a, b, c; Cejas *et al.*, 2003; Furuita *et al.*, 2003). En el presente estudio, dos de los ácidos grasos más abundantes en los huevos, de los distintos tratamientos, fueron DHA y EPA, encontrándose una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre el contenido en n – 3 HUFA de los huevos y el porcentaje de supervivencia larvaria. Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentra una correlación positiva entre la relación de estos dos ácidos grasos y el porcentaje de supervivencia larvaria en puestas de reproductores de esta misma especie. También, se encontró una correlación significativa entre el contenido dietético de carotenoides y el contenido de los huevos en n - 3 HUFA. Vasallo-Agius *et al.* (2001 b), encuentran un contenido más alto de n-3 HUFA en huevos, de jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), alimentados con una dieta que contenía el 4,6% de lípidos y 21,9 ppm de axtasantina que en huevos de reproductores alimentados con una dieta con 16,2 de lípidos y 1,5 ppm de axtaxantina.

En los espáridos, la composición en ácidos grasos de las gónadas de la hembra es afectada por el contenido en ácidos grasos dietéticos que a su vez afecta significativamente la calidad del huevo en un período corto de tiempo. Diversos estudios han mostrado que la composición lipídica de los tejidos de reproductores de dorada alcanza un equilibrio con los lípidos de las dietas en tan solo 15 días de alimentación (Harel *et al.*, 1992; Tandler *et al.*, 1995). Los reproductores de dorada continúan alimentándose durante la maduración sexual ya 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 de proceder de la dieta de los reproductores y/o

reservas exógenas. Teniendo en cuenta 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). En esta especie, la calidad de la puesta puede modificarse variando la calidad nutritiva de las dietas de los reproductores incluso durante la época de puesta (Harel *et al.*, 1994; Zohar *et al.*, 1995). En este sentido, el contenido en carotenoides de las dietas experimentales se vio reflejado en los huevos de las puestas de los grupos de reproductores experimentales

Numerosas funciones han sido propuestas para los carotenoides en peces. Estos compuestos juegan un papel importante como antioxidantes y ofrecen protección contra daños causados por los radicales libres (Miki *et al.*, 1984; Edge *et al.*, 1997; Shimidzu *et al.*, 1996), son precursores de vitamina A, y mejoran la función respiratoria (Craik, 1985; Mikulin, 2000). Estas características sugieren que los carotenoides son importantes para garantizar el normal desarrollo embrionario y también podrían afectar a las tasas de eclosión y supervivencia larvaria en peces y otros grupos zoológicos (Craik, 1985; George *et al.*, 2001).

Los resultados de este trabajo sugieren que la calidad de la puesta de la dorada puede mejorarse por la inclusión de carotenoides dietéticos. La inclusión de carotenoides, como el pimentón en polvo, de origen vegetal, produjo mejores resultados en la calidad de la puesta que la harina de langostino, de origen animal, si bien la primera dieta aportó un mayor porcentaje de carotenoides totales. Por ello es también necesario determinar los niveles de carotenoides dietéticos óptimos en las dietas para reproductores de dorada.

4.1.5. BIBLIOGRAFIA

AHMADI, M.R., BAZYAR, A.A., S. SAFI, T. YTRESTØYL y B. BJERKENG. 2006. Effect of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J.Appl.Ichthyol.* 22: 388-394.

ALMANSA, E., PÉREZ, M. J., CEJAS, J. R., BADÍA, P., 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: 323-336.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.

BARUA, A.B., KOSTIC, D. y J.A. OLSON. 1993. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols, and carotenoids in human serum. *J. Chromatogr.*, 617, 257-264.

BRANSDEN, M.P., CARTER, C.G. y P.D.NICHOLS. 2003. Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.):effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. *Com. Biochem. Physiol.*, B 135,611-625.

BRITTON, G. 1995. UV/Visible spectroscopy. In Carotenoids: Spectroscopy (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds). Vol. 1B. Birkäusen, Basel. 1998.

BRUCE, M., F. OYEN, J.G. BELL, J.F. ASTURIANO, M. CARRILLO, S. ZANUY, J. RAMOS y N. BROMAGE. 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of $n - 3$ and $n - 6$ highly unsaturated fatty acids to reproductive performance. *Aquaculture.* 177: 85-97.

CASTRO-GONZÁLEZ, M.I, OJEDA, V.A., MONTAÑO BS, C.E. LEDESMA, y R.F.PÉREZ-GIL.2007. n-3 fatty acid evaluation in eighteen Mexican marine fishes as functional food.. *Arch Latinoam Nutr.*, 57 (1): 85-93.

CEJAS, J.R., ALMANSA, E., VILLAMANDOS, J.E., BADIA, P., 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.

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.

CHRISTIE, W.W. 1982. Lipid Analysis. Pergamon Press, Oxford. (second revised edition) 207 pp.

CRAIK, J.C. 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, 47:61-88.

CZESNY, S. y K. DABROWSKI, 1998. The effect of fatty acid concentration on embryo viability in wild and domesticated walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquat. Living Resour.* 11, 371-378.

DEVAUCHELLE, N. 1984. Incubation of the eggs of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). In Barnabe, G. y Billard, R. eds. L' aquaculture du bar et des Sparides. Pp. 117-124.

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.

EDGE, R., D.J. McGARVEY y T.G.TRUSCOTT. 1997. The carotenoids as antioxidants- a review. *J. Photochem. Photobiol.* B.41:189-200.

FALK-PETERSEN, S., SARGENT J.R., FOX, C., FALK-PETERSEN, L.B., T. HAUG Y E. KJØRSVIK.1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar. Biol.*, 101: 553-556.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., HERNÁNDEZ, C.M., FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.E., VERGARA, J.M. y L. ROBAINA. 1990. Influencia de distintas proporciones hembra:macho en la puesta de dorada (*Sparus aurata* L.) *Actas II Congreso Nacional de Acuicultura*. CSIC, Cádiz, Spain, pp. 27-31.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VALENCIA A., SALHI M. y J.M. VERGARA. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132, 325-337.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VALENCIA A., SALHI, M. 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, 233-246.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., GONZÁLEZ, M., ROBAINA, L. y A. VALENCIA. 1998. Combined effect of dietary α -tocoferol and n-3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 161, 475-476.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S. Y L. ROBAINA. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. *Informes Técnicos del Instituto Canario de Ciencias marinas* nº 12, 200 pp.

FERNÁNDEZ-PALACIOS H. y M.S. IZQUIERDO. 2009. Efectos de la dieta de los reproductores sobre la puesta. En: La reproducción de los peces: aspectos básicos y su aplicación en acuicultura. *Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura*. M. Carrillo, coordinador. J. Espinosa de los Monteros, editor científico. pp 339-399.

FOLCH, J., LEES, M. 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.

FURUITA, H., TANAKA, H., YAMAMOTO, T., M. SHIRAISHI y T. TAKEUCHI. 2000. Effects of n-3 HUFA levels in broodstocks diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 187(3-4): 387-398.

FURUITA, H., YAMAMOTO, T., SHIMA, T., N. SUZUKI y T. TAKEUCHI. 2003. Effects of arachidonic acid level in broodstocks diet on larval and egg quality of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220(1-4): 725-735.

GEORGE, S.B., LAWRENCE, J.M., LAWRENCE, A.L., J. SMILEY y L. PLANK. 2001. Carotenoids in the adults diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegates*. *Aquaculture*. 199: 353-369.

HAREL, M., A. TANDLER y G.W. KISSIL. 1992. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. *Isr.J.Aquacult.Bamidged*. 44,127.

HAREL, M., TANDLER, A., 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 eggs composition and egg quality. *British Journal of Nutrition*, 72:45-58.

HARRIS, L.E. 1984. Effects of a broodfish diet fortified with canthaxanthin on female fecundity and egg color. *Aquaculture*, 43: 179-183.

HIRAYAMA, O., K. NAKAMURA., S. HAMADA y Y. KOBAYASHI. 1994. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* 29, 149-150.

IZQUIERDO, M.S., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., 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., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., T. ARAKAWA y C. KITAJIMA. 1990. Optimal EFA levels in Artemia to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). In: *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. (M. Takeda & T. Watanabe, editors). pp. 221-232. Tokyo University of Fisheries, Japan.

IZQUIERDO, M.S., FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. y A.G.J. TACON. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197, 25-42

LATSCHA, T. 1990. Carotenoids: Their Nature and Significance in Animal Feeds, Department of animal Nutrition and Health, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland.

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): 25-240.

LI, Y., W. CHEN, Z. SUN, J. CHEN y K. WU. 2005. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. *Aquaculture*, 245:263-272.

LIÑAN-CABELLO M. A., J. PANIAGUA-MICHEL y T: ZENTENO-SAVIN. 2002. Carotenoids and retinoid like regulators of stress oxidative during the gonadic maturation of *Litopenaeus vannamei*. En: *Society for free radicals research international* (Pasquier c. Ed), Monduzzi Editore, Bolonga, Italia, 607-610 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.
- MATSUFUJI, H., NAKAMURA. H., M. CHINO y M. TAKEDA. 1998. Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in páprika (*Capsicum annuum*). *J.Agric. Food Chem.*46, 3468-3472.
- 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.
- MIKULIN, A. 2000. Functional role of pigments and pigmentation in fish ontogeny.VNIRO, Moscow, p.432.
- MOURENTE, G., M.A. CARRASCOSA, C. VELASCO, J.M. ODRIOZOLA, BILLARD y N. De PAUW. 1989. Effect gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) broodstocks diets on eggs lipid composition and spawning quality. *Aquaculture Europa'89. Special Publication, European Aquaculture Society*, 10:179-180.
- 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. And Biochem.*, 8(2): 93-101.
- NAVAS, J.M., M. BRUCE, M. TRUSH, B.M. FARNDAL, 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.
- SAWANBOONCHUM, J., ROY, W., D. ROBERTSON y J. G. BELL. 2008. The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua*, L.) *aquaculture*, 283 (1-4): 97-101.

SARGENT, J.R., D.R. TOCHER y J.G., BELL 2002. The lipids. In: Halver. J.E., Hardy. R.W. (Eds.). *Fish Nutrition*, third ed. Academic Press, San Diego. pp. 182-308.

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.

SHIMIDZU N., M. GOTO y W. MIKI. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms, *Fish. Sci.*, 62, 134-137.

SOKAL, R.R. y J. ROLF. 1979. *Biometría*. Blume, Madrid.

STEEL, R.G. y J.H. TORRIE. 1986. *Bioestadística*. McGraw-Hill, Mexico City.

TANDLER, A., HAREL, M., W.M. KOVEN y S. KOLKOVSKY. 1995. Broodstock and larvae nutrition in gilthead seabream *Sparus aurata* new finding on its involment in improving growth, survival and swim bladder inflation. *Isr.J.Aquacult. Bamidgeh* 47: 95-111.

TVERANGER, B. 1986. Effect of pigment content in broodstock diet on subsequent fertilization rate, survival and growth rate of rainbow trout (*salmo gairdneri*) offspring. *Aquaculture*, 53: 85-93.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., SATOH, S., KIRON, V., IMAIZUMI, H., T. YAMAZAKI y K. KAWANO. 2001a. Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research*, 32 (suppl.1): 263-272.

VASSALLO-AGIUS, R., IMAIZUMI, H., WATANABE, T., YAMAZAKI, T., S. SATOH y V. KIRON. 2001b. The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fish. Sci.* 67, 260-270.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., IMAIZUMI, H., YAMAZAKI, T., S. SATOH y V. KIRON. 2001c. Effects of dry pellets containing astaxanthin and squid meal on the spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Fish. Sci.* 67: 667-674.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., IMAIZUMI, H. y T. YAMAZAKI. 2002. Spawning performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed dry pellets containing paprika and squid meal. *Fisheries Science*, 68, 230-232.

VERAKUNPIRIYA, V., MUSHIAKE, K., KAWANO, K. y K. WATANABE. 1997. Supplemental effect of astaxanthin in broodstock diets on the quality of yellowtail eggs. *Fish.Sci.*, 63, 816-823.

WATANABE, T. y V. KIRON. 1995. Broodstock management and nutritional approaches for quality offsprings in the Red Sea Bream. In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (Bromage, N.R. y Roberts, R.J. Eds.),. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 424 pp.

WATANABE, T. y R. VASSALLO-AGIUS. 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227, 35-61.

WATANABE, T., T. ARAKAWA, C. KITAJIMA y S. FUJITA.1984. 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., 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.

WYBAN, J., MARTÍNEZ, G.y J. SWEENEY. 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquaculture*, 28, 59-62.

ZOHAR, Y., HAREL, M., S. HASSIN y A. TANDLER. 1995. Gilt-head seabream (*Sparus aurata*). In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (Bromage, N.R. & Roberts, R.J. Eds.),. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 94-117 pp.

4.2 EXPERIMENTO II. EFECTO DEL NIVEL DE CAROTENOIDES EN DIETAS PARA REPRODUCTORES DE DORADA (*Sparus aurata* L.) SOBRE LA CALIDAD DE LAS PUESTAS

4.2.1. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los estudios sobre el efecto de los carotenoides, en animales, acuáticos están realizados con salmónidos, ciprínidos y peneidos, debido fundamentalmente al efecto que estos tienen sobre la pigmentación. Los carotenoides son compuestos que no son considerados esenciales, pero tanto en invertebrados como vertebrados, tienen diversas funciones que todavía no se conocen muy bien. La complementación de dietas con carotenoides no sólo tiene efecto sobre la pigmentación, sino que también juega un papel nutricional en animales acuáticos, particularmente en peces y crustáceos (Torrissen, 1990; Latscha, 1991). Varias funciones de los carotenoides en peces han sido sugeridas, Izquierdo *et al.* (2005) señalan algunas: precursores de vitamina A, mejoran el sistema inmune y actúan como antioxidantes (incluyendo la protección de los lípidos a la oxidación). De hecho, los requerimientos de antioxidantes dietéticos aumentan durante la reproducción (Fernández y Izquierdo, 2009) y se ha visto que su proporción en dietas para reproductores están relacionado con el nivel de ácidos grasos altamente insaturados en dichas dietas.

Diferentes autores han observado el efecto positivo de diversas fuentes de carotenoides sobre la puesta: en peces (Verakunpiriya *et al.*, 1997a,b; Vassallo-Agius *et al.*, 2001, 2002; Watanabe y Vassallo-Agius 2003; Ahmadi *et al.*, 2006), en equinodermos (Tsushima, *et al.*, 1997; George *et al.*, 2001) y en crustáceos (Liñan-Cabello *et al.*, 2004), y también en larvas de crustáceos mejorando problemas asociados a deficiencias de pigmentación (Regunathan y Wesley, 2006). Sin embargo, existe gran discrepancia en los trabajos publicados sobre la relación entre los carotenoides dietéticos y diversos parámetros de la calidad de la puesta, cuando se utiliza como fuente la astaxantina (Ahmadi *et al.*, 2006). Sin embargo, Vassallo-Agius *et al.* (2001, 2002) señalan el efecto positivo de los carotenoides cuando utilizaron esteres de pimentón en dietas para reproductores

de seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*) en la calidad de la puesta. Esto fue probablemente debido a la potente acción antioxidante de los esteres del pimentón debido a su afinidad por los radicales libres (Matsufuji *et al.*, 1998). Watanabe *et al.* (1991 a, b), señalan que, la vitamina E y los carotenoides juegan un papel determinante en la calidad de la puesta y su capacidad antioxidante ha sido demostrada, pero sus niveles óptimos en las dietas de muchas especies no han sido determinado. Incrementos de los niveles de vitamina E de 22 a 190 mg/kg en dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) redujeron significativamente el número de huevos anormales en las puestas (Fernández-Palacios *et al.*, 2005). Los niveles dietéticos de n-3 HUFA en la calidad de las puestas, en dorada, también han sido investigadas (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Sin embargo, en esta especie no hay estudios sobre el efecto de los carotenoides dietéticos en la puesta. El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de diferentes niveles de carotenoides, utilizando pimentón comercial, como fuente de los mismos, sobre la calidad de la puesta de la dorada.

4.2.2. MATERIAL Y METODOS

Reproductores

Treinta y seis reproductores de dorada (2-4 años de edad) procedentes de las instalaciones de jaulas del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), fueron distribuidos al azar, en una proporción de 2 ♂:1♀ (Fernández-Palacios *et al.*, 1990), en doce tanques circulares de fibra de vidrio de 1000 l, con una renovación diaria de cuatro veces el volumen del tanque. Las puestas fueron espontáneas y los huevos fueron colectados diariamente. La calidad de la puesta fue determinada según la metodología descrita por Fernández-Palacios *et al.* (1995). Las características biométricas de los reproductores se muestran en la Tabla XIV. La temperatura del agua de los tanques de reproductores durante la experiencia se registro en forma diaria y fue de $20,4 \pm 1,27$ °C (media±DE), mientras que la salinidad y saturación de oxígeno del agua se registraron

semanalmente, siendo los valores de salinidad de 37 ppm, y de $7,55 \pm 2,47$ ppm la saturación de oxígeno. El foto periodo fue el natural.

Tabla XIV.- Características biométricas de los reproductores y condiciones de cultivo durante el periodo experimental

Grupo experimental	P0	P1	P2	P4
<i>Machos</i>				
Peso corporal (kg)	$1,20 \pm 0,28$	$1,03 \pm 0,27$	$0,85 \pm 0,24$	$0,84 \pm 0,10$
Longitud estandar (cm)	$37,41 \pm 2,28$	$35,28 \pm 0,63$	$32,45 \pm 2,33$	$33,23 \pm 2,92$
Factor Condición	$27,98 \pm 1,43$	$28,66 \pm 1,24$	$25,93 \pm 1,68$	$25,63 \pm 1,75$
<i>Hembras</i>				
Peso corporal (kg)	$1,73 \pm 0,83$	$1,41 \pm 0,37$	$0,87 \pm 0,08$	$1,5 \pm 0,39$
Longitud estandar (cm)	$43 \pm 6,1$	$40 \pm 6,1$	$34 \pm 1,2$	$41 \pm 9,0$
Factor Condición	$21,38 \pm 1,32$	$21,87 \pm 1,22$	$22,13 \pm 1,16$	$21,76 \pm 1,37$
Densidad (kg/m ³)	$1,16 \pm 0,27$	$1,13 \pm 0,23$	$0,96 \pm 0,26$	$1,09 \pm 0,35$

*(Media \pm (DE); Factor de Condición = $[\text{Peso corporal (g)} \times 1000] / [\text{Longitud Estándar (cm)}]^3$).

Dietas

La composición y análisis proximal de las dietas experimentales se muestran en la Tabla XV. Se formularon cuatro dietas isolipídicas e isoprotéicas con harina de calamar y aceite de pescado como fuentes proteicas y de lípidos, y la inclusión de carotenoides en cantidades crecientes utilizando como fuente pimentón en polvo: sin (P0), con 1% (P1), 2% (P2) y 4% (P4). En la Tabla XVI se muestran los ácidos grasos de las dietas así como algunas relaciones entre ellos.

Tabla XV.- Composición y análisis proximal de las dietas experimentales

Ingredientes (g/100 g dieta)	Grupo experimental			
	P0	P1	P2	P4
Harina de calamar ^a	64,52	64,52	64,52	64,52
Aceite de pescado	3,45	3,45	3,45	3,45
Mezcla Vitaminas ^b	2,0	2,0	2,0	2,0
Mezcla Minerales ^b	2,0	2,0	2,0	2,0
Almidón gelatinizado ^c	23,3	23,3	23,3	23,3
Pimentón ^d	0	1,0	2,0	4,0
α – Celulosa	4,0	3,0	2,0	0
Carboximetil celulosa ^e	1,0	1,0	1,0	1,0
Composición Analítica (%peso seco)				
Proteínas (%)	51,81	51,60	51,82	50,59
Lípidos (%)	15,16	16,08	15,77	14,46
Cenizas (%)	4,26	4,23	4,19	4,38
Humedad (%)	10,64	11,21	11,21	9,57
Carbohidratos ¹	28,77	28,09	28,22	30,57
n-3 HUFA (% peso seco)	1,82	1,04	1,17	1,07
Total carotenoides (µg/g muestra)	1,06	4,73	7,73	14,97
Total carotenoides / n-3 HUFA	0,58	4,54	6,60	13,99

^a Rieber y Son Ltd., Bergen, Noruega

^b Fernández-Palacios *et al.* (1998).

^c Merigel 100 Amylum Group

^d Pimentón “Titán” José Martínez y Cía. S.A. (Murcia, España)

^e Carboximetil celulosa CMC (Sal de sodio, Sigma C-5678)

¹ Calculados como $100 - (\% \text{Proteína} + \% \text{Lípidos} + \% \text{Ceniza}) \%$

Tabla XVI.- Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales (% Total de ácidos grasos)

ACIDOS GRASOS	Grupo experimental			
	P0	P1	P2	P4
14:0	6,32	6,50	7,11	5,74
15:0	0,64	0,78	0,79	0,61
16:0	30,69	40,34	39,25	30,88
16:1 n-7	5,59	4,29	4,26	5,35
16:1n-5	0,25	0,26	0,23	0,00
17:0	0,44	0,51	0,65	0,42
16:4n-1	0,06	0,02	0,09	0,04
18:0	4,33	5,00	4,48	4,56
18:1 n-9	9,79	9,14	9,74	10,52
18:1 n-7	2,59	2,82	2,94	2,69
18:1 n-5	0,57	0,45	0,51	0,44
18:2 n-6	1,98	2,56	4,07	6,74
18:2n-4	0,08	0,06	0,07	0,07
18: 3n-6	0,14	0,12	0,11	0,13
18:3n-4	0,09	0,06	0,06	0,08
18:3 n-3	0,50	0,30	0,36	0,49
18:3n-1	0,00	0,00	0,00	0,00
18:4 n-3	0,61	0,28	0,32	0,38
18:4 n-1	0,02	0,02	0,04	0,02
20:1 n-9	10,55	8,57	9,37	10,11
20: 1n-7	0,14	0,27	0,26	0,17
20: 1n-5	0,06	0,05	0,05	0,00
20:2 n-6	0,34	0,27	0,27	0,28
20:3 n-9	0,02	0,00	0,00	0,01
20:3 n-6	0,03	0,02	0,02	0,02
20:4 n-6	0,62	0,36	0,41	0,43
20: 3n-3	0,41	0,27	0,28	0,30
20:4 n-3	0,19	0,11	0,12	0,13
20:5 n-3	4,15	2,21	2,53	2,58
22:1 n-11	8,53	6,97	7,65	8,94
22:1 n-9	0,92	0,00	0,48	0,68
22: 1 n-7	0,00	0,07	0,00	0,00
22:4 n-6	0,13	0,51	0,08	0,08
22:5 n-6	0,03	0,07	0,01	0,02
22:5 n-3	0,24	0,11	0,16	0,14
22:6 n-3	7,05	3,81	4,34	4,29
Saturados	42,75	54,30	53,51	43,09
Monoenoicos	39,27	33,01	31,57	39,18
Poli	17,98	11,97	14,92	17,72
n 3	13,65	7,66	8,62	8,74
n 6	3,30	3,49	5,00	7,98
n 9	26,86	18,29	19,61	26,73
n-3 HUFA	12,06	6,50	7,44	7,44
AA / EPA	0,03	0,03	0,03	0,03
EPA / DHA	0,59	0,58	0,58	0,60
oleico / DHA	1,39	2,40	2,24	2,45
oleico / n-3HUFA	0,81	1,41	1,31	1,41
n-3 / n-6	4,13	2,19	1,72	1,09

Análisis bioquímicos

Las muestras por triplicado de dietas y huevos fueron analizadas de acuerdo con el siguiente procedimiento: humedad, proteína y cenizas fueron llevadas a cabo siguiendo los protocolos de AOAC, (1995). Los lípidos totales fueron extraídos por el método descrito por Folch *et al.* (1957). Los ácidos grasos de las dietas y huevos fueron obtenidos por transmetilación descrita por Christie (1982). Los FAME fueron separados, identificados y cuantificados por cromatografía gas-líquido bajo condiciones descrita por Izquierdo *et al.* (1990).

La extracción de carotenoides de las dietas y huevos fueron realizadas siguiendo el método de Barua *et al.* (1993). Para su cuantificación se utilizó un espectrofotómetro UV/V, la absorbancia λ -max y el coeficiente de extinción (E1%.1cm) de 2500 según la fórmula descrita por Britton (1995).

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se han expresado como media \pm desviación estándar de la media. Los datos se compararon estadísticamente utilizando el análisis de varianza ANOVA (Sokal y Rohlf, 1979). Detectadas las diferencias significativas a través del ANOVA, las diferencias entre medias fueron comparadas mediante el test de Duncan, como criterio general se tomó un 5 % de nivel de significación.

Cuando las varianzas eran heterogéneas y/o los datos no presentaban una distribución normal 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 persistía en los datos, se empleaba el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1979). Detectadas diferencias estadísticamente significativas con el test Kruskal-Wallis, se utilizaba el procedimiento gráfico de caja y bigotes con muescas para determinar las diferencias entre los replicados. Los datos se analizaron con el

programa estadístico STATGRAPHICS (Versión 3.1 Plus para Windows; Graphic Software Systems, Inc.USA).

4.2.3. RESULTADOS

Parámetros biológicos de las puestas

Las dietas experimentales fueron aceptadas satisfactoriamente y no se observó ninguna mortalidad durante el periodo experimental. En todos los tanques se obtuvieron puestas. Durante las cuatro primeras semanas del experimento se suministro, a los grupos experimentales, una dieta comercial (Proaqua, Palencia, España), no se observaron diferencias significativas en los parámetros de calidad de las puestas durante este periodo de alimentación común. Finalizado dicho periodo se continuaron alimentando todos los días de la semana pero con las dietas experimentales al 1,5 % de la biomasa de cada tanque repartidos en tres tomas diarias (9:00, 11:00 y 15:00 h). Se compararon los datos de parámetros de calidad entre los replicados de una misma dieta y se encontró que no había diferencias significativas entre ellos.

Al analizar los índices de calidad de las puestas (Tabla XVII) se observa que los mejores resultados en cuanto a porcentaje de huevos vivos, de huevos no fecundados y eclosión corresponden a las puestas de los reproductores alimentados con la dieta P2 que se diferencian estadísticamente ($P < 0,05$) con los índices de las puestas de los reproductores alimentados con la dieta P4, también existen diferencias estadísticamente significativas, en el porcentaje de huevos no fecundados, con las puestas de los reproductores alimentados con la dieta P1.

En el porcentaje de huevos vivos y de eclosión también las puestas de los reproductores alimentados con la dieta P2 se diferencian significativamente de los reproductores alimentados con la dieta P0. No se observaron huevos ni larvas morfológicamente anormales.

Tabla XVII.- Índices de calidad de las puestas

Índices de las puestas (%)	Grupo experimental			
	P 0	P1	P 2	P4
	n = 53	n = 52	n = 59	n = 63
Huevos vivos	84,20 ± 16,00 ^b	89,28 ± 13,83 ^{ab}	92,49 ± 10,73 ^a	72,26 ± 20,26 ^c
Huevos muertos	14,54 ± 16,40 ^b	8,01 ± 13,58 ^a	7,03 ± 10,88 ^a	21,86 ± 20,70 ^b
Huevos no fecundados	0,96 ± 1,84 ^a	2,71 ± 4,85 ^b	0,20 ± 0,64 ^a	5,8 ± 13,73 ^b
Eclósión	80,75 ± 19,37 ^b	89,72 ± 19,59 ^a	91,27 ± 11,13 ^a	73,63 ± 22,08 ^b
Larvas saco vitelino reabsorbido	73,85 ± 19,41 ^a	77,35 ± 13,14 ^a	76,12 ± 16,37 ^a	68,7 ± 22,25 ^a

*Valores en la misma columna sin o con igual superíndice no tienen diferencias significativas.

No se observaron diferencias significativas en cuanto al diámetro del huevo, de la gota lipídica o de la talla de la larva con el saco vitelino reabsorbido (Tabla XVIII).

Tabla XVIII.- Medidas de huevos y larvas

Medidas (mm)	Grupo experimental			
	P0	P1	P 2	P 4
Diámetro huevo	0,987±0,016	0,986±0,018	0,987±0,017	0,985±0,019
Diámetro gota lipídica	0,234 ± 0,007	0,235 ± 0,006	0,237 ± 0,006	0,234 ± 0,007
Longitud larvas saco vitelino reabsorbido	3,549 ± 0,20	3,529 ± 0,26	3,55 ± 0,18	3,546 ± 0,16

*Valores en la misma columna sin o con igual superíndice no tienen diferencias significativas.

Respecto a la composición de las dietas y su relación con los índices de las puestas se han encontrado relaciones polinomiales entre el porcentaje de huevos muertos (Fig.13) y el porcentaje de eclósión (Fig.14) con la cantidad de carotenoides totales. Entre la relación carotenoides totales / n-3 HUFA de las dietas y el porcentaje de huevos muertos (Fig. 15), y el porcentaje de eclósión (Fig.16). Por otro lado, se encontraron correlaciones negativas entre el porcentaje de supervivencia larvaria y el contenido de ácido oleico de las dietas (Fig. 17).

