



## MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS VI MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Las Palmas de Gran Canaria, España  
2008 – 2010

# PRIMERAS EXPERIENCIAS DE CULTIVO LARVARIO DEL MEDREGAL NEGRO (*Seriola rivoliana*, Valenciennes 1833) EN CANARIAS

*Esther Grossi Dopico*

TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE  
DEFENDIDA PARA LA OBTENCION  
DEL TITULO DE  
MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS

Las Palmas de Gran Canaria a 18 de Mayo de 2010



## MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS VI MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Organizado conjuntamente por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (Gobierno de Canarias) y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), a través del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)

# PRIMERAS EXPERIENCIAS DE CULTIVO LARVARIO DEL MEDREGAL NEGRO (*Seriola rivoliana*, Valenciennes 1833) EN CANARIAS

*Esther Grossi Dopico*

Trabajo realizado en Laboratorio; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, bajo la dirección del Dr. Hipólito Fernández-Palacios Barber y el Dr. Javier Roo Filgueira.

Presentado como requisito parcial para la obtención del Título oficial de Máster Universitario en Cultivos Marinos otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y del Diploma de Master of Science en Acuicultura otorgado por el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM).

### Directores:

**Dr. Hipólito Fernández-Palacios Barber**

**Dr. Javier Roo Filgueira**

### Autora:

**Esther Grossi Dopico**

## **Agradecimientos**

A mis directores Pipo y Javi. Gracias por vuestra ayuda a lo largo de todo este tiempo, por vuestra orientación que fue imprescindible para la realización de este trabajo.

A Carmen, Juan, Juanma, Domi, Dani y demás profesores que nos ayudaron a lo largo de todo el máster.

A la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias, al Ministerio de Ciencia e Innovación y al Subprograma de Recursos del Fondo Social Europeo.

El presente trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto “Cultivo de especies de rápido crecimiento, RAPCREC” financiado por la Viceconsejería de Pesca del Gobierno de Canarias.

A todos los técnicos, Ada, Dailos, Lorena, Carmen, Yurena, Silvia y en especial a Rubén y Emma por todo el tiempo empeñado en ayudarme y enseñarme las tareas tanto del Mesocosmos como en los análisis en el IUSA.

A todos los compañeros del máster, María, Fati 1, Fati 2, Filiz, Antonio, Dailos, Rayco, Marco, Alex, Enmanuel, Islam y Mohamed, con los que pasé muy buenos momentos, espero que no perdamos el contacto, agradecer especialmente a Nati y Mauricio, por todos los buenos momentos que pasamos juntos en el Mesocosmos.

A todos aquellos que pasaron por mi camino tanto en Taliarte como en el IUSA a lo largo de este trabajo.

A todos los miembros de la organización del Master, gracias por esta oportunidad y todas las enseñanzas impartidas.

Finalmente los que para mi son los mas importantes.

A mi familia, mi madre, mi abuela, Alber y a mis tíos Carlos y Montse, sin vosotros no podría haber hecho nada de esto. A mi padre, que aunque no haya estado en esta etapa de mi vida me sigue ayudando cada día que pasa.

A todos mis amigos de Galicia, por darme ánimos y ayuda en los momentos difíciles que pasé aquí.

A todos los nuevos amigos que encontré durante estos dos años, Laura, Nele, Doris, Antonio, David, Cristian, Rosario, Michele y alguno más, con los que pasé algunos de mis mejores momentos.

Y a la persona más importante en todo este tiempo, quien estuvo a mi lado desde el principio y que me hizo la estancia aquí mucho más fácil, gracias Antonio por seguirme hasta aquí y ayudarme día a día.

**GRACIAS**

# Índice

Lista de figuras .....	XI
Lista de tablas .....	XV
Abreviaturas .....	XVII
Resumen .....	XIX
<b>1. Introducción</b> .....	<b>21</b>
1.1. Definición de acuicultura .....	23
1.2. Antecedentes y situación actual .....	23
1.3. Divesificación .....	30
1.4. Inducción a la puesta .....	32
1.5. Cría larvaria .....	34
1.5.1. Importancia de la cría larvaria .....	34
1.5.2. Técnicas de la cría larvaria .....	36
1.5.2.1. Sistemas intensivos .....	36
1.5.2.2. Sistemas extensivos .....	38
1.5.2.3. Sistemas semi-extensivos (mesocosmos) .....	39
1.5.2.3.1. Bloom natural – Filosofía extensiva .....	40
1.5.2.3.2. Método de agua verde – Filosofía extensiva .....	41
1.5.2.3.3. Métodos de agua pseudo verde – Filosofía intensiva .....	41
1.5.2.3.4. Métodos de agua clara- Filosofía intensiva .....	41
1.5.2.3.5. Técnicas neo-verde .....	42
1.5.3. Alimentación larvaria .....	42
1.5.3.1. Microalgas .....	42
1.5.3.2. Rotíferos .....	42
1.5.3.3. <i>Artemia</i> .....	43

1.5.3.4.	Copépodos .....	44
1.5.3.5.	Destete .....	44
1.6.	Cultivo del género <i>Seriola</i> .....	45
1.7.	Cultivo del medregal negro ( <i>Seriola rivoliana</i> ) .....	48
2.	<b>Objetivos</b> .....	51
3.	<b>Material y métodos</b> .....	55
3.1.	Localización del estudio .....	57
3.2.	Especie objeto del estudio .....	57
3.2.1.	Nomenclatura .....	57
3.2.2.	Descripción .....	57
3.2.3.	Distribución .....	58
3.2.4.	Hábitat .....	59
3.3.	Tanques .....	60
3.4.	Cultivos auxiliares .....	61
3.4.1.	Cultivo de fitoplancton .....	62
3.4.2.	Cultivo de rotíferos .....	63
3.4.3.	Cultivo de <i>Artemia</i> .....	66
3.5.	Reproductores .....	68
3.6.	Inducción .....	69
3.7.	Puesta .....	70
3.8.	Experimentos de Cultivo semi-intensivo: Mesocosmos .....	72
3.9.	Experimentos de Cultivo intensivo .....	74
3.10.	Medidas .....	76
3.11.	Test de actividad .....	77
3.12.	Métodos analíticos .....	78
3.12.1.	Humedad .....	78

3.12.2. Ceniza .....	79
3.12.3. Lípidos .....	79
3.12.4. Proteínas .....	80
<b>4. Resultados .....</b>	<b>83</b>
4.1. Reproducción .....	85
4.2. Desarrollo embrionario .....	87
4.3. Desarrollo larvario .....	90
4.4. Experimentos de cultivo larvario .....	93
4.4.1. Cultivos en sistema semi-intensivo .....	93
4.4.1.1. Experimento 1 .....	93
4.4.1.2. Experimento 2 .....	100
4.4.1.3. Experimento 3 .....	102
4.4.2. Cultivos en sistema intensivo .....	110
4.4.2.1. Experimento 4 .....	110
4.4.2.2. Experimento 5 .....	110
4.4.2.3. Experimento 6 .....	111
<b>5. Discusión .....</b>	<b>115</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>129</b>
<b>7. Referencias .....</b>	<b>135</b>

## Lista de Figuras

- Fig. 1.- Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura,  
(FAO, 2008) ..... 25
- Fig. 2.- Producción de la acuicultura por regiones en 2006,  
(FAO, 2008)..... 26
- Fig. 3.- Producción de la acuicultura mundial: principales grupos de especies,  
(FAO, 2008)..... 27
- Fig. 4.- Evolución de la producción mundial de la acuicultura: principales  
grupos de especies, (FAO, 2008)..... 28
- Fig. 5.- Distribución de la producción de la acuicultura en España,  
(Jacumar, 2008)..... 29
- Fig. 6.- Producción de la acuicultura, de las principales especies de peces en  
España (Jacumar , 2008) ..... 29
- Fig. 7.- Juveniles de medregal limón y medregal listado (*Seriola fasciata*)  
capturados para su engorde..... 34
- Fig. 8.- Clasificación de las técnicas de cultivo larvario modificado por  
Divanach (1985)..... 36
- Fig. 9.-Organización de tecnologías de mesocosmos. (Filosofía general y  
especificidad técnica) (Divanach y Kentouri, 2000)..... 40
- Fig.10 .- Rotífero *Brachionus sp*..... 42
- Fig.11.- Metanauplio de *Artemia sp*..... 44
- Fig.12. - Jaula de KONA BLUE..... 49
- Fig.13.- Reproductor de medregal ..... 58
- Fig. 14.- Distribución mundial de la *Seriola rivoliana* (Froese y Pauly, 2010)..... 58
- Fig.15.- Ciclo de vida del medregal negro..... 59

• Fig. 16.- Tanque de cultivo de 40 m <sup>3</sup> .....	60
• Fig.17.- Tanque de de 2 m <sup>3</sup> .....	61
• Fig.18.- Esquema de una célula de <i>Nannocloropsis sp.</i> .....	62
• Fig. 19: Bolsas de cultivo de fitoplancton de 230 y 460 litros.....	63
• Fig.20.- Rotífero ( <i>Brachionus plicatilis</i> ).....	63
• Fig.21.- Tanques de producción de rotíferos.....	64
• Fig.22.- Tanque de enriquecimiento de rotíferos.....	66
• Fig.23.- <i>Artemia</i> .....	66
• Fig.24.- Inducción a la puesta: canulación e inyección hormonal.....	69
• Fig.25.- Huevo viable de medregal negro.....	70
• Fig.26.- Medida realizadas en las larvas.....	77
• Fig.27.- Proyector de perfiles .....	77
• Fig.28.- Test de actividad.....	78
• Fig.29.- Determinación de lípidos: a) Ultra Turrax; b) Filtrado de la fase orgánica.....	80
• Fig.30.- Destilador de proteínas .....	81
• Fig.31.- Crecimiento en peso de los reproductores desde 2006 a 2009.....	85
• Fig.32.- Evolución de los parámetros de calidad de puesta.....	87
• Fig.33.-Desarrollo embrionario de <i>S. rivoliana</i> , 1-8.....	88
• Fig.34.-Desarrollo embrionario de <i>S. rivoliana</i> , 9-16.....	89
• Fig.35.- Desarrollo larvario de <i>S.rivoliana</i> , a-d.....	91
• Fig.36.- Desarrollo larvario de <i>S.rivoliana</i> e-j.....	92
• Fig.37 .- Evolución de diferentes parámetros morfométricos de las larvas de <i>S. rivoliana</i> .....	93
• Fig.38.- Heces de larvas de medregal negro en etapa de alimentación Con <i>Artemia</i> .....	94

---

• Fig.39.- Evolución de la LT a lo largo del experimento 1.....	94
• Fig.40.- Evolución de la LPA a lo largo del experimento 1 .....	95
• Fig.41.- Evolución de la HC a lo largo del experimento 1.....	95
• Fig.42.- Evolución del PH a lo largo del experimento 1.....	96
• Fig.43.- Evolución de la LT a lo largo del experimento 2.....	100
• Fig.44.- Evolución de la LPA a lo largo del experimento 2.....	101
• Fig.45.- Evolución del DO a lo largo del experimento 2.....	101
• Fig.46.- Evolución de la HC a lo largo del experimento 2.....	102
• Fig.47.- Evolución del PH a lo largo del experimento 2.....	102
• Fig.48.- Evolución de la LT a lo largo del experimento 3.....	103
• Fig.49.- Evolución de la LPA a lo largo del experimento 3.....	104
• Fig.50.- Evolución de la HC a lo largo del experimento 3.....	104
• Fig.51.- Evolución del PH a lo largo del experimento 3.....	104
• Fig.52. Contenido en ARA, EPA, DHA y DPA en porcentaje en área de ácidos grasos totales para los rotíferos.....	108
• Fig.53.- Evolución de la LT a lo largo del experimento 6.....	111
• Fig.54.- Evolución de la LS a lo largo del experimento 6.....	112
• Fig.55.- Evolución de la LPA a lo largo del experimento 6.....	113
• Fig.56.- Evolución de la HC a lo largo del experimento 6.....	113
• Fig.57.- Evolución del DO a lo largo del experimento 6.....	114
• Fig.58.- Evolución del PH a lo largo del experimento 6.....	114

## Lista de Tablas

Tabla. I.- Principales productores de pescado para el consumo humano, (FAO, 2008) .....	26
Tabla. II.- Protocolo de descapsulación de la <i>Artemia</i> (Roo, 2009) .....	67
Tabla. III.- Protocolo de conservación de la <i>Artemia</i> en salmuera (Roo, 2009) .....	68
Tabla. IV.- Esquema de cultivo del experimento 1 .....	73
Tabla. V.- Esquema de cultivo del experimento 2 .....	73
Tabla. VI.- Esquema del experimento 3.....	74
Tabla. VII.- Esquema de cultivo del experimento 4, 5 y 6 .....	75
Tabla. VIII. Índices de calidad de las puestas.....	86
Tabla. IX.- Composición proximal (Peso seco) de enriquecedores, rotíferos y <i>Artemia</i> del experimento 1.....	96
Tabla. X.- Ácidos grasos de los enriquecedores utilizados (% ácidos grasos totales) .....	98
Tabla. XI.- Ácidos grasos de rotíferos y <i>Artemia</i> (% ácidos grasos totales) .....	99
Tabla. XII.- Supervivencia del test de actividad.....	105
Tabla. XIII.- Análisis proximal de enriquecedor, rotíferos, <i>Artemia</i> , huevos y larvas de seriola .....	106
Tabla. XIV.- Ácidos grasos de enriquecedores, rotíferos y <i>Artemia</i> del experimento 3, (% ácidos grasos totales).....	107
Tabla. XV.- Ácidos grasos de huevos y larvas del experimento 3 .....	109

---

## Abreviaturas

AOAC: Asociación química analítica de los Estados Unidos.

APROMAR: Asociación Empresarial de productores de cultivos marinos (Association of marine aquaculture producers; Spain).

ARA: Ácido Araquidónico (20: 4n-6).

BHT: Butilhidroxitolueno.

DHA: Ácido Docosahexaenoico (22: 6n-3).

DPA: Ácido Docosapentaenoico (22: 5n-6).

DPE: Días después de la eclosión.

DPF: Días después de la fertilización.

DO: Diámetro del ojo.

EPA: Ácido Eicosapentaenoico (20: 5n-3).

FAMES: Ácidos grasos metil ester.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FEAP: Federación Europea de Productores de Acuicultura.

FF: Fracción flotante.

FNF: Fracción no flotante.

GnRH: Hormona liberadora de Gonadotropina.

$H_{AFF}$  = Total de huevos anormales en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la fracción flotante.

HC: Altura cefálica.

HPE: Horas después de la eclosión.

HPF: Horas después de la fertilización.

$H_{MFF}$  = Total de huevos muertos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la fracción flotante.

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

$H_{NFFF}$  = Total de huevos no fecundados en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la fracción flotante.

$H_{VFF}$  = Total de huevos vivos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la fracción flotante.

ICCM: Instituto Canario de Ciencias Marinas.

$L_C$  = Número de larvas con el saco vitelino reabsorbido.

LPA: Longitud preanal.

LS: Longitud estándar.

LSC: Longitud del saco.

LT: Longitud total.

n-3 HUFA: n-3 series ácidos grasos altamente insaturados (20 o más carbonos).

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación food, Spain).

PH: Peso húmedo.

ppm: Partes por millón.

PT: Peso total.

TFA: Ácidos grasos totales.

ULPGC: Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

UV: Ultravioleta.

## Resumen

La diversificación de especies es un tema a considerar para el desarrollo sostenible de la acuicultura. No obstante, para la posible producción de nuevas especies es necesario solventar el cuello de botella que representa la etapa larvaria dentro de los cultivos, para lo cual, la utilización de una tecnología adecuada y el conocimiento de la biología de las especies, puede contribuir a superar los periodos críticos y evaluar la viabilidad de su producción.

La tecnología del mesocosmos fue utilizada para cultivar una especie con potencial para la acuicultura, el medregal negro (*Seriola rivoliana*). Se realizó la inducción a la puesta de los reproductores, durante los meses de julio a octubre, obteniéndose 10 puestas. De estas se produjeron un total de 2,7 millones de huevos los cuales se sembraron en seis experimentos diferentes.

Se hizo también un seguimiento del desarrollo embrionario. El diámetro del huevo en la fase de mórula era de  $1,049 \pm 0,04$  mm, y el de la gota lipídica de  $0,299 \pm 0,009$  mm. La eclosión se produjo a las 36 HPF a una temperatura de  $23,1^{\circ}\text{C} \pm 1,3$ . Las larvas recién eclosionadas tenían una longitud total de  $2,54 \pm 0,01$  mm y un saco vitelino de  $1,29 \pm 0,07$  mm. A las 60 HPF se produjo la apertura de la boca en el 100% de las larvas, produciéndose la primera alimentación exógena a las 72 HPF. El saco vitelino y la gota lipídica no se reabsorben totalmente hasta las 120 HPE. El día 15 DPE se inicia la flexión y se da por finalizada el 20 DPE.

De los seis experimentos realizados, solo cuatro de ellos llegaron a los 30 días. Las larvas alcanzaron una longitud total de 16,6 mm y un peso húmedo de 75,5 mg en el mejor de los experimentos. La supervivencia observada fue de 0-2.13%, observándose un pico de mortalidad en los primeros días, 7-11 DPE, debido al cambio de alimentación, y una paulatina mortalidad a lo largo de todo el periodo de cultivo.

Las larvas se mostraron muy sensibles a condiciones estresantes como los cambios de iluminación y de calidad de agua, igualmente a la manipulación principalmente, a partir del día 20 de cultivo, que se refleja en la aparición de síndrome de shock tras la captura y una mortalidad del 100% de las larvas.

En la composición proximal, tanto del enriquecedor Spirit, como de los rotíferos enriquecidos con él, y de las larvas, se encontraron altos niveles de DPA.

# 1. Introducción

## **1.- Introducción**

### **1.1.- Definición de acuicultura**

Según la FAO, la acuicultura es la cría de organismos acuáticos ya sean peces, moluscos, crustáceos o plantas. El cultivo supone la intervención humana para incrementar la producción; por ejemplo: concentrar poblaciones de peces, alimentarlos o protegerlos de los depredadores. 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 recurso de propiedad pública, con o sin licencia apropiada, constituyen la cosecha de las pesquerías.

El método de cultivo varía mucho según el lugar donde se lleve a cabo: piscicultura de agua dulce en los arrozales de Viet Nam, la cría de camarón en estanques de agua salada en las costas de Ecuador, o la producción de salmón en jaulas en las costas de Noruega o de Escocia. Sin embargo, la mayor parte de la producción de la acuicultura se lleva a cabo en países en desarrollo, para la cría de peces de agua dulce, como la tilapia o la carpa, situados en los primeros eslabones de la cadena alimentaria.

### **1.2.- Antecedentes y situación actual**

La Acuicultura, como tal, nació hace 4000 años en China con el cultivo de la carpa, sin embargo, su contribución significativa en la alimentación humana, es mucho más reciente. 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 XV.

La acuicultura ha experimentado un enorme crecimiento en los últimos 30 años, así la producción mundial de pescado, crustáceos y moluscos de acuicultura ha pasado de constituir el 3,9% de la producción pesquera total en 1970, a ser del 43% en 2004, con una previsión de que alcance el 50% en el 2025 (FAO, 2008). De esta manera desde 1970, la producción acuícola es el sector productivo que más ha crecido con un 8,7% anual frente al 1,2% en la producción pesquera o el 2,8% de la producción cárnica de animales terrestres.

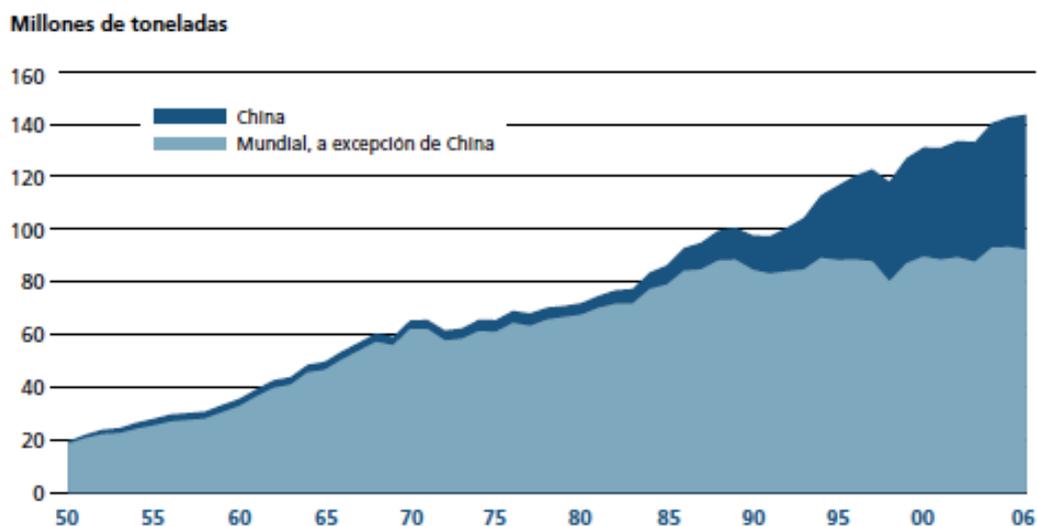
Dado que la pesca extractiva ha llegado o está por llegar al límite de su capacidad, la acuicultura tendrá que asumir una carga cada vez mayor para poder alimentar a las poblaciones pobres y que pasan hambre, predominando la producción de especies de agua dulce y de moluscos.

Ante esta situación, según la FAO, la acuicultura se presenta como una alternativa factible para complementar el grado de abastecimiento de la pesca extractiva y satisfacer la enorme demanda existente de productos del mar, permitiendo mantener las actuales proporciones de pescado en la dieta.

La producción mundial de la pesca de captura y de la acuicultura proporcionó unos 110 millones de toneladas de pescado para consumo humano en 2006, lo que equivale a un suministro teórico per cápita de 16,7kg, cifra que se encuentra entre las más elevadas registradas hasta el momento, estimándose que llegará a los 19-21 kg/persona en 2030 (Siendo en la actualidad España, uno de los primeros países consumidores de pescado a nivel mundial con 36,6 kg/persona/año (MAPA, 2007). Un 47% de esta cantidad correspondió a la acuicultura. En total, los productos pesqueros proporcionaron a más de 2.900 millones de personas al menos un 15 % del aporte medio de proteínas de origen animal.

Un vistazo general al estado de los recursos pesqueros marinos, confirma que las proporciones de las poblaciones sobreexplotadas, agotadas y en recuperación se han mantenido relativamente estables en los últimos 10-15 años, tras las marcadas tendencias al alza observadas durante las décadas de 1970 y de 1980, con la expansión de los esfuerzos pesqueros. En 2007, en torno a un 28 % de las poblaciones estaban sobreexplotadas y por lo tanto no aprovechaban su máximo potencial debido a una excesiva presión pesquera. Un 52 % adicional de las poblaciones se hallaban plenamente explotadas y, por ello, producían capturas próximas a sus límites máximos sostenibles, sin posibilidad de aumentar. Tan sólo un 20 % de las poblaciones eran objeto de una explotación moderada o estaban infraexplotadas, quizá con posibilidades de producir más. En total, el 80 % de las poblaciones mundiales de peces, sobre las que se dispone de información, han sido catalogadas como plenamente explotadas o sobreexplotadas, es probable que ya se haya alcanzado el potencial máximo de pesca de captura en los océanos del mundo.

Mientras que la producción de la pesca de captura cesó de crecer a mediados de la década de 1980, el sector de la acuicultura ha mantenido una tasa de crecimiento medio anual del 8,7 % en todo el mundo (excluyendo a China, con un 6,5 %) desde 1970. Las tasas de crecimiento anual de la producción acuícola mundial entre 2004 y 2006 fueron del 6,1 % en volumen y del 11,0 % en valor. La acuicultura sigue creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, y a mayor ritmo que la población. Se espera que la acuicultura supere a la pesca de captura como fuente de pescado para la alimentación. Desde una producción de menos de un millón de toneladas anuales a comienzos de la década de 1950, en 2006 la producción registrada alcanzó los 51,7 millones de toneladas, con un valor de 58.236 millones de EUR, lo que representa una tasa de crecimiento anual de casi el 7 %. (Fig.1)



**Fig.1.- Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO, 2008).**

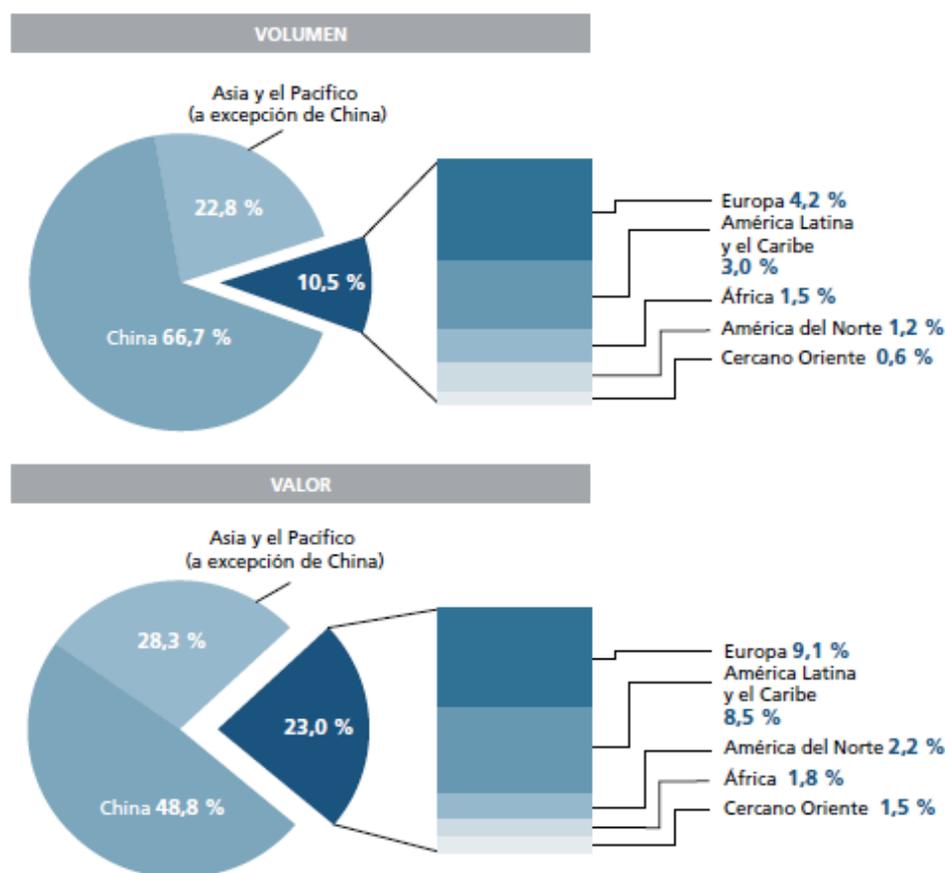
La acuicultura mundial está liderada por la región de Asia y el Pacífico, la cual aporta el 89 % de la producción total en cantidad y el 77 % en valor. Este dominio se debe principalmente a la enorme producción de China. China produce el 77 % de Ciprínidos y el 82 % del suministro mundial de Ostreidos. Así, la producción de carpas de la región de Asia y el Pacífico suma el 98 % del total mundial, la de ostras el 95 % y la de camarones y gambas el 88 % . Noruega y Chile son los dos mayores productores mundiales de salmón y representan el 33 % y el 31 %, respectivamente, de la producción mundial. (Tabla I, Fig. 2). En China, el 90 % de la producción de pescado para alimentación proviene de la acuicultura.

Tabla I.- Principales productores de pescado para el consumo humano (FAO, 2008)

	Los diez principales productores en cuanto a volumen, 2006			Los diez principales productores en cuanto a crecimiento, 2004-2006			
	2004	2006	TCA	2004	2006	TCA	
	(Toneladas)	(Porcentaje)		(Toneladas)	(Porcentaje)		
China	30 614 968	34 429 122	6,05	Uganda	5 539	32 392	141,83
India	2 794 636	3 123 135	5,71	Guatemala	4 908	16 293	82,20
Viet Nam	1 198 617	1 657 727	17,60	Mozambique	446	1 174	62,24
Tailandia	1 259 983	1 385 801	4,87	Malawi	733	1 500	43,05
Indonesia	1 045 051	1 292 899	11,23	Togo	1 525	3 020	40,72
Bangladesh	914 752	892 049	-1,25	Nigeria	43 950	84 578	38,72
Chile	665 421	802 410	9,81	Camboya	20 675	34 200	28,61
Japón	776 421	733 891	-2,78	Pakistán	76 653	121 825	26,07
Noruega	636 802	708 780	5,50	Singapur	5 406	8 573	25,93
Filipinas	512 220	623 369	10,32	México	104 354	158 642	23,30

Notas: No se contabilizan las plantas acuáticas. TCA = tasa de crecimiento porcentual media anual para el periodo 2004-2006.

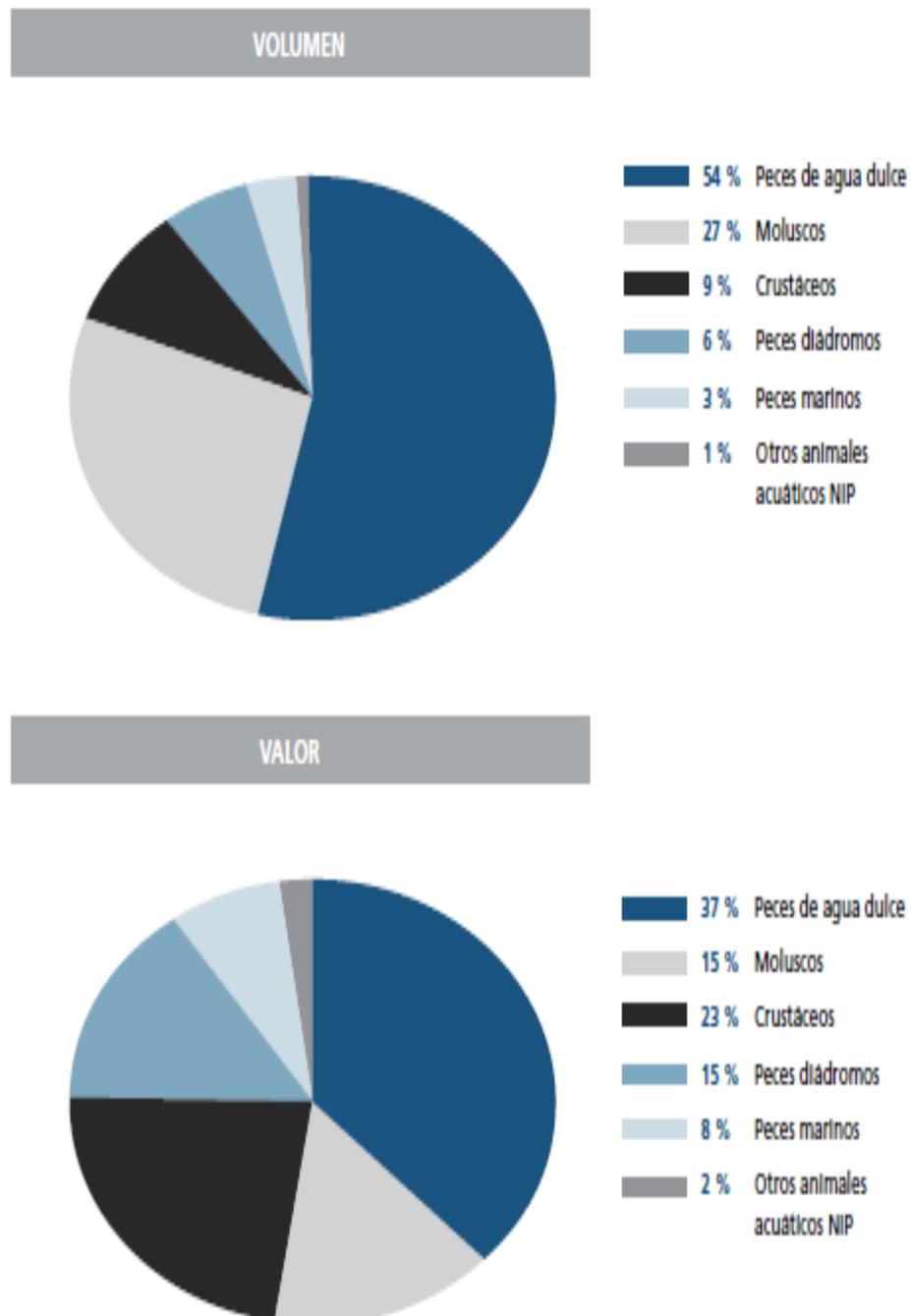
<sup>1</sup> Por lo que respecta a los mayores productores en términos de crecimiento, solamente se han tenido en cuenta aquellos países cuya producción superó las 1 000 toneladas en 2006.



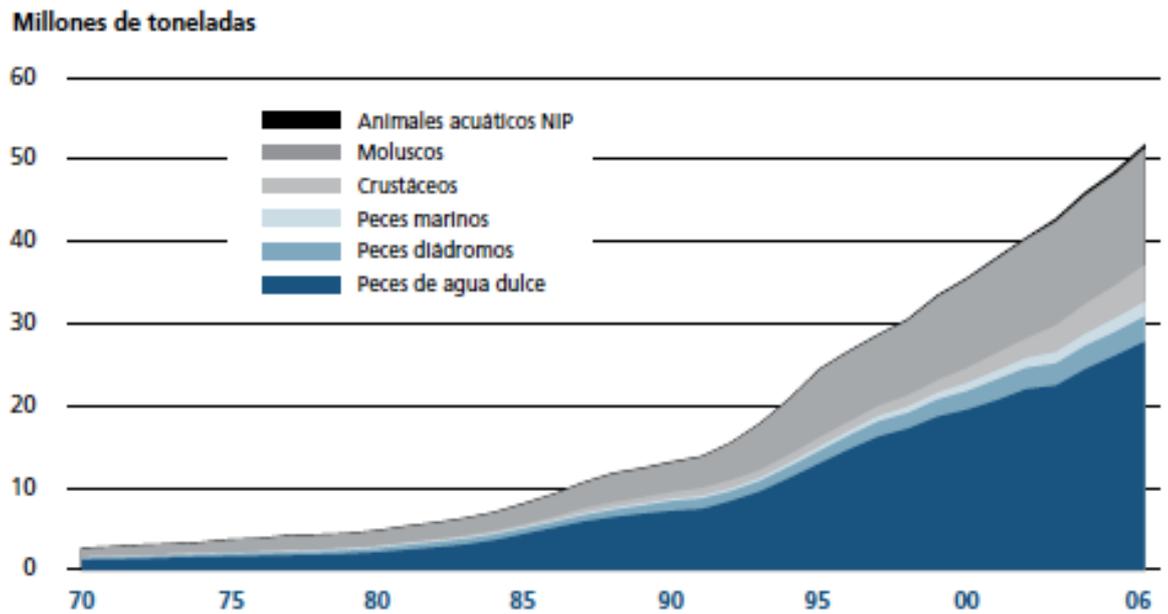
Nota: No se contabilizan las plantas acuáticas.

Fig.2.- Producción de la acuicultura por regiones en 2006 (FAO, 2008).

