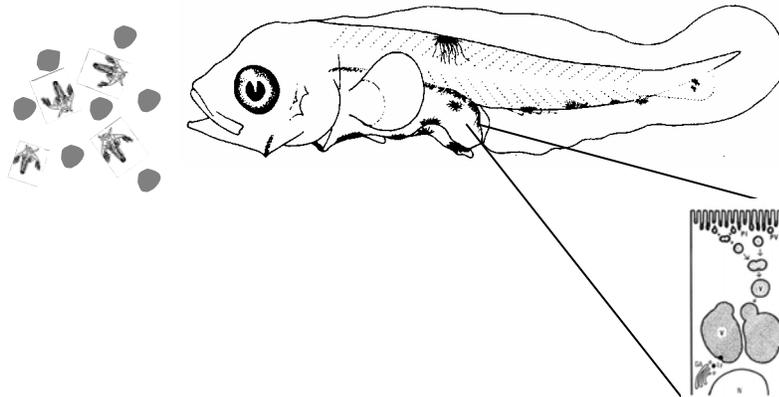




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**ESTUDIOS DE LA FUNCIÓN DIGESTIVA EN LARVAS DE LA
CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*: ASPECTOS
ALIMENTICIOS Y SUS APLICACIONES PRÁCTICAS.**

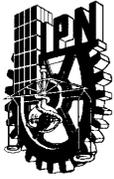
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

M. en C. RENATO PEÑA MARTINEZ

MAYO 2005



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 10:00 horas del día 28 del mes de Enero del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

“ESTUDIOS DE LA FUNCIÓN DIGESTIVA EN LARVAS DE LA CABRILLA ARENERA
***Paralabrax maculatofasciatus*: ASPECTOS ALIMENTICIOS Y SUS APLICACIONES PRÁCTICAS”**

Presentada por el alumno:

PEÑA
Apellido paterno

MARTÍNEZ
materno

RENATO
nombre(s)

Con registro:

B	0	0	1	2	0	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DRA. SILVIE DUMAS

PRESIDENTE

DRA. LAURA SÁNCHEZ VELASCO

SECRETARIO

DR. BENJAMÍN W. ANGUAS VELEZ

SEGUNDO VOCAL

DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO

TERCER VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN LÓPEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



L. P. N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 20 del mes Mayo del año 2005, el (la) que suscribe RENATO PEÑA MARTÍNEZ alumno(a) del Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS con número de registro B001209 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo al dirección de: DRA. SILVIE DUMAS y cede los derechos del trabajo titulado: "ESTUDIOS DE LA FUNCIÓN DIGESTIVA EN LARVAS DE LA CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*: ASPECTOS ALIMENTICIOS Y SUS APLICACIONES PRÁCTICAS" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: blacklarrae@hotmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


RENATO PEÑA MARTÍNEZ

nombre y firma

CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	11
GLOSARIO	12
I. INTRODUCCIÓN	13
I.1. Parámetros de cultivo y el inicio de la alimentación exógena.	14
I.2. Alimentación durante el cultivo larval.	18
I.2.1. <i>Alimento vivo</i>	19
I.2.2. <i>Alimento artificial</i>	20
I.2.3. <i>Protocolos de alimentación</i>	21
I.3. Ontogenia del tubo digestivo y de la actividad enzimática digestiva.	22
I.4. Absorción de proteínas.	26
I.5. Efecto de la inanición	28
II. ANTECEDENTES	31
II.1. Biología de la especie	31
II.2. Experiencias de cultivo	32
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV. HIPÓTESIS	38
V. OBJETIVOS	40
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	41
VI.1. SISTEMA VISUAL Y EFICIENCIA ALIMENTICIA	41
VI.2. PRIMERA ALIMENTACIÓN Y EFICIENCIA ALIMENTICIA	43
VI.2.1. <i>Efecto de la intensidad luminosa</i>	43
VI.2.2. <i>Efecto del color del tanque y la densidad de alimento</i>	44
VI.2.3. <i>Efecto del retraso en la primera alimentación en el desarrollo y eficiencia alimenticia</i>	45
VI.3. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y ALIMENTACIÓN DE LARVAS	48
VI.3.1. <i>Desarrollo y distribución de la actividad enzimática digestiva</i>	48
VI.3.2. <i>Efecto del destete en el desarrollo y la condición nutricional</i>	50
VII. RESULTADOS	55
VII.1. SISTEMA VISUAL Y EFICIENCIA ALIMENTICIA	55
VII.2. PRIMERA ALIMENTACIÓN Y EFICIENCIA ALIMENTICIA	63
VII.2.1. <i>Efecto de la intensidad luminosa</i>	63
VII.2.2. <i>Efecto del color del tanque y la densidad de alimento</i>	64
VII.2.3. <i>Efecto del retraso en la primera alimentación en el desarrollo y eficiencia alimenticia</i>	67
VII.3. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y ALIMENTACIÓN DE LARVAS	76
VII.3.1. <i>Desarrollo y distribución de la actividad enzimática digestiva</i>	76

<i>VII.3.2. Efecto del destete en el desarrollo y condición nutricional.</i>	87
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	93
VIII.1. SISTEMA VISUAL Y EFICIENCIA ALIMENTICIA	93
VIII.2. PRIMERA ALIMENTACIÓN Y EFICIENCIA ALIMENTICIA	98
<i>VIII.2.1. Efecto de la intensidad de luz, color de tanque y densidad de alimento</i>	98
<i>VIII.2.2. Efecto del retraso de la primera alimentación en el desarrollo y eficiencia alimenticia.</i>	102
VIII.3. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y ALIMENTACIÓN DE LARVAS	106
<i>VIII.3.1. Desarrollo y distribución de la actividad enzimática digestiva</i>	106
<i>VIII.3.2. Efecto del destete en el desarrollo y condición nutricional.</i>	113
IX. CONCLUSIONES	120
<i>IX.1. Sistema visual y eficiencia alimenticia.</i>	120
<i>IX.2. Primera alimentación y eficiencia alimenticia</i>	120
<i>IX.3. Fisiología digestiva y alimentación de larvas</i>	121
X. RECOMENDACIONES	123
XI. PERSPECTIVAS	125
XII. REFERENCIAS	126
XIII. PRODUCTOS	138
XIV. ANEXO	139

RESUMEN

La presente tesis abarcó diferentes aspectos involucrados en la alimentación de larvas de la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. Se describió el desarrollo del sistema visual. Se estudiaron los efectos de la intensidad de luz, color del tanque y densidad de alimento en la primera alimentación, así como los efectos de un retraso en la primera alimentación, tanto en la eficiencia alimenticia como en el desarrollo y crecimiento. Se describió el desarrollo y distribución de la actividad enzimática digestiva. Finalmente se diseñó una estrategia de destete con el fin de evaluar el efecto de la misma sobre el desarrollo de la cabrilla arenera. El sistema visual de la cabrilla arenera sigue un patrón general descrito en larvas de otras especies marinas. Se evidenciaron dos etapas de diferenciación del sistema visual. La primera relacionada con el inicio de la alimentación exógena y la segunda durante la transformación a juvenil. Mediante la evaluación directa de las larvas con alimento en el tubo digestivo, se estableció la dependencia de la luz y el efecto de la densidad de alimento como factores que promueven la eficiencia alimenticia durante la primera alimentación de la cabrilla arenera. Por su parte, el color del tanque no presenta ningún efecto durante la primera alimentación. Un retraso de un día en la primera alimentación no tiene efectos significativos en el desarrollo de la cabrilla arenera, sin embargo, un retraso mayor produce daños a nivel histológico y morfométrico, que pueden afectar la calidad de la semilla producida. La actividad enzimática digestiva de la cabrilla arenera se evidenció desde el momento de la primera alimentación (día 2). A partir del día 15 se observa un incremento en la actividad enzimática digestiva, sugiriendo un proceso de madurez digestiva. Los enterocitos del intestino anterior y de los ciegos pilóricos son los principales sitios de actividad enzimática digestiva. Se evidenció que un alimento artificial produce daños a nivel celular en el hígado e intestino posterior (menor área nuclear de los hepatocitos y menor tamaño de los enterocitos), así como a nivel morfométrico (menor longitud total, altura de la cabeza, altura del músculo), los cuales se consideran como síntomas de malnutrición provocados por el alimento artificial. Por su parte, la absorción de proteínas es mayor en las larvas alimentadas con alimento vivo que las alimentadas con una dieta artificial. Los resultados de esta tesis sugieren que las condiciones de cultivo y alimentación deben ser adaptadas a las características propias de las larvas de la cabrilla arenera. De esta forma se propone incrementar la intensidad de luz, así como la densidad de alimento suministrado. Es necesario realizar más pruebas acerca del efecto del color del tanque de cultivo sobre el crecimiento de la cabrilla arenera. Se propone el uso de caracteres histológicos y morfométricos como parte de un plan de evaluación integral sobre el desempeño de dietas artificiales durante el cultivo de larvas de la cabrilla arenera.

ABSTRACT

This study describes several aspects related to larval feeding in the spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*. The development of the visual system was described. The effects of light intensity, rearing tank color and prey density during first feeding, and also the effects of a delayed first feeding on larval development and feeding efficiency were studied. The development and distribution of digestive enzymatic activity were described. Finally, the effects of an early weaning strategy on the larval development were described. The visual system of the spotted sand bass larvae follows the same general pattern described for other teleost larvae. Two differentiation stages were observed. The first one related to the onset of exogenous feeding, and the second during the transformation to juvenile. Light dependency and prey density effect on the feeding efficiency at first feeding of spotted sand bass larvae was observed. Rearing tank color has no effect on feeding efficiency at first feeding. First feeding delayed by one day has no significant effect on larval development; however a bigger delay may produce histological and morphological damages, affecting seed quality. Digestive enzymatic activity was evident from the onset of the exogenous feeding (day 2). From day 15, an increment on the activity was observed, suggesting digestive maturity. The intestinal and pyloric enterocytes were the main sites for enzymatic activity. An artificial microparticulate feed generate cellular damage in the liver and the intestines; and in the morphometric level as well, suggesting a poor nutrition condition due to the artificial diet. Protein absorption was higher in the live-fed larvae than in the larvae fed with the artificial diet. The results suggest that rearing and feeding conditions must be adapted to the larval feeding and physiological capabilities. An increase in light intensity and prey density is proposed. More studies related to the effect of rearing tank color on larval development are required. The use of histological and morphological characters as part of an integral strategy for the performance evaluation of artificial feeds during larval spotted sand bass culture is proposed.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microfotografía de la retina de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) durante el periodo de alimentación endógena (pág. 14).
- Figura 2.** Algunos de los principales factores que afectan la ingestión al momento de la primera alimentación de larvas de peces marinos (pág. 15).
- Figura 3.** Principal alimento vivo utilizado a nivel mundial (pág. 18).
- Figura 4.** Diferentes tipos de dietas artificiales empleadas durante el cultivo de larvas de peces marinos (pág. 19).
- Figura 5.** Diagrama generalizado del grado de desarrollo del tubo digestivo al momento de la primera alimentación de larvas de peces marinos (pág. 21).
- Figura 6.** Microfotografía del intestino posterior. Se observan las etapas del proceso de absorción y digestión intracelular de proteínas en los enterocitos (pág. 26).
- Figura 7.** Espécimen adulto de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 29).
- Figura 8.** Calendario de alimentación de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) implementado en la Unidad Piloto de Maricultivos del CICIMAR-IPN (pág. 31).
- Figura 9.** Diagrama esquemático con las mediciones tomadas en las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 44).
- Figura 10.** Microfotografía de la mucosa intestinal y del hígado de las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) con las mediciones realizadas (pág. 45).
- Figura 11.** Tamaño de la boca y longitud total de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) desde la primera alimentación hasta el día 18 a 25° C (pág. 49).
- Figura 12.** Microsecciones del sistema visual de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 0 y 1 días de desarrollo (pág. 54).

Figura 13. Microsecciones del sistema visual de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 2 días de desarrollo (pág. 55).

Figura 14. Microsecciones del sistema visual de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 8 y 14 días de desarrollo (pág. 56).

Figura 15. Longitud total, diámetro del ojo y altura de la cabeza durante el desarrollo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 57).

Figura 16. Regresión lineal entre el diámetro del ojo y la longitud total, y entre el diámetro del ojo y altura de la cabeza (pág. 58).

Figura 17. Microsecciones del sistema visual de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 16 y 22 días de desarrollo (pág. 60).

Figura 18. Intensidad alimenticia (número de presas ingeridas) de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) desde la primera alimentación hasta el día 21 (pág.61).

Figura 19. Incidencia alimenticia (porcentaje de larvas con alimento) de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) durante la primera alimentación a diferentes intensidades de luz (pág. 62).

Figura 20. Intensidad alimenticia (número de presas ingeridas) de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) durante la primera alimentación a diferentes intensidades de luz (pág. 63).

Figura 21. Eficiencia alimenticia de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) durante la primera alimentación a diferentes colores de tanque y densidades de presas (pág. 64).

Figura 22. Morfometría de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación, y en larvas en inanición total (Pág. 66).

Figura 23. Longitud total de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación, y en larvas en inanición total (pág. 67).

Figura 24. Incidencia alimenticia (porcentaje de larvas con alimento) en la primera alimentación de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación (pág. 69).

Figura 25. Intensidad alimenticia (número de presas ingeridas) en la primera alimentación de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación (Pág. 69).

Figura 26. Microfotografías del hígado de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación (pág. 71).

Figura 27. Microfotografías de la mucosa del intestino anterior de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación (pág. 72).

Figura 28. Mediciones del área nuclear de los hepatocitos y altura de los enterocitos en los intestinos de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación (pág. 73).

Figura 29. Curva de crecimiento de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) desde la primera alimentación hasta el día 30 (pág. 74).

Figura 30. Sitios de actividad de fosfatasa alcalina en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) en los días 2, 10, 20 y 25 (pág. 76).

Figura 31. Sitios de actividad de fosfatasa ácida en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) en los días 5, 10, 20 y 25 (pág. 78).

Figura 32. Sitios de actividad de esterasa no específica en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) en los días 2, 10, 20 y 25 (pág. 80).

Figura 33. Sitios de actividad de aminopeptidasa M en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) en los días 5, 10, 15 y 25 (pág. 82).

Figura 34. Sitios de actividad de dipeptidil-aminopeptidasa IV en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) en los días 5, 10 y 25 (pág. 84).

Figura 35. Mediciones morfométricas de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) alimentadas con alimento vivo o una dieta microparticulada a partir del día 17 (pág. 86).

Figura 36. Mediciones de la altura de los enterocitos y área nuclear de los hepatocitos de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) alimentadas con alimento vivo o una dieta microparticulada a partir del día 17 (pág. 87).

Figura 37. Microfotografías de las vacuolas pinocitóticas en el intestino posterior de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 15 y 21 días, alimentadas con alimento vivo o una dieta microparticulada (pág. 88).

Figura 38. Microfotografías de las vacuolas pinocitóticas en el intestino posterior de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 27 y 33 días, alimentadas con alimento vivo o una dieta microparticulada (pág. 89).

Figura 39. Distribuciones de frecuencias del área de las vacuolas pinocitóticas en el intestino posterior de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), a los días 15, 21, 27 y 33, alimentadas con alimento vivo o una dieta microparticulada (pág. 90).

Figura 40. Esquema de alimentación recomendado durante el cultivo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 122).

LISTA DE TABLAS

- Tabla I.** Actividad enzimáticas digestiva registrada durante el desarrollo de larvas de diferentes especies de peces marinos (pág. 23).
- Tabla II.** Técnicas enzimohistoquímicas y tipo de sustrato utilizado en cada técnica (pág. 48).
- Tabla III.** Estrategia de co-alimentación aplicada a las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 51).
- Tabla IV.** Formulación de la dieta artificial microparticulada utilizada en la estrategia de destete de las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 51).
- Tabla V.** Altura de las capas de la retina durante el desarrollo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 57).
- Tabla VI.** Mediciones morfométricas de las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso en la primera alimentación de 0, 1, y 2 días (pág. 68).
- Tabla VII.** Actividad de fosfatasa alcalina en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 75).
- Tabla VIII.** Actividad de fosfatasa ácida en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 77).
- Tabla IX.** Actividad de esterasa no específica en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 79).
- Tabla X.** Actividad de aminopeptidasa M en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 81).
- Tabla XI.** Actividad de dipeptidil-aminopeptidasa IV en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 83).
- Tabla XII.** Crecimiento de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) alimentadas con alimento vivo o una dieta microparticulada a partir del día 17 (pág. 85).
- Tabla XIII.** Diferenciación de los sistemas digestivo y visual durante el desarrollo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 95).
- Tabla XIV.** Condiciones recomendadas durante el cultivo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (pág. 122).

GLOSARIO

- Bastones.-** Células fotorreceptoras. Son las responsables de la percepción de la intensidad de la luz (Leeson *et al.*, 1990).
- Borde plumoso.-** Proyección de la superficie apical de los enterocitos en ambos intestinos que consiste en numerosas microvellosidades, cada una está cubierta por una extensión de la membrana plasmática (Leeson *et al.*, 1990).
- Conos.-** Células fotoreceptoras, codifican para diferentes longitudes de onda, son las responsables de la percepción del color (Leeson *et al.*, 1990).
- Destete.-** Término adoptado del inglés “weaning”. Se refiere al cambio de alimento vivo, por un alimento artificial.
- Eficiencia alimenticia.-** Término que se emplea para evaluar la alimentación de las larvas (Yin y Blaxter, 1987). Implica la determinación de la intensidad e incidencia alimenticia.
- Eleuteroembrión.-** De acuerdo a Balon (1984), fase del periodo embrionario de los peces que comienza desde el momento de la eclosión hasta que son absorbidos completamente el saco vitelino y el glóbulo de aceite.
- Enterocitos.-** Término que reciben las células epiteliales de la mucosa que reviste a ambos intestinos del tubo digestivo debido a su función de absorción de nutrientes (Stroband y Dabrowski, 1979).
- Enzimoquímica.-** Técnicas histológicas que tienen por objetivo detectar la actividad enzimática (Davenport, 1960).
- Hepatocitos.-** Células que componen al hígado (Leeson *et al.*, 1990).
- Inanición.-** Período de tiempo en el que no hay alimentación (Blaxter y Hempel, 1963).
- Incidencia alimenticia.-** Proporción de larvas que presentan alimento en el tubo digestivo (Yin y Blaxter, 1987).
- Intensidad alimenticia.-** Cantidad de presas presentes en el tubo digestivo de las larvas (Yin y Blaxter, 1987).
- Mucosa intestinal.-** Primera capa que reviste al sistema digestivo, compuesta por células epiteliales conocidas como enterocitos que son del tipo cilíndrico simple ó pseudoestratificado (Leeson *et al.*, 1990).
- Pinocitosis.-** Proceso de absorción celular. Consiste en el envolvimiento de partículas por parte de la superficie apical del enterocito, a través del borde plumoso. Se asocia principalmente con la absorción de proteínas (Watanabe, 1984a) y el sistema inmunológico (Stroband y Dabrowski, 1979).
- Punto de no retorno.-** Es el tiempo en días en que el daño morfológico, histológico y fisiológico en las larvas producido por inanición es irreversible, y la muerte es inminente (Blaxter y Hempel, 1963).
- Túnica muscular.-** Tercera capa que reviste al tubo digestivo, está compuesta por músculo en arreglo longitudinal y transversal (Leeson *et al.*, 1990).

I. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas dos décadas, el cultivo de larvas de peces marinos ha recibido gran atención. La trascendencia de un exitoso cultivo larval recae en que la producción constante de semilla permite un abasto permanente de la misma, facilitando la elaboración de esquemas de producción, sin depender de fluctuaciones que pongan en riesgo la producción ó la investigación. No obstante, lograr esta consistencia productiva resulta en ocasiones una tarea compleja, principalmente debido a que gran parte de las altas tasas de mortalidad reportadas en el cultivo de peces marinos, ocurren durante el periodo larval, de la misma forma que ocurre en el medio natural. Esto ha provocado que el cultivo de larvas de peces marinos sea considerado como una etapa crítica dentro de los esquemas de producción. Resaltan ciertas etapas que por su dificultad de sobrellevar se han establecido como verdaderos "cuellos de botella" que limitan el éxito en el cultivo. Particularmente importante es la etapa de la primera alimentación, en donde la larva debe iniciar exitosamente la búsqueda y captura de un alimento exógeno. La otra etapa considerada como crítica es el momento en que se hace una transición de un alimento vivo a un alimento artificial, y que se conoce como destete (del inglés "weaning").