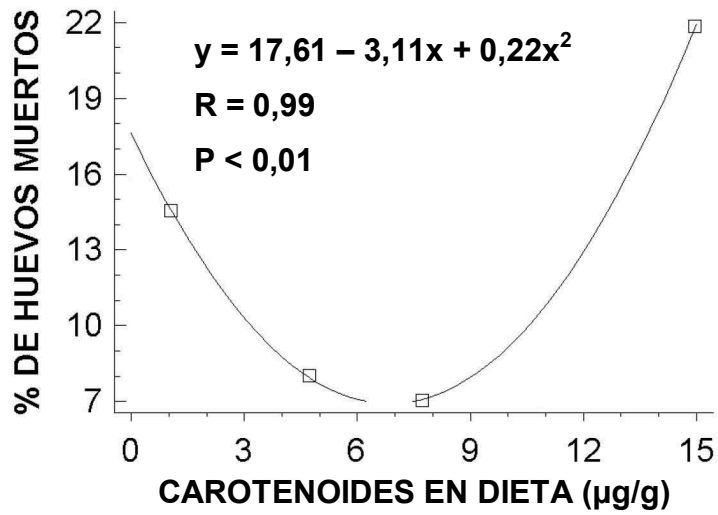


Fig. 13.- Relación entre el nivel dietético de carotenoides y el porcentaje de huevos muertos.

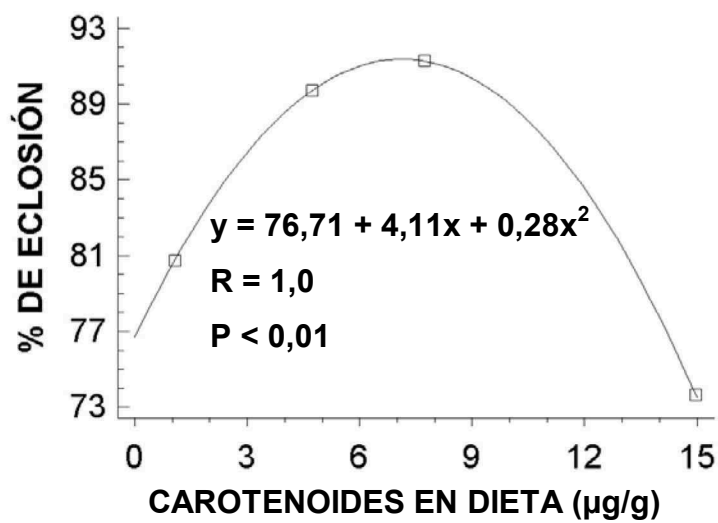
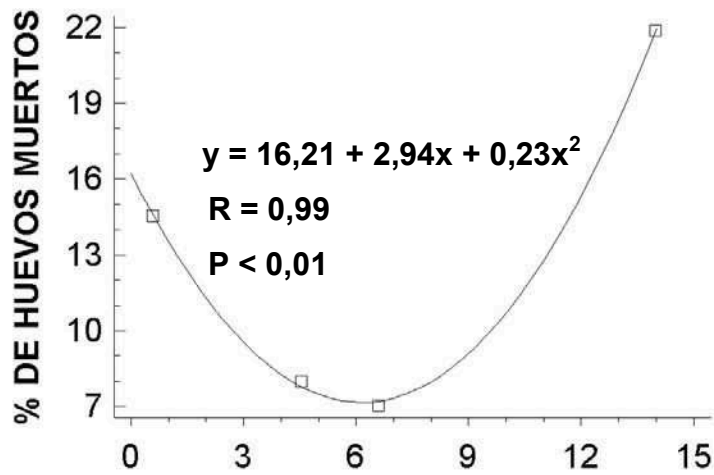


Fig. 14.- Relación entre el nivel dietético de carotenoides y el porcentaje eclosión.



CAROTENOIDES/n-3 HUFA EN LAS DIETAS

Fig. 15.- Correspondencia entre la relación carotenoides totales/n-3 HUFA, en las dietas, y el porcentaje de huevos muertos.

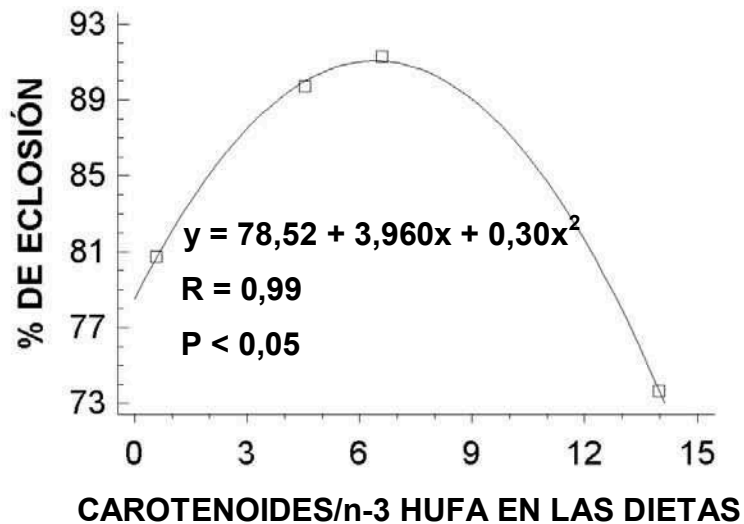


Fig.16.- Correspondencia entre la relación carotenoides totales/n-3 HUFA, en las dietas, y el porcentaje de eclosión.

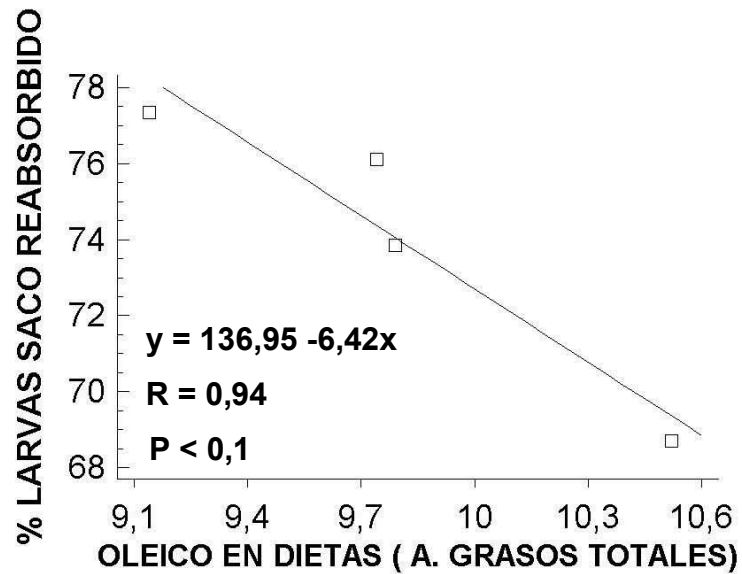
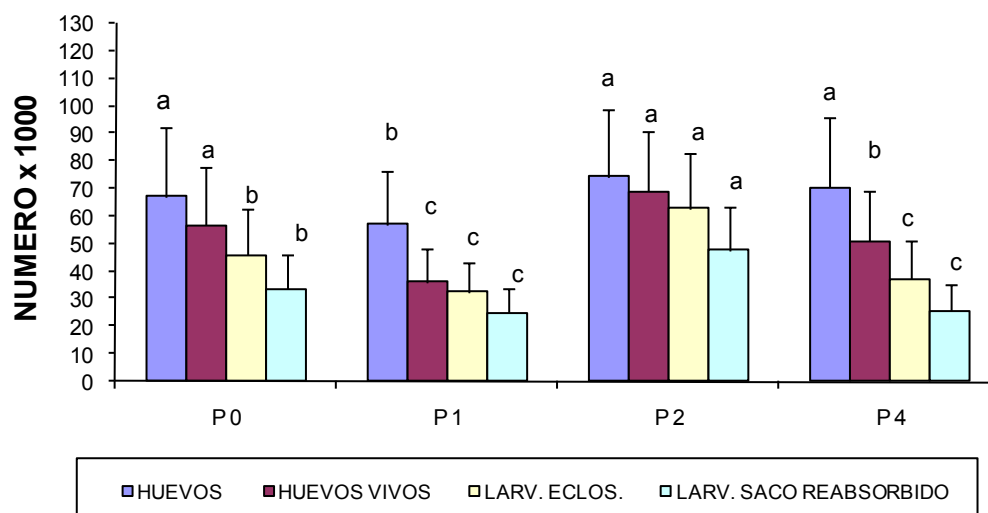


Fig. 17.- Relación entre el nivel dietético de ácido oleico y el porcentaje de supervivencia larvaria.

Las producciones relativas (por kg de hembra y por puesta): número de huevos, de huevos vivos, de larvas eclosionadas y de larvas con saco vitelino reabsorbido se indican en la Fig.18, observándose que la producción de los reproductores alimentados con la dieta P2 es la más elevada mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$) en todos los parámetros calculados con las producciones de los reproductores alimentados con la dieta P1. En el número de huevos vivos se diferencia significativamente de los reproductores alimentados con la dieta P4. En el número de larvas eclosionadas y de larvas con el saco vitelino reabsorbido con los reproductores alimentados con las dietas P0 y P4.



Barras del mismo color, sin o con misma letra no presentan diferencias significativas. Barras, del mismo color con diferentes letras presentan diferencias significativas (P < 0,05)

Fig. 18.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada alimentados con las diferentes dietas durante el periodo experimental.

Composición bioquímica de los huevos

En la Tabla XIX se muestra la composición, de los huevos de dorada producidos por los reproductores alimentados con las diferentes dietas experimentales.

Tabla XIX.- Composición de los huevos de los reproductores alimentados con las diferentes dietas (media ± desviación estándar)

Composición analítica	Grupo experimental			
	P0	P1	P2	P4
Lípidos % p,s,	21,11 ± 3,36 ^b	24,82 ± 4,41 ^a	24,08 ± 3,92 ^a	24,72 ± 3,89 ^a
Proteínas % p,s,	58,64 ± 13,73	58,89 ± 18,0	61,47 ± 12,99	66,8 ± 14,28
Cenizas (g)	0,52 ± 0,10	0,43 ± 0,15	0,46 ± 0,10	0,45 ± 0,11
Humedad %	89,36 ± 0,27	88,79 ± 0,61	89 ± 0,51	90,43 ± 0,64
Carotenoides (µg/g)	10,52 ± 2,98 ^b	16,12 ± 2,06 ^a	15,17 ± 8,28 ^{ab}	18,19 ± 5,73 ^a

*Filas de una misma columna con o sin superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0,05)

Al analizar los resultados obtenidos se observa que el contenido en lípidos totales es significativamente mayor en los huevos procedentes de los reproductores alimentados con inclusión de carotenoides en las dietas (P1, P2 y P4), que en los huevos de los reproductores alimentados con la dieta sin inclusión de carotenoides (P0). El contenido de proteínas en los huevos es más alto en aquellas dietas con niveles más altos de carotenoides. Los huevos procedentes de los reproductores alimentados con la dieta P0 presentan niveles de cenizas ligeramente más altos que los precedentes de los reproductores alimentados con las otras dietas. También el contenido en carotenoides es más elevado en los huevos de los reproductores alimentados con las dietas complementadas con carotenoides diferenciándose significativamente ($P < 0,05$) los de las dietas P4 y P1 con las de la dieta P0. Los de la dieta P2 no se diferencian significativamente de los de las dietas P0, P1 y P4. Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre el contenido en carotenoides de las dietas y de los huevos (Fig. 19).

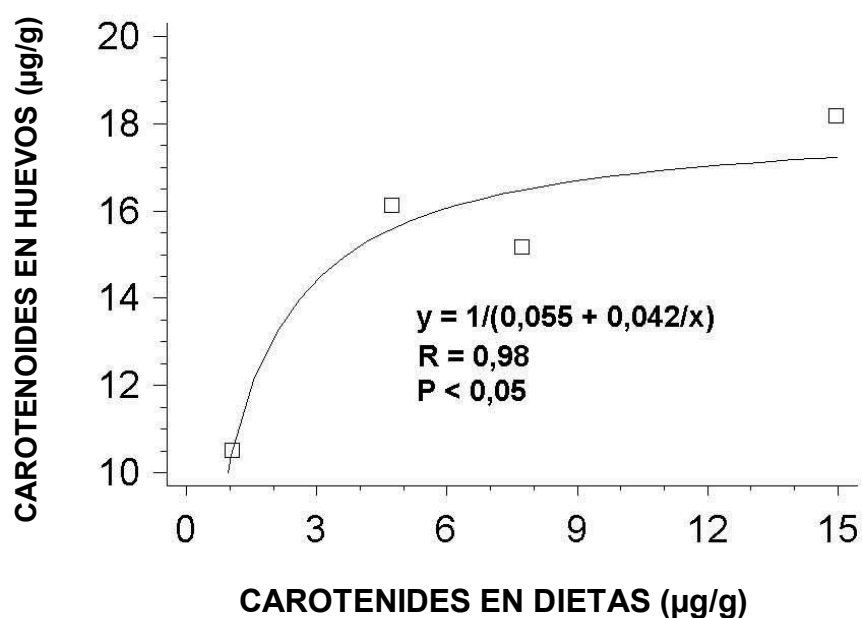


Fig. 19.- Relación entre el nivel dietético de carotenoides y su contenido en los huevos.

Los ácidos grasos presentes en mayor proporción en los lípidos de los huevos (Tabla XX) fueron: ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1n-9), ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA). Seguidos en importancia por los ácidos: palmitoléico (16:1n-7), esteárico (18:0) y eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA) (Tabla XX). Los huevos procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con las dietas con inclusión de carotenoides (P1, P2 y P4) se caracterizaron por tener niveles más altos de DHA, palmítico, y de EPA que los huevos procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con la dieta sin inclusión de carotenoides (dieta P0). Por otro lado, los ácidos grasos: oleico, EPA, DHA n-3, n-6 y n-3 HUFA contenidos en los huevos presentan niveles mucho más altos que los calculados para las dietas.

Tabla XX.- Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos

A. GRASOS	Grupo experimental			
	P 0	P 1	P 2	P 4
14:0	6,67 ± 1,52 ^a	7,14 ± 3,34 ^a	5,3 ± 1,34 ^a	6,15 ± 1,82 ^a
15:0	0,55 ± 0,03	0,89 ± 0,06	0,05 ± 0,001	0,3 ± 0,06
16:0	42,77 ± 8,48 ^a	32,63 ± 3,14 ^{ab}	30,64 ± 3,88 ^b	35,97 ± 10,03 ^{ab}
16:1n-7	8,64 ± 1,57	5,5 ± 1,79	4,77 ± 2,29	6,55 ± 1,77
16:1n-5	0,24 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,21 ± 0,05	0,18 ± 0,03
17:0	0,89 ± 0,05	0,69 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,57 ± 0,01
16:4n-1	0,09 ± 0,001	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,006	0
18:0	7,99 ± 2,50 ^{ab}	8,72 ± 2,51 ^a	4,46 ± 1,03 ^c	5,87 ± 1,86 ^{bc}
18:1n-9	15,9 ± 1,87 ^b	22,35 ± 5,64 ^a	16,07 ± 3,66 ^b	17,25 ± 2,88 ^b
18:1n-7	4,16 ± 1,49 ^a	4,99 ± 1,57 ^a	2,66 ± 0,08 ^b	3,36 ± 0,72 ^{ab}
18:1n-5	0,46 ± 0,08	0,44 ± 0,07	0,41 ± 0,02	0,37 ± 0,06
18:2n-9	0,08 ± 0,00	0,15 ± 0,005	0,04 ± 0,0	0,08 ± 0,0
18:2n-6	4,25 ± 1,59 ^{ab}	4,82 ± 0,94 ^b	5,85 ± 1,96 ^{ab}	8,81 ± 3,39 ^a
18:2n-4	0,04 ± 0,0	0,11 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,0
18:3n-6	0,17 ± 0,03	0	0,08 ± 0,0	0
18:3n-3	0,62 ± 0,10	0	0	0
18:4n-3	0,47 ± 0,03	0,82 ± 0,40	0,54 ± 0,15	0,52 ± 0,12
18:4n-1	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,0	0,08 ± 0,0	0,06 ± 0,0
20:0	0,05 ± 0,0	0	0	0
20:1n-9	3,32 ± 0,20	2,84 ± 0,30	3,07 ± 0,15	2,27 ± 0,84
20:1n-7	0,28 ± 0,05	0,2 ± 0,07	0,37 ± 0,04	0,04 ± 0,0
20:2n-6	0,25 ± 0,04	0,38 ± 0,02	0,18 ± 0,05	0,19 ± 0,04
20:3n-3	0,31 ± 0,06	0,34 ± 0,06	0,27 ± 0,08	0,23 ± 0,10
20:4n-3	0,64 ± 0,03	0,46 ± 0,08	0,51 ± 0,06	0,24 ± 0,02
20:5n-3	6,05 ± 0,95	8,7 ± 2,09	9,89 ± 2,31	8,88 ± 1,98
22:1n-11	0,46 ± 0,08	0,14 ± 0,02	0,25 ± 0,06	0,15 ± 0,01
22:1n-9	0,07 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,01 ± 0,0
22:4n-6	0,23 ± 0,05	0,2 ± 0,06	0,22 ± 0,06	0,21 ± 0,03
22:5n-6	0,02 ± 0,0	0	0	0
22:5n-3	0,29 ± 0,04	0	0,49 ± 0,18	0,13 ± 0,08
22:6n-3	14,48 ± 7,37 ^b	25,4 ± 1,65 ^a	19,79 ± 3,91 ^{ab}	25,02 ± 2,81 ^a
Saturados	23,17 ± 3,66 ^b	34,36 ± 8,16 ^a	31,47 ± 12,86 ^a	45,03 ± 12,96 ^a
Mono	33,37 ± 9,96	37,85 ± 8,97	28,5 ± 8,62	24,2 ± 9,51
n3	21,5 ± 2,84	30,55 ± 5,72	30,69 ± 7,3	25,38 ± 9,47
n6	5,07 ± 1,72 ^b	5,92 ± 0,21 ^b	7,82 ± 3,52 ^{ab}	9,52 ± 3,63 ^a
n9	21,1 ± 3,75	24,4 ± 4,61	17,66 ± 3,48	17,15 ± 3,69
DHA/EPA	1,69 ± 0,09 ^a	1,61 ± 0,86 ^a	2,11 ± 1,03 ^a	1,72 ± 1,15 ^a
EPA/DHA	0,59±0,03	0,72±0,39	0,45 ± 0,17	0,39 ± 0,06
n3/n6	4,42 ± 1,56	3,41 ± 2,34	4,67 ± 1,89	2,81 ± 1,29
AA/DHA	0	0	0	0
n-3 HUFA	19,24 ± 3,79	27,63 ± 8,51	29,44 ± 7,58	24,59 ± 9,46

*Filas de una misma columna sin o con superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0,05)

Por el contrario el contenido en ácidos eicosanoico (20:1n-9), saturados y monoénicos en los huevos presentan niveles mucho más bajos que los contenidos en las dietas (Fig.20). Por otro lado, el ácido araquidónico (20:4n-6) no fue detectado en los huevos de ninguno de los tratamientos.

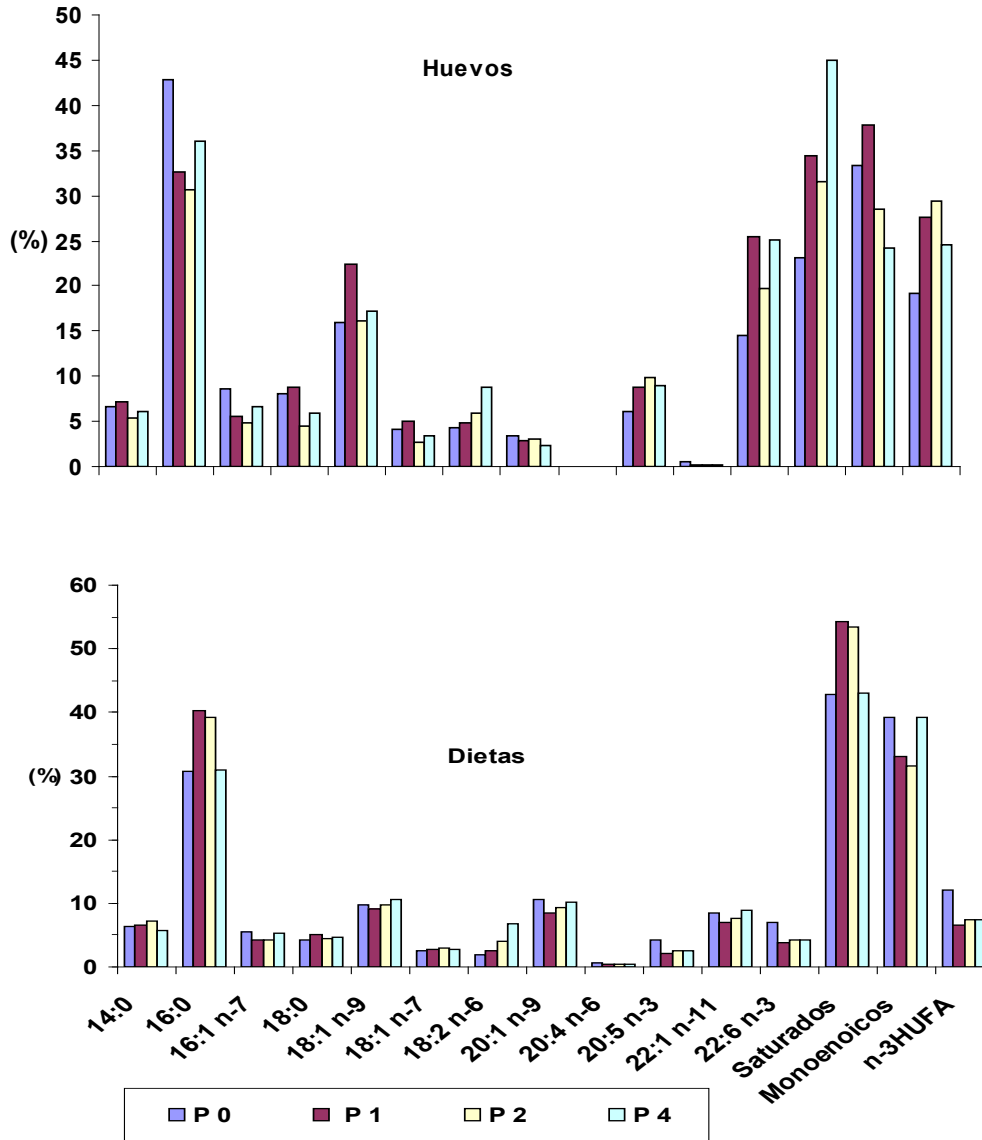


Fig. 20.- Ácidos grasos y clases de ácidos grasos más abundantes en los huevos y en las dietas.

4.2.4 DISCUSIÓN

La importancia de las dietas para reproductores y su efecto sobre aspectos reproductivos, en varias especies de peces, está bien documentada (Bromage, 1998). Se ha visto que la inclusión de carotenoides en dietas para peces juega un papel importante en la reproducción. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) un alto contenido de carotenoides en los huevos aumenta la tasa de fertilización y disminuye la mortalidad de las larvas durante el desarrollo embrionario y postlarvario (Tveranger, 1986; Dabrowski *et al.*, 1987). Así, Ahmadi *et al.* (2006) encontraron un efecto positivo sobre la reproducción en la trucha arco iris, suministrando distintos niveles de astaxantina en la dieta. Otros autores han encontrado una relación entre el grado de coloración de los huevos y la mortalidad durante el desarrollo embrionario (Mikulín y Soin, 1975; Craik, 1985).

Los resultados de este trabajo sugieren que la calidad de la puesta de la dorada (*Sparus aurata*) puede mejorarse con la inclusión de entre un 1 y un 2 % de carotenoides, provenientes de pimentón comercial, en la dieta de los reproductores. Observándose un mayor porcentaje de huevos vivos, de eclosión y de larvas con el saco vitelino reabsorbido en las dietas P1 y P2. En el pargo japonés (*Pagrus major*) la inclusión de astaxantina pura mejoró los porcentajes de huevos flotantes, de eclosión y de larvas normales (Watanabe y Kiron, 1995). En la seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*), la inclusión de astaxantina (30mg/kg) fue el factor determinante para la buena calidad de los huevos obtenidos (Verakunpiriya *et al.*, 1997b). Resultados similares fueron señalados por (Vassallo-Agius *et al.*, 2001, 2002; Watanabe y Vassallo-Agius, 2003) cuando complementaron con esteres de paprika las dietas para reproductores de seriola coreana. Ademas, confirmaron que las xantofilas: capsantina y capsoburina, tienen un mayor poder antioxidante que la astaxantina.

En cuanto a las medidas de huevos y larvas no se encontraron diferencias significativas entre las puestas de los reproductores alimentados con las dietas conteniendo diferentes niveles de carotenoides. Emata *et al.* (2000) señalan que el diámetro de los huevos no aparece relacionado con la dieta en puestas del chano (*Chanos chanos*) alimentados con dietas complementadas con otros antioxidantes como las vitaminas C y E. Por el contrario, Fernández-Palacios *et al.* (2005) si encuentran diferencias significativas en las medidas de huevos y larvas de reproductores de dorada alimentados con diferentes niveles vitamina E.

Se observó que tanto niveles inferiores como superiores de inclusión de carotenoides en las dietas (P0 y P4) afectaron negativamente algunos índices de las puestas, encontrándose correlaciones polinomiales estadísticamente significativas con el porcentaje de huevos muertos y el de eclosión. Verakumpiriya *et al.* (1997b), señalan resultados similares en puestas de seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*). Así, reproductores de esta especie alimentados con dietas complementadas con 0, 20,30 y 40 mg de astaxantina (por kg de dieta), tuvieron puestas en las que el porcentaje de huevos vivos y de eclosión fueron mejores cuando los reproductores se alimentaron con las dietas que contenían 20 y 30 mg de astaxantina. Verakumpiriya *et al.* (1997a) indican que un exceso (20%) de harina de krill causo mermas en la calidad de la puesta de seriola coreana. Sin embargo, Watanabe *et al.* (1991a) indican una mejoría en el porcentaje de huevos vivos y de eclosión, con respecto a una dieta control, cuando reproductores de pargo japonés (*Pagrus major*) son alimentados con krill (*Euphasia superba*) congelado. Es posible que el pargo japonés tenga un mecanismo por el cual puede utilizar o convertir grandes cantidades de astaxantina diesterificada proveniente del krill.

Por otro lado, Miki (1991) encontró que la forma de astaxantina diesterificada no tiene tanta capacidad de eliminación de radicales libres como posee la forma no esterificada. La astaxantina puede actuar como una hormona de la fecundación, aumentando la tasa de fertilización mediante la estimulación y atracción de los espermatozoides como fue observado en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Hartmann *et al.*, 1947). Según Mikulin y Soin (1975), la astaxantina puede mejorar

la calidad de los huevos a través de su papel en los procesos metabólicos durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, no encontraron diferencias en las tasas de fertilización en reproductores de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentado con diferentes niveles de cantaxantina y astaxantina antes de la puesta (Quantz, 1980; Christiansen y Torrissen 1997; Choubert *et al.*, 1998). Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas, en las tasas de fertilización, en los huevos de trucha arco iris alimentadas con un 10% de krill como fuente de astaxantina, y el grupo control sin astaxantina (Tveranger, 1986)

En este experimento se obtuvieron correlaciones entre la relación carotenoides totales y n – 3 HUFA de las dietas y el porcentaje de huevos muertos y de eclosión. Fernández-Palacios *et al.* (2005) indican correlaciones entre la relación vitamina E y n – 3 HUFA en dietas para dorada (*Sparus aurata*) con varios indicadores de la calidad de la puesta: positiva con el porcentaje de huevos vivos, y negativas con el porcentaje de huevos no fecundados, de huevos anormales y de larvas anormales. Así mismo, se obtuvieron correlaciones entre el ácido oleico dietético con el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido. Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentran una correlación entre el ácido oleico de las dietas para reproductores de dorada con otro índice de la calidad de las puestas como es el porcentaje de huevos no fecundado. 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 no sólo de n-3 HUFA en los fosfolípidos de la membrana de los huevos si no también del balance entre los HUFA y otros ácidos grasos tales como el oleico y el linolénico para obtener altas calidades de puesta

Las producciones relativas (por kg de hembra y por puesta): número de huevos, de huevos vivos, de larvas eclosionadas y de larvas con saco vitelino reabsorbido más elevadas correspondieron a los reproductores alimentados con la dieta P2 que contenía un 2% de carotenoides. Deufel (1970) indica que la

inclusión de carotenoides en dietas para peces juega un papel importante en la reproducción afectando entre otros parámetros a la fecundidad.

Verankumpiriya *et al.* (1997b) indican que las mayores producciones en cuanto a larvas obtenidas por kg de hembra en seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*), corresponden a los reproductores alimentados con 30 mg de astaxantina por kg de dieta. En jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), a pesar de que sus huevos no contienen carotenoides, la inclusión de astaxantina en la dieta a razón de 10 mg/kg, incrementó la fecundidad (Vassallo-Agius *et al.*, 2001). Roy *et al.* (2007) señalan un incremento del 20 % en el número de huevos por puesta en reproductores de bacalao (*Gadus morhua*) cuando son alimentados con una dieta con inclusión de astaxantina (1,2 g/kg) en comparación con un grupo control alimentado con una dieta sin complementar. En estudios recientes Sawanboonchun *et al.* (2008) encontraron mejorías en las producciones relativas cuando suplementaron con astaxantina las dietas de reproductores de bacalao (*Gadus morhua*). Los reproductores fueron alimentados con una dieta control sin adición de astaxantina, y una dieta complementada con astaxantina (73,7 mg/kg de peso seco) durante 2 meses antes del desove. Los resultados indican que la absorción de astaxantina en los huevos de reproductores de la dieta fue muy eficiente. La dieta con astaxantina incrementó la producción de huevos totales y de huevos vivos, por kg de hembra, con respecto a la dieta control.