En 2006, más de la mitad de la producción de la acuicultura mundial estaba compuesta por peces de agua dulce. La producción ascendió a 27,8 millones de toneladas, con un valor de 21.800 millones de EUR. Ese mismo año, los moluscos constituyeron el segundo mayor grupo, con 14,1 millones de toneladas (27 % de la producción total), con un valor de 8.800 millones de EUR. Los crustáceos, aunque en cantidad mucho menor (4,5 millones de toneladas), alcanzaron un valor significativamente mayor, de 13.270 millones de EUR. (Figs. 3 y 4)



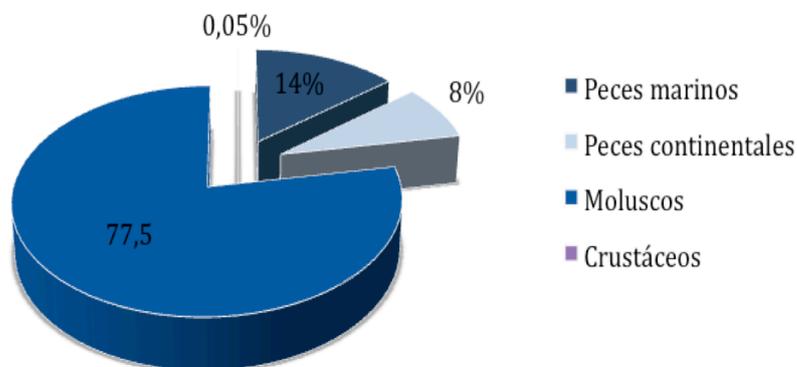
**Fig.3.- Producción de la acuicultura mundial: principales grupos de especies (FAO, 2008).**



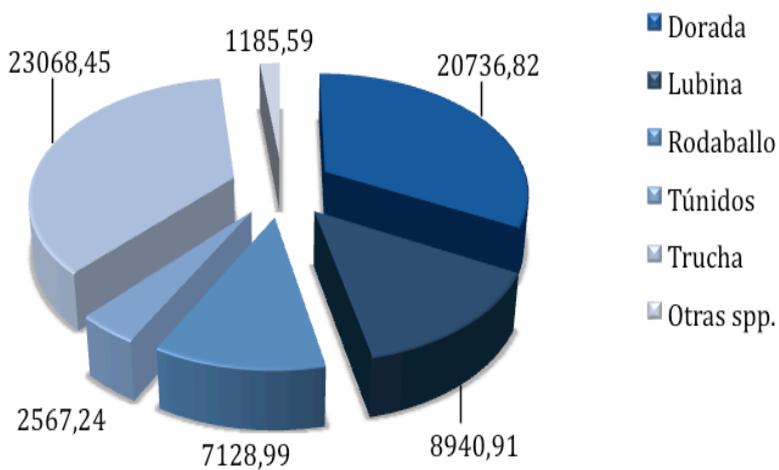
Nota: NIP = no incluidos en otra parte.  
**Fig. 4.- Evolución de la producción mundial de la acuicultura, principales grupos de especies (FAO, 2008).**

A nivel mundial, en el año 2006, se contabilizaron más de 250 especies de animales y plantas cultivadas, siendo los peces el grupo mayoritario en diversidad, con casi un 50% de las especies cultivadas (APROMAR, 2008). En el caso concreto de la acuicultura europea, los principales grupos que se producen, son peces y moluscos de alto valor comercial. Sin embargo, se trata de un sector que sigue basado en la explotación de un reducido número de especies, cuyas técnicas de cultivo han podido establecerse gracias al esfuerzo dedicado tanto al trabajo empírico, como a la investigación aplicada al desarrollo tecnológico. En el caso particular de los peces marinos (excluyendo Salmónidos), la producción en los ocho últimos años ha experimentado un importante aumento pasando de poco más de 125.000 toneladas en el año 2000, concentradas fundamentalmente en el cultivo de 3 especies: dorada (*Sparus aurata*), lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y rodaballo (*Psetta máxima*) a algo más de 250.000 toneladas estimadas en el año 2008. Incluyendo las producciones de bacalao (*Gadus morhua*), corvina (*Argyrosomus regius*) y el engorde de atún Atlántico (*Thunnus thynnus*). A las especies anteriormente mencionadas se han incorporado las producciones de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), y halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (FEAP, 2010).

En España, aproximadamente el 78% de la producción en 2008 correspondió a moluscos (principalmente mejillón, junto con ostras, almejas y berberechos) y el 22% restante a peces, especialmente dorada, lubina, rodaballo, trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y *Thunnus sp.* (Figs. 5 y 6).



**Fig.5.- Distribución de la producción de la acuicultura en España (JACUMAR, 2008).**



**Fig. 6.- Producción de la acuicultura, de las principales especies de peces en España (JACUMAR, 2008).**

### 1.3.- Diversificación

La acuicultura marina se ha desarrollado concentrando su actividad en unas pocas especies, por lo que se hace necesario desarrollar técnicas que permitan la diversificación buscando una serie de especies que reúnan una serie de requisitos tanto económicos como biológicos (Basurco y Abellán, 1999).

En los últimos años se han realizado, alrededor del mundo, múltiples estudios para el desarrollo del cultivo de nuevas especies realizándose grandes progresos en especies como la cobia, *Rachycentrom canadum* (Faulk *et al.*, 2007), el lenguado común, *Solea solea* (Palazzi *et al.*, 2006), la lisa, *Chelon labrusus* (Ben Khemis *et al.*, 2006), el pez limón o medregal, *Seriola dumerili* (Papandroulakis *et al.*, 2005) y el pez gato asiático, *Pangasius bocourti* (Hung *et al.*, 2002) entre otros. En el norte de Europa se han consolidado en los últimos 10 años las producciones de bacalao (*Gadus morhua*) y de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Con Noruega e Islandia como principales países productores.

Los últimos años en la acuicultura española han venido marcados por la aparición de una serie de acciones encaminadas a diversificar la producción de las especies consideradas tradicionales, dorada, lubina y rodaballo.

A principios de la década de los noventa, centros de investigación y algunas empresas privadas del sector, comenzaron diferentes investigaciones con nuevas especies potencialmente cultivables. Para la elección de las mismas se tomó como criterio inicial que tuvieran un alto valor en el mercado y que poseyeran unas características biológicas adecuadas, que permitieran el desarrollo del cultivo en todas sus fases, para obtener un suministro de alevines continuo que permitiese disponer de una producción sostenible.

Los requisitos necesarios para la elección de estas nuevas especies según Basurco y Abellán (1999) se resumen en :

- . Estudios preliminares económicos y de mercado para la evaluación de los precios (actuales y posible evolución), demanda de la especie y evolución de los mercados.
- . Estudio de las condiciones biológicas básicas que conciernen al cultivo de la especie: reproducción, crecimiento, adaptación a los sistemas de cultivo existentes.

. Suministro de juveniles y/o reproductores, rapidez de crecimiento, tamaño, fecundidad, viabilidad del cultivo larvario y engorde, eficacia de conversión del alimento, resistencia a enfermedades y estrés, mortalidad, edad de maduración, etc.

. Desde el punto de vista medioambiental las especies candidatas a ser seleccionadas, y con el fin de minimizar los efectos ambientales adversos y de proteger la diversidad biológica acuática, deben ser especies locales, evitando la tentación de introducir especies exóticas (Bartley, 1993, 1998).

Basurco y Abellan (1999) señalan que esta primera "selección" normalmente se lleva a cabo por instituciones públicas y se centran en "Estudios experimentales de un stock proveniente del medio natural, adaptación al cautiverio, y la definición del ciclo biológico de vida". En cuanto a las empresas privadas, el criterio principal a seguir a la hora de seleccionar una especie marina para el cultivo, se orienta hacia la posibilidad de poder llevar a cabo ensayos pilotos experimentales, y teniendo en cuenta los siguientes puntos:

- Interés económico y comercial (de mercado).
- Grado alcanzado en la tecnología del cultivo de la especie en cuestión.
- Grado alcanzado en la tecnología del cultivo de una especie similar y su cultivo larvario y engorde.

Una vez seleccionada la especie, se inicia una fase de investigación y desarrollo tecnológico que, a pesar de que básicamente se utiliza tecnología ya conocida, suelen ser fases largas y costosas, del orden de entre 5 y 10 años. La siguiente fase consiste en el desarrollo de técnicas de producción a escala piloto y de implantación industrial. La diversificación tiene una serie de ventajas: nos permitiría fundamentalmente reducir el riesgo en las instalaciones, ya que se disminuye el riesgo de mortalidades por enfermedades o caídas de precio en el mercado, también nos permitiría una mayor expansión en el mercado al aumentar los sectores de venta actuales y la introducción en nuevos mercados ya sean nacionales o extranjeros. Además el cultivo de nuevas especies va a aumentar la eficiencia de las instalaciones en donde la utilización de los recursos se puede ampliar a prácticamente todo el año.

Sin embargo, no todas son ventajas en la diversificación, ya que la aparición de nuevas especies en el mercado puede ocasionar bajadas o desestabilizaciones en el precio

de las especies ya cultivadas, no existiendo garantía de que el precio se mantenga. Además, para la puesta en el mercado de nuevas especies, es necesario invertir en el desarrollo de técnicas de producción y de apertura de mercado.

Dentro del panorama de las nuevas especies podemos distinguir varios grupos:

- 1- Especies de las que, a pesar de tener un valor comercial alto, no se tiene información, o ésta es escasa sobre su aclimatación a las condiciones de cultivo y en principio se supone que presentan serias dificultades, lo cual no significa necesariamente que no sean viables. Entre ellas podemos citar la merluza (*Merluccius merluccius*), el rape (*Lophius piscatorius*), el calamar (*Loligo vulgaris*), etc.
- 2- Especies de las que si se dispone de dicha información, pero ésta todavía no es concluyente, lo cual no permite el paso de la fase de investigación a la de desarrollo industrial. Entre ellas cabría citar el salmonete de roca (*Mullus surmuletus*), el esturión (*Acipenser sturio*), etc.
- 3- Especies de las que ya se tienen resultados concluyentes pero no reúnen las condiciones para ser explotadas comercialmente. Estas especies pueden sin embargo ser interesantes desde el punto de vista de la repoblación. Entre éstas podemos citar el sargo (*Diplodus sargus*), el aligote (*Pagellus acarne*), el abadejo (*Pollachius pollachius*), la herrera (*Lithognathus mormyrus*), la hurta (*Pagrus auriga*), *Mugil sp*, etc.
- 4- Especies de las que no sólo existe información concluyente para su explotación, sino que en alguno de los casos ya se ha cerrado el ciclo de producción y las investigaciones están en fase de desarrollo para ser transferidas al sector industrial. Entre estas especies citaremos el lenguado común, el dentón (*Dentex dentex*), el pargo (*Pagrus pagrus*) y el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*).

#### **1.4.- Inducción a la puesta**

Muchas de las especies piscícolas no maduran normalmene en condiciones de cautiverio, especialmente cuando las variables ambientales que condicionan el desarrollo gonadal y la maduración de gametos están alteradas o ausentes. En ciertas circunstancias,

para sincronizar la puesta, es necesario acelerar o retardar la producción de gametos machos y hembras, de adelantar o desfasar el desarrollo embrionario y la producción de juveniles, o facilitar la hibridación de especies o cepas que difieren en sus períodos de maduración.

Así, muchas especies de peces exhiben disfunciones reproductoras cuando son estabulados en cautividad, las más comunes son que la hembra no culmina el proceso final de la maduración del oocito y por consiguiente la ovulación y la puesta (Zohar, 1988, 1989 a,b; Peter *et al.*, 1993), mientras que los machos producen pequeños volúmenes de esperma o esperma de baja calidad (Billard, 1986, 1989). Por ello, el tratamiento hormonal es el único medio de asegurar la puesta.

En la actualidad, una de las técnicas más utilizadas para la inducción de la puesta, de reproductores en cautividad, es el uso de hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH) que inducen a la hipófisis a la secreción de gonadotropinas y la consiguiente maduración de los oocitos y puesta. Las ventajas de la aplicación de hormonas liberadoras (GnRH) en la inducción de la puesta en peces han sido señaladas por Zohar y Mylonas (2001). Con la aparición de análogos sintéticos (LHRHa y GnRHa) que resultaron más potentes y de mayor duración que los nativos, se ha generalizado su uso, tanto en especie marinas como de agua dulce. (Zohar, 1988; Peter y Yu, 1997; Patiño, 1997).

Los preparados sintéticos o análogos han sido utilizados en las principales especies de la acuicultura europea (FEAP, 2010): lenguado común (Bertotto *et al.*, 2006), dorada (Barbaro *et al.*, 1997), lubina europea (Fornies *et al.*, 2001; Mylonas *et al.*, 2003; Firat *et al.*, 2005), trucha arcoiris (Arabaci *et al.*, 2004; Vazirzadeh *et al.*, 2008), atún atlántico (Mylonas *et al.*, 2007), salmón atlántico, *Salmo salar* (Vikingstad *et al.*, 2008), rodaballo (Mugnier *et al.*, 2000), halibut (Mazorra *et al.*, 2000), y bacalao (Garber *et al.*, 2009).

Así mismo han sido utilizados en especies emergentes de la acuicultura europea (Basurco y Abellan, 1999), especies tales como el verrugato, *Umbrina cirrosa* (Mylonas *et al.*, 2000; Barbaro *et al.*, 2002), lenguado senegalés (Agulleiro *et al.*, 2006; Guzman *et al.*, 2009), corvina (Cardenas *et al.*, 2009), pez limón o medregal (Mylonas *et al.*, 2004), mero moreno, *Epinephelus marginatus* (Marino *et al.*, 2003; Conceição *et al.*, 2008) o el pargo (Büke *et al.*, 2005).

## 1.5.- Cría larvaria

### 1.5.1.- Importancia de la cría larvaria

Hoy en día, la producción larvaria y la obtención de alevines de buena calidad, siguen representando el cuello de botella para el desarrollo de la acuicultura, sobre todo en ciertas especies marinas. Esto es debido a que las larvas de peces marinos no están completamente desarrolladas cuando eclosionan, por lo que ciertos tejidos y órganos, como el sistema nervioso, digestivo y estructuras óseas, no han completado su desarrollo y deben experimentar importantes cambios morfológicos, funcionales y fisiológicos durante las primeras semanas de vida (Govoni *et al.*, 1986). Durante las primeras etapas de desarrollo de estos organismos se necesitará un manejo más delicado. Una solución a este inconveniente, sería optimizar las condiciones de manejo de las diferentes especies marinas que actualmente se cultivan.

Se ha comprobado que la obtención de semilla, del medio natural, no es una estrategia viable en los cultivos intensivos de peces, siendo adecuada en otros sistemas de cultivo y con otros organismos, como moluscos y algunos peces de gran valor comercial como pueden ser ciertas especies de atún, mero moreno y *Seriola sp* (Fig.7) (Ottolengui *et al.*, 2004).



**Fig.7.- Juveniles de medregal limón y medregal listado (*Seriola fasciata*) capturados para su engorde.**

Tanto la Asociación Canaria de Empresarios de Acuicultura (ACEA), como la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (APROMAR) han resaltado la conveniencia de que el sector de cría vaya por delante del sector de engorde, en el sentido de resolver los problemas de índole técnico y adquirir el desarrollo adecuado para así garantizar que, cuando este último sector disponga de mercados suficientes para llevar a cabo una producción masiva (grandes tonelajes), no se quede sin materia prima (semilla) para continuar desarrollándose.

El estudio del comportamiento larvario es muy importante ya que aporta ventajas prácticas sobre el cultivo, tanto directas como indirectas. El estudio del comportamiento a lo largo del desarrollo larvario permitiría establecer los momentos de aparición de determinadas pautas típicas en los animales sanos. Posibles desviaciones en el tipo de comportamiento o retrasos en la aparición de esas pautas, constituirían indicadores no invasivos del estado de desarrollo, madurez y salud del animal. Así, el estudio del comportamiento larvario puede revelarse como un excelente indicador del estado de bienestar de las larvas, y por lo tanto, trascendental en el éxito del cultivo larvario. El continuo avance en estudios relacionados con la nutrición, técnicas de producción, genética, patología, con ayuda de los estudios de comportamiento de larvas y alevines, favorecerá la incorporación de nuevas especies de peces marinos a la acuicultura.

La cría larvaria es la fase que comienza con la eclosión de los huevos y la aparición de las larvas, las cuales después de absorber todas sus reservas de vitelo, deben iniciar su alimentación exógena, fase que suele estar asociada a mortalidades masivas tanto en el medio natural como en acuicultura. La mortalidad suele estar asociada a la especie y a la calidad de la puesta, pero principalmente se debe a la inapropiada alimentación en los primeros días de vida (Yúfera y Darias, 2007).

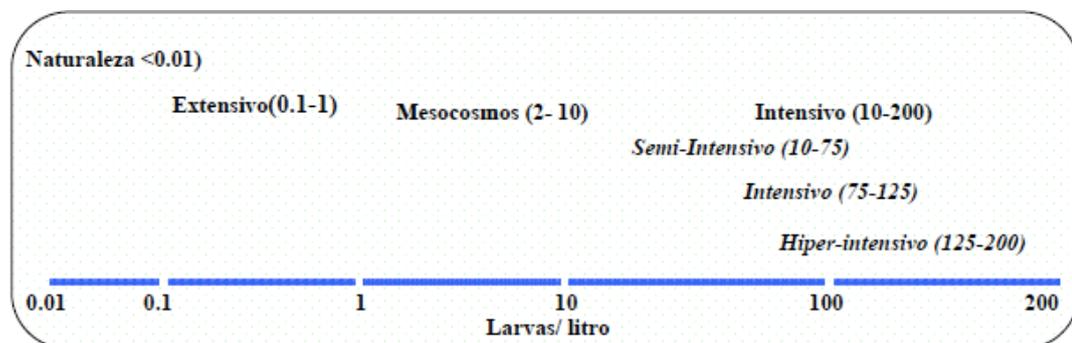
Las larvas en el medio natural, tienen a su disposición un amplio rango de organismos, aunque la supervivencia en este medio sea baja debido a la poca disponibilidad de las presas y a la elevada presencia de depredadores. En los sistemas en cautividad debido, fundamentalmente, a los costes de producción, esta elección es muy limitada, y la alimentación larvaria esta compuesta por sólo dos o tres organismos. Dependen de una cadena trófica natural, basada en el uso de algas unicelulares, rotíferos y

*Artemia*. Este alimento suele ser producido en las mismas instalaciones, de cría larvaria lo cual incrementa la dificultad y los costes del cultivo (Chang *et al.*, 2006; Curnow *et al.*, 2006).

La optimización de las condiciones de cultivo, pasa por mantener unas condiciones bióticas y abióticas adecuadas que deben tender a aproximarse en lo posible, a las condiciones del medio natural. En el éxito de las distintas técnicas de cultivo, intervienen un gran número de variables que son condicionantes de las mismas, entre ellas la calidad nutritiva del alimento.

### 1.5.2.- Técnicas de cría larvaria

Existen una gran variedad de técnicas de cultivo de los peces marinos. La clasificación establecida por Divanach (1985) define las técnicas de cultivo larvario teniendo en cuenta la densidad larvaria y el volumen del tanque utilizado, diferenciando así tres categorías principales: sistemas o técnicas intensivas, técnicas extensivas y sistemas o técnicas mesocosmos (Fig.8).



**Fig.8.- Clasificación de las técnicas de cultivo larvario modificado por Divanach (1985).**

La última revisión de definición de técnicas de cría larvaria realizada por Divanach *et al.* (1998) incorpora a su clasificación inicial diferentes características estructurales y operacionales que permiten definir la productividad y eficiencia del sistema.

Otros autores como Van der Meeren y Nass (1997) clasifican las técnicas de cría larvaria de acuerdo al origen de la alimentación. Clasificaciones de diferentes autores coinciden plenamente en la definición de sistemas extensivos e intensivos. Sin embargo, la definición de semi-intensivo de Van der Meeren y Naas (1997) es lo que Divanach *et*

*al.* (1998) definen como sistema semi-extensivo. La terminología que se utiliza en este estudio, hace referencia a la establecida por Divanach *et al.* (1998).

### 1.5.2.1.- Sistemas intensivos

Se caracterizan por la alta densidad larvaria usada en los tanques (Semi-intensivo = 25-50 larvas/litro; Intensivo= 75-125 larvas/litro; Hiper-intensivo =150-200 larvas/litro ). En estas tres variantes, la complejidad del cultivo se incrementa con el aumento de densidad larvaria (Divanach *et al.*,1998).

Las técnicas intensivas e hiper-intensivas se aplican con especies como la lubina y la dorada, con las cuales aún a estas densidades de cultivo se pueden alcanzar elevadas supervivencias (Shields, 2001). Por el contrario, las técnicas semi-intensivas suelen estar más indicadas en algunas especies de peces planos como el rodaballo. Estas técnicas son sofisticadas, caras, y requieren de un conocimiento profundo de la especie.

Se llevan a cabo por lo general en el interior, con tanques por lo general de forma determinada (cilindros) y, a pesar de que todavía es frecuente el uso de pequeños volúmenes (0,5-1 m<sup>3</sup>), la tendencia actual es la utilización de volúmenes mayores (10-20m<sup>3</sup>). Los parámetros de cultivo en las técnicas intensivas son: condiciones controladas de temperatura, iluminación, hidrodinámica, oxigenación y alimentación. Generalmente el fotoperiodo, intensidad y espectro lumínico son artificiales, y se cambian de acuerdo al desarrollo de las larvas y a la agudeza de su sistema visual (Roo *et al.*, 2001).

La alimentación en estos sistemas es totalmente exógena y restringida, a una dieta que se basa en el uso del rotífero *Brachionus sp* y *Artemia sp*, cuyo valor nutritivo es necesario mejorar a través de enriquecedores comerciales que aportan diversos nutrientes (proteínas, ácidos grasos altamente insaturados, vitaminas y minerales) con el fin de cubrir los requerimientos nutritivos de las larvas (Izquierdo y Fernández-Palacios, 1997; Sargent *et al.*, 1999). La selección de la correcta secuencia alimentaria y la flexibilidad en su aplicación, de acuerdo a las necesidades del lote de larvas cultivado, es una herramienta indispensable para obtener elevadas tasas de supervivencia, baja dispersión de tallas y reducir el comportamiento caníbal.

Dado que con este tipo de técnicas todos los parámetros son potencialmente limitantes, los requisitos para su éxito dependen de un personal de trabajo especializado en

términos biológicos y altamente capacitado en el manejo de las distintas áreas. Cuando los suministros técnicos no cubren las demandas biológicas las larvas no tienen otra alternativa que adaptarse o morir. Durante esta adaptación algunas larvas pueden deformarse, lo que las hace no comercializables, o bien estar en desventaja presentando un bajo rendimiento en el crecimiento (Divanach, 1985).

#### **1.5.2.2.- Sistemas Extensivos**

Se basan en la productividad de un sistema artificial que simula la naturaleza, donde la larva es el eslabón superior de la pirámide alimenticia que se genera, por lo que no es necesario proveer de alimento a las mismas ya que el ecosistema es autónomo desde el inicio de la vida trófica hasta la cosecha. Eventualmente, se procede a la adición de fertilizantes para promover un desarrollo más rápido de la producción primaria en el estanque.

Los volúmenes de cultivo se inoculan con fitoplancton y zooplancton y posteriormente se añaden los huevos o larvas de las especies objetivo (Van der Meeren y Naas, 1997; Divanach *et al.*, 2002).

Las técnicas extensivas, al contrario que las intensivas se realiza con bajas densidades de cultivo (0.1 – 1 indv/ litro), son ecológicas y económicas. Se realiza en grandes estanques exteriores, aunque en ocasiones se utilizan bolsas de plástico, tanques o jaulas con malla fina. Los volúmenes pueden variar de cientos a miles de metros cúbicos con profundidades de dos a cinco metros. Generalmente, estos sistemas están expuestos a las fluctuaciones climáticas y adaptadas al medioambiente natural que será específico de cada región, estación y geografía del lugar elegido para su desarrollo.

Las principales operaciones, que requieren de la intervención de las personas se refieren a la preparación del tanque, inicio de la cadena trófica, inóculo de huevos o larvas y la pesca final de los alevines producidos.

El buen funcionamiento de esta técnica depende del conocimiento del ecosistema, de su manejo y del respeto hacia las leyes de productividad. El éxito con este tipo de producción en relación con la calidad de las larvas producidas, es mucho mayor que con el método intensivo. La calidad de los alevines producidos es excelente, ya que no aparecen problemas como peces sin vejiga, deformidades esqueléticas, anomalías de coloración o comportamiento (Divanach *et al.*, 1996).

Este sistema aunque utiliza bajas densidades de cultivo, es ciento, incluso miles de veces superior, que las densidades existentes en el medio natural.

### **1.5.2.3.- Sistemas Semi-extensivos (mesocosmos)**

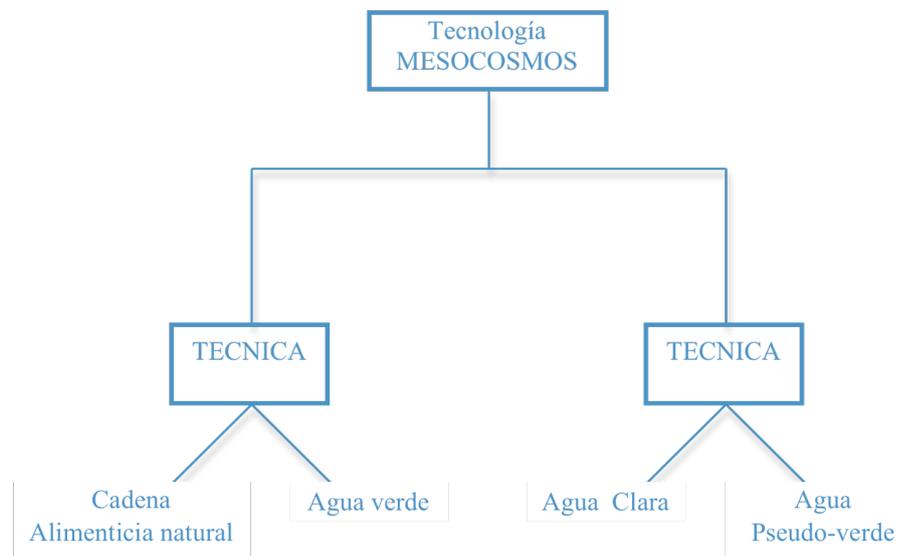
Estos sistemas de alto rendimiento, son intermedios entre los extensivos e intensivos, y presentan las ventajas de ambos sin sus respectivos inconvenientes. Se consideran técnicas semi-extensivas de producción masiva (Divanach y Kentouri, 2000; Papandroulakis *et al.*, 2004).

El cultivo larvario tiene lugar a densidades relativamente bajas (2–10 larvas/litro) en volúmenes relativamente grandes (30-100 m<sup>3</sup>) y a una profundidad de 1,5-2,5m. Con este sistema obtenemos una elevada producción de alevines por tanque (50.000 a 300.000 dependiendo de la especie) y una productividad alta (> 2 millones de alevines/persona/año) (Divanach *et al.*, 2002).

Se lleva a cabo en sitios cerrados o semi-abiertos por lo que las condiciones medioambientales pueden ser tanto naturales como artificiales, y es posible manejarlas según la preferencia. Esto evita variaciones climáticas estacionales o geográficas. Para la mayoría de las especies se utilizan fotoperiodos largos (> 18 horas) y temperaturas medias (15-21°C). La alimentación exógena y endógena combinada aumenta la calidad nutritiva del alimento para las larvas, reduciendo los riesgos de deficiencias nutricionales a consecuencia de un exceso de alimentación o falta de presas.

El rendimiento obtenido con esta técnica para el cultivo de especies conocidas como lubina, dorada o sargo son frecuentemente mejores que los obtenidos con técnicas intensivas o extensivas. La supervivencia, tras el destete, de los alevines generalmente está entre un 40-90% de los huevos con una media del 60 %. El crecimiento oscila entre 15 y 20 mg al mes de vida, con unos índices de dispersión bajos, y con una menor incidencia de deformidades durante los 40-50 primeros días. El destete se completa a los 45-55 días de vida (Divanach *et al.*, 2002). Esta tecnología ha sido empleada con éxito para la producción de alevines de más de 25 especies de peces marinos y 5 híbridas (Divanach *et al.*, 2002).

Dentro de la técnica Mesocosmos se diferencian dos variantes (Fig.9) y cuatro subvariantes de acuerdo al origen y calidad de la cadena alimenticia (Divanach *et al.*,2002).



**Fig.9.-Organización de tecnologías de mesocosmos. (Filosofía general y especificidad técnica) (Divanach y Kentouri, 2000).**

En la filosofía extensiva la cadena alimenticia es básicamente endógena y esta es complementada con alimentación exógena cuando se presentan síntomas de agotamiento y falta de alimento. En la filosofía intensiva, la alimentación es básicamente exógena pero presenta una cierta capacidad de producción endógena debido a la baja densidad de las larvas (baja tasas de alimentación) y a la presencia de fitoplancton en el tanque. Las 4 subvariantes se caracterizan por los métodos para la mejora del medio y /o la cadena alimenticia:

#### **1.5.2.3.1.- Bloom natural- Filosofía extensiva.**

Se basa en la generación de una cadena trófica natural, cuyo inóculo se obtiene directamente a partir del agua de mar que se bombea (Divanach *et al.*, 2002). Para ello, se utiliza una filtración gruesa, 250-350 $\mu$ m, del agua, que permite eliminar posibles competidores y posibilita el paso de pequeño plancton natural que será usado como inóculo. El agua es fertilizada con nutrientes para que se desarrolle el fitoplancton presente de forma natural. Las larvas se alimentaran de zooplancton natural alrededor de 20-25 días, tiempo crítico en el desarrollo de la larva y tras el cual ya están preparadas para continuar alimentándose de *Artemia* y comenzar su destete

#### **1.5.2.3.2- Método de agua verde- Filosofía extensiva.**

Al igual, que el descrito anteriormente, consiste en la generación de una cadena trófica, sin embargo, esta será de origen endógeno (Divanach *et al.*, 2002). En este caso, el tanque se llena con agua de mar previamente filtrada y esterilizada. Se fertiliza con nutrientes y se introduce un inóculo de fitoplancton y rotíferos permitiendo que se desarrollen ambos. Cuando la cadena alimenticia se desarrolla correctamente esta dura aproximadamente 25 días, pasando posteriormente a usarse *Artemia* y dietas de destete.

#### **1.5.2.3.3- Métodos de agua pseudo verde- Filosofía intensiva.**

En ella, el cultivo larvario se desarrolla en un medio con una composición más estable que los anteriores, que contiene fitoplancton y rotíferos de origen exógeno, producidos en instalaciones paralelas y que se aportan diariamente según la demanda de las larvas (Divanach *et al.*, 2002) La adición de fitoplancton (*Nanochloropsis sp* y *Chlorella sp*) y rotíferos se realiza 1-2 veces al día y se utilizan rotíferos previamente enriquecidos, con preparados comerciales para mejorar su valor nutritivo. Cuando la larva alcanza el tamaño necesario para poder alimentarse de *Artemia* cesa el uso del fitoplancton y el cultivo se continúa en técnica de agua clara.

Existen tres divisiones de este método: la primera consiste en mantener los huevos y las prelarvas en un medio con agua clara y casi aséptico hasta el inicio de la vida trófica. En esta etapa se adiciona el fitoplancton y los rotíferos. En las otras dos divisiones se inicia el tanque de cultivo ya sea con una cadena alimenticia natural o bien una cadena a base de fitoplancton y rotíferos. Posterior a ello, se adicionan los huevos o prelarvas. Estas dos últimas variantes del método suelen no ser muy recomendables, puesto que parte de la fase autotrófica ocurre en un medio muy poblado, lo cual en ocasiones perturba a las prelarvas (Divanach y Kentouri, 2000).

#### **1.5.2.3.4.- Métodos de agua clara- Filosofía intensiva.**

Es un método en el cual no se utiliza fitoplancton y esta siempre asociado a altas tasas de renovación de agua  $>10\%/h$  lo que imposibilita el desarrollo de microorganismos endógenos. Se utiliza generalmente con especies, como la lubina, que aceptan rápidamente los nauplios de *Artemia* en su primera alimentación. O bien asociado a sistemas de alimentación automática capaces de suministrar alimento con una calidad nutritiva elevada (Divanach *et al.*, 2002).

### 1.5.2.3.5- Técnicas neo-verde.

Esta es una nueva técnica que todavía están siendo testada en muchas instalaciones a nivel experimental, utilizando generalmente fitoplancton crioconservado o producido en sistemas de cultivos heterotróficos, como pastas y liofilizados de microalgas (Divanach *et al.*, 2002).

### 1.5.3.- Alimentación larvaria.

#### 1.5.3.1.- Microalgas.

La utilización de microalgas es necesaria tanto para la alimentación directa de las larvas (en algunos peces), o como base de la cadena alimentaria para la producción masiva de zooplancton (rotíferos, *Artemia* y copépodos). En la cría larvaria de peces, las microalgas son utilizadas principalmente para la producción masiva de alimento vivo, sin embargo también se utiliza directamente en los tanques de cultivo “técnica del agua verde”, ya que la presencia de la microalga en el tanque colabora con la estabilización de la calidad del agua en sistemas cerrados ayudando en la producción de oxígeno y en la remoción de productos metabólicos, funciona como fuente indirecta de alimento ya que mantiene la calidad del zooplancton, generando una pequeña cadena alimenticia, incrementa la captura del alimento debido a que mejora el contraste visual y la dispersión de la luz, y por último, ayuda en el control microbiano (Coutteau, 1996).

#### 1.5.3.2.- Rotíferos.

Los rotíferos (Fig.10), fueron encontrados adecuados como alimento vivo para larvas de peces debido a varias razones: forma, talla, color, poca movilidad, su posible manipulación bioquímica y su fácil cultivo a altas densidades que permite suministrar grandes cantidades a las larvas en cautividad. Además, en la actualidad los rotíferos sirven como biocápsulas o vehículos para transferir agentes terapéuticos a las larvas.

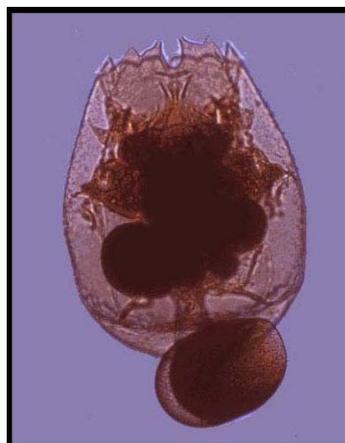


Fig.10.- Rotífero *Brachionus* sp.

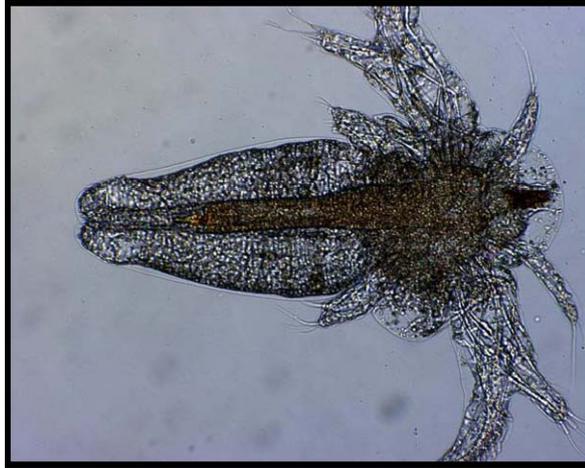
Debido a que son utilizados como único alimento de las larvas de peces en las primeras fases de su desarrollo, estos deben suministrar todos los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo de sus depredadores (larvas) durante este periodo. Dentro de estos nutrientes se incluyen los lípidos, proteínas, aminoácidos esenciales y vitaminas, la mayoría de los rotíferos cultivados pueden tener ausencia de estos nutrientes por lo que deben ser enriquecidos con microalgas y/o enriquecedores comerciales ricos en estos nutrientes para ser ofrecidos posteriormente a las larvas.

