

MASTER UNIVERSITARIO INTERNACIONAL EN CULTIVOS MARINOS

Las Palmas de Gran Canaria, España

2012

CARACTERIZACIÓN Y MODULACIÓN DEL COLOR EN EL CABALLITO
DE MAR (*Hippocampus hippocampus*)

ÁNGEL SEGADE BOTELLA

CARACTERIZACIÓN Y MODULACIÓN DEL COLOR EN EL CABALLITO DE MAR (*HIPPOCAMPUS HIPPOCAMPUS*)

Trabajo realizado en el Instituto Canario de Ciencias Marinas de Las Palmas de Gran Canaria, España, bajo la dirección de las Dr./Dra. Lucía Molina Domínguez y Lidia Robaina Robaina

Y presentando como requisito parcial para la obtención del Título de Máster Universitario Internacional en Cultivos Marinos, otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos del Mediterráneo de Zaragoza (CIHEAM).

Directora, Codirectora y Autor, -ora:

Fdo: D^a Fdo: D^a Fdo: D

Telde, a de, de 2012



Agradecimientos

Debo expresar mis más sentidos agradecimientos a todas aquellas personas que han confiado en mí en todo momento y han mostrado su apoyo. En primer lugar agradecer a mi directora de tesina, que me apoyara al realizar los trámites pertinentes para poder formar parte de este grupo de investigación, así como de toda la ayuda y paciencia prestada por su parte a la hora de realizar este experimento y redactar el presente documento.

Al GIA y al ICCM, por aceptarme en su grupo de investigación y prestarme sus instalaciones para realizar estos experimentos.

A mi compañero, mentor y reciente Doctor Francisco Otero Ferrer, por su apoyo y transmisión de conocimientos.

A unas personas (Yaiza y Ana) que siempre han ayudado en las labores de mantenimiento y cuidado de las instalaciones, que sin ellas todo el trabajo realizado hubiese sido mucho más duro.

A mis compañeros de máster, por los buenos y no tan buenos momentos que hemos pasado juntos, pero especialmente a mi compañero Bruno, por ayudarme en el laboratorio. Al senior Jonathan por poner un punto de alegría en nuestro pequeño grupo. Pero agradecer especialmente a mi gran compañero y amigo Antonio por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos y el apoyo mostrado en todo momento.

A Josefa García Romero (Fefi) por la transmisión de conocimientos en diferentes campos y por la ayuda prestada, ya que sin ella parte del trabajo no hubiese podido ser realizado.

A Lidia Robaina, mi codirectora y una gran cabeza pensante, que con su ayuda y dedicación ha sido posible obtener los resultados aquí presentados.

Principalmente agradecer a esas personas que están cerca de mí aunque sea en la distancia, que siempre me han apoyado, ayudado y escuchado cuando ha sido necesario, mis padres, mis dos hermanas y a mi amor que ha sido capaz de aguantarme en estos meses.

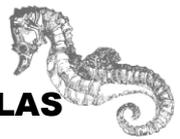
ÍNDICE

1.-Introducción	1
1.1.- Comercio mundial de organismos acuáticos ornamentales.....	1
1.2.- Impacto de de las pesquerías ornamentales.....	3
1.3.- Comercio de Singnátidos y su impacto en el medio.....	6
1.4.-Taxonomía y distribución de los Singnátidos	9
1.5.- Características generales de la subfamilia <i>Hippocampinae</i>	9
1.5.1.- Status y conservación de <i>Hippocampus hippocampus</i>	11
1.6.- La acuicultura de especies ornamentales.....	12
1.6.1.- Alimentación de peces ornamentales	14
1.6.2.- Importancia del color en peces ornamentales.....	16
1.7.- El cultivo del caballito de mar.....	21
1.7.1.- Alimentación del caballito de mar en cautividad.....	22
1.7.2.- El color del caballito de mar en cautividad.....	24
1.8- Objetivos.....	26
2.- Material y métodos.....	27
2.1.- Instalaciones.....	27
2.2.- Caballitos.....	28
2.3.- Preparación de las dietas.....	29
2.4.- Diseño experimental y muestreos.....	30
2.5.- Análisis bioquímicos.....	34
2.6.- Histología	37
2.7.- Análisis estadístico.....	38
3.- Resultados.....	39
4.- Discusión.....	48
5.- Conclusiones.....	55
6.- Bibliografía.....	57



Lista de figuras

Figura 1. Exportaciones (arriba) e importaciones (abajo) por continente	2
Figura 2. Técnicas de pesca destructivas: pesca con dinamita (izquierda) y pesca con cianuro (derecha).....	4
Figura 3. Caballitos secos comercializados como medicina tradicional o souvenir.....	6
Figura 4. Distribución geográfica de los caballitos de mar.....	9
Figura 5. Caballitos mimetizándose con el entorno.	10
Figura 6. Morfología del caballito de mar (<i>Hippocampus hippocampus</i>).....	12
Figura 7. Precios de dos caballitos de la misma especie pero de distinto color.....	17
Figura 8. Imágenes del pez payaso Picasso (<i>Amphiprion percula</i>) de ORA® Farm (izquierda), el <i>fire red</i> (centro) y <i>sunburst</i> ® (derecha) y <i>mustangs</i> (<i>Hippocampus erectus</i>) de Ocean Rider.....	17
Figura 9. Momentos clave en la evolución del comercio y la acuicultura del caballito de mar de 1960 a 2009.....	21
Figura 10. Instalación general, detalle de un acuario y del sistema de filtración.....	27
Figura 11. Caballito marcado con VIFE color verde, emitiendo fluorescencia.	28
Figura 12. Esquema general de las medidas tomadas.....	32
Figura 13. Medidas tomadas en los muestreos: A , cola; B , cuerpo; C , cuerpo'; D , cabeza; y E , hocico.	33
Figura 14. Medición del color mediante un colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japan)	33
Figura 15. Relación entre el % de lípidos del caballito de mar y su peso.....	41
Figura 16. Contenido en carotenoides ($\mu\text{g/g}$) totales en las dietas (negro) y los caballitos (gris).....	44
Figura 17. Variación de los valores medios a^* (rojo) y b^* (amarillo) a lo largo del tiempo en los caballitos alimentados con <i>Artemia</i> viva enriquecida (LEA). Fin del experimento principal (flecha negra), acumulación máxima alcanzada (flecha azul) y fin de experimento (flecha verde).	45
Figura 18. Imagen (4x, barra = 500 μm) del intestino medio con una <i>Artemia</i> entera (izquierda) y detalle (10x, barra = 200 μm) donde se observa el ojo, los toracópodos y una de las antenas de la <i>Artemia</i> (derecha). (Tinción H&E). A, <i>Artemia</i> ; O, Ojo de la <i>Artemia</i> ; T, Toracópodos.	46
Figura 19. Hígados de los caballitos al final del experimento: a) Dieta LEA (<i>Artemia</i> viva enriquecida. x10, barra = 200 μm y x40, barra = 50 μm) muestra gran cantidad de vacuolas lipídicas; b) Dieta FEA (<i>Artemia</i> enriquecida congelada. x10 y x40) muestra células hepáticas (H) englobando el páncreas (P) y gran cantidad de vacuolas lipídicas; c) Dieta M (<i>Mysis</i> congelados. x10 y x 40), muestra un hígado con gran cantidad de hepatocitos con el núcleo en el centro. (Tinción: H&E).	47



Lista de tablas

Tabla I. Principales países comercializadores de caballitos de mar.	8
Tabla II. Artículos publicados sobre peces ornamentales referidos al color.	20
Tabla III. Empresas que cultivan caballitos de mar y especies producidas.	22
Tabla IV. Artículos publicados sobre aspectos de biología y acuicultura de los caballitos de mar.	25
Tabla V. Dietas y las siglas que las representan.	30
Tabla VI. Comportamiento alimentario.	31
Tabla VII. Parámetros de crecimiento de los caballitos (media \pm desviación típica) al inicio y al final del experimento.	39
Tabla VIII. Composición bioquímica (% peso húmedo, media \pm desviación típica) y contenido de carotenoides totales ($\mu\text{g g}^{-1}$) de las cinco dietas experimentales, $p < 0.05$	40
Tabla IX. Composición bioquímica (% de peso húmedo, media \pm desviación típica) de los caballitos de mar alimentados con las diferentes dietas experimentales, $p < 0.05$	40
Tabla X. Composición de ácidos grasos (% del total) de las dietas y los caballitos.	42
Tabla XI. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) de los principales ácidos grasos (% del total \pm desviación típica) y sus relaciones en la composición del cuerpo entero en caballitos de mar alimentados con diferentes dietas, $p < 0.05$	43
Tabla XII. Parámetros ópticos de color (a, b, L, Hue y Chroma) y contenido en carotenoides totales ($\mu\text{g g}^{-1}$) en los caballitos de mar al inicio y final del experimento.	44



Resumen

Los caballitos de mar son especies protegidas debido a la progresiva regresión de las poblaciones naturales, sobre todo por la sobreexplotación que sufren por su uso habitual como producto seco en la Medicina Tradicional China. Además, existe un gran interés de estos peces como organismos de acuario. El color de los caballitos está poco estudiado, pero se conoce que es capaz de cambiar de coloración para mimetizarse con su entorno, por otro lado, el color es el principal factor que marca el precio de mercado. Se han realizado diversas experiencias de cultivo, con varias especies de caballito de mar, entre ellas la que es objeto de este trabajo *Hippocampus hippocampus*, pero se desconoce el efecto de las dietas sobre su coloración y bienestar. En el presente trabajo se estudió durante 102 días el efecto de cinco dietas a base de *Artemia* y misidáceos, con diferentes enriquecimientos (Selco® y Cyclop-eeze®), sobre el crecimiento, supervivencia y color de caballitos de mar subadultos, así como sus efectos a nivel histológico. A continuación se seleccionó la dieta de *Artemia* viva para evaluar la evolución del color hasta su máximo y posterior reversión, en su caso.

Al final del experimento no se observaron diferencias en crecimiento ni composición a excepción de los lípidos, que resultaron mayores en las dietas basadas en *Artemia*. Por otra parte, las tinciones histológicas realizadas con hematoxilina y eosina (H&E) en los hígados de los caballitos alimentados con las dos dietas a base de *Artemia* mostraron abundantes vacuolas lipídicas a diferencia de los alimentados con misidáceos. Respecto al color, se observó una mayor deposición del amarillo independientemente de la naturaleza de la dieta, reflejándose el contenido de carotenoides de la dieta en los animales. Además, alcanzaron un máximo de expresión del color tras 180 días. A partir de este momento se observó una reversión del color tras el cambio de dieta los caballitos, mostrando periodos de adaptación de 30 días tras el cambio de dieta.



1.-Introducción

1.1-Comercio mundial de organismos acuáticos ornamentales

El origen de la acuariofilia es muy antiguo y va ligado al de la acuicultura. En la antigua China cultivaban carpas para consumo en los mismos bancales de cultivo de arroz. En estos cultivos aparecieron peces coloreados que se seleccionaron por su colorido para mantenerlos en estanques y jardines. Entre los años 960 y 1279 se popularizó el mantenimiento de estos peces en recipientes cerámicos. Pero no fue hasta 1750 que se introdujeron en Europa los primeros peces de colores y hasta el siglo XX que se intentase la reproducción de especies tropicales.

Actualmente, la acuariofilia es una afición cada vez más extendida por todo el mundo y que cada día crece más, del mismo modo aumenta la demanda de nuevos y mejores productos por parte de los acuariófilos. Debido a su antigüedad, la acuariofilia de agua dulce está mucho más extendida y desarrollada que la marina, pero de todos modos en ambos casos han desarrollado un gran incremento en el comercio de organismos de acuario. Este comercio involucra a millones de personas de todo el mundo, proporcionando puestos de trabajo en diferentes sectores, y moviendo millones de dólares.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, Food and Agriculture Organisation of United Nations) el comercio internacional de peces de acuario representa sólo un 0.5% del comercio internacional de peces (FAO, 2007). A pesar del escaso volumen, si nos referimos al valor, este porcentaje aumentaría debido a que el comercio de organismos ornamentales se realiza de forma unitaria incluyendo especies que un solo ejemplar de unos 30g podría triplicar el precio de un kilo de pescado para el consumo. Según la FAO (2010) el porcentaje del valor de este mercado



con respecto al de consumo aún está por calcular. Además, este mercado ha aumentado progresivamente pasando de 21.5 millones de dólares en 1976 a 315 millones de dólares en 2007 (Monticini, 2010). Aunque tras más de 30 años de incremento en la demanda de peces ornamentales, la crisis que comenzó en 2008 golpeó duramente al sector, disminuyendo el volumen de las exportaciones y las ferias internacionales se vieron afectadas por la bajada participación de empresas (Monticini, 2010). Los mayores exportadores de peces ornamentales son los países situados en el sureste asiático (51% de las exportaciones mundiales), en particular Singapur con un 20% del total. Europa cuenta con un 29%, Norteamérica un 4% y Suramérica un 6 % (Figura 1). Mientras que los mayores importadores son Estados Unidos, Japón y algunos países de la Unión Europea como Alemania, Holanda e Italia (Figura 1).

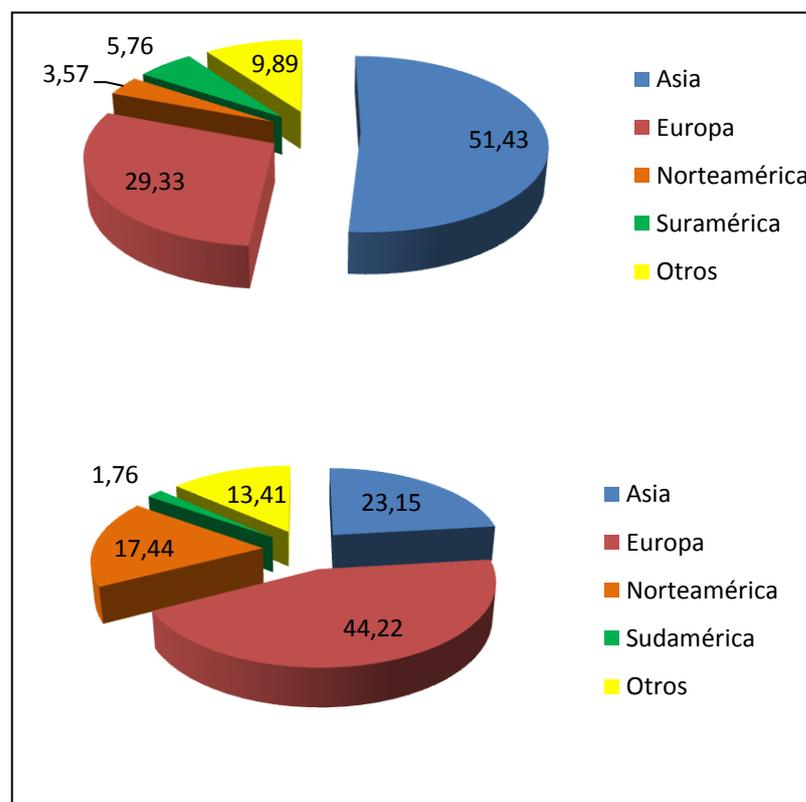


Figura 1. Exportaciones (arriba) e importaciones (abajo) por continente en 2007 (modificado de Monticini, 2010).



La mayoría de peces ornamentales marinos son capturados del medio, se estima que sólo entre un 1-10% son criados en cautividad (Wabnitz *et al.*, 2003), mientras que en el caso de los peces de agua dulce más de un 95% de las especies son criadas en cautividad.

Los datos existentes y referentes al comercio de peces ornamentales deben ser analizados cuidadosamente debido a sus diferentes orígenes, a la identificación errónea de especies o falta de información de importación/exportación. A pesar de estas limitaciones los datos existentes son la única forma de realizar estudios de las tendencias del mercado de peces ornamentales (Molina y Segade, en revisión)

1.2.- Impacto de las pesquerías ornamentales

El hecho de que más del 90% de los organismos ornamentales marinos que se comercializan sean capturados del medio natural, hace plantearse el efecto que puede tener esta industria en el medio ambiente. La mayoría de los organismos comercializados provienen de arrecifes de coral y zonas adyacentes, donde habitan y se reproducen. Según Wilkinson (2004) el 20% de los arrecifes de coral del planeta han sido destruidos y no muestran signos de recuperación. Debemos tener en cuenta que los arrecifes de coral cubren únicamente un 0.25% de la superficie de los océanos, pero son conocidos como “las selvas de los mares” (Spalding *et al.* 2001) debido a su biodiversidad, albergando más de 4000 especies de peces, unas 800 especies de coral (Paulay, 1997) y un gran número de invertebrados y esponjas.

Las amenazas a las que se enfrentan estos ecosistemas son muy diversas, como los desastres naturales, el calentamiento global, el turismo, la recogida de materiales para construcción, la sobrepesca para alimentación, de organismos ornamentales o para joyería, souvenir o medicina tradicional china, entre otras (Liebermann y Field, 2001). Quizás de todas ellas podemos destacar la utilización de técnicas de pesca destructivas,



como dinamita y productos químicos como cianuro sódico o quinaldina (Figura 2). Los explosivos se usan tanto para pesquerías de consumo como de ornamentales, aunque los químicos son utilizados demasiado frecuentemente para capturar especies ornamentales (Molina y Segade, 2011). Estas técnicas no solo ocasionan daños a las poblaciones de las especies objetivo, sino que también lo hacen con las demás especies y en el hábitat que les rodea, provocando la rotura y muerte de los corales. Específicamente el cianuro contribuye al proceso de blanqueamiento (“bleaching”) de los corales (Jones *et al.*, 1999) y crustáceos, provocando la destrucción grandes áreas de arrecife (Mak *et al.*, 2005).

Es difícil estimar el uso de estas técnicas debido a su naturaleza clandestina, en la mayoría de los países están prohibidas, aunque es evidente que deben hacerse más esfuerzos en los países exportadores para promocionar políticas de control, establecer cuotas de pesca basadas en criterios científicos y mejorar las prácticas de manejo, para controlar el uso de estas técnicas que provocan daños en los habitantes de los arrecifes.



Figura 2. Técnicas de pesca destructivas: pesca con dinamita (izquierda) y pesca con cianuro (derecha)

Fuente: Internet (<http://www.tacticalfanboy.com>; <http://envirohonper7.wikispaces.com>)

Por otro lado, el ecosistema puede verse afectado por la pesca extremadamente selectiva, focalizada en unas pocas especies, lo que puede dar lugar a desequilibrios. Por ejemplo, en Hawaii, uno de los lugares con más pesquerías de ornamentales, toda la captura se focaliza en el género *Centropyge*, endémico de las islas, y la especie *Zebbrasoma flavescens* (Molina y Segade, 2011).