Diferencias en concentración de pigmentos carotenoides han sido previamente señalados entre reproductores silvestres y de acuicultura. Estas diferencias nutricionales se correlacionaron con las diferencias en la calidad de los huevos, lo que sugiere que niveles sub-óptimos de pigmentos carotenoides pueden causar algunos problemas de la calidad de los huevos en el bacalao (Salze *et al.*, 2005). Estos autores encontraron que las concentraciones de carotenoides en huevos provenientes de acuicultura fueron inferiores que en los huevos de bacalao silvestres. Por lo tanto, las mejoras observadas en la calidad de los huevos y larvas de bacalao, cuando la dieta se complementa con astaxantina, podría explicarse por una mejor protección antioxidante en la dieta, en los huevos y larvas, al igual que

ocurre en salmonidos, Cowey *et al.* (1985) y peneidos, Pangantihon-Kuhlmann *et al.* (1998).

En cuanto al contenido en lípidos totales de los huevos de las distintas dietas, los resultados son comparables a los obtenidos por Fernández-Palacios *et al.* (1995, 2005), Domarco (2001), Almansa *et al.* (1999), Mourente y Odrizola (1990) y Scabini *et al.* (en revisión).

La complementación con carotenoides dietéticos incrementó la concentración de carotenoides en los huevos. Concentraciones de astaxantina y cantaxantina en los huevos incrementaron las tasas de fertilización en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Deufel, 1965; Craik, 1985). En el presente estudio se encontró una correlación entre el contenido dietético de carotenoides y su nivel en los huevos. Ahmadi *et al.* (2006) señalan una correlación entre la astaxantina dietética y su nivel en los huevos en puestas de reproductores de trucha arco iris alimentados con diferentes niveles de astaxantina. En este mismo sentido Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentra una correlación entre el contenido dietético de otro antioxidante, como la Vitamina E, y su nivel en los huevos de puestas de reproductores de dorada (*Sparus aurata*) alimentados con diferentes niveles de Vitamina E.

Los ácidos grasos más abundantes en los huevos son los mismos para todas las dietas, coincidiendo con los resultados de Mourente y Odrizola (1990), Fernández-Palacios *et al.* (1995, 2005), Domarco (2001), Scabini *et al.* (en revisión) para esta especie. Y también con los señalados para otras especies de peces marinos como pargo japonés, *Pagrus major* (Izquierdo *et al.*, 1989) el halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (Falk-Petersen *et al.*, 1989), la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Bruce *et al.*, 1999), el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Lavens *et al.*, 1999), el trompetero australiano, *Latris lineada* (Morehead *et al.*, 2001), el sargo, *Diplodus sargus* (Cejas *et al.*, 2003), el lenguado del pacífico, *Paralichthys olivaceus* (Furuita *et al.*, 2003) y el crescent sweetlips, *Plectorhynchus cinctus* (Li *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se observó que el alto contenido de n - 3 HUFA en los huevos fue en su mayor parte debido a la contribución del EPA y DHA, siendo sus niveles mucho más altos que en las dietas, sugiriendo que existe una retención selectiva de DHA en el huevo durante la embriogénesis (Izquierdo, 1996). Resultados similares fueron señalados por Fernández-Palacios *et al.* (1995) y Domarco (2001). Li *et al.* (2005) trabajando con reproductores de crescent sweetlips (*Plectorhynchus cinctus*) señalan que este alto nivel de n-3 HUFA en las larvas fue debido en su mayor parte a la contribución de DHA, denotando la importancia de este ácido graso para el normal desarrollo de embriones y larvas.

4.2.5 BIBLIOGRAFIA

AHMADI, M., BAZYAR, A., SAFI, S., YTRESTØYL, T. y B. BJERKENG. 2006. Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyol.* 22: 388-394.

ALMANSA, E., PEREZ, M., CEJAS, J., BADIA, P., J. 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.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.

BARUA, A.B., KOSTIC, D. y J.A. OLSON. 1993. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols, and carotenoids in human serum. *J. Chromatogr.*, 617, 257-264.

BRITTON, G. 1995. UV/Visible spectroscopy. In Carotenoids: Spectroscopy (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds). Vol. 1B. Birkäusen, Basel. 1998.

BROMAGE, N. 1998. Broodstock management and the optimization of seed supplies. *Suisanzoshoku*, 46:395-401.

BRUCE, M., F. OYEN, J.G. BELL, J.F. ASTURIANO, M. CARRILLO, S. ZANUY, J. RAMOS y N. BROMAGE. 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of $n - 3$ and $n - 6$ highly unsaturated fatty acids to reproductive performance. *Aquaculture*. 177: 85–97.

CEJAS, J.R., ALMANSA, E., VILLAMANDOS, J.E., BADIA, P., 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.

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.

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. 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonids fishes. *Aquaculture* (47):61-88.

DABROWSKI, K., LUCZYNSKI, M., CZECZUGA, B. y S. FALKOWSKI. 1987. Relationships among corregonid fresh reproductive effort, carotenoid content in eggs and survival of embryos. *Arch. Hydrobiol.*, (Suppl.)79:29-48.

DEUFEL, J., 1965 Pigmentierungsversuche mit Cantaxanthin bei Regenbogenforellen. *Arch. Fischereiwiss.*, 16: 125 – 132.

DEUFEL, J. 1970. Probleme der Forrellenfütterung. Informationsdienst F.Hoffman-LaRoche 1265. Switzerland.

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.

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.

FALK-PETERSEN, S., SARGENT J.R., FOX, C., FALK-PETERSEN, L.B., T. HAUG Y E. KJØRSVIK.1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar. Biol.*, 101: 553-556.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., HERNÁNDEZ, C.M., FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.E., VERGARA, J.M. y L. ROBAINA. 1990. Influencia de distintas proporciones hembra:macho en la puesta de dorada (*Sparus aurata* L.) *Actas II Congreso Nacional de Acuicultura*. CSIC, Cádiz, Spain, pp. 27-31.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VALENCIA A., SALHI M. y J.M. VERGARA. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132, 325-337.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., GONZÁLEZ, M., ROBAINA, L. y A. VALENCIA. 1998. Combined effect of dietary α -tocoferol and n-3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 161, 475-476.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S. y L. ROBAINA. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. *Informes Técnicos del Instituto Canario de Ciencias Marinas*, Nº 12, 200 pp.

FERNÁNDEZ-PALACIOS H. y M.S. IZQUIERDO. 2009. Efectos de la dieta de los reproductores sobre la puesta. En: La reproducción de los peces: aspectos básicos y su aplicación en acuicultura. *Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura*. M. Carrillo, coordinador. J. Espinosa de los Monteros, editor científico. pp 339-399.

FOLCH, J., LEES, M. 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.

FURUITA, H., YAMAMOTO, T., SHIMA, T., N. SUZUKI y T. TAKEUCHI. 2003. Effects of arachidonic acid level in broodstocks diet on larval and egg quality of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220(1-4): 725-735.

GEORGE, S., LAWRENCE, J., LAWRENCE, A., SMILEY, J. y L. PLANK. 2001. Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegates*. *Aquaculture* 199: 353-369.

HARTMANN, M., F. MEDEM, R. KUHN y H.J BIELIG. 1947. Untersuchungen über die Befruchtungsstoffe der Regenbogenforelle. *Z. Naturforsch- 2b*, 330-349.

IZQUIERDO, M.S., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., T. ARAKAWA y C. KITAJIMA. 1990. Optimal EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). In: *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. (M. Takeda & T. Watanabe, editors). pp. 221-232. Tokyo University of Fisheries, Japan.

IZQUIERDO, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.* 2: 183-191.

IZQUIERDO, M.S., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., 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., KALINOWSKI, C.T., THONGROD, S. y , L. ROBAINA. 2005. Nutritional needs for correct pigmentation in European red porgy *Pagrus pagrus*. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. (Lyons, T.P. y Jacques, K.A. Eds.) pp. 307-313. Nottingham Univ.

LATSCHA, T. 1991. Carotenoids in aquatic animal nutrition. In: *Proceedings of Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop* (Akiyama, D.M. y Tan, R.K.H.eds), pp.68-79, Thailand and Indonesia, September 19-25

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): 25-240.

LI, Y., WEI-ZHOU, C., ZE-WEI, S., JIE-HUI, C. y W. KE-GANG. 2005. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. *Aquaculture* 245: 263-272.

LIÑAN-CABELLO, M., MEDINA-ZENDEJAS, R., SÁNCHEZ-BARAJAS, M. y A. HERRERA. 2004. Effects of carotenoids and retinol in oocyte maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquacult. Res.* 35: 905-911.

MATSUFUJI, H., NAKAMURA, H., CHINO, M. y M. TAKEDA. 1998. Antioxidante activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* 46:3468-3472.

MIKI, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 63(1):141-146.

MIKULIN, A. y S. SOIN, 1975. The functional significance of carotenoids in the embryonic development of teleosts. *J. Ichthyol.*, 15:749-759.

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. ODRIÓZOLA. 1990. Effects 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.

PANGANTIHON-KUHLMANN M.P., O. MILLAMENA y Y. CHERN. 1998. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquatic Living Resources*, 11(6):403-409.

QUANTZ, G. 1980. Über den Einfluss von Carotinoidreichem Trockenfutter auf die Eibefruchtung der Regebogenforelle (*Salmo gairdneri* R.). *Arch. Fischwiss.* 31, 29-40.

REGUNATHAN, C. y S. WESLEY. 2006. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition*. 12: 425-432.

ROY, W., G. BELL, J. SAWANBOONCHUN, A. DAVIE, J. FRANCO, D. FERNANDES, J. GNASSOU y D. ROBERTSON. 2007. SARF014: Cod broodstock nutrition: Arachidonic acid and astaxanthin as determinants of egg quality. *Final Report*. 27 pp.

SALZE, G., D.R. TOCHER, W. J. ROY y D.A. ROBERTSON, 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): Egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquacult. Res.* 36, 1488-1499.

SAWANBOONCHUM, J., ROY, W., D. ROBERTSON y J. G. BELL. 2008. The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua*, L.) *aquaculture*, 283 (1-4): 97-101.

SOKAL, R.R. y J. ROLF. 1979. *Biometría*. Blume, Madrid.

TORRISEN, O.1990. Biological activities of carotenoids in fishes. In: The current status of fish nutrition in aquaculture. Proc. Third Internat Symp. On Feeding and Nutrition in Fish. M. Takeda and T. Watanabe (eds.) Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, 387-399 pp

TSUSHIMA, M., KAWAKAMI, T., MINE, M. y T. MATSUNO. 1997. The role of carotenoids in the development of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 32, 149-153.

TVERANGER, B. 1986. Effect of pigment content in broodstock diet on subsequent fertilization rate survival and growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) off spring. *Aquaculture* 53:85-93.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., SATOH, S., KIRON, V., IMAIZUMI, H., YAMAZAKI, T. y K. KAWANO. 2001. Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck y Schlegel). *Aquaculture Research*, 32 (suppl.1), 263-272.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., IMAIZUMI, H. y T. YAMAZAKI. 2002. Spawning performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed dry pellets containing paprika and squid meal. *Fisheries Science*, 68, 230-232.

VERAKUNPIRIYA, V., WATANABE, K., MUSHIAKE, K., KAWANO, K., KOBAYASHI, T., HASEGAWA, L., KIRON, V., SATOH, S. y WATANABE, T. 1997a. Effect of a krill meal supplementation in soft-pellets on spawning and quality of eggs Of yellowtail. *Fish.Sci.* 63, 433-439.

VERAKUNPIRIYA, V., MUSHIAKE, K., KAWANO, K. y K. WATANABE. 1997b. Supplemental effect of astaxanthin in broodstock diets on the quality of yellowtail eggs. *Fish.Sci.*, 63, 816-823.

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 VASSALLO-AGIUS, R. 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227, 35-61.

WATANABE, T., LEE, M. J., MIZUTANI, J., YAMADA, T., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., KITADA, T. y T. ARAKAWA. 1991a. Effective components in cuttlefish meal and raw krill for the improvement of quality of red sea bream *Pagrus major* eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 681-694.

WATANABE, T., FUJIMURA, T., LEE, M.J., FUKUSHO, K., SATOH, S. y T. TAKEUCHI. 1991b. Effect of polar and non-polar lipids from krill on quality of eggs of red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 695-698.

4.3 EXPERIMENTO III. CALIDAD DE LA PUESTA EN DORADA (*Sparus aurata* L.) ALIMENTADA CON DOS NIVELES COMBINADOS DE CAROTENOIDES Y ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

4.3.1. INTRODUCCIÓN

Debido al aumento de la producción de la acuicultura, la demanda de semilla de alta calidad se ha incrementado considerablemente, es por lo tanto fundamental el control completo del ciclo productivo, de las especies en cautividad, para el éxito de los criaderos comerciales. Los genes parentales, edad y estado nutricional de los reproductores son los factores de que mas afectan la calidad de las puestas en peces. Los peces en su medio natural están sometidos a factores poco conocidos, en lo que se refiere a aspectos nutricionales y ambientales, que influyen en su rendimiento productivo (Stickney, 1996). Sin embargo, en cautividad, se sabe que diversos nutrientes tales como los ácidos grasos esenciales (Watanabe *et al.*, 1984a; Hardy *et al.*, 1990; Zohar *et al.*, 1995; Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 2001), el α -tocoferol (Izquierdo y Fernández-Palacios, 1997; Fernández-Palacios *et al.*, 1998, 2005), el ácido ascórbico (Blom y Dabrowski, 1995) o los carotenoides (Watanabe y Kiron, 1995) influyen en calidad de las puestas.

Los carotenoides juegan un papel importante en la reproducción de peces. La inclusión de carotenoides en la dieta de los reproductores ha mejorado el rendimiento reproductivo en peces como la seriola coreana, *Seriola quinqueradiata* (Verakunpiriya *et al.*, 1997; Vassallo-Agius *et al.*, 2002; Watanabe y Vassallo-Agius, 2003) y en crustáceos como el camarón patiblanco, *Penaeus vannamei* (Wyban *et al.*, 1997). En la seriola coreana la inclusión en la dieta de 30 ppm de astaxantina mejoran la calidad de las puestas (Watanabe y Vassallo-Agius, 2003). En el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), aunque sus huevos no contienen carotenoides, 10 ppm de astaxantina en la dieta incrementan significativamente la fecundidad (Watanabe y Vassallo-Agius, 2003). Además se ha determinado que la interacción entre la vitamina A y la astaxantina influye en el adecuado desarrollo de los ovarios y mejora la calidad de las puestas de los reproductores del langostino monodon, *Penaeus monodon* (Pangantihon-Kühlmann *et al.*, 1998). Los carotenoides además tienen diversos papeles en

peces: son precursores de vitamina A, estimulantes del sistema inmune y antioxidantes (Izquierdo *et al.*, 2005). El requerimiento de antioxidantes, en reproductores de peces, se ve incrementado durante la reproducción en relación con la necesidad de altos niveles de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en la dieta (Fernández-Palacios e Izquierdo, 2009). Izquierdo *et al.* (2001) señalan que los requerimientos de α -tocoferol se incrementan a medida que aumenta el contenido de ácidos grasos insaturados en las dietas para reproductores de dorada, (*Sparus aurata*). Sin embargo, en esta especie, de gran importancia en la acuicultura Mediterránea, no se han realizado experimentos para determinar el efecto de la inclusión de carotenoides en la dieta sobre su rendimiento reproductivo, ni su papel como antioxidantes junto a niveles elevados de ácidos grasos insaturados en dietas para reproductores.

Diversos carotenoides han sido incluidos en dietas para peces con la finalidad de mejorar la pigmentación o el rendimiento reproductivo (Izquierdo *et al.*, 2005). La astaxantina y la cantaxantina son los carotenoides que se emplean más frecuentemente y principalmente en forma sintética (Storebakken y Goswami, 1996; Smith *et al.*, 1992). Fuentes naturales de carotenoides como el krill (Watanabe *et al.*, 1985b, 1991a,b; Kalinowski *et al.*, 2005) o el pimentón han sido también utilizadas, siendo sus niveles de inclusión en las dietas para peces bastante más elevados, en comparación con las fuentes sintéticas, debido a su baja pureza. Recientemente, otros autores (Ingle de la Mora *et al.*, 2006) han encontrado que la oleorresina de pimentón es eficientemente utilizada por la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) pero su efecto en el rendimiento reproductivo todavía es desconocido.

El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la oleorresina de pimentón (*Capsicum annuum*), como fuente de carotenoides para dietas de reproductores de dorada, y evaluar su efecto conjuntamente con los ácidos grasos insaturados, sobre la calidad de la puesta en esta especie.

4.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Reproductores

Treinta y seis reproductores de dorada (*Sparus aurata*) de 2-4 años de edad, fueron distribuidos al azar en doce tanques circulares, fabricados en poliéster reforzados con fibra de vidrio, de 1000 l en una proporción de 2♂:1♀ (Fernández-Palacios *et al.*, 1990). Las puestas fueron espontáneas, el fotoperíodo fue natural. La calidad de las puestas fue determinada según la metodología descrita por Fernández-Palacios *et al.* (1995). Las características biométricas de los reproductores se muestran en la Tabla XXI.

Tabla XXI.- Peso, longitud y factor de condición de los reproductores utilizados en el experimento

Grupo experimental	40 / 2,5	40 / 4	60 / 2,5	60 / 4
<i>Machos</i>				
Peso corporal (kg)	0,49 ± 0,04	0,46 ± 0,09	0,47 ± 0,07	0,44 ± 0,08
Longitud Estandar (cm)	27,88 ± 0,79	27,55 ± 1,63	27,93 ± 0,84	27,16 ± 1,43
Factor de Condición	22,7 ± 1,22	22,08 ± 1,79	21,43 ± 2,02	22,16 ± 1,81
<i>Hembras</i>				
Peso corporal (kg)	1,28 ± 0,34	1,09 ± 0,22	1,27 ± 0,18	1,05 ± 0,10
Longitud Estandar (cm)	37,15 ± 3,21	36,6 ± 1,65	38,13 ± 1,15	36,46 ± 0,89
Factor de Condición	22,46 ± 0,32	22,06 ± 1,51	22,8 ± 1,0	21,66 ± 1,6
Biomasa(kg/m ³)	2,27 ± 0,37	2,03 ± 0,28	2,21 ± 0,22	1,94 ± 0,19

*(Media ± (DE); Factor de Condición = [Peso corporal(g)x1000]/[longitud Estándar (cm)]³).

Los tanques tenían circuito abierto de agua de mar con un flujo de 165 l/h, lo que aseguraba una renovación diaria de aproximadamente unas cuatro veces su volumen, además estaban dotados de dos puntos de aireación. La temperatura durante el experimento osciló entre 18,7°C y 21,6°C.

Dietas

Se formularon cuatro dietas isolípídicas e isoproteicas con harina de calamar y aceite de pescado como fuentes proteicas y de lípidos, respectivamente. Las dietas formuladas contenían dos diferentes niveles de carotenoides (40 y 60 mg kg⁻¹ de oleorresina de pimentón (José Martínez y Cía. S.A. Murcia, España) en combinación con dos niveles de n - 3 HUFA (25 y 40 g kg⁻¹ peso seco).

La composición y contenido analizado de las dietas se señalan en la Tabla XXII, donde se observa que el contenido de proteínas y lípidos en las dietas fue muy semejante, aproximadamente de 48 y 15 g kg⁻¹, respectivamente. La composición en ácidos grasos de las dietas se indica en la Tabla XXIII.

Tabla XXII.- Composición y análisis proximal de las dietas experimentales

Ingredientes (g/100g dieta)	Grupo experimental			
	40 / 2,5	40 / 4	60 / 2,5	60 / 4
Harina de calamar	58,05	58,05	58,05	58,05
Aceite de Pescado	3,4	5,95	3,4	5,95
EPA 28	1,6	2,77	1,6	2,77
Acido Oleico	3,7	0	3,7	0
Almidón gelatinizado	23,73	23,71	23,66	23,64
Vitaminas ^a	2,0	2,0	2,0	2,0
Minerales ^a	2,0	2,0	2,0	2,0
Oleorresina de pimentón	0,07	0,07	0,14	0,14
α – Celulosa	5,0	5,0	5,0	5,0
Composición Analítica				
(% peso seco)				
Proteínas	48,39 ± 5,0	47,66 ± 3,3	47,84 ± 0,2	48,00 ± 0,6
Lípidos	14,77 ± 5,7	15,73 ± 5,9	14,72 ± 8,4	14,27 ± 8,7
Cenizas	4,26 ± 0,2	4,23 ± 1,0	4,19 ± 4,0	4,38 ± 1,3
Humedad	9,83 ± 1,2	9,66 ± 2,4	9,89 ± 0,7	9,29 ± 2,1
Carbohidratos ¹	32,58	32,38	33,25	33,36
n-3 HUFA	1,66	2,43	1,87	2,86
Carotenoides Totales (ppm)	46,31 ± 1,10	48,05 ± 2,76	61,83 ± 5,64	62,26 ± 0,86

^a Fernández-Palacios *et al.* (1998).

¹ Calculados como 100 – (%Proteína + % Lípidos + % Ceniza) %

Tabla XXIII.- Composición y algunas relaciones de los ácidos grasos de las dietas experimentales (% total de ácidos grasos)

Acidos Grasos	Grupo experimental			
	40 / 2,5	40 / 4	60 / 2,5	60 / 4
14:0	5,14	7,11	5,03	6,33
15:0	0,52	0,61	0,51	0,54
16:0	20,53	25,19	20,00	22,54
17:0	0,51	0,69	0,49	0,64
18:0	3,03	3,54	2,86	3,32
20:0	0,12	0,16	0,11	0,15
Saturados	30,50	37,55	29,20	33,75
14:1(n-7)	0,18	0,19	0,17	0,16
15:1(n-5)	0,13	0,09	0,12	0,08
16:1(n-7)	6,80	7,85	6,65	7,50
16:1(n-5)	0,30	0,35	0,29	0,31
18:1(n-9)	27,50	9,71	27,10	9,29
18:1(n-7)	3,89	2,98	3,81	2,89
18:1(n-5)	0,08	0,02	0,30	0,26
20:1(n-9)	2,53	2,83	2,55	3,36
20:1(n-7)	0,01	0,16	0,10	0,13
22:1(n-11)	0,63	0,91	0,59	0,90
22:1(n-9)	0,34	0,37	0,31	0,36
Monoenoicos	42,91	26,13	42,19	25,28
18:2(n-6)	3,52	3,34	3,85	3,54
18:3(n-6)	0,07	0,12	0,11	0,17
20:3(n-6)	0,21	0,23	0,20	0,23
20:4(n-6)	0,72	0,94	0,74	1,03
22:4(n-6)	0,08	0,05	0,21	0,06
22:5(n-6)	0,17	0,24	0,18	0,27
Total (n-6) PUFA	4,78	4,92	5,29	5,31
18:3(n-3)	0,59	0,84	0,63	0,96
18:4(n-3)	0,82	1,49	0,95	1,73
20:3(n-3)	0,26	0,29	0,26	0,30
20:4(n-3)	0,39	0,61	0,41	0,75
20:5(n-3)	6,99	10,77	7,69	13,78
22:5(n-3)	0,67	1,16	0,74	1,51
22:6(n-3)	8,35	11,52	9,63	12,31
Total (n-3) PUFA	18,08	26,67	20,32	31,34
Total PUFA	22,86	31,59	25,61	36,64
Poli insaturados	26,59	36,32	28,62	40,97
n-3	18,70	26,95	20,37	31,45
n-6	5,24	5,09	5,75	5,34
n-9	28,62	11,06	30,15	13,23
n-3 HUFA	16,67	24,34	18,74	28,65
ARA / EPA	0,10	0,09	0,10	0,07
EPA / DHA	0,84	0,93	0,80	1,12
Oleico a. / DHA	3,29	0,84	2,81	0,75
Oleico a. / n-3 HUFA	1,65	0,40	1,45	0,32
n-3 / n-6	3,57	5,30	3,55	5,89

Análisis bioquímicos

Se recogieron muestras de huevos a lo largo del período experimental, y muestras de las dietas que fueron guardadas en atmósfera de nitrógeno, en congelador -80 °C (Marca Revco, modelo ULT 1786-3-V36, NY, USA) para su posterior análisis.

Los lípidos de las dietas y huevos fueron extraídos en frío para la determinación posterior de su composición en ácidos grasos, el método utilizado fue el descrito por Folch *et al.* (1957), Los lípidos se guardan a – 80 ° C, en viales etiquetados, disueltos en cloroformo y en atmósfera de nitrógeno para evitar su oxidación.

Para la determinación de ácidos grasos, los lípidos obtenidos por el método Folch *et al.* (1957). Se transesterificaron con ácido sulfúrico al 1% en metanol según la técnica de Christie (1982), modificada por Izquierdo *et al.* (1990). Los ésteres metílicos fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases mediante un cromatógrafo Shimadzu (Instrument Division, Kyoto, Japón), e integrador Shimadzu, bajo las condiciones operativas descritas en el capítulo de material y métodos generales. La humedad y el contenido de cenizas de las muestras fue determinado secando las muestras a 105 °C o incinerando a 450 °C, respectivamente hasta alcanzar peso constante (AOAC. 1995). El contenido de carotenoides totales fue analizada de acuerdo a Barua *et al.* (1993). La cuantificación total de carotenoides se determino por espectrofotometría, la absorbancia fue leída a una longitud de onda λ -max de 470 nm. El coeficiente de extinción (E1%1cm) usado fue 2500 para astaxantina en hexano (Britton, 1995).

El total de carotenoides en gramo de muestra fue determinado con la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g} / \text{g} = 10000 \times V \times A / P \times E \text{ 1\% 1cm} \quad \text{donde}$$

V = volumen total de la extracción en mililitros

P = peso de la muestra en gramo

A = valor de absorbancia medida en el espectrofotómetro

2500 = coeficiente de extinción de la astaxantina en hexano

Análisis estadísticos

Los valores obtenidos en este experimento tanto de los parámetros de calidad de los huevos como de la composición bioquímica de los mismos y de las dietas se expresan como media de los valores \pm desviaciones estándar, y se compararon estadísticamente utilizando el análisis de varianza, ANOVA (Sokal y Rohlf, 1979). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$. Las diferencias entre medias fueron puestas de manifiesto mediante el test de comparación múltiple de medias de Tukey, o con el test de Duncan para niveles más bajos de significación.

Cuando las varianzas eran heterogéneas o los datos no tenían una distribución normal se intentaba hacerlas homocedásticas y/o que los datos se distribuyeran normalmente mediante transformaciones. Si la heterogeneidad o la no distribución normal de los datos persistían, se empleaba el test no paramétrico de rangos múltiples de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1979). Detectadas diferencias estadísticamente significativas con el test de Kruskal-Wallis, se utilizó el procedimiento de caja y bigotes con muescas para determinar la diferencia entre las réplicas

Para ver el efecto combinado de los carotenoides y de los n-3 HUFA de la dieta sobre la calidad de la puesta, se utilizó un análisis de varianza de dos vías considerando como factores los dos niveles de carotenoides y los dos niveles de n-3 HUFA. Los datos se analizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS Versión 5.1 Plus for Windows; (Graphic software Systems, Inc.USA).

4.3.3. RESULTADOS

Parámetros biológicos de las puestas

Previamente, a su alimentación con las dietas experimentales los peces fueron alimentados durante 30 días con una dieta comercial (Proaqua, Palencia, España) comprobándose la inexistencia de diferencias significativas entre las puestas de los reproductores durante este periodo. Después de este periodo de

alimentación común, los reproductores de cada uno de los tratamientos fueron alimentados dos veces al día (1,5% peso corporal) con cada una de las dietas experimentales durante cinco semanas. Cada dieta fue probada por triplicado y se comprobó la inexistencia de diferencias significativas entre los parámetros de calidad de las puestas de los replicados de un mismo tratamiento. Todas las dietas experimentales fueron aceptadas por los reproductores no registrándose mortalidades durante el periodo experimental

Al analizar los resultados obtenidos, tras la finalización del experimento (Tabla XXIV), se observó que las puestas de los reproductores alimentados con el nivel más alto de inclusión de n-3 HUFA (dietas 40/4 y 60/4) mejoraron marcadamente en término de huevos vivos, aunque solo las puestas de los reproductores alimentados con la dieta 60/4 se diferenciaron significativamente de las puestas de los reproductores alimentados con las dietas 40/2,5 y 60/2,5.

Tabla XXIV.- Índices de las puestas de los reproductores de dorada

Grupo experimental	% Huevos Vivos	% Huevos muertos	% Huevos no fecundados
40 / 2,5 (n=13)	86,46 ± 8,10 ^b	9,71 ± 7,93 ^{ab}	3,84 ± 4,71 ^a
40 / 4 (n=13)	89,60 ± 8,17 ^{ab}	6,55 ± 4,50 ^{ab}	3,85 ± 3,95 ^a
60 / 2,5 (n=14)	83,55 ± 9,35 ^b	14,55 ± 8,95 ^b	1,89 ± 3,68 ^b
60 / 4 (n=13)	95,31 ± 3,22 ^a	4,47 ± 3,06 ^a	0,20 ± 0,52 ^b
	% Con más de una gota lipídica	% Eclosión	% Larvas saco vitelino reabsorbido
40 / 2,5 (n=13)	0,07 ± 0,25	92,92 ± 6,35	83,83 ± 7,00
40 / 4 (n=13)	0,70 ± 1,40	96,23 ± 2,79	85,15 ± 6,86
60 / 2,5 (n=14)	0	95,01 ± 5,69	86,23 ± 5,95
60 / 4 (n=13)	0	97,21 ± 1,66	84,62 ± 5,91

Valores en la misma columna sin o con igual superíndice no hay diferencia significativa.