#### **1.5.3.3.- *Artemia*.**

Después de la alimentación con rotíferos, se suele continuar con *Artemia sp.* (Fig.11), que aunque no forma parte de la dieta natural de peces, es una de las presas vivas más utilizadas en la cría larvaria de peces y crustáceos, debido principalmente a su capacidad de producir cistes que pueden mantenerse en un estado latente durante largos periodos de tiempo, lo que permite que sean procesados y envasados para su comercialización, evitando así la realización de un cultivo continuo como en el caso de los rotíferos.

Los nauplios de *Artemia* presentan un tamaño que oscila entre 400 y 500  $\mu\text{m}$ , que los hace adecuados como segunda alimentación de un gran número de peces e incluso como primera de algunos. Su valor nutritivo es relativamente alto debido a sus reservas vitelínicas, además, es un organismo filtrador no selectivo, lo que le brinda la capacidad de retener cualquier tipo de partículas orgánicas o inorgánicas siempre que estas tengan un tamaño adecuado, permitiendo así que su valor nutritivo pueda ser mejorado con enriquecedores, comúnmente se utilizan emulsiones de aceites de origen marino y a su vez se puede utilizar como medio de transporte de otras sustancias como medicamentos, vacunas etc. Sin embargo, este enriquecimiento implica un crecimiento de la *Artemia*, por lo cual en la acuicultura se utilizan tanto nauplios (*Artemia* recién eclosionada) como metanauplios enriquecidos (24 horas después de la eclosión)

Sin embargo, el uso de *Artemia*, presenta algunos inconvenientes importantes, como el ser un recurso limitado y el alto coste de los cistes. Además presenta un valor nutritivo variable según el lugar de procedencia de la misma (Versichelle *et al.*, 1989).



**Fig.11.- Metanauplio de *Artemia* sp.**

#### **1.5.3.4.- Copépodos.**

Los copépodos marinos son el alimento natural de la mayoría de las larvas de peces y comprenden un gran número de especies. Se han logrado cultivos de Calanoideos (*Calanus sp.*, *Acartias sp.*, etc.), y Harpacticoideos (*Tigriopus japonicus*, *Tisbe furcata*, etc.) (Støttrup y Norsker, 1997; Nanton y Castell, 1998; Schipp *et al.*, 1999). Se ha señalado que los copepodos pueden tener un mayor valor como alimento de larvas de peces que la *Artemia* porque su perfil nutricional es más adecuado para los requerimientos de estas (Delbare *et al.*, 1996; Nanton y Castell, 1998; Payne *et al.*, 2001)

Su típico movimiento en zigzag, es un importante estímulo de aceptabilidad para muchos peces, los cuales los prefieren antes que a los rotíferos, otra ventaja del uso de los copépodos es que las especies bentónicas como *Tisbe sp.* mantienen las paredes y el fondo de los estanques de cultivo libres de microalgas y detritos por el pastoreo (Delbare *et al.*, 1996). Otra de las ventajas de su uso como alimento de larvas de peces es que pueden ser administrados como nauplios, copepoditos o adultos. Sin embargo, presentan limitaciones ya que estos organismos presentan ciclos de vida largos, comparados con los otros alimentos vivos. Así, su desarrollo puede durar desde una semana hasta un año y su longevidad va desde seis meses hasta un año (Delbare *et al.*, 1996)

#### **1.5.3.5.- Destete.**

A pesar de las excelentes características que presentan los alimentos vivos en la cría larvaria, su utilización constituye uno de los costes más importantes en una producción, ya

que se deben realizar cultivos de los mismos lo que genera gastos de equipamiento, mano de obra y mantenimiento. Además, el alimento vivo puede presentar problemas, tanto de abastecimiento como de calidad nutricional (Sorgeloos, 1980; Watanabe *et al.*, 1983).

Es por esto, que el destete se debe realizar lo mas temprano posible, ya que como sabemos es el proceso en el cual se sustituye gradualmente el alimento vivo por alimento inerte, siendo de gran importancia el tiempo de co-alimentación, ya que los peces presentan una preferencia natural por el alimento vivo (Dutton, 1992; Fernández-Díaz *et al.*, 1994).

Por ello, es de gran interés el desarrollo de microdietas que contrarresten los problemas ocasionados por el uso del alimento vivo. Las microdietas ofrecen una serie de ventajas como son: fácil disponibilidad, costes de producción mas bajos y además ofrecen la oportunidad de introducir nutrientes que no estén disponibles en el alimento vivo (Rosenlund *et al.*, 1997).

A pesar de todas estas ventajas, los esfuerzos por sustituir las presas vivas por alimento inerte sólo han tenido un éxito parcial, tanto en lo que se refiere al número de especies a las que se puede aplicar, como a la supervivencia obtenida (Adron *et al.*, 1974; Kanazawa *et al.*, 1982; Walford *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 2001; Fletcher *et al.*, 2007)

Las microdietas comúnmente utilizadas en la alimentación larvaria pueden clasificarse en: micropartículas que utilizan algún tipo de aglutinante para mantener unidos los nutrientes ; microencapsulados donde los nutrientes se protegen por medio de una pared semipermeable; y partículas complejas, que son microcápsulas más complejas que tienen la capacidad de liberar atrayentes de bajo peso molecular, tales como aminoácidos libres, con objeto de aumentar la ingestión por parte de la larva, pero que a su vez retengan con mayor eficacia vitaminas, minerales y en general su contenido nutritivo (Ozkizilcik y Chu, 1996)

### **1.6.- Cultivo del género *Seriola*.**

La elección de especies del género *Seriola* como candidatas para la acuicultura se basa en las mismas razones que las dadas por Mateos (2007) para la corvina:

1. Buscar una nueva especie que pudiera contribuir a diversificar los cultivos existentes en el área Mediterránea, dorada y lubina, ya que por un gran aumento de la producción de estas especies el mercado se encontraba en una situación de precios bajos y de no incremento de consumo. Desde muchos foros distintos se apostaba por la diversificación de cultivo como un remedio a la crisis existente.
2. Buscar una especie que tuviera un mejor comportamiento que las ya cultivadas, mayor crecimiento en menor tiempo, mejores índices de conversión que ayudaran a disminuir los costes de producción.
3. Buscar una especie similar al salmón atlántico, que al tener mejor crecimiento hiciera viable obtener animales de una talla grande para un procesado con bajas pérdidas, cosa que no era posible con la dorada y la lubina. De esta forma se podría ofrecer al consumidor nuevos productos (eviscerados, filetes, precocinados, etc).
4. Esta nueva especie debería ser conocida y apreciada por el consumidor, para que la campaña de introducción fuera más sencilla y menos costosa.
5. Por último y lo más importante, que fuera una especie apta para realizar su cría integral, desde el huevo a la talla comercial adaptándose a los sistemas de cultivo existentes.

Además las especies de este género tienen un rápido crecimiento, amplio mercado y precios relativamente altos en el mercado internacional, que según FIS (2005) oscilan entre los 7,10 y 7,25 US\$/kg en el mercado japonés, y entre 7 y 11 EUR/kg en el mercado europeo. No obstante, a nivel de acuicultura se ha fijado un precio de 7,76-11,64 EUR/kg (Nash, 1995). Según los datos proporcionados por FIS (2005) y asentadores internacionales, los principales mercados donde se comercializan especies de este género en el mundo son: Aci Trezza (Italia); La Nueva Viga (México); Fulton y Filadelfia (EE.UU.); Tsukijit (Japón) y Auckland (Nueva Zelanda).

El interés por la producción de especies del género *Seriola* en cautividad a nivel mundial ha ido aumentando en los últimos 20 años. En España este interés es mucho más reciente. Existen distintos organismos que han incorporado tanto al pez limón o medregal

limón como al medregal negro a sus líneas de investigación para contribuir a la diversificación de la acuicultura.

Entre los años 1987-1991 se realizó un proyecto JACUMAR sobre localización, captura y engorde de alevines salvajes de pez limón o medregal limón, en el que participaron técnicos e instalaciones de Cataluña, Murcia y Baleares. En ese mismo proyecto se estabularon reproductores de esta especie en jaulas y se obtuvieron huevos mediante inducción hormonal, aunque no se obtuvieron alevines. Por su parte, el Centro Oceanográfico de Murcia, del Instituto Español de Oceanografía dedicó asimismo importantes esfuerzos económicos a la reproducción de la especie sin obtener alevines. En 2004 el Centro Oceanográfico de Canarias, del Instituto Español de Oceanografía consiguió la reproducción natural del pez limón o medregal limón en cautividad. PROMAN, empresa pionera en la producción de esta especie a nivel nacional, estabula en 2003 el primer stock de reproductores salvajes, realizando a lo largo de estos últimos años, distintos ensayos encaminados a la obtención de huevos, así como al posterior cultivo larvario, llegando a producir en 2008 cerca de 30.000 alevines con unas perspectivas, para el año 2009, de 100.000.

Los sistemas de cultivo para el género *Seriola* a nivel mundial, varían según la especie. Así el cultivo de la seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*) en Asia (principalmente Japón y Corea), se realiza en forma de semicultivo, puesto que el cultivo larvario aún no se ha puesto a punto a escala industrial. El proceso de cultivo se compone de tres etapas bien diferenciadas: recolección de los alevines en el medio natural (2,5 - 5 cm), cría de los alevines hasta el estado juvenil (5 - 15 cm), y engorde de juveniles hasta su tamaño comercial (> 40 cm). La mayoría de los cultivos se limitan al uso de sistemas con estructuras flotantes en regiones litorales protegidas.

El cultivo de la seriola coreana, es la base de un importante sector de la acuicultura en Japón. Esta especie ha sido cultivada en Japón durante los últimos 70 años, pero la producción no aumentó sustancialmente hasta mediados de la década de 1950. El cultivo de especies del género de la *Seriola* significa más del 60% de los peces marinos producidos por la acuicultura en Japón.

Casi todas las investigaciones realizadas con pez limón o medregal limón se basan en los juveniles capturados en el medio natural, o de los huevos producidos a partir de la

inducción hormonal de los ejemplares maduros obtenidos en el medio silvestre (Tachihara *et al.*, 1993; Jover *et al.*, 1999; Nakada, 1999; Lazzari *et al.*, 2000; Mazzola *et al.*, 2000; Pastor *et al.*, 2000). La maduración y el éxito del desove se ha logrado con el uso de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa) (Mylonas *et al.*, 2004). Además, la obtención de semilla se logró con éxito utilizando la tecnología del mesocosmos (Papandroulakis *et al.*, 2005).

El medregal del cabo (*Seriola lalandi*) tiene un gran demanda en lugares como Australia y Nueva Zelanda, dónde han desarrollado tecnologías de cultivo similares. Mientras que la producción japonesa de seriola coreana se basa casi totalmente en la captura de juveniles silvestres (unos 100 millones de alevines al año, que se cultivan en unas 3000 explotaciones), en Australia y Nueva Zelanda la producción de semilla es totalmente dependiente de los reproductores criados artificialmente.

El Grupo STEHR ha llevado a cabo ensayos de engorde del medregal del cabo durante los veranos de 1998/1999 y 1999/2000. Las pruebas convencieron al Grupo STEHR del gran potencial de esta especie para la producción en acuicultura intensiva.

En 2006, CLEAN SEAS tomó el control del mercado del medregal del cabo en Australia. La producción total, en Australia del Sur es cada vez mayor, de aproximadamente 1.500 toneladas en 2005/06, a alrededor de 3.370 toneladas en 2007/08. CLEAN SEAS ha ampliado sus operaciones de exportación a Europa del Este. Esta especie ya está disponible en mercados de Italia, Holanda, Alemania, Francia, Reino Unido y Suiza.

En el 2009, la empresa ACUINOR (Acuícola del Norte S.A., Chile), fue la segunda en el mundo que obtuvo una producción industrial de juveniles de medregal del cabo.

### **1.7.- Cultivo del Medregal negro (*Seriola rivoliana*).**

En el año 1995, en el Ecuador se obtuvieron desoves naturales de medregal negro en salas de maduración en tres laboratorios diferentes (CINCO S.A., CRIDEC C.A. y GRANJAS MARINAS DEL ROSARIO). En esta experiencia reportada por Benetti y colaboradores (1995), los medregales negros fueron cultivados en jaulas flotantes, puestas en los canales de entrada de agua de una granja camaronera. La supervivencia final fue de

15% y la tasa de conversión alimenticia fue casi de 5.0 (Benetti *et al.*, 1998). Desde el 2002, el CENAIM (Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas) ha venido realizando investigaciones sobre el cultivo de medregal negro, colaborando en varios aspectos con una empresa privada que desarrollaba el cultivo de peces marinos, y como parte del esfuerzo se esta trabajando para mejorar la supervivencia en esta fase, en base al manejo del alimento y de estrategias para la alimentación..

El medregal negro se produce de forma industrial en Hawaii, por KONA BLUE WATER FARMS. El proceso de la cría del medregal negro comienza con los reproductores, estos desovan naturalmente, sin inducción hormonal. Pasan unas 6-10 semanas en las instalaciones en tierra y después son transferidos a las jaulas sumergidas (Fig. 12), que están a un km de la costa de Kona, a una profundidad de unos 60 metros, y permanecen allí 8-10 meses que es cuando se produce la cosecha. Actualmente KONA BLUE es el primer criadero de esta especie, produciendo en 2008 alrededor de 500 toneladas de Kona Kampachi, nombre comercial que le dan al medregal negro.



**Fig.12.- Jaula de KONA BLUE.**

## **2. Objetivos**

## 2.- Objetivos

El medregal negro (*Seriola rivoliana*) es una de las especies que puede contribuir a la diversificación de la acuicultura. Es una especie de gran interés debido a su rápido crecimiento y a la buena calidad de su filete. Al igual que cualquier otra especie, el éxito de su producción depende de la obtención de semillas de buena calidad y en número suficiente. Por esto es importante optimizar la supervivencia y crecimiento larvario, fundamentalmente, mediante la realización de estudios de alimentación larvaria y de las condiciones técnicas del cultivo. Por otro lado, es esencial la realización de esta fase del cultivo de una manera menos compleja y costosa, para lo cual es necesaria la utilización temprana de alimento inerte y disminuir así la dependencia del alimento vivo

El objetivo general de este trabajo fue el de desarrollar un primer protocolo de cultivo estándar para esta especie. Para ello se realizaron seis experimentos que han pretendido aportar información acerca de ello

# **3. Material y métodos**

### **3.- Material y métodos**

#### **3.1.- Localización del estudio.**

El presente trabajo fue realizado en la planta experimental de cría larvaria y producción de alevines (mesocosmos) del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM).

#### **3.2.- Especie objeto del estudio.**

##### **3.2.1. Nomenclatura**

Phyllum: *Chordata*

Superclase: *Gnathostomata*

Clase: *Actinopterygii*

Orden: *Perciformes*

Familia: *Carangidae*

Género: *Seriola*

Especie: *S. rivoliana*

El medregal negro, *Seriola rivoliana* (*Valenciennes, 1783*) pertenece a la familia Carangidae, que está formada por 33 géneros y 140 especies. Las especies de este género son principalmente marinas; raramente salobres. Distribuidas por el Atlántico, Índico y Pacífico. (Froese y Pauly, 2010).

##### **3.2.2. Descripción**

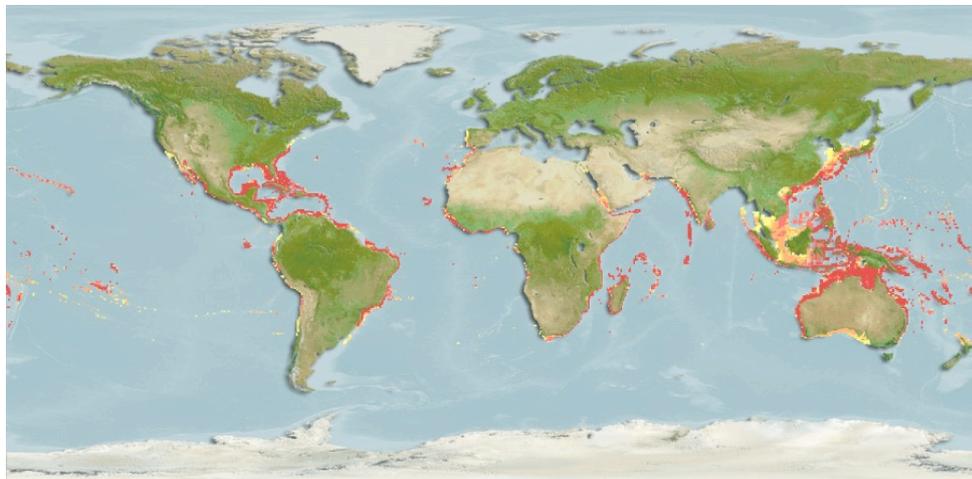
El Medregal negro, se caracteriza por tener el cuerpo alargado, levemente comprimido y moderadamente alto. Posee 8 espinas dorsales, 27-33 radios blandos dorsales, 3 espinas anales y 18-22 radios blandos anales. La coloración del pez es bastante variable, posee dorso marrón o aceitunado a verde azulado; flancos y vientre más claro; en adultos, una franja oscura vertical en la nuca y una franja lateral oscura, que se extiende hacia atrás y hacia arriba a partir del ojo. Alcanza una talla de 160 cm y un peso máximo de 59Kg (Froese y Pauly, 2010) (Fig. 13).



**Fig.13.- Ejemplar de medregal.**

### **3.2.3. Distribución**

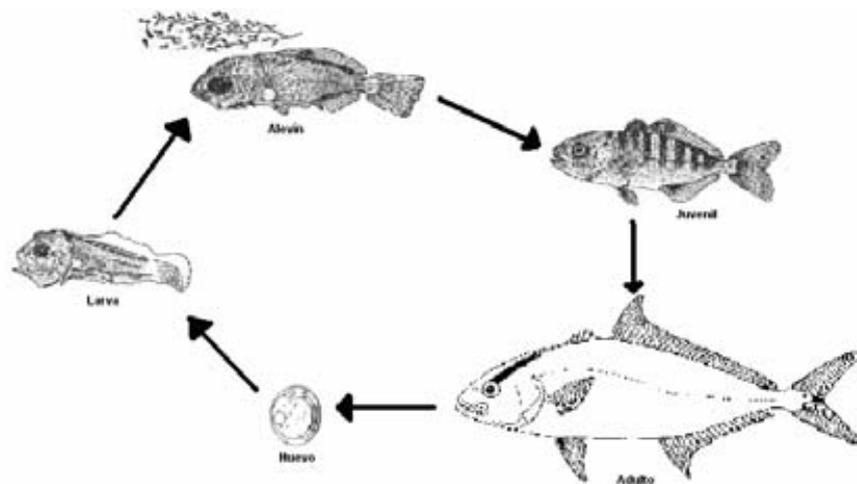
Esta especie se encuentra distribuida a lo largo de las zonas subtropicales de los océanos Índico, Atlántico oeste y Pacífico oeste, desde los 43°N - 38°S, y 180°W-180°E. (Froese y Pauly, 2010). Es un depredador pelágico, muy común en Azores y Canarias, siendo frecuente encontrarla asociados a *Seriola dumerili* (Santos *et al.*, 1997), (Fig. 14).



**Fig.14.- Distribución mundial de la *Seriola rivoliana* (Froese y Pauly, 2010).**

### 3.2.4. Hábitat

Es un pez marino, teleósteo, carnívoro, de gran fuerza y veloz, que tiende a ser migratorio debido a la búsqueda de alimento y para la reproducción de la especie (Fig. 15). La forma de reproducción de estos peces, es por fertilización externa. Los huevos de los peces de este género son pelágicos, tienen forma esférica y sin coloración. Es un pez pelágico, demersal y epibentónico que se encuentra en aguas abiertas cerca de la superficie. Está asociado a arrecifes marinos en un rango de profundidad de 5-160 m, (Lieske y Myers, 1994), aunque normalmente se encuentra entre los 5 y 35 m (Gasparini y Floeter, 2001). Son oportunistas, con una dieta que varía en función de su tamaño. En el medio natural se alimentan principalmente de moluscos, crustáceos, equinodermos y peces pequeños. Cuando tienen una talla de 4 cm, su alimentación consiste principalmente en copépodos. A medida que crecen comienzan a alimentarse de peces pequeños, y una vez que han alcanzado los 15 cm comienzan a preda sardinas y calamares.



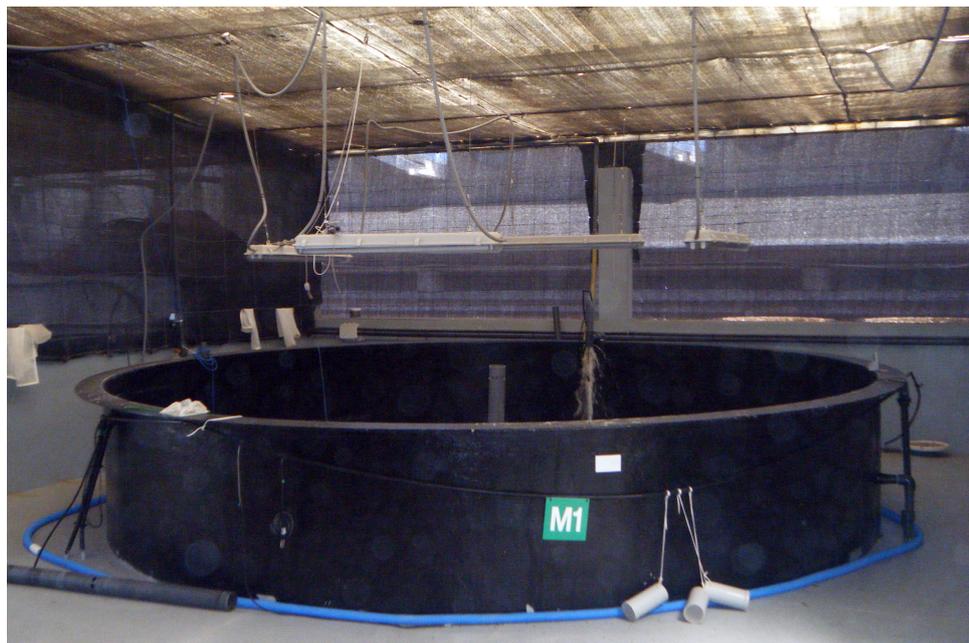
**Fig.15.- Ciclo de vida del medregal negro.**

### 3.3.-Tanques

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

- **Tanques de 40 m<sup>3</sup>**

Los tanques tienen un diámetro de 5 m y una profundidad de 2,35m en la parte central (Fig.16) y cuentan con una entrada de agua en su parte superior y dos desagües situados en el fondo, uno de ellos en posición central y el otro en posición lateral. La entrada y salida de agua varía a lo largo del periodo de cultivo, de acuerdo con la secuencia alimentaria. Así, durante las primeras fases de alimentación con presas vivas, la entrada de agua se realiza por el fondo y la salida por la superficie. Una vez se introducen las dietas inertes el sistemas se invierte para favorecer la limpieza del tanque.



**Fig. 16.- Tanque de cultivo de 40 m<sup>3</sup>.**

- **Tanques de 2 m<sup>3</sup>**

Los tanques tienen un diámetro de 1,5m y una profundidad de 2 m (Fig. 17), en su parte más profunda. Con sistema de circuito abierto de agua de mar previamente filtrada y esterilizada mediante radiación UV. La entrada de agua de estos tanques se realiza por el fondo y la salida por la superficie.

En ambos tipos de tanque, el fotoperiodo fue de 12-12, luz-oscuridad, con iluminación tanto natural como artificial. Diariamente se midieron el oxígeno disuelto y la temperatura.



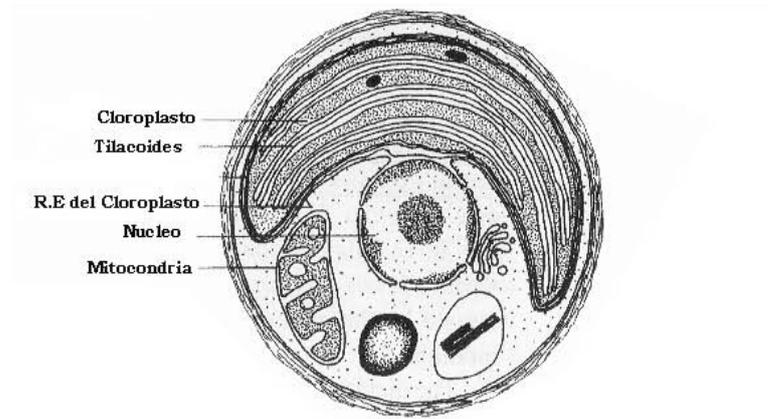
**Fig.17.- Tanque de 2 m<sup>3</sup>.**

### **3.4.-Cultivos auxiliares**

Para el desarrollo de los diferentes experimentos fue necesaria la realización de una serie de cultivos auxiliares para la producción de “*alimento vivo*”, que es el conjunto de organismos que se utilizan como alimento de las larvas de peces marinos en sus primeras etapas, antes de la alimentación con dietas inertes, y que por sus características biológicas necesitan ser producidos en condiciones específicas dentro de las propias instalaciones.

### 3.4.1.- Cultivo de fitoplancton

Se utilizó la microalga *Nannochloropsis sp.* (Fig.18) El cultivo se realizó en bolsas de 50, 230 y 460l, con una mezcla de agua dulce y salada, para obtener una salinidad del 25‰.



**Fig.18.- Esquema de una célula de *Nannochloropsis sp.***

El sistema de cultivo empleado para la producción masiva de fitoplancton, fue de tipo “Bach” o sistema cerrado (Fig. 19). Las cosechas se realizaron cuando el cultivo se encuentra en su fase exponencial de crecimiento, es decir, cuando la concentración se encontraba entre 250 – 300 millones de células /ml.

El protocolo consistió en la introducción de un inóculo algal a una concentración inicial de  $1,5 \times 10^6$  cells/ml en las bolsas de 50 l llenas con el agua de mar al 25‰ de salinidad, y la adición de un fertilizante comercial (Nutri-Phyt; Fitoplancton marino S.L, Puerto Santa María, España). A cada bolsa de cultivo se le introdujo un difusor a una distancia de 15cm del fondo, a través de los cuales se suministró aireación para favorecer la mezcla del medio y evitar la sedimentación de las células. Al quinto día de cultivo se añade formaldehído (38%) (Panreac, España) a una dosis de 0.05 ml/l, para eliminar los posibles contaminantes.

La cosecha de las bolsas de 50 l se utilizó como inóculo para el cultivo de las de 230 l, y las de 230 l a su vez como inóculo de las de 460l. El fitoplancton producido en las bolsas de 460 l se utilizó en el proceso de cultivo de larvas para la aplicación de las técnicas de agua verde, y para la alimentación de rotíferos.



**Fig. 19: Bolsas de cultivo de fitoplancton de 230 y 460 litros.**

### **3.4.2. Cultivo de rotíferos**

El rotífero utilizado fue *Brachionus sp.* (Fig.20).



**Fig.20.- Rotífero (*Brachionus sp.*).**

Para el proceso de producción masiva de rotíferos se utilizaron tanques cilíndricos de fibra de vidrio, con una capacidad de 1700 l (Fig.21).



**Fig.21.- Tanques de producción de rotíferos.**

Los cultivos se iniciaron con una concentración de aproximadamente 300 rot/ml, los ciclos duraron 8 días (Tabla IV). Los días 4 y 6 se realizaron cosechas de 400l que fueron repuestos con agua de mar con una salinidad del 25‰. Al 8º día se procedió a la cosecha del volumen total y se reinició de nuevo ciclo. Tras la cosecha, los rotíferos fueron sumergidos durante 1 minuto en agua dulce para eliminar posibles contaminantes.

Los medios y parámetros fisicoquímicas utilizadas en la producción de rotíferos fueron: agua esterilizada con UV; una Tª entre 20 y 25°C; salinidad de 25 ppm; fotoperíodo natural; aireación con un único difusor central; e inyección de oxígeno cuando el nivel es inferior a 3,5 ppm.

Para conocer el estado del cultivo, se controló diariamente el número total de rotíferos y el % de hembras ovígeras. Para ello, se tomaron tres muestras de 0,5 ml de una muestra recogida en el centro del tanque de cultivo, y se contaron sobre una placa de contaje. También se anotó la actividad de los individuos calculada de forma visual (alta-media-baja), y la presencia de contaminantes, como ciliados y copépodos. Diariamente, se

---

tomaron medidas de temperatura y oxígeno disuelto a las 9:00 y a las 15:00 con una sonda portátil (Mod. Handy Polaris, OxyGuard; Birkerød, Dinamarca).

Para la alimentación se utilizó levadura de pan seca (*Sccharomyces cerevisiae*) a una concentración de 0,4 g/millón de rotíferos. El día de inicio del ciclo se añadió también fitoplancton liofilizado, en una concentración de 0,1 g/millón de rotíferos. La alimentación se hizo manualmente a las 09:00 y a las 15:00 horas, y mediante un alimentador automático, a partir de las 18:00, cada 6 horas.

Antes de utilizar los rotíferos como alimento de las larvas, se procedió a su enriquecimiento con DHA Protein Selco (INVE, Belgium,) y Spirit (INVE, Belgium) dependiendo del experimento. Para ello se trasvasaron a 2 tanques de 500 litros (Fig.22), uno de ellos para la alimentación de las larvas por mañana, que era cosechado a las 08:30 y otro para la alimentación de la tarde, cosechado a las 14:00. En el tanque de la mañana el enriquecimiento se hacía mediante un dosificador automático programado para dar el producto a las 02:00 y a las 05:00. Al segundo de los tanques, se le suministró el enriquecedor de forma manual a las 08:00 y a las 11:00. Una vez enriquecidos, los rotíferos fueron filtrados en una bolsa de malla de 63 µm de luz y enjuagados con agua de mar para eliminar posibles impurezas. Después fueron concentrados en un cubo de 20 l y contados. Se realizaron tres contajes de 0,5 ml, tomados de una muestra de 5 ml diluidos en 250ml de agua salada.

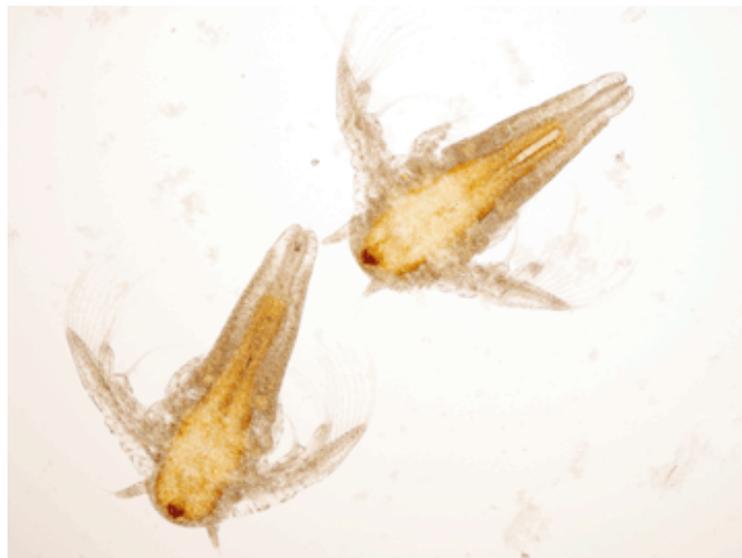
Con objeto de realizar análisis bioquímicos de los rotíferos, tanto de los alimentados con levadura como de los enriquecidos, estos fueron filtrados con una red de 62 micras y lavados con agua dulce. A continuación, se secaron mediante papel de filtro, tras lo cual la muestra fue inmediatamente congelada a -80° C. Se procedió también a la toma de muestras de los enriquecedores para su análisis.



**Fig.22.- Tanque de enriquecimiento de rotíferos.**

### **3.4.3. Cultivo de Artemia**

Se utilizaron cistes *Artemia* (Tipo EG; INVE, Dendermode, Bélgica), (Fig.23)



**Fig.23: *Artemia***

Dentro del protocolo de utilización de *Artemia* (Tabla II), el primer paso consistió en la descapsulación, proceso en el que se elimina el corion, para evitar la posible introducción de patógenos, y la disminución de la calidad del agua, por el exceso de materia orgánica en el tanque de las larvas. Para este proceso es necesario hidratar los cistes, para lo que se utilizan 10-12 l de agua salada por cada kg de cistes, y se hidratan durante 45 min-1 h 30 min en un tanque con aireación fuerte. Posteriormente los cistes se cosechan con una malla de 125 $\mu$ m, se lavan con agua salada eliminando después, toda el agua posible. El siguiente paso consiste en la eliminación del corión mediante una solución concentrada de hipoclorito sódico, para esto se añaden 4l de agua de mar, 350 gramos de hipoclorito sódico, y 66 gramos de NaOH por cada kg de cistes hidratados en el mismo tanque anterior. El proceso termina cuando se produce un cambio de color de los cistes de marrón a anaranjado, y que suele durar unos 5 minutos. Cuando los cistes han cambiado de color se cosechan en la malla anteriormente citada y se lavan con abundante agua salada durante unos 15 minutos para eliminar el cloro que pueda quedar.

Para la conservación de los cistes, estos se guardan en salmuera (Tabla III). Para ello se elimina la mayor parte de agua y se añade por cada kg de cistes secos 4l de agua salada y 1,17kg de sal marina, al final tenemos una concentración de 139g de cistes/l de salmuera. Esta salmuera se mantiene en la cámara de frío en ausencia de luz.

**Tabla II.- Protocolo de descapsulación de *Artemia* (Roo, 2009)**

Hidratación: 45' - 1h 30'. 10-12 litros de agua por kg de ciste seco.							
Descapsulación		Artemia (Kg)	Hipoclorito(g)	Lejía(l)	NaOH (g)	Agua de mar( l)	Vol total
Lejías varias 10 l		0,25	87,5	2,19	16,5	1,31	3,5
Índice de Refracción:	1,352	0,50	175	4,38	33	2,6	7
Conc. Gram/l	40	1,0	350	8,75	66	5,3	14
		1,5	525	13,13	99	7,9	21
		2,0	700	17,50	132	10,5	28
		2,5	875	21,88	165	13,1	35
		3,0	1.050	26,25	198	15,8	42
		4,0	1.400	35,00	264	21,0	56
		5,0	1.750	43,75	330	26,3	70
		6,0	2.100	52,50	396	31,5	84
		7,0	2.450	61,25	462	36,8	98
		7,5	2.625	65,63	495	39,4	105
<b>Notas</b>							
Lejía: 0.35 gramos de hipoclorito por gramo de cistes secos(INVE).							
Sosa: 66g de NaOH por kilogramo de cistes secos.							
Antiespumante. Opc: 250-500ppm, 0.25-0.5 g/l.							
Agua de mar: La necesaria para alcanzar una concentración final de 14 l/kg de ciste secos.							
Tiempo: 5-8min, según cambio de color (pardo-naranja).							
Neutralización :Lavar con agua de mar abundante durante 20 min, tb puede utilizarse 50g Tiosulfato/kg ciste. Se puede comprobar la presencia de restos de Cl con ortotolidina u otro detector de cloro.							