Además, en ciertos casos la pesca es selectiva por sexo o edad (Wabnitz *et al.*, 2003). En muchas especies los ejemplares más jóvenes son más coloridos y más atractivos para el consumidor, como es el caso de las especies de la familia *Pomacanthidae*. En otras especies, como lábridos y góbidos, los machos suelen ser más coloridos que las hembras. Esta pesquería tan selectiva puede causar grandes desequilibrios poblacionales a nivel local, aunque no llegue a trascender a escala global.

Otro posible efecto negativo en los ecosistemas es la sobrepesca de especies limpiadoras como ciertas especies de góbidos (*Gobiosoma spp.*) y lábridos (*Labroides spp.*), que pueden afectar a las especies con la que se establecen relaciones de simbiosis. Además, estos organismos tienen un papel importante en la salud del arrecife, eliminando parásitos y partículas de mucus o tejidos muertos en otros organismos. Por ejemplo, desde Sri Lanka se exportan anualmente más de 20 000 lábridos limpiadores (Woods and Rajasuriya, 1999), realmente se desconoce el impacto de su pesca en el arrecife.

Es difícil estimar globalmente los daños ocasionados por la extracción de organismos ornamentales. Algunas veces, especialmente las partes implicadas en el comercio, abogan por el escaso efecto global de estas prácticas en las poblaciones de los arrecifes, sin embargo, sus repercusiones deben ser valoradas a nivel local más que a nivel global y focalizándose en las especies objetivo. Por ejemplo, en el archipiélago Revillagigedo (México), se ha constatado que la población de *Holacanthus clarionensis* disminuyó un 95% debido a su sobreexplotación (Almenara-Roldan y Ketchum, 1994). Serían necesarios estudios concretos focalizados en las especies que se extraen en una zona determinada para evaluar el efecto de su explotación.



1.3.- Comercio de singnátidos y su impacto en el medio

El comercio de singnátidos, especialmente de caballitos de mar en el planeta, alcanza volúmenes importantes, con Asia como el principal comercializador (Vincent *et al.*, 2011). Los países involucrados en el comercio exportan sobretodo caballitos secos a Asia para su uso en la medicina tradicional. Los individuos vivos son importados principalmente por los países europeos y los Estados Unidos de América para los acuarios. El mayor consumidor mundial de caballitos de mar es China que los utiliza como medicina tradicional y alimento tónico (Figura 3), pero en el resto del mundo también son comercializados como souvenir (secos) (Figura 3) o vivos para acuarios.



Figura 3. Caballitos secos comercializados como medicina tradicional o souvenir. Fuente: Internet

(<http://www.eckerd.edu>; ; <http://www.smallworldbeauty.com>)

En la Tabla I se resumen los principales países comercializadores (excluyendo a China) y la forma de comercio del producto ya sea vivo o seco. Aún sabiendo que el principal consumidor de caballitos de mar es China no existen datos reales acerca del volumen total de importaciones de este país. Pero algunos estudios realizados advirtieron que en 2001 Japón importó desde países africanos 242 kg de caballitos secos con un valor de 23 552 dólares americanos. Por otra parte, Estados Unidos importó 622 619 caballitos de mar secos entre los años 1996-2000, principalmente provenientes de Filipinas, China y México. En Europa se importaron un total de 39 928 caballitos de mar vivos entre los años 1997-1999 (Vincent *et al.*, 2011).



Todo este comercio se centra en solo 15 especies, en concreto *Hippocampus abdominalis*, *H. barbouri*, *H. borboniensis*, *H. camelopardalis*, *H. comes*, *H. erectus*, *H. fuscus*, *H. histrix*, *H. ingens*, *H. kelloggi*, *H. kuda*, *H. reidi*, *H. spinosissimus*, *H. subelongatus* y *H. zosterae* de las 48 que se han descrito en este género.

La principal amenaza para las poblaciones naturales de caballitos es la sobrepesca ya sea accidental (“bycatch”) o como especie objetivo, mediante artes de pesca de arrastre principalmente para su comercialización como producto seco para el mercado asiático. En 1995 en Asia se comercializaron 45 toneladas de caballitos secos. Sin embargo, en determinadas zonas de India, Filipinas y Vietnam (Vincent, 1995), los pescadores obtienen entre el 80 y el 100% de sus beneficios por la pesca de caballitos vivos para su exportación a los mercados europeos y estadounidenses. En los últimos años, aunque se ha aumentado el esfuerzo pesquero las capturas han seguido disminuyendo, estimándose una disminución entre un 15% y un 50% de las poblaciones naturales en las principales zonas de extracción en los últimos cinco años (Vincent *et al.*, 2011). Aun teniendo estos datos en cuenta, no se conoce el impacto global que puede tener la disminución de las poblaciones de caballitos de mar en el ecosistema, sin embargo, es evidente que constituye una grave amenaza para la biodiversidad.

Tabla I. Principales países comercializadores de caballitos de mar (modificado de Vincent *et al.*, 2011)

Región	País	Comercializado seco		comercializado vivo	
		Origen	Consumidor	Origen	Consumidor
África	Egipto			X	
	Gambia	X			
	Guinea	X			
	Kenia			X	
	Madagascar	X			
	Mozambique	X		X	
	Nigeria	X			
	Senegal	X			
	Seychelles	X			
	R. Sudafricana	X	X		X
	Tanzania	X	X		
Togo	X				
América del Norte	Canadá		X	x ³	X
	México	X	X	X	X
	USA	X	X	X	X
Centro América	Belice	X	x ¹	X	
	Costa Rica		x ¹	X	X
	Cuba			X	
	Guatemala	X	x ¹		
	Honduras	X	x ¹		
	Nicaragua	X	X		x ²
	Panamá		X		x ¹
América del Sur	Argentina		x ¹		X
	Bolivia		X		
	Brasil	X	x ¹		X
	Chile		X		
	Ecuador	X	X ¹	x ²	
	Perú	X	x ¹		
	Surinam	X			
	Uruguay				X
Europa	Venezuela	X			
	Austria				X
	Bélgica				X
	Dinamarca				X
	Francia				X
	Alemania		X		X
	Grecia		x ¹		
	Hungría				X
	Irlanda				X
	Italia		X		X
	Holanda		X		X
	Noruega				X
	Portugal		x ¹		X
	España	X	X		X
	Suecia				X
	Suiza				X
	Reino Unido		X	x ³	X
Oceanía	Australia	X	X	X	X
	Nueva Zelanda	X	X	X	X
	Islas Fiji			X	
	Islas Salomón			X	

¹ Comercio local principalmente. ² Tras la recogida de información la comercialización no se llevo a cabo. ³ Cría en cautividad (Modificado de Vincent *et al.*, 2011).



1.4.-Taxonomía y distribución de singnátidos

Los miembros de la familia *Syngnathidae* pertenecen a la clase Actinopterygii, al igual que el resto de peces óseos. El término *Syngnathidae* proviene del griego y significa de mandíbulas fusionadas. Este grupo engloba un total aproximado de 296 especies. A esta misma familia pertenecen los peces pipa, los dragones de mar y los caballitos de mar. Todos los caballitos forman parte del género *Hippocampus*, término compuesto de las palabras griegas *hippos* (caballo) y *campus* (monstruo marino). La mayoría de los integrantes de esta familia son marinos o de aguas salobres aunque con alguna excepción, como es el caso de algunos peces pipa. Se distribuyen en los océanos Atlántico, Pacífico e Indico y la mayoría en las aguas templadas y tropicales.

1.5.-Características generales de la subfamilia *Hippocampinae*

El número total de especies de caballito de mar no está del todo claro, debido a sus variaciones morfológicas dentro de una misma especie dependiendo del hábitat, geografía, etc... pero en la actualidad se reconocen 48 especies diferentes (Vincent *et al.*, 2011). Todas las especies de caballito de mar son especies marinas (aunque pueden encontrarse en estuarios de aguas salobres) y viven generalmente en aguas poco profundas de zonas templadas y cálidas de todo el planeta (Figura 4).

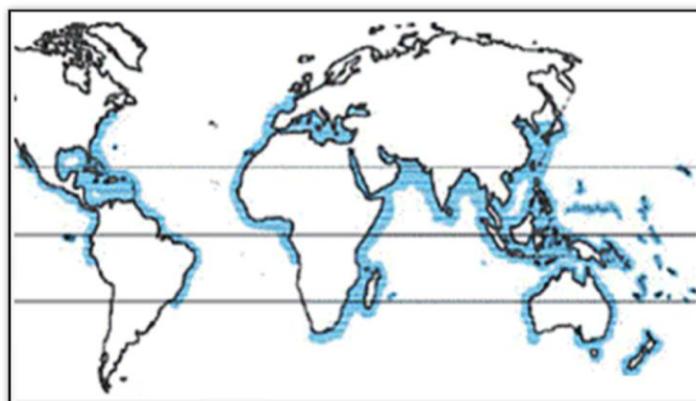


Figura 4. Distribución geográfica de los caballitos de mar (modificado de Lourie *et al.*, 1999)



No se conoce exactamente la esperanza de vida de las poblaciones naturales de caballitos de mar, la mayoría de datos existentes provienen de experiencias en laboratorios o acuarios. Al parecer, la supervivencia varía entre el año para las especies más pequeñas, hasta los 5 ó 6 años para las especies más grandes (Foster y Vincent, 2004; Curtis y Vincent, 2006).

Se trata de especies que basan su supervivencia en el camuflaje, tratando de mimetizarse con su entorno, pudiendo cambiar de color o generar apéndices cutáneos (Foster y Vincent, 2004) (Figura 5). Tiene pocos predadores naturales, aunque se han encontrado caballitos de mar en el estómago de peces como el atún o el dorado, sus principales predadores podrían ser sepias y cangrejos. La mayor amenaza para el caballito es el ser humano, ya que viven en aguas poco profundas por lo que la actividad antropogénica les afecta directamente.



Figura 5. Caballitos mimetizándose con el entorno. Fuente: Internet (<http://www.uicnmed.org>; <http://www.blueworldfotos.com/>)

La principal característica que los diferencia del resto de peces es su cabeza situada en ángulo recto con el cuerpo. Tienen el cuerpo comprimido lateralmente y carecen de escamas, pero poseen un esqueleto formado por placas óseas formando anillos alrededor del cuerpo y recubierto por una fina capa de epitelio. Estos anillos son útiles para realizar la diferenciación entre especies. Carecen de aleta caudal y ventral, y las dorsales son pequeñas y con forma de abanico. Sus ojos se mueven independientemente uno del otro y



no tienen estómago ni dientes, por lo que para alimentarse succionan a sus presas a través de un hocico tubular. Existe un claro dimorfismo sexual (Figura 6), y posiblemente sea la característica que más define a estos peces, puesto que el macho posee un tejido en forma de bolsa en el vientre, en el cual incuban la puesta. Durante la reproducción los progenitores producen los gametos, pero al contrario de la mayoría de seres vivos es el macho quién incuba los huevos que la hembra le introduce en la bolsa incubadora, tras un cortejo que ha sido descrito (Anónimo, 1999). En el interior de la bolsa paterna los huevos eclosionarán, aunque las larvas no saldrán hasta absorber totalmente el saco vitelino. Es esta característica de la reproducción, además de su aspecto, lo que los hace tan llamativos para los acuarios.

1.5.1.-Biología y estatus del caballito de mar de hocico corto (*Hippocampus hippocampus*)

La especie que se va a estudiar es el *H. hippocampus*, esta especie posee las características generales descritas en el apartado anterior para el resto de miembros de su familia, además se distribuye desde el Sur del Reino Unido hasta las aguas noroccidentales del continente africano, estando presente en las costas de las Islas Canarias. Se trata de una especie morfológicamente muy similar a *H. guttulatus* (Figura 6), que se alimenta principalmente de pequeños crustáceos como misidáceos, anfípodos y copépodos (Kitsos *et al.*, 2008). Al igual que la mayoría de sus parientes es una especie sedentaria que habita en aguas poco profundas con fondos arenosos o rocosos y con abundancia de algas (Whitehead, 1986), características que la hacen especialmente vulnerable debido a la proximidad de factores antropogénicos que afectan a su entorno.

Esta especie está catalogada en la categoría de “Datos Insuficientes” (“Data Deficient”) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (International Union for



Conservation of Nature, IUCN) debido principalmente a la falta de datos sobre las tendencias de las poblaciones naturales, además hay una carencia de información acerca de las áreas ocupadas por esta especie y no existen análisis cuantitativos que evalúen la probabilidad de extinción de la especie. Está considerada como especie de “Interés para los ecosistemas canarios” en el Catalogo Canario de Especies Protegidas (Gobierno de las Islas Canarias, Ley 4/2010, de 4 de Junio). Como todos los integrantes de de la subfamilia *Hippocampinae* está incluida en el Apéndice II de CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), un acuerdo internacional entre gobiernos que asegura que el comercio de flora y fauna silvestres no amenace su existencia.

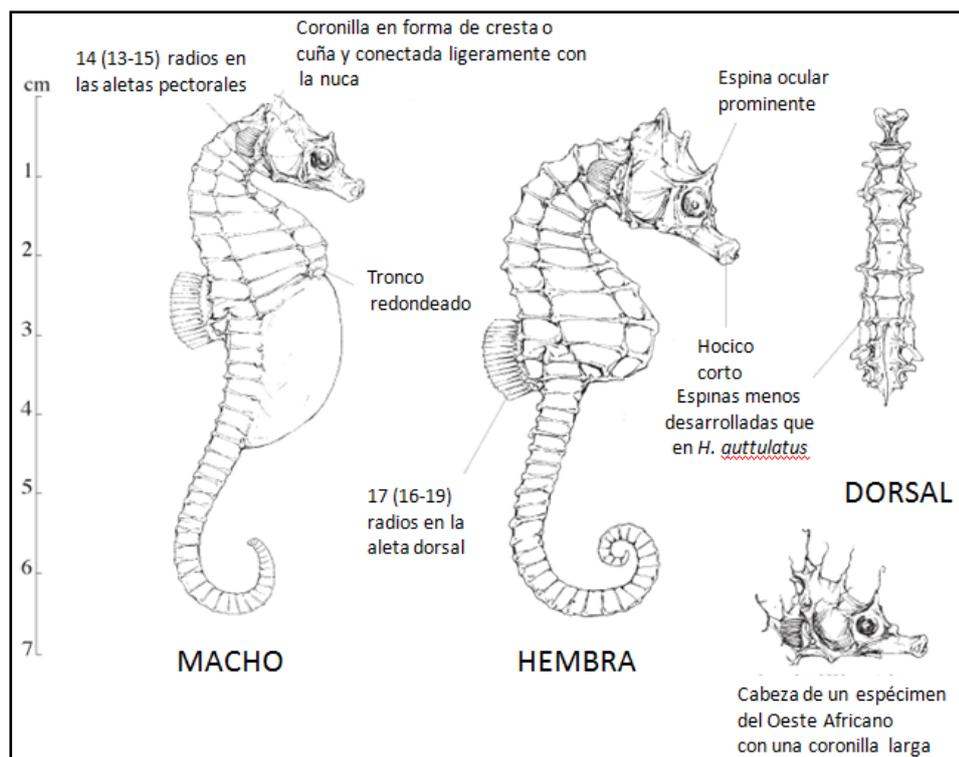


Figura 6. Morfología del caballito de mar (*Hippocampus hippocampus*) (adaptado de Lourie *et al.*, 2004)

1.6.-La acuicultura de especies ornamentales

La alta demanda de organismos ornamentales marinos y la preocupación creciente por la conservación del medio ambiente con una normativa cada vez más restrictiva para su



captura, han llevado a distintos organismos e instituciones a promover la acuicultura de estas especies como una de las posibles soluciones para abastecer el mercado. Además el desarrollo de la acuicultura de ornamentales proporcionar nuevos conocimientos acerca del comportamiento y la biología de muchas especies. Todos estos conocimientos resultan de interés para los estudios de ecología y pueden colaborar en la mejora de la gestión de las poblaciones naturales e incluso apoyar acciones de repoblación o reforzamiento de poblaciones con los ejemplares obtenidos en cautividad.

En los últimos años se han realizado muchos avances en las técnicas de cultivo, especialmente en la mejora de la alimentación que permitirán cultivar mayor cantidad de especies (Tlusty, 2002). Actualmente sólo un 1% de las especies ornamentales marinas comercializadas son producidas en cautividad (FAO, 2007). Uno de los elementos más importantes para la producción en cautividad de estas especies está ligado a su tipo de reproducción. La mayoría de especies producidas en cautividad a nivel comercial con fines ornamentales, son ponedores demersales o incubadores bucales, con pequeñas cantidades de huevos grandes que dan lugar a larvas bien desarrolladas (Molina y Segade, 2011), y por lo tanto, más fáciles de alimentar en condiciones de cultivo, pero se están realizando avances científicos con alguna especie de huevos pelágicos (como por ejemplo, *Z. flavescens*). El cultivo larvario, y en particular su alimentación, es el principal cuello de botella que dificulta la producción acuícola comercial de las especies ornamentales.

Está muy relacionado con el tamaño de las larvas en el momento de la eclosión y la talla y calidad nutritiva del alimento que se les proporciona. Las presas utilizadas tradicionalmente en acuicultura (rotíferos, *Brachionus plicatilis* y nauplios de *Artemia spp.*), en algunos casos no resultan adecuados por diferentes motivos, ya sea por su gran tamaño, que no permita a las larvas recién eclosionadas alimentarse, o por el estrecho abanico de opciones puede provocar desequilibrios nutricionales (Izquierdo, 1996). Otras



presas vivas han sido probadas en diferentes especies, como los copépodos, los misidáceos y otros organismos planctónicos capturados del medio o cultivados (Herrera *et al.*, 2009).

El principal motivo que dificulta el cultivo larvario de nuevas especies es el desconocimiento de los requerimientos nutricionales y la dificultad para realizar la primera alimentación de manera adecuada (Ogawa y Brown, 2001; Otero-Ferrer *et al.*, 2010). Por todo ello, está pendiente la optimización de los protocolos de larvicultura de especies marinas, especialmente para la producción a escala comercial, es importante producir organismos que puedan competir económicamente con especímenes capturados directamente del medio (Calado *et al.*, 2005; Olivotto *et al.*, 2006).

Por otra parte, algunas compañías han empezado a comercializar peces ornamentales de engorde, es decir, son capturados como post-larvas del medio natural y llevados hasta el tamaño comercial en cautividad (Dufour *et al.* 1999). Este sistema se basa en el principio que la mayoría de peces de arrecife tienen una fase larvaria pelágica en su ciclo de vida, y que posteriormente retornan al arrecife. Durante el asentamiento, un 95 % de las post-larvas perecen por causas naturales, por lo que recolectar un pequeño porcentaje de estas post-larvas supone un nuevo recurso marino y una nueva vía para el desarrollo de nuevas técnicas sostenibles de acuicultura, ya sea para el comercio o la repoblación.