El porcentaje de huevos vivos está significativamente correlacionado con los niveles dietéticos de n – 3 HUFA, ácido Eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), y ácido Araquidónico (20:4n-6, ARA) (Fig. 21).

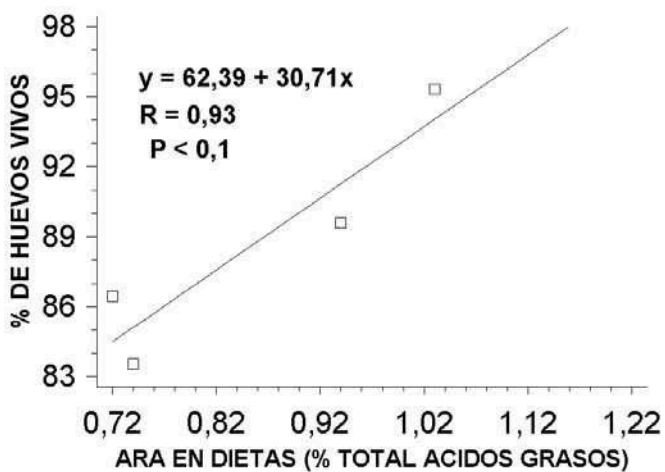
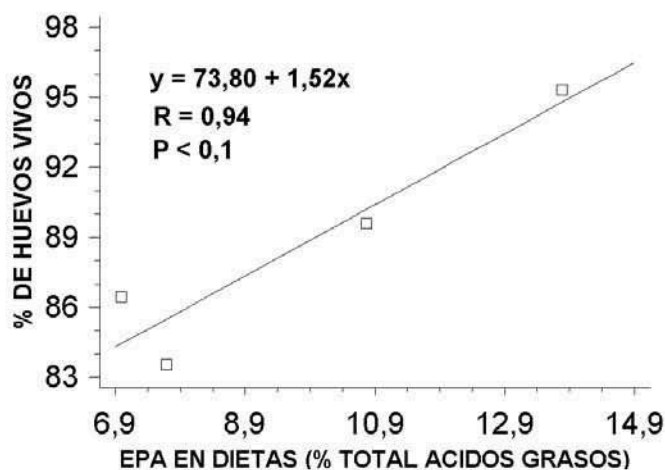
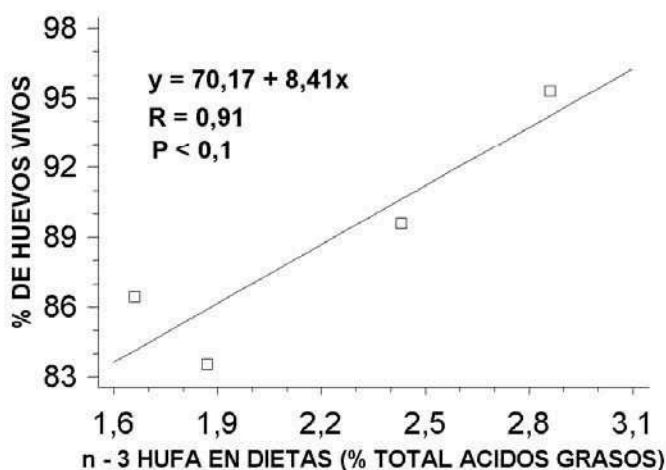


Fig. 21.- Relación entre los niveles dietéticos de n – 3 HUFA, EPA y ARA con el porcentaje de huevos vivos.

El porcentaje de huevos no fecundados es significativamente menor en las puestas de los reproductores alimentados con las dietas conteniendo los niveles más altos de carotenoides (60/2,5 y 60/4). Se encontraron correlaciones significativas entre el porcentaje de huevos no fecundados, y el contenido en carotenoides de la dieta (Fig. 22).

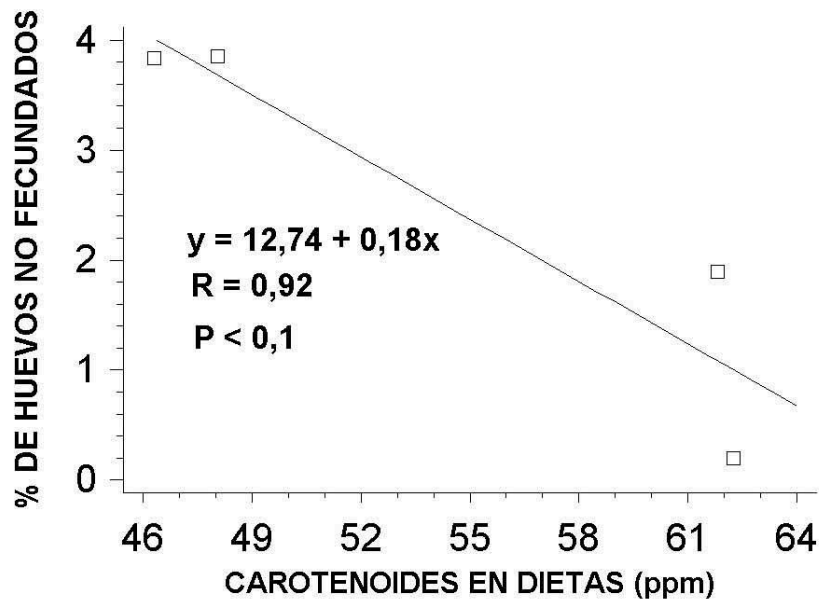


Fig. 22.- Relación entre los carotenoides de las dietas y el porcentaje de huevos no fecundados.

Los porcentajes de eclosión también se vieron incrementados con el aumento de n-3 HUFA en las dietas aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Se observó una correlación significativa entre el porcentaje de eclosión y el contenido dietético de n-3 HUFA, ácido Docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA) y ARA (Fig. 23).

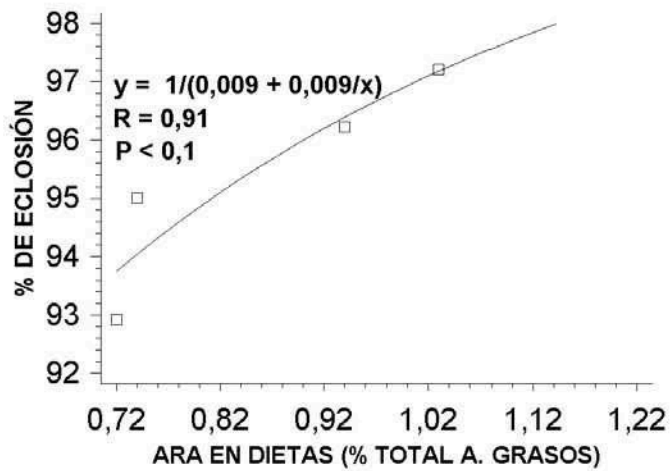
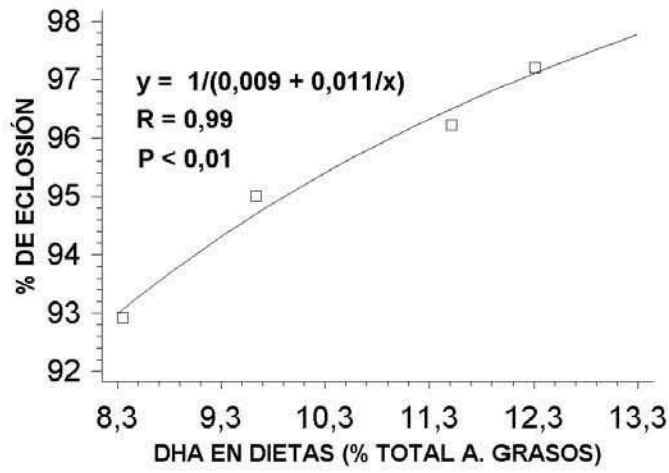
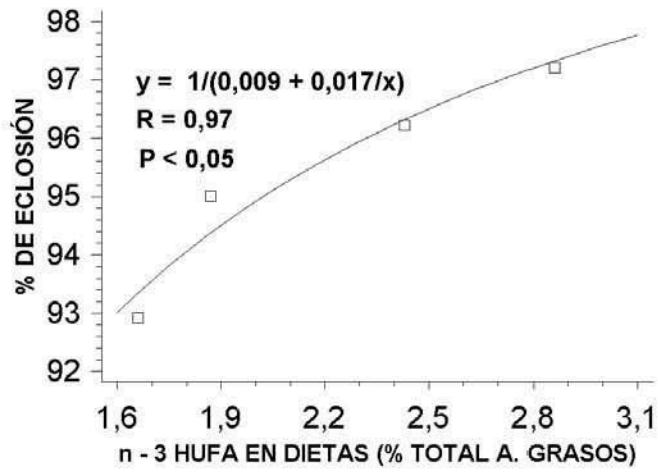


Fig. 23.- Relación entre el porcentaje de eclosión y los niveles dietéticos de n -3 HUFA, DHA y ARA.

En cuanto a la relación EPA/DHA de las dietas y los índices de calidad de las puestas, se han encontrado correlaciones con el porcentaje de huevos vivos (Fig. 24).

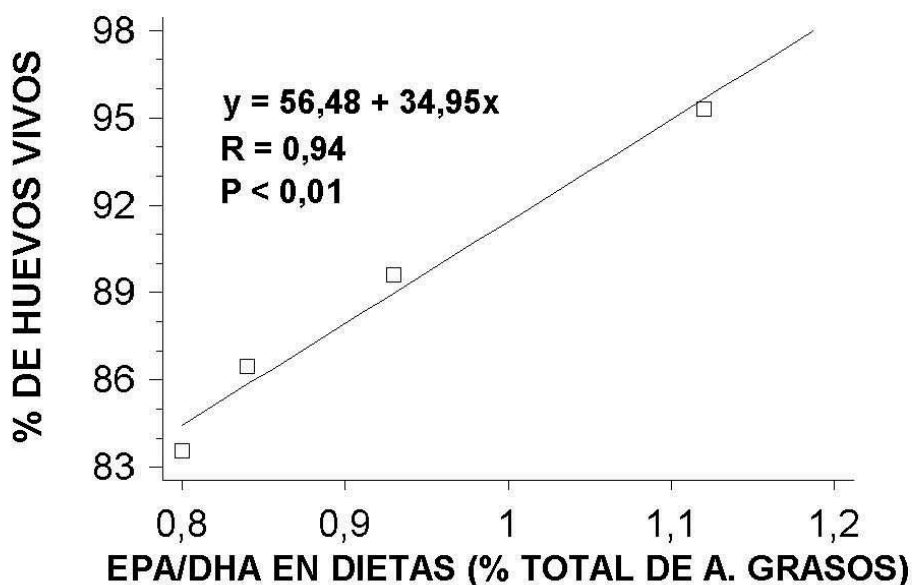
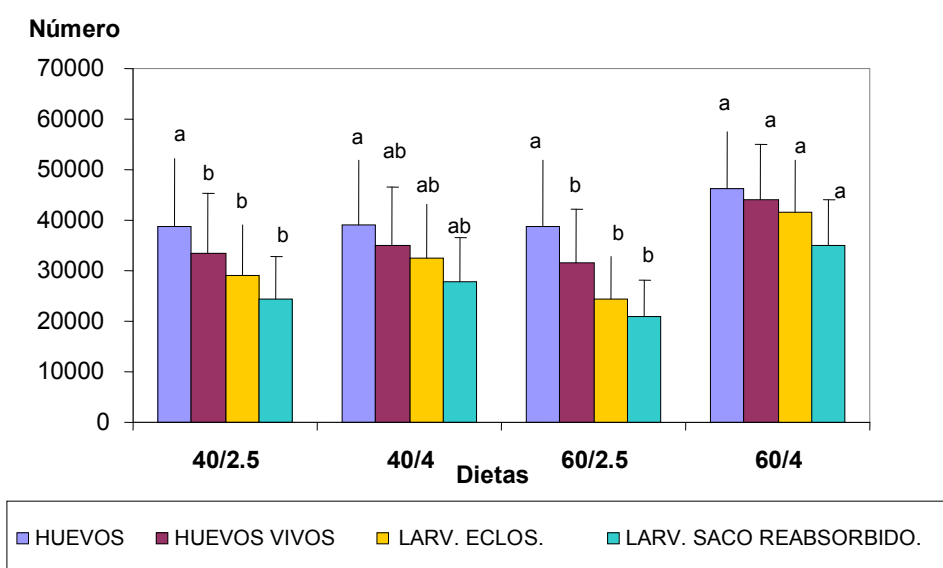


Fig. 24.- Correspondencia entre la relación dietética EPA/DHA y el porcentaje de huevos vivos.

La fecundidad relativa de los reproductores, expresada como la producción diaria de huevos por kilogramo de hembra, es ligeramente más alta en los reproductores alimentados con la dieta 60/4 (Fig. 25), y como consecuencia de un mayor porcentaje de huevos vivos, de fecundación y de eclosión, la producción de huevos viables, larvas eclosionadas y larvas con el saco vitelino reabsorbido fue significativamente mayor que en los peces alimentados con 2,5% n-3 HUFA (dietas 40/2,5 y 60/2,5).



*Barras del mismo color, sin o con misma letra no presentan diferencias significativas. Barras del mismo color con diferentes letras presentan diferencias significativas ($P < 0,05$)

Fig. 25.-Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada

Los efectos de la combinación de los dos niveles de carotenoides y n-3 HUFA en la calidad de puesta fueron evaluados mediante un análisis de la varianza factorial, resultando que los distintos niveles de n-3 HUFA incluidos en la dieta mejoraron significativamente el porcentaje de huevos viables. En cuanto a los carotenoides solo mejoraron significativamente la fecundación reduciendo el porcentaje de huevos no fecundados. No se encontró interacción entre ambos factores sobre ninguno de los parámetros controlados.

Composición bioquímica de los huevos

Los lípidos totales de los huevos de los reproductores de los diferentes grupos experimentales no mostraron diferencias significativas entre ellos (Tabla XXV).

Tabla XXV.- Composición de los huevos de los reproductores alimentados con las diferentes dietas

Composición analítica	Grupo experimental			
	40 / 2,5	40 / 4	60 / 2,5	60 / 4
Lípidos (% p.s.)	30,77 ± 7,14	29,09 ± 7,22	24,47 ± 5,77	25,20 ± 6,57
Carotenoides (ppm)	8.80 ± 2.58	9.26 ± 1.50	11.88 ± 5.60	14.24 ± 6.59
Ceniza (g)	4.1 ± 0.8 ^b	5.1 ± 1.6 ^{ab}	5.7 ± 1.0 ^a	5.3 ± 1.6 ^{ab}
Humedad (%)	93.20 ± 0.66	92.81 ± 0.89	92.42 ± 0.76	92.55 ± 0.70

* Valores en la misma fila con igual superíndice no son estadísticamente significativo

El incremento en el nivel de carotenoides en la dieta, incrementó ligera, pero no significativamente, su contenido en los huevos, encontrándose una correlación positiva entre este contenido en las dietas y en los huevos (Fig. 26). Así mismo, se encontró una correlación altamente significativa entre el nivel de carotenoides en los huevos y el porcentaje de huevos no fecundados (Fig. 27).

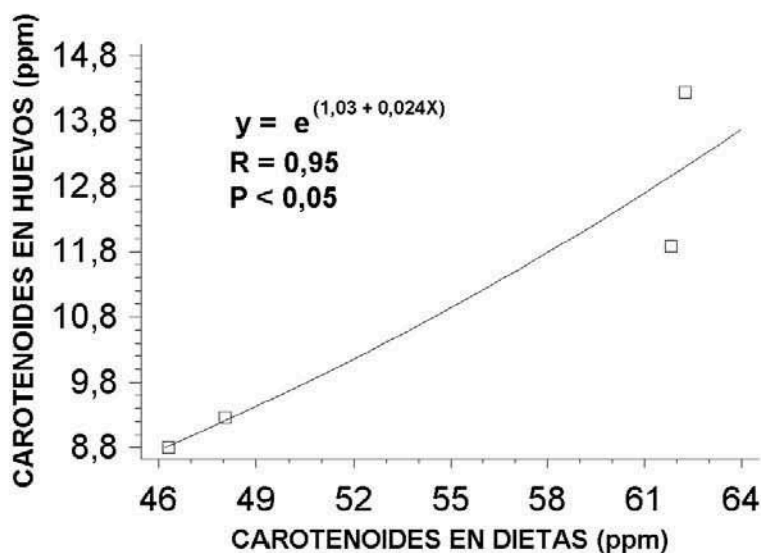


Fig. 26.- Relación entre el contenido de carotenoides en los huevos y el nivel dietético de carotenoides.

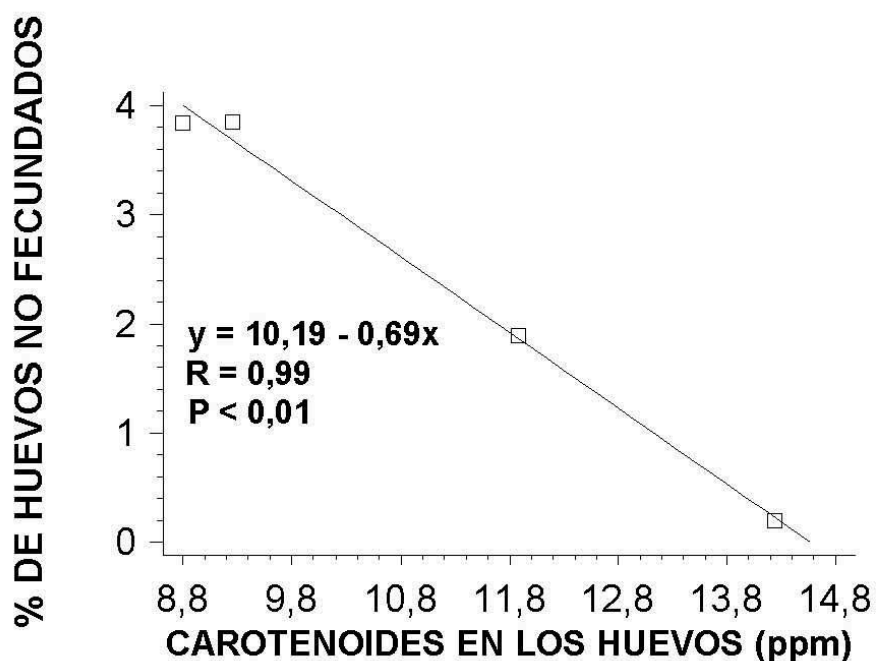


Fig. 27.- Relación entre el contenido de carotenoides en los huevos y el porcentaje de huevos no fecundados.

El contenido más alto en cenizas se encontró en los huevos de los peces alimentados con la dieta 60/2,5, siendo significativamente mayor que el contenido de los huevos de los reproductores alimentados con la dieta de 40/2,5 (Tabla XXV).

Los principales ácidos grasos encontrados en los lípidos totales de los huevos fueron 16:0 (ácido Palmítico), 18:1n9 (ácido Oleico) y DHA (Tabla XXVI), seguidos en orden de importancia por el EPA y 16:1n-7 (ácido Palmitoleico).

Tabla XXVI. Composición de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos de reproductores

Acidos Grasos	Grupo experimental			
	40 / 2,5	40 / 4	60 / 2,5	60 / 4
14:0	4.37 ± 0.86 ^{ab}	2.11 ± 2.07 ^b	2.75 ± 1.49 ^b	4.19 ± 1.69 ^a
16:0	20.17 ± 0.51 ^b	22.62 ± 0.85 ^a	21.07 ± 1.07 ^{ab}	21.51 ± 0.57 ^a
18:0	3.20 ± 0.36 ^b	4.74 ± 0.62 ^a	4.00 ± 0.82 ^{ab}	4.46 ± 0.52 ^a
Total saturados	28.90 ± 1.56 ^a	30.77 ± 1.63 ^a	29.12 ± 0.50 ^a	31.50 ± 2.01 ^a
16:1(n-7)	7.59 ± 0.79 ^a	7.39 ± 0.49 ^a	6.52 ± 0.53 ^a	7.39 ± 0.73 ^a
16:1(n-9)	0.93 ± 0.29 ^a	0.60 ± 0.42 ^a	0.86 ± 0.17 ^a	0.63 ± 0.09 ^a
18:1(n-7)	2.93 ± 0.34 ^a	2.62 ± 0.16 ^b	3.11 ± 0.22 ^a	2.54 ± 0.10 ^b
18:1(n-9)	18.65 ± 1.19 ^a	10.55 ± 0.32 ^b	18.68 ± 0.45 ^a	10.81 ± 1.02 ^b
20:1(n-9)	0.75 ± 0.12 ^a	0.57 ± 0.06 ^b	0.63 ± 0.01 ^{ab}	0.54 ± 0.02 ^b
20:1(n-7)	0.15 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.00 ^b	0.11 ± 0.00 ^b	0.12 ± 0.01 ^b
22:1(n-11)	0.15 ± 0.08 ^a	0.08 ± 0.05 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^{ab}	0.06 ± 0.01 ^b
Total monoenoicos	32.05 ± 2.05 ^a	22.80 ± 0.75 ^b	30.95 ± 0.76 ^a	22.94 ± 1.19 ^b
18:2(n-6)	4.54 ± 0.13 ^a	3.76 ± 0.37 ^b	3.47 ± 0.10 ^b	3.97 ± 0.26 ^b
20:4(n-6)	0.81 ± 0.04 ^d	1.04 ± 0.09 ^a	0.88 ± 0.02 ^c	0.95 ± 0.04 ^b
Total (n-6) PUFA	5.91 ± 0.20 ^a	5.32 ± 0.24 ^{bc}	4.76 ± 0.12 ^c	5.47 ± 0.19 ^b
18:4(n-3)	0.72 ± 0.13 ^{bc}	0.87 ± 0.06 ^{ab}	0.57 ± 0.04 ^c	0.89 ± 0.05 ^a
20:4(n-3)	0.65 ± 0.04 ^b	0.88 ± 0.04 ^a	0.69 ± 0.04 ^b	0.90 ± 0.06 ^a
20:5(n-3)	6.82 ± 0.46 ^c	10.86 ± 0.49 ^a	8.26 ± 0.11 ^b	9.71 ± 1.00 ^{ab}
22:5(n-3)	1.93 ± 0.20 ^b	2.19 ± 0.18 ^a	1.89 ± 0.13 ^b	2.22 ± 0.13 ^a
22:6(n-3)	20.00 ± 2.46 ^a	22.71 ± 1.23 ^a	20.52 ± 1.27 ^a	22.46 ± 1.08 ^a
Total (n-3) PUFA	31.11 ± 3.04 ^b	38.61 ± 0.97 ^a	32.74 ± 1.16 ^b	37.43 ± 1.92 ^a
Total PUFA	63.98 ± 2.03 ^a	64.05 ± 1.75 ^a	65.43 ± 0.65 ^a	62.81 ± 1.71 ^a
N - 3 HUFA	29.56 ± 2.99 ^b	36.82 ± 0.91 ^a	31.52 ± 1.14 ^b	35.48 ± 1.91 ^a
DHA / EPA	2.93 ± 0.26 ^a	2.09 ± 0.20 ^b	2.48 ± 0.14 ^{ab}	2.32 ± 0.20 ^b
ARA / DHA	0.04 ± 0.005 ^a	0.04 ± 0.005 ^a	0.04 ± 0.005 ^a	0.04 ± 0.008 ^a
ARA / EPA	0.12 ± 0.007 ^a	0.09 ± 0.005 ^c	0.10 ± 0.005 ^b	0.09 ± 0.008 ^c
n - 3 / n - 6	4.99 ± 0.35 ^b	7.03 ± 0.45 ^a	6.42 ± 0.41 ^a	6.53 0.43 ^a

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

No se encontraron diferencias significativas, entre los diferentes grupos experimentales, en lo concerniente al total de ácidos grasos saturados. Los huevos de los reproductores alimentados con los niveles más bajos de n-3 HUFA dietas 40/2,5 y 60/2,5, presentaron niveles significativamente más altos de ácidos grasos mono insaturados siendo estos principalmente: 18:1n-9, 16:1n-7 y 18:1n-7 (ácido Vacenico). En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados, el contenido en ARA y EPA de los huevos de los peces alimentados con las dietas con mayor nivel de n-3 HUFA (40/4 y 60/4) fue significativamente mayor que en los huevos de los reproductores alimentados con las dietas más bajas en n-3 HUFA (40/2,5 y 60/2,5), aunque en el caso del EPA no se diferenciaron significativamente los huevos de las dietas 60/4 y 60/2,5. El DHA también fue mayor en los huevos de las dietas con mayor contenido en n-3 HUFA aunque no hubo diferencias

significativas con los huevos de los reproductores alimentados con las otras dietas. Se encontraron correlaciones positivas estadísticamente significativas, entre el nivel dietético de DHA y su nivel en los huevos (Fig. 28). En cuanto al contenido en n-3 HUFA, este es significativamente mayor en los huevos de los reproductores alimentados con las dietas con mayor contenido en n-3 HUFA (40/4 y 60/4). Existiendo correlaciones significativas entre el contenido en n-3 HUFA de las dietas y de los huevos (Fig. 29).

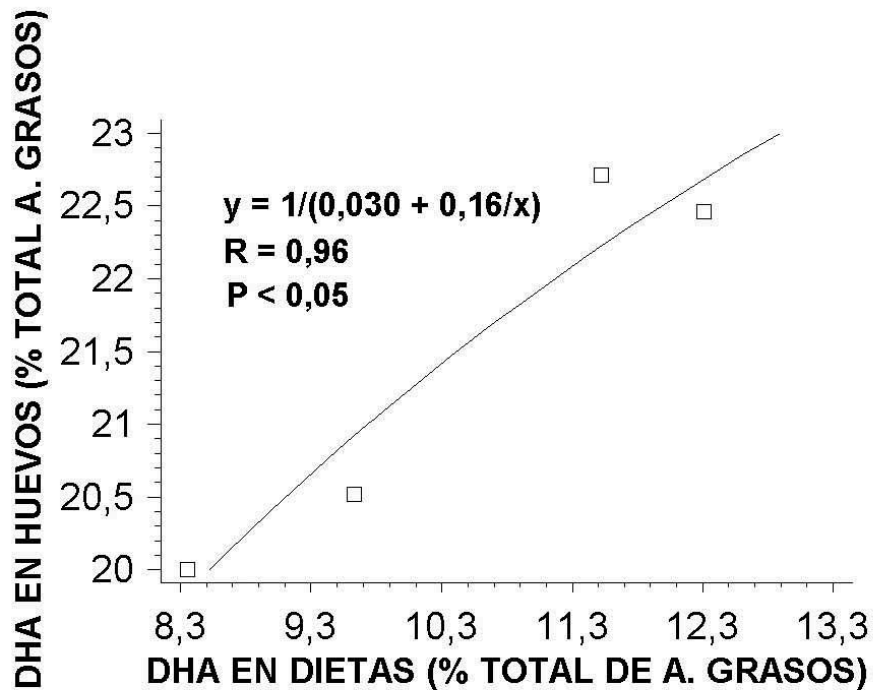


Fig. 28.- Relación entre los niveles de DHA en las dietas y en los huevos.

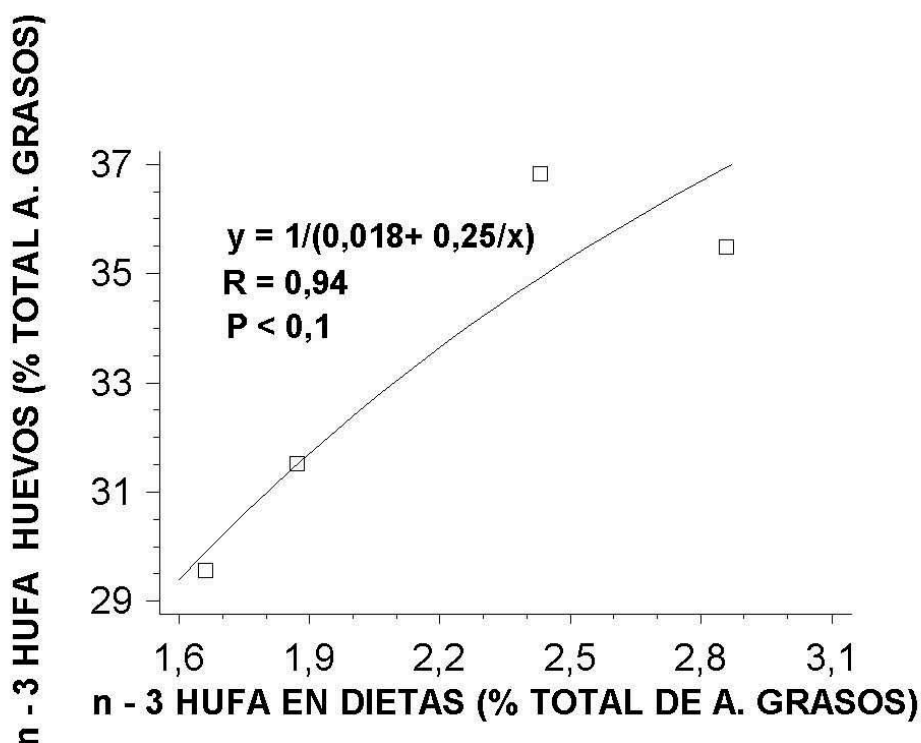


Fig. 29.- Relación entre los ácidos grasos de la serie n – 3 HUFA de las dietas y su contenido en los huevos.