**Tabla III.- Protocolo de conservación de *Artemia* en salmuera (Roo, 2009)**

Salmuera	<i>Artemia</i> (Kg)	Sal (kg)	Agua (l)	Vol final(l)	Conc. Final
	0,25	0,29	1,00	1,79	139,4
	0,50	0,59	2,00	3,59	139,4
	1,0	1,17	4,00	7,17	139,4
	1,5	1,76	6,00	10,76	139,4
	2,0	2,34	8,00	14,34	139,4
	2,5	2,93	10,0	17,93	139,4
	3,0	3,52	12,0	21,52	139,4
	4,0	4,69	16,0	28,69	139,4
	5,0	5,86	20,0	35,86	139,4
	6,0	7,03	24,0	43,03	139,4
	7,0	8,20	28,0	50,20	139,4
	7,5	8,79	30,0	53,79	139,4

Notas

Agua: 4l agua de mar( 37% ) por kg de cistes secos.  
Sal:330 g sal/litro - g de sal en agua de mar.  
Cistes:  
VT= Agua + sal + Cistes(2\*peso en seco)  
Concentración: Kg descapsulado/VT  
Producción teórica: HE\* gramos sembrados  
Conservar en ausencia de luz en lugar fresco(<10°).

Para la eclosión de los cistes, se pone la cantidad de salmuera necesaria el día anterior en un tanque con agua de mar filtrada y esterilizada con UV, con una aireación central fuerte, iluminación de 24h y un calentador que lleva la temperatura del agua hasta unos 28-29° C. La densidad de siembra utilizada fue de 1,8g/l. Después de la eclosión se obtienen los nauplios de *Artemia*, que son utilizados en la primera fase de alimentación con este crustáceo. En la siguiente fase se utilizan metanauplios, que son enriquecidos para mejorar su valor nutritivo. Para la obtención de estos se ponen los nauplios en un tanque igual al utilizado para su eclosión, con las mismas condiciones pero sin calentar el agua. Se llena de agua de mar esterilizada y se siembran nauplios a una concentración de 250-300/ml. El enriquecedor utilizado fue la emulsión lipídica Easy DHA Selco (Inve, Dendermonde, Bélgica), se añade una cantidad de 0,6g/l, en una única dosis, al inicio del periodo de enriquecimiento. El tiempo de enriquecimiento de los nauplios fue de 18-24 horas. Una vez enriquecidos los metanauplios se filtraron en una bolsa de 125µm de luz de malla, y se lavaron con agua de mar para eliminar los posibles restos de la emulsión enriquecedora concentrándolos posteriormente en un cubo de 20l. Los metanauplios enriquecidos se añadieron manualmente al tanque larvario.

### 3.5.-Reproductores

Los ejemplares de medregal negro, fueron capturados en la costa SO de Gran Canaria por barcos artesanales. Las artes utilizadas fueron nasas de profundidad, con dimensiones entre 2,5 y 3 m de diámetro, y 0,85 y 1,10 m de altura. Los peces una vez

capturados, se mantuvieron en circuito abierto en los viveros de las embarcaciones hasta su llegada al puerto de Mogán (Gran Canaria). A continuación fueron trasladados por carretera en tanques de 500l con oxígeno disuelto. A su llegada a las instalaciones, los peces se trasladaron a un tanque de 10m<sup>3</sup> de capacidad. Una vez aclimatados a las condiciones de cultivo, los peces fueron anestesiados utilizando aceite de clavo, y se determinó la longitud estándar (LS), y peso total (PT), procediendo al marcaje mediante microchip subcutáneo, PIT (Trovan Ltd. Reino Unido). Los peces se alimentaron dos veces por semana con pienso comercial (Vitalis Repro<sup>TM</sup>), y una vez a la semana con alimento fresco (calamar y mejillón).

### 3.6.-Inducción

Para determinar el grado de madurez de las hembras, se realizaron biopsias ováricas que se llevaron a cabo utilizando un catéter, con un diámetro interno de 1,3 mm (Kruuse, Dinamarca), introduciéndolo por el poro genital (Fig.24). Cada muestra de ovario se observó en un proyector de perfiles (Mitutoyo PJ-3000A, Kanagawa, Japón) y se estimó el diámetro de 100 ovocitos seleccionados al azar.

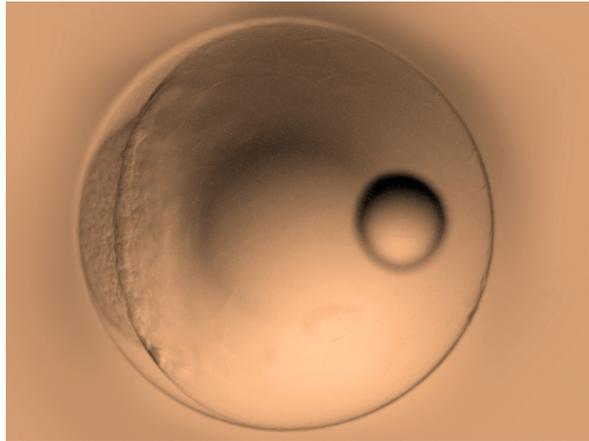
Se indujo semanalmente a los reproductores, mediante una inyección hormonal de GnRH $\alpha$  (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Missouri, USA), con una dosis de 20  $\mu$ g/kg, con el objetivo de asegurar la puesta (Fernandez-Palacios et al., 2009).



**Fig.24.- Inducción a la puesta: canulación e inyección hormonal.**

### 3.7.- Puesta

Los huevos se recogieron en un colector de 500 $\mu$  de malla que se colocaba en la salida superior de agua de los tanques de los reproductores. Una vez recogida la puesta se realizó la decantación de huevos en vasos de 5l de volumen, separándose, la fracción flotante (Fig 25) y la no flotante. Una vez seleccionada la fracción flotante se procedió a su recuento por volumetría y posteriormente a la siembra en los tanques de cultivo.



**Fig.25.- Huevo viable de medregal negro.**

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 de 1litro para su incubación. El fondo estaba constituido por una malla de plancton de 500  $\mu$ m de luz, si eran utilizados para el cálculo de la tasa de eclosión y de 165  $\mu$ m, si eran utilizados para el cálculo de la supervivencia larvaria, para así evitar la pérdida de larvas. Una vez sembrados eran dispuestos en un tanque rectangular de plástico de 500l de capacidad, con circuito abierto de agua y aireación permanente, de tal manera que la renovación de agua y la oxigenación del interior de los cubiletes se realizaba a través de la tela de plancton.

Para cada puesta se sembraron 5 cubiletes para el cálculo de cada uno de los dos índices. Se utilizaron las siguientes fórmulas:

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

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

Dónde:

$H_{VFF}$  = Total de huevos vivos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la fracción flotante.

$H_{MFF}$  = Total de huevos muertos en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la fracción flotante.

$H_{NFFF}$  = Total de huevos no fecundados en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la fracción flotante.

$H_{AFF}$  = Total de huevos anormales en las cinco muestras de 5 ml sacadas de la fracción flotante.

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

$L_C$  = Número de larvas con el saco vitelino reabsorbido.

Para el cálculo del porcentaje de eclosión, aproximadamente a las 48 horas de haber sido sembrados los huevos, los cubiletes se introdujeron en un vaso de precipitado de plástico de 2l. Tras remover todo, el agua era trasvasada a un catalizador de vidrio. Sobre este se lavaba el cubilete para no dejar ningún huevo adherido a él. El catalizador se colocaba sobre una lámina de plástico negro y por contraste se contaba el número de huevos no eclosionados decantados en el fondo y se aplicaba la fórmula.

Para el cálculo de la tasa de supervivencia, aproximadamente a las 96 horas, se procedía de la misma forma, aunque en este caso lo que se contaba eran las larvas vivas que había, y posteriormente se aplicaba la fórmula.

También se utilizaba como indicadores de la calidad de puesta, la producción total de huevos, de huevos fecundados, de huevos flotantes, de larvas nacidas, y de larvas con el saco vitelino reabsorbido, calculados utilizando los índices medios de las puestas.

El desarrollo organogénico se estudió utilizando una lupa Leica M125 y cámara DFC 295. La temperatura a lo largo del periodo experimental fue de  $23^{\circ}\text{C}\pm 1$  y la iluminación fue una combinación de luz natural y luz artificial con un fotoperiodo 12horas -12 horas. Cada hora se tomaron muestras de los huevos para su fotografía. Las medidas de los huevos se realizaron utilizando el proyector de perfiles (Mitutoyo PJ-3000A, Kanagawa, Japón).

### 3.8.- Experimentos de Cultivo semi – intensivo: Mesocosmos.

Se realizaron un total de 3 experimentos para lo que se sembraron 3 puestas diferentes, la primera de 200.000 huevos fertilizados, y las dos siguientes de 160.000. Los huevos tenían de 12 a 24 horas tras la fecundación (HPF). El agua utilizada era filtrada, la renovación de agua se incrementó desde un 15% diario del volumen del tanque en las primeras etapas hasta un 15%/h el día 30. La salinidad del agua de mar se mantuvo constante durante todos los experimentos (37‰). El oxígeno disuelto y la temperatura se determinaron diariamente con una sonda Handy Polaris de OxyGuard (Birkerød, Dinamarca). La iluminación fue una combinación de luz natural y luz artificial con un fotoperiodo 12horas -12 horas.

En cuanto a la secuencia alimentaria (Tablas IV y V), se utilizó la técnica del agua verde por lo que desde el día 2 dpe se añadió diariamente fitoplancton vivo para mantener una concentración de 20-25 millones de cél/ml. La alimentación inicial consistió en rotíferos (*Brachionus sp*) enriquecidos como se ha descrito en el apartado de cultivos auxiliares. Se mantuvo una concentración 4-5 rotíferos/ml en el tanque larvario, ajustando esta cantidad dos veces al día (08:00;15:00). A partir del día 9 dependiendo del experimento, una vez al día (11:00), se añadieron 5 nauplios/ml de *Artemia*, y 3 días después, hasta el fin del experimento, se añadieron metanauplios de *Artemia* enriquecidos con Easy DHA Selco a una concentración de 5 metanauplios/ml dos veces al día (11:00;15:00 ). La concentración de presas en el tanque (rotíferos y *Artemia*) se determinó mediante la toma, dos veces al día (08:00;14:00) de muestras, antes de la adición de presas nuevas para restablecer la concentración predeterminada. A partir del 5 DPE y hasta los 25 DPE, para la eliminación de la película lipídica, que se produce por los enriquecedores de las presas vivas, se limpió la superficie de los tanques mediante el uso de un limpiador. El destete dio comienzo alrededor del día 18, según el experimento, utilizándose microdietas de la gama Genma Micro (Skretting, Francia) diseñadas para peces marinos. La alimentación con microdietas se realizó tanto de forma manual como automática mediante alimentadores automáticos (T-Drum feeders, Arvotec Noruega).

Tabla.IV.- Esquema del experimento 1

Edad	Luz	Flujo	Cultivo	Alimentación		
Siembra	Natural	25%/día	Agua clara	Alimentación endógena		
Eclosión						
3	Fotoperiodo 24 h Natural+Artificial	15-50% día	Agua verde (250-350.000 cels/ml)	Rotíferos DHA Protein Selco (5-10ind/ml)	Nauplios (0,025-0,50 indv/ml)	Pienso manual (GM150, GM300)
5						
13						
15						
20						
25	Fotoperiodo 12-12 h Natural+Artificial	75-200-200%/día	Agua verde		Metanauplios ( 0,25-1 indv/ml)	Pienso manual+ automático(GM150, GM300)
30						

Tabla.V.- Esquema del experimento 2

Edad	Luz	Flujo	Cultivo	Alimentación		
Siembra	Natural	25%/día	Agua clara	Alimentación endógena		
Eclosión						
3	Fotoperiodo 24 h Natural+Artificial	15-50% día	Agua verde (250-350.000 cels/ml)	Rotíferos DHA Protein Selco (5-10ind/ml)	Metanauplios ( 0,25-1 indv/ml)	Pienso manual+ automático (GM150, GM300)
5						
13						
15						
20						
25	Fotoperiodo 12-12 h Natural+Artificial	75-200-200%/día	Agua clara			
30						

**Tabla.VI.- Esquema del experimento 3**

Edad	Luz	Flujo	Cultivo	Alimentación		
Siembra	Natural	25%/día	Agua clara	Alimentación endógena		
Eclosión						
3	Fotoperiodo 24 h Natural+Artificial	15-50%/día	Agua verde (250-350.000 cels/ml)	Rotíferos Spirit (5-10ind/ml)	Nauplios (0,025-0,50 indv/ml)	Pienso manual+ automático (GM150, GM300)
5						
13						
15						
20						
25	Fotoperiodo 12-12 h Natural+Artificial	75-200-200%/día	Agua clara		Metanauplios (0,25-1 indv/ml)	Pienso manual+ automático (GM300,0,3)
30						

### 3.9.- Experimentos de Cultivo intensivo.

Se realizaron tres experimentos para la que se sembraron un total de 160.000 huevos fertilizados de 12 a 24 HPF para el experimento 4, 120.000 en el 5 y 5.000 en el 6. La renovación de agua se incrementó desde un 15% diario del volumen del tanque en las primeras etapas, hasta un 200% diario. La salinidad del agua de mar se mantuvo constante durante todas las experiencias (37‰). El oxígeno disuelto y la temperatura se determinaron diariamente con una sonda Handy Polaris. La iluminación era una combinación de luz natural y luz artificial con un fotoperiodo 12horas -12 horas.

En cuanto a la secuencia alimentaria (Tabla VII), fue la misma para los 3 experimentos. Se utilizó la técnica del agua verde, igual que en los experimentos de cultivo semi-intensivos. Desde el día 3 hasta el 30 DPE, la alimentación consistió en rotíferos (*Brachionus sp*) enriquecidos como se ha descrito en el apartado de cultivos auxiliares. Se mantuvo una concentración 4-5 rotíferos/ml en el tanque larvario, ajustando dos veces al día (08:00;15:00) esta concentración. Desde el día 12 hasta el 15 DPE, una vez al día (11:00), se añadieron 0,5 millones de nauplios de *Artemia*, y desde el día 16 hasta el día 30

DPE se añadieron 0,5 millones de metanauplios de *Artemia* enriquecidos con Easy DHA Selco dos veces al día (11:00;15:00 ). La concentración de presas en el tanque (rotíferos y *Artemia*) se determinó mediante la toma de muestras, dos veces al día (08:00;14:00), antes de la adición de presas nuevas para restablecer la concentración predeterminada. A partir del 5 DPE y hasta los 25 DPE se limpió superficie de los tanques mediante el uso de un limpiador, para la eliminación de la película lipídica que se produce por los enriquecedores de las presas vivas. El destete dió comienzo el día 23 utilizándose micro dietas de la gama Genma Micro (Skretting, Francia) diseñadas para peces marinos. La alimentación con microdietas se realizó tanto de forma automática como mediante los alimentadores automáticos ya mencionados.

**Tabla.VII.- Esquema del experimento 4, 5 y 6**

Edad	Luz	Flujo	Cultivo	Alimentación		
Siembra	Natural	25%/día	Agua clara	Alimentación endógena		
Eclosión						
3	Fotoperiodo 24 h Natural+Artificial	15-50%/día	Agua verde (250-350.000 cels/ml)	Rotíferos Spirit (5-10ind/ml)		Pienso manual+ automático (GM150, GM300)
5						
13					Nauplios (0,025-0,50 indv/ml)	
15					Metanauplios ( 0,25-1 indv/ml)	
20						
25	Fotoperiodo 12-12 h Natural+Artificial	75-200-200%/día	Agua verde (250-350.000 cels/ml)	Rotíferos Spirit (5-10ind/ml)	Metanauplios ( 0,25-1 indv/ml)	Pienso manual+ automático (GM150, GM300)
30						

### 3.10.- Medidas.

En todos los experimentos, cada 5 días desde el inicio de la experiencia, se tomaron muestras de 15 larvas y se determinaron la longitud total (LT), longitud estándar (LS), longitud preanal (LPA), longitud del saco vitelino (LSC), diámetro de la gota lipídica (DGL), diámetro del ojo (OJO), y altura cefálica (HC) (Fig.26). Las larvas se midieron tras ser anestesiadas con una solución al 1 ‰ de esencia de clavo natural. Las medidas se realizaron utilizando un proyector de perfiles (Fig.27).

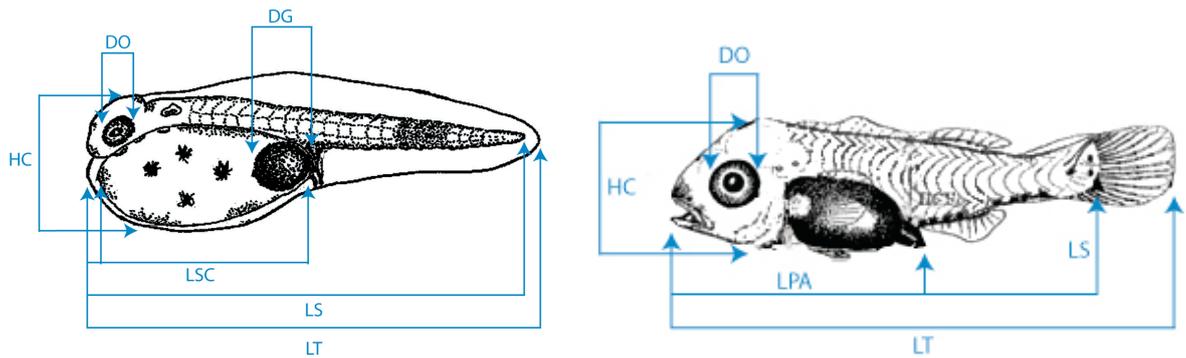
Para determinar el peso húmedo, las larvas se colocaron sobre una red y se lavaron con agua dulce y después con agua destilada para eliminar las sales. Posteriormente se eliminó el agua de la muestra con papel secante. Se colocaron 5 larvas en un portaobjetos de cristal previamente marcado y seco, del cual se conocía su peso ( $P_c$ ), y se determinó el peso húmedo del conjunto ( $P_c$ ) y larvas ( $L$ ) en una balanza de precisión (Mettler Toledo AG 204, Ohio, USA). Para determinar el peso individual de las larvas se aplicó la siguiente expresión:

$$PI = \frac{P_c + L}{n} - (P_c)$$

Para la determinación del peso seco, las larvas con el porta se secaron a 110°C, en una estufa (Jouan EU 28, S. Herblain, Francia) Una vez alcanzado el peso constante se sacaron de la estufa y se pusieron en un desecador durante 30min para adaptarlas a la temperatura ambiente. Finalmente se pesó el porta con las larvas ( $L$ ). El peso individual de cada larva ( $PI$ ) se obtuvo mediante la expresión siguiente:

$$PI = \frac{P_c + L}{n} - (P_c)$$

La supervivencia final se determinó mediante el contaje individualizado de las larvas supervivientes de cada tanque.



**Fig.26-** Medidas realizadas en las larvas: longitud total (LT), longitud estándar (LS), longitud preanal (LPA), longitud del saco vitelino (LSC), diámetro de la gota lipídica (DGL), diámetro del ojo (OJO), y altura cefálica (HC).



**Fig.27.-** Proyector de perfiles.

### 3.11.- Test de actividad.

En el experimento 3, se realizó un test de actividad (Fig.28) en el día 30 de vida de las larvas. Primero se determinó la cantidad necesaria de anestésico para dormir a las larvas sin matarlas, ya que sin anestesarlas al sacarlas del tanque morían. Para esto se les fue administrando desde 0,1ml hasta 0,4 ml de aceite de clavo al 5% por cada 100 ml de agua. También se fue probando con diferentes tiempos de anestesia desde 25 hasta 40 segundos.

Una vez determinada la cantidad y tiempo idóneo de anestésico (0,1ml durante 30 segundos), se procedió a realizar el test de actividad. El test consistió en dejar 5 larvas (una de cada vez) fuera del agua durante diferentes tiempos desde los 10 segundos hasta los 2 minutos, y posteriormente dejar que se recuperaran en un cubo de 10 litros con agua de mar y ver la supervivencia transcurridas 24 h.



### 3.12.- Métodos analíticos

A lo largo de la experimentación se guardaron muestras de larvas, huevos, *Artemia*, rotíferos y sus respectivos enriquecedores para su posterior análisis bioquímico.

Las muestras fueron guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los análisis bioquímicos se realizaron en el laboratorio del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (ULPGC). Se hicieron determinaciones del contenido en humedad, cenizas, proteínas, y lípidos totales. Con el fin de reducir el error analítico, todas las determinaciones por triplicado.

#### 3.12.1.- Humedad

Se calculó siguiendo el Método Oficial de Análisis de la Asociación de Química Analítica de Estados Unidos (A. O. A. C., 1995). El procedimiento consiste en secar en una estufa a  $110^{\circ}\text{C}$  una cantidad conocida de muestra hasta que el peso de la muestra se hace constante, calculándose el porcentaje de humedad con la siguiente fórmula:

$$\%H = 100 * (B-C)/(B-A)$$

Dónde :        A= Peso del pesafiltro  
                  B= Peso del pesafiltro + peso muestra  
                  C= Peso del pesafiltro + peso muestra una vez seca.

### 3.12.2. Cenizas

El contenido de cenizas se determinó por medio de la incineración de la muestra en un horno mufla, a una temperatura de 600°C durante 24 horas, donde:

$$\%Cenizas = 100 * (C-A)/(B-A)$$

Dónde :        A= Peso del crisol.  
                  B= Peso del crisol + peso muestra .  
                  C= Peso del crisol + peso muestra una vez seca.

### 3.12.3. Lípidos

La extracción de lípidos se realizó según el método de Folch *et al.* (1957). El método consiste en tomar por triplicado una cantidad de muestra entre 50-200 mg , añadirle una solución de 5 ml de Cloroformo:Metanol (2:1) con 0.01% de BHT y homogeneizar en un Ultra Turrax (IKA-Werke, T25 Basic, Staufen, Germany), (Fig.29a) a 11.000 rpm durante 5 minutos limpiando una solución de 5 ml de Cloroformo:Metanol (2:1). Se añaden 2 ml de KCl al 0.88% para incrementar la polaridad de la fase acuosa, y así obtener una mejor separación de las fases. Se agita y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos. Al finalizar, se elimina la fase superior y se filtra la inferior (fase orgánica) con sulfato de sodio anhidro en el filtro a otro tubo previamente pesado (Fig.29 b). Posteriormente, se evapora a sequedad con N<sub>2</sub> y se determina el contenido de lípidos totales de la muestra. Los lípidos totales extraídos se transfieren a un medio ácido, para la identificación de ácidos grasos y cuantificación por cromatografía de gases. A los lípidos totales secos, se les añade 1 ml de tolueno con BHT y 2 ml de una solución de metanol:sulfúrico al 1 %. Se agita fuertemente, se llena el tubo con N<sub>2</sub>, se sella y se deja incubando 16 horas a 50°C en agitación y oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se saca la muestra, se deja enfriar y se le añaden 3.5 ml de agua ultra pura, seguidos de 4 ml de hexano:dietil éter 1:1 con BHT al 0.01%. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos. Seguidamente se transfiere la fase superior que contiene los ésteres metílicos a otro tubo.

En el primer tubo se repite el proceso añadiendo únicamente hexano:dietil Éter sin BHT. Posteriormente, se añaden 3 ml de  $\text{KHCO}_3$  al tubo que contiene las fases superiores, se agita y se vuelve a centrifugar. Nuevamente se procede a transferir la superior a un tercer tubo previamente pesado y se evapora con  $\text{N}_2$ . Se disuelven los FAMES con 1-2 ml de hexano. Los ésteres metílicos obtenidos se purifican haciéndolos pasar por un cartucho Set-Pack de  $\text{NH}_2$ . Los FAMES purificados se evaporan a sequedad con  $\text{N}_2$  se pesa el contenido del tubo y se diluye a concentración de 40 mg de FAMES por ml de hexano. Se pasan a micro viales y se congelan en un congelador ( $-80^\circ$ ) hasta el momento de su identificación y cuantificación en el cromatógrafo de gases.



**Fig.29.- Determinación de lípidos: a) Ultra Turrax; b) Filtrado de la fase orgánica.**

#### 3.12.4. Proteínas

El contenido de proteínas se calculo mediante la técnica de Kjeldhal a partir del contenido de nitrógeno total de las muestras. El método consiste en la digestión (Fig. 30) de las muestras con ácido sulfúrico a  $400^\circ\text{C}$  con presencia de un catalizador de cobre durante una hora, seguido de una destilación con hidróxido sodico al 40% utilizando ácido bórico saturado como sustancia receptora; finalmente se realiza una valoración con ácido clorhídrico 0,1 M. para calcular el porcentaje de proteína se utilizo la siguiente formula:

$$\%P = \frac{\text{ml de HCl consumido} - \text{HCl blanco} \cdot 0,1 \cdot 14,007 \cdot 6,25 \cdot 100}{\text{peso muestra mg.}}$$



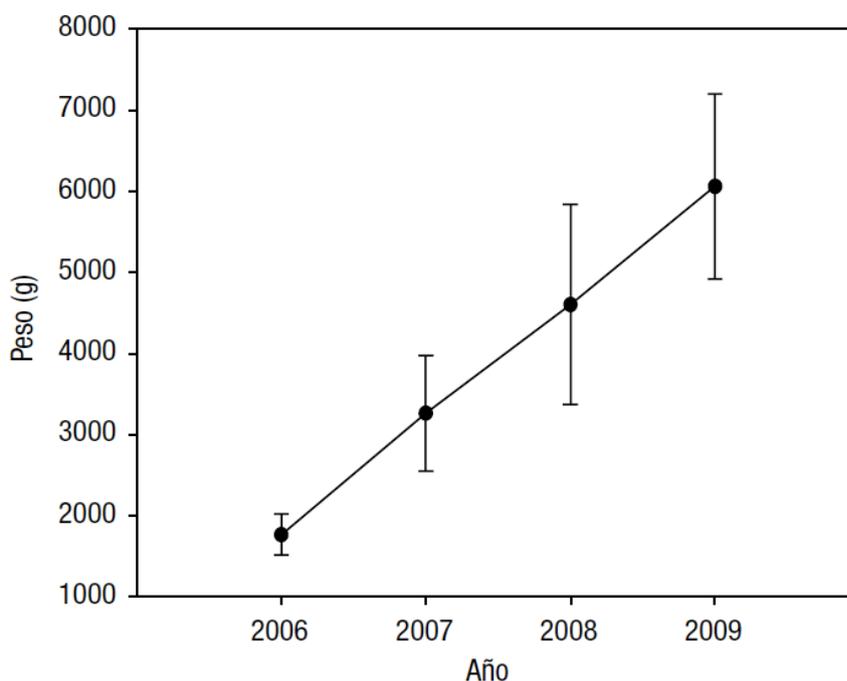
**Fig.30.-Destilador de proteínas.**

# 4. Resultados

## 4.- Resultados

### 4.1.- Reproducción

Los ejemplares capturados se aclimataron rápidamente a las condiciones de cautividad, obteniéndose una supervivencia media del 75% tras tres años en nuestras instalaciones. El peso medio inicial de 1,7 kg, en junio de 2006, se incrementó hasta los 6,0 kg en julio de 2009 (Fig.31).



**Fig.31.- Crecimiento en peso de los reproductores desde 2006 a 2009.**

Durante el mes de mayo de 2009 se detectó la presencia de machos maduros, tras la obtención de esperma mediante masaje y presión abdominal, en un rango de pesos de 2,3 a 4,4 kg. En el caso de las hembras, la biopsia gonadal indicó la presencia de ejemplares con ovocitos mayores de 500  $\mu\text{m}$  en un rango de peso de 5,1 a 7,3 kg. La inducción hormonal, tuvo como resultado la obtención de 10 puestas durante los meses de julio a octubre. La evolución de los parámetros de calidad de puesta se indican en la Tabla VIII. El número de huevos totales, huevos flotantes, huevos fecundados, larvas eclosionadas y larvas con el saco vitelino reabsorbido se indican en la figura 32.

Tabla VIII. Índices de calidad de las puestas

Puesta	Fecha	% Fracción flotante	% Fecundación	% Eclosión	% Larvas con saco vitelino reabsorbido
1	24/07/13	75,25	93,22	91,83	40,57
2	31/07/13	n.d	94,69	n.d	n.d
3	06/08/13	80,99	91,64	79,95	40,29
4	14/08/13	52,22	97,7	75,03	40,29
5	21/08/13	70,20	92,81	68,23	38,57
6	05/09/13	89,14	97,01	84,9	75,08
7	12/09/13	46,94	88,14	82,63	47,22
8	19/09/13	88,75	93,00	69,27	42,83
9	03/10/13	93,57	97,97	96,96	93,33
10	24/10/13	57,00	79,44	62,5	53,33
<b>Media</b>		<b>72,67±17,22</b>	<b>92,56±5,5</b>	<b>79,03±11,37</b>	<b>52,39±19,14</b>

Nota: n.d= datos no disponibles

El número total de huevos que se produjeron a lo largo del período de puesta fue de 2.755.952, produciéndose las puestas más numerosas durante el mes de agosto, con 1,27 millones de huevos. La mejor puesta en terminos de calidad, fue la puesta nº 9, teniendo los porcentajes de flotabilidad, fecundacion, de eclosión y de larvas con saco vitelino reabsorbido más elevados.

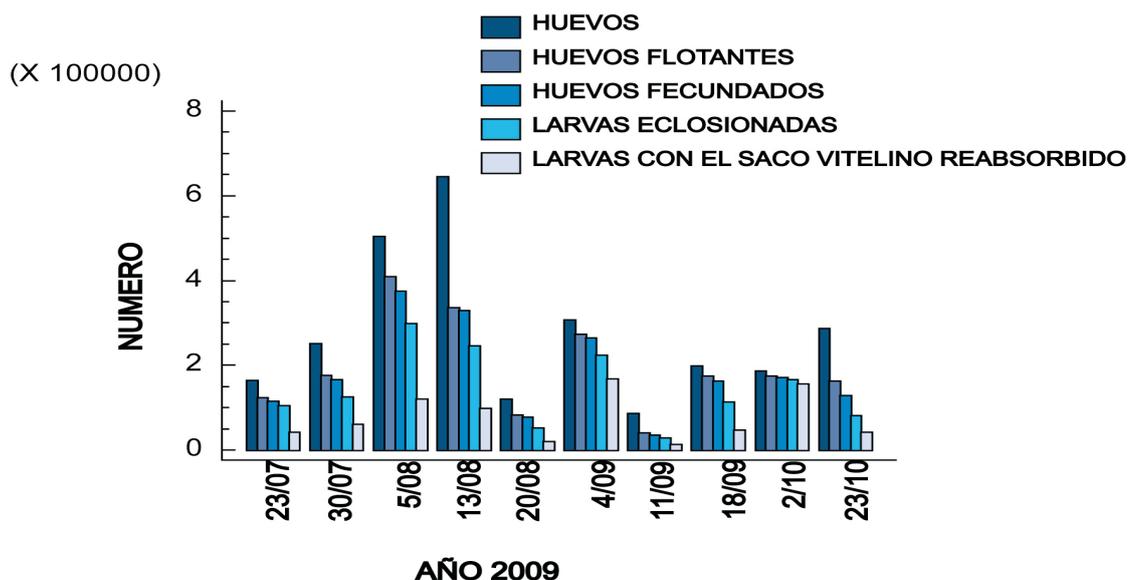


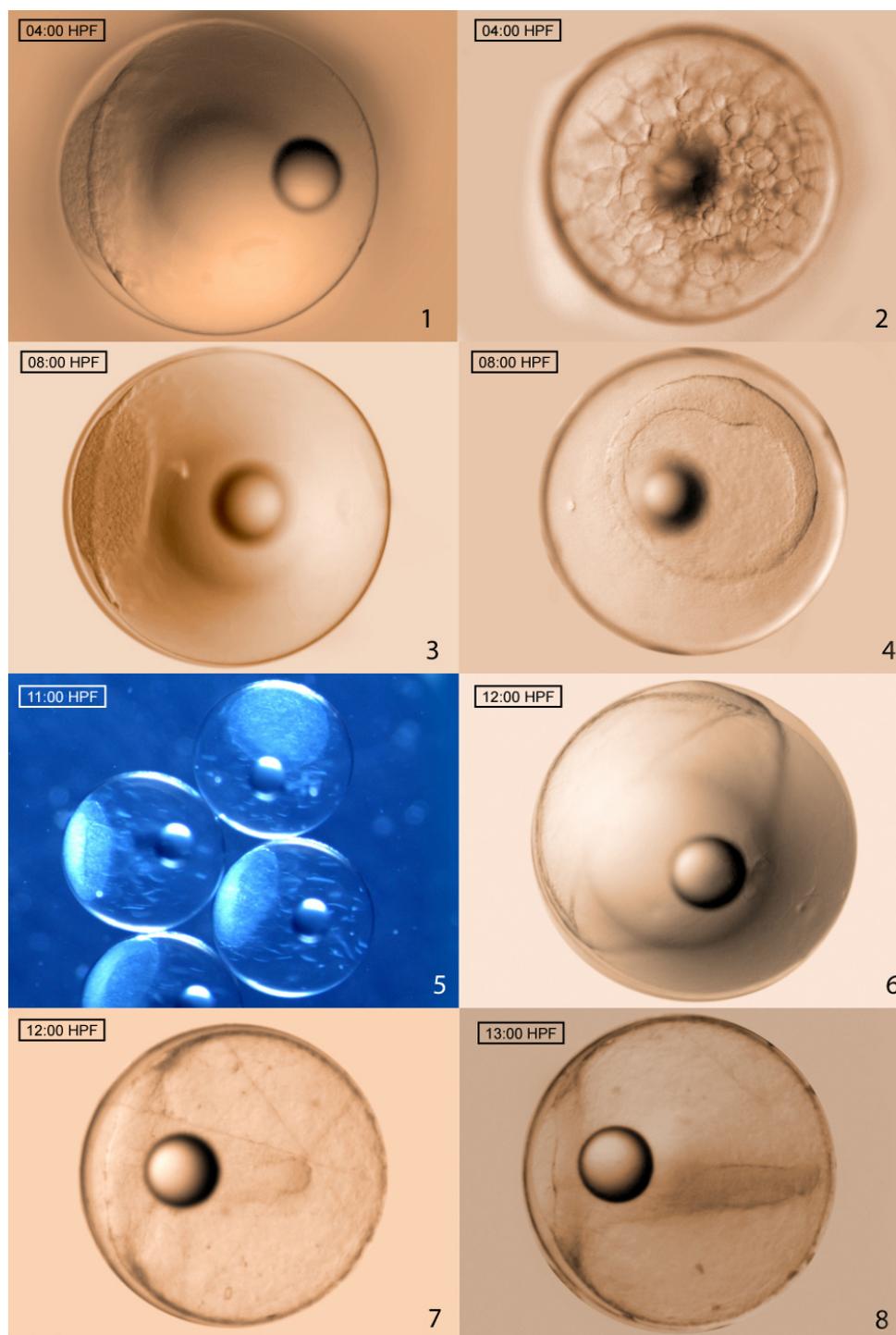
Fig.32.- Evolución de los parámetros de calidad de puesta.

En términos generales, la tasa media de la fracción flotante (FF) fue de un  $72,67 \pm 17,22$  %, mientras el porcentaje de fecundación medio fue de  $92,56 \pm 5,5$  %. La tasa de eclosión varió ampliamente entre las diferentes puestas, siendo la media un  $79,03 \pm 11,37$  %. En cuanto al porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido, este también fue muy variable, desde 40,29 al 93,33%, con una media del  $52,36 \pm 19,14$ %.