Definitivamente se debe trabajar más en este campo para seguir mejorando las técnicas de cultivo y la alimentación en fases críticas, como es el caso del periodo larvario.

1.6.1.- Alimentación de especies ornamentales

En la última década debido al incremento de la demanda se han realizado algunos estudios para mejorar la producción de organismos ornamentales marinos, pero tanto los acuaristas como los acuariófilos demandan alimentos de calidad para sus peces y en realidad, poco se conoce acerca de los requerimientos nutricionales de la mayoría de peces



ornamentales, y de los efectos fisiológicos adversos que se pueden derivar de la carencia o exceso de algún nutriente en la dieta. Estos desequilibrios nutricionales pueden provocar inmunodepresión y convertir a los ejemplares en más proclives a sufrir patologías de otro tipo. Por ejemplo, la carencia de aminoácidos, ácidos grasos, sales minerales esenciales o vitaminas pueden provocar diversos efectos como por ejemplo, escoliosis, lordosis, afecciones branquiales, etc,... (Tacon, 1995). Del mismo modo, se ha observado en múltiples estudios en peces de consumo que un exceso de grasas en las dietas puede provocar anomalías hepáticas (Caballero *et al.*, 2004).

En los últimos años se han realizado algunos experimentos utilizando diferentes ingredientes para la formulación de dietas específicas para organismos ornamentales (James y Sampath, 2004; Vasudhevan *et al.*, 2009; Ezhil *et al.*, 2008;). Aun así la información existente no tiene comparación con la existente para los peces objeto de la acuicultura para consumo humano (Fraser y Davies, 2009), se han realizado muchos avances en la nutrición para peces de consumo y todos estos conocimientos podrían ser extrapolados a los peces ornamentales. Sin embargo, en algunas especies, principalmente de agua dulce (*Xiphophorus helleri*, *Pterophyllum scalare*, *Paracheirodon innesi* o *Dascyllus aruanus*) se han realizado experimentos muy concretos para evaluar el efecto de algún nutriente sobre determinados factores, como crecimiento, supervivencia larvaria y mejora del color. Haciendo un recorrido por las referencias bibliográficas hay pocos estudios realizados en especies de agua salada, uno de ellos es el llevado a cabo por Vijayagopal *et al.* (2008) en el que probaban diferentes dietas formuladas con distintos niveles de proteínas para determinar el óptimo para el crecimiento de la damisela (*Dascyllus aruanus*), determinando que entre un 36 y un 47 % era el óptimo para esta especie. Otros estudios para especies de agua dulce como el de Sealey *et al.* (2009) con el tetra neón (*Paracheirodon innesi*) probó diferentes fuentes y niveles de proteína de origen



marino y vegetal terrestre determinando que para ambas fuentes los niveles óptimos eran de 45 y 55% de proteína, pero la de origen marino resultaba mejor que la vegetal. Por otro lado, algún estudio se ha realizado haciendo referencia a otro tipo de nutrientes, el caso del estudio realizado por Langroudi *et al.* (2009) concluyó que el enriquecimiento de la *Artemia* con EPA (Ácido eicosapentaenoico) y DHA (Ácido docosahexaenoico) aumenta la puesta del escalar o pez ángel (*Pterophyllum scalare*) y además, la adición de vitamina C en forma de ascorbil-palmitato aumentaba aún más la supervivencia larvaria.

Debido a la falta de información general acerca de la nutrición de peces de acuario los acuariófilos más experimentados aún prefieren confiar en comidas caseras que intentan suplir todos los requerimientos de los peces o potenciar una cualidad determinada (color, crecimiento, reproducción...).

Del mismo modo, en acuarios públicos las dietas de los peces no solo se basan en dietas secas formuladas sino que usualmente se aporta una cantidad de alimento fresco. Esto implica que no existe una confianza por parte de los consumidores finales de los productos existentes en el mercado. Es evidente que la investigación relativa a la nutrición en ornamentales está todavía por desarrollar.

1.6.2.- Importancia del color en especies ornamentales

El color es un factor muy importante en la acuicultura, en lo referente al color en la acuicultura de consumo, aporta una sensación de alimento saludable, por lo que su aceptación en el mercado aumenta. El color en los peces de acuario está directamente relacionado con la aceptación y su precio (Wabnitz *et al.* 2003) (Figura 7). El color de un pez puede estar controlado por la genética (Shi *et al.*, 2010; Gomelsky *et al.*, 1996; David *et al.*, 2004) y por la alimentación (Wallat *et al.*, 2005, Kop y Durmaz, 2008). Haciendo referencia a estos dos factores, los productores de peces ornamentales intentan conseguir



mediante el cruce de peces de diferente fenotipo, nuevas variedades de color para encontrar nuevos nichos de mercado y satisfacer a los compradores más exigentes, como por ejemplo el pez payaso Picasso (*Amphiprion percula*) de ORA® Farm o el fire red o sunburst® mustangs (*Hippocampus erectus*) de Ocean Rider (Figura 8). Del mismo modo se comercializan alimentos o aditivos con pigmentos específicos que potencien determinados colores de los peces, como por ejemplo los pellets Discus Excel Color de Aquatic Nature® o el polvo de Cyclop eeze®. Existen algunos estudios referentes al color de los peces ornamentales y diferentes ingredientes como fuentes de pigmentos (carotenoides), pero casi exclusivamente en especies de agua dulce (Tabla II) (Ezhil *et al.* 2008; Kop y Durmaz 2008; Yasir y Qin 2009a).



Figura 7. Precios de dos caballitos de la misma especie pero de distinto color. Fuente: Internet (www.tiendadecaballitos.es)



Figura 8. Imágenes del pez payaso Picasso (*Amphiprion percula*) de ORA® Farm (izquierda), el fire red (centro) y sunburst® (derecha) mustangs (*Hippocampus erectus*) de Ocean Rider. (Fuente: www.orafarm.com y www.seahorse.com)



Observando las referencias de la Tabla II, los estudios realizados en los últimos años van por el mismo camino, la búsqueda de fuentes de pigmentos para peces ornamentales: algunos utilizan pigmentos sintéticos como el lucantin pink (astaxantina) o pigmentos purificados (cantaxantina o β -caroteno) y otros harinas de origen vegetal como la harina de pétalo de caléndula, la harina de cúrcuma o el polvo de *Porphyridium cruentum* (microalga roja). También se ha observado que efecto puede tener la intensidad lumínica sobre la coloración de los peces así como el efecto del tanque sobre el mismo.

En todos los estudios se pone de relieve la necesidad de unas técnicas válidas de medición del color, ya sea mediante extracción de pigmento para observar la acumulación o metodologías de análisis de imagen. A continuación se describirán algunas de las técnicas utilizadas en estos experimentos:

- Espectrofotometría: se extraen los pigmentos de las muestras mediante un disolvente orgánico, para su posterior análisis mediante un espectrofotómetro (Wallat *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2009; Ezhil *et al.*, 2008; Kop y Durmaz, 2008).
- HPLC (High performance Liquid Cromatography): se trata de una técnica que permite determinar el pigmento existente en el animal previo sacrificio y extracción de los pigmentos (Wallat *et al.*, 2011; Yasir y Quin, 2009a; Yasir y Quin, 2009b).
- Colorimetría: se trata de una técnica no invasiva en la cual con la ayuda de un colorímetro portátil se aplica un haz de luz sobre la muestra (pez) y una centralita recibe la señal dividiéndola en diferentes factores (a^* , rojo; b^* , amarillo y L^* , luminosidad), mediante las cuales a través de unas fórmulas es posible calcular la saturación y el color (Baron *et al.*, 2008).
- Análisis de imagen: existen diferentes formas de realizar el análisis de imagen, en todas ellas se sacan fotografías de forma estándar para todas las muestras y posteriormente se analizan con programas informáticos de tratamiento de imagen. Uno de esos métodos es

el denominado RGB (Red, Green and Blue): se aísla la zona que se desea analizar y el programa realiza un recuento de píxeles de cada uno de los colores primarios Yasir y Quin, 2009a; Yasir y Quin, 2009b; Novelo y Gomelsky, 2009). Otro método más rudimentario pero válido para patrones de coloración con parches como es el caso de las carpas es rodear el contorno con una línea, imprimir la imagen y recortarla comparando el peso de los parches o manchas con el peso total (Novelo y Gomelsky, 2009).



Tabla II. Artículos publicados sobre peces ornamentales referidos al color

Referencia	Especie	Objetivo	Método de análisis
Wallat <i>et al.</i> , 2011	<i>Carassius auratus</i>	Determinar el efecto de 7 dietas comerciales en el color	Espectrofotometría y HPLC
Yasir y Qin, 2010	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Determinar el efecto de la astaxantina, β -caroteno y cantaxantina a diferentes concentraciones en el color del pez	Análisis de imagen y HPLC
Mukherjee <i>et al.</i> , 2009	<i>Poecilia reticulata</i>	Evaluar el efecto de diferentes porcentajes de cúrcuma en la dieta sobre el color	Espectrofotometría
Yasir y Qin 2009 a,	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Analizar el efecto de 3 intensidades lumínicas sobre el color	Análisis de imagen y HPLC
Yasir y Qin, 2009 b	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Evaluar el color del tanque sobre la coloración del pez	Análisis de imagen y HPLC
Novelo y Gomelsky, 2009	Ciprinus carpio	Comparar dos técnicas de análisis de color	Análisis de imágenes
Baron <i>et al.</i> , 2008	<i>Colisa lalia</i>	Comparar el efecto de una dieta enriquecida con un pigmento sintético y pigmentos naturales de remolacha y zanahoria negra sobre el color del pez	Colorimetría
Ezhil <i>et al.</i> , 2008	<i>Xiphophorus helleri</i>	Evaluar el efecto de la harina de caléndula en la coloración de los peces	Espectrofotometría
Kop y Durmaz, 2008	<i>Cichlasoma severum</i>	Determinar el efecto de la astaxantina, β -caroteno y <i>Porphyridium cruentum</i> sobre el color del pez	Espectrofotometría



1.7.-El cultivo del caballito de mar

Los primeros datos del cultivo de la subfamilia *Hippocampinae* son de 1957 en el Sur de China (Fan, 2005), aunque no se consiguió realizar una producción comercial. En otros países, durante los años 70-80, se comenzó a llevar a cabo de forma experimental la reproducción de diferentes especies de caballito de mar en centros de investigación y acuarios públicos (Correa *et al.*, 1989; Scarratt, 1996). Pero no fue hasta los años 90 cuando se llevó a cabo el primer cultivo comercial de *H. abdominalis* (Woods, 2000) para abastecer al mercado chino con caballitos secos para la medicina tradicional. El interés de China por cultivar otras especies de caballitos de mar creció (Figura 9), pero surgieron múltiples dificultades como problemas con la alimentación y la aparición de enfermedades (Vincent y Clifton-Hadley, 1989). Fue a final de los 90 cuando comenzó la investigación con estos peces, y se publicaron los primeros datos al respecto.

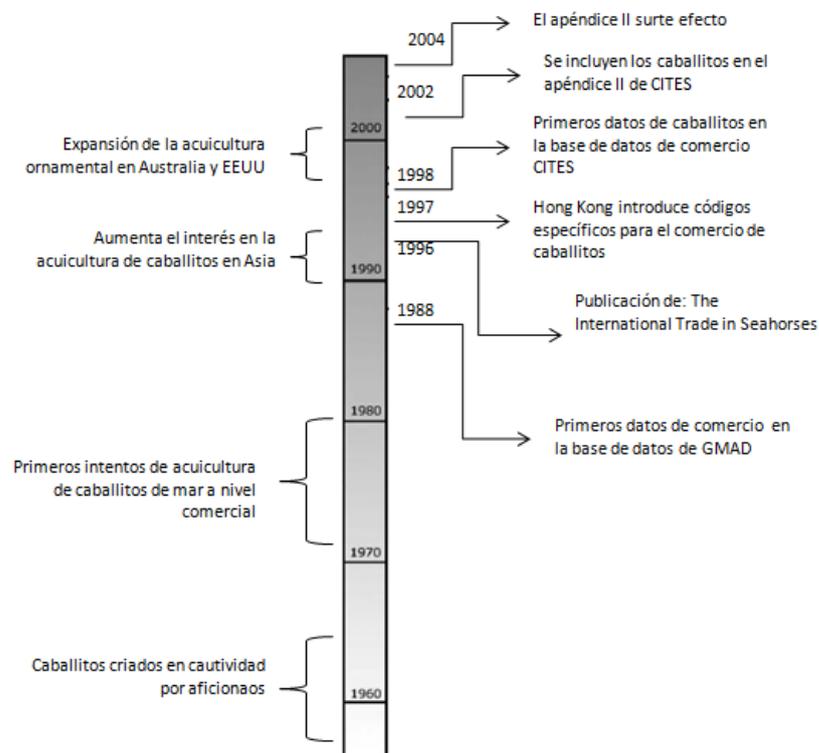


Figura 9. Momentos clave en la evolución del comercio y la acuicultura caballito de mar de 1960 a 2009 (Modificado de Koldewey y Martin-Smith, 2010).



Fue en este momento cuando se crearon diferentes empresas que cultivaban caballitos de mar (Tabla III) y los vendían principalmente vivos a acuarios públicos, pero alguna empresa los vendía secos o sacaba provecho mediante visitas organizadas de turistas. Actualmente existen varios centros donde se producen caballitos de mar ya sea para investigación o de forma comercial, se estimó que entre 2005 y 2006 existían al menos 28 centros que cultivaban caballitos, pero dos tercios de ellos operaban en instalaciones de menos de 200m² o con menos de 40 000 litros (Koldewey y Martin-Smith, 2010).

Tabla III. Empresas que cultivan caballitos de mar y especies producidas.

Empresas	Seahorse Australia	Seahorse Sanctuary	ORA Farm	Ocean rider	Seahorse Source	Southwatch Seahorse Farm
ESPECIES CULTIVADAS	<i>H. abdominalis</i>	<i>H. reidi</i>	<i>H. erectus</i>	<i>H. erectus</i>	<i>H. abdominalis</i>	<i>H. erectus</i>
	<i>H. barbouri</i>	<i>H. barbouri</i>	<i>H. kuda</i>	<i>H. ingens</i>	<i>H. barbouri</i>	<i>H. reidi</i>
	<i>H. breviceps</i>	<i>H. angustus</i>	<i>H. reidi</i>	<i>H. abdominalis</i>	<i>H. breviceps</i>	
	<i>H. kuda</i>			<i>H. zosterae</i>	<i>H. erectus</i>	
	<i>H. subelongatus</i>			<i>H. barbouri</i>	<i>H. fuscus</i>	
	<i>H. whittei</i>			<i>H. hilonis</i>	<i>H. ingens</i>	
	<i>H. angustus</i>			<i>H. capensis</i>	<i>H. kuda</i>	
			<i>H. taeneopeterus</i>	<i>H. reidi</i>		
				<i>H. zosterae</i>		

En la actualidad existen diversos grupos de investigación en todo el mundo que trabajan con caballitos de mar, estudiando su biología, su ecología, mejorando las técnicas de cultivo y refiriéndolas al cultivo de otras especies con el objetivo de mejorar los puntos críticos como son el cultivo larvario y la primera alimentación, que al igual que en otras especies suponen un cuello de botella para su cultivo (Tabla IV).

1.7.1.-Alimentación del caballito de mar en cautividad

El caballito de mar además de las particularidades ya descritas en su anatomía y comportamiento presenta también otra característica peculiar referida a su alimentación en



cautividad. Se trata de un depredador visual que no acepta alimento seco, por lo que se debe alimentar con presas vivas o congeladas (Job *et al.*, 2002; Woods, 2005) (Tabla IV). Dada la estrecha gama de alimentos disponibles en el mercado y el desconocimiento de sus requerimientos nutricionales y en previsión de posibles deficiencias, por lo general las presas vivas empleadas se suelen enriquecer con productos comerciales (González *et al.*, 2003; Olivotto *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2011), el problema de estos productos es que aportan nutrientes muy concretos (ácidos grasos, minerales, vitaminas....) y al carecer de estudios contrastados sobre sus requerimientos podrían estar generando deficiencias de otros nutrientes.

En cautividad se suele alimentar a los caballitos con *Artemia sp.* enriquecida con productos comerciales (Job *et al.*, 2002). Se han realizado algunas experiencias en las que se utilizan otras presas vivas: misidáceos (Otero-Ferrer *et al.*, 2009), anfípodos (Murugan *et al.*, 2009), e incluso dietas inertes ya sean presas congeladas como los misidáceos (Woods, 2005) o alimento formulado (Thangaraj y Lipton, 2008), obteniendo diferentes resultados (Tabla IV).

En las experiencias en las cuales se utilizó una presa viva diferente a la *Artemia*, el crecimiento de los caballitos fue mayor o mejoró su reproducción (Otero-Ferrer *et al.*, 2009; Murugan *et al.*, 2009), a su vez Thangaraj y Lipton (2008) observaron que la mezcla de *Artemia* y misidáceos mejoraba el crecimiento frente a ambas presas por separado y que con la harina de pescado se obtenían resultados mucho más bajos; y por otra parte Woods (2005) determinó la ración diaria de misidáceos congelados para el *Hippocampus abdominalis*.



1.7.2- El color del caballito de mar en cautividad

Como se comentó con anterioridad el precio de un pez ornamental depende principalmente de su color. Pero no se conoce realmente como poder modificar o modular el color de los caballitos. Se sabe que el caballito puede cambiar de color para mimetizarse con el entorno, pero existen otros factores como el genotipo y la alimentación que pueden influir. Aunque se hayan llevado a cabo muchos experimentos sobre el cultivo de caballitos de mar (Palma *et al.* 2011; Woods y Valentino 2003; Woods, 2005; Zhang *et al.* 2011), prácticamente no se ha realizado ninguno que haga referencia al color de los mismos (Lin *et al.*, 2009a; Lin *et al.*, 2011) y ninguno que aporte datos del efecto de la dieta en el color del cuerpo del caballito de mar adulto.



Tabla IV. Estudios publicados sobre aspectos de biología y acuicultura de los caballitos de mar.