La implementación de un alimento artificial lo antes posible, con la consecuente reducción en los costos de producción, se ha convertido en una de las premisas del cultivo de larvas de peces marinos. Es así como se han realizado numerosos ensayos en los cuales se reporta la implementación de un alimento artificial (Bromley, 1977; Gatesoupe, 1983; Ehrlich *et al.*, 1989; Cahu y Zambonino-Infante, 1994; Chu y Ozkizilcik, 1999; Anguas-Vélez *et al.*, 2000a). Sin embargo, salvo algunas excepciones en las que se han reportado resultados alentadores, aún dista el igualar las tasas de crecimiento y sobrevivencia obtenidas cuando las larvas se alimentan con presas vivas.

Múltiples han sido las causas a las que se les atribuye el limitado éxito en la transición a un alimento artificial durante el cultivo larval de peces marinos. Por nombrar algunas: intentar el destete desde la primera alimentación, inadecuadas condiciones de cultivo; pobre capacidad digestiva de las larvas; inadecuadas características físicas y químicas del alimento artificial, entre otras.

La presente tesis surge de una línea de investigación encaminada a optimizar el cultivo de larvas de peces marinos, específicamente de la cabrilla arenosa, *Paralabrax maculatofasciatus*. En una primera etapa, se describió el desarrollo del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenosa (Peña, 2000). Ahora, se abordan diferentes aspectos relacionados con el proceso alimenticio durante el cultivo larval de *Paralabrax maculatofasciatus*. Tales aspectos adquieren relevancia y se espera que contribuyan en la adecuación de las condiciones de cultivo, en la implementación de una estrategia de destete temprano, y en el mejoramiento de la calidad de la semilla producida.

I.1. Parámetros de cultivo y el inicio de la alimentación exógena.

La transición de una nutrición endógena a una exógena es considerada como una etapa decisiva dentro del ciclo de vida de los peces (Balon, 1981, 1985). Inicia cuando abren la boca y el ano. Es común que esto ocurra aún cuando no se hayan agotado completamente las reservas vitelinas (Govoni *et al.*, 1986), dando lugar a un periodo de nutrición mixta (Balon, 1986). La duración de este periodo es específica para cada especie y es termo-dependiente. Las larvas de la cabrilla arenosa, por ejemplo, tienen un periodo de nutrición mixta que dura menos de un día a 25° C (Peña, 2000). En contraste, en especies templadas como *Hippoglossus hippoglossus* puede durar hasta tres semanas a 6° C (Helvik y Karlsen, 1996).

Durante el periodo de nutrición mixta, las larvas deben adaptarse exitosamente de un tipo de fuente alimenticia a otro para evitar la inanición (Yin y Blaxter, 1986). Esto implica que durante los primeros días de desarrollo existan cambios drásticos en la

morfología y fisiología de las larvas. Todos ellos encaminados al inicio de la alimentación exógena. Los cambios más significativos que ocurren son el desarrollo de los sistemas visual y digestivo. En este sentido, Porter y Theilacker (1999) y Roo *et al.* (1999) establecieron que existe una sincronización funcional y estructural en el desarrollo del ojo y del tubo digestivo durante el periodo de alimentación endógena en larvas de *Theragra chalcogramma* y *Pagrus pagrus*, respectivamente.

Durante la primera alimentación, las larvas incrementan su actividad en la búsqueda de alimento (Blaxter, 1986) hasta que reciben un estímulo asociado a la disposición del mismo, desencadenando el comportamiento alimenticio (Cuenca y García-Gallego, 1987). De acuerdo con Hunter (1981), las larvas son depredadores visuales, por lo que la visión juega un papel importante en la orientación e inicio del comportamiento alimenticio (Blaxter, 1986). El inicio de la alimentación requiere de un adecuado desarrollo del ojo, de lo contrario, las larvas serán incapaces de localizar el alimento, disminuyendo así la sobrevivencia (Helvik y Karlsen, 1996). Al momento de la eclosión, el ojo de las larvas está presente, pero no completamente desarrollado. Está compuesto de una lente rodeada por una retina formada por células indiferenciadas en un arreglo concéntrico (Blaxter, 1975). Durante el periodo de alimentación endógena inicia el desarrollo de estratos celulares en la retina. Estos son, de la lente al exterior: capa de células ganglionares, capa plexiforme interna, capa nuclear interna, capa plexiforme externa y capa nuclear externa. Esta última capa está compuesta por las células fotorreceptoras: los conos (Fig. 1, pág. 14) (Blaxter, 1975; Kawamura *et al.*, 1984). Una característica a resaltar es la ausencia del pigmento visual durante este periodo de desarrollo. Esta ausencia indica la no funcionalidad del ojo, ya que el pigmento visual es el responsable de la recepción de fotones (Kawamura *et al.*, 1984). Para el momento de la primera alimentación, aparece el pigmento visual, marcando el inicio de la funcionalidad del sistema visual.

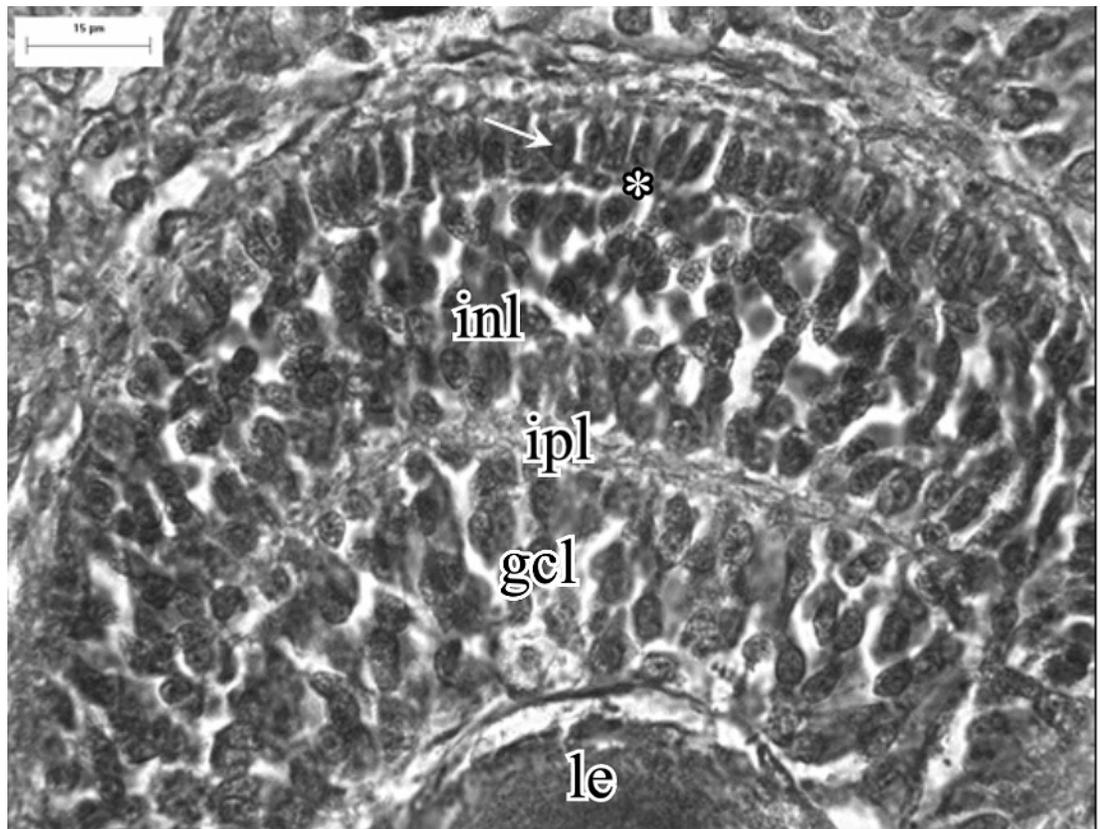


Figura 1. Microfotografía de la retina de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) durante el periodo de alimentación endógena. Los conos (flecha) son los únicos fotorreceptores presentes. No se observa pigmento visual. El asterisco muestra la capa plexiforme externa, que se ubica por debajo de los conos; inl = capa nuclear interna, ipl = capa plexiforme interna, gcl = capa ganglionar, le = lente. Tinción hematoxilina-eosina. Barra = 15 μ m.

No sólo el grado de desarrollo estructural de los elementos involucrados en la alimentación (i. e. sistemas visual y digestivo) influye en el inicio de la misma. Existen factores de naturaleza variable cuya interacción puede limitar ó incrementar la ingesta. Kestemont y Baras (2001) enlistan algunos de estos factores presentes tanto en el medio natural como en condiciones de cultivo, mismos que se presentan en la Figura 2.

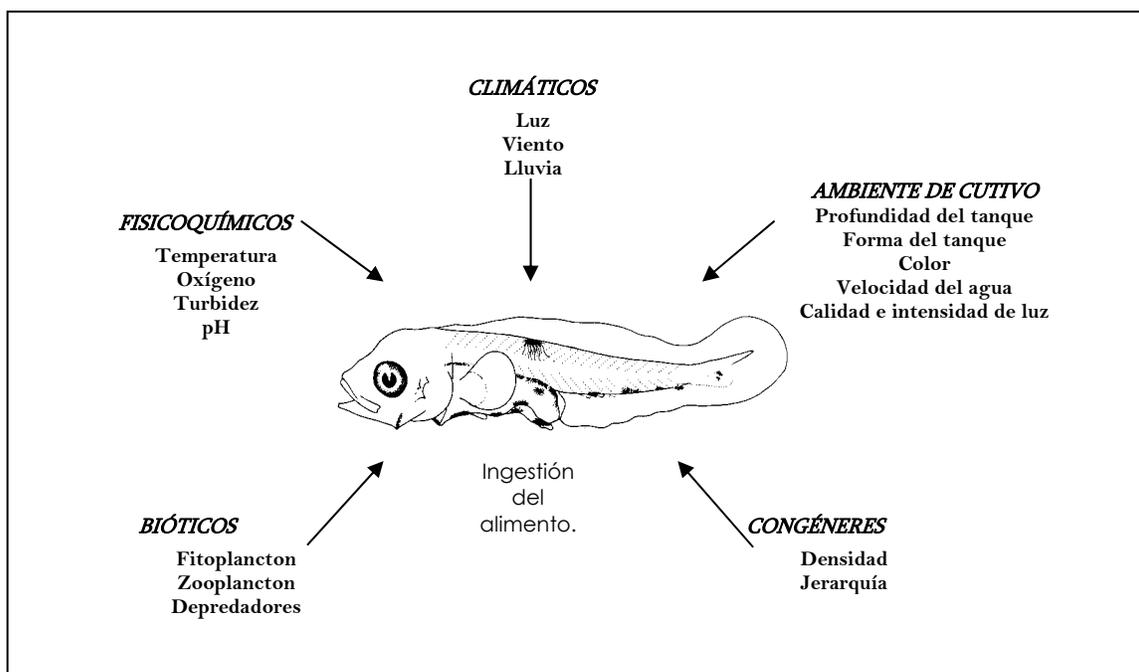


Figura 2. Algunos de los principales factores que afectan la ingestión al momento de la primera alimentación en larvas de peces marinos. Modificado de Kestemont y Baras (2001).

Dentro de un sistema de cultivo, los factores mencionados son manipulados y controlados por el productor ó el investigador, proveyendo las condiciones que favorezcan la ingesta. En este sentido, la intensidad de luz durante el cultivo es un factor importante que permite la detección del alimento (Blaxter, 1986). Sin embargo, algunos autores han establecido que muy bajas o muy elevadas intensidades de luz, según las especies, afectan negativamente la eficiencia alimenticia de las larvas, es decir, reducen

tanto el número de larvas que presentan alimento (incidencia alimenticia), como el número de presas ingeridas por larva (intensidad alimenticia) (Paul, 1983; Cobcroft *et al.*, 2001; Downing y Litvak, 2001). Blaxter (1986) propuso un umbral luminoso de 0.1 lux, debajo del cual, las larvas de peces no se alimentan. No obstante, existen reportes de especies como *Clupea harengus* (Batty *et al.*, 1986) donde se ha observado la ingesta en condiciones de oscuridad, así como otros estudios que reporten la presencia de alimento en larvas recolectadas durante el ocaso (Sánchez-Velasco, 1998). Otros factores en un sistema de cultivo, como el color del tanque (Downing y Litvak, 1999a) y la densidad de alimento (Paul, 1983), presentan un efecto favorable sobre la eficiencia alimenticia de las larvas de peces al momento de la primera alimentación.

Bajo este marco, resalta la necesidad de establecer el efecto de diferentes parámetros de cultivo sobre la eficiencia alimenticia durante la primera alimentación, con ello, será posible adecuar las condiciones de cultivo de tal forma que se favorezca la ingestión del alimento durante la transición a un alimento exógeno, reduciendo así, el riesgo de inanición.

I.2. Alimentación durante el cultivo larval.

La utilización y optimización de alimentos para el cultivo larval representa una de las principales líneas de investigación en la larvicultura. La selección de alimentos apropiados exige que éstos cubran ciertos requerimientos, principalmente alimenticios y nutricionales (Dabrowski, 1984; Cahu y Zambonino-Infante, 2001). Esto ha traído como consecuencia que se implementen nuevas estrategias de alimentación, así como tipos de alimento que permitan cubrir estos requerimientos. Los dos tipos de alimento suministrado durante el cultivo larval son el alimento vivo y el alimento artificial.

I.2.1. Alimento vivo.

El alimento ingerido por las larvas en el medio natural consiste de zooplancton, particularmente copépodos en diferentes etapas de su ciclo de vida (May, 1970; Sánchez-Velasco, 1998; Sánchez-Velasco *et al.*, 1999), es por ello que durante las primeras experiencias de cultivo larval se suministraba zooplancton recolectado del medio natural (May, 1970). A pesar de resultados favorables, el suministro de este tipo de alimento carece de consistencia y está sujeto a fluctuaciones naturales de las poblaciones, poniendo en riesgo la investigación, así como la producción y calidad de semilla.

Posteriormente, se desarrollaron técnicas de cultivo de ciertas especies de invertebrados y microalgas. Dentro de las microalgas más empleadas figuran *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galvana*, *Nannochloropsis oculata*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros gracilis* y *Chlorella* sp. (Tucker, 1998), las cuales se emplean como alimento del zooplancton con el que se alimentará a las larvas de peces, y en algunos casos funcionan directamente como alimento de las mismas (Reitan *et al.*, 1997).

Entre las especies de invertebrados más utilizados como alimento resaltan el rotífero *Brachionus plicatilis*. (Fig. 3A, pág. 18) y el branquiópodo *Artemia* sp.; este último se emplea en diferentes etapas de su ciclo de vida (Fig. 3B-D, pág. 18). Estos organismos son empleados como alimento rutinario a nivel mundial. No obstante, estas especies carecen de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) de la serie ω -3, los cuales son esenciales para el desarrollo de las larvas (Izquierdo, 1996; Kanazawa, 1997), por lo que requieren de un enriquecimiento en lípidos previo antes de ser suministradas a las larvas. El enriquecimiento del alimento vivo se logra mediante el uso de emulsiones comerciales ricas en HUFAs (Lavens y Sorgeloos, 1996).

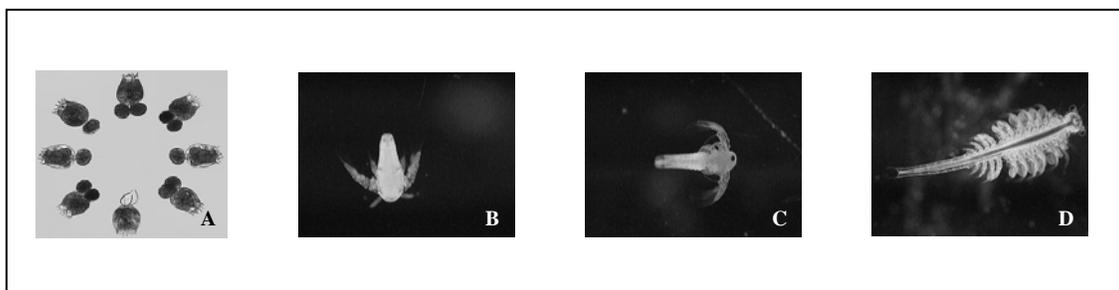


Figura 3. Principal alimento vivo utilizado a nivel mundial. A) Rotífero *Brachionus plicatilis*, B) nauplios C) metanauplios y D) juveniles de *Artemia sp.* A, tomada de internet; B, C y D, Imágenes originales, Unidad Piloto de Maricultivos, CICIMAR-IPN.

Existen otros grupos de invertebrados que también han sido utilizados como alimento; resaltan los copépodos de los géneros *Acartia*, *Paracalanus*, *Euterpina*, *Tigriopus* y *Tisbe*, entre otros. Los cuales, a pesar de su alto contenido de HUFAs, son particularmente difíciles de mantener en condiciones de cultivo, lo que los convierte en una alternativa limitada en su uso (Stottrup y Norsker, 1997). Otros tipos de alimentos suministrados son los dinoflagelados como *Gymnodinium*, y ciliados como *Paramecium* y *Euplotes*, así como algunos cladóceros como *Moina* y *Daphnia*. También se han utilizado larvas de anélidos, moluscos y equinodermos, e incluso, eleuteroembriones y larvas de peces (May, 1970; Tucker, 1998; Liang *et al.*, 2001).

1.2.2. Alimento artificial.

Una alternativa al uso del alimento vivo, es la implementación de un alimento artificial. Esto permitiría reducir los costos de producción del alimento vivo, los cuales suelen ser del orden del 50 % de los gastos totales de producción (Liang *et al.*, 2001). A pesar de esto, la implementación de un alimento artificial adecuado para las larvas de peces, presenta una serie de complicaciones. Resaltan las características físicas inherentes a la dieta, por mencionar algunas: tamaño y forma de la partícula, textura,

lixiviación, y densidad, que determina la flotabilidad y el tiempo de permanencia en la columna de agua. Químicamente, la adecuada composición de la dieta representa el principal reto, ya que debe satisfacer las necesidades nutricionales de las larvas. La correcta adaptación de ambos aspectos forma parte fundamental del proceso de evaluación del alimento artificial durante el cultivo de larvas de peces marinos (Bengtson, 1993; Person-Le Ruyet *et al.*, 1993).

Existen diferentes tipos de dietas artificiales que han sido utilizadas durante el cultivo larval: microparticuladas, microencapsuladas, microaglomerados, hojuelas y líquidas (Lazo, 2000; Russiello e Ingley, 2000) (Fig. 4), y cuyo éxito está en función de la especie.

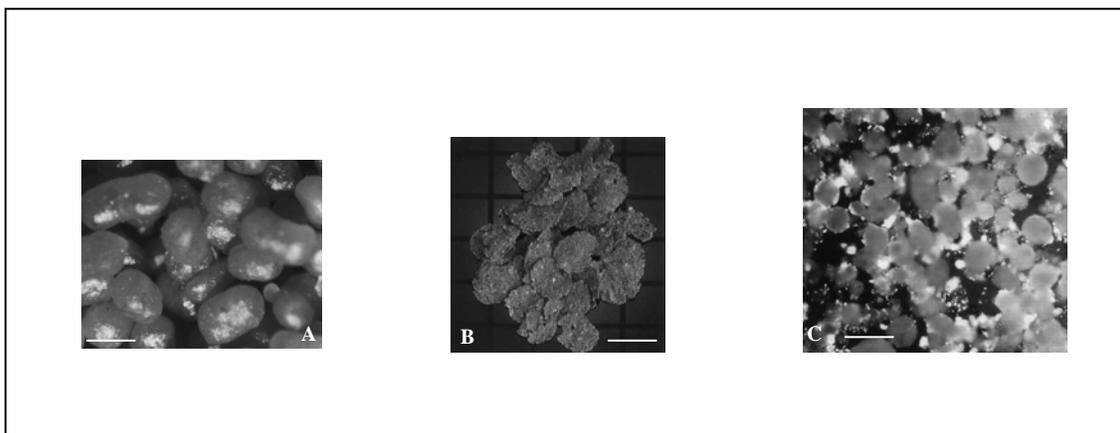


Figura 4. Diferentes tipos de dietas artificiales empleadas durante el cultivo de larvas de peces marinos. A) microcápsulas, B) hojuelas, C) microparticulas.