En relación con las proporciones entre los principales ácidos grasos, la relación DHA/EPA fue mayor en los huevos procedentes de los peces alimentados con las dietas con más bajo contenido en n-3 HUFA (40/2,5 y 60/2,5) diferenciándose significativamente los huevos procedentes de la dieta 40/2,5 de los huevos procedentes de las dietas 40/4 y 60/4. Se encontraron correlaciones significativas entre estos dos ácidos grasos y el porcentaje de eclosión (Fig. 30). En lo que respecta a la relación ARA/EPA los huevos procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con las dietas 40/2,5 y 60/2,5 tienen un contenido significativamente mayor.

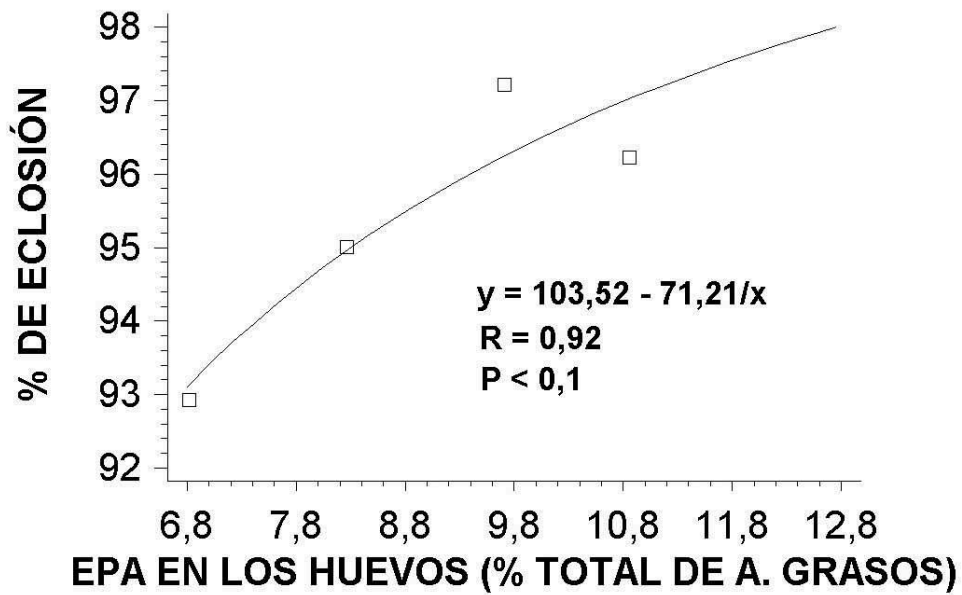
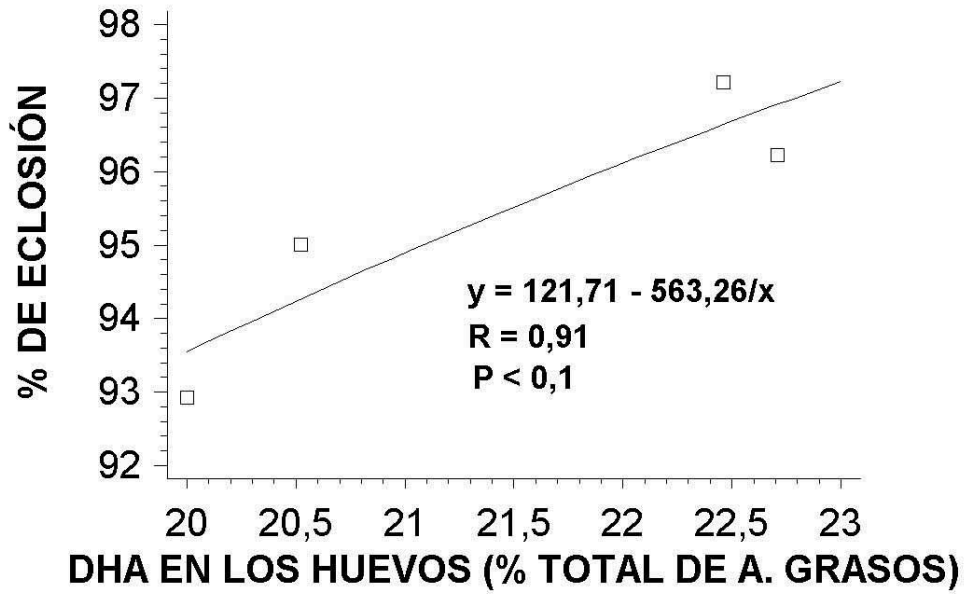


Fig. 30.- Relación entre los niveles de EPA y DHA en los huevos y el porcentaje de eclosión.

4.3.4.- DISCUSIÓN

En este experimento el rendimiento reproductivo de la dorada (*Sparus aurata*), independientemente del tipo de dieta empleada, ha sido mayor, en comparación con otros estudios previos con esta misma especie (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997, 1998; Cejas *et al.*, 2003).

El incremento de los niveles de n-3 HUFA en la dieta de un 2,5 a un 4% mejoró el rendimiento reproductivo de la dorada en términos de porcentaje de huevos vivos y de eclosión. Resultados similares para esta especie han sido descritos por Domarco (2001), utilizando dos dietas comerciales y dos dietas húmedas (calamar-gambas y calamar-caballa) encontró que el incremento de los niveles de n-3 HUFA en los huevos implicaba un aumento en el porcentaje de huevos viables, independientemente del ingrediente utilizado. Así mismo, la mejora en la viabilidad 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.*, 1997).

Fernández-Palacios *et al.* (1995, 2005) señalan que el porcentaje de huevos vivos, definidos como huevos morfológicamente normales, 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. En este sentido, se encontraron correlaciones positivas entre el nivel dietético de n – 3 HUFA y su contenido en los huevos, y con los porcentajes de huevos vivos y de eclosión. Fernández-Palacios *et al.* (1995) encuentran también una correlación entre el nivel dietético de n – 3 HUFA y su nivel en los huevos y con el porcentaje de huevos vivos en puestas de esta misma especie. Así mismo, se encontraron correlaciones entre el porcentaje de huevos vivos y los contenidos en EPA y ARA de las dietas. Fernández-Palacios *et al.* (1995) indican una correlación entre el EPA de las dietas y el porcentaje de huevos vivos. En este mismo sentido Fernández-Palacios *et al.* (2005) señalan una correlación entre este porcentaje y la relación dietética ARA/EPA.

El incremento dietético de n - 3 HUFA mejoro el porcentaje de eclosión, encontrándose correlaciones positivas entre este índice de calidad de las puestas y los niveles dietéticos de n – 3 HUFA, DHA y ARA. En el primer experimento de este estudio también se encontraron correlaciones positivas entre el porcentaje de eclosión y el contenido de n – 3 HUFA, EPA y ARA. De manera semejante, la viabilidad de los huevos del cherne americano (*Morone chrypsos*), expresada en términos de altos porcentajes de eclosión, están asociados a un mayor contenido de n-3 HUFA en las dietas y en los huevos (Lane y Kholer, 2006).

Aunque los altos niveles de n-3 HUFA no tuvieron un efecto negativo en el presente estudio, Fernández-Palacios *et al.* (1995, 2005) señalan que niveles altos de n-3 HUFA en la dieta de los reproductores de dorada acompañados de un aumento de su concentración en el huevo, ocasionan una disminución en la cantidad total de huevos producidos. Similares resultados, en cuanto a la producción de semilla, son encontrados en el espada, *Xiphophorus helleri*, por Ling *et al.* (2006). Li *et al.* (2005) encuentran en el crescent sweetlips (*Plectorhynchus cinctus*) que dietas tanto con exceso o deficiencia de n-3 HUFA, tienen efectos negativos en la calidad de huevos y larvas. Furuita *et al.* (2002) señalan en el lenguado del Pacífico, *Paralichthys olivaceus*, una disminución de los porcentajes de huevos flotantes, eclosión y de larvas normales al aumentar los n-3 HUFA dietéticos de 2,1 a 6,2%. Esta inhibición en la producción de huevos podría ser debida a la acción directa de los niveles tisulares de n-3 HUFA en el eje endocrino cerebro-pituitario-gonadal. Por ejemplo, se ha encontrado que los ácidos grasos EPA y DHA reducen “in vitro” la acción esteroidogénica de la gonadotrofina 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). Este efecto negativo de un exceso de n-3 HUFA podría estar relacionado con la carencia de antioxidantes en la dieta (Fernández-Palacios *et al.*, 2005). De esta forma una dieta con elevados niveles de n-3 HUFA debería tener un mayor contenido de antioxidantes. La vitamina E y los carotenoides atrapan eficientemente los radicales libres, teniendo un papel protector frente a la acción negativa de los radicales libres. Un incremento de α -tocoferol en la dieta previene la aparición de un saco vitelino hipertrofiado (Fernández-Palacios *et al.*, 2005). En

el presente experimento, la inclusión de carotenoides, en las dietas de los reproductores, puede prevenir los posibles efectos adversos generados por elevados niveles de n-3 HUFA en dietas para reproductores.

El incremento del nivel de carotenoides en la dieta de 40 a 60 ppm mejoró significativamente el porcentaje de fecundación de los huevos de dorada, existiendo una correlación entre ambos parámetros. Tveranger (1986) alimentando reproductores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con dietas complementadas con un 10% de harina de krill encuentra una mejora en el porcentaje de fecundación en las puestas de estos reproductores comparadas con las de otros reproductores alimentados con una dieta no complementada, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. En el pargo japonés (*Pagrus major*) la adición de astaxantina purificada en las dietas de reproductores mejora notablemente los porcentajes de huevos flotantes y de eclosión, así como el porcentaje de larvas normales (Watanabe y Kiron, 1995). También en especies de agua dulce, como la trucha arcoíris, la inclusión de astaxantina en dietas para reproductores tiene efectos positivos en los porcentajes de fecundación, de supervivencia del huevo y de eclosión (Ahmadi *et al.*, 2006). La función antioxidante de los carotenoides puede ser clave en la protección del esperma durante la espermiogénesis hasta la fertilización, reduciendo el riesgo de la oxidación de los lípidos (Izquierdo *et al.*, 2005). La oxidación de los lípidos relacionada con un bajo nivel de vitamina E, en la dorada (*Sparus aurata*), reduce los porcentajes de huevos fecundados (Fernández-Palacios *et al.*, 2005) lo cual podría estar relacionado con la reducción en el número y motilidad de los espermatozoides que ha sido descrita para otros vertebrados (Donnelly *et al.*, 1999; Danikowski *et al.*, 2002) y en peces como el ayu, *Plecoglossus altivelis* (Hsiao y Mak, 1978).

En este mismo sentido, la deficiencia de vitamina C, en las dietas para reproductores de pueden tener una influencia negativa en la motilidad del esperma de la trucha arco iris (Ciereszco y Dabrowski, 1995). Por lo tanto, un incremento de los niveles de carotenoides en la dieta puede proteger al esperma de la oxidación de los lípidos, mejorando la motilidad de los mismos y los porcentajes de fecundación.

En el presente experimento, el incremento de los niveles de n-3 HUFA en la dieta mejoró la producción de huevos vivos, larvas eclosionadas y con el saco vitelino reabsorbido. En dorada, Fernández-Palacios *et al.* (1995) indican que la calidad de la puesta, que constituye un factor limitante para la producción masiva de semilla de esta especie, se ve directamente afectada por los niveles de n-3 HUFA en las dietas de los reproductores. Así, por ejemplo, la fecundidad aumenta significativamente con un aumento en los n-3 HUFA dietéticos en la dorada (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 2005) y en otros espáridos (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 a, b).

En otras especies, como el bacalao (*Gadus morhua*), algunos autores (Lie *et al.*, 1993) no han podido demostrar un claro efecto de los ácidos grasos esenciales sobre la fecundidad utilizando dietas comerciales enriquecidas con diferentes tipos de aceites (soja, capellán o sardina). Éstos resultados, que parecen contradictorios con los obtenidos en espáridos, podrían ser debidos a unos menores requerimientos de AGEs en los reproductores de bacalao, que parecen ser cubiertos por los lípidos residuales presentes en la harina ó el aceite de pescado que contenía la dieta comercial basal a la que se añadieron los distintos tipos de aceites.

Tal como sucedió en nuestro experimento, otros ácidos grasos distintos de los n-3 HUFA parecen jugar un papel importante en la producción de huevos en los peces. Así, la presencia de ARA en las dietas para reproductores de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) incrementa la fecundidad (Bruce *et al.*, 1993). También en el lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) el incremento dietético de ARA de 0,1 a 0,6% (peso seco) mejora la fecundidad, mientras que elevaciones hasta el 1,2% inhiben esta mejora (Furuita *et al.*, 2003). Sin embargo, 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 ARA y DHA y otra dieta basada en harina de krill. Aunque la dieta con ojos de atún tiene un contenido en DHA significativamente mayor que la dieta a base de krill, no aparecen diferencias significativas en su concentración en los huevos, probablemente debido a una acumulación selectiva del DHA independientemente de sus niveles en las dietas.

Algunos autores también han señalado la importancia de la relación ARA/EPA en el desarrollo larvario (Sargent *et al.*, 1999; Koven *et al.*, 2001). Esta relación es además importante para muchas funciones fisiológicas que dependen del estado evolutivo de la especie y de sus requerimientos (Pickova *et al.*, 2007). Bell *et al.* (1997), Bruce *et al.* (1999) y Omnes *et al.* (2004) han sugerido la importancia de las relaciones ARA/EPA y EPA/DHA contenidas en dietas para reproductores para mejorar la calidad de las puestas. Estos tres ácidos grasos ARA, 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. El ARA es un importante precursor de eicosanoides en las células de los peces (Bell y Sargent, 2003) en competencia con el EPA que parece ejercer una influencia moduladora sobre la producción de eicosanoides derivados del ARA. Puesto que estos eicosanoides juegan un papel fundamental en la regulación del desarrollo embrionario y larvario, del sistema inmune ó en la osmoregulación, entre otras muchas funciones, pero presentan diferente actividad fisiológica según sean derivados del EPA ó el ARA, la relación dietaria, y por lo tanto tisular, ARA/EPA constituye un factor nutricional crítico en dietas para larvas y reproductores.

El contenido de carotenoides en la dieta estuvo significativamente correlacionado con el contenido de carotenoides en los huevos de dorada. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), altos contenidos de carotenoides en los huevos está relacionado con una mejora en la tasa de fertilización (Dabrowski *et al.* 1987). La importancia de los carotenoides en la reproducción se puso claramente de manifiesto con los estudios controlados de alimentación de reproductores con distintos contenidos en carotenoides (Harris, 1984; Choubert y Blanc, 1998; Watanabe y Kiron, 1995).

En la dorada (*Sparus aurata*) el incremento de carotenoides en la dieta, provenientes de una preparación de oleorresina obtenida del pimentón, aumentó la deposición de carotenoides en los huevos mejorando el rendimiento reproductivo y demostrando la importancia nutricional de este producto como fuente de carotenoides para los reproductores de esta especie.

El incremento del contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta implica un aumento de estos en los huevos. Fernández-Palacios *et al.* (1995) señalan que la composición en ácidos grasos de los huevos de dorada está directamente afectada por el contenido en n-3 HUFA de la dieta de los reproductores. Los ácidos grasos de la serie n-3 HUFA contenidos en los huevos de dorada se incrementan cuando se incrementan los n-3 HUFA de la dieta. Por el contrario, Lie *et al.* (1993) señalan que la composición del huevo de bacalao (*Gadus morhua*) no se vio marcadamente afectada cuando los reproductores de esta especie fueron alimentados con dietas comerciales enriquecidas con diferentes tipos de aceites (soja, capellán o sardina) durante un largo periodo de tiempo. El contenido de DHA, EPA y ARA en los huevos aumenta con el incremento dietético de n-3 HUFA en concordancia con estudios previos (Izquierdo *et al.*, 2001). Por lo tanto, su incremento en las dietas para reproductores y como consecuencia en los huevos, puede ser responsable de la mejora de la calidad de la puesta, existiendo correlaciones positivas del nivel de DHA y EPA en los huevos con el porcentaje de eclosión.

Además, a niveles bajos de n-3 HUFA en la dieta, los huevos de los reproductores alimentados con el nivel más alto de carotenoides mostraron concentraciones más altas de EPA y ARA. Tanto el EPA como el ARA son precursores de eicosanoides, entre ellos prostaglandinas (PG) de las series III (Stacey y Goetz 1982), una de las PG mayoritariamente sintetizadas por los peces marinos (Ganga *et al.*, 2005), y II (Bell *et al.*, 1994), respectivamente. Puesto que estos ácidos grasos regulan la producción de eicosanoides, están indirectamente implicados en numerosos procesos reproductores (Moore, 1985), incluyendo la producción de hormonas esteroides, el desarrollo gonadal y la ovulación. Así, ambos ácidos grasos, modulan la esteroidogénesis en la gónada del carpín macho (Wade *et al.*, 1994). Por ello, una deficiencia o un desequilibrio de los AGEs en la dieta de los reproductores puede ocasionar una cierta inhibición de la esteroidogénesis que retrase la espermiación, y como consecuencia reduzca las tasas de fecundación. Es más, también se conocen las prostaglandinas como importantes feromonas en algunos teleósteos (Mustafa y Srivastava, 1989; Sorensen y Goetz, 1993; Rosenblum *et al.*, 1995), estimulando el comportamiento sexual masculino y sincronizando las puestas de

la hembra y el macho, afectando directamente así al éxito de la fecundación (Sorensen *et al.*, 1988).

4.3.4.-BIBLIOGRAFÍA

AHMADI, M.R., BAZYAR, A.A., S. SAFI, T. YTRESTØYL y B. BJERKENG. 2006. Effect of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J.Appl.Ichthyol.* 22: 388-394.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.

BARUA, A.B., KOSTIC, D. y J.A. OLSON. 1993. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols, and carotenoids in human serum. *J. Chromatogr.*, 617, 257-264.

BELL, J.G. y J.R. SARGENT. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities, *Aquaculture* 218: 491–499.

BELL, J.G., D.R. TOCHER, E.M. MACDONALD y J.R. SARGENT. 1994. Effect 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 eicosanoids production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 13(2): 105-118.

BELL, M. V., FARNDAL, B. M., BRUCE, M.P., J. M. NAVAS y M. CARRILLO. 1997. Effects of broodstocks dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*. 149: 107-119.

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.

BRITTON, G. 1995. UV/Visible spectroscopy. In *Carotenoids: Spectroscopy* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds). Vol. 1B. Birkäusen, Basel. 1998.

BRUCE, M.P., SHIELDS, R.J., 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 broodstocks. *Aquaculture and Fisheries Management*. 24: 417- 422.

BRUCE, M., F. OYEN, J.G. BELL, J.F. ASTURIANO, M. CARRILLO, S. ZANUY, J. RAMOS y N. BROMAGE. 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of $n - 3$ and $n - 6$ highly unsaturated fatty acids to reproductive performance. *Aquaculture*. 177: 85–97.

CEJAS, J.R., ALMANSA, E., VILLAMANDOS, J.E., BADIA, P., BOLAÑOS, A. 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.

CHOUBERT, G. y J. M. BLANC. 1998. Muscle pigmentation changes during and after spawning in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, red dietary carotenoids. *Aquat. Living Resour.*, 6:163-168.

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.

DABROWSKI, K., LUCZYNSKI, M., CZECZUGA, L. y S. FALKOWSKI. 1987. Relationships among corregonid fresh reproductive effort, carotenoid content in eggs and survival of embryos. *Arch. Hydrobiol.*, (Suppl.) 79, 29-48.

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.

DOMARCO, E. 2001. Efecto de la calidad de la dieta sobre las puestas de dorada (*Sparus aurata*). Tesis de Máster, 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.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., HERNÁNDEZ, C.M., FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.E., VERGARA, J.M. y L. ROBAINA. 1990. Influencia de distintas proporciones hembra:macho en la puesta de dorada (*Sparus aurata* L.) *Actas II Congreso Nacional de Acuicultura*. CSIC, Cádiz, Spain, pp. 27-31.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VALENCIA A., SALHI M. y J.M. VERGARA. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132, 325-337.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VALENCIA A., SALHI, M. 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, 233-246.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., GONZÁLEZ, M., ROBAINA, L. y A. VALENCIA. 1998. Combined effect of dietary α -tocoferol and n-3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 161, 475-476.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S. y L. ROBAINA. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. *Informes Técnicos del Instituto Canario de Ciencias Marinas*, Nº 12, 200 pp.

FERNÁNDEZ-PALACIOS H. y M.S. IZQUIERDO. 2009. Efectos de la dieta de los reproductores sobre la puesta. En: La reproducción de los peces: aspectos básicos y su aplicación en acuicultura. *Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura*. M. Carrillo, coordinador. J. Espinosa de los Monteros, editor científico. pp 339-399.

FOLCH, J., LEES, M. 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.

FURUITA, H., TANAKA, H., YAMAMOTO, T., SUZUKI N. y T. TAKEUCHI. 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstocks diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Aquaculture*, 210(1-4), 323-333.

FURUITA, H., YAMAMOTO, T., SHIMA, T., N. SUZUKI y T. TAKEUCHI. 2003. Effects of arachidonic acid level in broodstocks diet on larval and egg quality of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220(1-4): 725-735.

GANGA,R., J.G. BELL, D. MONTERO, L. ROBAINA, M.J. CABALLERO y M.S. IZQUIERDO. 2005. Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 142: 410 – 418

HARDY, R.W., MATSUMOTO, T., FAIRGRIEVE, W.T. 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: *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. In Fish* (Takeda, M. y Watanabe, T. eds), pp.347-356, The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture., Japan Translation Center, Tokyo

HARRIS, L.E. 1984. Effects of a broodfish diet fortified with canthaxanthin on female fecundity and egg color. *Aquaculture*. 43:179-183.

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.

INGLE DE LA MORA, G., ARREDONDO-FIGUEROA, J., PONCE-PALAFOX, J., BARRIGA-SOSA, I.D. y E.J. VERNON-CARTER. 2006. Comparison of red chilli (*Capsicum annum*) oleoresin and astaxantin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fillet pigmentation. *Aquaculture*, 258, 487-495.

IZQUIERDO, M.S. y H. FERNÁNDEZ-PALACIOS. 1997. Nutricional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cah. Options Mediterr.*, 22, 243-264.

IZQUIERDO, M.S., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., ARAKAWA, T. y C. KITAJIMA. 1990. Optimal EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). In: *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. (M. Takeda y T. Watanabe, editors). pp. 221-232. Tokyo University of Fisheries, Japan.

IZQUIERDO, M.S., FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. y A.G.J. TACON. 2001. Effects of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197, 25-42.

IZQUIERDO, M.S., KALINOWSKI, C.T., THONGROD, S. y L. ROBAINA. 2005. Nutritional needs for correct pigmentation in European red porgy *Pagrus pagrus*. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. (Lyons, T.P. y Jacques, K.A. Eds.) pp. 307-313. Nottingham Univ.

KALINOWSKI, C.T., ROBAINA, L.E., FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., SCHUCHARDT, D. y M.S. IZQUIERDO. 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture*, 244 (1-4), 223-231.

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.

LANE, R.L. y C.C. KOHLER. 2006. Effects of dietary lipid and fatty acids on reproductive performance, egg hatchability and overall quality of progeny of white bass *Morone chrysops*, *N. Am. J. Aquaculture* 68:141–150.

LI, Y., CHEN W., SUN Z., J. CHEN y K. WU. 2005. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorynchus cinctus*. *Aquaculture*, 245: 263-272.

LIE, O., A. MANGOR-JENSEN y G. HEMBRE. 1993. Broodstocks nutrition in cod (*Gadus morhua*) effect of dietary fatty acids. *Fiskeridir. Skr., Ser. Emaer.*, 6:11-19.

LING, S., KUAH, M., TENGGU, T., S. KOLKOVSKI y A.C. SHU-CHIEN. 2006. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture* 261:204-214.

MAZORRA, C., BRUCE, M., BELL, J.G., DAVIE, ALOREND, E., JORDAN, N., REES, J., PAPANIKOS, N., M. PORTER y N. BROMAGE. 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 227: 21-33.

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.

MOORE, P.K. 1985. Prostanoids: pharmacological, physiological and clinical relevance. Cambridge Univ.Press, Cambridge. 263 pp.

MUSTAFA, T. y K. C. SRIVASTAVA. 1989. Prostaglandinas (eicosanoids and their role in ectothermic organisms. *Adv.Comp.Env.Physiol.*, 5:157-207.

NAVAS, J. M., BRUCE, M., THRUSH, M., FARNDALE, B.M. BROMAGE, ZANUY, S., CARRILLO, M., 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.

OMNES, M.H., S. RECEK, H. BARONE, H. LE DELLIU, A. SCHMITZ, A. MUTELET, M. SUQUET y J.H. ROBIN. 2004. Influence of dry diets on reproductive performance and egg lipid composition during the first spawning season of captive pollack. "Nature and Culture" Comparative Biology and Interactions of Wild and Farmed Fish. Annual International Conference. Imperial College, London, 19-23 July 2004.

PANGANTIHON-KUHLMANN, M.P., MILLAMENA, M. y Y. CHERN. 1998. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquat. Living Resour.*,11, 403-409.

PICKOVA, J., E. BRÄNNÄS y T. ANDERSSON. 2007. Importance of fatty acids in broodstock diets with emphasis on Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eggs. *Aquacult Int* .15:305–311.

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. Proceeding of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, The University of Texas, Austin (USA), p.138.

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.

SMITH, B.E., HARDY, R.W. y O.J. TORRISSEN. 1992. Synthetic astaxanthin deposition in pan-sized coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 104, 105-119.

SOKAL, R.R. y J. ROLF. 1979. Biometría. Blume, Madrid.

SORENSEN, P.W y F.W. GOETZ. 1993. Pheromonal function of prostaglandin metabolites in teleost fish. *J. lipid Mediat.*, 6:385.

SORENSEN, P.W., HARA, T.J., STACEY, N.E. 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.

STACEY, N.E. y F.W. GOETZ. 1982. Role of prostaglandins in fish reproduction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 92-98.

STICKNEY, R. 1996. Principles of aquaculture. Chap.7. 352-358. Ed. John Wiley y Sons, Inc.

STOREBAKKEN T. y U.C. GOSWAMI. 1996. Plasma carotenoid concentration indicates the availability of dietary astaxanthin for Atlantic salmon, *Salmo salar*, *Aquaculture*, 146, 147-153.

TVERANGER, B.1986. Effect of pigment content in broodstock diet on subsequent fertilization rate, survival and growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) offspring. *Aquaculture*. 53: 85-93.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., IMAIZUMI, H. y T. YAMAZAKI. 2002. Spawning performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed dry pellets containing paprika and squid meal. *Fisheries Science*, 68, 230-232.

VERAKUNPIRIYA, V., MUSHIAKE, K., KAWANO, K. y K. WATANABE. 1997. Supplemental effect of astaxanthin in broodstock diets on the quality of yellowtail eggs. *Fish.Sci.*, 63, 816-823.

WADE, M.G., VAN DER KRAAK, G., GERRITS, M.F. y J.S. BALLANTYNE. 1994. Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in the goldfish testis. *Biol. Reprod.*, 51, 131-139.

WATANABE, T. y V. KIRON. 1995. Broodstock management and nutritional approaches for quality offsprings in the Red Sea Bream. In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (Bromage, N.R. y Roberts, R.J. Eds.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 424 pp.

WATANABE, T. y R. VASSALLO-AGIUS. 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227, 35-61.

WATANABE, T., KOIZUMI, T., SUSUKI, H., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., KITADA, T. Y y. TSUKASHIMA. 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., KOIZUMI, T., SUSUKI, H., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., KITADA, T. y Y. TSUKASHIMA. 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, C. KITAJIMA y S. FUJITA. 1984c. Effect of protein levels on reproduction of red sea bream. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 50: 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., KOTZUMI, T., SUZUKI, H., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., T. TIKADA y 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. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 51: 1511-1521.

WATANABE, T., LEE, M. J., MIZUTANI, J., YAMADA, T., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., KITADA, T. y T. ARAKAWA. 1991a. Effective components in cuttlefish meal and raw krill for the improvement of quality of red sea bream *Pagrus major* eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 681-694.

WATANABE, T., FUJIMURA, T., LEE, M.J., FUKUSHO,K., SATOH, S. y T. TAKEUCHI. 1991b. Effect of polar and non-polar lipids from krill on quality of eggs of red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 695-698.

WYBAN, J., MARTÍNEZ, G. y J. SWEENEY. 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *J. World Aquaculture*, 28, 59-62.

ZHANG, L., B. BENSON y J. L. LOGAN. 1992. Dietary fish oil delays puberty in female rats. *Biol. Reprod.*, 47:998-1003.

ZOHAR, Y., HAREL, M., HASSIN, S. y A. TANDLER. 1995. Gilthead seabream. In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (Bromage, N.R. y Roberts, R.J. Eds.),. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 424 pp.

4.4 EXPERIMENTO IV. NIVELES COMBINADOS DE CAROTENOIDES Y VITAMINA E EN DIETAS PARA REPRODUCTORES DE DORADA (*Sparus aurata* L.) Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE LA PUESTA Y COMPOSICIÓN DE LOS HUEVOS.