Referencia	Especie	Tema de estudio
Molina <i>et al.</i> , 2007	<i>H. Hippocampus</i>	Estudios poblacionales
Palma <i>et al.</i> , 2008	<i>H. guttulatus</i>	Uso de dietas congeladas
Valladares <i>et al.</i> , 2011	<i>H. guttulatus</i>	Estudios poblacionales
Woods, 2005	<i>H. abdominalis</i>	Racion de la dieta
Lin <i>et al.</i> , 2008a	<i>H. erectus</i>	Reproducción y cultivo larvario
Zhang <i>et al.</i> , 2011	<i>H. erectus</i>	Criterios de evaluación de la calidad de la puesta
Lin <i>et al.</i> , 2009a	<i>H. erectus</i>	Supervivencia y color
Lin <i>et al.</i> - 2011	<i>H. erectus</i> e <i>H. kuda</i>	Color
Thangaraj y Lipton 2008	<i>H. kuda</i>	Uso de alimento vivo y harina de pescado
Payne y Rippingale, 2000	<i>H. subelongatus</i>	Uso de copépodos en cultivo larvario
Deng <i>et al.</i> , 2005	<i>H. kuda</i>	Utilización de agua verde en cultivo larvario
Palma <i>et al.</i> , 2011	<i>H. guttulatus</i>	Enriquecimiento de <i>Artemia</i>
Otero <i>et al.</i> , 2010	<i>H. hippocampus</i>	Cultivo larvario



1.8.- OBJETIVOS

La nutrición en la acuicultura en general es un factor básico, mediante la alimentación a los peces se les aportan principalmente proteínas, lípidos e hidratos de carbono, pero también, ácidos grasos, vitaminas, minerales, ... que mejoran su crecimiento, supervivencia, reproducción y estado de salud en condiciones de cautividad. En el mundo de los acuarios es muy importante el color de los peces desde el punto de vista comercial, aunque ha sido poco estudiado especialmente en los marinos.

Este trabajo es un estudio que relaciona la nutrición con otros factores como el color y la salud animal, realizado en el caballito de mar (*H. hippocampus*), en el que mediante la alimentación con diferentes dietas se evalúa su efecto sobre el crecimiento y la supervivencia, así como la influencia sobre el color del animal y la acumulación de pigmentos en su cuerpo, determinando las consecuencias sobre su sistema digestivo. Los objetivos del experimento son los que se detallan a continuación:

- ⇒ Evaluar el efecto de cinco dietas diferentes sobre el crecimiento, supervivencia y composición bioquímica del caballito de mar.
- ⇒ Determinar la influencia de la alimentación en la variación del color, evaluando su expresión.
- ⇒ Observar la evolución del color a lo largo del tiempo y conocer el nivel de expresión máximo del mismo, así como la capacidad de reversión en su caso.
- ⇒ Examinar histológicamente el sistema digestivo de los caballitos de mar y determinar las consecuencias de las distintas dietas sobre su estructura y funcionalidad.



2.-Material y métodos

2.1.-Instalaciones

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) en la sala de acuarios.

Los acuarios están dispuestos en 2 módulos abastecidos con agua de mar prefiltrada y con sistemas de filtración (Figura 10) físicos y biológicos (Aquamedic Riff 500, Alemania) y esterilización por radiación ultravioleta (UV) (Teco®, TR 10 series, Italia). El caudal de entrada a los acuarios era de 30l/h y el agua se mantuvo a lo largo de todo el experimento a 23.52 ± 1.31 °C y 8.05 ± 1.13 mg L⁻¹ de oxígeno disuelto, con un fotoperiodo de 10 horas de luz / 14 horas de oscuridad (AquaMedic© of North America) T5, 24w y 10000K). La instalación estaba monitorizada las 24 horas mediante una serie de sensores conectados a una centralita llamada AT-Control System, (Aquamedic© of North America) la cual conectada a un ordenador mostraba los datos registrados de temperatura, pH, salinidad y nivel de agua de la instalación.

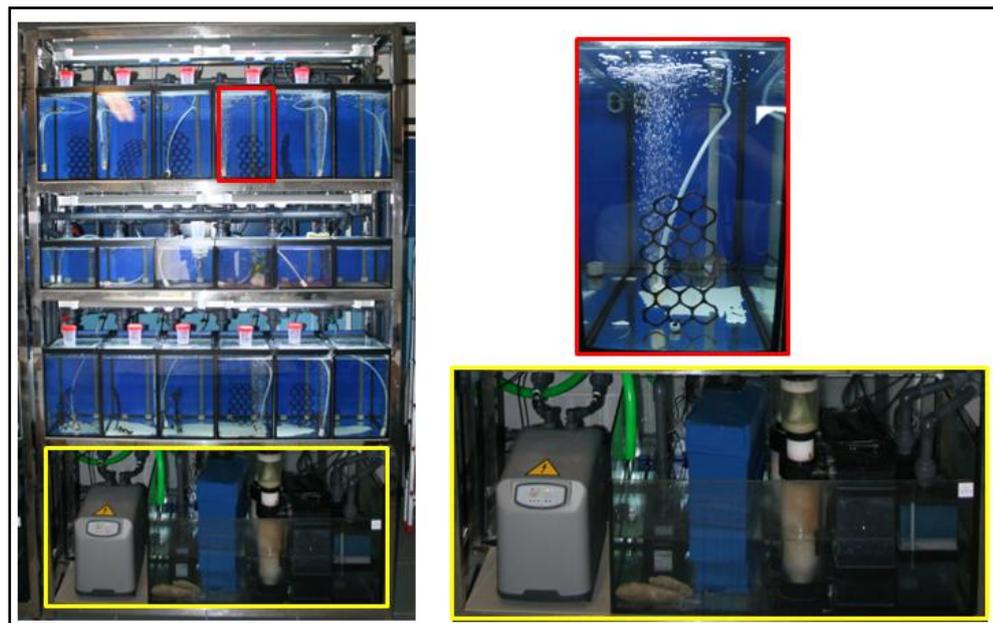


Figura 10. Instalación general, detalle de un acuario y del sistema de filtración.



Se utilizaron 15 acuarios de 34.96 litros (23 x 40 x 38 cm), cada uno de ellos provisto con material para la sujeción de los caballitos (Figura 9). Semanalmente se limpiaban los acuarios con la ayuda de una esponja y cada dos semanas se realizaba la limpieza de los filtros.

2.2.- Caballitos

El experimento se llevó a cabo con setenta y cinco caballitos (*H. hippocampus*) nacidos en cautividad en las instalaciones del ICCM. Los ejemplares que tenían un peso medio de 1.35 ± 0.42 g fueron marcados mediante elastómeros fluorescentes denominados VIFE (Visible Implant Fluorescent Elastomer; Northwest Marine Technology, Inc., Shaw Island, Washington), para identificarlos individualmente. Para realizar el marcaje se mezcla una resina coloreada con un catalizador que posteriormente se inyecta al caballito entre las placas óseas y la epidermis. Este producto solidifica rápidamente y emite fluorescencia bajo la luz ultravioleta (Figura 11). Mediante la inyección en diferentes puntos del pez se definen múltiples códigos que permiten la identificación simple de los ejemplares. Esta técnica se puso en práctica siguiendo la metodología descrita por Morgan y Martin-Smith (2004), y no presenta ningún efecto nocivo en la supervivencia de los animales (Curtis, 2006).



Figura 11. Caballito marcado con VIFE color verde, emitiendo fluorescencia. Fuente: Ángel Segade



2.3.- Preparación de las dietas y alimentación

En el experimento se utilizaron cinco dietas diferentes, basadas en *Artemia sp.* adulta y misidáceos comerciales que se detallan en la Tabla V.

Las dietas LEA y FEA (Tabla V) se prepararon con *Artemia* cultivada en la sala de producción de alimento vivo para ornamentales del ICCM. Para ello se realizó un cultivo de *Artemia* hasta estado adulto, se eclosionaron cistes de *Artemia* (EG Artemia Cysts, INVE, Bélgica), y se enriquecieron con SELCO® durante 48 horas en recipientes de 5 litros. Posteriormente se trasvasaron a tanques de engorde donde se les proporcionó diariamente dos tomas de Ori-Go (Skretting, España), aproximadamente a partir del día 30 los ejemplares de *Artemia* tenían el tamaño adecuado para su utilización en el experimento. A partir de este momento se realizaron dos tratamientos distintos para la *Artemia* producida:

- Enriquecimiento con SELCO® (LEA). Se recolectaba mediante un jamo una porción del cultivo se lavaba y se enriquecía diariamente durante 24h con SELCO® Congelación (FEA). Tras la realización del enriquecimiento tal y como se ha descrito en el punto anterior se lava y se congela.

Las dietas M, SEM y CEM (Tabla V) se basaron en misidáceos comerciales de la marca Ocean Nutrition™), con los siguientes tratamientos:

- Enriquecimiento con SELCO® (SEM). 250g de misis congelados de Ocean nutrition™, se dejan descongelar con 20 g de SELCO®, cuando se descongela, se homogeniza y se introduce en una bolsa de plástico para envasarlo al vacío y congelarlo de nuevo.



- Enriquecimiento con Cyclop-eeze® (CEM). Se utiliza la misma metodología que el tratamiento anterior, pero con 5g de polvo de Cyclop-eeze®.
- Sin ningún tipo de tratamiento (M).

Tabla V. Dietas y las siglas que representan.

<i>Artemia</i> adulta enriquecida con Selco®	LEA (Life Enriched <i>Artemia</i>)
<i>Artemia</i> adulta enriquecida y congelada	FEA (Frozen Enriched <i>Artemia</i>)
Misidáceos congelados	M (Mysis)
Misidáceos congelados enriquecidos con Selco®	SEM (Selco® Enriched Mysis)
Misidáceos congelados enriquecidos con Cyclop-eeze®	CEM (Cyclop-eeze® Enriched Mysis)

2.4.- Diseño experimental y Muestreos

2.4.1.- Evaluación del rendimiento productivo y de coloración de las 5 dietas experimentales.

El experimento se llevó a cabo por triplicado con 5 animales por acuario que estaban individualizados gracias a los VIFE. Durante el experimento se realizaron 5 muestreos entre los días 0 y 102, en que se consideró la finalización del experimento en función de los resultados de crecimiento y coloración obtenidos hasta ese momento.

A lo largo del experimento se preparaba diariamente la alimentación de todos los tratamientos que constaba de 1g de dieta (15% de la biomasa total aproximadamente) administrada en dos tomas: entre las 9 y 10 horas y las 13:30 y 14 horas. Previamente a la primera toma, se sifonaban los acuarios para eliminar heces, al igual que transcurridos 15 minutos de cada una de las tomas, se volvía a sifonar para eliminar los restos de alimento que pudiesen quedar en el fondo. Durante la alimentación se observaba y anotaba en una tabla (Tabla VI) el comportamiento de los ejemplares frente al tipo de alimento, (0 ó 1, no



realizan o realizan todos la acción, respectivamente) con el fin de determinar la aceptación de la dieta.

Tabla VI. Comportamiento alimentario.

Acuario	11	12	13	14	15	21	22	23	24	25	27	28	29	210	211	Observaciones
Movimiento																
Comen																

El crecimiento, la mortalidad y la evolución del color a lo largo de todo el experimento se controlaron mediante los siguientes parámetros:

Talla: se tomaron distintas medidas de los caballitos: cola, tronco¹, tronco², cabeza y hocico (Figura 12); con la ayuda de un pie de rey (Figura 13). A continuación se describirán las medidas utilizadas según Lourie *et al.* (2004)

-Cola: distancia entre el punto medio lateral del último anillo del tronco hasta la punta de la cola sin doblar.

-Tronco: Distancia entre el punto medio del anillo cleitral hasta el punto medio lateral del último anillo del tronco.

-Altura: Distancia desde la punta de la coronilla hasta la punta de la cola sin enroscar.

-Cabeza: Distancia desde el punto medio del anillo cleitral hasta la punta del hocico

-Hocico: Distancia desde la hendidura inmediatamente delante del ojo hasta la punta del hocico.

¹ Medida desde la aleta dorsal hasta el anillo cleitral

² Medida desde la aleta dorsal hasta el extremo de la coronilla

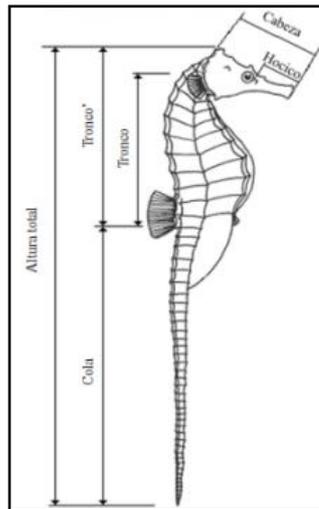


Figura 12. Esquema general de las medidas tomadas. Fuente: Modificado de www.projectseahorse.com

Peso: se tomó el peso húmedo de cada uno de los caballitos con una balanza (Mettler Toledo AG204, Suiza). Para ello los individuos se ponían en el interior de un vaso tarado previamente y una vez anotado el peso eran devueltos a la cubeta de muestreo.

Con los datos obtenidos de longitud y peso se calcularon los siguientes parámetros:

Índice de condición (IC):

$$IC = \frac{L}{P^3} \times 100,$$

donde L es Longitud y P es el peso.

Tasa Específica de Crecimiento (TEC, peso/longitud):

$$TEC = \frac{\Delta C}{T},$$

donde ΔC es la variación del crecimiento ya sea en peso o en longitud y T el tiempo (en días) transcurrido.

Color: se midió el color de la piel. En otras especies el color puede ser medido en diferentes zonas del cuerpo del pez, pero en este caso debido al reducido tamaño de los individuos la medición se realizó en todos los ejemplares en la zona abdominal mediante



un colorímetro portátil (Minolta Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japan) (Figura14).

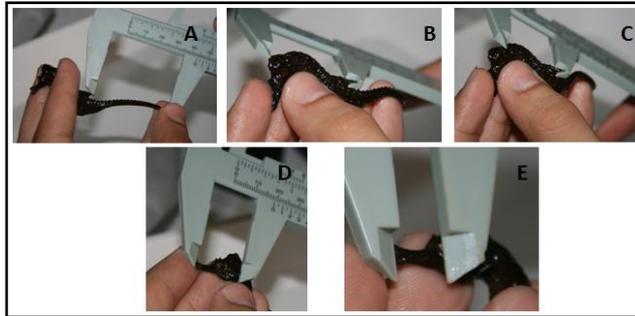


Figura 13. Medidas tomadas en los muestreos: A, cola; B, cuerpo; C, cuerpo; D, cabeza y E, hocico

Los parámetros de color determinados directamente fueron la tonalidad rojiza de la piel (a^*), la tonalidad amarillenta de la piel (b^*) y la luminosidad (L^*) de acuerdo con las recomendaciones de *International Commission on Illumination*, CIE (1976), a partir de los cuales se obtuvo el color total (Hue) y la intensidad de color (Chroma).



Figura 14. Medición del color mediante un colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japan)

2.4.2.- Valoración de la evolución del color.

Al final del experimento anterior (día 102), se consideró la puesta en marcha de una segunda prueba con la finalidad de estudiar la evolución del color de los animales y la aparición en su caso de un punto de saturación del color. Para ello se utilizaron los animales procedentes de uno de los tratamientos anteriores, el LEA, dado que la respuesta de crecimiento y color fue similar a la del resto de tratamientos, además que existía una mayor disponibilidad de alimento.



Para esta prueba se alimento a los caballitos de forma similar a lo anteriormente descrito, considerándose como posible punto final de la prueba la obtención de una meseta, o máxima deposición del color. Una vez alcanzada en su caso la meseta, se continuaría la alimentación con la dieta M con el fin de evaluar en esta especie la capacidad de revertir el color.

2.5.- Análisis bioquímicos

Se realizaron análisis bioquímicos por triplicado de cada una de las dietas, para lo que se recogieron 2 muestras de cada una de ellas y se formó un “pool”. Además, dos caballitos (macho y hembra) al inicio del experimento y un total de 30 caballitos al final, dos caballitos de cada acuario (macho y hembra), fueron sacrificados sumergiéndolos en agua y hielo durante 5 minutos, habiendo sido previamente anestesiados con aceite de clavo a una concentración de 0.04 ml/l. Este procedimiento de sacrificio ha sido considerado como adecuado por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) en 2011. Tras el sacrificio los caballitos fueron clasificados en bolsas individuales, y junto con las dietas se almacenaron a -80°C, hasta el momento de realizar los análisis, cuando se crearon pool de cada acuario.

2.5.1.- Determinación de humedad y cenizas

Se siguió el Método Oficial de Análisis de la Asociación de Química Analítica Oficial de Estados Unidos (AOAC, 2010), pesándose cantidades conocidas de muestra en crisoles y se pusieron en una estufa a 100° durante 24 horas, calculando la humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100,$$

siendo P_i el peso húmedo y P_f el peso seco de la muestra.



Para calcular el peso seco se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% p.s. = \frac{\% p.f.}{100 - \%H} \times 100,$$

siendo % p.s. el porcentaje de peso seco del parámetro que queremos calcular, H la humedad calculada con anterioridad y p.f. el peso fresco del parámetro a transformar.

Para calcular el contenido en cenizas, una vez pesada la muestra y calculada la humedad se introducía en el horno MUFLA a 600° durante 24h. Una vez enfriado el crisol se pesaba y calculaba el contenido en cenizas con la siguiente ecuación:

$$\% cenizas = \frac{P_{cc} - P_c}{P_m} \times 100,$$

En la que P_{cc} es el peso del crisol con las cenizas, P_c es el peso inicial del crisol y P_m es el peso fresco de la muestra.

2.5.2.- Determinación de proteínas

Para realizar la determinación de la proteína bruta de nuestras muestras se utilizó el método Kjendahl (AOAC, 2010) que permite calcular la cantidad de nitrógeno total de la muestra.

En primer lugar se digiere la muestra a 400°C en ácido sulfúrico y en presencia de un catalizador en una manta calefactora (Tecator Digester 20, Foss, Sweden). Tras la digestión se añade hidróxido sódico (NaOH) en exceso y se destila mediante un destilador (Kjeltec 2100 Destillation Unit, Foss, Sweden), el amoniaco liberado en ácido bórico, para ser posteriormente valorado con ácido clorhídrico HCl 0.1N. La ecuación para calcular el nitrógeno liberado es la siguiente:

$$\% proteínas = \frac{(V-P) \times N \times 14.007 \times 6.25}{M} \times 100,$$



En la que V es el volumen de HCl (ml) utilizado en la valoración, P es el volumen de HCl consumido por el patrón, N es la normalidad del HCl y M es el peso de la muestra en miligramos.

2.5.3.- Determinación de lípidos

Los lípidos totales se analizaron siguiendo el método de Folch *et al.*, (1957). El método consiste en la extracción de los lípidos en cloroformo-metanol (2:1), añadiendo una solución de cloruro potásico (KCl) para aumentar la polaridad de la fase acuosa. Una vez separados por decantación, se evapora la muestra y se seca para calcular el porcentaje de lípidos totales mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{L}{M} \times 100,$$

en la que L son los gramos de lípidos de la muestra y M los gramos de la muestra.

Los lípidos totales extraídos son transesterificados (Christie, 1982) para la identificación de ácidos grasos y cuantificación mediante cromatografía de gases (Izquierdo *et al.*, 1990).