1.2.3. Protocolos de alimentación.

En la actualidad, un protocolo típico de alimentación durante el cultivo de larvas de peces marinos inicia con el rotífero *Brachionus plicatilis* al momento de la primera alimentación, seguido de nauplios de *Artemia*, ambos son enriquecidos en emulsiones comerciales ricas en lípidos poliinsaturados; posteriormente las larvas se alimentan con

juveniles de *Artemia* (Civera et al., 2002). En algunas especies, como *Dicentrarchus labrax*, e *Hippoglossus hippoglossus* se inicia directamente con el uso de nauplios de *Artemia* (Zambonino-Infante et al., 1996; Luizi et al., 1999). Una práctica común es el agregar microalgas a los tanques de cultivo. Esta técnica conocida como “agua verde”, mantiene la calidad del alimento vivo no ingerido en el estanque; estabiliza la calidad del agua; provee de estimulantes inmunológicos y estimula el inicio de la alimentación (Marliave, 1994; Lavens et al., 1995; Lazo et al., 2000a).

La siguiente etapa durante la alimentación de larvas de peces marinos (generalmente larvas en etapas flexión-postflexión) consiste en un alimento artificial. Esta sustitución puede llevarse a cabo de manera abrupta, es decir, de *Artemia* a dieta artificial de un día a otro; ó puede realizarse de manera gradual, suministrando los dos tipos de alimento al mismo tiempo y eventualmente eliminando la *Artemia* mientras se incrementa la cantidad de dieta artificial, este proceso se conoce como co-alimentación. Es precisamente la co-alimentación, la estrategia que ha permitido obtener los mejores resultados durante el destete de las larvas, ya que se ha demostrado que permite que la larva se “familiarice” con el nuevo tipo de alimento (Rosenlund et al., 1997).

Aún así, uno de los principales requisitos para decidir cuándo iniciar con la sustitución del alimento vivo por uno artificial, es conocer el estado de desarrollo del tubo digestivo, así como la capacidad digestiva de las larvas y sus requerimientos nutricionales.

I.3. Ontogenia del tubo digestivo y de la actividad enzimática digestiva.

El tubo digestivo de larvas de peces marinos es morfológica y funcionalmente menos desarrollado que el de juveniles y adultos. Al momento de la eclosión, el tubo digestivo de las especies marinas está ubicado en posición dorsal al saco vitelino y es un tubo más o menos recto e indiferenciado (Govoni et al., 1986). También se ha reportado la presencia del hígado y del páncreas (Calzada et al., 1998). A pesar del incipiente

grado de desarrollo, se ha registrado la actividad enzimática digestiva de proteasas, carbohidrasas y lipasas poco después de la eclosión (Sarasquete *et al.*, 1995).

Los primeros días de vida se caracterizan por un progresivo desarrollo morfológico de las estructuras del tubo digestivo (Tanaka, 1973). Al inicio de la primera alimentación, el tubo digestivo presenta una diferenciación inicial estructural y funcional (Fig. 5). Se pigmentan los ojos y ocurre la apertura de la boca y del ano. Se observa la presencia del hígado y páncreas, ambos funcionales. La mucosa en los intestinos anterior y posterior presenta pliegues en desarrollo y enterocitos con numerosas microvellosidades que en conjunto aumentan la superficie de absorción. En algunas especies se ha reportado un recto corto (Calzada *et al.*, 1998; Peña, 2000). Del mismo modo, es posible distinguir un estómago primordial que ha iniciado su desarrollo. Esta diferenciación inicial posibilita a las larvas para la búsqueda, la ingestión, la digestión y la absorción del alimento vivo durante la primera alimentación.

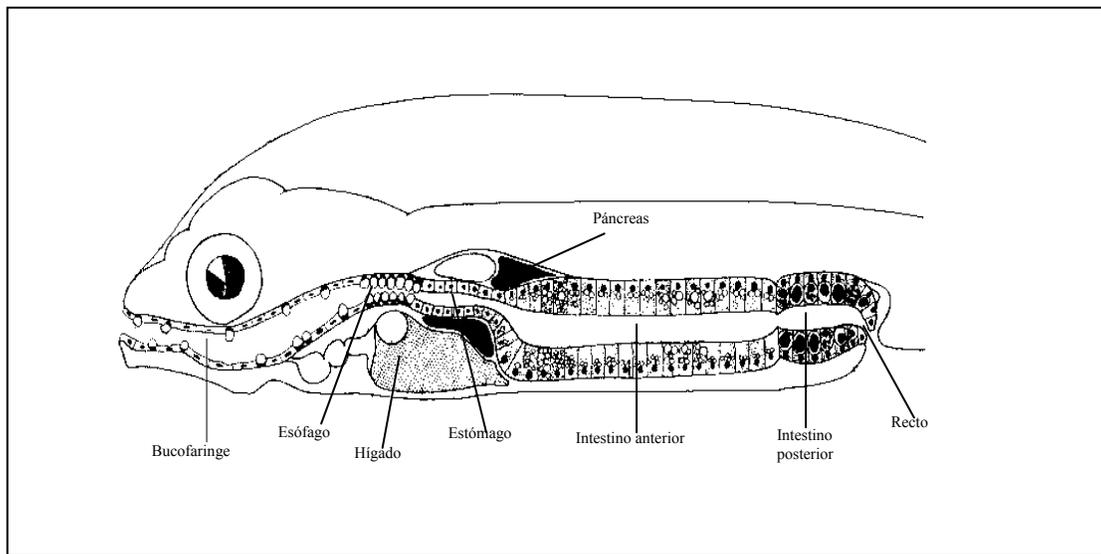


Figura 5. Diagrama generalizado del tubo digestivo al momento de la primera alimentación de larvas de peces marinos. Modificado de Tanaka (1973).

La actividad enzimática digestiva presenta un desarrollo sincrónico a la diferenciación estructural del tubo digestivo. En el páncreas inicia la formación de gránulos de zimógeno con enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas y carbohidrasas, a partir del segundo día de desarrollo; los cuales, posteriormente son secretados hacia el intestino anterior donde son activados (Kurokawa y Suzuki, 1995; 1996). De manera general, una gran diversidad de actividades enzimáticas digestivas ha sido detectada durante los primeros días del desarrollo de las larvas de varias especies (Tabla I, pág. 23).

Una vez iniciada, la actividad enzimática digestiva aumenta gradualmente con el desarrollo, aunque pueden ocurrir fluctuaciones influenciadas por cambios en la maduración del tubo digestivo y por cambios en el tipo y cantidad de alimento suministrado (Hjelmeland *et al.*, 1988; Munilla-Moran *et al.*, 1990; Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Zambonino-Infante *et al.*, 1996; Cahu *et al.*, 1998).

Los mecanismos de absorción varían muy poco entre las especies. De manera general, la mucosa intestinal secreta peptidasas y disacaridasas que hidrolizan oligopéptidos y oligosacáridos -productos de la acción de las enzimas pancreáticas- en péptidos, aminoácidos y monosacáridos, respectivamente, que posteriormente son absorbidos por los enterocitos con la ayuda de las fosfatasas ácida y alcalina que intervienen en el proceso de absorción de nutrientes al nivel de microvellosidades, en la región apical de las células intestinales. Los enterocitos del intestino anterior se caracterizan por la presencia de vacuolas lipídicas digestivas, resultantes de la absorción de ácidos grasos y monoglicéridos de los lípidos hidrolizados.

En el intestino posterior, los enterocitos muestran vesículas y vacuolas supranucleares, resultado del proceso de pinocitosis de proteínas que posteriormente son digeridas intracelularmente (Watanabe, 1982a; 1984a). Algunos autores consideran esta absorción, y posterior digestión intracelular de proteínas, como un mecanismo para compensar la incompleta digestión proteica extracelular, debida al escaso desarrollo del

tubo digestivo y/o a la ausencia de un estómago funcional en las primeras fases del desarrollo.

Tabla I.- Actividad enzimática digestiva registrada durante el desarrollo de larvas de diferentes especies de peces marinos.

TIPO DE ENZIMA	ESPECIE	EDAD (DÍAS)	REFERENCIA
Proteasas			
Tripsina	<i>Sparus aurata</i>	0*	Sarasquete <i>et al.</i> (1993)
	<i>Theragra chalcogramma</i>	0*	Oozeki y Bailey (1995)
	<i>Lates calcarifer</i>	0*	Walford y Lam (1993)
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0*	Alliot <i>et al.</i> (1977)
	<i>Solea senegalensis</i>	2	Ribeiro <i>et al.</i> (1999b)
Aminopeptidasa	<i>Chanos chanos</i>	21	Ferraris <i>et al.</i> (1987)
	<i>Solea senegalensis</i>	1	Ribeiro <i>et al.</i> (1999a)
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	0*	Kurokawa y Suzuki (1998)
	<i>Psetta maxima</i>	1	Cousin <i>et al.</i> (1987)
Quimotripsina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0*	Alliot <i>et al.</i> (1977)
Pepsina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	24	Zambobino y Cahu (1994)
Leucil-alanina-peptidasa	<i>Solea senegalensis</i>	6	Ribeiro <i>et al.</i> (1999b)
Carbohidrasas			
α amilasa	<i>Theragra chalcogramma</i>	0*	Oozeki y Bailey (1995)
	<i>Sparus aurata</i>	3	Moyano <i>et al.</i> (1996)
	<i>Solea senegalensis</i>	3	Ribeiro <i>et al.</i> (1999b)
α glucosidasa	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0*	Alliot <i>et al.</i> (1977)
Lipasas			
Lipasa	<i>Theragra chalcogramma</i>	0*	Oozeki y Bailey (1995)
	<i>Solea senegalensis</i>	12	Ribeiro <i>et al.</i> (1999a)
Esterasas			
Esterasa no específica	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0*	Alliot <i>et al.</i> (1977)
Fosfatasa			
Fosfatasa alcalina	<i>Pleuronectes ferrunginea</i>	3	Baglolle <i>et al.</i> (1998)
	<i>Sparus aurata</i>	0*	Sarasquete <i>et al.</i> (1993)
	<i>Chanos chanos</i>	3	Ferraris <i>et al.</i> (1987)
	<i>Solea senegalensis</i>	3	Ribeiro <i>et al.</i> (1999b)
Fosfatasa ácida	<i>Sparus aurata</i>	0*	Sarasquete <i>et al.</i> (1993)
	<i>Solea senegalensis</i>	2	Ribeiro <i>et al.</i> (1999a)
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0*	Alliot <i>et al.</i> (1977)

* La edad 0 indica el momento de la eclosión.

Por su parte, el recto, debido a las características de sus enterocitos (menor cantidad de microvellosidades), parece estar relacionado principalmente con procesos de recuperación de iones y agua, e incluso se ha reportado que actúa en la recuperación de tripsina (Pedersen y Hjelmeland, 1988).

Una vez diferenciado el tubo digestivo, es común que éste sufra una serie de torsiones, aumentando el tiempo de permanencia del alimento, así como la eficiencia alimenticia de las larvas (Govoni *et al.*, 1986). La aparición de las glándulas gástricas es considerada como el último evento de importancia en el desarrollo del tubo digestivo, igualmente, son la única diferencia en la capacidad digestiva entre larvas y juveniles (Boulhic y Gabaudan, 1992; Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Bisbal y Bengtson, 1995). El tiempo de aparición de las glándulas gástricas varía de manera interespecífica, pudiendo ocurrir a los 16 días en larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), a los 20 días en *Pagrus major* (Tanaka, 1973), o a los 31 días en *Paralichthys dentatus* (Bisbal y Bengtson, 1995). Pocos días después de la aparición de las glándulas gástricas, ocurre una transición en los mecanismos digestivos. Inicia la secreción de pepsinógeno y ácido clorhídrico con la consecuente disminución del pH gástrico (Segner, 1996). Existe evidencia que sugiere que al inicio de la actividad proteolítica en el estómago, el número de vesículas pinocitóticas en el intestino posterior decrece considerablemente como resultado de la disminución de la digestión intracelular (Ribeiro *et al.*, 1999a; Peña *et al.*, 2003). No obstante, es posible observar la presencia de vesículas pinocitóticas tanto en juveniles como en adultos (Watanabe, 1984b).

I.4. Absorción de proteínas.

La ausencia de un estómago funcional en la gran mayoría de las larvas de peces, sugiere que éstas presentan diferentes mecanismos de digestión proteica. Iwai y Tanaka (1968) reportaron la presencia de vesículas acidófilas en los enterocitos del intestino posterior de larvas de *Hemiramphus sajori*. También observaron que el tamaño de las

vesículas aumentaba con el desarrollo y sugirieron que se debían a la absorción de proteínas. Posteriormente, Iwai (1969) registró, en larvas y juveniles de *Cyprinus carpio*, una relación entre las vesículas acidófilas y un aumento en el número de lisosomas que las rodean, sugiriendo una digestión intracelular.

A partir de entonces se ha reportado la presencia de vesículas pinocitóticas tanto en larvas (Watanabe, 1981; 1982a; 1982b; 1984a; Segner y Rösch; 1998; Peña 2000) como en juveniles y adultos (Stroband y Dabrowski, 1979; Stroband y van der Veen, 1981; Watanabe, 1982a; 1982b; 1984b) de diferentes especies que pueden o no presentar un estómago funcional en los periodos juvenil y adulto.

Watanabe (1982b) describió el proceso de pinocitosis en larvas y juveniles de cinco especies. Utilizando peroxidasa de rábano como marcador, clasificó el proceso en cinco etapas principales: ingestión, transporte, acumulación, digestión y extinción (Fig. 6, pág. 26). Cada etapa ocurre a tiempos diferentes entre especies. Sin embargo, el tiempo en alcanzar la etapa de digestión fue menor en larvas que en juveniles. En este mismo estudio concluyó que las larvas utilizan la pinocitosis y la digestión intracelular como mecanismo principal de digestión proteica a falta de un estómago funcional durante los primeros días de desarrollo. Posteriormente, Watanabe (1984b) encontró que la actividad pinocitótica de las células intestinales disminuye después de la aparición de las glándulas gástricas y sugirió que ocurre como resultado a un cambio de los mecanismos de digestión proteica. Peña *et al.* (2003) registraron que las vacuolas pinocitóticas del intestino posterior de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, aparecen a los 4 días y eventualmente desaparecen después de la aparición de las glándulas gástricas, lo que comprueba la hipótesis de un relevo en el mecanismo digestivo de proteínas.

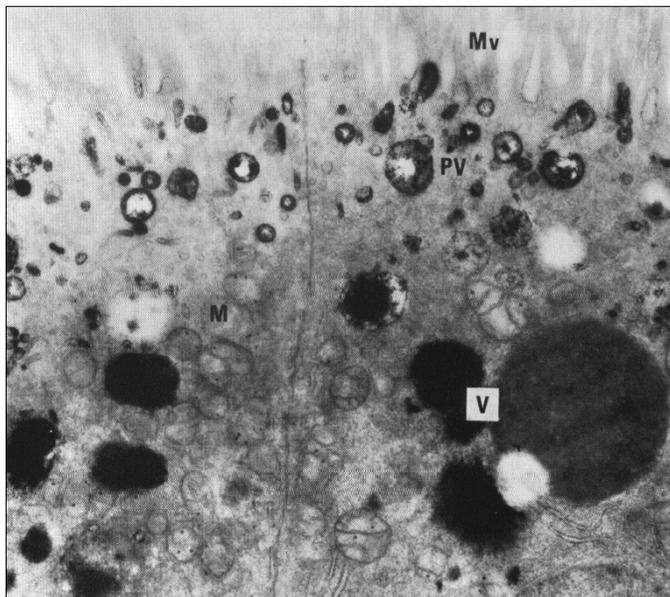


Figura 6. Microfotografía del intestino posterior. Se observan las etapas del proceso de absorción y digestión intracelular de proteínas en los enterocitos del intestino posterior. Mv,- microvellosidades; Pv.- vesículas pinocíticas; V.-vacuola pinocítica. Tomado de Watanabe (1984a).

Estudiar y caracterizar el proceso de absorción de proteínas, así como el proceso de digestión intracelular reviste gran importancia en la nutrición de larvas durante el cultivo. Por un lado, se puede evaluar la aceptación de dietas artificiales, ya sean experimentales o comerciales, y por otro lado, se puede determinar indirectamente desarrollo de la función digestiva de los enterocitos del intestino posterior.

I.5. Efecto de la inanición

Además de la depredación, la disponibilidad de alimento es una de las principales causas de mortalidad de las larvas de peces marinos (McFadzen *et al.*, 1994). Puede afectar el reclutamiento en las poblaciones naturales (O'Connell, 1980) y aumentar la vulnerabilidad de las larvas a ser depredadas (Oozeki *et al.*, 1989), así como la calidad de la semilla durante el cultivo (O'Connell, 1980, Theilacker, 1986). Varios autores han demostrado que las larvas de peces son más susceptibles a la inanición al momento de la primera alimentación, (McGurk, 1984; Martin y Wright, 1987; Yin y Blaxter, 1987; Richard *et al.*, 1991; Yúfera *et al.*, 1993).

Los periodos de inanición muy prolongados, pueden influir negativamente en la capacidad de alimentación y desarrollo posteriores de las larvas (Yúfera *et al.*, 1993). Además, las larvas llegan a un punto de deterioro físico conocido como punto de no retorno (PNR) (Blaxter y Hempel, 1963). Este punto corresponde al momento donde las larvas todavía están vivas, pero están demasiado débiles para alimentarse, aún cuando el alimento esté disponible, por lo que la muerte es inminente.

Los efectos de la inanición (total o temporal) han sido evaluados en larvas de diferentes especies a nivel morfológico, en base a mediciones morfométricas (Ehrlich *et al.*, 1976; Theilacker, 1978; 1986). Yin y Blaxter (1986) en larvas de *Gadus morhua* y *Platichthys flesus* y Yúfera *et al.* (1993) en larvas de *Sparus aurata*, utilizaron caracteres morfológicos como la altura de los miotomos, la altura del tubo digestivo, la altura del ojo, la altura de la cabeza y la longitud del cuerpo como indicadores del estado de nutrición de las larvas. Así mismo, mediante análisis histológicos se evaluaron las deformaciones como la reducción de la altura de los enterocitos, reducción del diámetro de los hepatocitos y atrofia de las fibras de tejido conectivo en larvas de *Psetta maxima* (McFadzen *et al.*, 1994), *Engraulis mordax* (O'Connell, 1976; 1980; Theilacker y Watanabe, 1989), *Kareius bicoloratus* (Oozeki *et al.*, 1989), *Anguilla japonica* (Inui y Egusa, 1967), *Clupea harengus*, *Pleuronectes platessa* (Ehrlich *et al.*, 1976), *Theragra chalcogramma* (Theilacker y Porter, 1995) y *Pomacentrus coelestis* (Hall y Bellwood, 1995). Theilacker (1978) y Kjorsvik *et al.* (1991) sostienen que el tubo digestivo y las glándulas asociadas son los primeros órganos en mostrar los efectos de la inanición, los cuáles se ven reflejados en alteraciones a nivel histológico. En años recientes, se han empleado técnicas bioquímicas que permiten establecer la condición nutricional de las larvas a través de la determinación de la tasa RNA/DNA (Clemmesen, 1996).

Ya sea con fines de cultivo ó como medio de estimación de las tasas de reclutamiento, es importante conocer el estado de la condición nutricional de las larvas de peces. Gracias a la descripción de los efectos de la inanición a nivel morfométrico,

histológico y/o bioquímico, ha sido posible establecer ciertos indicadores de inanición, por ejemplo, una mucosa intestinal con una talla inferior a 10 μm (Theilacker, 1978) o una baja tasa RNA/DNA (Clemmesen, 1996), con los que se puede inferir el estado nutricional de las larvas, ya sea en el medio natural ó en el sistema de cultivo. Un indicador debe ser específico, en el sentido de que las larvas mal nutridas puedan ser detectadas antes de alcanzar el punto de no retorno.