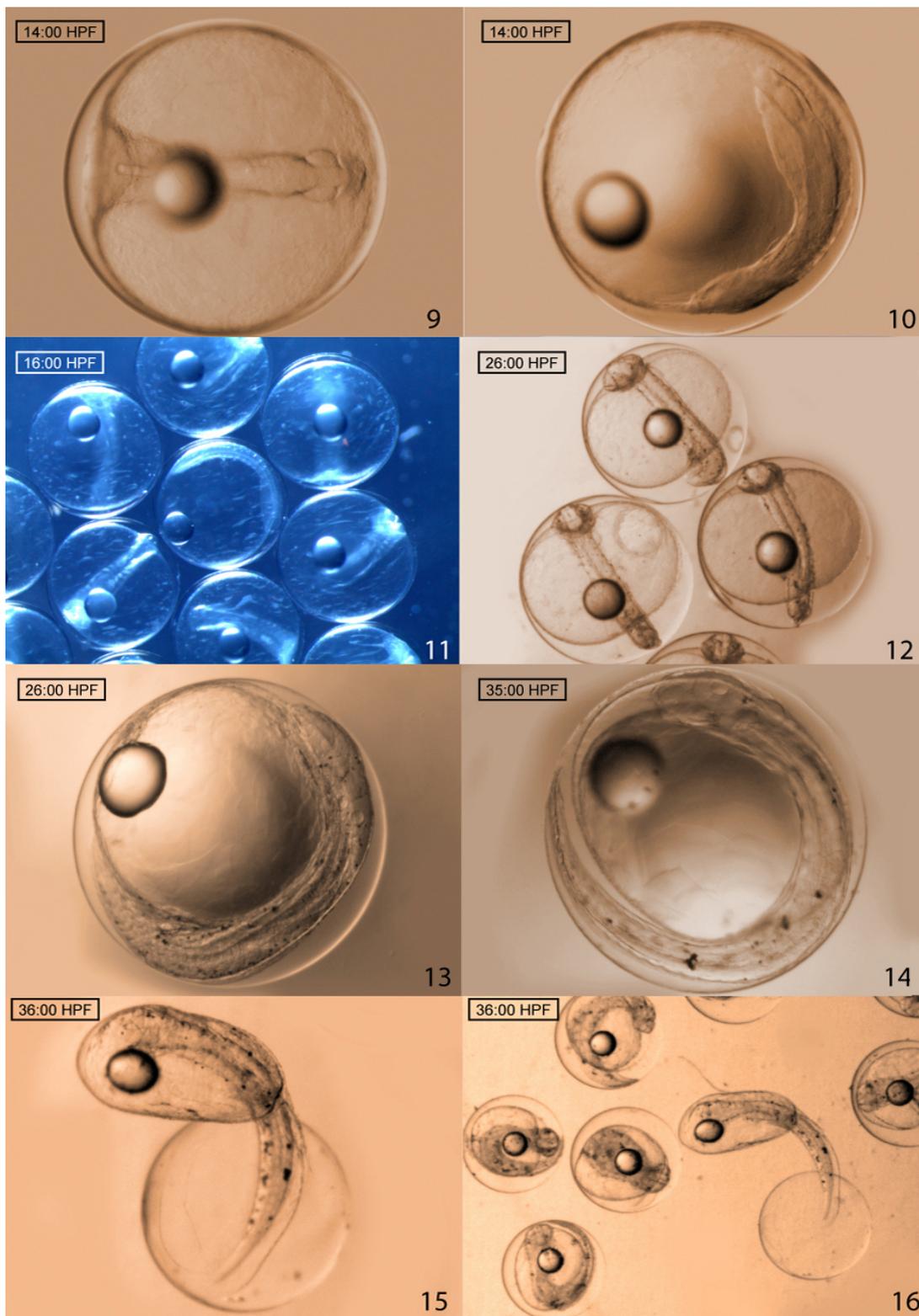
#### 4.2.- Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario fue estudiado a partir de la fase de mórula, 4 horas después de la fertilización (HPF), y a una temperatura de  $23,1^\circ\text{C} \pm 1,3$ . El diámetro del huevo en esta fase era de  $1,049 \pm 0,04$  mm, y el de la gota lipídica de  $0,299 \pm 0,009$  mm. Esta fase de mórula se puede apreciar en la figura 33-1,2, dónde se ve desde diferentes perspectivas. A las 8 HPF se observa la blástula (Fig. 33-3,4); a las 11 HPF comienza la fase de gastrulación (Fig.33-5); a las 12 HPF aparece  $\frac{1}{2}$  epibolia (Fig.33-6,7) y a las 13 HPF  $\frac{3}{4}$  de epibolia (Fig.33-8); la fase de nérula aparece a las 14 HPF (Fig.34-9,10) comenzando la fase de organogénesis a las 16 HPF y dura hasta las 35 HPF (Fig.34-11,12,13, y 14). A las 20 HPF se pudo apreciar la aparición de una suave pigmentación en el embrión a lo largo de la zona dorsal, el comienzo de latidos del corazón, y las primeras fases de formación del ojo. En esta etapa, el extremo caudal estaba separado del vítelo y el embrión era más largo que el diámetro del huevo. A las 23 HPF se apreciaron los primeros movimientos del embrión y se hicieron visibles las cápsulas óticas y ópticas. A las 25 HPF

aparecieron melanóforos en la zona de las cápsulas olfativas y en la gota lipídica. El aumento de pigmentación se observó claramente, en la zona dorsal, a las 27 HPF. Finalmente a las 36 HPF se inició el proceso de eclosión de las larvas (Fig.34-15,16).



**Fig. 33.- Desarrollo embrionario de *S.rivoliiana*: 1,2-Mórula; 3,4-Blástula; 5-Comienzo gastrulación; 6,7- ½ Epibolia; 8- ¾.**

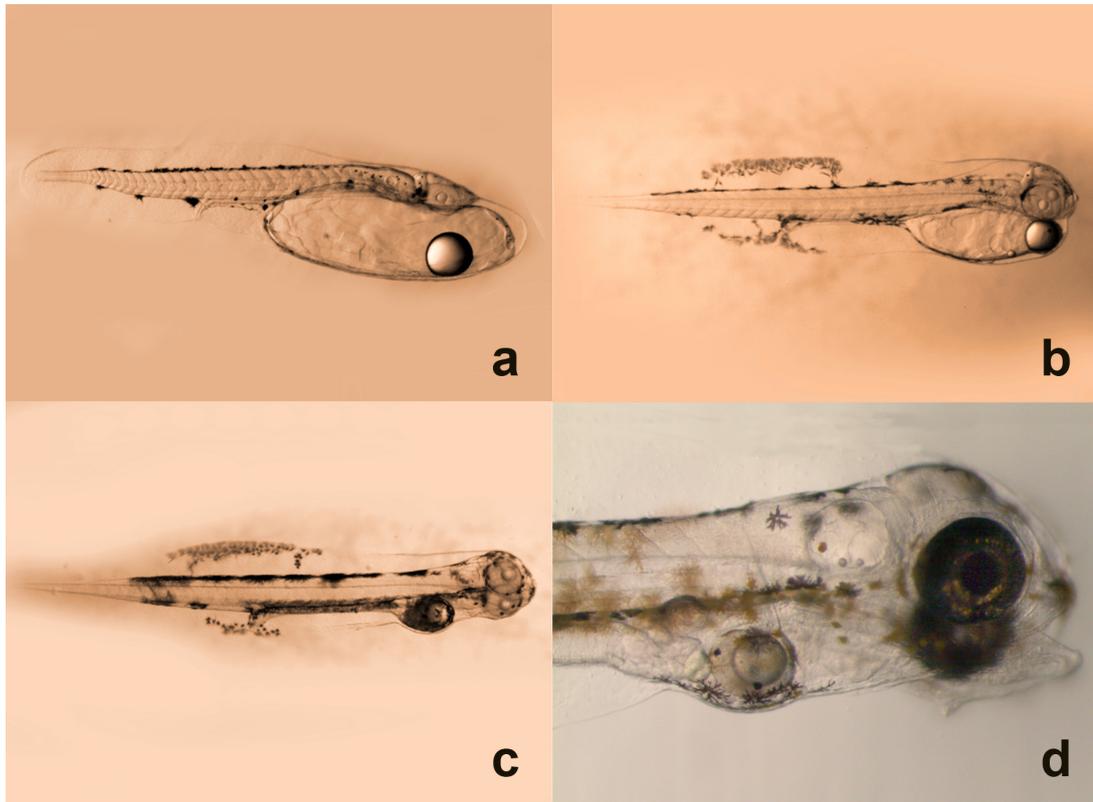


**Fig. 34.- Desarrollo embrionario de *S.rivoliana*: Epibolia; 9,10-Nérula; 11 -Comienzo organogénesis;12,13-Organogénesis (2/3 del huevo ocupado por el embrión); 14-Fin organogénesis (3/4 del huevo ocupado por el embrión); y 15,16-Eclósión.**

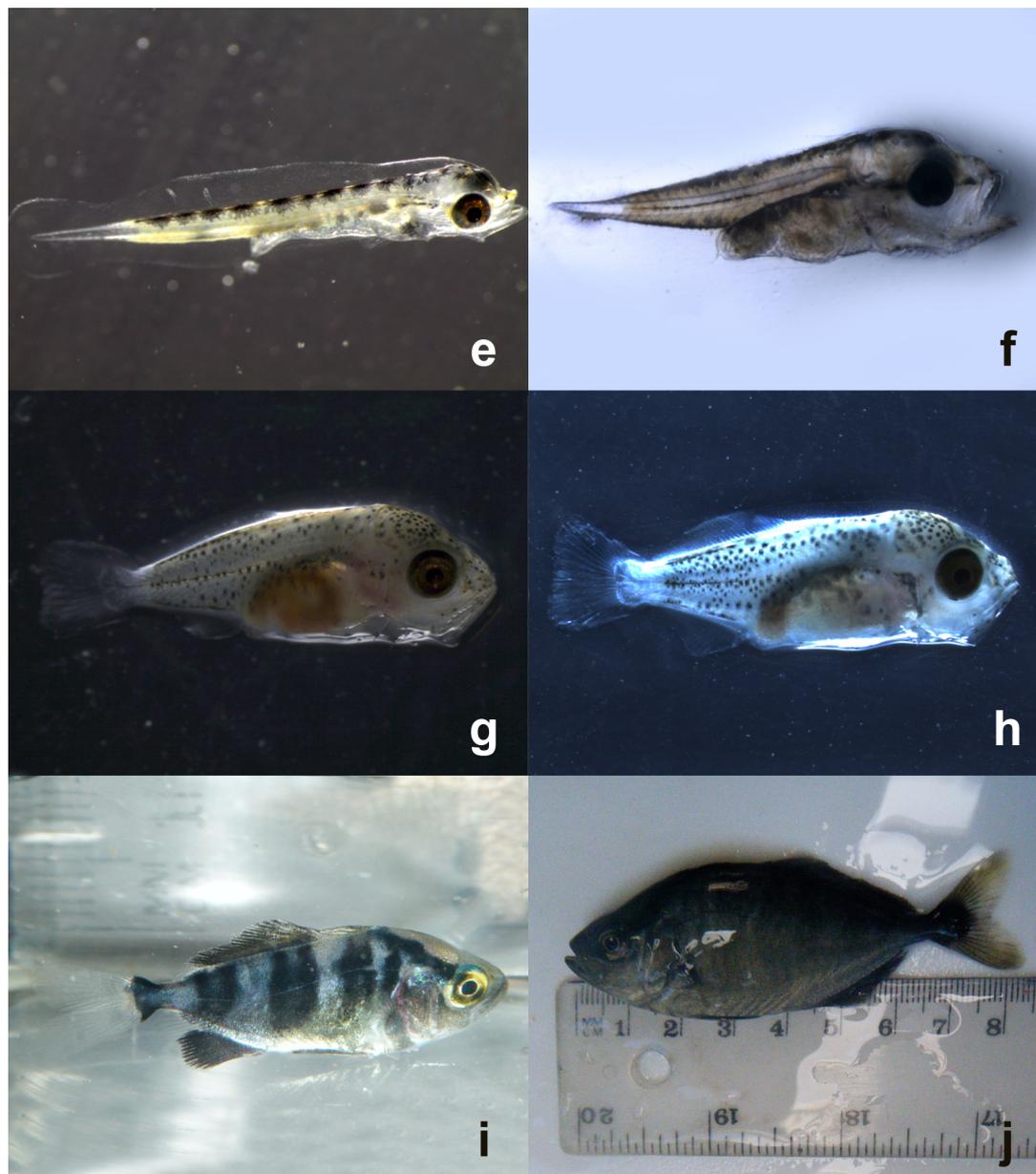
### 4.3.- Desarrollo larvario

Las larvas recién eclosionadas tenían una longitud total de  $2,54 \pm 0,01$ mm y un saco vitelino de  $1,29 \pm 0,07$ mm (Fig.35a). En este momento el tubo digestivo es rectilíneo formando un ángulo recto a la altura del ano. A las 12 horas después de la eclosión (HPE) se apreció un aumento del tamaño de la larva del 34,64%, la gota lipídica se desplazó hacia la zona posterior del saco vitelino y se incrementó la pigmentación en la aleta embrionaria (Fig.35b). A las 24 HPE se observan los neuromastos libres, los otolitos y el esbozo de la línea lateral, en el sistema visual cabe destacar aparición de una ligera pigmentación en los ojos (Fig.35c). A las 48 HPE el saco y gota se han reducido un 88 y 87% respectivamente (Fig.35d). En este mismo estadio, la pigmentación de la larva es más intensa, y los ojos aparecen completamente pigmentados, las aletas pectorales desarrolladas, la válvula ileorrectal y vejiga natatoria definida, apreciándose movimientos digestivos. En este estadio el 20% de las larvas tenían la boca abierta, este proceso no se completa para el 100% de la población hasta las 60 HPE. La alimentación exógena comenzó a las 72 HPE con la apertura de la boca y del ano, y con la formación de las aletas pectorales (Fig.36e). A las 72 HPE el 100% de las larvas presentan vejiga natatoria con una longitud  $0,13 \pm 0,07$ mm y una altura de  $0,08 \pm 0,02$  mm. El saco vitelino y la gota lipídica no se reabsorben totalmente hasta las 120 HPE. En la figura 37 se observa la evolución morfométrica de la larva hasta el 5° DPE (Días después de la eclosión).

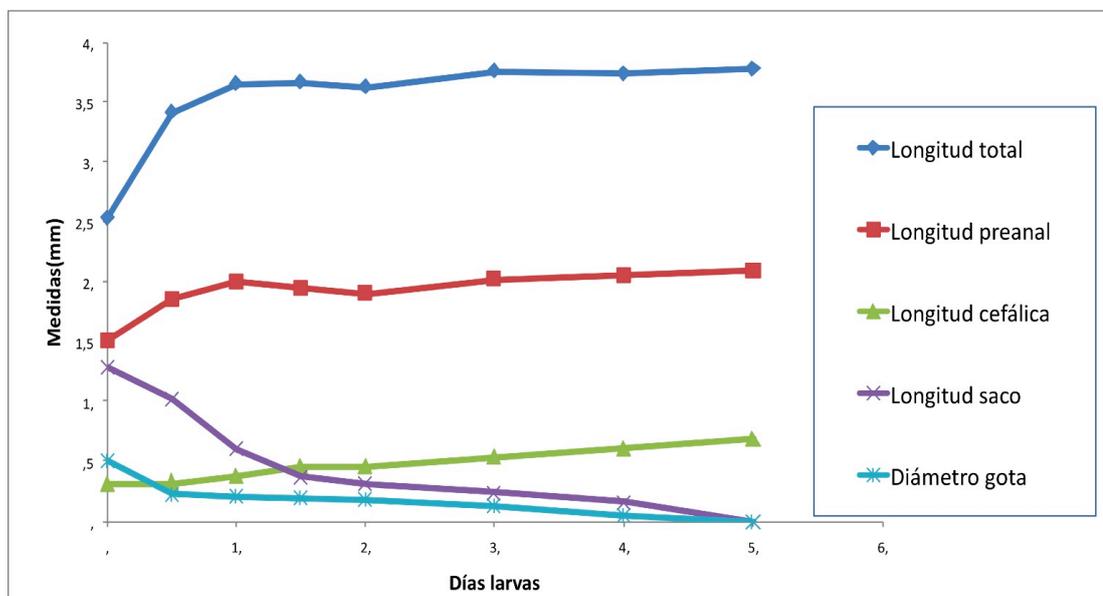
A día 10 DPE, se aprecia una larva con el estómago lleno de alimento y aún no se observa la flexión de la notocorda (Fig.36f). Es al 15 DPE cuando se observa el inicio de la flexión (Fig.36g) y al 20 DPE cuando se da por finalizada (Fig.6h). Con 30 DPE el juvenil ya tiene la pigmentación característica de los juveniles de esta especie mostrando las bandas de coloración transversales (Fig.36i). Con 42 DPE vemos un juvenil de 8 cm de longitud total completamente desarrollado (Fig.36j).



**Fig. 35.- Desarrollo larvario de *S. rivoliana*: a) Larva recién eclosionada; b) Larva con 12 HPE; c) Larva con 24 HPE ; d) Larva con 3 DPE.**



**Fig. 36.-** Desarrollo larvario de *S. rivoliana*: e) Larva con 5 DPE; f) Larva con 10 DPE; g) Larva con 15 DPE; h) Larva con 20 DPE; i) Juvenil con 30 DPE; j) Juvenil con 42 DPE.



**Fig.37 .-** Evolución de diferentes parámetros morfométricos de las larvas de *S. rivoliana*.

#### 4.4.- Experimentos de cultivo larvario

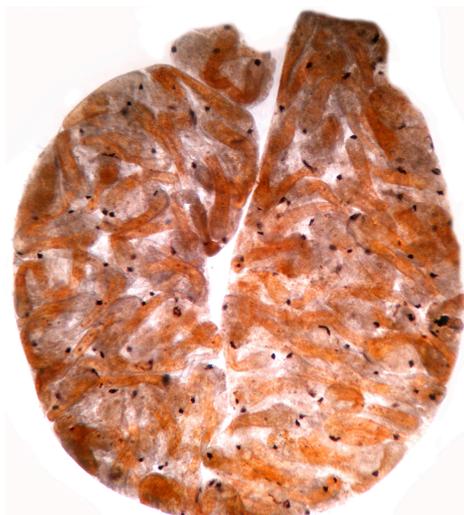
##### 4.4-1. – Cultivo en sistema semi-intensivo

Se realizaron un total de 3 experimentos en sistema semi-intensivo a lo largo de la época de puesta, los resultados de los mismos se muestran a continuación.

##### 4.4.1.1- Experimento 1

En este experimento se sembraron un total de 200.000 huevos de la fracción flotante de la puesta n° 6, en un tanque de 40.000 litros, resultando en una densidad inicial de 5 huevos/l. El porcentaje de eclosión fue de un 84,9 % y la supervivencia larvaria en el momento de reabsorción del saco fue de 75,08 % lo que implica una densidad de inicio de 3.2 larvas/l. Entre los días 7 y 11 después de la eclosión se observó un pico de mortalidad que continuó de manera paulatina a lo largo de todo el experimento, dando lugar a una supervivencia final de 1,13 % a los 30 DPE.

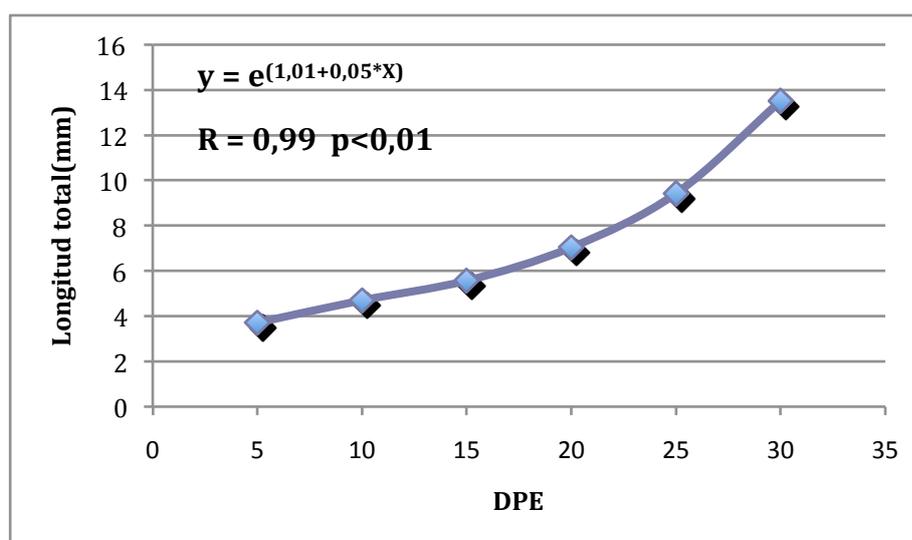
En la figura 38, se aprecian las heces de una larva en la etapa de alimentación con *Artemia*, donde se puede apreciar que los metanauplios mantienen su integridad, tras su paso por el digestivo, indicando una pobre digestión de la misma por las larvas de medregal negro. Este fenómeno se vió en todos los experimentos del presente estudio.



**Fig. 38.- Heces de larvas de medregal negro en etapa de alimentación con *Artemia*.**

A lo largo de este experimento la temperatura media de cultivo fue de  $24,4 \pm 0,44^\circ\text{C}$  y el  $\text{O}_2$  disuelto de  $6,31 \pm 0,32$  ppm.

Por lo que respecta al crecimiento de las larvas de *S. rivoliiana*, la evolución de la longitud total (LT), longitud preanal (LPA), altura cefálica (HC), y peso húmedo (PH) se muestra en las figuras 39-42.



**Fig.39.- Evolución de la LT a lo largo del experimento 1.**

En la figura 39 se observa como la longitud total de la larva llega a los 13,5 mm a los 30 DPE partiendo de 3,7 mm a los 5 DPE. También se indica la ecuación de crecimiento para las larvas de este experimento. La longitud preanal y altura cefálica siguen las misma tendencia que la longitud total, como vemos en la figura 40 y 41, haciéndose más pendiente la recta en el paso de 25 a 30 DPE. Esto mismo se ve pero con mucha mayor claridad en el peso húmedo, pasando de los 12,9 mg a los 39,5 mg en tan solo 5 días, de los 25 DPE a los 30 DPE.

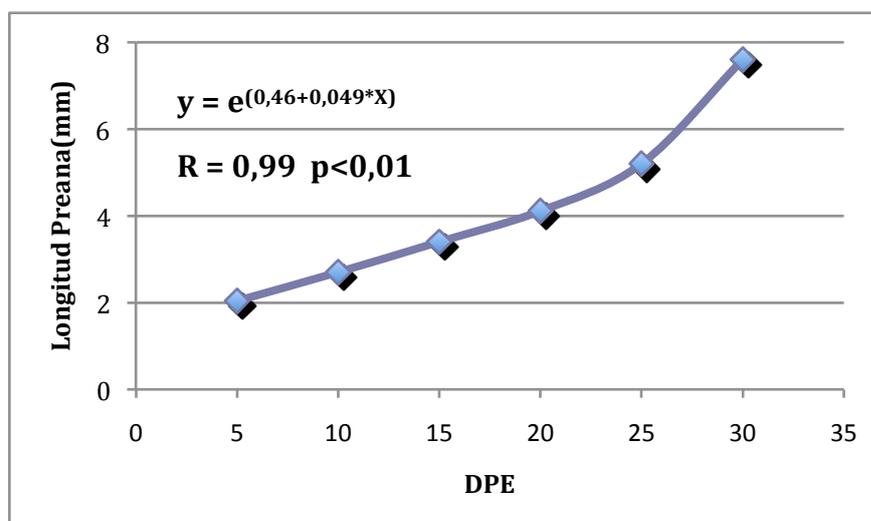


Fig.40.- Evolución de la LPA a lo largo del experimento 1.

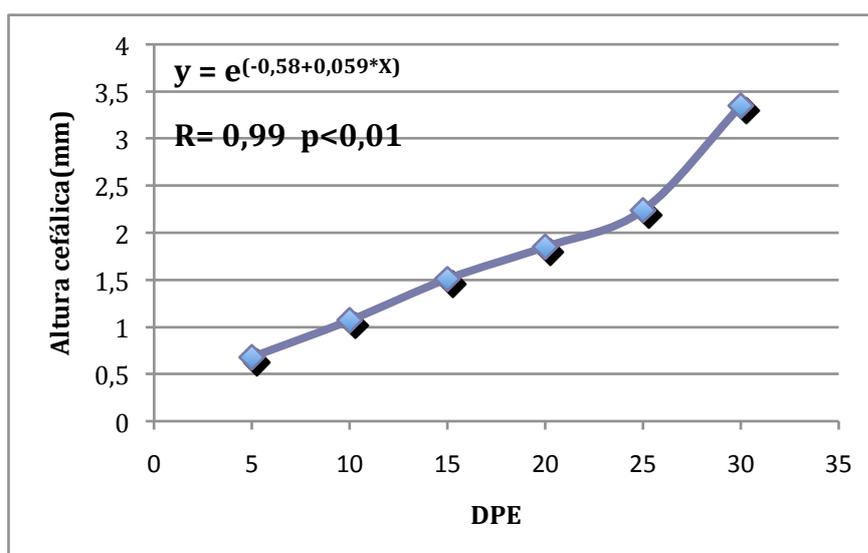
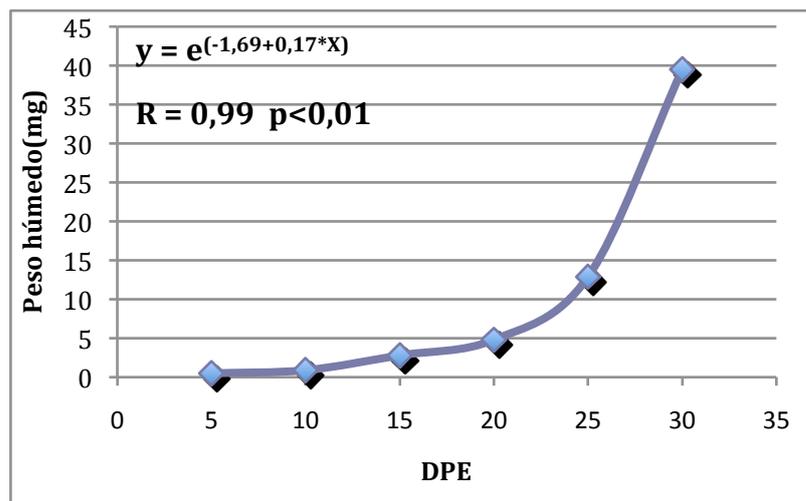


Fig.41.- Evolución de la HC a lo largo del experimento 1.



**Fig. 42.- Evolución del PH a lo largo del experimento 1.**

La composición proximal de enriquecedores y presas utilizadas en esta experiencia se muestra en la Tabla IX.

**Tabla IX.- Composición proximal (peso seco) de enriquecedores, rotíferos y *Artemia* del experimento 1**

		Humedad	Cenizas	Lípidos	Proteínas	CHO	Energía (Kj/g)	Ratio Prot/Lip
Enriquecedores	DHA Protein Selco	6,23±0,01	9,27±0,11	29,63±0,78	30,38±0,37	30,70±0,78	24,15±0,18	1,02±0,03
	Easy DHA Selco	33,32±0,04	0,38±0,05	89,54±2,69	1,42±0,18	8,65±2,89	37,19±0,60	0,015±0,001
Rotíferos	DHA Protein Selco	88,69±1,73	2,18±1,04	17,32±3,13	54,94±7,92	25,55±9,31	12,83±0,72	3,22±0,49
<i>Artemia</i>	Ao + 3h+ Easy DHA	90,77±1,73	0,87±0,25	17,72±2,07	60,83±2,27	20,56±2,8	11,86±0,74	3,47±0,42
	Easy DHA Selco	91,17±0,69	0,90±0,25	33,62±3,07	53,22±4,82	8,81±5,85	16,41±10,76	1,56±0,16

La principal diferencia en los productos enriquecedores utilizados es que vienen en: polvo en el caso del DHA Protein Selco para el enriquecimiento de rotíferos y en emulsión en el caso del Easy DHA Selco para la *Artemia*. Esta diferencia se refleja en la humedad de los productos, los valores de proteína, lípidos y cenizas. Igualmente, se puede observar que el elevado contenido lipídico del enriquecedor de *Artemia* se refleja en un mayor contenido energético (Tabla IX).

Por lo que respecta a las presas utilizadas cabe destacar el mayor contenido lipídico de los metanauplios de *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco, con respecto a los nauplios de *Artemia* Ao+3 horas enriquecidas con el mismo producto, lo que da lugar a un mayor contenido energético y una menor relación proteína-lípido en los metanauplios.

En cuanto al contenido de ácidos grasos de ambos enriquecedores, cabe decir que es muy similar, destacando los elevados niveles de ácidos grasos de la serie n-3, n-3 Hufa y en particular los ácidos grasos esenciales para peces marinos como son el Araquidónico (20:4 n-6, ARA), Eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y Docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA).

Tabla X.- Ácidos grasos de los enriquecedores utilizados (% ácidos grasos totales)

	DHA Protein Selco	Easy DHA Selco
<b>Total Saturados</b>	32,43	23,26
<b>Total Monoenoicos</b>	26,51	37,01
<b>Total n-3</b>	27,96	26,74
<b>Total n-6</b>	11,82	11,33
<b>Total n-9</b>	17,72	26,47
<b>Total n-3HUFA</b>	25,36	23,01
<b>14:00</b>	1,85	3,16
<b>16:00</b>	24,99	15,31
<b>16:1 n-7</b>	5,49	4,81
<b>18:00</b>	4,94	4,05
<b>18:1 n-9</b>	15,72	22,43
<b>18:1 n-7</b>	2,09	2,63
<b>18:2 n-6</b>	8,75	8,12
<b>18:3 n-3</b>	1,25	1,93
<b>20:1 n-9</b>	1,63	3,52
<b>ARA</b>	1,04	0,95
<b>EPA</b>	6,58	5,59
<b>DHA</b>	16,82	14,54
<b>DPA (22:5n-6)</b>	0,78	0,66
<b>DHA/22:5 n-6</b>	21,69	21,98
<b>EPA/ARA</b>	6,33	5,86
<b>ARA/EPA</b>	0,16	0,17
<b>DHA/EPA</b>	2,56	2,60
<b>DHA/ARA</b>	16,17	15,24
<b>oleico/DHA</b>	0,93	1,54
<b>oleico/n-3HUFA</b>	0,62	0,97
<b>n-3/n-6</b>	2,37	2,36

Los perfiles de ácidos grasos de las diferentes presas muestran una clara diferencia entre ellas, destacando los elevados niveles de ácidos grasos de la serie n-3, en la *Artemia* enriquecida (metanauplios), consecuencia del elevado nivel de 18:3n-3 en esta presa. Con respecto a los n-3 HUFA y en particular los ácidos grasos esenciales como son el ARA, EPA y DHA, destaca el elevado nivel de los mismos que se observa en los rotíferos enriquecidos y el fuerte descenso que se observa en el caso del DHA en la *Artemia* enriquecida (metanauplios) (Tabla XI).

**Tabla XI.- Ácidos grasos de rotíferos y *Artemia* (% ácidos grasos totales)**

	<b>Rotíferos enriquecidos DHA P. Selco</b>	<i>Artemia</i> A0+3h+Enriquecida	<i>Artemia</i> enriquecida
<b>Total Saturados</b>	20,48	17,78	18,31
<b>Total Monoenoicos</b>	41,12	32,26	35,85
<b>Total n-3</b>	22,31	38,42	33,78
<b>Total n-6</b>	12,23	8,81	9,67
<b>Total n-9</b>	23,53	21,84	24,10
<b>Total n-3HUFA</b>	19,67	6,61	13,30
<b>14:00</b>	1,59	0,78	0,97
<b>16:00</b>	14,30	11,04	11,20
<b>16:1 n-7</b>	12,40	2,60	3,37
<b>18:00</b>	3,38	5,02	5,10
<b>18:1 n-9</b>	18,33	20,04	21,82
<b>18:1 n-7</b>	3,76	5,62	6,08
<b>18:2 n-6</b>	8,67	6,79	6,66
<b>18:3 n-3</b>	1,11	26,50	17,71
<b>20:1 n-9</b>	2,65	1,04	1,63
<b>ARA</b>	1,45	0,76	1,27
<b>EPA</b>	5,90	2,41	5,76
<b>DHA</b>	10,37	2,08	5,37
<b>DPA (22:5n-6)</b>	0,53	0,10	0,29
<b>DHA/22:5 n-6</b>	19,42	21,84	18,45
<b>EPA/ARA</b>	4,06	3,17	4,54
<b>ARA/EPA</b>	0,25	0,32	0,22
<b>DHA/EPA</b>	1,76	0,86	0,93
<b>DHA/ARA</b>	7,15	2,74	4,24
<b>oleico/DHA</b>	1,83	10,01	4,10
<b>oleico/n-3HUFA</b>	0,94	3,05	1,64
<b>n-3/n-6</b>	1,86	4,36	3,49

#### 4.4.1.2- Experimento 2

En este experimento se sembraron un total de 160.000 huevos de la fracción flotante de la puesta n° 8 en un tanque de 40.000 litros, resultando en una densidad inicial de 4 huevos/l. El porcentaje de eclosión fue de un 69,27 % y la supervivencia larvaria en el momento de reabsorción del saco fue de 42,83 % lo que implica una densidad de inicio de 2,6 larvas/l. Entre los días 7 y 11 después de la eclosión se observó un pico de mortalidad que continuó de manera paulatina a lo largo de todo el experimento, dando lugar a una supervivencia final de 0,93 % a los 30 DPE.

A lo largo de este experimento la temperatura media de cultivo fue de  $24,0 \pm 0,59^{\circ}\text{C}$  y el  $\text{O}_2$  disuelto de  $6,40 \pm 0,36$  ppm.

Por lo que respecta al crecimiento de las larvas de *S. rivoliana*, la evolución de la longitud total (LT), longitud preanal (LPA), altura cefálica (HC), y peso húmedo (PH) se muestra en las figuras 43-47.

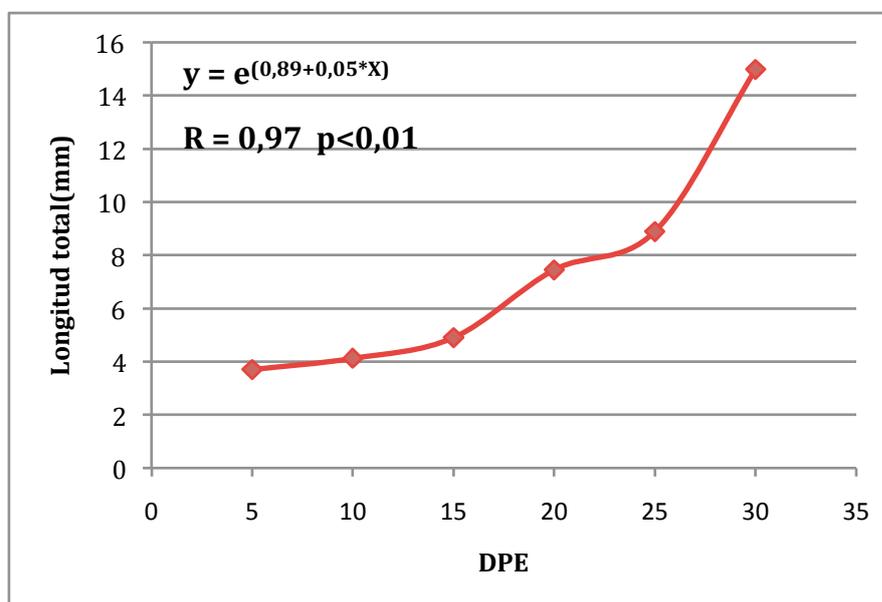


Fig.43.- Evolución de la LT a lo largo del experimento 2.