Para ello se les añade a los lípidos totales una vez llevados a sequedad 1ml de Tolueno con BHT y 2ml de Metanol:Sulfúrico (1%), se agita, se llena el tubo con N₂, se sella y se deja incubando durante 16 horas a 50°C en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se deja enfriar y se añaden 3.5ml de agua ultra pura y 4ml de Hexano:Dietileter 1:1 con BHT al 0.01% se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos para extraer la fase superior que contiene los ésteres.

Posteriormente se añade bicarbonato potásico (KHCO₃), se agita, centrifuga y se vuelve a extraer la fase superior, para finalmente evaporar, rediluir en 1-2ml de hexano, se filtra con un Sep-pack, se evaporan a sequedad, se rediluye y se identifican y cuantifican en un cromatógrafo de gases (Focus GC, Thermo Scientific, England)



2.5.4.- Determinación de pigmentos

La extracción de los pigmentos se llevó a cabo según la metodología descrita por Barua *et al.*, (1993). Se realiza la extracción de los carotenoides de las muestras mediante acetona. Con hexano y agua se realiza una separación por decantación y la fase obtenida es filtrada y evaporada para su posterior valoración en el espectrofotómetro (Evolution 300, Thermo scientific, England) a 470 nm, una vez rediluidos los pigmentos en un volumen de hexano conocido. Con los datos obtenidos se calcula la concentración de carotenoides expresados como equivalente de astaxantina:

$$\mu g/g = \frac{Abs \times V \times 10000}{2100},$$

donde Abs es la absorbancia y V el volumen con el que se rediluyeron los pigmentos extraídos.

2.6.- Histología

Al final del experimento se sacrificaron dos caballitos de las dietas LEA, FEA y M. Se realizó una disección para la extracción del hígado y el tubo digestivo, dividido en digestivo anterior, medio y posterior. Las muestras obtenidas fueron fijadas en formol tamponado al 10%. Para su procesado las muestras fueron deshidratadas en un gradiente de alcoholes con el procesador de tejidos (Jung Histokinete 2000, Leica, Germany). Se incluyeron en parafina utilizando un dispensador automático (TES 99, Medite, Sweden) y los bloques se cortaron con un micrótopo (Jung Autocut 2055, Leica, Germany) a 5 μ m. Los cortes obtenidos se tiñeron con hematoxilina-eosina (Martoja y Martoja-Pierson, 1970).

Los cortes fueron observados y comparados mediante un microscopio (Olympus CX41, Olympus, Japón) y fotografiados con un objetivo (Olympus CX30, Olympus, Japón). En



las observaciones, se prestó especial atención a la estructura de los hepatocitos y la existencia de absorción lipídica en los enterocitos.

2.7.- Análisis estadístico

En primer lugar se realizó un análisis para comprobar la normalidad y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y un test de Levene ($P < 0.05$), respectivamente (Zar, 2009). Cuando fue necesario los datos fueron transformados para obtener una varianza homogénea. Las diferencias entre grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía, utilizando el test de Tukey para realizar comparaciones múltiples. En todos los análisis estadísticos se utilizó un nivel de significancia del 95% con la ayuda del paquete de análisis estadístico SPSS 15.0.



3.- RESULTADOS

Observaciones generales

Tras el marcaje de los caballitos, se observó que no existía ningún efecto negativo sobre los peces, ya que no se observó mortalidad en los días posteriores al marcaje. Por otra parte, las observaciones realizadas diariamente durante la alimentación nos mostraron que existía una buena aceptación de las diferentes dietas por parte de los caballitos, mostrando una mayor voracidad a lo largo del todo experimento los individuos alimentados con *Artemia* viva, además se trataba de la dieta que creaba menor cantidad de desperdicios en el fondo de los acuarios. El resto de las dietas presentaban una aceptación similar, pero la dieta de misidáceos enriquecidos con Cyclop-eeze® ensuciaba ligeramente más el fondo del acuario.

Crecimiento y supervivencia.

Transcurridos los 102 días de experimento no se encontraron diferencias significativas en crecimiento, tanto en longitud como en peso, entre las diferentes dietas (ANOVA, $p < 0.05$) (Tabla VII). La mortalidad media observada entre los tratamientos (17%) estaba dentro de un rango normal, siendo LEA la única dieta en la que no se observó mortalidad.

Tabla VII. Parámetros de crecimiento de los caballitos (media \pm desviación típica) al inicio y al final del experimento.

	Inicial	LEA	FEA	M	SEM	CEM
Peso (g)	1.35 \pm 0.42	1.27 \pm 0.2	1.28 \pm 0.28	1.34 \pm 0.5	1.14 \pm 0.35	1.32 \pm 0.3
Longitud(cm)	8.16 \pm 0.84	8.38 \pm 0.72	8.63 \pm 0.65	8.29 \pm 0.63	7.94 \pm 0.72	8.35 \pm 0.55
TEC (peso)	-	0.00 \pm 0.12	-0.19 \pm 0.13	0.07 \pm 0.12	-0.03 \pm 0.06	0.04 \pm 0.15
TEC (talla)	-	1.15 \pm 0.65	0.06 \pm 0.17	0.16 \pm 0.24	0.07 \pm 0.24	0.18 \pm 0.24
IC	0.06 \pm 0.05	0.5 \pm 0.03	0.05 \pm 0.04	0.03 \pm 0.02	0.09 \pm 0.08	0.05 \pm 0.05
Supervivencia	-	100.00	73.33 \pm 11.55	66.67 \pm 23.09	53.33 \pm 30.55	73.33 \pm 11.55

Inicial, valores iniciales; LEA, *Artemia* viva enriquecida; FEA, *Artemia* congelada enriquecida; M, misidáceos; SEM, misidáceos enriquecidos con Selco; CEM, misidáceos enriquecidos con Cyclop-eeze.

TEC (peso; talla): Tasa Específica de Crecimiento (g/día; mm/día)

IC: Índice de Condición



Composición bioquímica de las dietas y los caballitos.

La composición bioquímica de las dietas utilizadas se muestra en la Tabla VIII para posteriormente poder realizar las comparaciones pertinentes con los resultados obtenidos en la composición de los caballitos.

Tabla VIII. Composición bioquímica (% peso húmedo, media ± desviación típica) y contenido de carotenoides totales (µg g⁻¹) de las cinco dietas experimentales, p<0.05.

	LEA	FEA	M	SEM	CEM
Proteína bruta	4.74±0.12 ^c	5.61±0.33 ^c	9.55±0.65 ^a	7.59±0.89 ^b	10.23±0.2 ^a
Lípidos totales	2.02±0.05 ^b	1.40±0.12 ^c	0.98±0.03 ^d	6.12±0.13 ^a	6.62±0.6 ^a
Ceniza	0.07±0.01	0.53±0.03	1.48±0.16	0.98±0.15	1.62±0.07
Humedad	93.18±0.02 ^a	91.48±0.04 ^b	90.13±1.47 ^c	87.10±0.17 ^d	86.30±0.12 ^d
Carotenoides	4.82±0.98 ^{ab}	3.17±0.37 ^c	3.98±0.24 ^{bc}	3.91±0.92 ^{bc}	6.26±1.06 ^a

Valores con la misma letra en cada columna no muestran diferencias significativas.

LEA, *Artemia* viva enriquecida; FEA, *Artemia* congelada enriquecida; M, misidáceos; SEM, misidáceos enriquecidos con Selco; CEM, misidáceos enriquecidos con Cyclop-eeze.

Haciendo referencia al análisis proximal de los caballitos de mar alimentados con las diferentes dietas al final del experimento, no se encuentran diferencias significativas entre tratamientos en proteína bruta, cenizas y humedad, pero se observan dos grupos de contenido lipídico (Tabla IX). Uno con valores más altos para las dietas a base de misidáceos y un segundo grupo con valores más bajos para las dietas a base de *Artemia*. Por otra parte y sin ningún tipo de relación con el contenido lipídico de la dieta, el contenido lipídico de los caballitos estaba directamente relacionado ($r^2 = 0.85$) con su peso (Figura 15).

Tabla IX. Composición bioquímica (% de peso húmedo; media ± desviación típica) de los caballitos de mar alimentados con las diferentes dietas experimentales, p<0.05

	LEA	FEA	M	SEM	CEM
Proteína bruta	14.70±1.69	13.73±0.48	14.76±1.16	14.05±0.35	15.78±0.72
Lípidos totales	0.46±0.09 ^b	0.43±0.06 ^b	0.75±0.16 ^a	0.54±0.04 ^{ab}	0.54±0.07 ^{ab}
Ceniza	14.71±0.19	13.55±1.06	11.52±1.36	12.69±0.89	13.78±2.45
Humedad	72.53±5.81	70.91±1.23	71.17±2.28	72.13±1.02	67.48±1.02

Valores con la misma letra en una misma fila no muestran diferencias significativas.

LEA, *Artemia* viva enriquecida; FEA, *Artemia* congelada enriquecida; M, misidáceos; SEM, misidáceos enriquecidos con Selco; CEM, misidáceos enriquecidos con Cyclop-eeze.

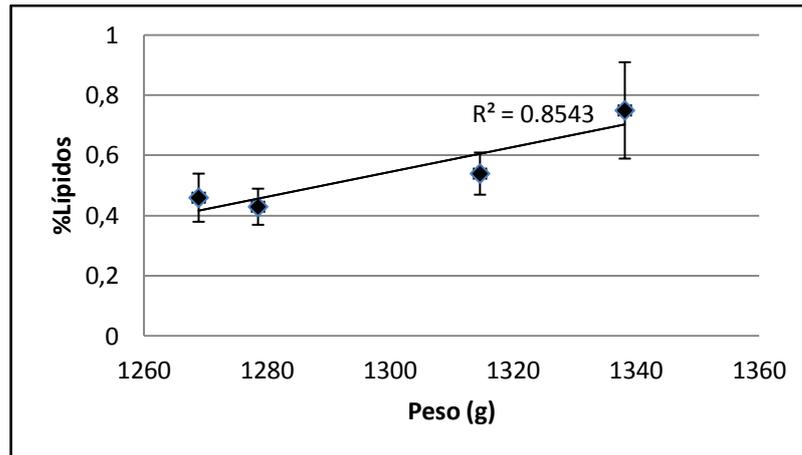


Figura 15. Relación entre el % de lípidos del caballito de mar y su peso

Finalmente se muestran los datos referentes a la composición en ácidos grasos (Tabla X). Donde se puede observar un alto contenido en ácidos grasos monoenoicos en ambas dietas a base de *Artemia* (LEA y FEA) y también aunque en menor medida en los misidáceos enriquecidos con SELCO (SEM).

Además se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de ácido oleico, linolenico y DHA entre los caballitos alimentados con las diferentes dietas (Tabla XI), siendo el DHA el único ácido graso que guardaba relación con las dietas suministradas. Se obtuvieron niveles significativamente superiores para aquellos caballitos alimentados con las dietas LEA y SEM.



Tabla X. Composición de ácidos grasos (% del total) de las dietas y los caballitos.

Ácido graso	DIETAS					CABALLITOS				
	LEA	FEA	M	SEM	CEM	LEA	FEA	M	SEM	CEM
14:0	1.35	1.19	2.27	4.00	5.34	2.63	2.22	2.52	2.92	2.56
14:1n-7	0.64	0.32	0.53	0.21	0.87	0.41	0.64	0.50	0.33	0.62
14:1n-5	0.05	0.04	0.13	0.07	0.37	0.14	0.11	0.10	0.10	0.15
15:0	0.45	0.41	1.08	0.76	1.04	0.58	0.52	0.60	0.54	0.62
15:1n-5	0.14	0.09	0.05	0.03	0.05	0.28	0.12	0.07	0.06	0.28
16:0ISO	0.19	0.11	0.28	0.13	0.31	0.12	0.13	0.15	0.10	0.17
16:0	12.12	11.85	28.30	20.72	21.82	18.45	15.43	20.82	17.88	19.03
16:1n-7	4.38	4.07	6.81	6.11	11.66	2.94	2.11	2.75	2.36	3.47
16:1n-5	0.63	0.34	0.93	0.37	0.79	0.32	0.34	0.40	0.26	0.43
16:2n-6	0.13	0.12	0.59	0.35	1.08	0.16	0.08	0.09	0.10	0.17
16:2n-4	0.47	0.53	0.30	0.66	2.40	0.19	0.55	0.38	0.36	0.33
16:0	0.10	n/d	0.41	0.23	1.38	0.19	0.11	0.10	0.13	0.19
16:3n-4	0.89	0.77	0.28	0.54	0.22	0.50	0.54	0.61	0.45	0.66
16:3n-3	0.14	0.14	0.23	0.20	0.66	0.22	0.16	0.24	0.23	0.26
16:3n-1	0.09	0.07	1.24	0.20	0.56	1.31	1.45	1.49	1.68	1.37
16:4n-3	0.09	0.06	0.06	0.24	0.45	0.45	0.66	0.54	0.65	0.54
16:4n-1	n/d	n/d	0.05	n/d	0.03	0.25	0.35	0.33	0.31	0.30
18:0	5.50	5.62	6.85	2.89	3.37	8.40	9.96	10.90	8.93	9.92
18:1n-9	22.93	23.07	9.44	18.82	7.98	15.83	20.70	20.17	18.19	18.48
18:1n-7	5.97	6.40	4.09	2.76	3.03	3.32	4.72	4.39	3.06	4.59
18:1n-5	0.27	0.22	0.14	0.19	0.18	0.11	0.13	0.15	0.11	0.16
18:2n-9	0.27	0.11	0.25	0.11	0.16	0.21	0.15	0.19	0.14	0.20
18:2n-6	11.83	11.44	3.06	6.38	4.55	4.85	10.16	6.66	4.90	7.72
18:2n-4	0.20	0.22	0.35	0.26	0.23	0.09	0.09	0.09	0.09	0.11
18:3n-6	0.24	0.19	0.24	0.21	0.47	0.36	0.13	0.11	0.11	0.30
18:3n-4	0.23	0.24	0.41	0.20	0.27	0.12	0.17	0.14	0.13	0.17
18:3n-3	6.07	5.04	3.19	1.70	3.92	2.87	2.15	1.47	0.99	3.07
18:3n-1	0.01	n/d	n/d	0.02	0.04	n/d	0.00	0.01	n/d	0.01
18:4n-3	0.63	0.59	0.64	0.90	2.82	1.01	0.35	0.46	0.62	0.72
18:4n-1	0.07	0.07	0.08	0.10	0.06	0.07	0.08	0.08	0.10	0.10
20:0	0.17	0.16	0.41	0.36	0.25	0.36	0.31	0.45	0.41	0.41
20:1n-9	0.26	0.28	0.20	2.84	0.67	0.08	0.12	0.12	0.12	0.11
20:1n-7	1.29	1.39	1.04	n/d	n/d	0.62	0.79	0.79	0.84	0.71
20:1n-5	0.18	0.17	0.47	0.28	0.27	0.21	0.20	0.23	0.22	0.25
20:2n-9	0.04	0.04	0.03	0.09	0.04	0.02	0.06	0.07	0.03	0.02
20:2n-6	0.48	0.53	0.74	0.41	0.58	0.42	0.37	0.43	0.37	0.41
20:3n-9	0.05	n/d	0.28	0.10	0.04	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
20:3n-6	0.12	0.11	0.20	0.14	0.22	0.17	0.12	0.11	0.11	0.15
20:4n-6	2.06	2.09	2.62	1.52	1.60	3.31	4.25	3.42	3.82	3.47
20:3n-3	0.24	0.24	0.80	0.28	0.50	0.39	0.15	0.28	0.30	0.33
20:4n-3	0.48	0.55	0.88	0.67	0.77	0.31	0.17	0.19	0.25	0.25
20:5n-3	10.37	10.22	11.47	7.12	10.72	5.37	3.83	3.75	4.75	4.14
22:1n-11	0.70	0.74	0.27	1.75	0.01	0.10	0.21	0.17	0.24	0.15
22:1n-9	0.15	0.15	0.16	0.39	0.18	0.33	0.41	0.37	0.45	0.36
22:4n-6	0.11	0.15	0.28	0.27	0.32	0.13	0.01	0.05	0.10	0.05
22:5n6	0.36	0.44	1.13	0.84	0.83	1.40	0.87	0.89	1.47	0.89
22:5n-3	0.80	1.07	0.42	1.26	0.50	1.90	1.94	1.48	1.52	1.60
22:6n-3	6.04	8.35	6.33	12.33	6.42	18.52	11.91	10.68	19.19	9.97



Ácido graso	DIETAS					CABALLITOS				
	LEA	FEA	M	SEM	CEM	LEA	FEA	M	SEM	CEM
Saturados	19.43	18.93	38.52	28.33	32.46	30.15	28.16	34.94	30.37	32.28
Monoenoicos	37.58	37.27	24.25	33.82	26.06	24.68	30.60	30.22	26.33	29.77
n-3	24.86	26.27	24.03	24.71	26.76	31.04	21.31	19.10	28.51	20.88
n-6	15.33	15.07	8.86	10.11	9.65	10.78	15.98	11.76	10.97	13.17
n-3HUFA	17.93	20.43	19.91	21.67	18.91	26.49	17.99	16.38	26.02	16.30
AA/EPA	0.20	0.20	0.23	0.21	0.15	0.62	1.11	0.91	0.80	0.84
EPA/DHA	1.72	1.22	1.81	0.58	1.67	0.29	0.32	0.35	0.25	0.42
Oleico/DHA	3.80	2.76	1.49	1.53	1.24	0.85	1.74	1.89	0.95	1.85
Oleico/n-3HUFA	0.92	0.88	0.39	0.76	0.30	0.51	0.97	1.06	0.64	0.89
n-3/n-6	1.62	1.74	2.71	2.44	2.77	2.88	1.33	1.62	2.60	1.59
PUFA n-3+ n-6	40.19	41.34	32.89	34.82	36.40	41.83	37.29	30.86	39.48	34.05

LEA, *Artemia* viva enriquecida; FEA, *Artemia* congelada enriquecida; M, misidáceos; SEM, misidáceos enriquecidos con Selco; CEM, misidáceos enriquecidos con Cyclop-eeze.