II. ANTECEDENTES

II.1. Biología de la especie

La cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus* (Serranidae: Percoidei) (Fig. 7), se distribuye desde Monterey, California, hasta Mazatlán, México (Miller y Lea, 1972). Habita principalmente en fondos rocosos y arenosos. Es un carnívoro de hábitos diurnos y nocturnos. Su espectro alimenticio está basado principalmente de crustáceos y peces pequeños, aunque ha sido registrada la ingesta de moluscos, gasterópodos y otros invertebrados (Lluch-Cota, 1995). Su modalidad reproductiva corresponde a la de un hermafrodita protogínico (Hastings, 1989; Lluch-Cota, 1995).

Es abundante en las aguas del noroeste de México y aún cuando no es comercializada en cantidades importantes, alcanza precios elevados en el mercado, y según Lluch-Cota (1995), su carne es considerada como de primera calidad.

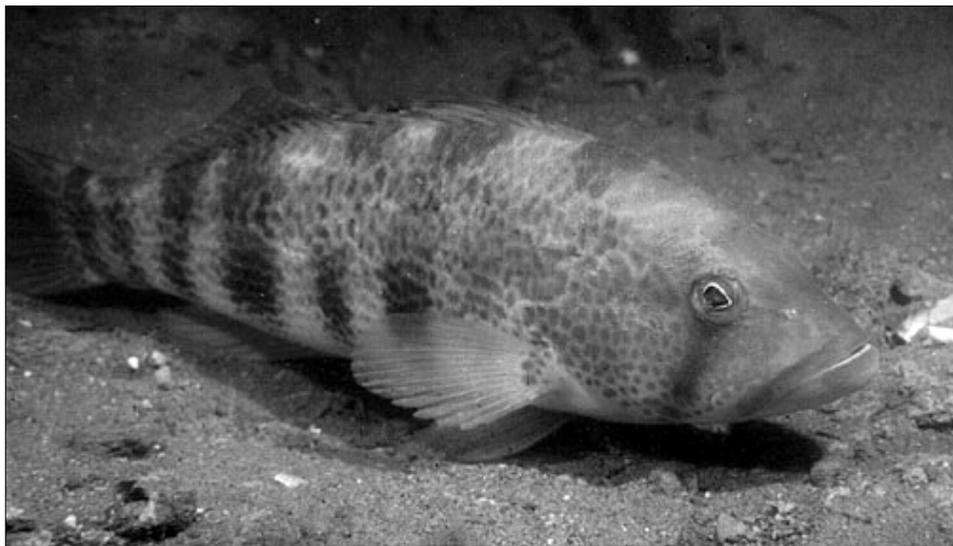


Figura 7. Especimen adulto de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

II.2. Experiencias de cultivo

A principios de la década pasada, diferentes centros de investigación como el Centro Regional de Investigaciones Pesqueras-La Paz, el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, y la Universidad Autónoma de Baja California Sur, iniciaron los intentos por implementar diferentes técnicas de cultivo de la cabrilla arenera. Así, Matus-Nivón *et al.* (1990) con base a ciertos criterios como crecimiento y resistencia a la manipulación, catalogaron a la cabrilla arenera, entre otras, como una especie con un buen potencial de cultivo.

Los primeros estudios fueron enfocados al mantenimiento y reproducción en cautiverio de la cabrilla arenera. Actualmente, se ha logrado la aclimatación de los reproductores y la obtención de desoves espontáneos mediante la manipulación de fotoperíodo y temperatura (Rosales-Velázquez, 1997). E incluso se ha reportado la conclusión del ciclo de cultivo (Martínez-Díaz *et al.*, 2001). Así mismo, se han publicado un par de manuales con la tecnología necesaria para desarrollar el cultivo a escala comercial de esta especie (Sepesca, 1994; Avilés-Quevedo *et al.*, 1995).

A mediados de la década pasada, comenzaron a abarcarse aspectos relacionados con el cultivo larval. A partir de entonces, se ha determinado que las mejores tasas de crecimiento se obtienen con una densidad de siembra de 50 larvas/litro (Álvarez-González *et al.*, 2001a) y se ha incrementado la sobrevivencia durante el cultivo larval, de 5 % (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995) a 11 % (Álvarez-González *et al.*, 2001a). De manera paralela con el incremento en la sobrevivencia, se implementó un calendario de alimentación que consiste en alimento vivo exclusivamente durante las primeras semanas de cultivo y un destete tardío aproximadamente a las tres ó cuatro semanas después de la eclosión. La Figura 8 (pág. 31) muestra el calendario de alimentación empleado actualmente en la Unidad Piloto de Maricultivos del Centro Interdisciplinario de Ciencias

Marinas del Instituto Politécnico Nacional durante el cultivo de larvas de la cabrilla arenera.

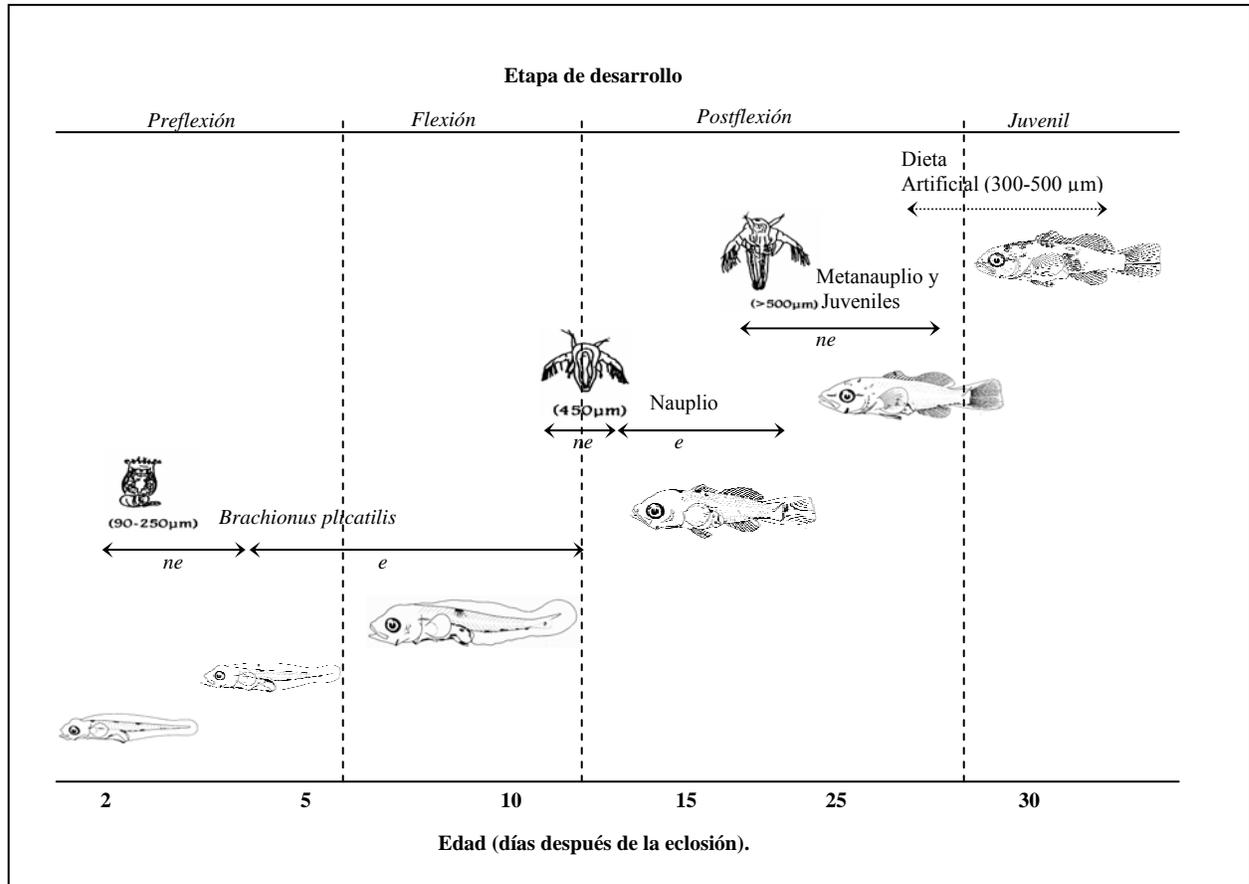


Figura 8. Esquema alimenticio de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) implementado en la Unidad Piloto de Maricultivos del CICIMAR-IPN, basado en edad y estado de desarrollo. Basado en Álvarez-González (1999), Peña (2000); e = enriquecido, ne = no enriquecido.

En un primer intento por sustituir el alimento vivo por un alimento formulado, Anguas-Vélez *et al.* (2000a) realizaron pruebas de destete por coalimentación a los 15, 25 y 30 días de edad, utilizando una dieta artificial experimental con un 55 % de proteína. Obtuvieron una sobrevivencia de 2.7 % y sugirieron que el mejor momento para iniciar el destete es a los 30 días. Sin embargo, en ese momento se desconocían los aspectos

básicos de la estructura y de la capacidad digestiva de las larvas que hacen posible la digestión del alimento.

En una primera etapa por determinar el mejor momento para iniciar el destete de las larvas de la cabrilla arenera, Peña *et al.* (2003) describieron el desarrollo del tubo digestivo y reportaron que a partir del día 5, éste se encuentra diferenciado en bucofaringe, esófago, estómago, intestinos anterior y posterior y recto. La absorción de carbohidratos ocurre en ambos intestinos. Las proteínas son absorbidas en el intestino posterior y los lípidos en el intestino anterior. Las glándulas gástricas se observan en el estómago por primera vez alrededor del día 16 (LT = 7.2 mm a 25° C) y sugirieron que el destete podría llevarse a cabo una vez que se observa la presencia de las glándulas gástricas. Complementariamente, se ha descrito la ontogenia enzimática de larvas de la cabrilla arenera, detectando actividad enzimática desde el momento de la eclosión y actividad proteolítica ácida alrededor del día 12 (Álvarez-González, 2003).

Recientemente, con base a la ontogenia enzimática digestiva, García-Gómez (2003) realizó el destete de larvas de la cabrilla arenera a los 17 y 22 días, con tres dietas microparticuladas cuya principal diferencia era la fuente de proteína (hidrolizado de proteína de pescado, harina de calamar y harina de sangre). Obteniendo una mayor sobrevivencia y crecimiento con la dieta a base de hidrolizado de proteína de pescado cuando el destete se realizó a los 17 días. Cuando el destete se realizó a partir de los 22 días, se observó un mejor crecimiento con la dieta basada en harina de calamar.

También se han realizado estudios sobre los requerimientos nutricionales proteicos de juveniles de la cabrilla arenera. Anguas-Vélez *et al.* (2000b) reportaron que juveniles de 2.5 g requieren al menos 55% de proteína con una dieta artificial a base de caseína. Álvarez-González *et al.* (2001b), recomendaron el uso de una dieta artificial con un contenido de 45-50 % de proteína para juveniles de 9-40 g. Por su parte, Carrasco-Chávez, (2004) identificó cuatro fases en el metabolismo de los lípidos y ácidos grasos de larvas de

la cabrilla arenera, y en juveniles de 0.38 grs, recomendó un nivel de inclusión de lípidos en la dieta artificial igual a 15 %.

III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances reportados en los últimos años en el cultivo de larvas de la cabrilla arenera, aún resaltan dos períodos que se han caracterizado por la presencia de elevadas tasas de mortalidad y que involucran el proceso alimenticio, éstos son: la primera alimentación exógena y la transición de un alimento vivo a una dieta artificial. En conjunto, ambas etapas determinan en gran medida el éxito del cultivo. Una elevada eficiencia alimenticia durante estos períodos críticos permitirá incrementar las tasas de sobrevivencia.

Durante ambos períodos, las larvas deben adaptarse a la presencia de un nuevo alimento. Resulta evidente que un mayor entendimiento de los procesos involucrados en la obtención del alimento tanto en la primera alimentación, así como durante el destete constituye una herramienta de gran utilidad durante el cultivo larval.

Una manera de lograr una mayor comprensión del proceso alimenticio es describiendo el estado de desarrollo de los órganos involucrados en el mismo (i.e. tubo digestivo y sistema visual). En el caso de la cabrilla arenera, el desarrollo del tubo digestivo ha sido descrito previamente (Peña *et al.*, 2003). Por lo que ahora se describe el desarrollo del sistema visual, así como de la eficiencia alimenticia.

La eficiencia alimenticia se refiere a qué tanto alimento es aprovechado por parte de las larvas e implica integrar aspectos como éxito de captura de presas, número de presas ingeridas, tiempo de permanencia del alimento en el tubo digestivo, tasa de asimilación del alimento ingerido, tasas de evacuación, etc. En la presente tesis, el término eficiencia alimenticia se refiere a la presencia de alimento en el tubo digestivo, básicamente dos evaluaciones son consideradas: la incidencia alimenticia, definida como el porcentaje de larvas con alimento presente en el tubo digestivo; y la intensidad alimenticia, la cual es el número de presas dentro del tubo digestivo de las larvas. Estas evaluaciones permitirán planificar los esquemas de producción del alimento vivo.

Por su parte, la primera alimentación constituye uno de los principales eventos dentro del ciclo de vida de los peces, durante el cual, las larvas deben comenzar a alimentarse. Ahora bien, considerando las tasas de mortalidad observadas durante este proceso, es importante establecer el efecto de aquellas condiciones de cultivo que favorezcan el inicio del proceso alimenticio, incrementando así la eficiencia alimenticia, lo cual puede traducirse en una mayor sobrevivencia durante los primeros días de desarrollo.

Además, es durante este momento en que las larvas son más susceptibles a la inanición, lo cual puede traducirse en larvas de baja calidad con bajas tasas de crecimiento y elevada incidencia de deformaciones que ponen en riesgo la calidad de las larvas producidas. Es por ello que deben evaluarse los efectos producidos por un retraso en la primera alimentación, así, será posible la identificación de aquellos caracteres que denotan cierto grado de inanición durante el cultivo larval.

Actualmente, la implementación de una estrategia de sustitución de alimento vivo por un alimento artificial, es un paso que se considera como fundamental en el establecimiento de un cultivo comercial rentable. Numerosas son las razones que apoyan la implementación de una estrategia de destete temprano. No obstante, antes de realizar el destete es necesario conocer la fisiología digestiva de las larvas, para ello, es necesario caracterizar el desarrollo de la capacidad digestiva de las larvas mediante la descripción de la ontogenia enzimática.

Por otro lado, la presencia de la dieta artificial como único alimento puede producir efectos que eventualmente se traducen en baja tasas de sobrevivencia. Resalta la necesidad de caracterizar el efecto de la dieta artificial en el desarrollo de las larvas. De esta forma podrá optimizarse la estrategia de destete, así como realizar una evaluación del desempeño de la dieta artificial durante el cultivo larval, lo cual permitirá tomar decisiones referentes a la viabilidad de la dieta artificial que se está empleando.

IV. HIPÓTESIS

Tomando en cuenta el marco anterior. Los estudios realizados con anterioridad (Peña, 2000; Álvarez-González, 2003), sugieren que las larvas de la cabrilla arenera siguen un patrón de desarrollo similar al de otras especies. Sin embargo, aún existen interrogantes que pretenden responderse mediante la presente tesis, es así que se plantearon las siguientes hipótesis:

- Aún cuando se ha corroborado en experimentos anteriores la ingesta de alimento por las larvas de la cabrilla arenera, se desconoce el efecto que diferentes intensidades de luz puedan tener en la eficiencia alimenticia de las larvas. Es de esperarse que las larvas de la cabrilla arenera incrementarán su eficiencia alimenticia a mayores intensidades de luz, y que, por el contrario, no sean capaces de alimentarse en condiciones de oscuridad total. Así mismo, puede esperarse que tanques de cultivo negros y mayores densidades de alimento incrementen la eficiencia alimenticia de las larvas de la cabrilla arenera.
- El desarrollo del sistema visual en larvas de peces marinos presenta un patrón general que consiste en la aparición de conos durante el inicio del desarrollo y la posterior aparición de bastones durante la transformación a juvenil (Evans y Browman, 2004). Es de esperarse que en las larvas de la cabrilla arenera se observe el mismo patrón de desarrollo.
- La temprana detección de larvas que presenten síntomas de inanición y/o malnutrición constituye una herramienta importante en la larvicultura. En la presente tesis se realiza una evaluación, a nivel histológico y morfológico, del efecto del retraso en la primera alimentación sobre el crecimiento y desarrollo de las larvas de la cabrilla arenera. Se pretende comprobar que la inanición tiene un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de las larvas, siendo éste mayor, mientras más tiempo se restrinja la alimentación.

- En otro orden de ideas, mediante técnicas enzimohistoquímicas ha sido posible establecer los sitios de actividad de las enzimas digestivas, siendo particularmente importante la mucosa intestinal (Lojda et al., 1979). De esta forma, en esta tesis se pretende probar que la mucosa intestinal de las larvas de la cabrilla arenera presenta actividad enzimática digestiva desde la primera alimentación, y que la actividad se incrementa durante el desarrollo.
- Por otra parte, durante una estrategia de destete temprano, es de esperarse que las larvas de la cabrilla arenera alimentadas con un alimento inerte presenten un crecimiento menor al de las larvas alimentadas con alimento vivo.
- De esta forma, el efecto de la dieta artificial sobre el desarrollo podrá evidenciarse mediante la evaluación de caracteres histológicos y morfométricos, los cuáles podrán emplearse como indicadores del desempeño de la dieta artificial utilizada.

Con la finalidad de comprobar las hipótesis aquí expuestas, se han planteado los siguientes objetivos.

V. OBJETIVOS

V.1. GENERAL

Describir e integrar aspectos morfológicos, fisiológicos y de cultivo; relacionados con la alimentación y función digestiva de larvas de la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*.

V.2. ESPECÍFICOS

- Describir el desarrollo estructural del sistema visual y evaluar la eficiencia alimenticia de larvas de la cabrilla arenera en condiciones de cultivo.
- Determinar el efecto de la intensidad de luz, el color del tanque y la densidad de alimento en la eficiencia alimenticia de la primera alimentación exógena de la cabrilla arenera.
- Determinar el efecto del retraso de la primera alimentación y establecer indicadores del estado de nutrición de larvas de la cabrilla arenera.
- Describir el desarrollo y la distribución de las actividades enzimáticas digestivas de fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, dipeptidil aminopeptidasa IV, aminopeptidasa M y esterasa no específica, de larvas de la cabrilla arenera, por medio de técnicas enzimohistoquímicas.
- Determinar los efectos del destete con de una dieta artificial microparticulada sobre el desarrollo, a nivel histológico y morfológico de las larvas de la cabrilla arenera.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Para cada uno de los bioensayos reportados en la presente tesis, se obtuvo un desove espontáneo de diferentes lotes de reproductores de la cabrilla arenera, los cuales fueron mantenidos en el laboratorio de Biología Experimental del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN). Las condiciones de cultivo de los reproductores fueron las mismas en cada desove obtenido: temperatura y fotoperíodo de 23°C y 13:11 luz:oscuridad, respectivamente. Los reproductores fueron alimentados con trozos de sardina y calamar a saciedad aparente. Los reproductores desovan durante la noche y los huevos son recolectados a la mañana siguiente en un sistema recolector que consta de una serie de tamices. Seguidamente, se realizó una evaluación volumétrica del desove, la cual considera a los huevos viables como los que flotan y a los muertos como los que no flotan (Rosales-Velázquez (1997).

Posteriormente, los huevos viables fueron transportados a la Unidad Piloto de Maricultivos del CICIMAR-IPN, y fueron sembrados en una tolva de incubación de 100 l a una temperatura de 25° C y salinidad de 35 ups, y aireación constante, hasta el momento de la eclosión. Posteriormente fueron sembrados y sometidos a diferentes diseños experimentales, los cuales se detallan a continuación.