4.4.1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario en peces es dependiente de los nutrientes esenciales presentes en los huevos. Como ha sido bien demostrado el desarrollo gonadal en los peces está muy influenciado por la nutrición de los reproductores. Desde 1980 ha aumentado la atención sobre el papel que tienen los diversos compuestos nutricionales en las dietas de reproductores (Luzzana *et al.*, 1997).

Dentro de los nutrientes esenciales, los ácidos grasos dietéticos son los que más influyen en la reproducción (Izquierdo *et al.*, 2001). Otro componente esencial en la dieta de peces es la vitamina E, su papel en los procesos reproductivos ha sido conocido desde hace décadas en los mamíferos, sin embargo, no fue hasta fines de la década de los 80 cuando Watanabe (1990) señaló su importancia en los peces. La principal función de la vitamina E es servir como antioxidante no enzimático, siendo fisiológicamente su papel más importante en los vertebrados (Packer, 1991). En la actualidad se reconoce que la vitamina E es uno de los nutrientes mas importantes para la reproducción de los peces (Izquierdo *et al.*, 2001), y se ha demostrado que su inclusión dietética favorece la calidad de las puestas en varias especies de peces marinos (Watanabe y Takashima, 1977; Takeuchi *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1985, 1991 a, b; Sutjaritvongsanon, 1987; Watanabe, 1990; Schimittou, 1993; Mushiake *et al.*, 1993; Dube, 1996; Shiranee y Natarajan, 1996; Izquierdo *et al.*, 2001; Morehead *et al.*, 2001; Fernández-Palacios *et al.*, 2005).

Por otro lado, los carotenoides que también cumplen, entre otras, una función antioxidante (incluyendo la protección de los lípidos a la oxidación), se han vistos relacionados en procesos reproductivos de organismos marinos tanto en crustáceos (Liñan-Cabello *et al.*, 2004) como en peces (Watanabe y Kiron, 1995; Verakunpiriya *et al.*, 1997 a, b; Vassallo-Agius *et al.*, 2001 a,b,c, 2002;

Watanabe y Vassallo-Agius 2003) y también en peces de agua dulce (Ahmadi *et al.*, 2006).

Watanabe *et al.* (1991 a,b) señalan que, la vitamina E y los carotenoides juegan un papel determinante en la calidad de la puesta y su capacidad antioxidante ha sido demostrada, pero sus niveles óptimos en las dietas de muchas especies no han sido determinados. En concreto, en la dorada (*Sparus aurata*) (Fernández-Palacios *et al.*, 2005) encontraron que la alimentación de reproductores con dietas deficientes en vitamina E disminuyó los porcentajes de huevos fecundados. También observaron una reducción del porcentaje de huevos viables con morfología normal. Mientras que la elevación de los niveles de n-3 HUFA (ácidos grasos altamente insaturados con ≥ 20 átomos de carbono) de 1,6 a 2,2 % (peso seco) en dietas con 125 mg/kg de vitamina E, no solo no mejora la calidad de los desoves sino que además ocasiona un alto porcentaje de larvas deformes con hipertrofia del saco vitelino (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Estudios posteriores encontraron que la elevación conjunta de los niveles de n-3 HUFA de 1,7 a 2,5 y de vitamina E de 125 a 190 mg/kg, mejora significativamente la calidad de las puestas y previene la formación de larvas deformes (Fernández-Palacios *et al.*, 1998, 2005).

Estudios recientes, utilizando oleorresina de pimentón como carotenoides en las dietas para reproductores, de dorada, durante la puesta, muestran que el incremento conjunto de n-3 HUFA de 2,5 a 4 % y la elevación del contenido de carotenoides dietéticos de 30 a 60 mg/kg, mejora significativamente la calidad de la puesta en términos de fecundidad, porcentajes de huevos viables, de eclosión y supervivencia larvaria Scabini *et al.* (en revisión). Sin embargo, en esta especie no hay estudios sobre componentes esenciales dietéticos combinados de vitamina E y carotenoides y su efecto en la puesta. Como es sabido, los peces no pueden sintetizar las vitaminas ni los carotenoides por lo que deben de obtener a través de las dietas. El objetivo del presente estudio es determinar el efecto en dos niveles de vitamina E combinado con carotenoides, utilizando oleorresina de pimentón comercial, como fuente de los mismos, sobre la calidad de la puesta de la dorada.

4.4.2. MATERIAL Y METODOS

Reproductores

Treinta y seis reproductores de dorada (*Sparus aurata*), de 2-4 años de edad procedentes de las instalaciones de cultivos marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), fueron distribuidos al azar en doce tanques circulares de fibra de vidrio de 1000 l en una proporción de 2♂:1♀ Fernández-Palacios *et al.* (1990). Con circuito abierto de 160 l/h lo que implicaba una renovación diaria de 4 veces el volumen del tanque y provistos de aireación complementaria. La temperatura del agua de los tanques de reproductores durante la experiencia se registro en forma diaria y fue de $21,6 \pm 1,32$ °C, mientras que la salinidad y saturación de oxígeno del agua se registraron semanalmente, siendo los valores de salinidad de $36,8 \pm 0,001$ ppm, y de $7,38 \pm 2,27$ ppm el oxígeno. El foto periodo fue natural. Las puestas fueron espontáneas y los huevos fueron colectados diariamente. La calidad de los desoves fue determinada según la metodología descrita por Fernández-Palacios *et al.* (1995). Las características biométricas de los reproductores se muestran en la Tabla XXVII.

Tabla XXVII.- Características biométricas de los reproductores

Grupo experimental	0 / 100	60 / 100	0 / 250	60 / 250
<i>Machos</i>				
Peso corporal (kg)	0,914±0,217	0,753±0,170	0,710±0,106	0,972±0,171
Longitud estandar (cm)	33,0±2,9	31,3±1,7	31,2±1,2	34,2±1,9
Factor Condición ²	25,1±1,3	24,4±2,1	23,3±1,0	24,2±1,4
<i>Hembras</i>				
Peso corporal (kg)	1,133 ±0,565	1,272±0,191	1,22±0,272	1,711±0,491
Longitud estandar (cm)	35,2±6,01	37,2±3,3	36,3±2,8	39,8±2,8
Factor Condición ²	24,8±1,3	24,9±3,0	25,3±1,1	26,6±2,4
Biomasa (kg/m ³)	2,96±0,90	2,77±0,45	2,64±0,48	3,65±0,49

(Media ± (DE); Factor de Condición = [Peso corporal(g)x1000]/[Longitud Estándar (cm)]³).

Dietas

La composición y análisis proximal de las dietas experimentales se muestran en la Tabla XXVIII. Se formularon cuatro dietas isolipídicas e

isoproteicas con harina de calamar y aceite de pescado como fuentes protéicas y de lípidos, conteniendo dos niveles de vitamina E (100 y 250 mg/kg) con y sin inclusión de carotenoides (CRT's) (0 y 60 mg/kg) utilizando como fuente oleorresina de pimentón, dietas : 0 / 100, 60 / 100, 0 / 250 y 60 / 250. En la Tabla XXIX se muestran los ácidos grasos de las dietas así como algunas relaciones entre ellos.

Tabla XXVIII.- Composición y análisis proximal de las dietas experimentales

Ingredientes (g/100 g dieta)	Grupo experimental			
	0/100	60/100	0/250	60/250
Harina de calamar ^a	59	59	59	59
Aceite de pescado	6	6	6	6
Mezcla Vitaminas ^b	2	2	2	2
Mezcla Minerales ^b	2	2	2	2
Almidón gelatinizado ^c	25,26	25,26	25,26	25,26
Pimentón ^d	0	0,14	0	0,14
Ac. Oleico	0,74	0,74	0,74	0,74
α – Celulosa	5	5	5	5
Composición Analítica				
Proteínas (%)	49,44	48,60	48,61	48,21
Lípidos (%)	12,54	10,98	11,10	11,54
Cenizas (%)	4,43	4,25	4,28	4,24
Humedad (%)	9,22	9,39	9,71	8,35
Carbohidratos ¹	33,59	36,17	36,01	36,01
n-3 HUFA (% peso seco)	3,51	3,45	3,25	3,56
Total carotenoides (µg/g muestra)	11,01	52,19	10,76	54,09
Vitamina E (mg/kg)	89	87	134	135
Total carotenoides / Vitamina E	0,12	0,60	0,08	0,40

^a Rieber y Son Ltd., Bergen, Noruega

^b Fernández-Palacios *et al.* (1998).

^c Merigel 100 Amylum Group

^d Oleorresina, José Martínez y Cía. S.A. (Murcia, España)

¹ Calculado por diferencia Carbohidratos = 100 – (%Proteína + % Lípidos + % Ceniza) %

Tabla XXIX.- Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales (% Total de ácidos grasos)

Acidos Grasos (% Area)	Grupo experimental			
	0 / 100	60 / 100	0 / 250	60 / 250
14:0	5,70	5,31	5,61	5,42
15:0	0,62	0,50	0,54	0,51
16:0 iso	0,07	0,06	0,07	0,07
Me16:0	0,40	0,41	0,41	0,39
16:0	24,72	22,34	24,59	22,22
17:0	0,63	0,54	0,58	0,58
18:0	3,71	3,39	3,70	3,45
20:0	0,16	0,14	0,16	0,15
Saturados	36,01	32,70	35,67	32,78
14:1(n-7)	0,00	0,00	0,03	0,00
14:1(n-5)	0,15	0,14	0,14	0,14
16:1(n-9)	6,28	6,04	6,04	6,05
16:1(n-7)	0,18	0,17	0,17	0,17
16:1(n-5)	0,28	0,26	0,29	0,28
18:1(n-9)	11,62	11,24	10,95	11,36
18:1(n-7)	2,34	2,21	2,25	2,24
18:1(n-5)	0,21	0,18	0,19	0,19
20:1(n-9)	0,00	0,00	2,55	2,61
20:1(n-7)	2,67	2,55	0,14	0,15
22:1(n-11)	0,53	0,52	0,51	0,59
Monoenoicos	24,25	23,31	23,28	23,77
16:2(n-6)	0,28	0,24	0,27	0,27
18:2(n-6)	4,14	4,68	4,14	4,68
18:3(n-6)	0,21	0,21	0,21	0,21
20:2(n-6)	0,22	0,21	0,21	0,21
20:4(n-6)	0,94	0,99	0,95	0,98
22:4(n-6)	0,57	0,61	0,58	0,60
(n - 6) PUFA	6,35	6,95	6,36	6,95
16:3(n-3)	0,00	0,00	0,04	0,04
16:4(n-3)	0,06	0,06	0,06	0,06
18:3(n-3)	0,79	0,88	0,78	0,87
18:4(n-3)	1,10	1,19	1,12	1,17
20:3(n-3)	0,12	0,12	0,12	0,12
20:4(n-3)	0,30	0,31	0,29	0,30
20:5(n-3)	10,47	11,56	10,83	11,39
22:5(n-3)	1,11	1,25	1,23	1,24
22:6(n-3)	15,99	18,18	16,81	17,82
(n - 3) PUFA	29,94	33,55	31,28	33,01
PUFA	36,29	40,49	37,64	39,96
(n - 3) HUFA	27,99	31,43	29,29	30,88
(n - 9)	17,98	17,35	19,61	20,10
AA / EPA	0,09	0,09	0,09	0,09
EPA / DHA	0,65	0,64	0,64	0,64
EPA / ARA	11,15	11,64	11,43	11,66
oleico / DHA	0,73	0,62	0,65	0,64
oleico / Σ n-3HUFA	0,42	0,36	0,37	0,37
n-3 / n-6	4,71	4,83	4,92	4,75

Análisis bioquímicos

Las muestras por triplicado de dietas y huevos fueron analizadas de acuerdo con el siguiente procedimiento: humedad, proteína y cenizas fueron llevadas a cabo bajo los protocolos de AOAC (1995). Los lípidos totales fueron extraídos por el método Folch *et al.* (1957). Los ácidos grasos de las dietas y huevos fueron obtenidos por transmetilación descrita por Christie (1982). Los FAME fueron separados, identificados y cuantificados por cromatografía gas-líquida bajo condiciones descrita por Izquierdo *et al.* (1990).

La extracción de carotenoides y vitamina E de las dietas y huevos fueron realizadas siguiendo el método de Barua *et al.* (1993) y leídas en el espectrofotómetro en el caso de carotenoides para su cuantificación. Mientras que para la cuantificación de la Vitamina E en el cromatógrafo (HPLC) fueron resuspendidas previamente con acetonitrilo: metanol para su lectura.

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se han expresado como media \pm desviación estándar de la media. Los datos procedentes de diferentes tratamientos de un mismo experimento se compararon estadísticamente utilizando el análisis de varianza ANOVA (Sokal y Rolf, 1979). Detectadas las diferencias significativas a través del ANOVA, las diferencias entre medias fueron comparadas mediante el test de Duncan, como criterio general se tomó un 5 % de nivel de significación.

Cuando las varianzas eran heterogéneas y/o los datos no presentaban una distribución normal se intentaba hacerlas homocedásticas transformando las variables en sus logaritmos o bien con la función arco seno. Si la heterogeneidad persistía en los datos, se empleaba el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Sokal y Rolf, 1979). Para la comparación de dos datos se utilizó el test de la “t” de Student. Los datos se analizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS (Versión 3.1 Plus para Windows; Graphic Software Systems, Inc.USA).

4.4.3. RESULTADOS

Parámetros biológicos de las puestas

Las dietas experimentales fueron aceptadas satisfactoriamente y no se observó ninguna mortalidad durante el periodo experimental. En todos los tanques se obtuvieron puestas. Se compararon los datos de parámetros de calidad entre los replicados de una misma dieta y se encontró que no había diferencias significativas entre ellos. Durante las cuatro primeras semanas del experimento se les suministro una dieta comercial (Proaqua, Palencia, España) común para todos los tanques. Finalizado dicho periodo se continuaron alimentando pero con las dietas experimentales al 1,5 % de la biomasa de cada tanque repartidos en tres tomas diarias (9:00, 11:00 y 15:00 h) todos los días de la semana. Se observó (Tabla XXX) que las puestas de los reproductores alimentados con la dieta 60/100 son las que tienen el porcentaje más alto de huevos vivos, el más bajo es el obtenido en las puestas de los reproductores alimentados con la dieta 60/250, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales. Los reproductores alimentados con esta última dieta, tuvieron los porcentajes más bajos de eclosión, y de larvas con el saco vitelino reabsorbido y el más alto de huevos no fecundados, diferenciándose significativamente, en el porcentaje de huevos no fecundados y de eclosión con las puestas de los reproductores alimentados con la dieta 0/100 que tuvieron los mejores resultados en cuanto a huevos no fecundados, eclosión y larvas con el saco vitelino reabsorbido. No se observaron huevos anormales, ni con más de una gota lipídica, así como tampoco larvas anormales durante el experimento.

Tabla XXX.- Índices de las puestas de los reproductores

Índices de las puestas (%)	Grupo experimental			
	0/100	60 / 100	0 / 250	60 / 250
	n = 36	n = 38	n = 33	n = 23
Huevos vivos	87,35 ± 8,75 ^{ab}	90,61 ± 6,43 ^a	88,94 ± 6,14 ^{ab}	83,7 ± 8,24 ^b
Huevos muertos	11,73 ± 8,48 ^{ab}	6,19 ± 4,51 ^a	7,64 ± 5,06 ^{ab}	10,57 ± 7,81 ^b
Huevos no fecundados	1,5 ± 3,13 ^b	3,19 ± 4,26 ^{ab}	3,40 ± 3,98 ^a	5,71 ± 6,13 ^a
Eclosión	88,88 ± 10,22 ^a	86,72 ± 11,25 ^{ab}	88,77 ± 7,58 ^{ab}	79,73 ± 16,27 ^b
Larvas saco vitelino reabsorbido	82,13 ± 10,16	78,11 ± 12,62	80,28 ± 8,08	75,79 ± 15,79

* Valores con superíndices distintos en una misma fila indican diferencias significativas.

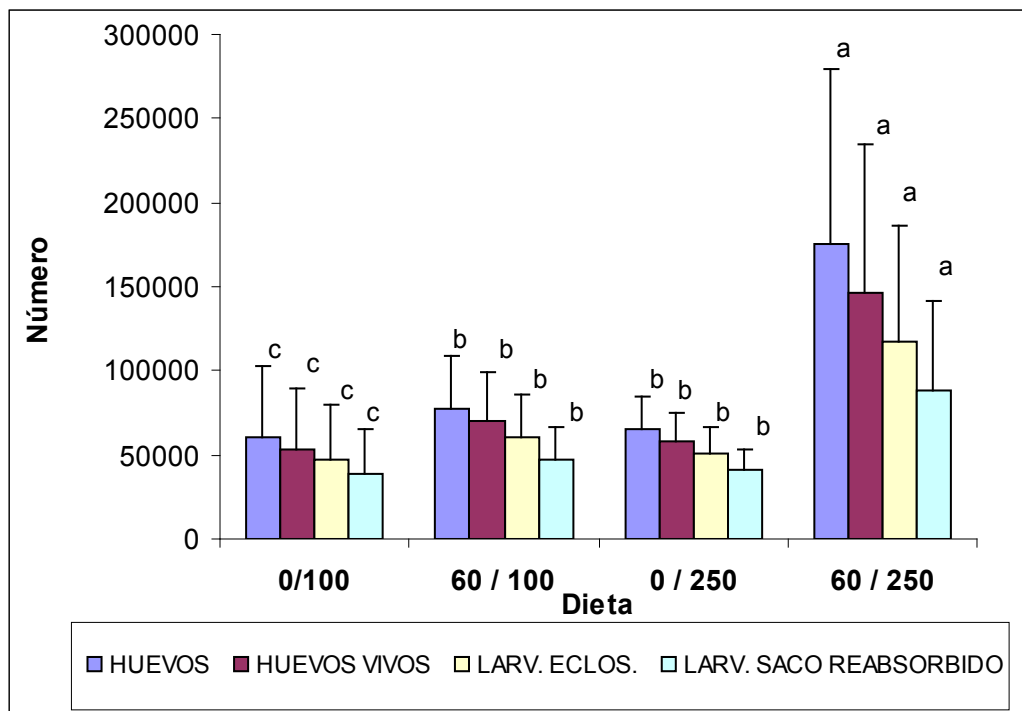
En cuanto a las medidas de huevos y larvas (Tabla XXXI), los huevos procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con las dietas con mayor nivel de vitamina E, son significativamente más pequeños que los de los reproductores alimentados con el nivel más bajo de vitamina E. En lo que respecta al diámetro de la gota de grasa aparecen diferencias significativas entre los huevos de los reproductores alimentados con las cuatro dietas experimentales, siendo el mayor el de la dieta 60/250. La longitud de las larvas de 1 día procedentes de los reproductores alimentados con la dieta 0/250 fue significativamente mayor que las de los reproductores alimentados con las dietas 0/100 y 60/250. Las larvas de los reproductores alimentados con la dieta 60/100 se diferenciaron significativamente de las de los reproductores de la dieta 0/100.

Tabla XXXI.- Medidas de huevos y larvas

Medidas (mm)	Grupo experimental			
	0/100	60 / 100	0 / 250	60 / 250
Diámetro huevo	959,39 ± 31,37 ^a	957,7 ± 32,80 ^a	942,58 ± 34,66 ^b	938,64 ± 27,99 ^b
Diámetro gota lipídica	231,85 ± 13,47 ^c	239,68 ± 14,20 ^b	231,65 ± 13,28 ^c	248,38 ± 18,69 ^a
Longitud larvas de 1 día de vida	2,52 ± 0,34 ^c	2,86 ± 0,41 ^{ab}	2,92 ± 0,34 ^a	2,75 ± 0,33 ^b

* Valores con superíndices distintos en una misma fila indican diferencias significativas.

Las producciones relativas (por kg de hembra y puesta): huevos totales, huevos vivos, número de larvas eclosionadas y número de larvas con el saco vitelino reabsorbido se indican en la Fig. 31. Se observa que la producción de los reproductores alimentados con la dieta 60/250 es la más elevada mostrando diferencias significativas con las demás producciones en todos los parámetros y, ello a pesar de que el porcentaje de huevos vivos, de los reproductores alimentados con esta dieta, fue el más bajo, y el porcentaje de huevos no fecundados el más alto de todos los grupos experimentales. Mientras que las producciones de los reproductores alimentados con la dieta 0/100 fueron las más bajas.



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

Fig. 31.- Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada alimentados con las diferentes dietas.

Por otro lado, para ver si existe un efecto combinado de los niveles dietéticos de carotenoides y vitamina E, sobre los índices de puestas se realizó un análisis de ANOVA multifactorial, existiendo un efecto combinado estadísticamente significativo de los carotenoides y vitamina E sobre el porcentaje de huevos no fecundados. También se observó un efecto significativo de los carotenoides con los porcentajes de eclosión y de larvas con el saco vitelino reabsorbido. Así como de la vitamina E el porcentaje de huevos vivos.

Composición bioquímica de los huevos

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

Tabla XXXII.- Composición de los huevos de los reproductores alimentados con las diferentes dietas

<i>Composición analítica</i>	Grupo experimental			
	0 /100	60 / 100	0 /250	60 /250
Lípidos % p.s.	22,79±3,37	22,35±4,34	24,56±4,52	26,1±3,32
Proteínas % p.s.	59,59 ± 8,13	62,47 ± 9,50	62,36 ± 9,14	65,0 ± 14,76
Cenizas %	0,39 ± 0,09	0,42 ± 0,10	0,45 ± 0,10	0,44 ± 0,12
Humedad %	93,51 ± 0,43	93,6 ± 0,76	93,35 ± 0,35	93,23 ± 0,43
Carotenoides µg/g	6,31 ± 4,12	14,80 ± 6,30	7,09 ± 4,09	14,22 ± 5,13
Vitamina E mg/kg	3,76 ± 2,05 ^b	3,57 ± 0,59 ^b	5,60 ± 1,69 ^a	5,56 ± 0,72 ^a

*Filas de una misma columna con o sin superíndices iguales no presentan diferencias significativas. Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Al analizar los resultados obtenidos se observa que el contenido en lípidos totales es ligeramente más elevado en los huevos procedentes de los reproductores alimentados con la dieta con los niveles más altos de vitamina E. Situación similar ocurre con el contenido de proteínas y cenizas, no habiendo diferencias significativas entre ellos.

Respecto al contenido de carotenoides no se observaron diferencias significativas entre los huevos procedentes de los reproductores alimentados con las distintas dietas, si se observa contenidos más altos en aquellos procedentes de reproductores alimentados con las dietas complementadas con carotenoides (dieta 60/100 y 60/250), independiente de los niveles de vitamina E contenidos en estas. Se encontraron correlaciones positivas entre el nivel dietético de carotenoides y su contenido en los huevos (Fig. 32).

Mientras que el contenido de Vitamina E, es significativamente más alto en los huevos provenientes de los reproductores alimentados con las dietas con los niveles más elevados de vitamina E (dieta 0/250 y 60/250), que en los huevos de los reproductores alimentados con las dietas con los niveles más bajos de vitamina E (dieta 0/100 y 60/100). Existen correlaciones positivas entre el contenido de vitamina E de las dietas y su nivel en los huevos (Fig. 33).

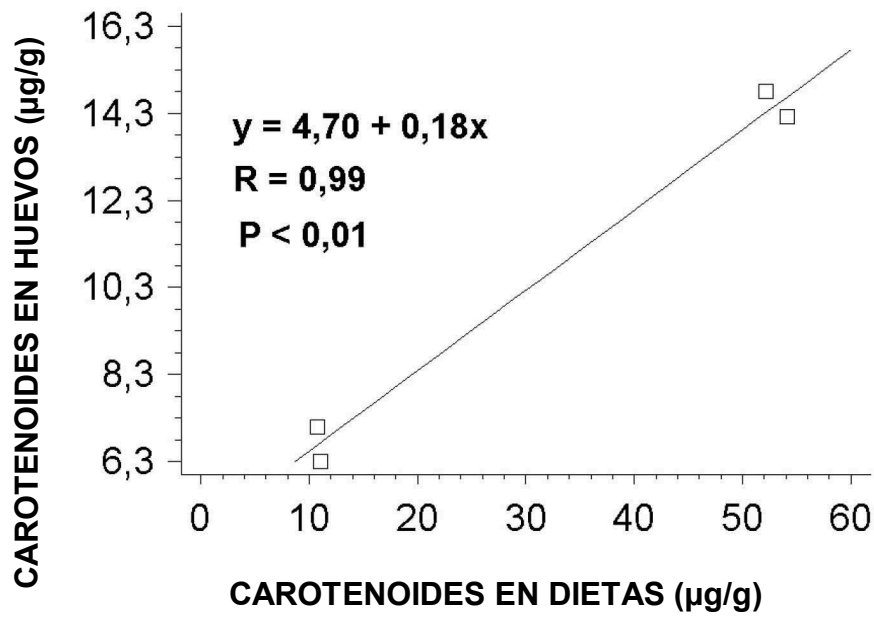


Fig. 32.- Relación entre el nivel dietético de carotenoides y su contenido en los huevos.

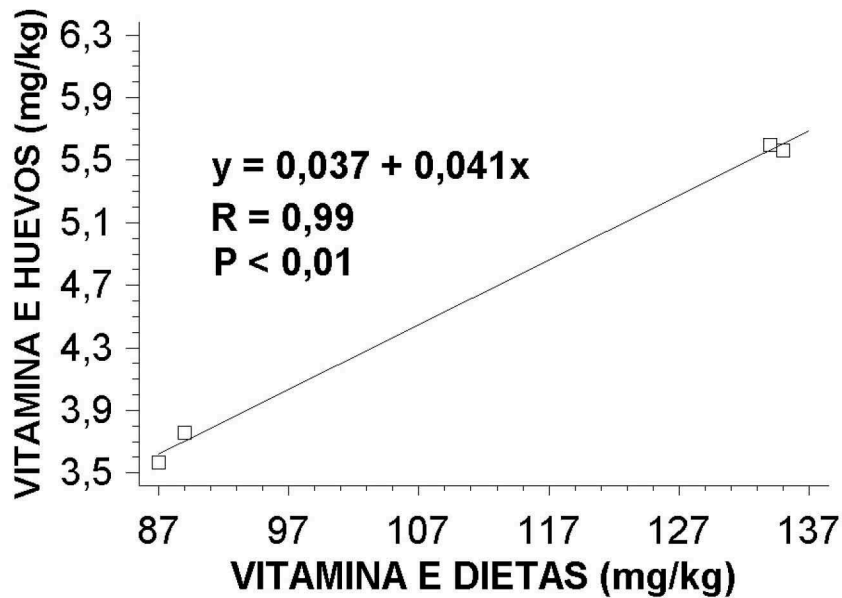


Fig. 33.- Relación entre el nivel dietético de vitamina E y su contenido en los huevos.

Los ácidos grasos presentes en mayor proporción en los lípidos de los huevos de las puestas de los reproductores de dorada (*Sparus aurata*) fueron: ácido Palmítico (16:0), ácido Decosahexaenoico DHA (22:6n-3) y ácido Oleico (18:1n-9) (Tabla XXXIII), independientemente de los ácidos grasos contenidos en las dietas. Seguidos en importancia por el ácido Eicosapentaenoico EPA (22:5n-3), ácido Hexadecenoico (16:1n-5) y por el ácido Linoléico (18:2n-6).

Al analizar los resultados obtenidos se observa además que el contenido de ácido Palmitoléico (16:1n-7) en los huevos de los reproductores alimentados con la 0/250 es significativamente mayor que en los huevos de los reproductores alimentados con la dieta 0/100. Mientras que el contenido de ácido Estéarico (18:0) en los huevos de los reproductores alimentados con la dieta 0/100 es significativamente más alto que en los huevos de las dietas 60/100 y 0/250. Situación contraria sucede el ácido Linoléico (18:2n-6) en las mismas dietas. También se observa diferencias significativas con el contenido más alto de ácido Araquidónico (20:4n-6) en los huevos de los reproductores alimentados con las dietas 0/100 y 60/250 que de los huevos procedentes de las dietas 60/100 y 0/250. Situación similar ocurre con el contenido de EPA en los huevos de las dietas 0/100 y 60/250 que difieren significativamente de la dieta 60/100. En lo que respecta al contenido de n-3 en los huevos, se observa una diferencia significativa en los reproductores alimentados con la dieta 60/100 de las dietas 0/100 y 60/100 que tienen valores más bajos.

Finalmente, los huevos procedentes de las puestas de los reproductores alimentados con la dieta 60/250 se caracterizaron por tener los contenidos de DHA y n-3 HUFA más altos. También la relación de los ácidos grasos de la serie n-3 /n-6 fueron significativamente los más altos que las demás dietas. Sin embargo, la relación AA/DHA contenidas en los huevos fue significativamente más baja que las demás dietas.