Tabla XI. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) de los principales ácidos grasos (% del total \pm desviación típica) y sus relaciones en la composición del cuerpo entero en caballitos de mar alimentados con diferentes dietas, $p < 0.05$

Ácido graso	LEA	FEA	M	SEM	CEM
AA	3.31 \pm 0.01	4.25 \pm 0.17	3.42 \pm 1.31	3.82 \pm 0.23	3.47 \pm 1.82
DHA	18.52 \pm 1.19 ^a	11.91 \pm 1.59 ^b	10.68 \pm 0.85 ^b	19.19 \pm 0.69 ^a	9.97 \pm 2.85 ^b
EPA	5.37 \pm 0.70	3.83 \pm 0.19	3.75 \pm 0.15	4.75 \pm 0.50	4.14 \pm 1.37
Linolenico	2.87 \pm 0.23 ^a	2.15 \pm 0.22 ^{ab}	1.47 \pm 0.32 ^{ab}	0.99 \pm 0.05 ^b	3.07 \pm 0.88 ^a
Linoleico	4.85 \pm 0.73	10.16 \pm 0.28	6.66 \pm 4.19	4.90 \pm 1.44	7.72 \pm 0.88
Oleico	15.83 \pm 0.38 ^b	20.70 \pm 0.98 ^a	20.17 \pm 2.04 ^a	18.19 \pm 0.39 ^{ab}	18.48 \pm 0.34 ^{ab}
AA/EPA	0.62 \pm 0.08	1.11 \pm 0.10	0.91 \pm 0.39	0.80 \pm 0.13	0.84 \pm 0.17
EPA/DHA	0.29 \pm 0.02 ^{ab}	0.32 \pm 0.06 ^{ab}	0.35 \pm 0.04 ^{ab}	0.25 \pm 0.03 ^b	0.42 \pm 0.02 ^a
Oleico/DHA	0.85 \pm 0.08	1.74 \pm 0.32	1.89 \pm 0.04	0.95 \pm 0.01	1.85 \pm 0.14
Oleico/n-3HUFA	0.51 \pm 0.05 ^c	0.97 \pm 0.09 ^a	1.06 \pm 0.04 ^a	0.64 \pm 0.01 ^{bc}	0.89 \pm 0.14 ^{ab}
n-3/n-6	2.88 \pm 0.43	1.33 \pm 0.07	1.62 \pm 0.72	2.60 \pm 0.36	1.59 \pm 0.45
PUFA n-3+ n-6	41.83 \pm 1.57	37.29 \pm 0.95	30.86 \pm 6.54	39.48 \pm 1.65	34.05 \pm 9.18

Valores con la misma letra en una misma fila no muestran diferencias significativas.

LEA, *Artemia* viva enriquecida; FEA, *Artemia* congelada enriquecida; M, misidáceos; SEM, misidáceos enriquecidos con Selco; CEM, misidáceos enriquecidos con Cyclop-eeze.

Color y análisis de pigmentos

Haciendo referencia a la evolución del color, se observó una gran deposición del color amarillo (b*), mientras que la deposición del color rojo (a*) no fue detectada a lo largo del



experimento (Tabla XII). Además, se encontraron diferencias significativas en el contenido total de carotenoides en el cuerpo de los caballitos entre las diferentes dietas ($p < 0.05$), mostrando una relación directa con el contenido en carotenoides de la dieta ($r^2=0.79$), pero sin relación alguna con el contenido lipídico ($r^2=0.08$) (Fig. 16).

Tabla XII. Parámetros ópticos de color (a, b, L, Hue y Chroma) y contenido en carotenoides totales ($\mu\text{g g}^{-1}$; media \pm desviación típica) en los caballitos de mar al inicio y final del experimento.

	Inicial	LEA	FEA	M	SEM	CEM
a (rojo)	5.28 \pm 1.54	4.55 \pm 1.66	3.61 \pm 1.35	4.64 \pm 2.14	4.46 \pm 1.35	5.34 \pm 1.58
b (amarillo)	9.19 \pm 3.45	13.94 \pm 4.53	15.05 \pm 6.64	11.63 \pm 5.17	10.48 \pm 3.41	15.38 \pm 5.1
L	30.37 \pm 2.52	32.97 \pm 3.00	34.18 \pm 6.46	30.73 \pm 3.58	30.96 \pm 2.65	33.20 \pm 4.15
Hue	58.69 \pm 8.22	70.33 \pm 8.34 ^{ab}	75.23 \pm 5.8 ^a	66.73 \pm 9.43 ^b	65.96 \pm 6.21 ^b	70.29 \pm 4.78 ^{ab}
Chroma	10.70 \pm 3.48	3.73 \pm 2.07	5.04 \pm 5.19	3.16 \pm 2.27	3.32 \pm 2.34	4.83 \pm 3.83
Carotenoides	-	19.45 \pm 0.83 ^b	17.31 \pm 3.35 ^{bc}	14.81 \pm 3.21 ^c	14.99 \pm 1.79 ^{bc}	27.13 \pm 1.81 ^a

Valores con la misma letra en una misma fila no muestran diferencias significativas.

Inicial, valores iniciales; LEA, *Artemia* viva enriquecida; FEA, *Artemia* congelada enriquecida; M, misidáceos; SEM, misidáceos enriquecidos con Selco; CEM, misidáceos enriquecidos con Cyclop-eeze.

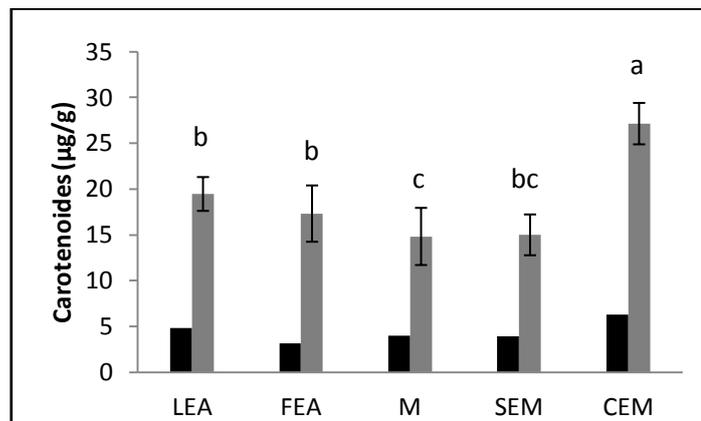


Figura 16. Contenido en carotenoides ($\mu\text{g/g}$) totales en las dietas (negro) y los caballitos (gris).

En la gráfica siguiente (Figura 17) se observa la evolución del color en los caballitos alimentados con LEA a lo largo de toda la experiencia. En el comienzo del experimento (Día 0), se realizó un cambio de dieta, de M a LEA, debido a esto, se advierte un punto de inflexión a partir del cual el amarillo (b*) disminuye hasta cierto punto mientras que el rojo (a*) se comporta de forma opuesta. Durante los 30 primeros días de experimento existe un periodo de adaptación a la nueva dieta, donde la expresión del color siguió el patrón citado



anteriormente y trascurrido este periodo solo se observa una inversión de la expresión. Hasta el día 102, final del experimento principal (flecha negra), se observa un claro incremento de la coloración amarilla, mientras que los niveles de rojo disminuyen. Para conocer la evolución en el tiempo se continuó con la alimentación hasta alcanzar un máximo estable en el día 180 (flecha azul). Alcanzado este máximo se realizó un cambio de dieta nuevamente de LEA a M, observándose nuevamente una inversión de los valores del rojo y el amarillo en la piel de los animales hasta el día de finalización del experimento (flecha verde), que se corresponde con un segundo periodo de adaptación de 30 días nuevamente.

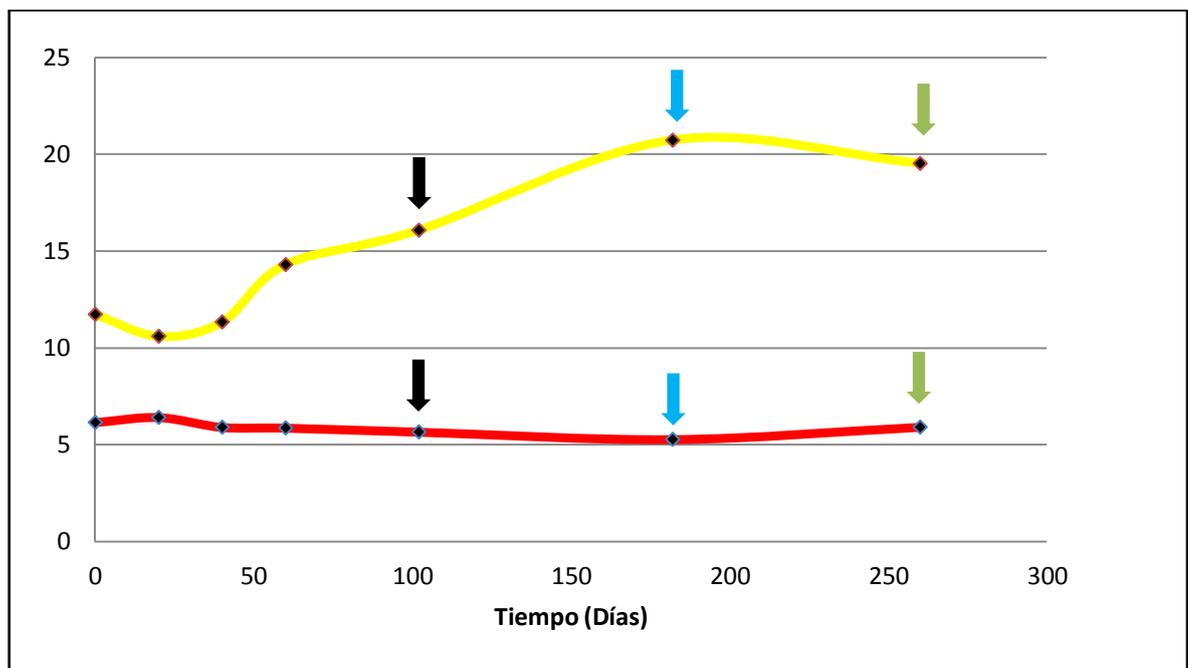


Figura 17. Variación de los valores medios a*(rojo) y b* (amarillo) a lo largo del tiempo en los caballitos alimentados con *Artemia* viva enriquecida (LEA). Fin del experimento principal (flecha negra), acumulación máxima alcanzada (flecha azul) y fin de experimento (flecha verde)

Análisis histológico

Tras la disección del caballito, se identificaron los órganos que iban a ser extraídos para realizar el estudio macroscópico e histológico, en el que se observó un largo sistema digestivo carente de estómago en el que la única diferencia entre las tres dietas era el



contenido del mismo, junto con un hígado lobulado con forma ligeramente alargada y un color anaranjado intenso, el cual no presentaba diferencias macroscópicas apreciables entre los diferentes tratamientos.

A nivel histológico no se encontraron diferencias entre los intestinos de los caballitos alimentados con las diferentes dietas, observándose existencia de absorción lipídica en todas las muestras. Sin embargo, hasta el intestino medio de los caballitos alimentados con LEA y FEA se observó *Artemia* entera sin digerir (Figura 18), mientras que en el intestino de los caballitos alimentados con M, a partir del intestino medio ya no se observaban restos de misidáceos.

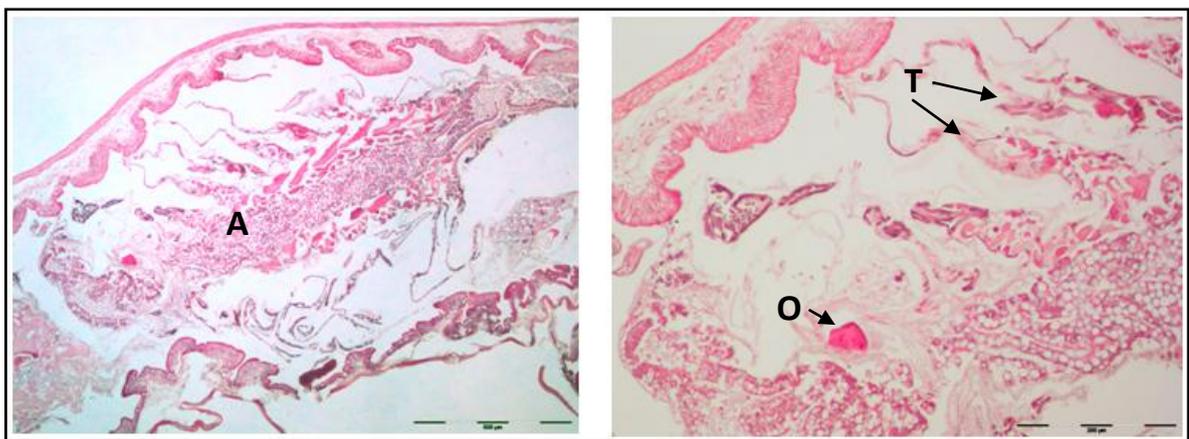


Figura 18. Imagen (4x, barra = 500 μ m) del intestino medio con una *Artemia* entera (izquierda) y detalle (10x, barra = 200 μ m) donde se observa el ojo, los toracópodos y una de las antenas de la *Artemia* (derecha). (Tinción H&E). A, *Artemia*; O, Ojo de la *Artemia*; T, Toracópodos.

Se constató la existencia de hepatopáncreas, con tejido hepático muy denso (Figura 19). Se observaron claras diferencias en los hígados de los caballitos alimentados entre las 3 dietas (LEA, FEA y M). En el caso de los hígados de los caballitos alimentados tanto con LEA como con FEA existía acumulación lipídica (ligeramente mayor en LEA), por lo que los hepatocitos presentan vacuolas lipídicas y un desplazamiento periférico del núcleo, mientras que en el hígado de los caballitos alimentados con la dieta M los hepatocitos eran pequeños circulares y con el núcleo situado en el centro de la célula (Figura 19).

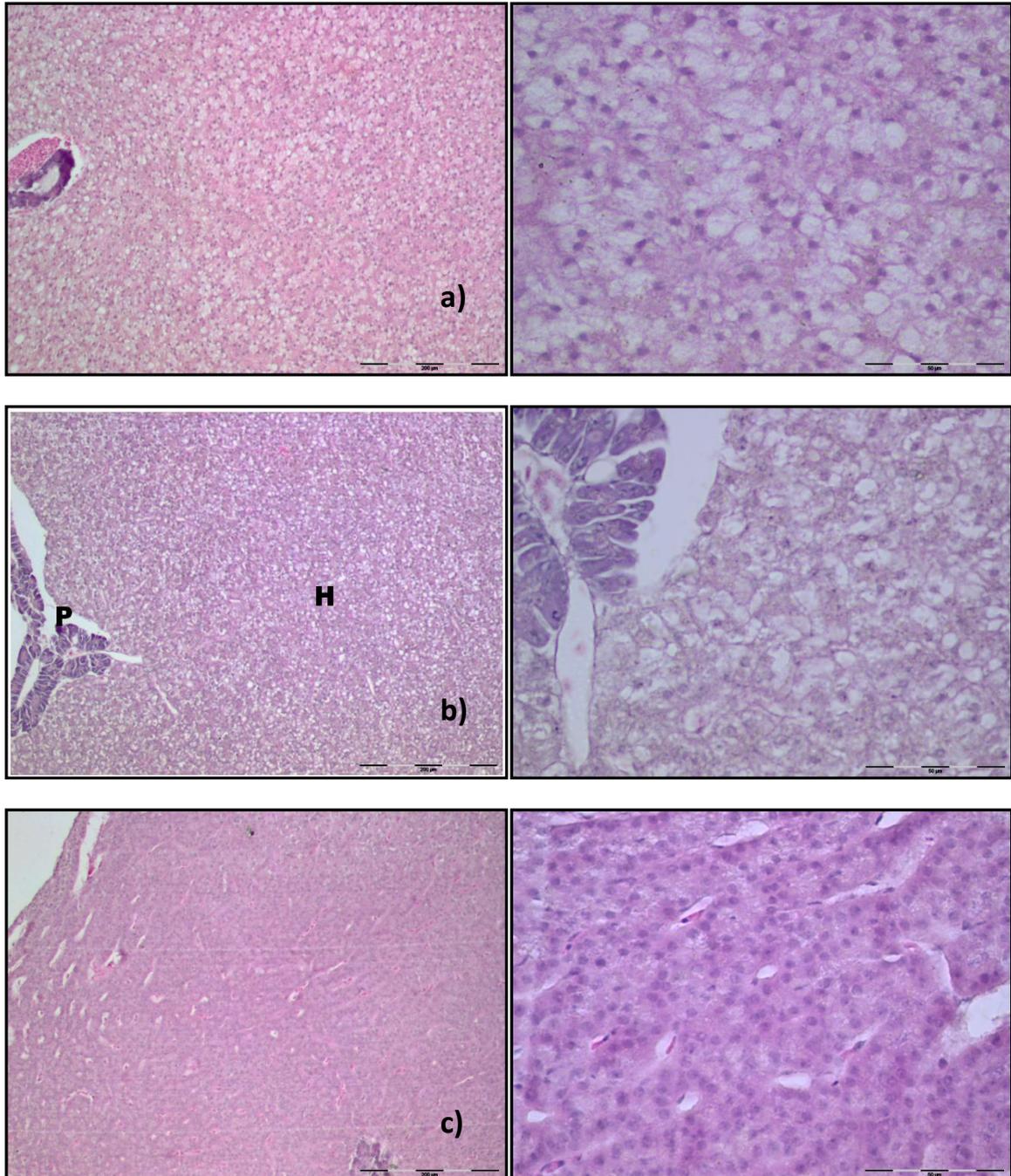


Figura 19. Hígados de los caballitos al final del experimento: a) Dieta LEA (*Artemia* viva enriquecida. x10, barra = 200µm y x40, barra = 50µm) muestra gran cantidad de vacuolas lipídicas; b) Dieta FEA (*Artemia* enriquecida congelada. x10 y x40) muestra células hepáticas (H) englobando el páncreas (P) y gran cantidad de vacuolas lipídicas; c) Dieta M (*misidáceos* congelados. x10 y x 40), muestra un hígado con gran cantidad de hepatocitos con el núcleo en el centro. (Tinción: H&E)



4.- DISCUSIÓN

En diferentes experiencias e incluso en el medio natural se han observado caballitos de mar de la misma especie con diferentes patrones de color, esto puede deberse tanto a la alimentación como a la capacidad que tienen los miembros de esta familia para cambiar su color y mimetizarse con su entorno (Foster y Vincent, 2004; Qin *et al.*, 2012; Otero-Ferrer, 2012). El color del caballito puede verse afectado por la intensidad de la luz, el color del fondo, la salinidad y la temperatura, tal y como demostró Wardley (2001) en el *Hippocampus abdominalis*, y si las condiciones ambientales son las óptimas, en condiciones de cultivo el caballito puede mantener su color durante toda la vida (Lin *et al.*, 2009a).

Se sabe que la alimentación puede influir en la coloración de un pez (Kalinowski *et al.*, 2005; Harpaz y Padowicz., 2007; Kalinowski *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010), pero son hechos que están comenzando a ser estudiados y en el caso de los caballitos de mar se desconoce el efecto de la dieta en su coloración, a pesar del interés económico que esto pudiera conllevar.