VI.1. SISTEMA VISUAL Y EFICIENCIA ALIMENTICIA

Los eleuteroembriones fueron sembrados a una densidad inicial de 150 eleuteroembriones/l en tres tanques de 100 l con agua de mar filtrada a $25 \pm 0.2^\circ$ C, 35 ups de salinidad y fotoperíodo de 12:12 (luz:oscuridad). La intensidad de luz en la superficie de los tanques de cultivo era de 500-540 lux. Las larvas se alimentaron una vez al día (por la mañana), desde el día 2 al día 4 con rotíferos *Brachionus plicatilis* (1-3 rotíferos/ml); rotíferos enriquecidos con Selco™ (Artemia Systems, Bélgica) desde el día 5 al día 13 (7-10

rotíferos/ml); nauplios de *Artemia* enriquecidos (1-4 nauplio/ml) desde el día 12 al día 17; y juveniles de *Artemia* (0.25 juveniles/ml) desde el día 14 al día 22. Las cantidades y tiempos de enriquecimiento de los rotíferos y los nauplios de *Artemia* fueron las recomendadas por el productor. No se suministraron microalgas durante este bioensayo.

VI.1.1. Desarrollo del sistema visual.

Diariamente, desde la eclosión hasta el día 14, y posteriormente cada dos días hasta el día 22, un total de 40 larvas fueron recolectadas de manera aleatoria antes de la alimentación. Se anestesiaron con metil sulfonato de tricaina (Sargent, USA) (MS-222, 35 mg/l) y fueron fijadas con formol al 4 %. Posterior a un proceso de deshidratación en varias magnitudes de alcohol, fueron incluidas en una doble matriz de alginato y parafina (Muñetón-Gómez *et al.*, 1989). Se obtuvieron cortes sagitales de 5 μ m de espesor con un microtomo de rotación y fueron teñidos con hematoxilina-eosina (Davenport, 1960). Se analizaron las muestras con un microscopio óptico para describir el desarrollo del ojo. Adicionalmente, se midió el diámetro de la lente y la altura de las capas de la retina utilizando el software de análisis de imágenes Image Pro Plus v4.5 (Media Cybernetics, MD USA).

VI.1.2. Evaluación de la eficiencia alimenticia.

Todos los días desde el día 2 al día 12 y cada dos días hasta el día 18 y finalmente el día 21, treinta larvas de cada tanque fueron recolectadas una hora después de la alimentación. Las larvas fueron anestesiadas y fotografiadas con el analizador de imágenes Image Pro Plus v4.5, para medir la longitud total (LT), diámetro del ojo (DE) y altura de la cabeza (AC). Así mismo, se determinaron la incidencia e intensidad alimenticias para cada día de muestreo. La incidencia alimenticia se determinó como el porcentaje de larvas recolectadas que presentaban alimento en el tubo digestivo. La intensidad alimenticia se midió como el número de presas contadas en el tubo digestivo (Yin y Blaxter, 1987). Ambas mediciones se realizaron con un microscopio estereoscópico (Olympus, SZ40, Japón).

Los datos sobre la incidencia alimenticia fueron transformados utilizando $\sqrt{\arcsen x}$ antes de realizar los análisis estadísticos. Se realizó una ANOVA de una vía. Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó una prueba de Tukey ($P < 0,05$).

VI.2. PRIMERA ALIMENTACIÓN Y EFICIENCIA ALIMENTICIA

En un primer experimento se determinó el efecto de la intensidad luminosa, y en el segundo se describió el efecto de la densidad de alimento y color del tanque de cultivo sobre la eficiencia alimenticia de las larvas durante la primera alimentación.

VI.2.1. Efecto de la intensidad luminosa.

Se determinó por triplicado el efecto de cuatro intensidades de luz (0, 100, 400 y 700 lux). Para ello se utilizaron 12 acuarios de vidrio de 10 l (30 cm de largo, 20 cm de alto y 20 cm de ancho). La luz se suministró con 8 lámparas blancas de luz fluorescente de 75 watts c/u (Phillips). Las diferentes intensidades luminosas se obtuvieron colocando los acuarios a diferentes distancias de la fuente de luz y cubriéndolos con una malla cuando era necesario. La intensidad luminosa se midió con un fotómetro (L246373, Extech Inst. USA) en la superficie del agua. Para proveer una iluminación homogénea, los acuarios fueron forrados con papel blanco. Las larvas se sembraron en los acuarios al momento de la primera alimentación (día 2), a una densidad de 50 larvas/l. Después de un periodo de aclimatación de dos horas, las larvas fueron alimentadas con rotíferos *Brachionus plicatilis* sin enriquecer a una densidad de 3 rotíferos/ml. No se agregaron microalgas en los acuarios.

Una hora después de la alimentación, 30 larvas fueron recolectadas de cada acuario y anestesiadas con MS-222 (35 mg/l). La eficiencia alimenticia se evaluó como la incidencia y la intensidad alimenticia, descritas en el apartado anterior.

Los datos sobre la incidencia alimenticia fueron transformados utilizando $\sqrt{\arcsen x}$ antes de realizar los análisis estadísticos. Los datos transformados de la incidencia

alimenticia y los datos de la intensidad alimenticia fueron analizados con un ANOVA de una vía con la intensidad luminosa como factor. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó una prueba de Tukey ($P < 0,05$).

VI.2.2. Efecto del color del tanque y la densidad de alimento.

Se utilizaron 27 acuarios de vidrio de 10 l (30 cm largo, 20 cm de alto y 20 cm de ancho), de diferente color (9 blancos, 9 grises y 9 negros). Para proveer una iluminación homogénea, los acuarios fueron pintados con pintura epóxica no tóxica (Prometal, Fulmex E-26-B, México). Un día después de la eclosión, se sembraron las larvas en los acuarios a una densidad inicial de 50 larvas/l. Con base a los resultados obtenidos con respecto al efecto de la intensidad de luz sobre la eficiencia alimenticia, los acuarios se mantuvieron bajo una intensidad de luz que fluctuaba entre los 500 y 700 lux. Las condiciones de cultivo fueron temperatura de 25° C y salinidad de 35 ups, el fotoperíodo fue de 12:12 (luz:oscuridad).

Al día 2, las larvas fueron alimentadas con el rotífero *Brachionus plicatilis* en tres densidades diferentes (5, 10 y 15 rotíferos/ml) por triplicado para cada color de tanque. *Nannochloropsis oculata* se agregó a los acuarios como "agua verde" a una densidad de 300, 000 céls/ml. Una hora después de cada alimentación, se recolectaron 30 larvas por acuario y se anestesiaron con MS-222 (35 mg/l). La eficiencia alimenticia se determinó mediante la incidencia y la intensidad alimenticia, descritas anteriormente.

Los datos sobre la incidencia alimenticia fueron transformados utilizando $\sqrt{\arcsen x}$ antes de realizar los análisis estadísticos. A los datos se les aplicó un ANOVA de 2 vías con el color del tanque y la densidad de presas como factores. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó una prueba de Tukey ($P < 0,05$).

VI.2.3. Efecto del retraso en la primera alimentación en el desarrollo y eficiencia alimenticia.

Los eleuteroembriones recién eclosionados fueron sembrados en 12 tanques de 100 l a una densidad inicial de 50 larvas/l. Las condiciones de cultivo fueron de $24 \pm 0,4$ ° C y 36 ups. Cuatro tratamientos fueron evaluados por triplicado: la primera alimentación a partir del día 2 como control; y un retraso en la primera alimentación de 1 día (D1), 2 días (D2), y 3 días (D3). Un lote de larvas se mantuvo en inanición total.

El régimen alimenticio fue el mismo para todos los tratamientos: rotífero *Brachionus rotundiformis* (5 rotíferos/ml) por dos días; rotíferos enriquecidos con Selco® (*Artemia* Systems, Belgium) (5 rotíferos/ml) durante 10 días; y nauplios de *Artemia* enriquecidos con Selco® (3-5 nauplios/ml), durante 10 días. Las concentraciones y tiempos utilizados del enriquecedor fueron aquellos recomendados por el productor.

Desde la eclosión y hasta el día 19, 30 larvas fueron recolectadas de cada tanque una hora después de la alimentación. Se anestesiaron y fotografiaron con el analizador de imágenes Image Pro Plus v4.5. Se realizó la medición de 6 caracteres morfométricos: Longitud total (LT), altura del cuerpo (ACP), diámetro del ojo (DO), altura de la cabeza (AC), altura del hígado (AH), altura del tubo digestivo (ATD) y altura del músculo (AM) (Yúfera *et al.*, 1993) (Fig. 9, pág. 44).

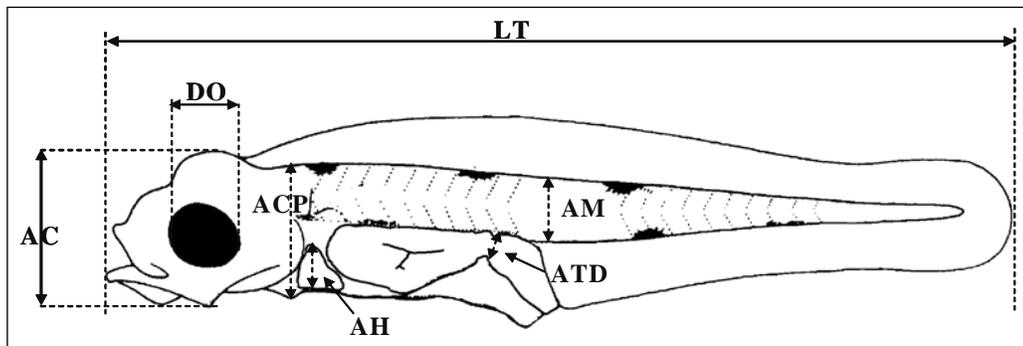


Figura 9. Diagrama esquemático con las mediciones tomadas en las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). AC = altura de la cabeza; ACP = altura del cuerpo; AH= altura del hígado; AM = altura del músculo; ATD = altura del tubo digestivo; DO = diámetro del ojo; LT = longitud total.

En cada día de muestreo, adicionalmente se recolectaron 30 larvas de cada tratamiento. Se anestesiaron y se fijaron con solución Bouin. Después de 24 horas se preservaron en alcohol etílico al 70 %. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de 5 μm de espesor. Los cortes fueron teñidos con la técnica histológica general de hematoxilina-eosina (Davenport, 1960). Las preparaciones permanentes fueron fotografiadas con el analizador de imágenes Image Pro Plus v4.5 y se midieron la altura de los enterocitos en las dos secciones del intestino (desde la membrana basal hasta la punta del borde de cepillo) y el área del núcleo de los hepatocitos (Fig. 10, pág. 45).

Se determinaron la incidencia e intensidad alimenticia para cada tratamiento en cada día de muestreo, siguiendo la metodología de los capítulos anteriores. El punto de no retorno se determinó como el tiempo en días en que la incidencia alimenticia de la primera alimentación disminuye a menos del 50 % de la incidencia alimenticia máxima registrada entre los tratamientos (Blaxter y Hempel, 1963; Yúfera *et al.*, 1993).

Todas las mediciones fueron analizadas con un ANOVA de una vía con el tiempo de inanición como factor. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó una prueba de Tukey ($P < 0,05$).

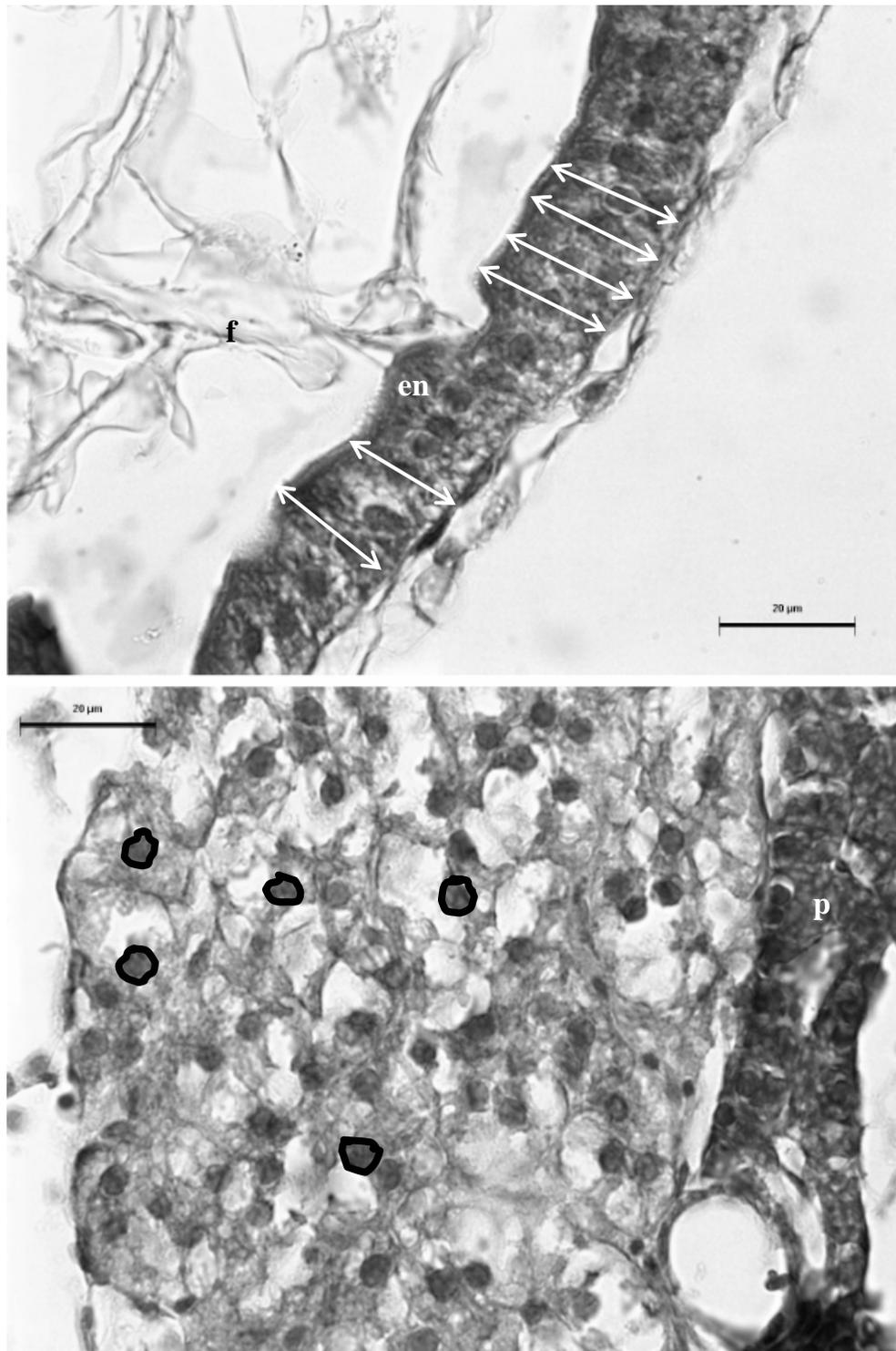


Figura 10. Microfotografía de la mucosa intestinal (A) y del hígado (B) de las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) con las mediciones realizadas. Tinción, hematoxilina-eosina. Barras = 20 μm. f = alimento, en = enterocitos, p = páncreas.

VI.3. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y ALIMENTACIÓN DE LARVAS

VI.3.1. Desarrollo y distribución de la actividad enzimática digestiva.

Los eleuteroembriones fueron sembrados en 12 tanques de 100 l a una densidad de 50 larvas/l. Las condiciones de cultivo fueron 25.3° C y 35 ups, el fotoperíodo utilizado fue de 12:12 luz:oscuridad.

Las larvas fueron alimentadas a partir del día 2 y hasta el día 4 con el rotífero *Brachionus plicatilis* (densidad promedio 1.7 rotíferos/ml). Rotíferos enriquecidos con Selco® durante los días 5 al 15 (densidad promedio 7.8 rotíferos/ml). *Nannochloropsis oculata* se agregó a los tanques como “agua verde” desde el día 1 al día 5 a una densidad de 300 000 células/ml. Nauplios de *Artemia* se agregaron durante los días 12 y 13 a una densidad promedio de 1.6 nauplios/ml. Nauplios enriquecidos con Selco® se agregaron durante los días 14 al 29 a una densidad promedio de 7.7 nauplios/ml. *Artemia* de 12 días de edad (densidad promedio 0.1 *Artemia*/ml) fue agregada a las larvas durante los días 20 hasta el final del experimento al día 30.

Se llevaron a cabo recolectas matutinas previas a la alimentación los días 2, 6, 10, 15, 20, 25 y 30. Cada día se recolectaron 30 larvas por cada actividad enzimática determinada. Las larvas fueron anestesiadas con MS-222 (35mg/l) y fotografiadas para el posterior registro de la longitud total (LT) con la ayuda del analizador de imágenes Image Pro Plus v4.5. Inmediatamente después fueron enjuagadas con agua destilada y preservadas en nitrógeno líquido (-156° C) y almacenadas a -80° C hasta el momento de su procesamiento enzimohistoquímico.

Se utilizaron técnicas enzimohistoquímicas para detectar la presencia de la actividad de cinco enzimas digestivas (Tabla II, pág. 48). Estas técnicas permiten la detección del sitio de producción de la actividad enzimática mediante la precipitación de un sustrato específico (Lojda *et al.*, 1979). En el anexo (pág. 137) se presentan en detalle las técnicas utilizadas.

Se realizaron cortes sagitales (10-15 μm), de todas las larvas muestreadas, en un criostato (Carl Zeiss, modelo HMN505-N, Alemania) (-18° a -25° C) en el laboratorio de Histología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, B.C.S.). Los cortes fueron incubados en un sustrato específico y las laminillas fueron selladas permanentemente con gelatina. En todos los casos, como controles negativos, se tomaron cortes que fueron incubados en medios sin el sustrato específico. Todos los reactivos utilizados en las técnicas enzimoquímicas fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO).

Las preparaciones histológicas obtenidas de las pruebas enzimoquímicas se analizaron con la ayuda de un microscopio óptico a diferentes magnitudes (5x, 10x, 40x, 100x). Las regiones que mostraron la presencia de actividad enzimática se registraron mediante el programa analizador de imágenes Image Pro Plus v4.5.

La evaluación de la actividad enzimática consiste en la identificación de las zonas de producción enzimática digestiva mediante una clasificación semicuantitativa de la intensidad de la reacción colorimétrica. Las escalas fueron: reacción negativa (-) (cuando no se observó coloración), reacción débil (+) (cuando fue ligeramente perceptible), reacción moderada (++) y reacción fuerte (+++) (cuando fueron claramente observadas). Este tipo de evaluación ha sido empleado por Segner *et al.* (1989) y Gawlicka *et al.* (1995) en larvas de *Coregonus lavaretus* y *Acipenser transmontanus*, respectivamente.

Tabla II. Técnicas enzimohistoquímicas y sustrato específico utilizado en cada técnica.

Enzima	Sustrato específico	pH	Tiempo de incubación (min)	Referencia
Proteasas				
Aminopeptidasa M (E.C.3.4.11.2)	L-Leucil-4-metoxi- β - naftilamida	6.5	45	Segner <i>et al.</i> , 1989
Dipeptidil-aminopeptidasa IV (E.C.3.4.11.2)	Glicil-prolil-4-metoxi- β - naftilamida	7.2	90	Lojda <i>et al.</i> , 1979
Esterasas				
Esterasa no específica (E.C.3.1.1)	α -naftil acetato	7.4	30	Segner <i>et al.</i> , 1989
Fosfatasas				
Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1)	α -naftil fosfato	9.2	60	Lojda <i>et al.</i> , 1979
Fosfatasa ácida (E.C.3.1.3.2)	β -glicerofosfato	5.0	60	Lojda <i>et al.</i> , 1979

VI.3.2. Efecto del destete en el desarrollo y la condición nutricional.

VI.3.2.1. Determinación del tamaño de la partícula.