En la figura 43 se ve como la longitud total de la larva llega a los 14,98 mm a los 30 DPE partiendo de 3,7 mm a los 5 DPE. También se observa la ecuación de crecimiento para este experimento. La longitud preanal y altura cefálica siguen la misma tendencia que la longitud total, como vemos en la figura 44 y 46, haciéndose más pendiente la recta en el paso de 25 a 30 DPE. Esto mismo se ve, pero con mucha mayor claridad, en el peso húmedo, pasando de los 13,7 mg a los 65,6 mg en tan solo 5 días, de 25 DPE a 30 DPE.

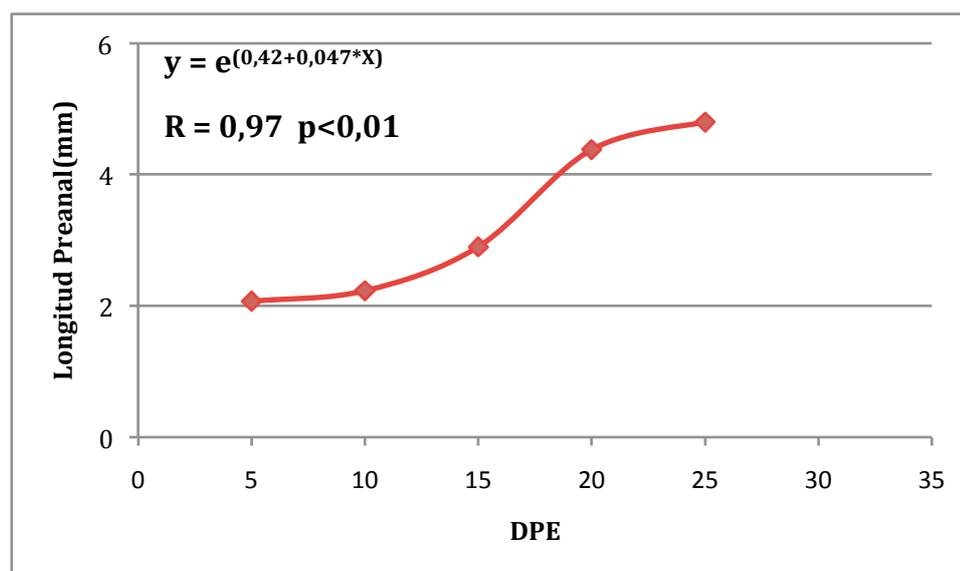


Fig. 44.- Evolución de la LPA a lo largo del experimento 2.

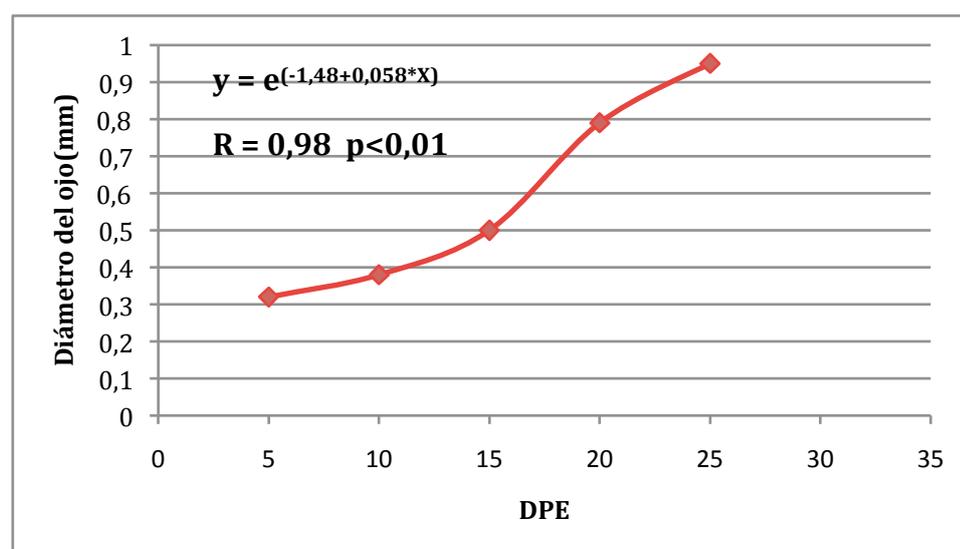
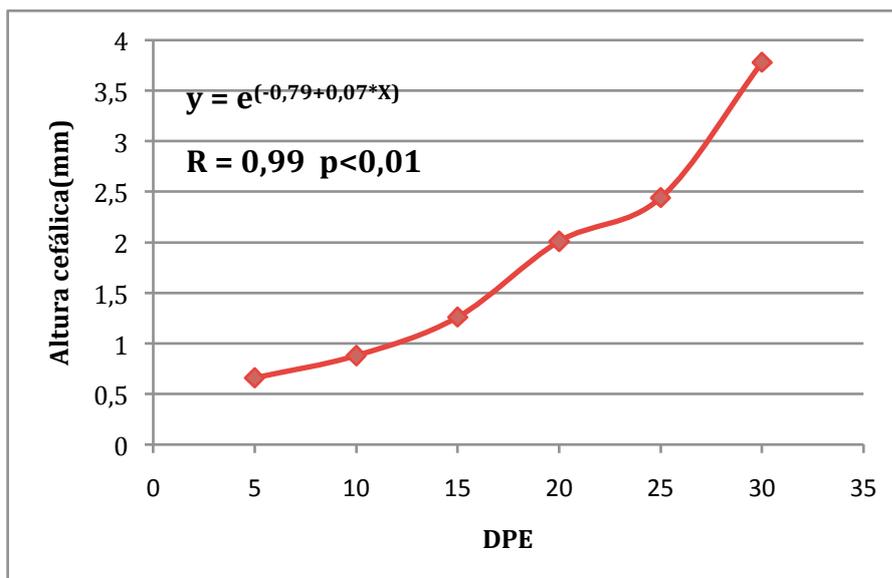
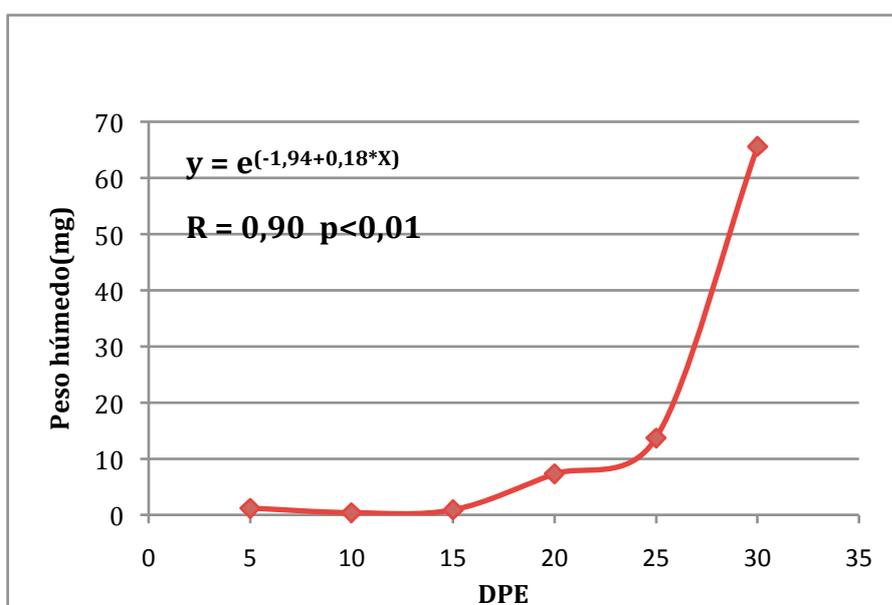


Fig. 45.- Evolución de la DO a lo largo del experimento 2.



**Fig. 46.- Evolución de la HC a lo largo del experimento 2.**



**Fig.47.- Evolución del PH a lo largo del experimento 2.**

La composición proximal y de ácidos grasos de enriquecedores, rotíferos y *Artemia* es la misma que para el experimento 1.

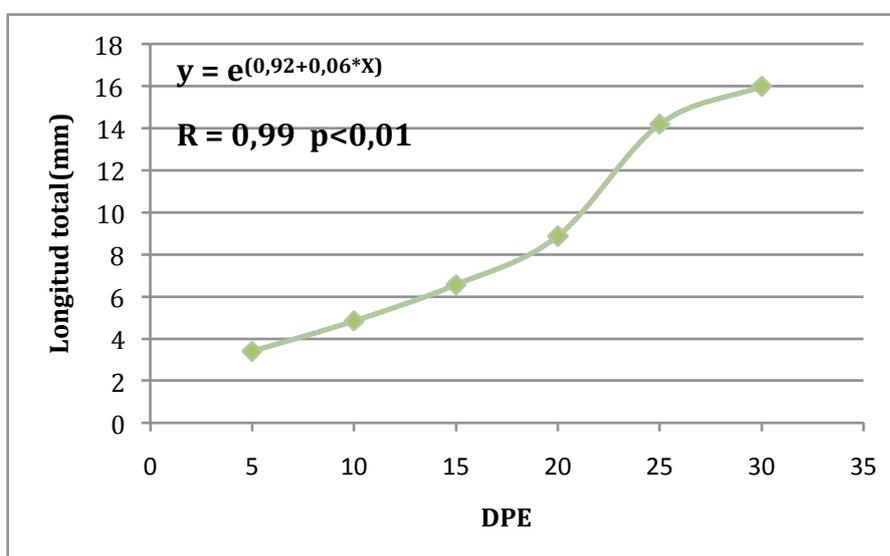
#### 4.4.1.3- Experimento 3

En este experimento se sembraron un total de 160.000 huevos de la fracción flotante de la puesta n° 9 en un tanque de 40.000 litros, resultando en una densidad inicial de 4 huevos/l. El porcentaje de eclosión fue de un 96,96 % y la supervivencia larvaria en el momento de reabsorción del saco fue de 93,33 % lo que implica una densidad de inicio de

3,6 larvas/l. Entre los días 7 y 11 después de la eclosión se vió un pico de mortalidad que continuó de manera paulatina a lo largo de todo el experimento, dando lugar a una supervivencia final de 2,13 % a los 30 DPE.

A lo largo de este experimento la temperatura media de cultivo fue de  $23,76 \pm 0,32$  °C y el O<sub>2</sub> disuelto de  $6,46 \pm 0,40$  ppm.

Por lo que respecta al crecimiento de las larvas de *S. rivoliana*, la evolución de la longitud total (LT), longitud preanal (LPA), altura cefálica (HC), y peso húmedo (PH) se muestra en las figuras 48-51.



**Fig.48.- Evolución de la LT a lo largo del experimento 3.**

En la figura 48 se observa como la longitud total de la larva llega a los 15,98 mm a los 30 DPE partiendo de 3,4 mm a los 5 DPE. También se observa la ecuación de crecimiento para este experimento. La longitud preanal y altura cefálica siguen la misma tendencia que la longitud total, como vemos en la figura 49 y 50, haciéndose más pendiente la recta en el paso de 25 a 30 DPE. Esto mismo se ve pero con mucha mayor claridad en el peso húmedo, pasando de los 12,7 mg a los 67,2 mg en tan solo 10 días, de 20 DPE a 30 DPE.

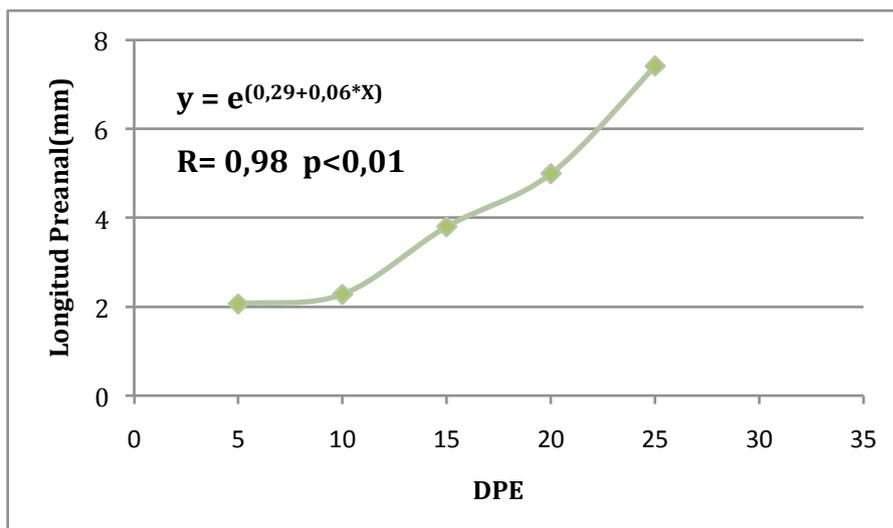


Fig. 49.- Evolución de la LPA a lo largo del experimento 3.

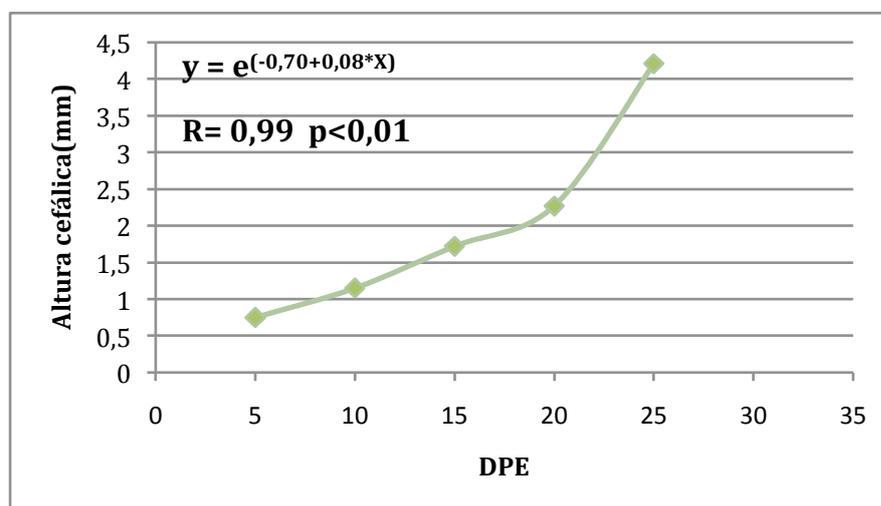


Fig. 50.- Evolución de la HC a lo largo del experimento 3.

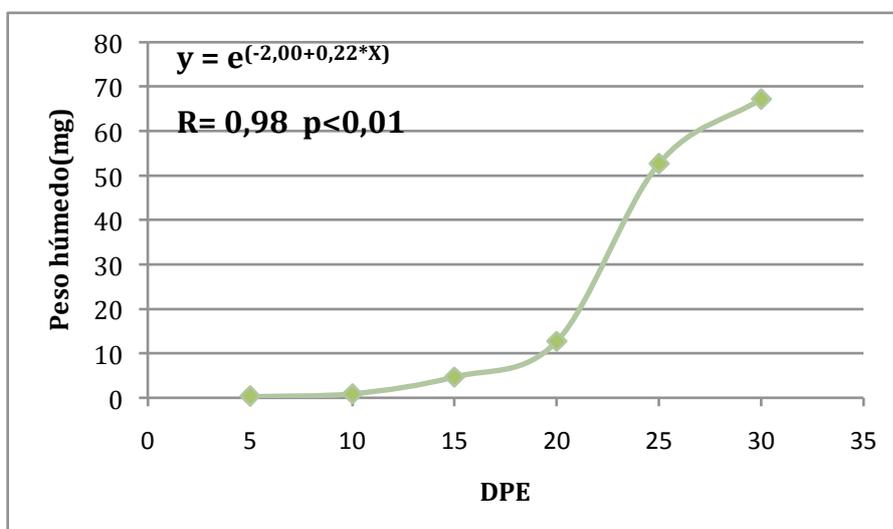


Fig.51.- Evolución del PH a largo del experimento 3.

Solo en este experimento se realizó un test de actividad, midiendo la resistencia a exposición al aire en larvas de 30 DPE. Los resultados de pruebas preliminares mostraron que el 100% de los ejemplares sufren el síndrome de shock y mueren tras la captura con red. Es por ello que se procedió a realizar el test con las larvas anestesiadas, para lo que se probaron, primero, dos diferentes dosis de anestesia, 0,1 y 0,2 ml de aceite de clavo al 5% por cada 100ml de agua, y posteriormente realizar el test con diferentes tiempos de exposición al aire. El tiempo máximo que el 100% de las larvas aguantaron fuera del agua se estimó en 90 segundos, para ambas concentraciones de anestésico. (Tabla XII).

**Tabla.XII.- Supervivencia del test de actividad**

Concentración Anestésico	Tiempo exposición al aire (seg)	Supervivencia
0,2ml/100ml de Aceite de Clavo al 5%	10	100%
	15	100%
	20	100%
	25	100%
	30	100%
	40	100%
	50	100%
	75	100%
	90	100%
0,1ml/100ml de Aceite de Clavo al 5%	105	40%
	40	100%
	50	100%
	75	100%
	90	100%
	105	40%
	120	40%

En este experimento, se testó un nuevo producto experimental de la casa INVE (Spirit) para el enriquecimiento de rotíferos, al igual que en las experiencias anteriores se trata de un enriquecedor en polvo. En el caso de la *Artemia* se utilizó el mismo enriquecedor que en las experiencias anteriores: Easy DHA Selco. Las principales diferencias entre los enriquecedores se reflejan en el contenido en humedad, proteína, lípidos y cenizas (Tabla XIII).

**Tabla XIII.- Análisis proximal de enriquecedores, rotíferos, *Artemia*, huevos y larvas de seriola**

		Humedad	Cenizas	Lípidos	Proteínas	CHO	Energía(Kj/g)	Ratio Prot./Lip
<b>Enriquecedor Spirit</b>		4,74±0,45	3,83±0,06	55,02±0,67	27,53±0,87	15,52±2,12	29,78±0,53	0,50±0,02
<b>Easy DHA Selco</b>		33,32±0,04	0,38±0,05	89,54±2,69	1,42±0,18	8,65±2,89	37,19±0,60	0,015±0,001
<b>Rotífero Enriquecido Spirit</b>		89,20±1,15	2,06±0,65	23,07±4,36	49,58±4,25	25,51±6,44	14,77±0,97	2,19±0,29
<i>Artemia</i>	<b>Ao + 3h+ Easy DHA</b>	90,77±1,73	0,87±0,25	17,72±2,07	60,83±2,27	20,56±2,8	11,86±0,74	3,47±0,42
	<b>Easy DHA Selco</b>	91,17±0,69	0,90±0,25	33,62±3,07	53,22±4,82	8,81±5,85	16,41±10,76	1,56±0,16
<b>Seriola</b>	<b>Huevos</b>	90,49±0,14	0,38±0,11	27,42±2,16	91,08±7,30	n.d	n.d	3,34±0,43
	<b>Larvas Día 30</b>	81,95±0,66	3,73±0,21	7,62±0,8	71,79±4,09	17,49±4,09	9,04±0,37	9,50±1,19

En cuanto a la composición bioquímica de las presas utilizadas en esta experiencia, nuevamente destacar el mayor contenido lipídico de los metanauplios de *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco, respecto a los otros dos tipo de presas utilizadas, y su mayor contenido energético, respecto al rotífero (Tabla XIII).

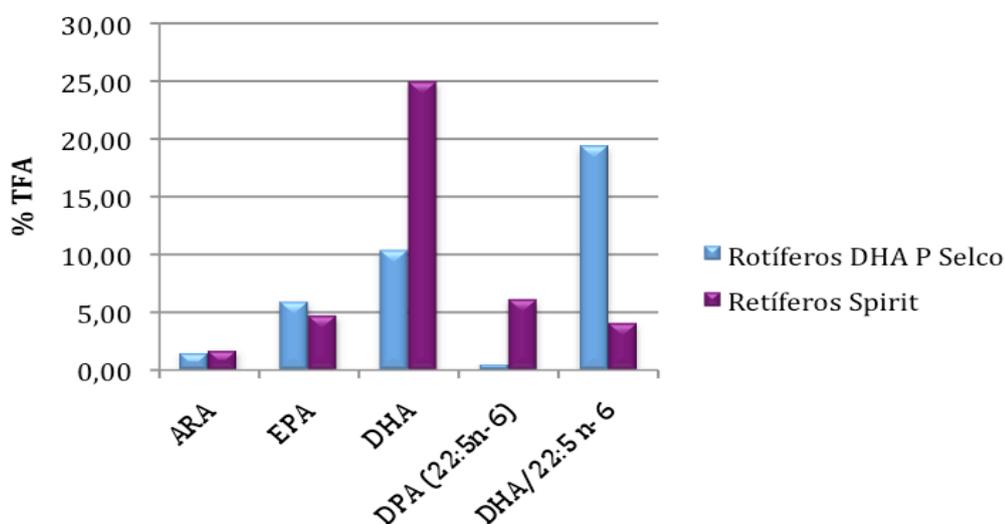
Respecto a la composición proximal de huevos y larvas de *S. rivoliana*, esta muestra que el contenido lipídico de los huevos fertilizados se reduce enormemente en larvas de 30 días. El porcentaje de proteínas para los huevos fue de 8,66±0,61 y subió hasta 13,04±1,06 en el día 30 (Tabla.XIII).

Finalmente, el contenido de ácidos grasos de los rotíferos y *Artemia* difiere enormemente, destacando los elevados niveles de ácidos grasos de Monoenos, serie n-3, n-6, n-9 y n-3 HUFA. En particular, destacan las diferencias entre los ácidos grasos esenciales como son el ARA, EPA y DHA. Finalmente destaca el elevado contenido de DPA en el enriquecedor de rotíferos (Tabla XIV).

**Tabla XIV.- Ácidos grasos de los enriquecedores, rotíferos y *Artemia* del experimento 3, (% ácidos grasos totales)**

	<i>Enriquecedores</i>		<i>Presas</i>		
	<i>Spirit</i>	<i>Easy DHA Selco</i>	<i>Rotíferos Spirit</i>	<i>Artemia +3h+Enriquecida</i>	<i>Artemia enriquecida</i>
<b>Total Saturados</b>	27,61	23,26	20,22	17,78	18,31
<b>Total Monoenoicos</b>	13,25	37,01	22,58	32,26	35,85
<b>Total n-3</b>	40,70	26,74	35,73	38,42	33,78
<b>Total n-6</b>	17,70	11,33	19,73	8,81	9,67
<b>Total n-9</b>	10,18	26,47	14,59	21,84	24,10
<b>Total n-3HUFA</b>	38,86	23,01	32,58	6,61	13,30
<b>14:00</b>	3,47	3,16	2,07	0,78	0,97
<b>16:00</b>	21,75	15,31	15,00	11,04	11,20
<b>16:1 n-7</b>	1,64	4,81	4,24	2,60	3,37
<b>18:00</b>	1,91	4,05	2,40	5,02	5,10
<b>18:1 n-9</b>	9,62	22,43	12,04	20,04	21,82
<b>18:1 n-7</b>	0,99	2,63	2,53	5,62	6,08
<b>18:2 n-6</b>	7,12	8,12	10,55	6,79	6,66
<b>18:3 n-3</b>	1,08	1,93	2,20	26,50	17,71
<b>20:1 n-9</b>	0,48	3,52	1,41	1,04	1,63
<b>ARA</b>	1,11	0,95	1,71	0,76	1,27
<b>EPA</b>	3,05	5,59	4,72	2,41	5,76
<b>DHA</b>	34,12	14,54	24,92	2,08	5,37
<b>DPA (22:5n-6)</b>	8,76	0,66	6,12	0,10	0,29
<b>DHA/22:5 n-6</b>	3,90	21,98	4,07	21,84	18,45
<b>EPA/ARA</b>	2,75	5,86	2,76	3,17	4,54
<b>ARA/EPA</b>	0,36	0,17	0,36	0,32	0,22
<b>DHA/EPA</b>	11,18	2,60	5,30	0,86	0,93
<b>DHA/ARA</b>	30,75	15,24	14,61	2,74	4,24
<b>oleico/DHA</b>	0,28	1,54	0,48	10,01	4,10
<b>oleico/n-3HUFA</b>	0,25	0,97	0,37	3,05	1,64
<b>n-3/n-6</b>	2,30	2,36	1,81	4,36	3,49

Las diferencias observadas entre los productos enriquecedores se reflejan a su vez en las presas. Así, destacan los elevados niveles de ácidos grasos de la serie n-6 y n-3 HUFA en el rotífero consecuencia del elevado nivel de DPA y DHA en esta presa. Cuando se comparan estos datos con los obtenidos en los experimentos anteriores, hay que destacar las diferencias entre nivel de DPA y DHA de los rotíferos enriquecidos con el nuevo producto (Spirit) respecto al DHA Protein Selco (Fig. 52).



**Fig. 52. Contenido en ARA, EPA, DHA y DPA en porcentaje en área de ácidos grasos totales para los rotíferos.**

En cuanto al contenido de ácidos grasos de los huevos y larvas como se muestra en la tabla XV, cabe destacar que a pesar de mantenerse el nivel de ácidos grasos de la serie n-3, los ácidos grasos que conforman esta serie cambian enormemente desde la etapa de huevo hasta los 30 DPE, así se puede observar un importante descenso del contenido en DHA y el incremento del ácido linolénico(18:3n-3) (Tabla XV).

Tabla XV.- Ácidos grasos de huevos y larvas del experimento 3

	Huevos	Larvas 30dpe
<b>Total Saturados</b>	21,94	23,45
<b>Total Monoenoicos</b>	29,43	28,89
<b>Total n-3</b>	28,71	33,46
<b>Total n-6</b>	18,36	12,35
<b>Total n-9</b>	22,18	20,06
<b>Total n-3HUFA</b>	25,77	23,13
<b>14:00</b>	1,08	0,34
<b>16:00</b>	16,03	12,51
<b>16:1 n-7</b>	3,59	1,57
<b>18:00</b>	4,09	9,62
<b>18:1 n-9</b>	21,14	18,63
<b>18:1 n-7</b>	3,28	6,13
<b>18:2 n-6</b>	15,15	6,41
<b>18:3 n-3</b>	0,93	8,21
<b>20:1 n-9</b>	0,63	0,97
<b>ARA</b>	1,40	3,46
<b>EPA</b>	5,04	6,20
<b>DHA</b>	16,98	12,97
<b>DPA (22:5n-6)</b>	0,30	0,83
<b>DHA/22:5 n-6</b>	56,30	15,70
<b>EPA/ARA</b>	3,60	1,80
<b>ARA/EPA</b>	0,28	0,56
<b>DHA/EPA</b>	3,37	2,09
<b>DHA/ARA</b>	12,14	3,75
<b>oleico/DHA</b>	1,24	1,44
<b>oleico/n-3HUFA</b>	0,82	0,81
<b>n-3/n-6</b>	1,56	2,71

#### **4.1-1. – Cultivo en sistema intensivo**

Se realizaron un total de 3 experimentos en este tipo de tanques de 2000l a lo largo del período de puesta, los resultados se muestran a continuación.

##### **4.4.2.1- Experimento 4**

En este experimento se sembraron un total de 120.000 huevos de la fracción flotante de la puesta n° 6, en un tanque de 2.000 litros, resultando en una densidad inicial de 60 huevos/l. El porcentaje de eclosión fue de un 79,95 % y la supervivencia larvaria en el momento de reabsorción del saco fue de 40,29 % lo que implica una densidad de inicio de 19,3 larvas/l.

A lo largo de este experimento la temperatura media de cultivo fue de  $23,71 \pm 0,69$  °C y el O<sub>2</sub> disuelto de  $5,90 \pm 0,29$  ppm.

Las larvas de este tratamiento solo llegaron a día 5, por lo que solo se pudo medir la longitud total y el peso húmedo a esta edad, siendo  $3,56 \pm 0,26$  mm y 0,6 mg respectivamente.

##### **4.4.2.2- Experimento 5**

En este experimento se sembraron un total de 5.000 huevos de la fracción flotante de la puesta n° 3, en un tanque de 2.000 litros, resultando en una densidad inicial de 2,5 huevos/l. El porcentaje de eclosión fue de un 84,9 % y la supervivencia larvaria en el momento de reabsorción del saco fue de 75,08 % lo que implica una densidad de inicio de 1,6 larvas/l.

A lo largo de este experimento la temperatura media de cultivo fue de  $24,07 \pm 0,34$  °C y el O<sub>2</sub> disuelto de  $6,21 \pm 0,37$  ppm.

Las larvas de este tratamiento solo llegaron a día 10, por lo que solo se pudo medir la longitud total y el peso húmedo a esta edad, siendo  $3,79 \pm 0,22$  y  $4,34 \pm 0,20$  mm de longitud total y 0,4 y 0,7 mg de peso húmedo a los 5 y 10 DPE.

En cuanto a la composición proximal del enriquecedor de rotíferos y de los rotíferos es la misma que para el experimento 1.

#### 4.4.2.3- Experimento 6

En este experimento se sembraron un total de 160.000 huevos de la fracción flotante de la puesta n° 10, en un tanque de 2.000 litros, resultando en una densidad inicial de 80 huevos/l. El porcentaje de eclosión fue de un 62,5 % y la supervivencia larvaria en el momento de reabsorción del saco fue de 53,33 % lo que implica una densidad de inicio de 47,8 larvas/l. Entre los días 7 y 11 despues de la eclosión se observó un pico de mortalidad que continuo de manera paulatina a lo largo de todo el experimento, dando lugar a una supervivencia final de 0,15 % a los 30 DPE.

A lo largo de este experimento la temperatura media de cultivo fue de  $23,71 \pm 0,69$  °C y el  $O_2$  disuelto  $5,90 \pm 0,29$  ppm.

Por lo que respecta al crecimiento de las larvas de *S. rivoliana*, la evolución de la longitud total (LT), longitud preanal (LPA), altura cefálica (HC), y peso húmedo (PH) se muestra en las figuras 53-59.

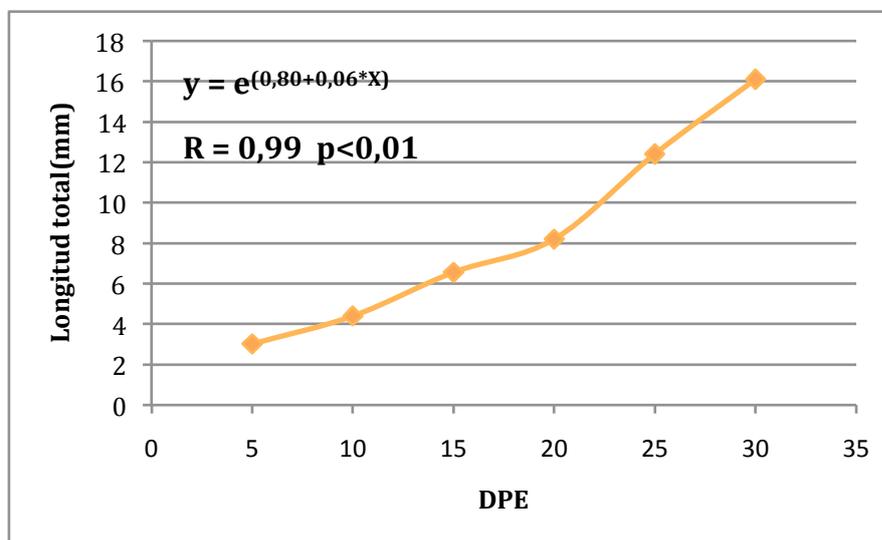


Fig.53.- Evolución de la LT a lo largo del experimento 4.

En este experimento la longitud total va desde los 3,02 a los 16,10 mm (Fig.53), que es la longitud mayor alcanzada en el presente estudio. Al igual que en los anteriores experimentos, el crecimiento aumenta en los últimos días del experimento, y todos los parámetros medidos siguen una misma tendencia, viéndose más evidente en el peso húmedo, llegando a los 75,5 mg, el valor más alto alcanzado en nuestro trabajo (Fig.58).

En la figura 53 se observa como la longitud total de la larva llega a los 16,10 mm a los 30 DPE partiendo de 3,02 mm a los 5 DPE. También se ve la ecuación de crecimiento para este experimento. La longitud preanal y altura cefálica siguen las misma tendencia que la longitud total, como vemos en la figura 55 y 56, haciéndose más pendiente la recta en el paso de 25 a 30 DPE. Esto mismo se ve pero con mucha mayor claridad en el peso húmedo, pasando de los 34,6 mg a los 75,5 mg en tan solo 5 días, de 25 DPE a 30 DPE.

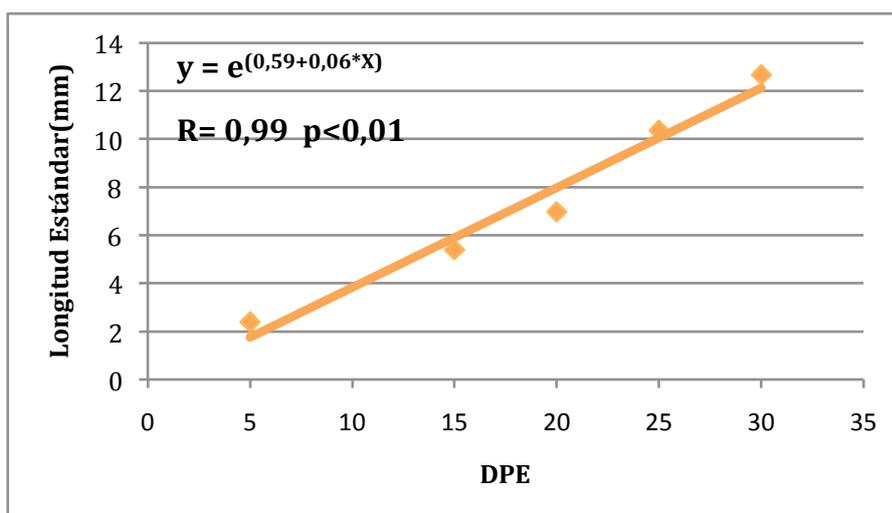


Fig. 54.- Evolución de la LS a lo largo del experimento 6.

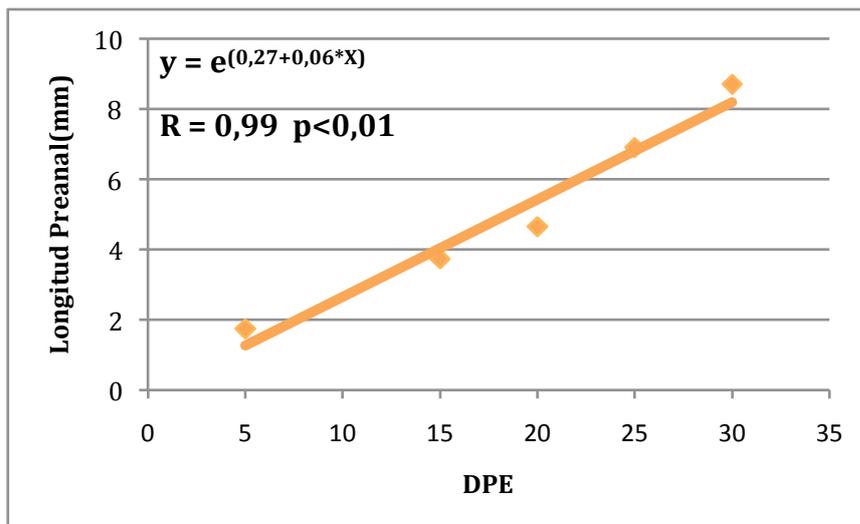


Fig.55.- Evolución de la LPA a lo largo del experimento 6.