Publicaciones recientes hacen referencia a la utilización de diferentes dietas para alimentar caballitos de mar. Así, Job *et al.* (2002) utilizaron plancton salvaje durante la fase de desarrollo larvario, que posteriormente se eliminó de la dieta para alimentar con nauplios de *Artemia* sin enriquecer junto con misidáceos salvajes. Por otra parte Woods en 2005 realizó un experimento para encontrar la ración idónea para el *Hippocampus abdominalis*, utilizando como alimento misidáceos congelado. En este estudio se eligieron la *Artemia* y los misidáceos, enriquecidos con diferentes productos comerciales. La elección de la *Artemia* se debe a que a lo largo de la historia reciente de la acuicultura ha sido la presa viva que más comúnmente ha sido utilizada para realizar el cultivo de



diferentes especies en acuariología (Naz y Türkmen, 2009; Gómez-Requeni *et al.*, 2010; Palma *et al.*, 2011; Jafari *et al.*, 2011; Tziouveli *et al.*, 2012). Se trata de un organismo fácil de cultivar, relativamente barato y que puede utilizarse como biocápsula que puede ser enriquecida y así ser utilizada como vehículo de distintos nutrientes que de otro modo, sería más complicado que se incorporaran al organismo cultivado. Por otro lado, los misidáceos son un alimento fácil de conseguir congelado y ha sido igual que la *Artemia* ampliamente utilizado para el cultivo de especies ornamentales con buenos resultados (Olivotto *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007; Roopin *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009b), además se trata de un alimento que interesa a los productores comerciales que quieren vender caballitos de mar capaces de alimentarse de presas inertes (Woods, 2005).

En este experimento no se observaron diferencias de crecimiento entre los animales alimentados con cada una de las dietas. Tal y como observó Woods (2005) que realizó un experimento testando cuatro raciones diferentes de 5, 10, 15 y 20% de biomasa diaria en *H. abdominalis*, obteniendo únicamente diferencias de peso en la ración más baja; y Otero *et al.* (2009), que observaron que no había diferencias de crecimiento en ejemplares adultos cuando eran alimentados con misidáceos silvestres y *Artemia* enriquecida con Selco®. En la presente experiencia no se obtuvieron diferencias en el crecimiento, probablemente debido a la menor tasa de crecimiento observada para esta especie. Dada la escasez de datos de crecimiento de ejemplares adultos de caballitos de mar, resulta necesario valorar los resultados encontrados, en la presente experiencia, con aquellos otros en larvas, considerándose además los datos reportados para diferentes especies y condiciones de cultivo. En este sentido, la especie objeto de estudio (*H. hippocampus*) es de aguas templadas, por lo que su metabolismo debe ser más lento que el de otras especies de la misma familia (por ejemplo, *H. reidi* o *H. kuda*) de aguas más cálidas. En consecuencia, debería presentar un crecimiento más lento, tal y como puede observarse en el periodo de



desarrollo larvario de *H. reidi* con una tasa de crecimiento diario de 0.77mm (Hora y Joyeux, 2009) y *H. hippocampus* con un crecimiento diario del tronco de aproximadamente 0.21mm (Otero-Ferrer *et al.*, 2010). De la misma forma, se observa que los ejemplares adultos tienen una tasa de crecimiento de 0.24mm/día en *H. abdominalis* (Woods, 2005), frente a un crecimiento diario medio de los caballitos sujetos de estudio de 0.12mm/día, un 50% menor en este caso. Por tanto, los resultados de crecimiento obtenidos en la presente experiencia podríamos decir que estarían dentro de la norma para una especie como el *Hippocampus hippocampus*, además de que, como se indicó anteriormente no se vio afectado por las diferentes dietas.

Los bajos niveles de lípidos obtenidos en los análisis se corresponden con lo observado por Lin *et al.* (2008b) en ejemplares adultos de otras especies. Además se ha observado que la cantidad de lípidos en ejemplares adultos ($0.54 \pm 0.12\%$) es inferior a la de larvas y juveniles de *H. hippocampus* ($2.95 \pm 0.22\%$) (Otero-Ferrer *et al.*, 2010), disminuyendo el contenido de lípidos totales en las larvas desde día cero a medida que avanza el tiempo, tal y como observaron Faleiro y Narciso en *H. guttulatus* (2010). Realizando una comparación del contenido en nutrientes de las dietas frente al de los caballitos alimentados con ellas se observa que generalmente la composición nutricional del pez está directamente relacionada con la composición de su dieta, como se observa en los lípidos de este experimento, mostrando un mayor contenido lipídico en aquellos caballitos alimentados con dietas con alto contenido en lípidos (Lee *et al.*, 2002; Orban *et al.*, 2007; Velu y Munuswamy, 2007). Existiendo una excepción, el caso de la dieta M, para la que con un bajo contenido lipídico se obtiene el mayor contenido graso en los animales. Este hecho podría deberse a la calidad de los lípidos, al aprovechamiento de éstos por los caballitos y a una posible mayor digestibilidad de la misma dieta, dando lugar a que el porcentaje de lípidos entre los caballitos alimentados a base de misidáceos no se modifique con respecto al contenido



inicial, a diferencia de los tratamientos de *Artemia*, para los que se obtuvieron valores significativamente menores de lípidos, acompañados de una acumulación de grasa en el hígado.

El uso que hace el caballito de mar de los misidáceos, refiriéndose a la grasa es igual en las tres dietas basadas en esta presa (M, SEM y CEM), existiendo un incremento del contenido graso del animal cuando se incrementa el contenido de la dieta (Bell *et al.*, 2001). Concretamente, en relación al DHA por ejemplo se observó un 66% de incremento de este ácido graso para cualquiera de los niveles (6% ó 12%) en la dieta. Por el contrario en las dietas a base de *Artemia*, existen diferencias entre ambas; así en la dieta LEA se incrementan los niveles de DHA en un 200% con respecto a la dieta, mientras que en FEA solamente en un 37%, pudiendo deberse estos resultados a diferencias en la digestibilidad de ambos tratamientos. Tal y como se observó en los análisis histológicos, aparecía *Artemia* entera en el digestivo de los caballitos alimentados con LEA y no así con FEA, dando a entender la baja digestibilidad de la primera frente a la segunda. Hecho que podría dar lugar a una acumulación de DHA como fuente de reserva tal y como han descrito otros autores (Izquierdo, 1996; Izquierdo *et al.*, 1990; Otero-Ferrer *et al.*, 2010; Van der Meeren *et al.*, 1993). Probablemente, el hecho de congelar la *Artemia* produce una rotura de las estructuras y tejidos que favorecerían la digestibilidad de esta dieta LEA.

Además se obtiene en referencia al EPA, una disminución entre el contenido en la dieta y el caballito, ya que como ha sido ampliamente referenciado, este ácido graso es utilizado como fuente de energía, frente al DHA que tiende a conservarse como se demuestra en el presente estudio con subadultos. Por otra parte, existen unas grandes diferencias en el contenido de ácido linoleico entre las dietas a base de *Artemia* y de misidáceos, con un gran contenido de este ácido graso en las primeras, posiblemente debido a la presencia en



el alimento o en el enriquecedor de fuentes vegetales terrestres. Por otro lado, estas diferencias que están siendo observadas para las dietas conteniendo *Artemia*, podrían además relacionarse con los altos niveles de HUFA que contienen estas dietas (20%), en contraposición de lo observado en presas silvestres como son los misidáceos, con un 4.2% (Otero-Ferrer *et al.*, 2010). Estos hechos nos dan a entender que ni la *Artemia* viva ni los enriquecedores existentes sean el alimento idóneo para los caballitos de mar. Tal como ya estaba descrito el caballito de mar carece de estómago (Lourie *et al.*, 2004), es posible que debido a esto su capacidad digestiva sea más débil por lo que fue posible encontrar restos de comida sin digerir en su tracto digestivo. En relación con el contenido de lípidos en las dietas, se observó que en las dos dietas que presentaban los mayores valores, existía una mayor deposición lipídica en el hígado de los caballitos, que se pudieron observar en las tinciones correspondientes, este hecho por el momento no podemos considerarlo patológico, ya que la acumulación puede tratarse de una respuesta adaptativa a un exceso de lípidos que se acumulan y crean un reservorio de energía (Mosconi-Bac, 1987). Para poder determinar si se trata de una patología nutricional se debería realizar un análisis de microscopía electrónica para observar la estructura celular de los hepatocitos. Los ejemplares alimentados con la dieta M, poseían un hígado sin señales de acumulación grasa. Esto podría verse afectado por dos factores, el primero de ellos sería debido a que los bajos niveles de lípidos disponibles en la dieta daba lugar a su inmediata utilización como fuente de energía (Caballero *et al.*, 1999; Figueiredo-Silva *et al.*, 2005); y un segundo factor que relaciona el contenido en fósforo de la dieta con la deposición grasa, ya que este elemento puede producir un ligero descenso de la acumulación de grasa en el hígado (Robaina *et al.*, 1998).

La nutrición en acuicultura de peces de consumo está muy avanzada. Se han realizado múltiples experiencias especie-específicas para conocer sus requerimientos nutricionales



(Tibaldi et al., 1994; Schuchardt et al., 2006) y los efectos tanto beneficiosos como nocivos que pueden tener diferentes ingredientes incorporados a las dietas (Zambonino Infante y Cahu, 1999; Yigit et al., 2012). Sin embargo, en el caso de la acuicultura de especies ornamentales, se conoce muy poco acerca de sus requerimientos nutricionales y los efectos de las dietas en el organismo.

Por lo que se refiere al color, se observó la existencia de una relación directa entre el contenido de carotenoides totales del cuerpo de los caballitos y el de la dieta ($R^2 = 0.79$), de acuerdo con lo observado por otros autores (Chebbaki, 2001; Kalinowski *et al.* 2005), pero sólo hasta un máximo (Mukherjee *et al.* 2009), aunque no siempre directamente relacionado con un incremento de la expresión del color, como se observa en el caso de la dieta CEM. Este hecho puede variar de una especie a otra dependiendo de la naturaleza de los pigmentos (Baron *et al.* 2007), debido a que no todos los peces tienen las mismas vías metabólicas para la asimilación de los carotenoides (Chatzifotis *et al.* 2004). En este experimento, los caballitos de mar mostraron una gran habilidad para asimilar y expresar los pigmentos amarillos. Es por esto que los caballitos alimentados con las dietas basadas en *Artemia* mostraron una mayor coloración amarilla, pero sin diferencias significativas respecto a las dietas a base de misidáceos, las cuales podrían contener mayor cantidad de pigmentos rojos. A su vez los caballitos mostraron que a pesar de las deficiencias existentes para asimilar los lípidos no existía una relación directa con la asimilación de pigmentos carotenoides ($r^2=0.08$).

Como ya se ha demostrado en otras especies, existe un tiempo necesario para alcanzar una expresión de color máxima, 120-180 días en el bocinegro *Pagrus pagrus* (Kalinowski et al., 2007), siendo en el caso del *H. hippocampus* de aproximadamente 180 días. Además, se observó que tras realizar un cambio de dieta, el metabolismo del caballito pasa por un



periodo de aproximadamente 30 días, durante el cual se adapta a la nueva dieta, tal y como se observó en la evolución del color. De igual forma, tal y como ha sido reportado en otras especies, el *H. hippocampus*, presenta una capacidad de reversión del color que ha sido notorio a los 270 días, si bien desde los 60 días ya se observaron estos cambios *de visu*.



5.- CONCLUSIONES

- 1.-Todas las dietas experimentales (LEA, FEA, M, SEM y CEM) reportaron las mismas tasas de crecimiento (0.12mm/día), estando éstas dentro del rango esperado para esta especie.
- 2.-El contenido lipídico de los caballitos adultos está directamente relacionado con su peso ($r^2=0.85$), resultando menor que lo observado para larvas de esta misma especie.
- 3.-Los resultados indican que el enriquecimiento de los misidáceos con Selco o Cyclo-peeze no mejoran ni el crecimiento ni la supervivencia de los animales, observándose únicamente para la dieta CEM el mayor contenido de carotenoides en los animales.
- 4.-La congelación de la *Artemia* tras su enriquecimiento mejora el uso de la dieta con respecto a la *Artemia* viva enriquecida, si bien sin diferencias en el contenido en carotenoides, indicando la importancia de estos últimos desde el punto de vista fisiológico de esta especie.
- 5.-Los resultados de los análisis histológicos mostraron que el caballito posee un hepatopáncreas con una cantidad de hepatocitos de pequeño tamaño.
- 6.-Un alto contenido lipídico en la dieta afecta directamente a la acumulación de lípidos en el hígado formándose gran número de vacuolas. Los resultados indican un bajo requerimiento de grasa en su dieta, no superando valores del 6%.
- 7.-Distinta calidad y disponibilidad de lípidos en dieta repercuten en el contenido graso de los animales, estando a su vez esto relacionado con diferencias en el uso y deposición de los ácidos grasos. Se demuestra la esencialidad del DHA frente al EPA tal y como ha sido reportado en otras especies marinas.

8.-Distintas dietas permiten modular el color y su intensidad en los caballitos.

9.-Se observó un periodo de adaptación de 30 días cuando se realiza un cambio de dieta que se ve reflejado en la expresión del color de los animales.

10.-El caballito de mar *H. hippocampus* tiene una gran facilidad para acumular y expresar el color amarillo, alcanzando un máximo de expresión a los 180 días cuando son alimentados con *Artemia*.



6.- Bibliografía

- Almenara-Roldan S. y Ketchum J.T. 1994. Forgotten islands of the Mexican Pacific. *OFI Journal* 9. pp 12-14.
- Anónimo, 1999. Dance at sea. *Nature*, vol. 398, no. 6730, pp. 773-773.
- AOAC, 2010. Official Methods of Analysis of the Association of the Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Barua A.B., Kostic D. y Olson J.A. 1993. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols, and carotenoids in human serum. *Journal of Chromatography* 617, 257-264.
- Baron, M., Davies, S., Alexander, L., Snellgrove, D. y Sloman, K.A. 2008. "The effect of dietary pigments on the coloration and behaviour of flame-red dwarf gourami, *Colisa lalia*", *Animal Behaviour*, vol. 75, no. 3, pp. 1041-1051.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F. y al, e. 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition*, vol. 131, no. 5, pp. 1535-43.
- Caballero, M.J., Lopez-Calero, G., Socorro, J., Roo, F.J., Izquierdo, M.S. y Fernandez, A.J. 1999. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, vol. 179, no. 1-4, pp. 277-290.
- Caballero, M., Izquierdo, Kjorsvik, E., Fernandez, A.J. y Rosenlund, G. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, vol. 27, no. 9, pp. 531-541.
- Calado R., Rosa R., Morais S., Nunes M.L. y Narciso, L. 2005. Growth, survival, lipid and fatty acid profile of juvenile Monaco shrimps *Lysmata seticaudata* fed on different diets. *Aquaculture Research*, vol. 36, no5, pp. 493-504
- Chatzifotis S., Pavlidis M., Donate Jimeno C., Vardanis P. y Divanach P. 2004. The effect of carotenoid sources on skin coloration of red Porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Europe Conference, Biotechnology for Quality, Barcelona, Spain*



- Chebbaki, K., 2001. Efecto de la nutrición sobre la coloración de la piel y la calidad del filete en bocinegro, *Pagrus pagrus*. Tesis de Máster. II International Master in Aquaculture, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Spain, 93 pp.
- Christie W.W. 1982. *Lipid Analysis*. 2nd Revised Edition. Oxford. Pergamon Press.
- Correa, M., Chung, K.S. y Manrique, R. 1989. Experimental culture of the sea horse, *Hippocampus erectus*. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela.Cumana*, vol. 28, no. 1-2, pp. 191-196.
- Curtis, J.M.R. 2006. Visible Implant Elastomer Color Determination, Tag Visibility, and Tag Loss: Potential Sources of Error for Mark-Recapture Studies. *North American Journal of Fisheries Management*, vol. 26, no. 2, pp. 327-337.
- Curtis, J.M.R. y Vincent, A. 2006. Life history of an unusual marine fish: survival, growth and movement patterns of *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829. *Journal of fish biology*, vol. 68, no. 3, pp. 707-733.
- David, L., Rothbard, S., Rubinstein, I., Katzman, H., Hulata, G., Hillel, J. y Lavi, U. 2004, Aspects of red and black color inheritance in the Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio* L.), *Aquaculture*, vol. 233, no. 1-4, pp. 129-147.
- Deng, G., Lu, J. y Lin, Q. 2005. Effects of water-bloom on environmental factors in breeding water for juvenile seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Journal of Fishery Sciences of China/Zhongguo Shuichan Kexue*, vol. 12, no. 4, pp. 477-482.
- Dufour V. J., Jouvenel J. y Lo, Y. 1999. Collecting marine fish and invertebrate larvae: a sustainable technology. In: Abstracts of the *First International Conference of Marine Ornamentals*. Hawaii. p.27.
- Ezhil, J., Jeyanthi, C. y Narayanan, M. 2008. Effect of Formulated Pigmented Feed on Colour Changes and Growth of Red Swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 8, no. 1, pp. 99-101.
- Faleiro, F. y Narciso, L. 2010. Lipid dynamics during early development of *Hippocampus guttulatus* seahorses: Searching for clues on fatty acid requirements. *Aquaculture*, vol. 307, no. 1-2, pp. 56-64.
- Fan, Z., 2005. National report — China. In: Bruckner, A.W., Field, J.D., Daves, N. (Eds.), *The Proceedings of the International Workshop on CITES Implementation for*



- Seahorse Conservation and Trade. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-36. Silver Spring, MD, pp. 54–60.
- FAO, 2007. State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. FAO Newsletters. 162 pp.
- FAO, 2010. State of World Fisheries and Aquaculture 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. FAO Newsletters. 197pp.
- Figueiredo-Silva, A., Rocha, E., Dias, J., Silva, P., Rema, P., Gomes, E. y Valente, L. 2005. Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, vol. 11, no. 2, pp. 147-155.
- Folch J., Lees M.S. y Stanley G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry* 226,479-509.
- Foster S. y Vincent A. 2004. Live history and ecology of seahorses: Implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology*, 64:1-61
- Fraser, T.W.K. y Davies, S.J. 2009. Nutritional requirements of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus): a review. *Aquaculture Research*, vol. 40, no. 11, pp. 1219-1234.
- Garcia, J.R., Kalinowski, C.T.,H., Izquierdo, M.S.L. y Robaina, L.E.R. 2010. Marine and freshwater crab meals in diets for red porgy (*Pagrus pagrus*): effect on growth, fish composition and skin colour. *Aquaculture Research*, vol. 41, no. 12, pp. 1759-1769.
- Gonzalez, M., Rosas, J., Cabrera, T., Millan, J. y Velasquez, A. 2003. Larval survival of ornamental shrimp *Lysmata wurdemanni* Gibbes, 1850 (Crustacea: Decapoda) feeding on enriched *Artemia*. *Ciencia (Maracaibo)*, vol. 11, no. 2, pp. 107-112.
- Gomelsky, B., Cherfas, N.B., Ben-Dom, N. y Hulata, G. 1996. Color inheritance in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* L.) inferred from color variability in normal and gynogenetic progenies, *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, vol. 48, no. 4, pp. 219-230.
- Gómez-requeni, P., Conceição, L.E., C., Olderbakk Jordal, A. y Rønnestad, I. 2010. A reference growth curve for nutritional experiments in zebrafish (*Danio rerio*) and



- changes in whole body proteome during development. *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 36, no. 4, pp. 1199-215.
- Harpaz, S. y Padowicz, D. 2007. Color Enhancement in the Ornamental Dwarf Cichlid *Microgeophagus ramirezi* by Addition of Plant Carotenoids to the Fish Diet. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, vol. 59, no. 4, pp. 195-200.
- Herrera A. Gómez M., Molina L., Otero F. y Packard T. 2009. Advances in rearing techniques and analysis of nutritional quality of two mysids species present in Gran Canaria In: *Larvi '09 – Fish & Shellfish larviculture symposium. European Aquaculture Society, Special Publication No. 38, Oostende, Belgium*. pp.171-174.
- Holt G.J.2003. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species In: *Marine Ornamental species: Collection, Culture and Conservation*. Cato, J.C. and Brown, C.L. Eds. Iowa State Press. pp. 251-254.
- Hora, M.C. y Joyeux, J.C. 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture*, vol. 292, no. 1-2, pp. 37-41.
- International Commission on Illumination 1976. Official recommendations on uniform colour space, colour difference equations and metric colour terms. In: *Colorimetry, Publication CIE No.15.2, 2nd edn., pp. 9–12. Commission International de l'Eclairage, Paris, France*.
- IUCN. Red list of threatened species. www.redlist.org.(2006).
- Izquierdo, M. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* **2**, 183-191.
- Izquierdo M.S., Watanabe T., Takeuchi.T., Arakawa T. y Kitajima C. 1990. Optimum EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). In: *Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish* (eds. M. Takeda y T.Watanabe). Japan Translation Center, Tokyo, Japan. pp.221-232
- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G. y Gines, R. 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.