Previo a la implementación de la estrategia de destete, fue necesario determinar el tamaño de partícula de la dieta artificial a suministrar. Se realizó la medición del tamaño de la boca de las larvas siguiendo la metodología propuesta por Dabrowski y Bardega (1984). Para ello se midió la longitud de la maxila inferior durante el desarrollo de la cabrilla arenera. Se asume que la apertura de la boca, al momento de la ingesta, presenta un ángulo de 45°. De esta forma, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Tan } (45^\circ) * (\text{longitud maxila inferior})$$

La Figura 11 (pág. 49) muestra el tamaño de la boca durante el desarrollo de la cabrilla arenera a 25° C.

De acuerdo con Hunter (1981), el tamaño óptimo del alimento ingerido por las larvas de peces corresponde a un 40% del tamaño de la boca. Así, se determinó que el tamaño de la boca al día 17 es de $1017.0 \pm 197.8 \mu\text{m}$ y el tamaño inicial de la partícula del alimento artificial a utilizar en el presente experimento correspondió a $428 \mu\text{m}$. Los intervalos de talla de las microparticulas producidas y administradas fueron de $300\text{-}500 \mu\text{m}$ (a partir del día 17) y $500\text{-}700 \mu\text{m}$ (a partir del día 25).

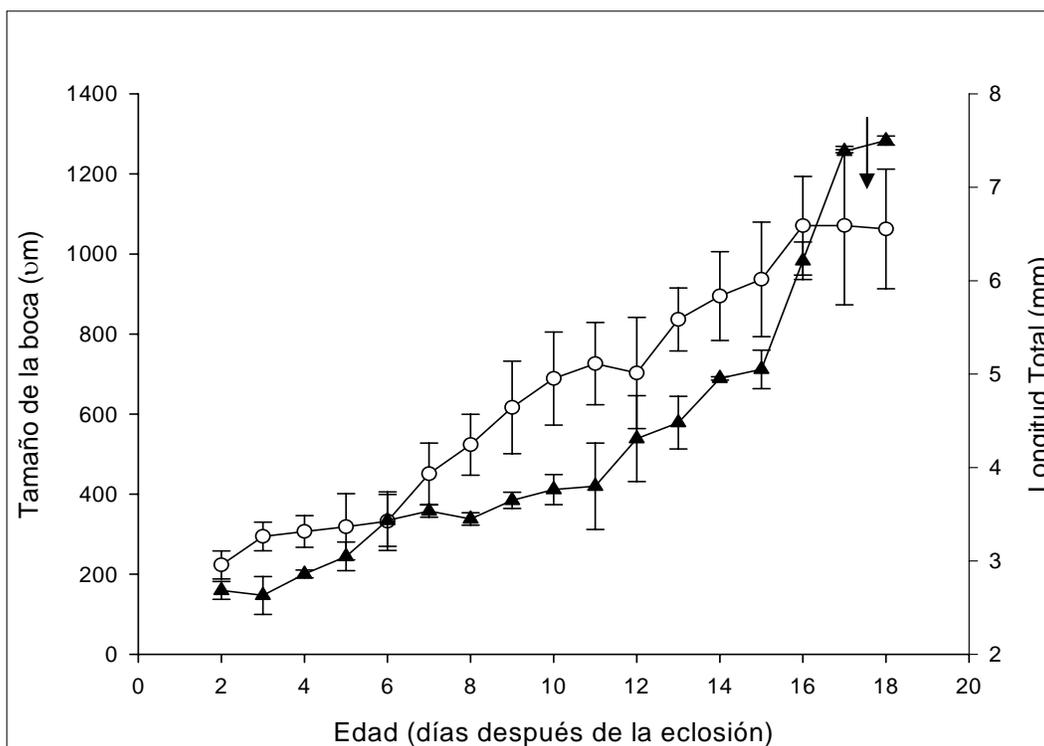


Figura 11. Tamaño de la boca (o) y longitud total (▲) de la cabrilla arenosa desde la primera alimentación, hasta el día 18 a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Los puntos representan los valores promedios ($n=30$). Las barras indican la desviación estándar. La flecha indica el momento de inicio del destete.

VI.3.2.2. Condiciones de cultivo y alimentación

Los eleuterioembriones fueron sembrados en 8 tanques de 120 l a una densidad de 50 larvas/l. Las condiciones de cultivo fueron $25 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ y 35 ups. La intensidad de luz en la superficie del agua fue de 500-700 lux proporcionada por lámparas de luz fluorescente Phillips de 75W, el fotoperíodo fue de 16:08 (luz:oscuridad).

El diseño experimental consistió en un control cuya alimentación fue en base a alimento vivo; y un tratamiento al cual se le suministró una dieta microparticulada a partir del día 17, ambos con 4 réplicas.

A partir del día 2 y hasta el día 5, se agregó *Nannochloropsis oculata* a todos los tanques de cultivo a una densidad de 300,000 células/ml. Las larvas fueron alimentadas a partir del día 2 con el rotífero *Brachionus plicatilis* a una densidad de 5 rotíferos/ml, desde el día 3 y hasta el día 14 se alimentaron con rotíferos enriquecidos con Selco® (Artemia Systems, Bélgica) a la misma densidad. A partir del día 12 se agregaron nauplios de *Artemia* enriquecidos con Selco® a una densidad de 3 nauplios/ml. La cantidad del enriquecedor utilizada en los rotíferos y nauplios de *Artemia* fue la sugerida por el productor.

La sustitución de alimento se inició en cuatro tanques de cultivo a partir del día 17, mediante una coalimentación de 4 días de duración (Tabla III, pág. 51). La dieta artificial suministrada es del tipo microparticulada. La fuente de proteína fue harina de pescado y quistes desencapsulados de *Artemia* (Tabla IV, pág. 51), los cuales representan una fuente de proteína altamente digerible (García-Ortega *et al.*, 2000a). Fue elaborada y proporcionada por el Dr. Armando García Ortega del Centro de Investigación de Alimentos y Desarrollo de Mazatlán. Dicho alimento ha sido empleado en especies como *Clarias gariepinus* (García-Ortega *et al.*, 2000a; 2000b; 2001) y *Sphoeroides annulatus* (García-Ortega *et al.*, 2003). La composición proximal (% peso seco) de la dieta fue proteínas 48.4; lípidos 12.3; cenizas 9.4 y materia seca 91.5 (García-Ortega *et al.*, 2003).

Tabla III. Estrategia de co-alimentación aplicada a las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). La frecuencia alimenticia fue de 4 alimentaciones/día con un intervalo de 4 horas por ración a partir de las 08:00 hrs.

Edad (Días)	Tipo de alimento	
	Nauplios de <i>Artemia</i>	Dieta Artificial
17	3 /ml	0.1 gr
18	2 /ml	0.1 gr
19	1 /ml	0.2 gr
20	1 /ml	0.2 gr
21 – 33	-	Saciedad aparente

Tabla IV. Formulación de la dieta artificial microparticulada utilizada en la estrategia de destete de las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los datos representan el nivel de inclusión (% de peso seco).

Ingrediente	% de inclusión
Quistes desencapsulados de <i>Artemia</i> ^a	74.0
Harina de sardina ^b	15.7
Aceite de hígado de bacalao ^c	2.6
Premezcla de vitaminas ^d	1.7
Premezcla de minerales ^d	1.0
CMC ^e	5.0

^a *Artemia* shell free, INVE Aquaculture Inc. UTA, USA.

^b Harinas y aceites de Occidente, S.A., Mazatlán, México.

^c Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V., México.

^d Malta Cleyton, Malta Texo de México S.A. de C.V.

^e Carboximetilcelulosa sal de sodio, Fluka CEIME, Buchs, Suiza.

VI.3.2.3 Toma de muestras y análisis.

Los días 15, 21, 27 y 33, previo a la alimentación, se realizaron muestreos de 10 larvas por tratamiento. Las larvas fueron anestesiadas con MS-222 (35 mg/l) y se fotografiaron para medir parámetros de desarrollo como, la longitud total (LT), diámetro

del ojo (DO), altura de la cabeza (AC), longitud de la cabeza (LCA) y la altura de la musculatura a nivel del ano (AM). La medición se hizo con el programa Image Pro Plus v4.5. Posterior a la digitalización, las muestras (n=10) fueron liofilizadas durante 24h y se determinó el peso seco en una balanza analítica. Adicionalmente, para evaluar la condición nutricional, los mismos días de muestreo se recolectaron 5 larvas por tratamiento. Estos individuos fueron anestesiados y fijados con formol al 4 %. Después de una deshidratación en alcohol de graduación ascendente, fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes histológicos (5 μ m) en un microtomo de rotación. Posteriormente fueron teñidas con la técnica general hematoxilina-eosina (Davenport, 1960). Las preparaciones permanentes fueron observadas en un microscopio óptico. Utilizando el analizador de imágenes Image Pro Plus v4.5, se tomaron fotografías digitales del intestino posterior, intestino anterior e hígado.

En el intestino anterior se midió la altura de los enterocitos, en el hígado se realizó la medición del área del núcleo de los hepatocitos y en el intestino posterior se llevó a cabo el conteo y la medición del área de las vacuolas pinocitóticas. Los resultados obtenidos se compararon entre el control y el tratamiento de destete.

Los datos de peso seco y las mediciones morfométricas, fueron analizados con una t de student para cada día de muestreo. Los valores de la altura de los enterocitos en el intestino anterior y el área del núcleo de los hepatocitos fueron analizados con un ANOVA de una vía con el tipo de alimento como factor. Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey ($P < 0,05$). El área de las vacuolas pinocitóticas en el intestino posterior se analizó con un análisis de frecuencia χ^2 .

VII. RESULTADOS

VII.1. SISTEMA VISUAL Y EFICIENCIA ALIMENTICIA

VII.1.1. Desarrollo del sistema visual.

Al momento de la eclosión, el ojo está indiferenciado. La lente está presente con un diámetro inicial de $26.0 \pm 3.1 \mu\text{m}$. La retina está formada por células indiferenciadas en un arreglo concéntrico sin estratificación (Fig. 12A, pág. 54).

Al día 1 se observaron cinco capas celulares en la retina. Desde el exterior al interior, estas fueron: capa nuclear externa, capa plexiforme interna, capa nuclear interna, capa plexiforme interna y capa ganglionar. La capa de pigmento epitelial aún no se observa (Fig. 12B, pág. 54). La capa nuclear externa está formada por los segmentos nucleares de los conos en desarrollo.

Al día 2, la capa de pigmento epitelial se observó en la superficie del ojo, rodeando la capa nuclear externa de la retina. (Figs. 13A, pág. 55). Los segmentos externos de los conos sencillos ya estaban bien formados a partir de este día (Figs. 13B, pág. 55; 14A, pág. 56).

A lo largo del periodo de estudio se observó un incremento en la altura de las capas de la retina (Tabla V, pág. 57) y del diámetro del ojo (Fig. 15, pág. 57). El diámetro del ojo está significativamente relacionado a la longitud total $r^2 = 0.993$ ($y = -0.021 + 0.077x$) y a la altura de la cabeza $r^2 = 0.99$ ($y = 0.048 + 0.294x$) (Fig. 16, pág. 58).

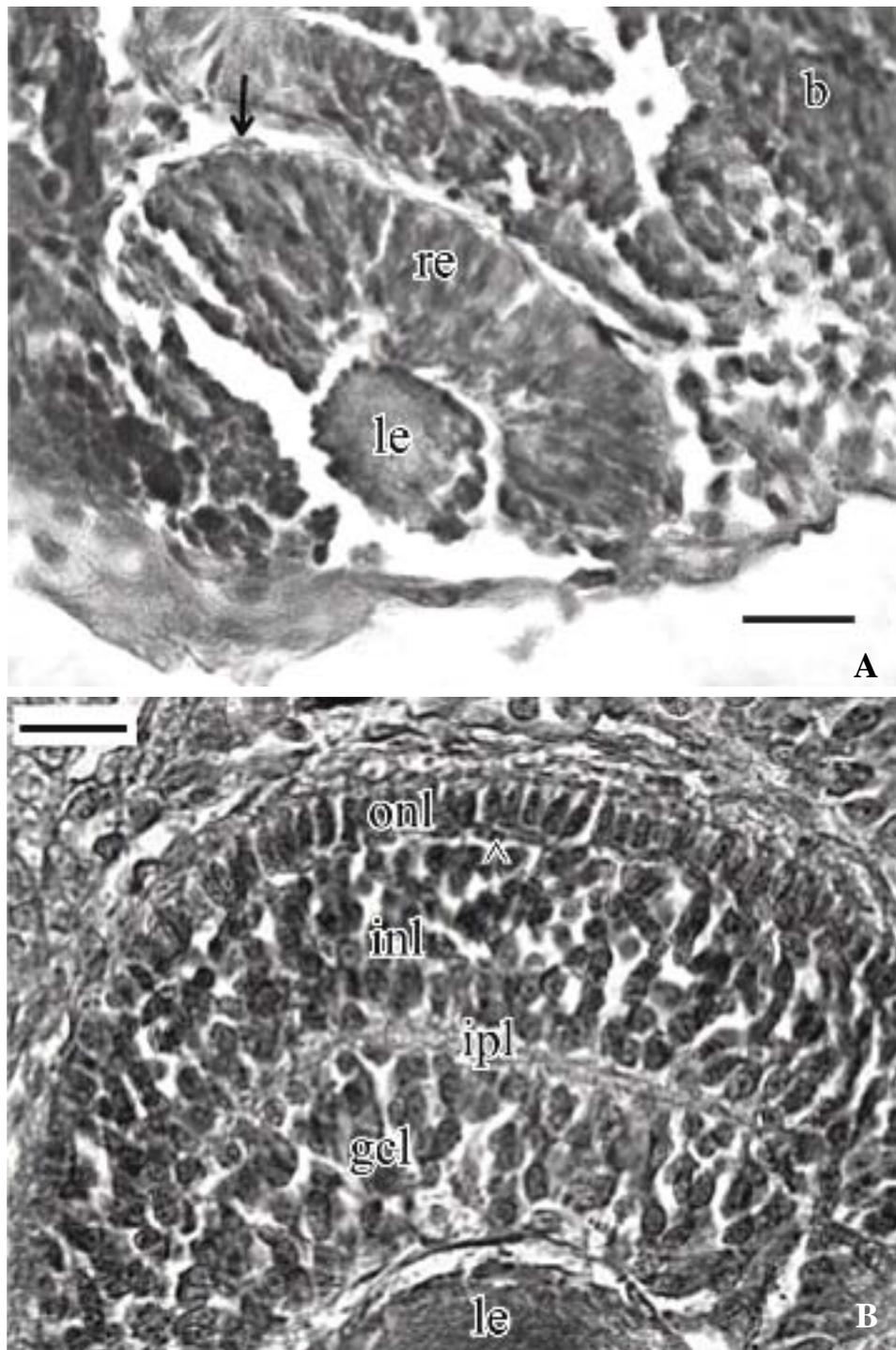


Figura 12. Microsecciones del sistema visual de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 0 y 1 días de desarrollo. (A) Sección longitudinal del ojo al momento de la eclosión. La flecha indica la capa de tejido conectivo rodeando a la retina indiferenciada. Barra = 20 μ m. (B) Ojo al día 1. Formación inicial de las capas de la retina. Los segmentos exteriores de los conos no están totalmente desarrollados. No hay pigmento epitelial. La cabeza de flecha indica la posición de la capa plexiforme externa. Tinción hematoxilina-eosina. Barra = 15 μ m. gcl = capa ganglionar; inl = capa nuclear interna; ipl = capa plexiforme interna; le = lente, m = músculo; onl = capa nuclear externa; re = retina.



Figura 13. Microsecciones del sistema visual de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los dos días de desarrollo. (A) Sección longitudinal de una larva al día 2. El pigmento epitelial rodea la retina (cabeza de flecha). En el tubo digestivo se observa una válvula intestinal. Barra = 200µm. (B) Corte longitudinal de ojo al día 2. El pigmento epitelial (pel) está presente a partir de este día. El asterisco se refiere a la capa nuclear externa. Barra = 20 µm. Tinción, hematoxilina-eosina. gel = capa ganglionar; inl = capa nuclear interna; ipl = capa plexiforme interna; le = lente; pel = capa de pigmento epitelial; ai = intestino anterior; b = cerebro; bc = cavidad bucal; pi = intestino posterior.

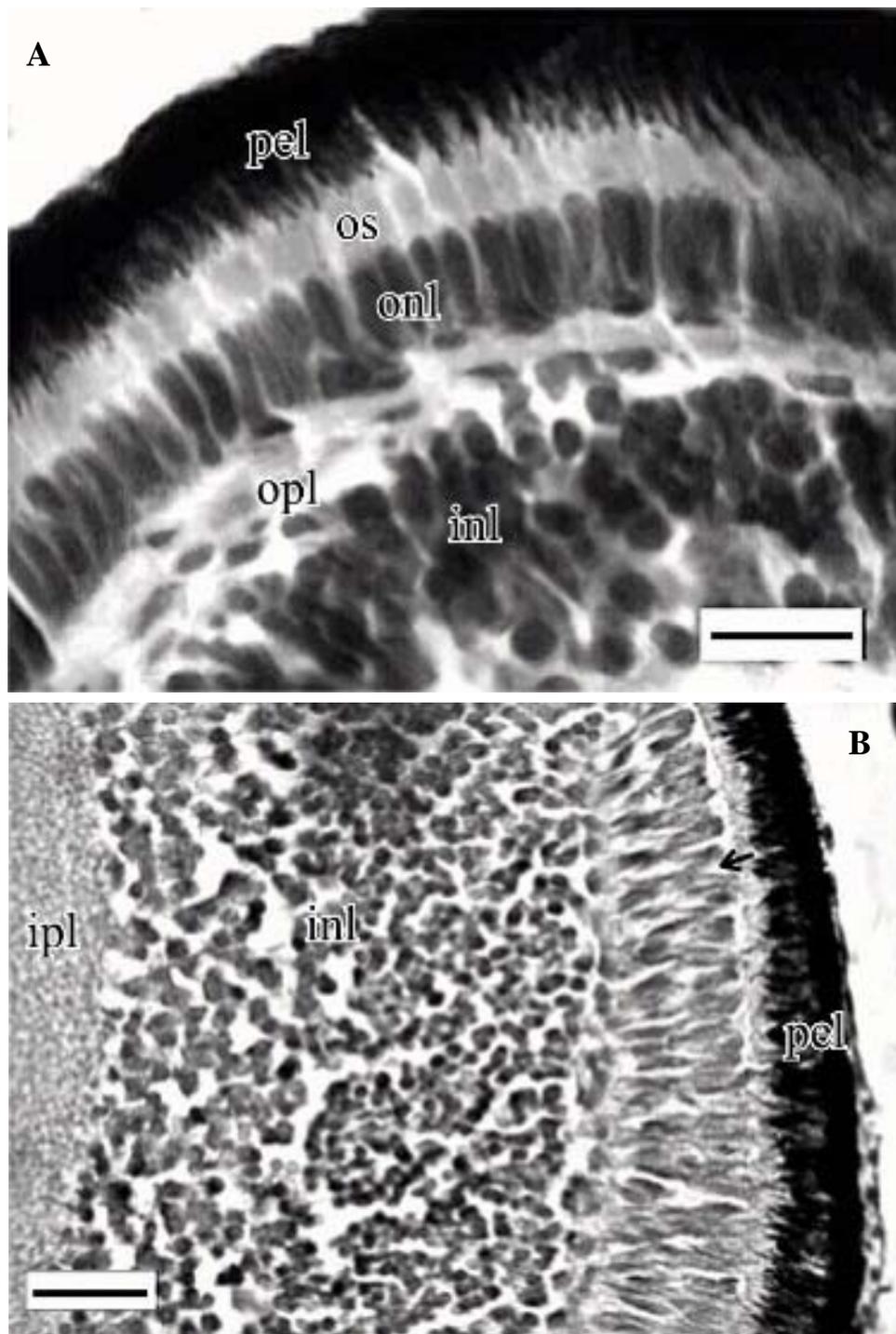


Figura 14. Microsecciones del sistema visual de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 8 y 14 días de desarrollo. (A) Ojo al día 8. Los segmentos exteriores de los conos están bien desarrollados. Barra = 10 μm. (B) Conos dobles (flecha) se observan por primera vez al día 14. Barra = 20 μm. Tinción hematoxilina-epsina. gcl = capa ganglionar; inl = capa nuclear interna; ipl = capa plexiforme interna; onl = capa nuclear externa; opl = capa plexiforme externa; os = segmentos exteriores; pel = capa de pigmento visual.