Tabla XXXIII.- Composición de los huevos (% total de ácidos grasos)

A. GRASOS	Grupo experimental			
	0/100	60/100	0/250	60/250
14:0	3,80 ± 0,93	4,19 ± 0,51	3,93 ± 0,81	3,77 ± 0,26
16:0	24,04 ± 3,44	22,31 ± 0,73	23,02 ± 1,28	22,59 ± 0,96
16:1n-9	0,33 ± 0,13	0,47 ± 0,13	0,52 ± 0,04	0,36 ± 0,09
16:1n-7	1,61 ± 0,46 ^b	1,89 ± 0,26 ^{ab}	2,04 ± 0,30 ^a	1,90 ± 0,19 ^{ab}
16:1n-5	6,29 ± 0,88	6,56 ± 0,31	6,29 ± 0,39	6,40 ± 0,29
16:2n-4	0,82 ± 0,11	0,81 ± 0,06	0,79 ± 0,04	0,88 ± 0,07
16:3n-4	0,54 ± 0,07	0,6 ± 0,04	0,59 ± 0,02	0,52 ± 0,05
16:3n-1	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,07	0,02 ± 0,0
18:0	5,30 ± 0,54 ^a	4,26 ± 0,53 ^b	4,54 ± 0,65 ^b	4,48 ± 0,46 ^{ab}
18:1n-9	15,00 ± 1,91	14,98 ± 1,19	14,68 ± 1,57	14,35 ± 1,06
18:1n-7	2,58 ± 0,23	2,55 ± 0,11	2,51 ± 0,13	2,49 ± 0,16
18:1n-5	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01
18:2n-6	4,58 ± 0,71 ^b	5,53 ± 0,42 ^a	5,40 ± 0,65 ^a	5,08 ± 0,33 ^{ab}
18:2n-4	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,02
18:3n-6	0,19 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,22 ± 0,02
18:3n-4	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,3 ± 0,01
18:3n-1	0,51 ± 0,06	0,62 ± 0,07	0,65 ± 0,05	0,75 ± 0,08
18:3n-3	0,58 ± 0,09	0,72 ± 0,05	0,73 ± 0,03	0,57 ± 0,08
18:4n-3	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02
20:1n-9	0,49 ± 0,02	0,57 ± 0,05	0,62 ± 0,04	0,68 ± 0,03
20:1n-7	0,08 ± 0,06	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,0	0,09 ± 0,0
20:2n-9	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01
20:2n-6	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
20:4n-6	0,98 ± 0,13 ^a	0,90 ± 0,06 ^b	0,91 ± 0,03 ^b	0,97 ± 0,003 ^a
20:4n-3	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02
20:5n-3	8,26 ± 1,32 ^a	7,61 ± 1,1 ^b	7,89 ± 0,86 ^{ab}	8,52 ± 0,89 ^a
22:1n-11	0,07 ± 0,004	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,003	0,03 ± 0,001
22:4n-6	0,72 ± 0,07	0,72 ± 0,07	0,73 ± 0,05	0,75 ± 0,06
22:5n-3	1,95 ± 0,26	2,00 ± 0,14	1,89 ± 0,20	1,66 ± 0,68
22:6n-3	19,54 ± 2,62	20,23 ± 1,64	20,56 ± 1,94	22,38 ± 1,41
Saturados	33,22 ± 1,90	32,01 ± 1,23	32,85 ± 2,3	32,35 ± 1,41
Mono	26,88 ± 1,84	26,91 ± 1,61	26,7 ± 1,74	25,09 ± 1,35
Σn3	31,92 ± 2,92	31,43 ± 3,08	31,02 ± 2,74	34,84 ± 0,85
Σn6	6,01 ± 1,23 ^b	7,37 ± 0,46 ^a	7,07 ± 0,67 ^{ab}	6,03 ± 1,02 ^b
Σn9	16,06 ± 1,71	16,04 ± 1,16	15,71 ± 1,24	14,86 ± 0,85
DHA/EPA	2,44 ± 0,32	2,64 ± 0,25	2,57 ± 0,28	2,63 ± 0,11
EPA/DHA	0,41 ± 0,05	0,38 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,01
n3/n6	4,82 ± 1,21 ^{ab}	4,29 ± 0,67 ^b	4,42 ± 0,64 ^{ab}	5,89 ± 0,98 ^a
AA/DHA	0,04 ± 0,007 ^a	0,04 ± 0,002 ^a	0,04 ± 0,003 ^{ab}	0,04 ± 0,005 ^b
sum n-3 HUFA	31,42 ± 3,19	30,7 ± 3,46	30,33 ± 2,80	34,56 ± 1,04

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

En cuanto a la composición bioquímica de los huevos y su relación con los índices de las puestas solo se ha encontrado correlaciones entre el porcentaje de huevos vivos y la relación AA/EPA (Fig. 34).

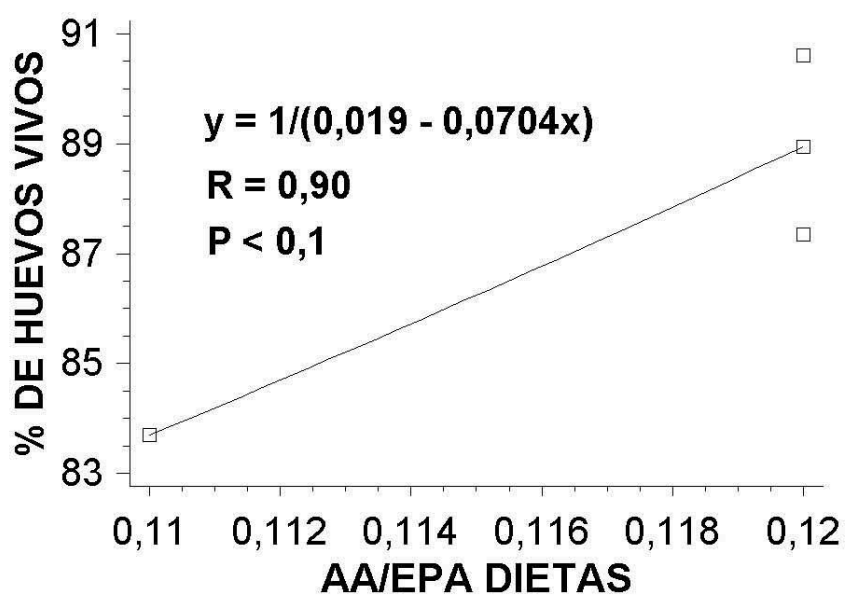


Fig. 34.- Correspondencia entre el porcentaje de huevos vivos con el nivel de la proporción AA / EPA en los huevos.

4.4.4.- DISCUSIÓN

En el presente experimento, los mejores resultados en cuanto a porcentaje de huevos no fecundados, eclosión y de larvas con el saco vitelino reabsorbido son obtenidos con la dieta 0/100 que contenía 89 mg de vitamina E por kilogramo de dieta y 11,01 µg de carotenoides por gramo de dieta. El contenido en n – 3 HUFA de las dietas experimentales fue de aproximadamente del 3,5% (peso seco). Fernández-Palacios *et al.* (1995), señalan un descenso del 10% del porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido, en las puestas de reproductores de dorada (*Sparus aurata*), alimentados con dietas conteniendo entre un 2% y un 3% (peso seco) de n -3 HUFA, pero sin complementar con antioxidantes. En esta mismo sentido Fernández-Palacios *et al.* (2005) señalan que, la elevación de los niveles dietarios de n-3 HUFA de 1,7 a 2,5 junto con la elevación del contenido dietario 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 larvas con el saco vitelino reabsorbido y disminución del porcentaje de huevos no fecundados, anormales morfológicamente y larvas anormales. En el presente experimento un nivel dietético de 3,51% (peso seco) de n – 3 HUFA junto a los niveles de Vitamina E y carotenoides contenidos en la dieta 0/100 parecen bastar para asegurar una buena calidad de puesta. En este experimento, la elevación de vitamina E de 100 a 250 mg/kg junto con la complementación con carotenoides provenientes de la oleorresina de pimentón podría prevenir el posible efecto negativo ocasionado por el alto contenido dietario de n-3 HUFA. Como señalaron Fernández-Palacios *et al.* (1995), un exceso de n-3 HUFA, por encima del 2,2%, en dietas de reproductores de dorada reducen la calidad de la puesta y produce hipertrofia del saco vitelino en las larvas.

Fernández–Palacios (2005) pudo comprobar posteriormente, que cuando se elevaron conjuntamente los niveles de vitamina E hasta 200-250 mg/kg, y los niveles de n-3 HUFA hasta un 2,5-2,8%, se obtiene mayor calidad en la puesta. No se observó hipertrofia del saco vitelino en las larvas. Por lo que sugiere, que niveles dietéticos adecuados de vitamina E permite mayores contenidos de n-3 HUFA en la dieta, y consiguientemente una mejor calidad de la puesta, poniendo de manifiesto una efectiva utilización de los ácidos grasos esenciales. Estudios

realizados por Cowey *et al.* (1983), sugieren que un aumento de los niveles de n-3 HUFA en las membranas pueden hacerlas más susceptibles a la oxidación y puede aumentar el requisito de antioxidantes.

Altos niveles dietéticos de DHA junto con bajos niveles dietéticos de vitamina E causan anormalidades en larvas de bacalao (Takeuchi *et al.*, 1994). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de niveles adecuados de antioxidantes en las dietas para la efectiva utilización de los ácidos grasos esenciales. El principal papel de la vitamina E y de los carotenoides es la protección de las membranas biológicas frente a los radicales libres producidos por la auto oxidación de los lípidos dietarios. Por esta razón altas ingestas de lípidos conteniendo ácidos grasos poliinsaturados aumentan las necesidades de antioxidantes 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 (1961) y Horwitt *et al.* (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 mas ácidos grasos poliinsaturados y monoenoicos que en truchas alimentadas con dietas conteniendo grasa de cerdo que contiene mas ácidos grasos saturados. El pez gato del canal (*Ictalurus punctatus*) alimentado con aceite oxidado sin suplementación 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 macropomun*) 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 positivos efectos

cuando son suministradas justo antes del comienzo de la puesta (Kanazawa, 1988).

En cuanto a las medidas de huevos y larvas, los huevos procedentes de las puestas de los reproductores de dorada (*Sparus aurata*), alimentados con las dietas con mayor nivel de vitamina E, son significativamente más pequeños, que los de los reproductores alimentados con el nivel dietético más bajo de vitamina E. Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentran que los huevos de reproductores de esta misma especie, alimentados con una dieta que contenía 2010 mg/kg eran mas pequeños que los de reproductores alimentados con una dieta que contenía 22,3 mg/kg de vitamina E, aunque en este caso no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En lo que respecta al diámetro de la gota de grasa, aparecen diferencias significativas entre los huevos de los reproductores alimentados con las cuatro dietas experimentales, siendo el mayor el de la dieta 60/250. En este mismo sentido Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentran diferencias significativas en el diámetro de la gota de grasa, siendo mayores los de los reproductores alimentados con los niveles más altos de vitamina E.

Las producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores alimentados con las dietas con mas alto contenido de carotenoides y vitamina E (60/250), fueron significativamente mayores que las del resto de los grupos experimentales. Koprücü y Seker (2003) encontraron que la adición de vitamina E en dietas para reproductores de guppy (*Poecilia reticulata*) y espada (*Xiphophorus helleri*) aumenta la fecundidad de las dos especies.

Por otro lado, los carotenoides son también potentes antioxidantes, protegiendo a la membrana celular de la degeneración peroxidativa causada por los radicales libres (Miki *et al.*, 1994). Además, de otras funciones como ser precursores de vitamina A o la de regular la quimiotaxis en los espermatozoides Izquierdo *et al.* (2005), siendo por todo ello muy importantes en la reproducción de los peces tanto en el desarrollo embrionario como larvario. Los requerimientos de antioxidantes se ha visto que se incrementan durante la época de reproducción (Izquierdo y Fernández-Palacios 1997; Fernández-Palacios *et al.* 1998. Así, en el Experimento III de este estudio se vio que inclusiones de 60 ppm

de carotenoides en la dieta junto con un alto contenido en n – 3 HUFA (2,86% peso seco), incrementaron de manera significativa las producciones relativas de los reproductores alimentados con esa dieta.

En el presente experimento se ha visto que existe un efecto combinado positivo, de los niveles dietéticos de carotenoides y vitamina E, en dietas con un alto contenido de n-3 HUFA, sobre los índices de puestas. Existiendo un efecto conjunto estadísticamente significativo de los carotenoides y vitamina E sobre el porcentaje de huevos no fecundados. También se observó un efecto significativo de los carotenoides en los porcentajes de eclosión y de larvas con el saco vitelino reabsorbido, y de la vitamina E en el porcentaje de huevos vivos cuando se analiza conjuntamente el efecto de ambos antioxidantes.

La complementación de las dietas con carotenoides y vitamina E incremento la concentración de estos dos antioxidantes en los huevos de los reproductores de dorada (*Sparus aurata*), encontrándose correlaciones positivas altamente significativas entre los niveles dietéticos y el de los huevos. En los Experimentos II y III del presente estudio, también se encontraron correlaciones positivas entre los contenidos en carotenoides de las dietas y su nivel en los huevos. Por otra parte Fernández-Palacios *et al.* (2005), indican una correlación positiva entre el nivel dietético de vitamina E y su contenido en los huevos en un experimento con reproductores de esta misma especie.

En el presente estudio se muestra que los niveles de lípidos contenidos en los huevos fueron independientes de los de las dietas. Similares resultados fueron observados también en lubina, *Dicentrarchus labrax* (Navas *et al.*, 1997) y en pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1985). Estudios anteriores realizados en dorada mostraron que los incrementos de ácidos grasos de la serie n-3 y n-3 HUFA en los huevos fueron debidos en su mayor parte a los incrementos de Linolénico, Estearidónico y EPA (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Li *et al.* (2005), en un estudio realizado con reproductores del crescent sweetlips (*Plectorhynchus cinctus*), señalan incrementos similares que fueron debidos principalmente al incremento DHA en los huevos. Sugiriendo una retención selectiva de este ácido graso durante la embriogénesis, y señalando la

importancia de este ácido graso para el desarrollo embrionario y larvario. Watanabe (1993) y Sargent (1995) señalan la importancia de los n-3 HUFA y en particular el DHA en los estadios embrionarios y larvarios en peces marinos. En el presente estudio, los incrementos de n – 3 HUFA en los huevos se deben principalmente al incremento de DHA y EPA en los mismos.

Se encontraron relaciones positivas entre la relación AA/EPA de los huevos y el porcentaje de huevos vivos. El AA es precursor de eicosanoides de la serie II de prostaglandinas que están involucradas tanto en la embriogénesis como en la eclosión (Bell *et al.*, 1997). Mientras que Bruce *et al.* (1999) y Furuita *et al.* (2002) señalan que las proporciones de DHA/EPA y AA/EPA son importantes índices para evaluar la calidad del huevo.

Los resultados de este estudio sugieren que los niveles de n-3 HUFA en dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) podría elevarse hasta un 3,5% cuando se complementan conjuntamente con carotenoides provenientes de oleoresina del pimentón y con vitamina E, mejorando así la calidad de la puesta de la dorada.

4.4.5. BIBLIOGRAFIA

AHMADI, M., BAZYAR, A., SAFI, S., YTRESTØYL, T. y B. BJERKENG. 2006. Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyol.* 22: 388-394.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.

BARUA, A.B., D. KOSTIC y J.A OLSON. 1993. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols, and carotenoids in human serum. *J. Chromatogr.*, 617, 257-264.

BELL, M.V., B.M. FARNDALE, M.P. BRUCE, J.M. NAVAS y M. CARRILLO. 1997. Effects of broodstocks dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 149, 107-119.

BRUCE, M., F. OYEN, G. BELL, J.F. ASTURIANO, B. FARNDALE, M. CARRILLO, S. ZANUY, J. RAMOS y N. BROMAGE. 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture* 177, 85-97.

CHRISTIE, W.W. 1982. Lipid Analysis. Pergamon Press, Oxford. (second revised edition) 207 pp.

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.

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.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., C.M.HERNÁNDEZ, J.E. FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.M. VERGARA y L. ROBAINA. 1990. Influencia de distintas proporciones hembra:macho en la puesta de dorada (*Sparus aurata* L.) *Actas II Congreso Nacional de Acuicultura*. CSIC, Cádiz, Spain, pp. 27-31.

FERNÁNDEZ-PALACIOS H. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 320 pp.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VALENCIA A., SALHI M. y J.M. VERGARA. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132, 325-337.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S., GONZÁLEZ, M., ROBAINA, L. y A. VALENCIA. 1998. Combined effect of dietary α -tocoferol and n-3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 161, 475-476.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S. y L. ROBAINA. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. *Informes Técnicos del Instituto Canario de Ciencias Marinas*, Nº 12, 200 pp.

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.

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, 323-333.

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.

IZQUIERDO, M.S., T. WATANABE, T.TAKEUCHI, T. ARAKAWA y C. KITAJIMA. 1990. Optimal EFA levels in Artemia to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). In: *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. (M. Takeda & T. Watanabe, editors). pp. 221-232. Tokyo University of Fisheries, Japan.

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. TACON . 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.

IZQUIERDO, M.S., KALINOWSKI, C.T., THONGROD, S. y , L. ROBAINA. 2005. Nutritional needs for correct pigmentation in European red porgy *Pagrus pagrus*. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. (Lyons, T.P. y Jacques, K.A. Eds.) pp. 307-313. Nottingham Univ.

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.

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.

LI, Y., WEI-ZHOU, C., ZE-WEI, S., JIE-HUI, C. y W. KE-GANG. 2005. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. *Aquaculture* 245: 263-272.

LIÑAN-CABELLO, M., MEDINA-ZENDEJAS, R., SÁNCHEZ-BARAJAS, M. y A. HERRERA. 2004. Effects of carotenoids and retinol in oocyte maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquacult. Res.* 35: 905-911.

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.

LUZZANA, U., F. VALFRE, y J.E. HALVER. 1997. A brief review of the role of select micronutrients in fish reproduction and estimated dietary requirements of broodstock. *Riv. Ital. Acquacol.* 32: 13-29.

MIKI, W., N. OTAKI, N. SHIMIDZU y A. YOKOYAMA. 1994. Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. *J.Mar.Biotechnol.* 2,35-37.

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 lineate*) and captive striped trumpeter that were fed different diets. *Aquaculture*, 192(1):39-53.

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.

NAVAS, J. M., M.BRUCE, M. THRUSH, B.M.FARNDAL, N. BROMAGE, S. ZANUY, M. CARRILLO, J.G. BELL y J. RAMOS. 1997. The impact of seasonal alternation in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish Biol.*51, 760-773.

PACKER, L. 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:1050S-1055S.

SARGENT, J.R. 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage, N.R., Robert, R.J. (Eds.), Broodstocks management and egg and larval quality. Blackwell, Oxford, pp.353-372.

SCHIMITTOU, H.R.1993. High density fish culture in low volume cages. M.I.T.A. (P) N° 518, vol AQ41, 75 pp.

SHIRANEE, P. y P. NATARAJAN. 1996. Crude palm oil as a source of carotenoids and tocopherols to enhance reproductive potencial in pearlspot *Etroplus suratensis*. *Asian Fisheries Science*, 9 (1):35-44.

SOKAL, R.R. y J. ROLF. 1979. Biometría. Blume, Madrid.

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., N° 12, p.2.

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.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., SATOH, S., KIRON, V., IMAIZUMI, H., YAMAZAKI, T. y K. KAWANO. 2001 a. Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck y Schlegel). *Aquaculture Research*, 32 (suppl.1), 263-272.

VASSALLO-AGIUS, R., H. IMAIZUMI, T. WATANABE, T. YAMAZAKI, S. SATOH y V. KIRON. 2001 b. The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fisheries Science*, 67, 260-270.

VASSALLO-AGIUS, R., T. WATANABE, H. IMAIZUMI, T. YAMAZAKI, S. SATOH, y V. KIRON. 2001 c. Effects of dry pellets containing astaxanthin and squid meal on the spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Fisheries Science*, 67, 667-674.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., IMAIZUMI, H. y T. YAMAZAKI. 2002. Spawning performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed dry pellets containing paprika and squid meal. *Fisheries Science*, 68, 230-232.

VERAKUNPIRIYA, V., K. WATANABE, K. MUSHIAKE, K. KAWANO, T. KOBAYASHI, I. HASEGAWA, V. KIRON, S. SATOH y T. WATANABE. 1997a. Effect of a krill meal supplementation in sofá-pellets on spawning and quality of eggs of yellowtail. *Fish.Sci.*, 63, 433-439.

VERAKUNPIRIYA, V., K. MUSHIAKE, K. KAWANO y T. WATANABE. 1997b. Supplemental effect of astaxanthin in broodstock diets on the quality of yellowtail eggs. *Fish.Sci.*, 63, 816-823.

WATANABE, T. 1990. Effect of broodstock diets on reproduction of fish. *Actes Colloq.IFREMER*, 9:542-543.

WATANABE, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquac. Soc.* 24, 152-161.

WATANABE, T. y V. KIRON . 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. y R. VASSALLO-AGIUS. 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227, 35-61.

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., KOIZUMI, T., SUSUKI, H., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., KITADA, T. y Y. TSUKASHIMA. 1985. 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. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51, 1511-1521.

WATANABE, T., LEE, M. J., MIZUTANI, J., YAMADA, T., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., KITADA, T. y T. ARAKAWA. 1991a. Effective components in cuttlefish meal and raw krill for the improvement of quality of red sea bream *Pagrus major* eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 681-694.

WATANABE, T., FUJIMURA, T., LEE, M.J., FUKUSHO, K., SATOH, S. y T. TAKEUCHI. 1991b. Effect of polar and non-polar lipids from krill on quality of eggs of red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 695-698.

5. CONCLUSIONES

- 1.- Las dietas formuladas, con inclusión de carotenoides, fueron bien aceptadas por los reproductores. Se obtuvieron diferencias en la calidad de la puesta, entre los distintos tratamientos en todos los experimentos.
- 2.- En esta especie, la calidad de la puesta puede modificarse variando la calidad nutritiva de las dietas de los reproductores, incluso durante la época de puesta. En este sentido, en todos los experimentos, el contenido en carotenoides de las dietas experimentales se vio reflejado en los huevos de las puestas de los grupos de reproductores experimentales.
- 3.- La inclusión de carotenoides, como el pimentón en polvo, de origen vegetal produjo mejores resultados en la calidad de la puesta que la harina de langostino, de origen animal. Esto podría ser debido a que el nivel dietético de carotenoides en la dieta con pimentón en polvo, fue casi el doble que en las dietas con harina de carcasa langostino, más que al origen de los carotenoides que determinarían su calidad nutricional.
- 4.- Los resultados de este trabajo muestran que la calidad de la puesta de la dorada, puede mejorarse con la inclusión de entre un 1 y un 2 % de carotenoides, provenientes de pimentón comercial, en la dieta de los reproductores. Observándose una mejoría en el porcentaje de huevos vivos, de eclosión y de larvas con el saco vitelino reabsorbido, con respecto a dietas sin complementar o con un porcentaje más alto de complementación.
- 5.- Los resultados de este estudio sugieren que los niveles de n-3 HUFA en dietas para reproductores podrían elevarse hasta un 3,5 % cuando complementamos conjuntamente carotenoides provenientes de la oleoresina del pimentón y vitamina E, favoreciendo así la calidad de la puesta de la dorada.

- 6.- la inclusión de carotenoides y vitamina E, en las dietas, puede prevenir los posibles efectos adversos generados por elevados niveles de n-3 HUFA en piensos para reproductores.
- 7.- La sustitución de vitamina E, por carotenoides provenientes de la oleorresina del pimentón, podría tener un efecto económico positivo en la fabricación de piensos para reproductores en esta especie.
- 8.- Al igual que en estudios anteriores, no se encontraron relaciones entre las medidas de huevos y larvas con los parámetros de calidad de las puestas.
- 9.- Criterios morfológicos como la simetría de los blastómeros en las primeras divisiones celulares, y la transparencia del huevo, podrían ser utilizados como indicadores tempranos, de la viabilidad de los huevos de dorada.
- 10.- Los resultados del presente estudio indican, que una dieta para reproductores de dorada con aceite de pescado y harina de calamar como fuentes de lípidos y proteínas, niveles adecuados de vitamina E, y de carotenoides, provenientes del pimentón, permiten elevar los niveles dietéticos de n-3 HUFA hasta el 3,5% en peso seco. Asegurando así una excelente calidad de las puestas.

6. BIBLIOGRAFIA GENERAL

ABIDIN, M.Z., R. HASHIM y A.S.C. CHONG. 2006. Influence of dietary protein levels on growth and egg quality in broodstock female bagrid catfish (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.). *Aquaculture Research*, 37:416-418.

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.

AHMADI, M. R., A. A. BAZYAR, S. SAFI , T. YTRESTØYL y B. BJERKENG. 2006. Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyol.*, 22:388-394.

AIJUN, M., C. CHAO, L. JILIN, C. SIQING y Z. ZHIMIN. 2005. The effect of protein and n-3HUFA on the reproduction of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine fisheries research (Haiyang Shuichan Yanjiu)*, 26 (1): 7-12.

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.

AL HAFEDH, Y.S., A.Q. SIDDIQUI y M.Y. AL SAIADY.1999. Effects of dietary protein levels on gonad maturation, size and age at first maturity, fecundity and growth of Nile tilapia. *Aquaculture International*, 7: 319-332.

ALMANSÁ, 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.

ÁLVAREZ-LAJONCHÈRE, L. 2006. Nutrición de Reproductores de Peces Marinos. In: Edts.: L. Elizabeth Cruz-Suarez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Mharta G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 15-17 Noviembre, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC. 1018 pp.

ARIAS, A.M. 1980. Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Inv.Pesq.*, 44(1):59-83.

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.

BARUA, A.B., D. KOSTIC y J.A.OLSON. 1993. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols, and carotenoids in human serum. *J. Chromatogr.* 617: 257-264.

BAUCHOT, M.L. y J.C. HUREAU. 1986. Sparidae. En: Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. (P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J.Nilsen & E. Tortonese, Eds.)UNESCO, U.K.pp:883-907.

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, 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.

BENÍTEZ-SANTANA, T., R. MASUDA, E. JUÁREZ CARRILLO, E. GANUZA, A. VALENCIA, C.M. HERNÁNDEZ-CRUZ y M.S. IZQUIERDO. 2007. Dietary n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream. *Aquaculture*, 264: 408-417.

BEN-TUVIA, A. 1979. Studies of the population and fisheries of *Sparus auratus* in the Bardawil Lagoon, eastern Mediterranean. *Inv. Pesq.*, 43:43-67.

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.

BRANSDEN, M., BATTAGLENE, S., GOLDSMID, R., G. DUNSTAN y P. NICHOLS. 2007. Broodstocks condition, egg morphology and lipid content and composition during the spawning season of captive striped trumpeter, *Latris lineate*. *Aquaculture*, 268:2-12.

BRITTON, G. 1995. UV/Visible spectroscopy. In Carotenoids: Spectroscopy (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds). Vol. 1B. Birkäusen, Basel. 1998.

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 (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 141-166.

BROMAGE, N., 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.

BUENO, D. 2001. Evaluación del cultivo larvario de la dorada (*Sparus aurata* L.) en función de la calidad de puesta. Tesis de Máster, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, 63 pp.

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.; Anderson, E.; Stefansson, S. O. (Ed.): Bergen, Norway. *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.

CASSIE, R. M. 1956. Early development of the snapper, *Chrysophrys auratus* (Foster). *Trans. Roy. Soc.* 23 (2): 705-713.

CASTELLÓ, F. 1993. Biología de los teleósteos más interesantes en piscicultura marina. En: Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Castelló, F. (Eds.). Universidad de Barcelona, España p. 61-67.

CEJAS, J., J. VILLAMANDOS y M. SAMPER. 1992. Estudio sobre la reproducción de la dorada (*Sparus aurata*) en Canarias influencia del peso/edad de las hembras sobre la calidad de puesta. *Informes Técnicos del Instituto Español de Oceanografía*, 126: 37 pp.

CERDÁ, J., M. CARRILLO, S. ZANUY, J. RAMOS y M. DE LA HIGUERA. 1994. 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.

CHONG, A.S.C., S. ISHAK, Z. OSMAN y R. HASHIM. 2004. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of female swordtails *Xiphophorus helleri* (Poeciliidae). *Aquaculture*, 234: 381-392.

CHOU, Y.H. y Y.H. CHIEN. 2006. Effects of astaxanthin and vitamin E supplement in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* broodstock diet on their spawning performance and egg quality. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 33(2): 157-169.

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.

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., BELL, J.G., KNOX, D., A.FRASER. y A.YOUNGSON. 1985. Lipids and antioxidant systems in developing eggs of salmon (*Salmo salar*). *Lipids*. 20: 567-572.

CRAIK, J.C. 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.

DANTAGNAN, H. P., A. S. BORQUEZ , I. N. VALDEBENITO, I. A. SALGADO, E. A. SERRANO y M. S. IZQUIERDO. 2007. Lipid and fatty acid composition during embryo and larval development of puye *Galaxias maculatus* Jenyns, 1842, obtained from estuarine, freshwater and cultured populations *Journal of Fish Biology.* 70:770–781.

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 Balack Sea bass *Cantopristis striata*. *Conference Aquaculture 2001*, Lake Buena Vista, FL (USA), Book of Abstracts. P.181.

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.

DIVANACH, P. 1985. Contribution a la connaissance de la biologie et de l'élevage de 6 sparides Méditerranéens: *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus annularis*, *Lithognathus mormyrus* et *Puntazzo puntazzo* (Poissons teleostéens). These de doctoral 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.C. y I. BORLONGAN. 2003. A practical broodstock diet for the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*, 225 (1-4):83-88.

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.

EZZAT, A., A. RAMADAN y S. HAFEZ. 1982. Embryonic and larval development of *Sparus aurata*. *Vie Mar.*, 4: 59-66.

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.

FAO. 2007. <http://www.fao.org/docrep/009/a0699s/a0699s00.htm>. Estado de la Pesca Mundial y la Acuicultura 2006. Departamento de pesca y acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FAO. <http://www.fao.org/fishery/species/2384>.