- Jafari, M., Kamarudin, M.S., Saad, C.R., Arshad, A., Oryan, S. y Guilani, M.H.T. 2011. Effects of Different Diets on Growth, Survival and Body Composition of *Rutilus frisii* kutum Larvae. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, vol. 6, no. 6, pp. 662-668.
- James, R. y Sampath, K. 2004. Effect of feed type on growth and fertility in ornamental fish, *Xiphophorus helleri*. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, vol. 56, no. 4, pp. 264-273.
- Job, S.D., Do, H.H., Meeuwig, J.J. y Hall, H.J. 2002. Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda*. *Aquaculture*, vol. 214, no. 1-4, pp. 333-341.
- Jones R., Kildea, T. y Hoegh-Guldberg, O. 1999. PAM chlorophyll fluorometry a new in situ technique for stress assessment in scleractinian corals, used to examine the effects of cyanide from cyanide fishing. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 864-874.
- Kalinowski, C.T., Robaina, L.E., Fernandez-Palacios, H., Schuchardt, D. y Izquierdo 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture*, vol. 244, no. 1-4, pp. 223-231.
- Kalinowski, C.T., Izquierdo, Schuchardt, D. y Robaina, L.E. 2007. Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration. *Aquaculture*, vol. 272, no. 1-4, pp. 451-457.
- Kitsos M.S., Tzomos T.H., Anagnostopoulou L. y Koukouras A. 2008. Diet composition of the seahorses, *Hippocampus guttulatus* (Cuvier, 1829) and *Hippocampus hippocampus* (L., 1758) (Teleostei, Syngnathidae) in the Aegean sea. *Journal of Fish Biology* 72,1259-1267.
- Koldewey, H.,J. y Martin-Smith, K. 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*, vol. 302, no. 3-4, pp. 131-152.
- Kop, A. y Durmaz, Y. 2008, The effect of synthetic and natural pigments on the colour of the cichlids (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840). *Aquaculture International*, vol. 16, no. 2, pp. 117-122.
- Langroudi, H.E., Mousavi, S.H., Falahatkar, B. y Moradkhani, Z. 2009, Effect of diets containing artemia enriched with unsaturated fatty acids and vitamin C on angel fish *Pterophyllum scalare* propagation, *International Aquatic Research*, vol. 1, no. 1.



- Lee, S.M., Jeon, I.G. y Lee, J.Y. 2002. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, vol. 211, no. 1-4, pp. 227-239.
- Liebermann S. y Field, J. 2001. Global Solutions to Global Trade Impacts? Global Trade and Consumers Choices: Coral reef in Crisis. In: Proceedings of Annual meeting of the American Association for the Advancement of the Science, San Francisco, California. pp: 19-54.
- Lin, Q., Gao, Y., Sheng, J., Chen, Q., Zhang, B. y Lu, J. 2007. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture*, vol. 262, no. 2-4, pp. 481-492.
- Lin, Q., Lin, J. y Zhang, D. 2008a. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, vol. 277, no. 3-4, pp. 287-292.
- Lin, Q., Lin, J., Lu, J. y Li, B. 2008b. Biochemical Composition of Six Seahorse Species, *Hippocampus* sp., from the Chinese Coast. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 39, no. 2, pp. 225-234.
- Lin, Q., Lin, J. y Huang, L. 2009a. Effects of substrate color, light intensity and temperature on survival and skin color change of juvenile seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, vol. 298, no. 1-2, pp. 157-161.
- Lin, Q., Lin, J., Zhang, D. y Wang, Y. 2009b. Weaning of juvenile seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810 from live to frozen food. *Aquaculture*, vol. 291, no. 3-4, pp. 224-229.
- Lin, Q., Lin, J. y Huang, L. 2011. Ornamental Color of Seahorses *Hippocampus erectus* and *H. kuda*. *World Aquaculture 2011, Natal (Brasil)* 6-10, Junio
- Lourie, S. A., Pritchard, J. C., Casey, S. P., Truong, S. K., Hall, H. J. y Vincent, A. C. J. 1999. The taxonomy of Vietnam's exploited seahorses. *Biological Journal of the Linnaean Society*. 66(2), 231-256.
- Lourie S.A., Foster S.A., Cooper E.W.T. y Vincent A.C.J. 2004. A Guide to the Identification of Seahorses. Project Seahorse and Traffic North America. University of British Columbia and World Wildlife Fund, Washington, DC, USA.



- Mak K.K.W., Yanase H. y Renneberg R. 2005. Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 20: 2581-2593.
- Martoja, R y Martoja-Pierson, M. 1970. Técnicas de histología animal. Editorial Toray-Mason S.A., Barcelona, España, 350p.
- Molina, L. y Segade, A. 2011. Aquaculture as a potential support of marine aquarium fish trade sustainability. In: Transactions on Ecology and the environment, Vol., 101. Ed. Witpress Southampton, United Kingdom. pp. 15-25.
- Molina, L., A. López, B. Pardo, F. Otero, P. Martínez y C. Bouza. 2007. Species identification and population analysis of seahorses from Canary Islands (Spain). Aquaculture Europe 2007, Istanbul, 24-27 October 2007.
- Monticini, P. 2010. The ornamental fish trade, production and commerce of ornamental fish: technical-managerial and legislative aspects. GLOBEFISH Research Programme. Vol. 102. Rome, FAO 2010. p. 132.
- Morgan S y Martin-Smith K. 2004. Selected Techniques for Tagging Seahorses. Project Seahorse Technical Report No.6, Version 1.0. Vancouver: Project Seahorse, Fisheries Centre, University of British Columbia.
- Mosconi-Bac, N., 1987. Hepatic disturbances induced by artificial feed in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. during the first year of life. *Aquaculture* 153, 251–261.
- Mukherjee, A., Mandal, B. y Banerjee 2009. Turmeric as a carotenoid source on pigmentation and growth of fantail guppy, *Poecilia reticulata*. *Proc. zool Soc.* Vol. 62 no 2, pp. 119-123.
- Murugan, A., Dhanya, S., Sreepada, R.A., Rajagopal, S. y Balasubramanian, T. 2009. Breeding and mass-scale rearing of three spotted seahorse, *Hippocampus trimaculatus* Leach under captive conditions. *Aquaculture*, vol. 290, no. 1-2, pp. 87-96.
- Naz, M. y Türkmen, M. 2009. Changes in the digestive enzymes and hormones of gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L. 1758) fed on *Artemia nauplii* enriched with free lysine. *Aquaculture International*, vol. 17, no. 6, pp. 523-535.
- Novelo, N.D. y Gomelsky, B. 2009. Comparison of two methods for measurement of red-area coverage in white-red fish for analysis of color variability and inheritance in



- ornamental (koi) carp *Cyprinus carpio*. *Aquatic living resources/Ressources vivantes aquatiques*, vol. 22, no. 1, pp. 113-116.
- Ogawa T. y Brown C. 2001. Ornamental reef fish aquaculture and collection in hawaii. *Aquarium Sci. Conserv.* 3, 151-169.
- Olivotto, I., Yasumasu, S., Gioacchini, G., Maradonna, F. y al, e. 2004. Cloning and expression of high choriolytic enzyme, a component of the hatching enzyme system, during embryonic development of the marine ornamental fish *Chrysiptera parasema*. *Marine Biology*, vol. 145, no. 6, pp. 1235-1241.
- Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, M., Tosti, L. y Carnevali, O. 2006. Breeding and rearing the Sunrise Dottyback (*Pseudochromis flavivertex*): the importance of live prey enrichment during larval development, *Aquaculture*, vol. 255, no. 1-4, pp. 480-487.
- Orban, E., T. Nevigato, M. Masci, G. Di Lena, I. Casini, R. Caproni, L. Gambelli, P. De Angelis, y M. Rampacci. 2007. Nutritional quality and safety of European perch (*Perca fluviatilis*) from three lakes of Central Italy. *Food Chemistry* 100:482–490.
- Otero-Ferrer, 2012. Seahorses in Gran Canaria Island (Spain) Ecology and Aquaculture – Combined Tools for Marine Conservation Issues. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 279 pp.
- Otero-Ferrer F., Molina L., Socorro J., Herrera R., Fernández Palacios H. y Izquierdo M.S. 2009. Efecto de los misidáceos en la calidad de la puesta en el caballito de mar, *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758). XII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid 24-26, Noviembre 2009
- Otero-Ferrer, F., Molina, L., Socorro, J., Herrera, R., Fernandez-Palacios, H. y Izquierdo, M. S. 2010. Live prey first feeding regimes for short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture Research*, vol. 41, no. 9, pp. e8-e19.
- Palma, J., Stockdale, J., Correia, M. y Andrade, J.P. 2008. Growth and survival of adult long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) using frozen diets. *Aquaculture*, vol. 278, no. 1-4, pp. 55-59.



- Palma, J., Bureau, D.P. y Andrade, J.,P. 2011. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture*, vol. 318, no. 3-4, pp. 439-443.
- Paulay G.1997. Diversity & Distribution of Reef Organisms. Chapman y Hall, 115 Fifth Ave, NY 1003 (USA) pp: 303-304.
- Payne, M.F. y Ripplingale, R.J. 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture*, vol. 188, no. 3-4, pp. 353-361.
- Qin, G., Lin, Q., Gu, N., Lin, J. y Huang, L. 2012. Effect of broodstock origin, background and substrate color on skin coloration of three-spotted seahorses *Hippocampus trimaculatus* Leach, 1814. *Journal of experimental marine biology and ecology*, vol. 416-417, pp. 129-134.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M. y Montero, D. 1998. Increase of the dietary n-3/n-6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, vol. 161, no. 1-4, pp. 281-293.
- Roopin, M., Henry, R.P. y Chadwick, N.E. 2008. Nutrient transfer in a marine mutualism: patterns of ammonia excretion by anemonefish and uptake by giant sea anemones. *Marine Biology*, vol. 154, no. 3, pp. 547-556.
- Schuchardt, D., Fernandez-Palacios, H., Hernandez, C.M., Kalinowski, C.T., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M. y Robaina, L.E. 2006. *Preliminary Studies on the Nutritional Requirements of Red Porgy (Pagrus Pagrus)*. XII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (XII ISFNF) 2006 May 28.
- Scarratt, A., 1996. Techniques for raising lined seahorses (*Hippocampus erectus*). *Aquarium Frontiers*. 3, 24-29.
- Sealey, W.M., Barrows, F.T., Casten, M. y Hardy, R.W. 2009. Dietary Protein Source and Level Affects Growth in Neon Tetras. *North American Journal of Aquaculture*, vol. 71, no. 4, pp. 320-324.
- Shi, Z., Yang, G. y Chen, Y. 2010. Body color and fin shape in filial generation from several ornamental swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Fisheries Science/Shuichan Kexue*, 29(4), 212-216.



- Spalding M, Ravilious C. y Green E. 2001. World Atlas of Coral Reefs. University of California Press, Berkeley, USA. 404 pp.
- Tacon, A. 1995. *Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish*. FAO, ROME (ITALY). pp. 75.
- Tibaldi, E., Tulli, F. y Lanari, D. 1994. Arginine requirement and effect of different dietary arginine and lysine levels for fingerling sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, vol. 127, no. 2-3, pp. 207-218.
- Thangaraj, M. y Lipton, A.P. 2008. Survival and Growth of Captive Reared Juvenile Seahorse (*Hippocampus kuda*) Fed Live Feeds and Fishmeal, *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, vol. 60, no. 3, pp. 185-189.
- Tlusty, M. 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, 205(3), 203-203.
- Tziouveli, V., Hall, M. y Smith, G.G. 2012. Evaluation of lipid-enriched Artemia on the reproductive performance of the white-striped cleaner shrimp, *Lysmata amboinensis*. *Aquaculture International*, vol. 20, no. 2, pp. 201-211.
- Van der Meeren T., Klungsoyr J., Wilhelmsen S. y Kvenseseth P.G. 1993. Fatty acid composition of unfed and growing cod larvae, *Gadus morhua* L., feeding on natural plankton in large enclosures. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24, 167-185.
- Valladares, S., P. Quintas, A. Blanco, A. Chamorro, T. Hermelo y M. Planas, 2011. Description of *Hippocampus guttulatus* in Punta Cabalo (Ría de Arousa, NE Spain). The First Syngnathid Biology International Symposium, Fiskebäckskil, Suecia, 25-29 April 2011.
- Vasudhevan, I., James, R. y Sampath, K. 2009. Effect of Food Quality on Growth of the Ornamental Fish Koi carp, *Cyprinus carpio carpio* (var). *Fishery technology. Society of Fisheries Technologists (India)*, vol. 46, no. 1, pp. 79-82.
- Velu, C. S. y N. Munuswamy. 2007. Composition and nutritional efficacy of adult fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* as live feed. *Food Chemistry*. 100(4):1435-1442.
- Vijayagopal, P., Gopakumar, G.N. y Vijayan, K.K. 2008. Empirical feed formulations for the marine ornamental fish, striped damsel, *Dascyllus aruanus* (Linne 1758) and their



- physical, chemical and nutritional evaluation. *Aquaculture Research*, vol. 39, no. 15, pp. 1658-1665.
- Vincent, A.C.J., 1995. Trade in seahorses for traditional Chinese medicines, aquarium fishes and curios. *TRAFFIC Bull.* 15, 125–128.
- Vincent, A.C.J. y Clifton-Hadley, R.S., 1989. Parasitic infection of the seahorse (*Hippocampus erectus*) — a case report. *J. Wildlife Dis.* 25, 404–406.
- Vincent, ACJ, Brian G. Giles, Christina A. Czembor y Sarah J. Foster, 2011. Trade in seahorses and other syngnathids in countries outside Asia (1998-2001). UBC, Vancouver, BC (Canada). 181 pp.
- Wabnitz C., Taylor M., Green E. y Razak T. 2003. From ocean to aquarium. Cambridge, UK. United Nations Environment Programme – World Conservation Monitoring Centre.
- Wallat, G.K., Lazur, A.M. y Chapman, F.A. 2005, "Carotenoids of Different Types and Concentrations in Commercial Formulated Fish Diets Affect Color and Its Development in the Skin of the Red Oranda Variety of Goldfish", *North American Journal of Aquaculture*, vol. 67, no. 1, pp. 42-51.
- Wardley, T., 2001. Pot-bellied seahorses and their colours. Masters Thesis, University of Tasmania, pp. 98.
- Whitehead, P.J.P. 1986. Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. Paris, UNESCO
- Wilkinson C. 2004. Status of Coral Reefs of the World 2004. Townsville: Australian Institute of Marine Science. 264 pp.
- Woods, C. M. C. 2000. Preliminary observations on breeding and rearing the seahorse *Hippocampus abdominalis teleostei*: Syngnathidae in captivity. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34, 475-485.
- Woods, C.M.C. 2005. Growth of cultured seahorses (*Hippocampus abdominalis*) in relation to feed ration. *Aquaculture International*, vol. 13, no. 4, pp. 305-314.
- Woods E. y Rajasuriya A. 1999. Sri Lanka Marine Aquarium Fishery Conservation and management issues. Marine Conservation Society and national Aquatic Resources Agency 47 pp.



- Woods, C.C. y Valentino. F. 2003. Frozen mysids as an alternative to live *Artemia* in culturing seahorses *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture Research*, vol. 34, no. 9, pp. 757-763.
- Yasir, I. y Qin, J.G. 2009a. Impact of Background on Color Performance of False Clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 40, no. 6, pp. 724-734.
- Yasir, I. y Qin, J.G. 2009b. Effect of Light Intensity on Color Performance of False Clownfish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 40, no. 3, pp. 337-350.
- Yasir, I. y Qin, J.G. 2010. Effect of Dietary Carotenoids on Skin Color and pigments of False Clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 41, no. 3, pp. 308-318.
- Yigit, M., Bulut, M., Ergün, S., Güroy, D., Karga, M., Kesbiç, O.S., Yilmaz, S., Acar, Ü. y Güroy, B. 2012. Utilization of Corn Gluten Meal as a Protein Source in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Juveniles. *Journal of FisheriesSciences.com*, vol. 6, no. 1, pp. 63-73.
- Zambonino Infante, J.,L. y Cahu, C.L. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *The Journal of nutrition*, vol. 129, no. 6, pp. 1195-200.
- Zar J.H.2009. Biostatistical analysis, 5th Edition, Upper Saddle River, NJ: Prentice- Hall.
- Zhang, D., Yin, F. y Lin, J. 2011. Criteria for assessing juvenile quality of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*. *Aquaculture*, vol. 322-323, pp. 255-258.