Tabla V. Altura de las capas de la retina durante el desarrollo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los valores representan la media (n = 30) (desviación estándar.). Letras diferentes denotan diferencias significativas entre columnas (P<0.05). El asterisco indica que aún no se desarrolla.

Capas de la Retina	Edad (Días)				
	1	2	5	14	21
Capa de pigmento	*	7.86 (2.42) ^a	11.02 (3.52) ^b	12.16 (2.47) ^{bc}	23.80 (8.81) ^d
Capa nuclear externa	4.45 (0.78) ^a	5.37 (2.03) ^b	6.99 (1.98) ^c	8.38 (0.51) ^c	18.17 (4.53) ^d
Capa plexiforme externa	4.46 (1.51) ^a	3.14 (1.26) ^b	5.47 (2.34) ^{bc}	6.26 (1.96) ^{ac}	7.31 (1.48) ^d
Capa nuclear interna	21.52 (4.14) ^a	9.11 (1.74) ^b	12.51 (1.89) ^{bc}	17.25 (3.79) ^{ac}	71.29 (22.34) ^d
Capa plexiforme interna	5.33 (1.71) ^a	11.32 (3.15) ^b	18.93 (5.96) ^c	22.07 (7.24) ^c	31.56 (7.60) ^d
Capa ganglionar	17.04 (4.33) ^a	15.41 (2.87) ^a	19.34 (4.80) ^a	20.58 (4.54) ^a	32.18 (15.43) ^b
Diámetro de lente	36.92 (2.25) ^a	40.74 (3.21) ^a	57.86 (2.03) ^b	112.60 (5.56) ^c	355.04 (6.07) ^d

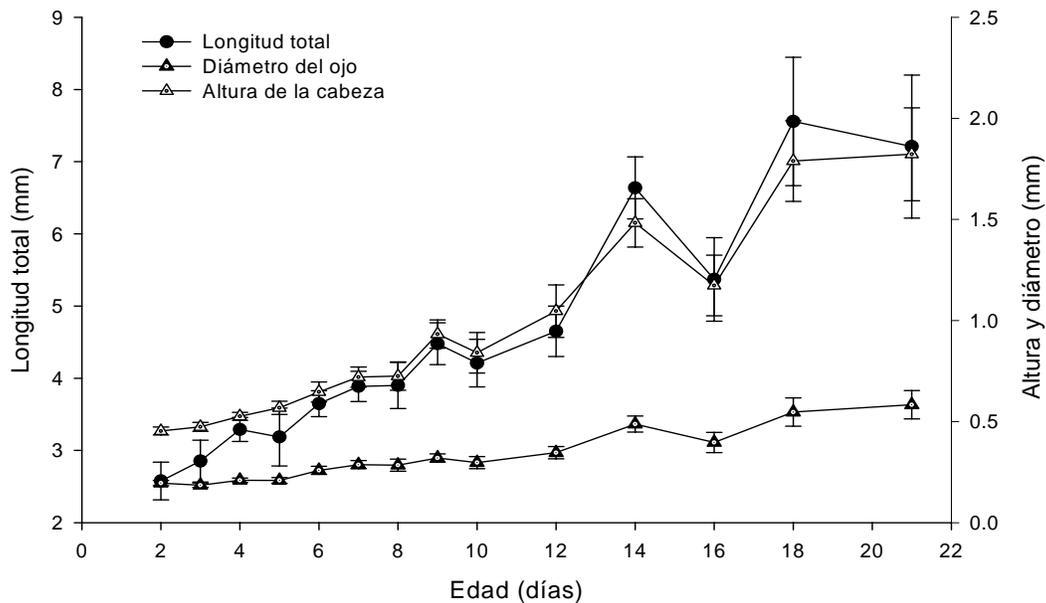


Figura 15. Longitud total, diámetro del ojo y altura de la cabeza (media ± desviación estándar, n = 30) durante el desarrollo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*).

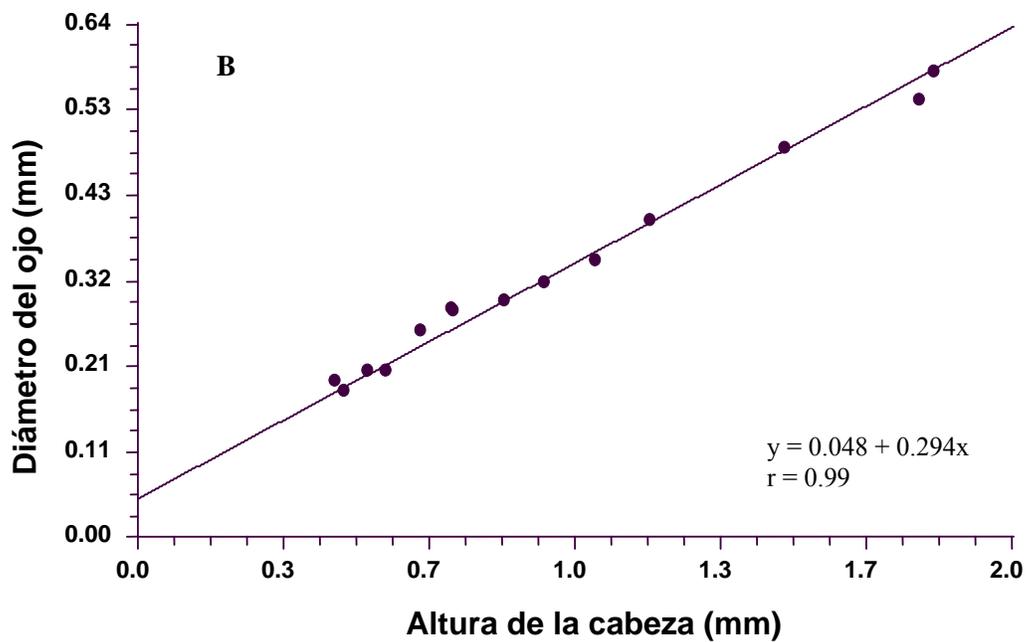
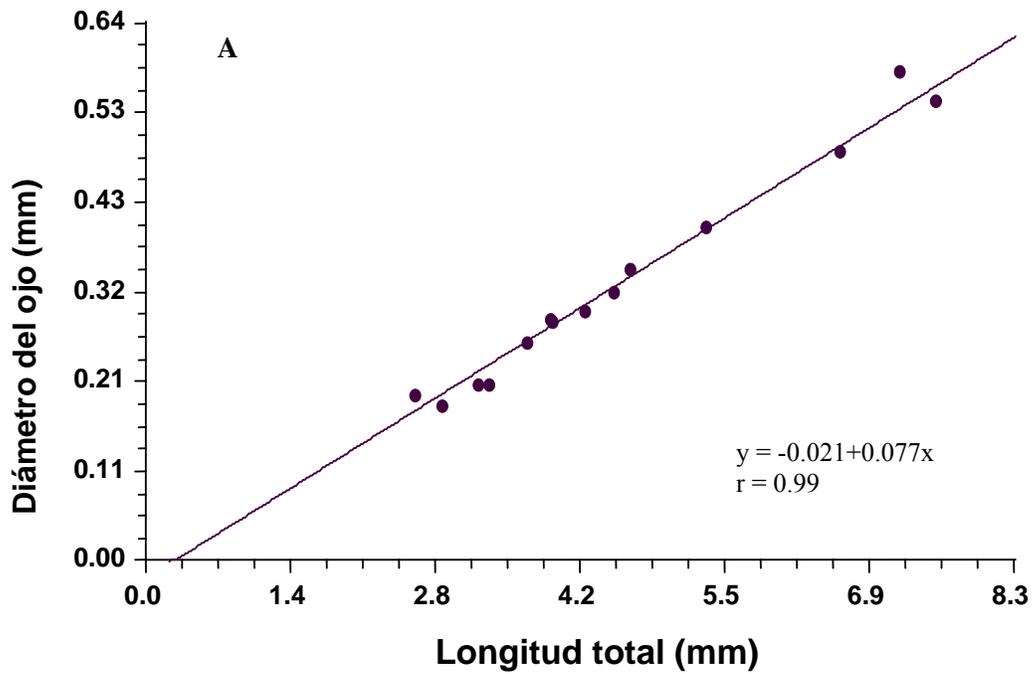


Figura 16. A) Regresión lineal entre el diámetro del ojo y la longitud total; B) Regresión lineal entre el diámetro del ojo y altura de la cabeza. En ambos casos $n = 30$.

A partir del día 14 se observaron por primera vez una serie de conos dobles (Fig. 14B, pág. 56), cuya presencia se incrementó en los días posteriores. A partir del día 16, se observaron varias células, presumiblemente provenientes de la capa nuclear interna, incorporándose a la capa nuclear externa (Fig. 17A, pág. 60). Al día 22, se observaron los bastones en la capa nuclear externa de la retina (Fig. 17B, pág. 60), dando como resultado la formación de una retina dual, es decir, compuesta por conos y bastones como fotorreceptores.

VII.1.2. Evaluación de la eficiencia alimenticia.

La incidencia alimenticia en la primera alimentación fue de 35 % y se incrementó significativamente al día siguiente (96 %). A partir del día 7 la incidencia fue del 100 % y se mantuvo durante todo el período de estudio.

La intensidad alimenticia inicial fue de 1 rotífero/larva y se incrementó con el desarrollo. De hecho, pueden distinguirse tres etapas en función a la intensidad alimenticia (Fig. 18, pág. 61). Una primera etapa durante los primeros días de desarrollo (2-6) en que la intensidad alimenticia se mantiene por debajo de los 15 rotíferos/larva. Posteriormente (días 7-12) se observa un incremento significativo en el número de presas, registrándose la mayor intensidad alimenticia al día 10 con 56.9 ± 9.6 rotíferos/larva. De hecho, la intensidad alimenticia durante los primeros 12 días de desarrollo está significativamente relacionada con la altura del tubo digestivo $r^2 = 0.960$ ($y = 3236.21x^{2.96}$). Finalmente, el número promedio de rotíferos en el tubo digestivo de las larvas decrece significativamente después de la adición de nauplios de *Artemia* a partir del día 12. El número de nauplios de *Artemia* se incrementó de 2.8 ± 1.9 en el día 12, a 12.1 ± 3.7 en el día 18.

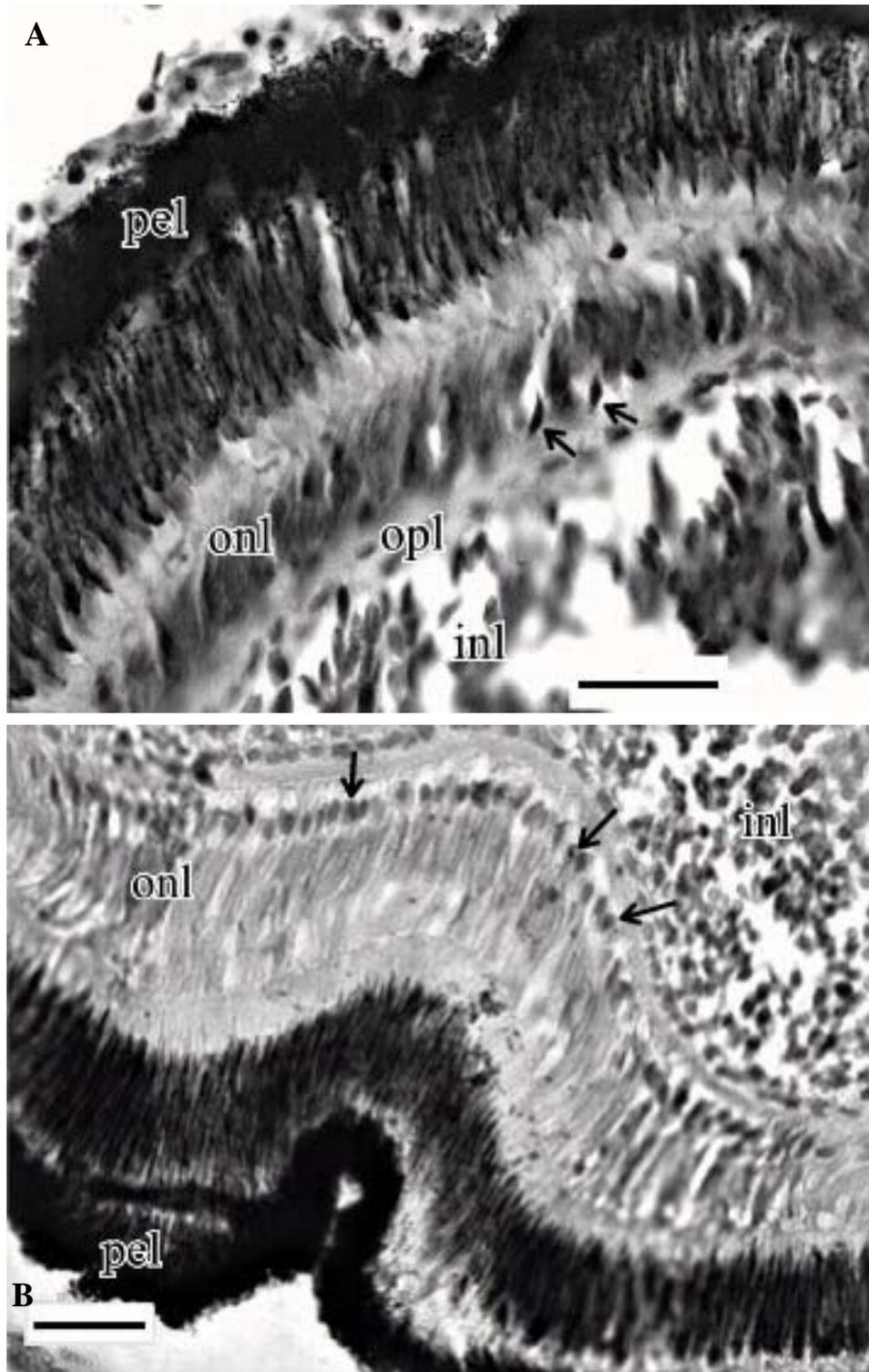


Figura 17. Microsecciones del sistema visual de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a los 16 y 22 días. (A) Ojo al día 16. Células de transición (flechas) están presentes en la capa nuclear externa. Barra = 20 μ m. (B) Ojo al día 22. Los bastones (flechas) se presentan en la retina. Barra = 20 μ m. pel = capa de pigmento epitelial; onl = capa nuclear externa; opl = capa plexiforme externa; inl = capa nuclear interna.

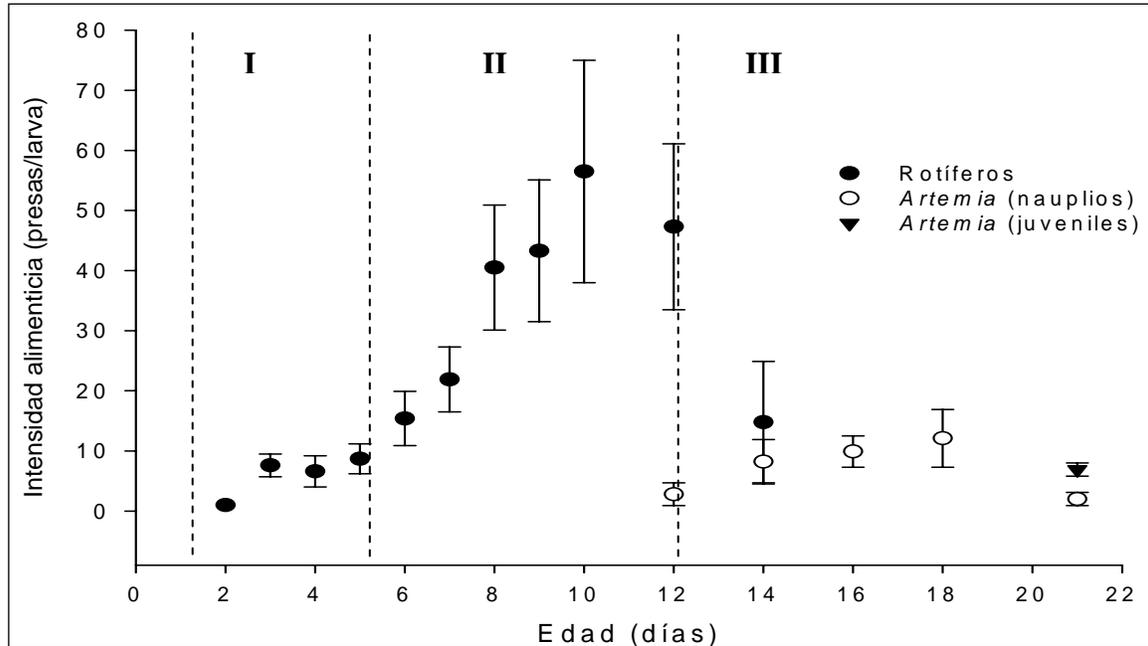


Figura 18. Intensidad alimenticia (número de presas ingeridas) de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) desde la primera alimentación hasta el día 21. Se observan tres períodos de intensidad alimenticia. Los puntos representan los valores promedio ($n = 30$) y las barras verticales la desviación estándar.

VII.2. PRIMERA ALIMENTACIÓN Y EFICIENCIA ALIMENTICIA

VII.2.1. Efecto de la intensidad luminosa.

La incidencia e intensidad alimenticia fueron afectadas por la intensidad luminosa. El porcentaje de larvas con alimento en el tubo digestivo aumenta con la intensidad luminosa. Las larvas alimentadas a 700 lux muestran una incidencia alimenticia significativamente superior ($P < 0,05$) (52 ± 4 % larvas con alimento) que las larvas alimentadas a 100 lux (28 ± 11 % larvas con alimento). No se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) en la incidencia alimenticia entre las larvas alimentadas a 400 (48 ± 10 % larvas con alimento) y 700 lux (52 ± 4 % larvas con alimento) (Fig. 19, pág. 62). El número de presas ingeridas por las larvas alimentadas a 100 ($1,8 \pm 0,2$ rotíferos/larva), 400

($2,4 \pm 0,3$ rotíferos/larva), y 700 lux ($2,4 \pm 0,1$ rotíferos/larva) no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$) (Fig. 20, pág. 63).

Se observó la presencia de presas en las larvas alimentadas en la oscuridad (0 lux). Sin embargo, tanto la incidencia alimenticia ($1,2 \pm 2,2$ % larvas con alimento) como la intensidad alimenticia ($0,4 \pm 0,7$ rotíferos/larva) fueron significativamente menores ($P < 0,05$) que las alimentadas en todos los tratamientos con luz.

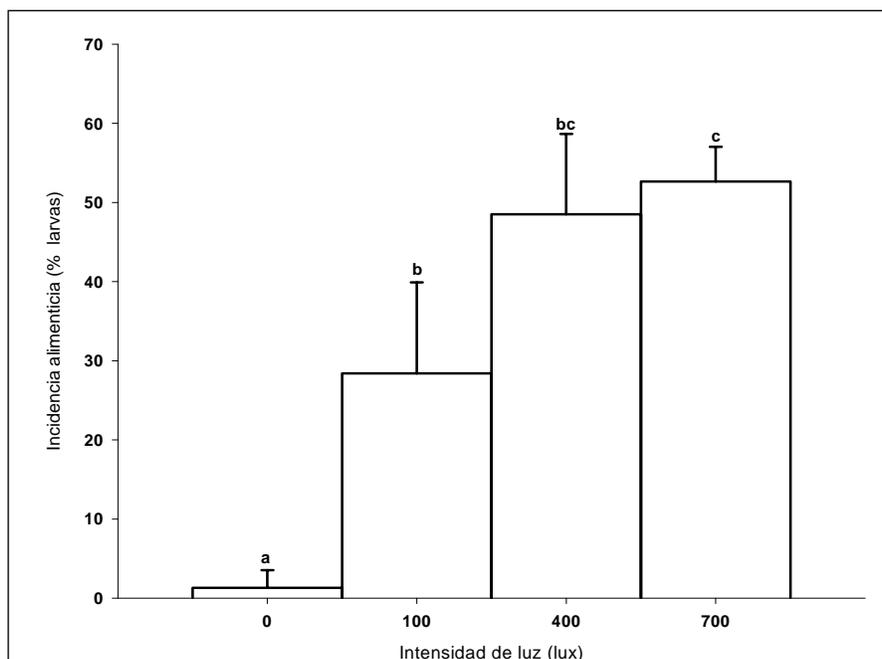


Figura 19. Incidencia alimenticia (porcentaje de larvas con alimento) de larvas de la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*) durante la primera alimentación, a diferentes intensidades de luz. Las barras verticales representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre las barras denotan diferencia significativa ($P < 0,05$).