FEAP. 2008. <http://feap.info/production/species/>

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. 2005. Efecto de determinados nutrientes en la composición de dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, 315 pp

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., HERNÁNDEZ, C.M., FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.E., J.M. VERGARA y L. ROBAINA. 1990. Influencia de distintas proporciones hembra:macho en la puesta de dorada (*Sparus aurata* L.) *Actas II Congreso Nacional de Acuicultura*. CSIC, Cádiz, Spain, 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.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S. y L. ROBAINA. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. *Informes Técnicos del Instituto Canario de Ciencias marinas* nº 12, 200 pp.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., D. SCHUCHARDT, J. ROO, C.M. HERNÁNDEZ-CRUZY y G. ROSEN LUND. 2009. Efecto de dos dietas comerciales sobre la calidad de la puesta de dorada (*Sparus aurata*).

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, 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. 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.

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.

GANGA, R., J.G. BELL, D. MONTERO, L. ROBAINA, M.J. CABALLERO y M.S. IZQUIERDO, 2005. Effect of feeding gilthead seabream (*Sparus aurata*) with vegetable lipid sources on two potential immunomodulator products: prostanoids and leptins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 142: 410-418.

GANGA, R., L. TORT, L. ACERETE, D. MONTERO y M.S. IZQUIERDO. 2006. Modulation of ACTH-induced cortisol release by polyunsaturated fatty acids in interregional cells from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *J. Endocrinol.* 190, 39-45.

GIMENEZ, G., ESTEVEZ, A., LAHNSTEINER, F., ZECEVIC, B., BELL, J., HENDERSON, R., J. PIÑERA y J. SANCHEZ-PRADO. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture*, 260:232-243.

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.

HALWART, M., D. SOTO y J.R. ARTHUR. 2007. Cage aquaculture – Regional reviews and global overview. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 498. Rome, FAO. 241 pp.

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.

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.

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 Sadd1e River, NJ. USA.

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, Eng1ewood C1iffs, NJ. USA.

HUXTABLE, R. J. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.*, 72: 101-163.

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. y H. FERNÁNDEZ-PALACIOS. 1997. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cah. Options Mediterr.*, 22: 243-264.

IZQUIERDO, M.S., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., T. ARAKAWA y C. KITAJIMA. 1990. Optimal EFA levels in Artemia to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). In: *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. (M. Takeda & T. Watanabe, editors). pp. 221-232. Tokyo University of Fisheries, Japan.

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.

JACUMAR. 2008. <http://www.mapya.es/producciones/estadisticas>.

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.

KESTEMONT, P., 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. 1985. Mineral supplementation of Atlantic salmon broodstock diets. In: Salmonid Reproduction: an International Symposium (R.N. Iwamoto & S.Sower, eds.), Washington Sea Grant program, University of Washington, Seattle, p.111.

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.

KHAN, M. A., A. K. JAFRI y N. K. CHADHA. 2005. Effects of varying dietary protein levels on growth, reproductive performance, body and egg composition of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*, 11: 11-17.

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.

KJØRSVIK, E. 1994. Egg quality in wild and broodstock cod L, *J. World Aquac. Soc.* 25:22-29.

KJØRSVIK, E., A. MANGOR-JENSEN y I. HOLMEFJORD. 1990. Egg quality in fishes. In: Blaxter J.H.S. and Southward A.J. (eds.), *Advances in Marine Biology*, 26: 71-113.

KJØSRVIK, 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 generation capacities of different tissues from the rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Lipids*, 30 (5):451-458.

KOKOKIRIS, L., S. BRUSLÉ, M. KENTOURI y A. FOSTIER. 1999. Sexual maturity and hermaphroditism of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei;Sparidae). *Marine Biology*, 134: 621-629.

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.

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.

- LAHNSTEINER, F. y P. PATARNELLO. 2004a. Biochemical egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: reproducibility of the method and its application for sharpsnout seabream, *Puntazzo puntazzo*. *Aquaculture*. 237: 433–442.
- LAHNSTEINER, F. y P. PATARNELLO. 2004b. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters. *Aquaculture*. 237:443–459.
- LAMBERSTEN, G. 1983. Some comments on the analysis of fat soluble vitamins in fish products by HPLC-chromatography. *Proc. 12 th Scand. Lipid Symp.* Gotheburg, Sweden. 21-26.
- LANE, R. y C. KHOLER. 2006. Effects of dietary lipid and fatty acids on white bass reproductive performance, egg hatchability, and overall quality of progeny. *North American Journal of Aquaculture*, 68(2): 141-150.
- 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.
- LE-BRETON, A.D. 1994. Marine fish breeding in the Mediterranean: Rearing techniques, actual situation and prospects. *Rec. Med. Veter. de l'École d'Alfort.*, 170:121-128.
- LEBOULANGER, J., 1977. Les vitamines. Biochemie. Mode d'action intérêt thérapeutique. Ed. Roche, Neuilly-sur-Seine, France, 194 pp.
- LEE, K. 2003. Biochemical advances in finfish hatchery production: a review. *Aquaculture*, 230 (1-4): 439-458.
- 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.

LI, Y., W. CHEN, Z. SUN, J. CHEN y K. WU. 2005. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. *Aquaculture*, 245:263-272.

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.

LING, S., M. KUAH , T. MUHAMMAD , S.KOLKOVSKI y A.S.C. CHONG. 2006. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fattyacid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*, 261:204-214.

LUQUET, P. y T. WATANABE. 1986. Interaction "nutrition-reproduction " in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2 (1-4): 121-129.

MADDEN, M. 2001. Vitamin A and the developing embryo. *Postgrad. Med. J.*, 77:489-491.

MAELAND, A., I. RØNNESTAD y R. WAAGBO. 2003. Folate in eggs and developing larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquac. Nutr.* 9:185-188.

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., 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.

MANSOUR, N., F. LAHNSTEINER y R. A. PATZNER . 2007. Distribution of lipid droplets is an indicator for egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario*. *Aquaculture*, 273(4): 743-747.

MATSUNARI, H., K. HAMADA, K. MUSHIAKE y T. TAKEUCHI. 2006. Effects of taurine levels in broodstock diet on reproductive performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science*, 72: 955-960.

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.

MEINELT, T., C. SCHULZ, M. WIRTH, H. KÜRZINGERZ y C. STEINBERG. 1999. Dietary fatty acid composition influences the fertilization rate of zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan). *J. Appl. Ichthyol.*, 15:19-23.

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.

MICALE, V. y F. PERDICHIZZI. 1990. Gonadal responsiveness to photoperiod extensión in captivity-born *Sparus aurata* (L.) during the male phase. *Boll.Zool.* 57:21-26.

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.

MORO, L., J.L. MARTIN, M.J. GARRIDO y I. IZQUIERDO (eds.) 2003. Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales) 2003. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. 250 pp.

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., 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.

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.

NANDI, S., D.N. CHATTOPADHYAY, J.P. VERMA, S.K. SARKAR y P. K. MUKHOPADHYAY. 2001. Effect of dietary supplementation of fatty acids and vitamins on the breeding performance of carp *Catla catla*. *Reproduction Nutrition Development*, 41(4):365-375.

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.

NRC (National Research Council). 1993. Nutrient requirements of fish. National Academic Press. Washington D. C. 144pp.

OMNES, M. H., S. RECEK, H. BARONE, H. LE DELLIOU, A. SCHMITZ, A. MUTELET, M. SUQUET y J. H. ROBÍN. 2004. Influence of dry diets on reproductive performance and egg lipid composition during the first spawning season of captive pollack. *Journal of Fish Biology*, 65 (Supplement A):326-336.

PALACE, V. P. y J. WERNER. 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review. Recent Advances in the Study of Fish Eggs and Larvae. M.P. Olivar and J.J. Govoni (eds.). *Sci. Mar.* 70 (Suppl. 2): 41-57.

PANGANTIHON-KUHLMANN M.P., O. MILLAMENA y Y. CHERN. 1998. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquatic Living Resources*, 11(6):403-409.

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.

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.

PICKOVA, J., E. BRÄNNÄS y T. ANDERSSON. 2007. Importance of fatty acids in broodstock diets with emphasis on Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eggs. *Aquacult. Int.* 15:305-311.

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.

RIDELMAN, J.M. 1981. Effects of starvation and diet formulation on ovarian development and egg viability of steelhead x rainbow trout hybrids. M. Sc. Thesis, University of Washington, Seattle, WA. 84 pp.

RIVAS, A., J. CEJAS, J. ESCANEZ y J.E. VILLA MANDOS. 1987. Primera experiencia de reproducción de dorada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), en el archipiélago Canario. *Cuad. Maris.Publ.Tec.*8:11-20.

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.

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, Univeridad de Bergen, Noruega.

RØNNESTAD, I. 1993. No efflux of free amino acids from yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 167:39-45.

RØNNESTAD, L. y H.J. FYHN. 1993. Metabolic aspects of free amino acids in deyeloping marine fish eggs and larvae. *Rev. Fish. Sci.*, 1: 239-259.

RØNNESTAD, I., H.J. FYHN y K. GRAVNINGEN. 1992. The importance of free aminoacids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol.*, 114: 517-525.

RØNNESTAD, I., O. LIE y R. WAAGBO. 1997. Vitamin B₆ in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*—endogenous utilization and retention in larvae fed natural zooplankton. *Aquaculture*. 157: 337–345.

RØNNESTAD, I., A. THORSEN y R.N. FINN. 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*. 177: 201–216.

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.

SALZE, G., TOCHER, D.R., W.J. ROY y D.A. ROBERTSON. 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquac. Res.* 36:1488–1499.

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.

SANTIAGO, C. B. y A. C. GONZAL. 2000. Effect of preparad diet and vitamins A, E and C supplementation on the reproductive performance of cage-reared bighead carp *Aristichthys nobilis* (Richardson). *J. Appl. Ichthyol.* 16: 8-13.

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 Qua1ity*. Blackwell Science, London, pp.353-372.

SARGENT, J.R., J.G. BELL, M.V. BELL, HENDERSON, R.J., y D.J.TOCHER. 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In: Lahlou, B., Vitiello, P._Eds., *Aquaculture: Fundamental and Applied Research Coastal and Estuarine Studies* 43. American Geophysical Union, Washington, DC, pp.103–124.

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.

SAWANBOONCHUM, J., ROY, W., D. ROBERTSON y J. G. BELL. 2008. The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua*, L.) *aquaculture*, 283 (1-4): 97-101.

SCABINI, V., H. FERNANDEZ-PALACIOS, y M.S. IZQUIERDO. 2006. Inclusion of carotenoids in broodstock diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758): Effects on egg and spawning quality. *Abstracts, XII International Symposium Fish Nutrition & Feeding* Biarritz, France.

SCHIMITTOU, H.R. 1993. High density fish culture in low volume cages. M.I.T.A. (P) No. 518, vol AQ41, 75 pp.

SHIELDS, R., N.P. BROWN y N.R. BROMAGE. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish eggs viability. *Aquaculture*, 155: 1-12.

SHIRANEE, P. y P. NATARAJAN. 1996. Crude palm oil as a source of carotenoids and tocopherols to enhance reproductive potencial 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.

SILVEIRA, R., J. PEREZ, E. FAJER y A. FRANCO. 1996. Effect of the vitamins supplement on the reproduction performance of *Ictalurus punctatus*. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 20 (2):28-30.

SIMAN, C.M. y U.J. ERIKSON. 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.

SORENSEN, P.W. y F.W. GOETZ. 1993. Pheromonal function of prostaglandin metabolites in teleost fish. *J. Lipid Mediat.*, 6: 385-393.

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.

SOKAL, R.R. y J. ROLF. 1979. Biometría. Blume, Madrid.

SOLIMAN, A. X., K. JAUNCEY y R.J. ROBERTS. 1986. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis niloticus* (Peters). *Aquaculture*, 59: 197-208.

SPRINGATE, J.R.C. y N.R. BROMAGE. 1985. Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 47: 163-172.

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.

SUAU, P. y J. LÓPEZ. 1976. Contribución al estudio de la dorada, *Sparus aurata* L. *Inv. Pesq.*, 40: 169-199.

SULLIVAN, M.H.F. y B.A. COOKE. 1985. Effects of calmodulin and lipoxygenase 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.

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. 1981a. 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., T. WATANABE, T. OGINO, M. SAITO, M. NISHIMURA y T. NOSE. 1981b. Effects of low protein-high calory diets and deletion of trace elements from a fish meal diet on reproduction of rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47:645-654.

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.

TANDLER, A., T. WATANABE, S. SATOH y K. FUKUSHO. 1989. The effect of food deprivation on the fatty acid and lipid profile of red seabream larvae (*Pagrus major*). *Br. J. Nutr.*, 62: 349-361.

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.

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.

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, 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 *Anahichas minor* Olafsen, *Aquac. Res.* 35:152–161.

TVERANGER, B. 1986. Effect of pigment content in broodstock diet on subsequent fertilization rate, survival and growth rate of rainbow trout (*salmo gairdneri*) offspring. *Aquaculture*, 53: 85-93.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., SATOH, S., KIRON, V., IMAIZUMI, H., T. YAMAZAKI y K. KAWANO. 2001a. Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research*, 32 (supl.1): 263-272.

VASSALLO-AGIUS, R., IMAIZUMI, H., WATANABE, T., YAMAZAKI, T., S. SATOH y V. KIRON. 2001b. The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fish. Sci.* 67, 260-270.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., IMAIZUMI, H., YAMAZAKI, T., S. SATOH y V. KIRON. 2001c. Effects of dry pellets containing astaxanthin and squid meal on the spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Fish. Sci.* 67: 667-674.

VASSALLO-AGIUS, R., WATANABE, T., YOSHIZAKI, G., S. SATOH y Y. TAKEUCHI. 2001d. Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed an n -3 EFA deficient diet and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, semen and livers. *Fish. Sci.* 67: 818-827.

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.

VERAKUNPIRIYA, V., K. WATANABE, MUSHIAKE, K., K. KAWANO, T. KOBAYASHI, HASEGAWA, I. KIRON, V. S. SATOH y T. WATANABE. 1997a. Effect of a krill meal supplementation in soft-pellets on spawning and quality of eggs of yellowtail. *Fish.Sci.* 63: 433-439.

VERAKUNPIRIYA, V., K. MUSHIAKE, K.JAWANO y T. WATANABE. 1997b. Supplemental effect of astaxanthin in broodstock diets on the quality of yellowtail. *Fish. Sci.* 63: 816-823.

WADE, M.G., G. VAN DER KRAAK, M.F. GERRITS y J.S. BALLANTYNE. 1994. Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in fue 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., KOIZUMI, T., SUSUKI, H., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., T. KITADA y Y. TSUKASHIMA. 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., OHHASHI, S., A. ITOH y S. FUJITA. 1984b. Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red sea bream broodstock and eggs produced. *Nippon Suisan Gakkaishi*.50: 503-515.

WATANABE, T., A. ITOH, C. KITAJIMA y S. FUJITA. 1984c. Effect of protein levels on reproduction of red sea bream. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 50: 1015-1022.

WATANABE, T., ITOH A., A. MURAKAMI y Y. TSUKASHIMA. 1984d. Effect of nutritional quality of diets given to broodstocks on the verge of spawning on reproduction of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 50: 1023-1028.

WATANABE, T. TAKEUCHI, T., M. SAITO y K. NISHIMURA. 1984e. Effect of low protein-high calorie or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50: 1207-1215.

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 y 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.*Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51 (9): 1511-1521.

WATANABE, T., M. S. IZQUIERDO, T. TAKEUCHI, S. SATOH y C. KITAJIMA. 1989. Comparison Between Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in terms of essential fatty Acid efficacy in Larval Red Seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(9):1635-1640.

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.

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.

XIAO, W., Y. LIU, L. TIAN, W. ZHEN y J. CAO. 2003. Effect of vitamin E and vitamin C on spawning quality of broodstock for grouper *Epinephelus coioides* *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*. 42 (Suppl.2): 214-217.

ZHANG, L., B. BENSON y J.L. LOGAN. 1992. Dietary fish oil delays puberty in female rats. *Biol. Reprod.*, 47:998-1003.

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.

7.- ANEXO

ASPECTOS GENERALES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO DE LA DORADA

Los huevos de la dorada (*Sparus aurata*) son transparentes, lo que permite ver fácilmente el estado de desarrollo con la ayuda de una lupa o estereoscopio. Por lo general, poseen una gota lipídica en su interior, aunque también pueden presentarse más. Los huevos son pelágicos, con flotación positiva, esféricos, de $0,969 \pm 0,029$ mm (n=14600) de diámetro y con una gota de grasa de $0,234 \pm 0,008$ mm (n=14567) de diámetro (Fernández-Palacios, 2005).

La fecundación en estos peces es externa, el huevo comienza a dividirse para luego formar el embrión en su interior. La primera descripción detallada del desarrollo embrionario y larvario de la dorada fue realizada por Cassie (1956). En el presente estudio se ha seguido la realizada por Ezzat *et al.* (1982). El desarrollo comienza con la fertilización; la membrana de huevo se separa del saco vitelino, que contiene normalmente una gota de grasa y comienzan las divisiones meroblásticas. El protoplasma forma un disco germinal en el polo animal.

El disco comienza a dividirse en dos células o blastómeros, luego en cuatro, en ocho, en dieciséis y en treinta y dos. Sucesivas divisiones de las células, tanto horizontales como verticales, dan como resultado la formación de un estado multicelular, esta etapa es denominada “de segmentación” (ver figura). Adicionales subdivisiones de los blastómeros continúan hasta el estado de mórula que tiene forma de disco más o menos convexo (blastodermo) en el polo animal, de las mismas dimensiones, aproximadamente, que el disco germinal antes de dividirse. El blastodermo se extiende sobre el vitelo y se forma un anillo germinal tenue, que va definiéndose cada vez más y empieza a extenderse sobre el vitelo hacia el centro del blastodermo mientras en la parte posterior del blastodisco se forma la placa embrionaria. El blastodermo continúa extendiéndose

el blastoporo, definiéndose así, el estado de gástrula, esta etapa se denomina *gastrulación* (ver figura). Es en ese momento cuando empiezan a formarse los primeros órganos rudimentarios. En la región anterior se diferencia la formación del cerebro, y en la posterior, la zona caudal, dando inicio a la etapa siguiente denominada *neurulación* (ver figura). A ambos lados del cerebro aparecen las cápsulas ópticas. El cerebro aún no tiene divisiones claras. La región caudal se estrecha, y en el eje embrionario aparecen tres segmentos que van aumentando en número. Se aprecian las tres divisiones del cerebro, las cápsulas ópticas son prominentes y se han transformado en globos oculares de doble pared. Aparecen los otocistos. La gota de grasa, permanece en el saco vitelino que está completamente rodeado por las células del blastodermo y, el blastoporo está cerrado. El número de segmento es de quince. El cerebro sigue su desarrollo. Aparecen cromatóforos a ambos lados de los globos oculares. La cola aparece libre del saco vitelino y ligeramente curvado.

Se distingue el corazón, que empieza a latir de forma irregular, aunque la circulación no es clara. El ojo está formado pero no pigmentado. En los otocistos se forman gránulos, precursores de los otolitos. En la parte anterior del cerebro y en el eje dorsal se observan melanóforos y los pigmentos amarillos son más evidentes en la región del ojo y en los laterales del cuerpo. Estos pigmentos también aparecen en la gota de grasa. El embrión rodea completamente el saco vitelino, y sus movimientos son cada vez más frecuentes. El embrión está preparado para la eclosión, dando término a la etapa de neurulación y paso a la etapa final denominada *eclosión* (ver figura).

La larva recién eclosionada es transparente con una longitud de $2,78 \pm 0,17$ mm ($n= 6295$) /Fernández-Palacios, 2005), y con un saco vitelino ovalado que va desde la cabeza hasta la región anterior del cuerpo de la larva. La gota de grasa se localiza en la parte distal del saco. El número de miótomos en esta fase es de alrededor de 28. Los melanóforos en la parte dorsal del cuerpo aumentan en número, mientras que los cromatóforos amarillos se tornan estrellados y aumentan de tamaño. El extremo posterior del estómago es plenamente visible

mientras que el estómago medio es menos evidente. El corazón de dos cámaras se ve latir con regularidad. Las cápsulas óticas están a cada lado del cerebro y aparecen como dos sacos ovaes transparentes en los que se observan un par de otolitos. Los ojos permanecen como dos sacos ovaes transparentes en los que se observan un par de otolitos. Los ojos permanecen sin pigmentar. Las cápsulas olfatorias se ven claramente. Las aletas dorsal, caudal y anal forman una única y transparente aleta larvaria.



Las larvas de un día de vida, tras la eclosión, muestran el saco vitelino parcialmente reabsorbido. Los ojos están completos con el iris aunque todavía no están pigmentados. Por debajo de las cápsulas óticas se observan tres arcos branquiales. Las aletas pectorales comienzan a esbozarse. El conducto

urogenital y el estómago medio aparecen claramente. La abertura anal esta formada aunque no es funcional. Las aletas dorsal, caudal y anal siguen siendo contínuas. Los cromatóforos amarillos con forma de estrella están concentrados en la región cerebral, área caudal y gota de grasa.

Las larvas con dos días de vida, tras la eclosión, muestran más reducido el saco vitelino, la cabeza aparece libre del saco vitelino. En las cápsulas óticas pueden observarse los esbozos de los canales semicirculares. También se pueden ver cuatro arcos branquiales. Las aletas pectorales se incrementan en tamaño los radios son aparentes. Los melanóforos son arborescentes.

Las larvas con tres días de vida, tras la eclosión, miden $3,024 \pm 0,17$ mm (n= 6061) (Fernández-Palacios (2005)).

El saco vitelino está ahora muy reducido y la gota de grasa esta todavía presente. La boca esta esbozada. Se observan cuatro arcos branquiales primarios. La retina en el ojo comienza a obscurecerse y la lente es claramente visible. Los melanóforos están concentrados la región del tronco detrás del estómago y en la cabeza. Las aletas pectorales están formadas. El intestino ha aumentado de tamaño. La circulación sanguínea aparece clara y la sangre es roja. La larva nada libremente cerca de la superficie preparada para alimentarse del medio.

8.- LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Principales producciones de peces en Europa en el año 2008 (FEAP, 2008)	4
Tabla II.	Principales producciones de peces en España en el año 2007 (Jacumar, 2008)	5
Tabla III.	Producción, en toneladas métricas, de dorada y lubina en España en el año 2007 (Jacumar, 2008).....	5
Tabla IV.	Producción de semilla de dorada en Europa (FEAP, 2008).....	6
Tabla V.	Mezcla de minerales utilizados en las dietas Experimentales.....	51
Tabla VI.	Mezcla de vitaminas hidrosolubles utilizada en las dietas experimentales.....	52
Tabla VII.	Mezcla de vitaminas liposolubles y antioxidantes utilizada en las dietas experimentales.....	52
Tabla VIII.	Características biométricas de los reproductores utilizados en el experimento.....	62
Tabla IX.	Composición y análisis proximal de las dietas experimentales	63
Tabla X.	Composición y relación entre algunos ácidos grasos de las dietas experimentales (% total de ácidos grasos).....	64
Tabla XI.	Índices de las puestas de los reproductores de dorada, alimentados con las dietas experimentales (media \pm DE)	67
Tabla XII.	Contenido en proteína, lípidos, carotenoides y humedad en los huevos (media \pm DE)	71

Tabla XIII.	Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos de los reproductores alimentados con diferentes dietas	74
Tabla XIV.	Características biométricas de los reproductores y condiciones de cultivo durante el periodo experimental.....	91
Tabla XV.	Composición y análisis proximal de las dietas experimentales	92
Tabla XVI.	Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales	93
Tabla XVII.	Índices de calidad de las puestas.....	96
Tabla XVIII.	Medidas de huevos y larvas	96
Tabla XIX.	Composición de los huevos de los reproductores alimentados con las diferentes dietas (media \pm DE)	100
Tabla XX.	Composición en ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos	103
Tabla XXI.	Peso, longitud y factor de condición de los reproductores utilizados en el experimento	120
Tabla XXII.	Composición y análisis proximal de las dietas experimentales	121
Tabla XXIII.	Composición y algunas relaciones de los ácidos grasos de las dietas experimentales (% total de ácidos grasos)	122
Tabla XXIV.	Índices de las puestas de los reproductores de dorada	125

Tabla XXV. Composición de los huevos de los reproductores alimentados con las diferentes dietas	131
Tabla XXVI. Composición de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los huevos de reproductores	133
Tabla XXVII. Características biométricas de los reproductores	155
Tabla XXVIII. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales	156
Tabla XXIX. Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales (% Total de de ácidos grasos)	157
Tabla XXX. Índices de las puestas de los reproductores	159
Tabla XXXI. Medidas de huevos y larvas.....	160
Tabla XXXII. Composición de los huevos de los reproductores alimentados con las diferentes dietas.....	162
Tabla XXXIII. Composición de los huevos (% total de ácidos grasos).....	165

9.- LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Capturas mundiales de peces, moluscos y crustáceos en las dos últimas décadas (FAO, 2007).....	2
Fig. 2.	Capturas y producción de la acuicultura de peces, moluscos y crustáceos en las dos últimas décadas (FAO, 2007).....	3
Fig. 3.	Dorada (<i>Sparus aurata</i> L., 1785).....	39
Fig. 4.	Tanque experimental de 1000 l y tanque auxiliar con el colector de huevos.....	42
Fig. 5.	Relación entre el contenido en carotenoides de las dietas y el porcentaje de huevos vivos.....	68
Fig. 6.	Relación entre el contenido en carotenoides de las dietas y el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido.....	68
Fig. 7.	Relación entre el porcentaje de eclosión y el contenido en n – 3 HUFA, DHA y EPA de las dietas.....	69
Fig. 8.	Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada alimentados con dietas experimentales.....	70
Fig. 9.	Relación entre el nivel dietético de n – 3 HUFA y el contenido en DHA en los huevos.....	72
Fig. 10.	Relación entre el contenido en ácido Oleico de los huevos y el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido.....	72

Fig.11.	Relación entre el contenido dietético en carotenoides, y el contenido en n -3 HUFA de los huevos.....	73
Fig. 12.	Relación entre el contenido en n-3 HUFA en los huevos y el porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido.....	73
Fig. 13.	Relación entre el nivel dietético de carotenoides y el porcentaje de huevos muertos.....	97
Fig. 14.	Relación entre el nivel dietético de carotenoides y el porcentaje eclosión.....	97
Fig. 15.	Correspondencia entre la relación carotenoides totales/n-3 HUFA, en las dietas, y el porcentaje de huevos muertos.....	98
Fig.16.	Correspondencia entre la relación carotenoides totales / n-3 HUFA, en las dietas, y el porcentaje de eclosión.	98
Fig. 17.	Relación entre el nivel dietético de ácido oleico y el porcentaje de supervivencia larvaria.....	99
Fig. 18.	Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada alimentados con las diferentes dietas durante el periodo experimental.....	100
Fig. 19.	Relación entre el nivel dietético de carotenoides y su contenido en los huevos.....	101
Fig. 20.	Ácidos grasos y clases de ácidos grasos más abundantes en los huevos y en las dietas	104

Fig. 21.	Relación entre los niveles dietéticos de $n - 3$ HUFA, EPA y ARA con el de huevos vivos.....	126
Fig. 22.	Relación entre los carotenoides de las dietas y el porcentaje de huevos no fecundados.....	127
Fig. 23.	Relación entre el porcentaje de eclosión y los niveles dietéticos de $n - 3$ HUFA, DHA y ARA.....	128
Fig. 24.	Correspondencia entre la relación dietética EPA/DHA y el porcentaje de huevos vivos.....	129
Fig. 25.	Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada.....	130
Fig. 26.	Relación entre el contenido de carotenoides en los huevos y el nivel dietético de carotenoides.....	131
Fig. 27.	Relación entre el contenido de carotenoides en los huevos y el porcentaje de huevos no fecundados.....	132
Fig. 28.	Relación entre los niveles de DHA en las dietas y en los huevos.....	134
Fig. 29.	Relación entre los ácidos grasos de la serie $n - 3$ HUFA de las dietas y su contenido en los huevos.....	135
Fig. 30.	Relación entre los niveles de EPA y DHA en los huevos y el porcentaje de eclosión.....	136

Fig. 31.	Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de los reproductores de dorada alimentados con las diferentes dietas.....	161
Fig. 32.	Relación entre el nivel dietético de carotenoides y su contenido en los huevos.....	163
Fig. 33.	Relación entre el nivel dietético de vitamina E y su contenido en los huevos.....	163
Fig. 34.	Correspondencia entre el porcentaje de huevos vivos con el nivel de la proporción AA / EPA en los huevos.....	166

10.- LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
AGEs	Ácidos Grasos Esenciales
ANOVA	Análisis de la Varianza
AOAC	Asociación Oficial de Analistas Químicos
CRT's	Carotenoides
DHA	Ácido Docosahexaenoico
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FAMES	Esteres Metílicos de los Ácidos Grasos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
FEAP	Federación Europea de Productores de la Acuicultura
FF	Fracción Flotante
FIGIS	Sistema de Información Global sobre las Pesquerías
FNF	Fracción no Flotante
GnRH	Hormona Liberadora de la Gonadotropina
GtH	Gonadotropina
GtH II	Gonadotropina II
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
HUFA	Ácidos Grasos Altamente Insaturados
ICCM	Instituto Canario de Ciencias Marinas
IGS	Índice Gonadosomático
JACUMAR	Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos
LH	Hormona Luteinizante
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTB ₅	Leucotrieno B ₅
PG	Prostaglandina
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGEs	Prostaglandinas E

PUFA Acidos Grasos Poliinsaturados