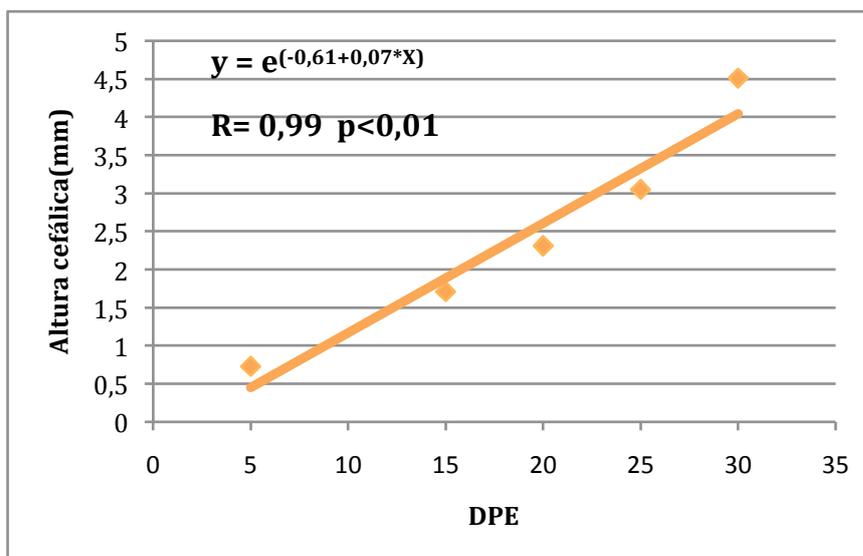


Fig.56.- Evolución de la HC a lo largo del experimento 6.

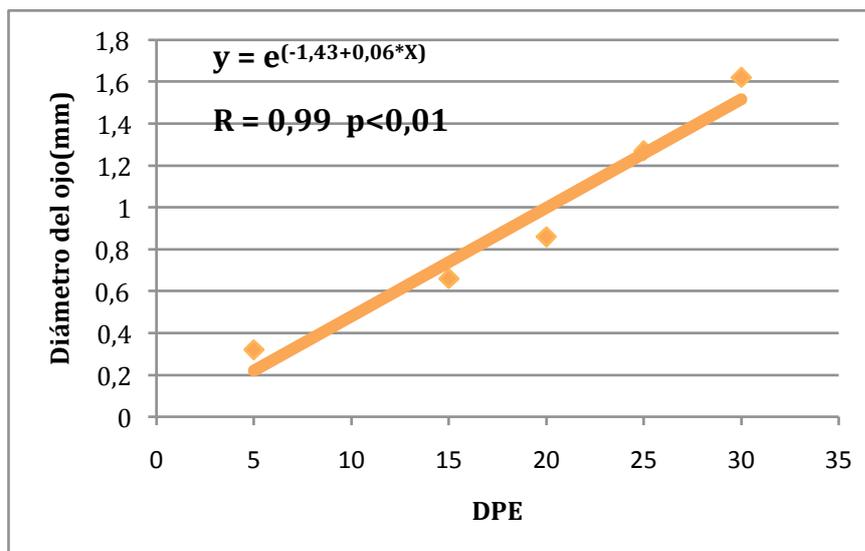


Fig.57.- Evolución del DO a lo largo del experimento 6.

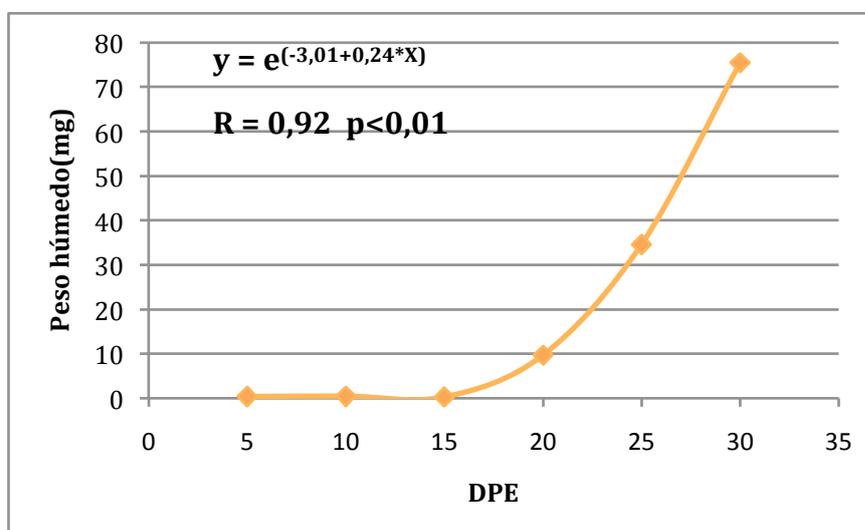


Fig.58.- Evolución del PH a lo largo del experimento 6.

La composición proximal de enriquecedores, rotíferos y *Artemia* es la misma que para el experimento 3.

# 5. Discusión

## 5.- Discusión

Varios autores han señalado que la fase de cultivo larvario es el más importante cuello de botella para el desarrollo de la acuicultura. Esto es debido, no solo a las bajas supervivencias obtenidas, sino además a los altos costos que representa esta fase del cultivo de una especie, en el total de la producción (Battaglione y Cobcroft, 2007).

La producción de nuevas especies depende de factores biológicos, tales como la eficiencia en la producción de huevos, la supervivencia larvaria, las tasas de crecimiento de los juveniles, los niveles de deformidad y la tolerancia a enfermedades. Así mismo, también dependen de factores no biológicos, tales como la certeza de la demanda de juveniles o la seguridad de que se obtendrán los objetivos de producción fijados. Ambos grupos de factores varían de acuerdo al tipo de cultivo empleado, así como el mercado al cual será destinada la producción.

La información biológica disponible para la cría de larvas de nuevas especies es muy escasa, esto ha retrasado la diversificación en el cultivo de peces marinos. Los métodos de cría extensivos son más naturales, y representan una manera más fácil de establecer las primeras necesidades de las nuevas especies a cultivar. Sin embargo, debido a la baja productividad de estos métodos, su aplicación industrial es menos rentable. Por otra parte, los métodos intensivos requieren un control total del proceso y un alto nivel de conocimientos biológicos, que en la mayoría de los casos no está disponible para el cultivo de nuevas especies. Estos inconvenientes conducen al empleo de métodos de cría semi-intensiva (Divanach *et al.*, 2002; Papandroulakis *et al.*, 2004, Roo *et al.*, 2010), con el fin de abordar la producción de semilla de nuevas especies. Uno de los métodos de cultivo empleado en este estudio, el mesocosmos es una técnica de cría intermedia entre métodos intensivos y extensivos, y puede ser considerada como una técnica semi-intensiva de producción.

El medregal negro es una de las especies que puede contribuir a la diversificación de la acuicultura marina en el área Centro Atlántica y Mediterránea. Es una especie de gran interés debido a su rápido crecimiento y a la buena calidad de su filete. Desafortunadamente, esta especie, como muchas otras especies de peces, exhibe disfunciones reproductoras cuando son estabulados en cautividad. Otro de los más

importantes cuellos de botella en el desarrollo de la acuicultura, es el control de la reproducción de los peces en cautividad. La adquisición de semilla del medio natural o de reproductores en cautividad solo durante el periodo natural de la puesta es inapropiada para la industrialización de la acuicultura. Una vez que la reproducción esté controlada en acuicultura, podrá ser suministrada semilla de forma continuada (Bromage y Roberts, 1995).

Tradicionalmente el control de la maduración se ha conseguido mediante la administración de compuestos bioactivos análogos a hormonas de mamíferos o peces, que son efectivos en peces teleósteos, tales como extractos de gonadotrofina, o compuestos que estimulan la síntesis y liberación de gonadotrofina endógena. El desarrollo de técnicas de inducción de la maduración ha superado varias etapas, desde el uso de preparaciones crudas de extractos pituitarios conteniendo gonadotrofinas, preparaciones de gonadotrofinas semipurificadas, hasta el uso de compuestos que estimulan la síntesis y liberación de gonadotrofina endógena.

La época de puesta, en cautividad, del medregal negro en Ecuador va desde abril a diciembre a una temperatura media de 27,4 °C. (Blacio, 2002). En Hawai ocurre durante todo el año a una temperatura media de 26° C. (Lidley *et al.*, 2004). En Méjico, en la naturaleza, ocurre durante todo el año, con un pico de abril a octubre y a una temperatura de 22-25° C. (Aviles *et al.*, 2004) En nuestro caso obtuvimos puestas inducidas desde julio a octubre a una temperatura media de 23° C. (Roo *et al.*, 2009).

Los resultados de la biopsia gonadal realizada a los reproductores, durante los años 2006 y 2007, mostraron que todas las hembras estaban inmaduras con oocitos primarios muy pequeños de <150µ de diámetro, y no se produjeron puestas. Lidley *et al.* (2004) señalan, para esta especie, un peso mínimo de 5 kg para que las hembras maduren. De la Gandara y Garcia-Gomez (2004) señalan, para que existan ejemplares maduros, un peso mínimo de 5-6 kg para los machos y un peso superior a los 11 kg para las hembras de pez limón, en el Mediterráneo.

En las biopsias realizadas en el año 2008, se observaron en hembras mayores de 5 kg, oocitos postvitelogénicos de >500 µm de diámetro, sin embargo tampoco se obtuvieron puestas. En el año 2009, se volvió a detectar la presencia de hebras maduras con oocitos previtelogénicos mayores de 500µm en un rango de tallas de 5,1 a 7,3 kg y se optó por la

inducción hormonal como medio para asegurar la puesta. El estado y diámetro de los oocitos de los reproductores de este experimento, es suficiente para inducir hormonalmente la puesta, como ha ocurrido en hembras de pez limón (Mylonas *et al.*, 2004), y también en otra especie de rápido crecimiento como la corvina (Duncan *et al.*, 2007). Por otra parte, señalar que, con el medregal negro se han obtenido puestas naturales en Hawaii (Lidley *et al.*, 2004) y en Ecuador (Blacio *et al.*, 2001). La obtención de puestas inducidas de medregal negro, en el ICCM, ha permitido la realización de las primeras experiencias de cría larvaria de esta especie en Europa.

En el presente estudio, los huevos del medregal negro tuvieron un diámetro medio de  $1,04 \pm 0,04$  mm, y el de la gota lipídica fue de  $0,29 \pm 0,009$  mm, con una temperatura de puesta de  $23 \pm 1$  °C. Este tamaño es muy similar al de *Seriola dumerili*, con huevos de un diámetro de  $1,03 \pm 0,2$  mm y de  $0,26 \pm 0,01$  mm para la gota lipídica, con una temperatura de puesta que osciló entre los 21°C y 23,5°C (Papandroulakis *et al.*, 2005). Pero, menor que el señalado para *S. dumerili* por Jerez *et al.* (2006) que fue de  $1,121 \pm 0,032$  y  $0,243 \pm 0,001$  para el huevo y la gota de grasa, respectivamente y con una temperatura que osciló entre los 19 y 24° C.

Moran *et al.* (2007), señalan para *Seriola lalandi* un diámetro del huevo de  $1,40 \pm 0,04$  mm y  $0,31 \pm 0,01$  mm para la gota de grasa, a una temperatura de puesta de 17°C. En este mismo sentido Verakunpiriya *et al.* (1997), indican un diámetro de  $1,20 \pm 0,04$  mm y de  $0,311 \pm 0,08$  para el huevo y gota lipídica, respectivamente, de *Seriola quinqueradiata*, a una temperatura de puesta de  $17,5 \pm 1,8$ ° C. Estas diferencias en el tamaño de los huevos, entre las distintas especies del género *Seriola*, podría deberse a la temperatura de puesta. Así, Mihelakakis *et al.* (2001) señalan una correlación negativa entre la temperatura de puesta y el diámetro del huevo en el pargo.

El diámetro del huevo del medregal negro es menor que el de otras especies de rápido crecimiento como el de la cobia que oscila entre 1,20 y 1,40 mm (Kaiser y Holt, 2005), y mayor que el del jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*) que es de  $0,98 \pm 0,02$  (Vasallo-Agius *et al.*, 2001) o de la corvina que es de  $0,85 \pm 0,02$  (Jimenez *et al.*, 2006).

En las puestas del medregal negro se pudo observar, en algunas ocasiones, huevos con más de una gota de grasa, esta característica aparece en huevos de otras especies como dorada (Ezzat *et al.*, 1982), el pargo (Socorro, 2006) o el medaka, *Orzyas latipes* (Iwamatsu, 1994). Makino *et al.* (1999), observaron que era frecuente en las puestas del robalo japonés

(*Lateolabrax japonicus*) la existencia de huevos con mas de una gota de grasa y siguiendo su desarrollo comprobaron que la fusión en una única 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.

La fase de organogénesis a  $23,1 \pm 1,3^\circ \text{C}$ , comienza a las 20 horas después de la fecundación (HPF), en *Seriola lalandi*, esta fase se observa a las 42 horas de la fertilización, a  $17^\circ \text{C}$  (Moran *et al.*, 2007). A las 23 horas de la fertilización se apreciaron los primeros movimientos del embrión, y se hicieron visibles las cápsulas óticas y ópticas. Hernandez-Cruz *et al.* (1999), señalan la aparición de movimientos erráticos del embrión del pargo transcurridas unas 30 horas desde el momento de la fecundación, con una temperatura del agua de  $18,5^\circ \text{C}$ . Ciechowski y Weiss (1973) indican, en el pargo, que transcurridas 21 horas desde el momento de la fertilización, cuando el embrión ocupa las dos terceras partes del perímetro del huevo, se produce la formación de las cápsulas ópticas secundarias y las capsulas óticas. En *S. lalandi*, a  $17^\circ \text{C}$ , la formación de las cápsulas ópticas tiene lugar a las 72 horas ddf (Moran *et al.*, 2007).

Antes de la eclosión, el embrión inicia una serie de movimientos bruscos, encaminados probablemente a la liberación de enzimas que poseen en la cabeza, y que son las encargadas de deshacer la cubierta del huevo (Faranda *et al.*, 1985).

El período de tiempo, desde el momento de la fecundación hasta la eclosión, varía entre las especies, incluso dentro de una misma familia, estando afectado sobretodo por la temperatura. Así, en el caso de pargo japonés (*Pagrus major*) a  $20^\circ \text{C}$  es necesario llegar a las 50 horas desde el momento de la puesta (Fukuhara, 1985). En el caso de la dorada el desarrollo embrionario puede variar desde las 135 horas a  $11^\circ \text{C}$  hasta las 40 horas a  $21,3^\circ \text{C}$  (Camus y Koutsikopoulos, 1984). Mientras que Ciechowski y Weiss (1973), determinaron que el tiempo de eclosión para el pargo era de entre 28 y 38 horas en temperaturas que oscilaban de  $21,5$  a  $22,5^\circ \text{C}$ . En Canarias, esta misma especie, tiene una duracion del desarrollo embrionario de 41 horas a  $19^\circ \text{C}$ , mientras que a  $21^\circ \text{C}$ , la eclosión se produjo a las 37 HPF (Socorro, 2006)

En nuestro caso, a las 36 HPF con una temperatura de  $23,1^\circ \text{C} \pm 1,3$ , se inició la eclosión de las larvas. Blacio (2002) señala una duración del desarrollo embrionario de 24,5

horas para esta misma especie a 27,4°C. En *Seriola dumerili*, la eclosión tiene lugar a la misma temperatura, a las 30 HPF, (Papandroulakis *et al.*, 2005; Mylonas *et al.*, 2004), a las 35 HPF a 23-27°C (Masuma *et al.*, 1990), a las 48 HPF a 19,8 °C (Lazzari, 1991). En Canarias, Jerez *et al.* (2006) indican una duración del desarrollo embrionario, de *S. dumerili* de 45 horas a una temperatura de 19°C, y de 34 horas a una temperatura de 24°C.

Los huevos *S. lalandi* eclosionan entre las 103 y 108 HPF a 17°C (Moran *et al.*, 2007). Para *S. quinqueradiata* se ha señalado un periodo de desarrollo embrionario de 48 horas a 19,8°C (Mushiake *et al.*, 1998). En cuanto a otras especies de rápido crecimiento, los huevos de corvina eclosionan a las 48 horas desde el momento de la fertilización, a una temperatura de 18,2 °C (Cruz *et al.*, 2007). En el caso de la albacora (*Thunnus albacares*), el periodo de desarrollo embrionario varía desde 26,5 hora a 23,5°C, hasta 20 horas a 29,5°C (Margulies *et al.*, 2007).

La organogénesis de la larva, está relacionada con sus necesidades fisiológicas, alimenticias y natatorias. De esta manera, cualquier cambio fisiológico siempre va a ir acompañado por cambios morfológicos que puedan permitir esa evolución. En este sentido, el inicio de la alimentación exógena es determinante en la morfología de la larva, que pasa de una alimentación por absorción de sus reservas vitelinas a la captura de presas vivas. Así, durante la organogénesis van sucediendo una serie de eventos que incluyen el desarrollo de una boca, hasta el momento innecesaria o la evolución de las aletas, que le permite mayor eficacia en la persecución de sus presas. Además la reducción en la flotabilidad, suministrada por la gota lipídica que va siendo consumida progresivamente, es compensada por la formación de la vejiga natatoria cuando la gota termina por desaparecer. De esta forma, las características morfológicas nos ayudan a entender los procesos fisiológicos que van sucediendo en la larva.

Las larvas recién eclosionadas, tenían una longitud total (LT) de  $2,54 \pm 0,01$  mm y un saco de  $1,29 \pm 0,07$  mm de longitud. Las larvas recién nacidas de medregal negro son de menor tamaño que las larvas de *Seriola dumerili*,  $2,88 \pm 0,22$  a 21-23,5°C (Papandroulakis *et al.*, 2005),  $3,639 \pm 0,012$  mm (Jerez *et al.*, 2006), y que las de *S. lalandi* con una LT de 4,8 mm a 17°C (Moran *et al.*, 2007). También son menores que las larvas de otras especies de rápido crecimiento, como las de la corvina que tienen una longitud estándar (LS) en el

momento de la eclosión de  $2,82\pm 0,37$ mm (Jimenez *et al.*, 2006), y que las de la albacora,  $2,61\pm 0,01$ mm (Margulies *et al.*, 2007).

La reabsorción del saco se produjo totalmente al día 5, coincidiendo con *S. lalandi* a 17°C (Moran *et al.*, 2007). En el caso de otra especie de rápido crecimiento como la corvina, la reabsorción completa del saco vitelínico tiene lugar 2 días después de la eclosión (DPE), de tal manera que el día 3 DPE queda solo un residuo del mismo, aunque la gota lipídica perdura hasta el día 7 DPE (Fernández-Palacios *et al.*, 2007). En algunos espáridos como el pargo, la sama de pluma (*Dentex gibbosus*) y el dentón (*Dentex dentex*) la reabsorción completa ocurre a los 4 (18,9-21,4°C), 3 (19,9-21,7°C) y 8 (17°C) días, respectivamente (Socorro, 2006; Glamuzina *et al.*, 1989).

La apertura de la boca del 100% de las larvas se produjo a las 60 horas después de la eclosión (HPE), coincidiendo, en el tiempo, con *S. dumerili* a 21-23,5°C (Papandroulakis *et al.*, 2005). Al cuarto día de vida, el tubo digestivo está lo suficientemente desarrollado para comenzar con la alimentación externa, esta etapa del desarrollo coincide, con la de *S. lalandi* a 17°C (Moran *et al.*, 2007). En este mismo día 4 DPE y con una LT de  $3,74\pm 0,12$  el 100% de las larvas presentan la vejiga natatoria, que aparece un día más tarde en *S. dumerili* con una LT de  $3,87\pm 0,23$  a 21-23,5°C (Papandroulakis *et al.*, 2005). Mientras que en *S. mazatlana* a 25-26°C aparece el día 7-8 DPE (Benetti, 1997).

En cuanto a la producción e índices de calidad de las puestas, decir que el número total de huevos obtenidos en las 10 inducciones realizadas fue 2,755,592 con un número medio de 275,592 huevos por puesta. Este número es superior a los 154,000 huevos por puesta, obtenidos de forma natural, para esta misma especie por Lidley *et al.* (2004), e inferior a los 376,610 huevos, por puesta natural de *Seriola dumerili* (Jerez *et al.*, 2006). En puestas inducidas, mediante inyección, de esta última especie se obtuvieron 46,522 huevos por puesta (García *et al.*, 2001), y en puestas inducidas mediante implante 170,000 huevos por puesta (Mylonas *et al.*, 2004).

El porcentaje medio de huevos flotantes,  $72,67\pm 17,22$  fue similar al indicado para *S. dumerili* a 21-23,5°C (Papandroulakis *et al.*, 2005), e inferior al señalado para corvina por Fernández-Palacios *et al.* (2009), que fue del  $87,14\pm 10,66$

El porcentaje medio de fecundación, en este estudio,  $92,56 \pm 5,5\%$  fue muy superior al 43% obtenido por Lidley *et al.* (2004) para puestas naturales de esta misma especie, y superior al indicado por Jerez *et al.* (2006) para puestas naturales de *S. dumerili* que fue del  $61,75 \pm 3,60\%$ . El porcentaje de eclosión del  $79,03 \pm 11,37\%$ , obtenido con las puestas inducidas del medregal negro, fue muy superior al  $16,49 \pm 3,03$  obtenido para *S. dumerili* por Jerez *et al.* (2006), y similar al reseñado para albacora que fue del  $83 \pm 14,7\%$  (Margulies *et al.*, 2007), y para corvina que fue del  $89,42 \pm 12,95$  (Fernández-Palacios *et al.*, 2009). En cuanto al porcentaje de larvas con el saco vitelino reabsorbido, este fue del  $52,39 \pm 19,14$  muy inferior al obtenido en puestas de corvina, inducidas con la misma cantidad de GnRH $\alpha$   $20 \mu\text{kg}^{-1}$ , que fue del  $84,83 \pm 10,56$  (Fernández-Palacios *et al.*, 2009).

El mejor crecimiento, a día 30 DPE, con respecto a los parámetros biométricos controlados (LT, LS, LPA, HC, OJO y PH), se observó en las larvas de los experimentos 3 y 6 (cultivo semi-intensivo e intensivo, respectivamente) alimentadas, en ambos casos, con rotíferos enriquecidos con Spirit, alcanzando, en el experimento 6, una LT de  $16,1 \pm 3,26$  mm, una LS de  $12,68 \pm 2,5$  mm y un PH de  $75,5 \pm 29,6$  mg. Estos crecimientos son menores que los señalados para esta misma especie en Hawai (CTSA, 2008); similares, hasta día 20 DPE, a los indicados por Papandroulakis *et al.* (2005) para *S. dumerili*; y superiores a los obtenidos por Hamasaki *et al.* (2008) para la LS a 14 y 20 DPE, para esta última especie.

El crecimiento de las larvas de medregal negro es mayor que el observado en el pargo, y en la sama de pluma que presentan una LS de 7,14 y 7,59 mm a los 31 DPE respectivamente (Socorro, 2006), que en dorada con una LS de 5,86 mm a los 31 DPE (Bessonart *et al.*, 1999), y que la corvina con una LT y LS de 6,70 y 5,84 mm, respectivamente (Fernández-Palacios *et al.*, 2009). Pero menor al alcanzado por otras especies como la cobia que llega a 14,6 mm a 22 DPE (Faulk *et al.*, 2007), o el atún de aleta azul del Pacífico, *Thunnus orientalis* que alcanza los 17,1 mm a 9 DPE (Seoka *et al.*, 2007).

La supervivencia larvaria más alta, a 30 DPE, se obtuvo en el experimento 3, con un 2,23%, que es muy similar a la obtenida por Blacio *et al.* (2001) a día 25 DPE, para la misma especie que fue del 2,35%. Para *S. dumerili* se indica una supervivencia del 3,5% a los 40 DPE (Papandroulakis *et al.*, 2005), y una supervivencia media, para esta última

especie del 2,45% a los 20 DPE (Hamasaki *et al.*, 2008). En *S. dumerili* también se señalan supervivencias del 1,6 al 11,9 % (Yamamoto *et al.*, 2008). En nuestro estudio, se ve una clara diferencia, en la supervivencia larvaria, entre los experimentos realizados en sistema semi-intensivo y los realizados en intensivo, llegando a día 30 DPE solo un experimento de cultivo intensivo y con muy baja supervivencia.

Se observó un pico marcado de mortalidad en los primeros días de vida, alrededor de los 7-11 DPE, coincidiendo con la reabsorción del saco, por lo tanto con el paso a alimento exógeno, y una paulatina mortalidad a lo largo de todo el tratamiento. CTSA (2008) y Benetti (1997) indican que en *Seriola dumerili*, *S.iquierata* y *S.lalandi*, se observan dos picos de mortalidad, uno en los primeros días coincidiendo con lo ocurrido en todos nuestros experimentos, y un segundo pico en la etapa de destete, debido al canibalismo. Este segundo pico no ocurrió en nuestros experimentos, debido a la baja densidad larvaria existente en los tanques de cultivo. La baja supervivencia larvaria, obtenida en nuestro estudio, puede ser debida a una multitud de factores, ya sea la calidad de la puesta, los factores de cultivo ( $T^a$ , oxígeno, calidad del agua...), tipo y tiempo de alimentación, elevada sensibilidad de las larvas entre otros. La calidad de las larvas, depende básicamente de la calidad de los huevos, la cual puede estar determinada por un elevado número de condiciones (Campbell *et al.*, 1992; Bromage y Roberts 1995; Carrillo *et al.*, 2000).

Los desequilibrios nutricionales en las primeras etapas de vida, tales como deficiencias en vitaminas, aminoácidos o ácidos grasos esenciales en la alimentación de reproductores o larvas, pueden alterar el comportamiento de la larva (Ishizaki, 2001), la supervivencia, el crecimiento, la sensibilidad al estrés (Izquierdo, 1996), o el desarrollo osteológico del cultivo larvario (Kanazawa *et al.*, 1983; Akiyama *et al.*, 1986; Knox *et al.*, 1988; Chatain y Ounais-Guschemann, 1990; Cahu *et al.*, 2003; Saele *et al.*, 2003; Hamre *et al.*, 2005).

En el caso particular de los lípidos, se ha demostrado que estos son cruciales para el desarrollo embrionario y larvario, ya que juegan un papel importante en una amplia serie de procesos (Sargent *et al.* 1999). En relación al contenido en lípidos totales encontrado en los huevos y larvas, se ve como el contenido de estos baja de huevos a larvas de 30 DPE (27-7%). Siendo el contenido lipídico de las larvas de 30 DPE inferior al reportado para

*Seriola dumerili* (Yamamoto *et al.*, 2008) y corvina Borrero (2008) que se sitúa entre 13-16% respectivamente. El contenido en proteína (91-71%), al igual que sucede con los lípidos, baja en el paso de huevos a larvas de 30 DPE y es similar al referido por Yamamoto *et al.*, 2008 para larvas de *S. dumerili*.

Pese a que no se conocen los requerimientos nutricionales de la especie estudiada, la utilización de los enriquecedores comerciales durante la alimentación con rotíferos y *Artemia*, al menos aseguraron un aporte de HUFA's (ácidos grasos altamente insaturados), puesto que se ha demostrado que alimentar a larvas con rotíferos y *Artemia* deficientes en EPA y DHA, se refleja en natación errática de las larvas que pueden flotar en la superficie del tanque, descenso en la actividad natatoria y alimenticia, hidropesía (depósitos de agua subcutáneos y subcelómicos), shock ante el test de actividad, y una baja supervivencia tras el mismo. Además son síntomas claros no solo un crecimiento reducido, sino también una ineficiente inflación de la vejiga natatoria y un menor porcentaje de supervivencia, como se ha observado en la dorada (Koven *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 1993, 1994; Salhi *et al.*, 1994) y en rodaballo (Gatesoupe y Milinaire, 1985).

En el caso particular de los ácidos grasos de cadena larga como. Docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA), Eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y Araquidónico (20:4 n-6, ARA) tienen una gran importancia, y han sido ampliamente estudiados en especies de peces marinos (Izquierdo 1996; Sargent *et al.*, 1997), jugando un papel importante en la estructura de la membrana celular, y estructura y evolución de diferentes tejidos y órganos en las primeras etapas de vida. Tienen un papel importante en el desarrollo de las larvas (Bell *et al.*, 1995a), en su supervivencia (Roo *et al.*, 2009), en su comportamiento frente a la escolarización (Ishizaki, 2001) y está relacionado también con el control del estrés (Watanabe *et al.*, 1983; Izquierdo, 2005; Ganga *et al.*, 2006). Cambios en las condiciones de cultivo durante este período de desarrollo larvario, tales como cambios en la alimentación, aumento de las tasas de flujo, reducción de agua verde, etc, imponen un alto riesgo de estrés a las larvas de peces, aumentando la importancia de una alimentación adecuada.

En este sentido, el comportamiento de las larvas de medregal negro en los tanques de cultivo, mostró una tendencia a la agregación en distintas áreas de la superficie del tanque y media columna de agua, respondiendo activamente ante estímulos sonoros

durante las primeras fases del cultivo. Sin embargo, las larvas se mostraron muy sensibles a condiciones estrésantes como los cambios de iluminación y de calidad de agua, igualmente a la manipulación principalmente, a partir del día 20 de cultivo, que se refleja en la aparición de síndrome de shock tras la captura y una mortalidad del 100% de los ejemplares manipulados, como se demostró en el experimento 3 y la necesidad de utilización de anestésico para la realización del test de actividad.

Estos síntomas son una indicación de deficiencias nutricionales, en particular de ácidos grasos esenciales como se señaló anteriormente y podrían estar asociados a la baja capacidad que tienen las larvas para digerir la *Artemia*, que, como se pudo observar se defeca prácticamente entera dando a entender una baja capacidad de asimilación de los nutrientes aportados en el enriquecimiento y estaría relacionado con el bajo nivel de lípidos en las larvas de 30DPE. Este mismo problema fue señalado por Roo *et al.* (2010) en el caso del pargo, señalando una importante mejora en la supervivencia de esta especie con un destete de las larvas desde etapas más tempranas.

La cantidad de ácidos grasos presentes en los rotíferos y *Artemia* enriquecidos son equivalentes a los encontrados por Roo *et al.* (2009), y cabe destacar el elevado nivel de DHA y DPA (22:5 n-6) en el enriquecedor experimental Spirit, este último es un ácido graso producido por ciertos protistas marinos como *Schizochytrium sp.* (Barclay y Zeller, 1996; Parrish *et al.*, 2007). Estos organismos se caracterizan además por los elevados niveles de DHA que pueden generar (>50%) por lo que están siendo utilizados como fuente de este ácido graso por algunos fabricantes de enriquecedores comerciales como ocurre con el Red pepper (Roo *et al.*, 2010).

Respecto a los porcentajes de ácidos grasos en porcentaje de área presentes en las larvas del medregal negro son equivalentes a las encontradas en otros peces marinos tales como la corvina (Borrero, 2008), cobia (Faulk y Holt, 2005), bacalao (García *et al.*, 2008), dorada (Bueno, 2001) o el atún de aleta azul del pacífico (Sekoia *et al.*, 2007). Si bien, el contenido de DHA encontrado en las larvas de 30 DPE fue inferior al de *S. dumerili* (Yamamoto *et al.*, 2008). Este ácido graso interviene en importantes funciones durante el desarrollo de la larva como son la formación del sistema neural o la visión. La proporción de DHA encontrado en las larvas fue más de dos veces superior al de la *Artemia* ingerida (12,61% frente a un 5,37%). Por el contrario, es muy inferior al de los rotíferos

enriquecidos con Spirit (24,32%) utilizados en esa experiencia y ligeramente superior al de rotíferos enriquecidos con DHA selco (10,37%).

Otros ácidos grasos esenciales como el ARA y el EPA están involucrados en la producción y la modulación de los eicosanoides (Bell *et al.*, 1994, 1995b; Sargent *et al.*, 1997). La cantidad relativa de EPA en las larvas de 30 DPE es inferior a la observada en *S. dumerili* (Yamamoto *et al.*, 2008) y con una tendencia al alza desde el estadio de huevo, lo que se relaciona con una presencia elevada en las presas vivas utilizadas. Por lo que respecta al ARA, este permanece constante en las larvas a lo largo del experimento, lo mismo ocurre en el caso de *S. dumerili* pero en porcentajes algo menores (Yamamoto *et al.*, 2008).

Al igual que ocurre en la composición de ácidos grasos de los rotíferos enriquecidos, se encontraron niveles elevados de DPA en las larvas de medregal negro, lo que se ha atribuido al contenido presente en la presas enriquecidas con Spirit. Un nivel elevado de DPA, puede dañar la función cerebral ya que, puede sustituir al DHA dada su similitud química dando lugar a alteraciones en las propiedades de las membranas neuronales y modificar las funciones de los fotorreceptores como se ha señalado en vertebrados superiores (Hrboticky *et al.*, 1991; Eldho *et al.*, 2003). La supervivencia también puede estar influenciada negativamente por altos niveles de DPA como señala Roo *et al.*, (2009) sin embargo, los niveles de DPA de las larvas de seriola son sensiblemente inferiores a los reportados en larvas de bocinegro (Roo *et al.* 2009), cobia (Faulk y Holt, 2005) y bacalao (Parrish *et al.*, 2007; García *et al.*, 2008), cuando eran alimentados con rotíferos y *Artemia* ricos en este ácido graso. Este hecho podría estar relacionado un con un uso más prolongado de la alimentación con rotíferos en el caso del bocinegro frente al presente estudio o a un efecto lavado del mismo desde la etapa de alimentación con rotíferos con la introducción de la *Artemia* que no incluye este ácido graso hasta el momento de la toma de muestras.

Hay que mencionar igualmente, que no sólo son importantes las cantidades de los diferentes HUFA, sino también las relaciones entre ellos, como los ácidos grasos n-3/n-6 en el músculo que se consideran importantes para el crecimiento y desarrollo normal de las larvas de peces (Izquierdo, 1996; Rainuzzo *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1999; Izquierdo *et*

*al.*, 2000). Los porcentajes encontrados de esta relación fueron similares a los encontrados en bocinegro por Roo *et al.* (2009).

Finalmente cabe señalar que independientemente de la alimentación empleada se confirma que el uso de sistema mesocosmos o condiciones de cultivo semi-intensivas mejoran la supervivencia larvaria y crecimiento de las mismas lo que concuerda con los resultados obtenidos por otro autores para especies de este mismo género como la *Seriola dumerilli* (Papandroulakis *et al.*, 2005; Jerez *et al.*, 2006) u otras especies de las que se desconoce su biología en profundidad como el bocinegro, (Roo *et al.*,2009).

# 6. Conclusiones

## 6. Conclusiones

1. Las experiencias de captura y aclimatación de ejemplares de medregal negro demuestran que es una especie resistente, que se aclimata con facilidad a las condiciones de cultivo. El crecimiento en la fase sub-adulta de los ejemplares capturados fue elevado llegando a sobrepasar los 2kg por año, lo que facilita la obtención de nuevos reproductores y da una idea del potencial de crecimiento de la especie.
2. La talla mínima de madurez en cautividad en Canarias para los machos se sitúa en un rango de pesos de 2,3 a 4,4 kg. Por el contrario en el caso de las hembras, esta no se alcanza hasta que superan los 5 Kg de peso. Tras tres años de cultivo no se han obtenido puestas naturales de la especie, en las condiciones descritas, por lo que es necesario seguir optimizando las condiciones de cultivo.
3. La época de puesta en Canarias, en condiciones de cultivo, parece estar situada entre los meses de junio a octubre y una temperatura del agua en ascenso con una media de 23° C.
4. La biopsia gonadal y la referencia de diámetro mínimo de oocito de  $>500 \mu\text{m}$  es un método adecuado para determinar el estado de madurez necesario para la inducción hormonal de esta especie. La inducción hormonal con una dosis de GnRHa  $20\mu\text{kg}^{-1}$  tuvo como resultado la obtención de puestas con un porcentaje elevado de huevos viables.
5. Los diferentes parámetros de calidad de puesta evaluados muestran una elevada calidad de las mismas, tanto en el porcentaje de fecundación que fue superior 90% y una elevada tasa de eclosión superior al 79%.
6. La obtención de mas de 2 millones de huevos de medregal negro, ha permitido la realización de los primeros estudios de desarrollo embrionario, ontogenia de las larvas y primeras experiencias de cría de esta especie en Europa.

7. Las larvas recién eclosionadas tenían una longitud total de  $2,54 \pm 0,01$ mm y un saco vitelino de  $1,29 \pm 0,07$ mm en su lado mas largo. La alimentación exógena efectiva dió comienzo a las 72 HPE con la apertura de la boca y del ano y la formación de las aletas pectorales. El 100% de las larvas presentan vejiga natatoria desde el tercer día de vida.
8. El saco vitelino y la gota lipídica se reabsorben totalmente al 5° día (120 HPE). La flexión de la notocorda da comienzo el día 15 DPE con una talla media de  $15,14 \pm 1,24$  mm. A los 30 DPE el juvenil ya tiene la pigmentacion característica de los juveniles de esta especie mostrando las bandas de coloración transversales y un peso medio de  $61,95 \pm 15,55$  mg.
9. Existe un primer período crítico de mortalidad entre los días 7-11 que se asocia al periodo de transición de fin de las reservas endógenas e inicio de alimentacion exógena. La mortalidad paulatina desde día 12 en adelante se asocia a la necesidad de optimización de los protocolos de cría, abarcando desde cambios de condiciones de cultivo generales como, aireación, iluminación, renovación de agua hasta el desarrollo de flora bacteriana en los tanques o el conocimiento de los requerimientos nutritivos de la especie entre otros.
10. La elevada sensibilidad al manejo de las larvas a partir del día 20 de cultivo, se confirma con la aparición de síndrome de shock tras la captura y una mortalidad del 100% de las larvas tras el test de actividad. El uso de aceite de clavo como anestésico se muestra como una medida efectiva para reducir la mortalidad por manejo a los 30 DPE.
11. Los síntomas observados parecen indicar deficiencias nutricionales, en particular de ácidos grasos esenciales, como el DHA con el uso de productos comerciales como el DHA Protein Selco en la etapa de alimentación con rotífero. En el caso del enriquecedor experimental, a pesar de tener un elevado contenido en DHA, la baja supervivencia obtenida puede estar influída por altos niveles de DPA encontrados, éste es un ácido graso poco común en los vertebrados que puede llegar a sustituir al DHA por su similitud química y disminuir las funciones cerebrales.

12. El pobre enriquecimiento de la *Artemia* en ácidos grasos esenciales como el DHA indica la necesidad de optimizar su enriquecimiento o el desarrollo de productos que permitan aumentar los niveles de AGE de acuerdo a los requerimientos de la especie.
13. La baja capacidad que tienen las larvas de seriola para digerir la *Artemia*, dificulta la asimilación de los nutrientes aportados en el enriquecimiento y estaría relacionado con el bajo nivel de lípidos alcanzado en las larvas de 30 DPE.
14. El uso de una etapa más prolongada de alimentación con rotíferos o el comienzo de un destete más temprano podrían servir como medidas paliativas a la baja capacidad de digestión de la *Artemia*.
15. Independientemente del tipo de enriquecedor empleado se confirma que el uso de sistema mesocosmos o condiciones de cultivo semi-intensivas mejoran la supervivencia y crecimiento de las larvas de medregal negro. El uso de unas condiciones de cultivo más naturales, como las que se dan en los sistemas mesocosmos, sirve como modelo para establecer las necesidades de las nuevas especies a cultivar.

# 7. Referencias

## 7. Referencias.

- Adron, J.W., Blair, A. y Cowey, C. B. 1974. Rearing of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae to metamorphosis using an artificial diet. *Fishery Bulletin* 72, 353- 357.
- Agulleiro, M. J., Anguis, V.J., Cañavate, P., Martínez-Rodríguez, G., Mylonas, C. y Cerda, J. 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sale (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 257, 511-524.
- Akiyama, T., Murai, T. y Nose, T. 1986. Role of tryptophan metabolites in inhibition of spinal deformity of Chum salmon fry caused by tryptophan deficiency. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52, 1255–1259.
- AOAC., 1995. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemist. U.S.A., 1018 pp.
- APROMAR 2008. La acuicultura marina de peces en España. Informe Apromar, 71pp.
- Arabaci, M., Diler, I. y Sari, M. 2004. Induction and synchronisation of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 237, 475–484.
- Avilés – Quevedo, A. y Castelló- Orvay, F. 2004. Manual para el cultivo del jurel. Sagarpa/inp, Mejico. 47p.
- Barbaro, A., Francescon, A., Bozzato, G., Merlin, A., Belvedere, P. y Colombo, L. 1997. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by a long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture* 197, 349-359.
- Barbaro A., Francescon, A., Bertotto, D., Bozzato, G., Di María, I., Patarnello, P., Furlan, F. y Colombo, L. 2002. More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonist in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture *J. Appl. Ichthyol.* 18, 192-199.
- Barclay, W. y Zeller, S. 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J. World Aqua. Soc.* 27, 3.
- Bartley, D. M. 1993. An application of international codes of practice on introductions of aquatic organisms: assessment of a project on the use of Chinese carps in Mozambique. FAO Fisheries Circular. 863. Rome. 21p.
- Bartley, D. M. 1998. Notes on biosafety and aquatic ecosystems. FAO Aquaculture Newsletter 19, 23-25.

- Basurco, B. y Abellan, E. 1999. Marine finfish species diversification: Current situations and prospects in Mediterranean Aquaculture. *Options Méditerranéées*, 24: 9-139.
- Battaglione, S. C. y Cobcroft, J. M. 2007. Advances in the culture of striped trumpeter larvae: A review. *Aquaculture* 268, 195-208.
- Bell, J.G., Tocher, D.R. y Sargent, J.R. 1994. Effect of supplementation with 20:3(n-6), 20:4 (n-6) and 20:5(n-3) on the production of prostaglandins E and F of the 1-, 2- and 3- series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1211, 335-342.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M. y Sargent, J.R.. 1995a. Effect of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostglandin production in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 139-151.
- Bell, M.V., Batty, R.S., Dick, J.R., Fretwell, K., Navarro, J.C. y Sargent, J.R. 1995b. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring *Clupea harengus L.* *Lipids* 30, 443-449.
- Ben Khemis, I., Zouiten, D., Besbes, R. y Kamoun, F. 2006. Larval rearing and weaning of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) in mesocosm with semi-extensive technology. *Aquaculture* 259, 190-201.
- Benetti, D.D. 1997. Spawning and larval husbandry of flounder (*Paralichthys woolmani*) and Pacific yellowtail (*Seriola mazatlana*), new candidate species for aquaculture. *Aquaculture* 155, 307-318.
- Benetti, D., Acosta, C., y Ayala, J. C., 1995. Cage and pond aquaculture of marine finish in Ecuador. *World Aquaculture* 26(4): 7-13.
- Benetti D., Garriques, D., y Wilson, E. E., 1998. Maturation, spawning and larval rearing techniques of Pacific yellowtail, *Seriola mazatlana*. *Suisanzoshoku* 46(3): 391-394.
- Bertotto, D., Barbaro, J., Francescon, A., Richard, J., Libertini, A. y Barbaro, A. 2006. Induced spawning in common sole (*Solea solea L.*). *Aquaculture Research* 37, 423-427.
- Bessonart, M., Izquierdo, M. S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C. M., Gonzalez, M. M. y Fernandez-Palacios, H. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) larvae. *Aquaculture* 179, 265-275.
- Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish. *Reprod. Nutr. Dev.* 26, 877-920.
- Billard, R. 1989. Endocrinology and fish culture. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 49-58.

- Blacio, E. 2002. CENAIM. Boletín informativo nº71.
- Blacio, E., Darquea, J. y Rodriguez, S. 2001. Avances en el cultivo de Huayaipe, *Seriola rivoliana* (Valenciennes 1833) en las instalaciones del CENAIM. *El Mundo Acuicola* Vol 9 (1), 23-24.
- Borrero, C.E. 2008. Primeras experiencias de cultivo larvario de la corvina (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) en Canarias. Tesis de Máster. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España, pp. 66-68.
- Bromage, N.R. y Roberts, R.J. 1995. Broodstock management and egg and larval quality. *Aquaculture* 141 (1-2): 140-142.
- 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.
- Büke, E., Akpınar, Z., Ayekin, B. y Dereli, H. 2005. Spawning performance and larval rearing of red porgy (*Pagrus pagrus* L., 1758) under culture conditions. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 22 (3-4), 303-309.
- Cahu, C.L, Zambonino Infante, J.L. y Barbosa, V. 2003. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Br. J. Nutr.* 90, 21–28.
- Campbell. P.M., Pottinger, T.G. y Sumpter, J.P. 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol. Reprod.* 47:1140-1150.
- Camus, P. y Koutsikopoulos, C. 1984. Incubation experimentale et developpement embryonnaire de la daurade royale, *Sparus aurata* (L.), a diferentes temperatures. *Aquaculture*, 42: 117-28.
- Cárdenas, S., Duncan, N., Fernández-Palacios, H., Pastor, E., Rodríguez-Rúa, A., Estévez, A., Schuchardt, D. y Grau, A. 2009. Larvicultura en el Plan Nacional de Cría de Corvina *Argyrosomus regius* (PLANACOR) de JACUMAR. *Foro Ac. Rec. Mar. Rias Gal.* 11, 497-504.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Oyen, F., Cerda, J., Navas, J.M. y Ramos, J. 2000. Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstock fitness. En Basurco, B. (Ed.), *Cahiers Options Mediterranennes, vol.47*. Mediterranean Marine Aquaculture Finfish Species Diversification. CIHEAM, Zaragoza, Spain, p 61-74.
- Chang, Q., Liang, M. Q., Wang, J. L., Chen, S. Q., Zhang, X. M. y Liu, X D. 2006. Influence of larval co-feeding with live and inert diets on weaning the tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture Nutrition* 12, 135-139.

- Chatain, B. y Ounais-Guschemann, N., 1990. Improved rate of initial swim bladder inflation in intensively reared *Sparus aurata*. *Aquaculture* 84, 345–353.
- Ciechomski, J.D. y Weiss, G. 1973. Desove y desarrollo embrionario y larval del besugo *Pagrus pagrus* en el mar Argentino. *Phycis*, 132: 481-487.
- Conceição, L., Cabrita, E., Engrola, S., Lacuisse, M., Pousão-Ferreira, P. y Dinis, M.T. 2008. Hormonal induction of Atlantic dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) broodstock. *Cybium* 32(2) suppl, 324-325.
- Coutteau, P. 1996. Micro-Algae. En: Lavens, P. y Sorgeloos, P. (Eds.). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361. Roma. 295 pp.
- Cruz, W., Grau, A., Pastor, E., Crespo, S. y Sala, R. 2007. Desarrollo ontogénico de lalarva de corvina (*Argynosomus regius*): estudio preliminar. Libro de actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura, 735.
- CTSA. 2008. [www.ctsa.org](http://www.ctsa.org)
- Curnow, J., King, J., Bosmans, J. y Kolkovski, S. 2006. The effect of reduced *Artemia* and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae. *Aquaculture* 257, 204-213
- De la Gándara, F. y García-Gómez, A. 2004. Reproduction of *Seriola dumerili* in captivity: experiences and related problems. In: Advances in biotechnologies applied to the reproduction of captive fish. University of Bari. 26-27.
- Delbare, P., Dhert, P. y Lavens, P. 1996. Zooplankton. En: Lavens, P. y Sorgeloos, P. (Eds.). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361. Roma. 295 pp.
- Dhert, P., Divanach, P., Kentouri, M. y Sorgeloos, P. 1998. Rearing techniques of difficult marine fish larvae. *World Aquaculture* 29, 48-55.
- Divanach P. 1985. Contribution de la Biologie et de l'Élevage de 6 Sparidés Méditerranéens: *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus annularis*, *Lithognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo* (Poissons Téléosteens). Thèse d'Etat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc. 479pp.
- Divanach, P. y Kentouri, M. 2000. Hatchery techniques for specific diversification in Mediterranean finfish larviculture. In: Basurco, B. (Ed.). Recent Advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. Proceedings of the TECAM Seminar, May 1999, Zaragoza, Spain. Cahiers Option Méditerranéennes 47, 75–87

- Divanach, P., Boglione, C., Menu, B., Koumoundouros, G., Kentouri, M. y Cataudella, S. 1996. Abnormalities in finfish mariculture: and overview of the problem, causes and solutions. In: Chatain, B., Saroglia, M., Sweetan, J. and Lavens, P. (Eds.), Sea bass and Sea bream culture: Problems and Prospects. Oostende, Belgium. Eur. Aqu. Soc. 45, 6
- Divanach, P., Papandroulakis, N. y Kentouri, M. 1998. Bases techniques de l'élevage larvaire de la daurade (*Sparus aurata*). In: Bennetau-Pelissero, C. (Ed). Avances Recentes en Reproduction et Elevage Larvaire des Especies Acuacoles. Contributions Presented at Atelier Professional ENITA-IFREMER, 7-8 October.1998, Bordeaux, France
- Divanach, P., Kentouri, M., Koumoundouros, G. y Pitta, P. 2002. Manual de producción de alevines de peces marinos con tecnología Mesocosmos. Proyecto Interactt. Departamento de biología de la Universidad de Creta, Departamento de acuicultura del Instituto de Biología Marina de Creta. Ed., March. 2002. Creta,Grecia.
- Duncan, N.J., Estevez, A. y Mylonas, C.C. 2007. Efecto de la inducción hormonal mediante implante o inyección de GnRHa en cantidad y calidad de puestas de corvina (*Argyrosomus regius*). Libro de actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. 731-732.
- Dutton, P. 1992. Effects of experience on feeding success by larval white seabass *Atractoscion nobilis*. *Journal of Fish Biology* 41, 765-773.
- Eldho, N.V., Feller, S.E., Tristram-Nagle, S., Polozov, I.V. y Awrisch, K. 2003. Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acids differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6409-6421.
- Ezzat, A., Ramadan, A. y Hafez, S. 1982. Embryonic and larval development of *Sparus aurata*. *Vie Mar*, 4: 59-66.
- Faranda, F., Cavaliere, A., Lo Paro, G., Manganaro, A. y Mazzola, A. 1985. Preliminary studies on reproduction of *Puntazzo puntazzo* under controlled conditions. *Aquaculture*, 49: 111-123.
- FAO. 2008. <http://www.fao.org>
- Faulk, C. K. y Holt, G. J. 2005. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. *Aquaculture* 249, 231-243.
- Faulk, C. K., Kaiser, J. B. y Holt, G. J. 2007. Growth and survival of larval and juvenile cobia *Rachycentron canadum* in a recirculating raceway system. *Aquaculture* 270, 149-157.

- FEAP.2010. <http://www.feap.info/production/species/>
- Fernández-Díaz, C., Pascual, E. y Yúfera, M. 1994. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed on inerte and live food. *Marine Biology* 118, 323-328
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Valencia, A, Salhi, M. y Vergara, J.M. 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., Schuchardt, D., Roo, J., Borrero, C., Hernández-Cruz, C.M. y Socorro, J. 2007. Estudio morfométrico de la corvina (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) durante el primer mes de vida. Libro de actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. 755-756
- Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Roo, J., Robaina, L., Hernández-Cruz, C.M. y Duncan, N. 2009. Eficacia de la inducción hormonal con distintas dosis de GnRHa en reproductores de corvina (*Argyrosomus regius*) y su efecto sobre la puesta. Libro de Actas del XII Congreso Nacional de Acuicultura 556 -557
- Firat, K., Saka, F. y Süzer, C.2005. Gonadal oocyte development in LhRHa hormone treated European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) broodstock. *Turk. J. Anim. Sci.*, 29:83-87.
- FIS: <http://fis.com/fis/marketprices/2005>.
- Fletcher, R. C., Roy, W., Davie, A., Taylor, J., Robertson, D. y Migaud, H. 2007. Evaluation of new microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Implications on larval performances and tank hygiene. *Aquaculture* 263, 35-51.
- Folch, J., Lees, M. y Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fornies, M.A., Mañanos, E., Carrillo, M., Rocha, A., Laureau, S., Mylonas, C.C., Zohar, Y. y Zanuy, S. 2001.Spawning induction of individualized European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 202 (3-4), 221-234.
- Froese, R y Pauly, D., 2010. Editors. Fish Base. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)
- Fukuhara, O. 1985. Functional morphology and behaviour of early life stages of red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51(5): 731-743.

- Ganga, R., Tort, L., Acerete, L., Montero, D. e Izquierdo, M.S. 2006. Modulation of ACTH induced cortisol release by polyunsaturated fatty acids in interrenal cells from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *J. Endocrinol.* 190, 39–45.
- Garber, A. F., Fordham, S. E., Symonds, J. E., Trippel, E.A. y Berlinsky, D. L. 2009. Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 296 (1-2),179-183.
- García, A., Díaz, M.V. y Agulleiro, B. 2001. Inducción hormonal de la puesta y desarrollo embrionario de la seriola Mediterránea (*Seriola dumerilii*, Risso). *Monogr. Inst. Canr. Cienc. Mar.* 4, 561– 566.
- Garcia, A. S., Parrish, C. C. y Brown, J. A. 2008. Growth and lípido composition of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae in response to differently enriched *Artemia franciscana*. *Fish Physiology and Biochemistry.* 34:77-94.
- Gasparini, J.L. y Floeter S.R. 2001. The shore fishes of Trindade Island, western South Atlantic. *J. Nat. Hist.* 35:1639-1656.
- Getesoupe, F.J. y Le Milinaire, C. 1985. Adaptation de la qualité alimentaire des filtreurs proiesaux besoins nutretifs des larves de poissons marins. *Coll. Fr-japon. Océanogr. Marseille* 8, p 51-73
- Geurden, I., Coutteau, P., y Sorgeloos, P. 1997. Effect of a dietary phospholipid supplementation on growth and fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and turbot (*Scophthalmus maximus* L.) juveniles from weaning onwards. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 259–272.
- Glamuzina, B., Jug-Dujakovic, J. y Katavic, I. 1989. Preliminary studies on reproduction and larval rearing of common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus 1758). *Aquaculture* 77: 75-84.
- Govoni, J. J., Boehlert, G.W. y Watanabe Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, 16, 1-3.
- Guzmán, J.M., Ramos J., Mylonas, C. y Mañanós E. L. 2009. Spawning performance and plasma levels of GnRH $\alpha$  and sex steroids in culturedfemale Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRH $\alpha$ -delivery systems. *Aquaculture* 291, 200-209
- Hamasaki, K., Tsuruoka, K., Teruya, K., Hashimoto, H., Hamada, K., Hotta, T. y Mushiake, K. 2008. Feeding habits of hatchery-reared larvae of greater amberjack *Seriola dumerili*. *Fisheries Science.* 74, 1096–1108.
- Hamre, K., Moren, M., Solbakken, J., Opstad, I. y Pittman, K. 2005. The impact of nutrition on metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture.* 250, 555–565.

- Hernandez-Cruz, C. M., Salhi, M., Bessonart, M., Izquierdo, M. S., Gonzalez, M. M. y Fernandez-Palacios, H. 1999. Rearing techniques for red porgy (*Pagrus pagrus*) during larval development. *Aquaculture* 179, 489-497.
- Houde, E. D. y Schekter, R. C. 1980. Feeding by marine fish larvae: developmental and functional responses. *Environmental Biology of Fishes* 5, 315- 334.
- Hrboticky, N., MacKinnon, M.J. e Innis, S.M. 1991. Retina fatty acid composition of piglets fed from birth with a linoleic acid-rich vegetable-oil formula for infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 483–490.
- Hung, L. T., Tuan, N. A., Cacot, P. y Lazard, J. 2002. Larval rearing of the Asian Catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time. *Aquaculture* 212, 115-127.
- Ishizaki, Y., Masuda, R., Uematsu, K., Shimizu, K., Arimoto, M. y Takeuchi, T. 2001. The effect of dietary docosahecaenoic acid on schooling behaviour and brain development in larval yellowtail. *Journal of Fish Biology.* 58, 1691 – 1703.
- Iwamatsu, T. 1994. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, 11: 825-39
- Izquierdo, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition.* 2, 183- 191.
- Izquierdo, M.S. 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cah. Options Mediterr.* 63, 91–102.
- Izquierdo, M., y Fernández-Palacios, H. 1997. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cahiers Options Mediterranee* 22, 243–264.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L. y Hernández-Cruz, C.M. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97–107.
- JACUMAR, 2008. <http://www.mapa.es>
- Jerez, S., Samper, M., Santamaría, F J., Villamandos, J.E., Cejas, J.R. y Felipe, B.C. 2006. Natural spawning of greater amberjack (*Seriola dumerili*) kept in captivity in the Canary Islands. *Aquaculture* 252, 199-207.
- Jiménez, M.T., Rodríguez de la Rúa, A., Sánchez, R. y Cárdenas, S. 2006. Atlas de desarrollo de la corvina *Argyrosomus regius* (Pisces : Sciaenidae) durante su primer mes de vida. *Redvet.* Vol VIII, 1.
- Jover, M., García-Gómez, A., Tomás, A., De la Gándara, F. y Pérez L. 1999. Growth of Mediterranean yellowtail *Seriola dumerilii* fed extruded diets containing different levels of protein and lipid. *Aquaculture* 179:25–33

- Kaiser, J.B. y Holt, J. 2005. SRAC publication nº 7202
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Sumida, S. y Iwashita, T. 1982. Rearing of larval red sea bream and ayu with artificial diets. *Memoirs of Faculty of Fisheries, Kagoshima University* 31, 183-192.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Kobayashi, T., Takae, M., Iwashita, T. y Uehara, R. 1983. Necessity of dietary phospholipids for growth of the larval ayu. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 32, 115–120.
- Knox, D., Bromage, N.R., Cowey, C.B. y Springate, J.R.C. 1988. The effect of broodstock ration size on the composition of Rainbow trout eggs (*Salmo Gairdneri*). *Aquaculture* 69, 93–104.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.Wm., Sklan, D., Friezlander, O. y Harel, M. 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 91, p 131-141.
- Lazzari, A., 1991. Some notes to the aquaculture development of the new Mediterranean species: the yellowtail (*Seriola dumerilii*) case and strategy to come, Special Publication No. 14. In: De Pauw, N., Joyce, J. (Eds.), *Aquaculture and the Environment. European Aquaculture Society*, Dublin, pp. 183– 184.
- Lazzari, A., Fusari, A., Boglione, A., Marino, G. y Di Francesco, M. 2000. Recent advances in reproductional and rearing aspects of *Seriola dumerilii*. In: Basurco B (ed) *Cahiers options Mediterraneeennes*, vol 47. Mediterranean marine aquaculture finfish species diversification. CIHEAM, Zaragoza, pp 241– 247
- Lidley, C.,W., Shields, R., J. y Ostrowski, A. O. 2004. Progress in amberjack culture at the Oceanic Institute in Hawaii. *Glob. Aqua. Advoc.* 7(1): 42-43.
- Lieske, E. y Myers R. 1994 *Collins Pocket Guide. Coral reef fishes. Indo-Pacific & Caribbean including the Red Sea. Haper Collins Publishers*, 400 p.
- Makino, N., Uchiyama, M., Iwanami, S., Tohyama, T. y Tanaka, M. 1999. Developmental changes in multiple oil globules of Japanese sea bass eggs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 65 (2): 268-277.
- MAPA. 2007. <http://www.marm.es>
- Margulies, D., Suter, J.M., Hunt, S.L., Olson, R.J., Scholey, V.P., Wexler, J.B. y Nakazawa, A. 2007. Apawning and early development of captive yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Fish Bull.* 105: 249-265.
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M.G., Zohar, Y. y Mylonas C.C. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH $\alpha$  implant. *Aquaculture* 219, 841-858.

- Masuma, S., Kanematu, M. y K. Teruya, K. 1990. Embryonic and morphological development of larvae and juveniles of the amberjack, *Seriola dumerilii* (in Japanese with a summary in English). *Japanese Journal of Ichthyology*, Vol. 37, No. 2: 164-169.
- Mateos, A. V. 2007. Una nueva especie para la acuicultura marina, la corvina, (*Argyrosomus regius*). En: Cerviño A., Guerra A. y Pérez C. (Eds.), Actas XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo, España. 519-522.
- Mazorra de Quero, C., Shields, R.J., Scott, A.P., Mylonas, C.C., Zohar, Y. y Bromage, N., 2000. Effects of GnRH $\alpha$  implants on female Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* spawning performance. In: Flos, R., Creswell, L. (Compilers), Aqua 2000, Responsible Aquaculture in the new Millennium, European Aquaculture Society, Special Publication 28, 454.
- Mazzola, A., Favalaro, E. y Sara' G., 2000. Cultivation of the Mediterranean amberjack, *Seriola dumerili* (Riso, 1810), in submerged cages in the Western Mediterranean Sea. *Aquaculture* 181:257-268.
- Mihelakakis, A., Yoshimatsu, T. y Tsoikas, C. 2001. Spawning in captivity and early life history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, 199: 333-352.
- Moran, D., Smith, C. K., Gara, B. y Poortenaar C. W. 2007. Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish. (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). *Aquaculture*. 262: 95-104.
- Mugnier, C., Guennoc, M., Lebegue, E., Fostier, A. y Breton, B. 2000. Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pellet. *Aquaculture* 181 (3-4), 241-255.
- Mushiake, K., Kawano, K., Kobayashi, T., y Yamasaki, T. 1998. Advanced spawning in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, by manipulations of photoperiod and water temperature. *Fish. Sci.* 64, 727-731.
- Mylonas, C., Georgiou, G., Stephanou, D., Atack, T., Afonso, A. y Zohar, Y. 2000. Preliminary data on the reproductive biology and hatchery production of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in Cyprus. *Cahiers Options Méditerranéennes* 47, 303-312.
- Mylonas C.C., Sigelaki, I., Divanach, P., Mañanos, E., Zanuy, S. y Afonso- Polyviou, A. 2003. Multiple spawning of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after repeated injections of GnRH $\alpha$ , and evaluation of egg quality. *Aquaculture* 221, 605-620.

- Mylonas, C., Papandroulakis, N., Smboukis, A., Papadaki, M. y Divanach, P. 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRH $\alpha$  implants. *Aquaculture* 237:141–154.
- Mylonas, C., Bridges, C., Gordin, H., Belmonte, A., Garcia, A., De La Gándara F., Fauvel, C., Suquet, M., Medina-Guerrero, A., Papadaki, M., Heinisch, G., De Metrio, G., Vasallo-Agius, R., Guzmán, J.M., Mañanos-Sánchez, E. y Zohar Y. 2007. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH $\alpha$ ) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science* 15, 183-210.
- Nakada, M. 1999. Yellowtail and related species culture. In: Stickney RR (ed) *Encyclopedia of aquaculture*. John Wiley and Sons, New York, pp 1007–1036
- Nanton, D. A. y Castell, J. D. 1998. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe sp.*, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture* 163, 251-261.
- Nash, C.E., 1995. *Aquaculture sector planning and management*. Oxford, Blackwell, Fishing News Books. 310 p.
- Ottolengui, F., Silvestri, C., Giordano, P., Lovatelli, A. y New, M.B. 2004. Capture-based aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. Rome, FAO. 308pp
- Ozkizilcik, S. y Chu, F. L. E. 1996. Preparation and characterization of a complete microencapsulated diet for striped bass *Morone saxatilis* larvae. *Journal of Microencapsulation* 3, 331-343.
- Palazzi, R., Richard, J., Bozzato, G. y Zanella, L. 2006. Larval and juvenile rearing of common sole (*Solea solea* L.) in the Northern Adriatic (Italy). *Aquaculture* 255, 495-506
- Papandroulakis, N., Kentouri, M., Maingot, E. y Divanach, P. 2004. Mesocosm. A reliable technology for larval rearing. Application *Diplodus puntazzo* and *Diplodus sargus*. *Aquaculture International* 4, 1–11
- Papandroulakis, N., Mylonas, C. C., Maingot, E. y Divanach, P. 2005. First results of greater amberjack (*Seriola dumerili*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture* 250, 155-161.
- Parrish, C.C., Whiticar, M. y Puvanendran, V. 2007. Is w6 docosapentaenoic acid and essential fatty acid during early ontogeny in marine fauna. *Limnol.Oceanogr.* 52 (1), 476–479.

- Pastor, E., Grau, A., Riera, F., Pou, S., Massuti, E. y Grau, A.M. 2000. Experiences in the culture of new species in the 'Estacion de Acuicultura' of the Balearic Government (1980–1998). In: Basurco B (ed) Cahiers options Mediterraneennes, vol 47. Mediterranean marine aquaculture finfish species diversification. CIHEAM, Zaragoza, pp 371–379
- Patiño, R. 1997. Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *Prog. Fish-Cult.* 59,118–128.
- Payne, M. F., Ripplingale, R. J. y Cleary, J. J. 2001. Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture* 194, 137-150.
- Peter, R.E., Lin, H.R., Van Der Kraak, L.G. y Little, M. 1993. Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. *Recent Advances in Aquaculture* 4, 25-30.
- Peter, R.E. y Yu, K.L. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 7, 173-197.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. y Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103–115.
- Rodriguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Mora, J., Lorenzo, A. y Fernández-Palacios, H., 1993. Essential fatty acid requirements for larval gilthead sea bream (*S.aurata*). *Aquacult. Fish. Manage.* 24, 295-304.
- Rodriguez, C., Pérez, J.A., Lorenzo, A., Izquierdo, M.S. y Cejas, J. 1994. N-3 HUFA requirement of larval gilthead seabream *S. aurata* when using high levels of eicosapentaenoic acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107 A. 693-698.
- Roo, F.J., 2009. Improvements in the production technology of red porgy (*Pagrus pagrus*) larvae and fry: importance of rearing conditions and diet nutritional value on their quality. Tesis doctoral de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria España. P.160.
- Roo, F.J., Izquierdo, M.S. Socorro, J.A., y Caballero, M.J. 2001. Caracterización histológica del desarrollo del sistema visual en larvas de dorada *Sparus aurata* (Linnaeus 1758). Series monografías del ICCM 4, 403-411.
- Roo, F.J., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J.A., Fernández-Palacios, H., Montero, D. e Izquierdo, M.S. 2009. Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 287, 84–93.
- Roo, F.J., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J.A., Fernández-Palacios, H. e Izquierdo, M.S. 2010. Advances in rearing techniques of *Pagrus pagrus*, (Linnaeus, 1758):

- comparison between intensive and semi-intensive larval rearing Systems. *Aquaculture Research*. 41 ,3, 433 – 449.
- Rosenlund, G., Stoss, J. y Talbot, C. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155, 183-191.
- Saele, O., Solbakken, J.S., Watanabe, K., Hamre, K. y Pittman, K. 2003. The effect of diet on ossification and eye migration in Atlantic Halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 220, 683–696.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M. y y Fernández-Palacios, H.1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 124, p 275-282.
- Santos R.S., Porteiro F.M. y Barreiros, J.P. 1997. -Marine fishes of the Azores: An annotated checklist and bibliography. Arquipélago. *Life Mar. Sci.*, Suppl. 1: 1-231.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A. y Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 119–129.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. y Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229
- Seoka, M., Kurata, M. y Kumai, H. 2007. Effect of docosahexaenoic acid enrichment in *Artemia* on growth of pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* larvae. *Aquaculture* 270, 193-199.
- Schipp, G. R., Bosmans, J. M. P. y Marshall, A. J. 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture* 174, 81-88.
- Shen, H., Howles, P. y Tso, P. 2001. From interaction of lipidic vehicles with intestinal epithelial cell membranes to the formation and secretion of chylomicrons. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50, 103-125.
- Shields, R.J. 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture* 200, 55–88
- Socorro, J. 2006. Estudio comparado del desarrollo embrionario y larvario del bocinero (*Pagrus pagrus*) y de la sama de pluma (*Dentex gibbosus*). Tesis doctoral Universidad de Las Palmas de Gran Canaria España. 256pp.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of the brine shimp *Artemia* in aquaculture. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. y Jaspers, E. (Eds.). The brine shimp *Artemia* ecology, culturing, use in aquaculture. Universal press. pp 25-46.
- Stepien, W. P. 1976. Feeding of laboratory-reared larvae of the sea bream *Archosargus rhomboidalis* (Sparidae). *Marine Biology* 38, 1-16.

- Støttrup J. G. y Norsker, N. H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155, 231-247.
- Tachihara K, Ebisu R. y Tukashima, Y. 1993. Spawning, eggs, larvae and juveniles of the purplish amberjack *Seriola dumerilii*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 59:1479–1488
- Van der Meeren, T. y Naas, K.E., 1997. Development of rearing techniques using large enclosed ecosystems in the mass production of marine fish fry. *Rev. Fish. Sci.* 5, 367–390
- Vasallo-Agius, R., Imaizumi. H., Watanabe, T., Yamazaki, T., Satoh, S. y Kiron, V. 2001. The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fisheries Science*, 67, 260-270.
- Vazirzadeh, A., Hajimoradloo, A., Hamid R. E. y Akhlaghi, M. 2008. Effects of emulsified versus saline administration of GnRHa on induction of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 280 (1-4), 267-269.
- Verakunpiriya, V., Mushiake, F., Kawano, K. y Watanabe, T. 1997. Supplemental effect of Astaxanthin in broodstock diets on the quality of yellowtail eggs. *Fidheries Science*. 63(5) 816-823.
- Versichelle, D., Léger, P., Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1989. L'utilisation d'artémia. En: Barnabé, G. (Ed.). *Aquaculture. technique et documentation*, Lavoisier, Paris. pp 241-259.
- Vikingstad, E., Andersson, E., Norberg, B., Mayer, I., Klenke, U., Zohar, Y., Stefansson, S.O. y Taranger, G.L. 2008 The combined effects of temperature and GnRHa treatment on the final stages of sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) females. *Fish Physiol Biochem*. 34(3), 289-98.
- Walford, J., Lim, T. M. y Lam, T. J. 1991. Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of seabass (*Lates calcarifer*) larvae: do the larvae ingest and digest protein-membrane microcapsules?. *Aquaculture* 92, 225-235.
- Watanabe, T., Kitajita, C. y Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture* 34, 115-143.
- Yamamoto, T., Teruya, K., Hara, T., Hokazono, H., Hashimoto, H., Suzuki, N., Iwashita, Y., Matsunari, H., Fuguita, H., y Mushiake, K. 2008. Nutritional evaluation of live food organisms and commercial dry feeds used for seed production of amberjack *Seriola dumerili*. *fisheries science*, 74, 1096–1108.
- Yúfera, M. y Darias, M. J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268, 53-63.

- Zohar, Y. 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations. In: Zohar, Y., Breton, B. (Eds.), *Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. INRA Press, París, pp. 47-62.
- Zohar, Y. 1989a. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. In: Shilo, M., Sarig, s. (Eds.), *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, pp. 65-119.
- Zohar, Y. 1989b. Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction growth, and smoltification. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 395-405.
- Zohar, Y. y Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.