VII.2.2. Efecto del color del tanque y la densidad de alimento.

La incidencia alimenticia no fue afectada significativamente ($P > 0,05$) por el color del tanque, pero sí por la densidad de presas ($P < 0,05$) (Fig. 21A, pág. 64). El porcentaje promedio de larvas con alimento a 5 rotíferos/ml ($52,3 \pm 9,2$ %) fue significativamente

menor ($P < 0,05$) que el registrado a 10 ($75,1 \pm 1,6 \%$) y 15 rotíferos/ml ($71,1 \pm 0,9 \%$). No se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre estas dos últimas densidades de presas.

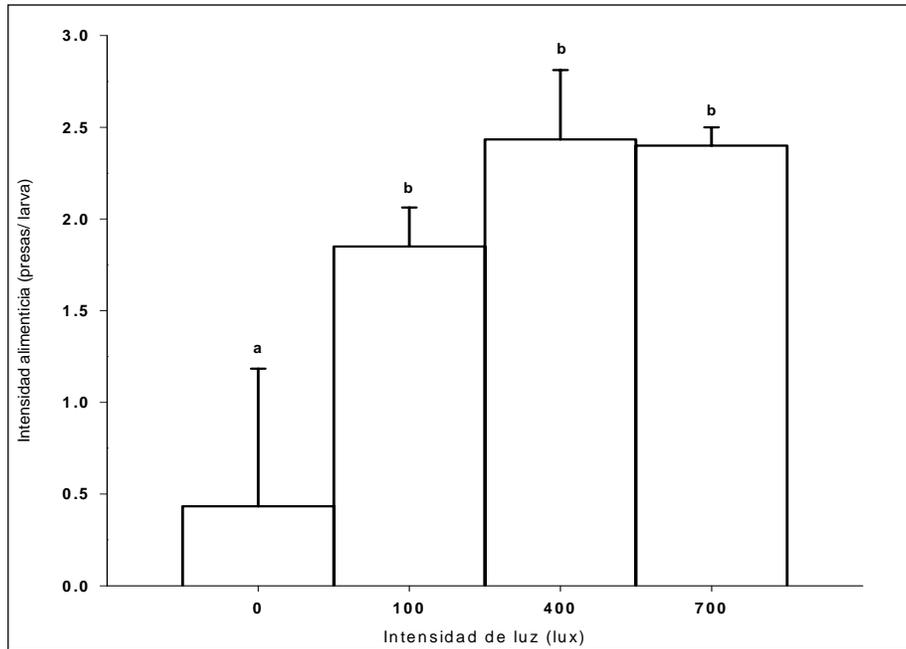


Figura 20. Intensidad alimenticia (número de presas ingeridas) de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) durante la primera alimentación, a diferentes intensidades de luz. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre las barras denotan diferencia significativa ($P < 0,05$).

La intensidad alimenticia fue afectada significativamente por el color del tanque ($P < 0,05$) y la densidad de presas ($P < 0,05$) (Fig. 21B, pág. 64). De hecho, se observó una interacción significativa entre ambos factores ($P = 0,0031$). El menor número de presas ingeridas fue registrado en los acuarios blancos a 5 rotíferos/ml ($1,9 \pm 0,9$ rotíferos/larva), pero no se registró diferencia significativa con los acuarios blancos a 15 rotíferos/ml ($2,5 \pm 1,3$ rotíferos/larva) ni con los acuarios negros a 5 rotíferos/ml ($2,2 \pm 1,1$ rotíferos/larva). En los acuarios grises no se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre las densidades de presas. Por su parte, en los acuarios negros, la intensidad alimenticia a 5 rotíferos/ml ($2,2 \pm 1,1$ rotíferos/larva) fue significativamente menor ($P < 0,05$) a la observada a 10 rotíferos/ml ($3,6 \pm 1,7$ rotíferos/larva) y a 15 rotíferos/ml ($4,3 \pm 1,6$ rotíferos/larva).

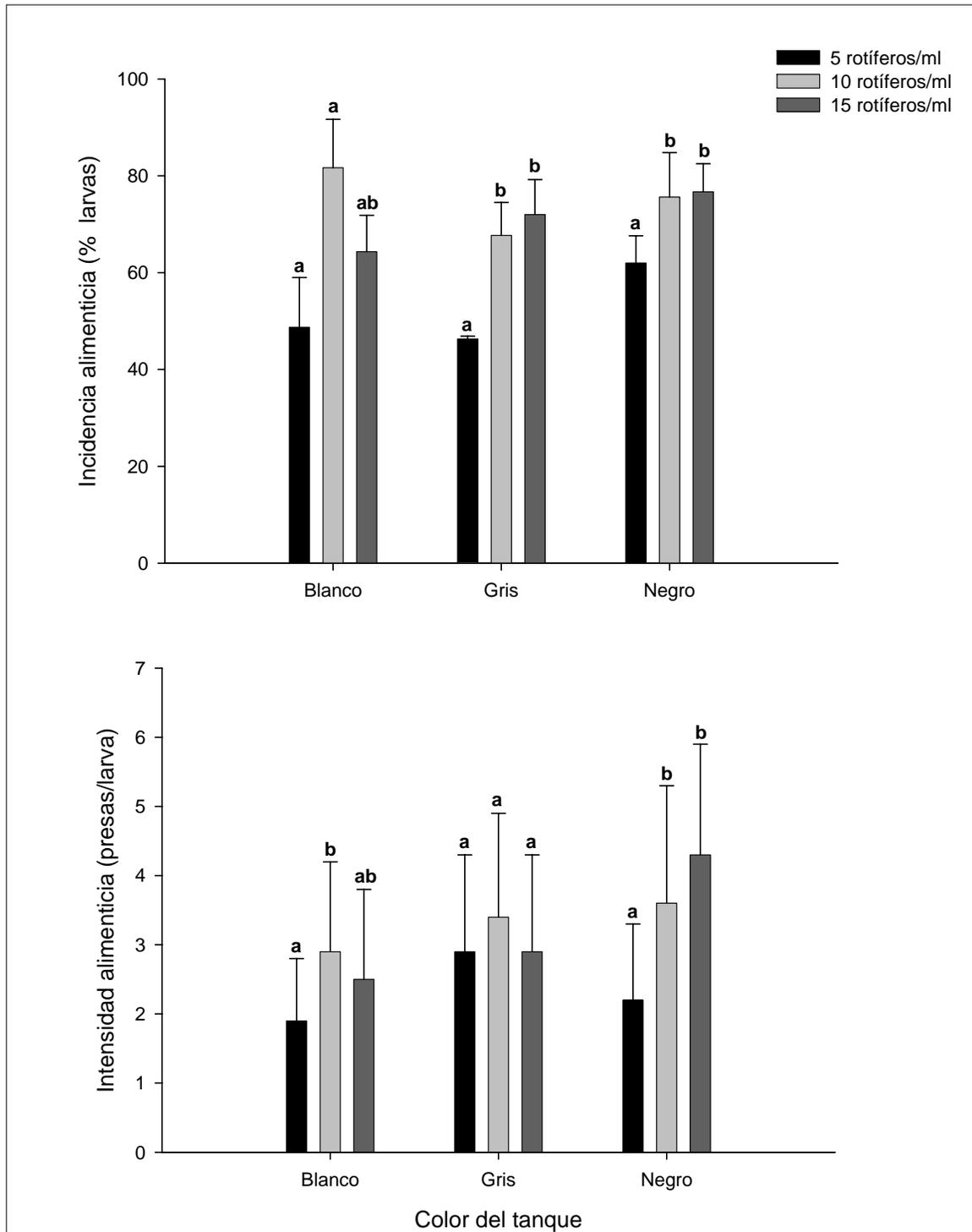


Figura 21. Eficiencia alimenticia de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) durante la primera alimentación a diferentes colores de tanque y densidades de presas. Los valores representan la media \pm desviación estándar. A) Incidencia alimenticia (porcentaje de larvas con alimento). B) Intensidad alimenticia (número de presas ingeridas). Diferentes letras denotan diferencia significativa ($P < 0,05$) entre las densidades en un color de tanque.

VII.2.3. Efecto del retraso en la primera alimentación en el desarrollo y eficiencia alimenticia.

Los efectos causados por el retraso de la primera alimentación fueron evidentes desde los primeros días de desarrollo. En el día 5 se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en todas las medidas morfométricas entre las larvas control y las larvas de los tratamientos D1 (primera alimentación retrasada un día), D2 (primera alimentación retrasada dos días), D3 (primera alimentación retrasada tres días) y en inanición (Fig. 22A-F, pág. 66). Por su parte, la altura del cuerpo (ACP) y la altura de la musculatura (AM) en las larvas del tratamiento D1 fueron significativamente superiores a las registradas en las larvas de los tratamientos D2 y D3 (Fig. 22C y D, pág. 66).

Las larvas de los tratamientos D1 y D2 se recuperaron del período de inanición inicial y sobrevivieron durante todo el experimento. Sin embargo, al final del experimento se observaron diferencias significativas en la longitud total (LT) cuando se compararon con las larvas control (Fig. 23, pág. 67).

En el día 14, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en todas las medidas morfométricas entre las larvas control y las del tratamiento D2 (Tabla VI, pág. 68). Por su parte, no se observaron diferencias significativas entre las larvas control y las larvas del tratamiento D1 en ninguna de las mediciones realizadas. Para el día 17, sólo se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la altura de la cabeza (AC), la AM, y la altura del hígado (AH) entre las larvas control y las del tratamiento D1. Mientras que las larvas del tratamiento D2 presentaron valores significativamente menores ($P > 0,05$) que las larvas control en el diámetro del ojo (DO), la AC, la AM, y la AH (Tabla VI, pág. 68). Al final del experimento (día 19), las mediciones registradas fueron significativamente mayores en las larvas control al compararlas con las larvas del tratamiento D2, excepto por la altura del tubo digestivo (ATD) (Tabla VI, pág. 68). Las larvas control y las del tratamiento D1 fueron diferentes significativamente solamente en la AM (Tabla VI, pág. 68) y la LT (Fig. 23, pág.

67). Las larvas en inanición total y las del tratamiento D3 no sobrevivieron más allá de los días 5 y 6, respectivamente.

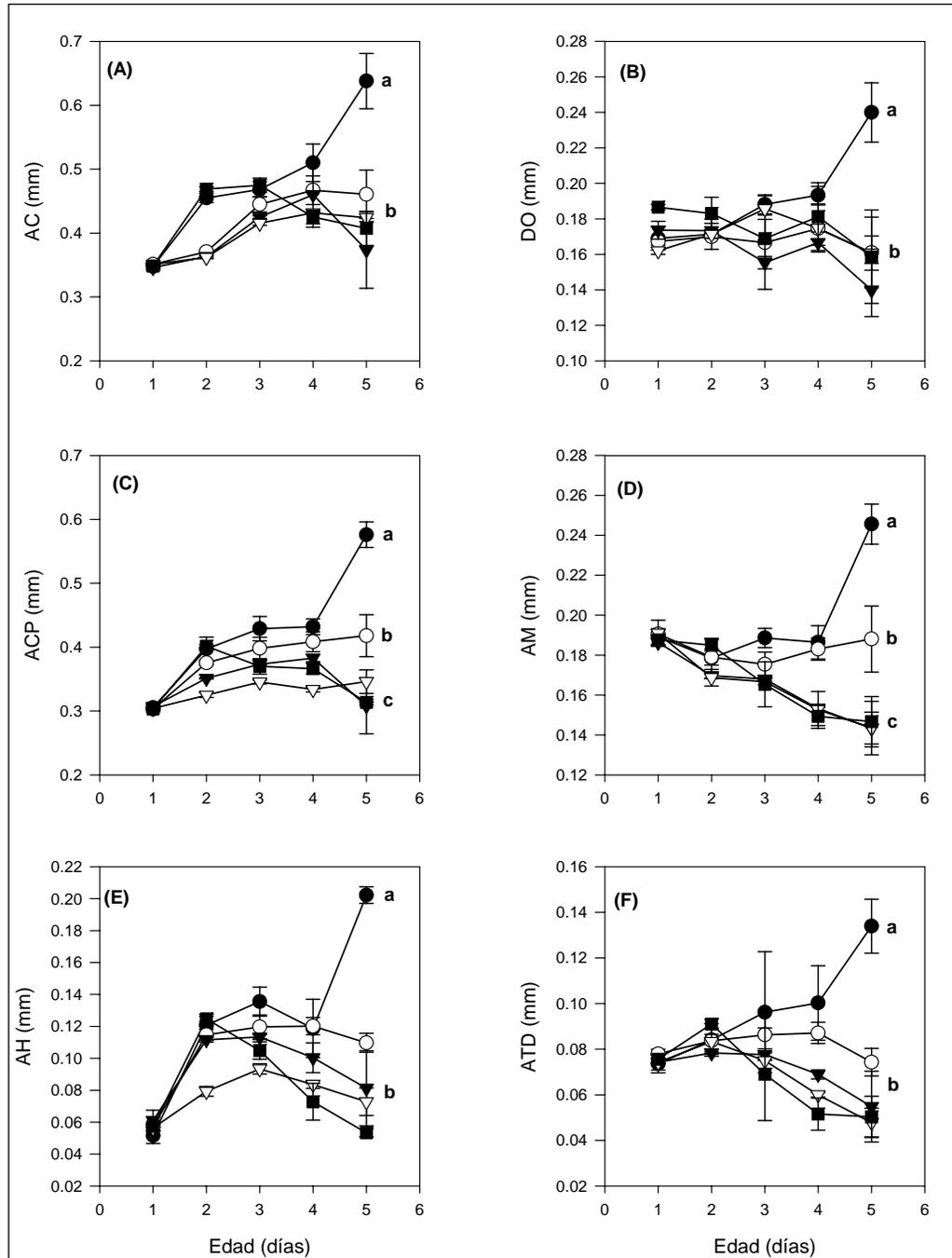


Figura 22. Morfometría de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación, y en larvas en inanición total. Cada valor representa la media \pm desviación estándar (líneas verticales) ($n = 30$). A) AC = altura de la cabeza; B) DA = diámetro del ojo; C) ACP = altura del cuerpo; D) AM = altura de la musculatura; E) AH = altura del hígado; F) ATD = altura del tubo digestivo. (●) Control; (○) D1; (▼) D2; (▽) D3; (■) inanición. Letra diferente denota diferencia significativa ($P < 0,05$).

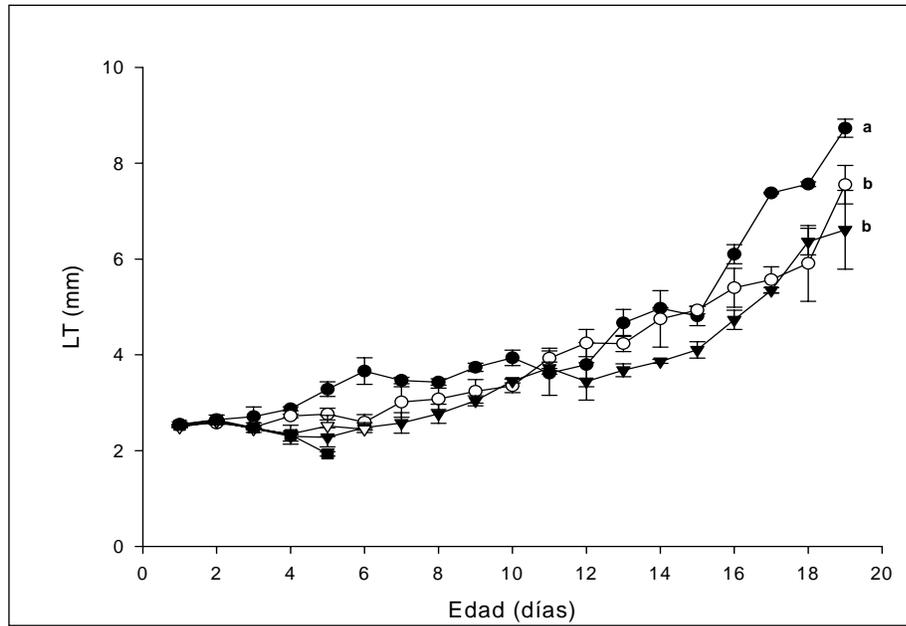


Figura 23. Longitud total (LT) de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación, y en larvas en inanición total. Los puntos representan las medias ($n = 30$). Las líneas verticales representan la desviación estándar. Los símbolos son similares a la figura 22. Letras diferentes denotan diferencia significativa ($P < 0,05$).

La incidencia alimenticia en la primera alimentación de las larvas control, D1, D2 y D3 fue 35 %, 60 %, 90 % y 10 %, respectivamente (Fig. 24, pág. 69). Esto implica que en las larvas del tratamiento D3, solamente el 10 % de ellas fueron capaces de ingerir alimento, mientras que en las larvas del tratamiento D2, el 90 % de ellas fue capaz de ingerir alimento. Esto indica que el punto de no retorno ocurrió entre los días 4 y 5. Por otro lado, la incidencia alimenticia de las larvas control, D1 y D2, alcanzaron el 100 % al día 9 y éste se mantuvo durante el resto del experimento.

El número de presas ingeridas al momento de la primera alimentación también es afectado por el tiempo que se retrasa la misma (Fig. 25, pág. 69). La intensidad alimenticia en la primera alimentación de las larvas control, D1 y D2 fue de 3.6 ± 0.8 , 2.8 ± 1.3 , 5.2 ± 0.3 y 10.2 ± 1.5 rotíferos por larva, respectivamente.

Tabla VI. Mediciones morfométricas de las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso en la primera alimentación de 0 (C), 1 (D1) y 2 (D2) días. Los datos representan la media (desviación estándar) (n = 30). Diferentes superíndices denotan diferencia significativa (P < 0,05) para una misma edad. Todas las medidas están dadas en mm.

		Edad (días)				
		6	10	14	17	19
	C	0,244 (0,01) ^a	0,293 (0,01) ^a	0,415 (0,03) ^a	0,538 (0,03) ^a	0,586 (0,05) ^a
DO	D1	0,194 (0,004) ^a	0,277 (0,02) ^a	0,431 (0,04) ^a	0,432 (0,01) ^{ab}	0,542 (0,004) ^{ab}
	D2	0,172 (0,05) ^a	0,254 (0,008) ^a	0,285 (0,019) ^b	0,459 (0,068) ^b	0,477 (0,048) ^b
	C	0,604 (,050) ^a	0,772 (,119) ^a	1,194 (,132) ^a	1,683 (,148) ^a	1,884 (,005) ^a
AC	D1	0,604 (,056) ^a	0,781 (,085) ^a	1,199 (,093) ^a	1,258 (,032) ^b	1,783 (,005) ^a
	D2	0,418 (,052) ^a	0,651 (,059) ^a	0,809 (,051) ^b	1,308 (,120) ^b	1,424 (0,2) ^b
	C	0,249 (,037) ^a	0,331 (,062) ^a	0,598 (,057) ^a	0,885 (,070) ^a	1,195 (,108) ^a
AM	D1	0,226 (,011) ^a	0,344 (,051) ^a	0,609 (,069) ^a	0,628 (0,05) ^b	0,762 (,004) ^b
	D2	0,167 (,034) ^a	0,272 (,019) ^a	0,342 (,019) ^b	0,708 (,130) ^b	0,740 (,115) ^b
	C	0,547 (,041) ^a	0,690 (,090) ^a	1,080 (,069) ^a	1,571 (,153) ^a	1,812 (,003) ^a
ACP	D1	0,495 (,019) ^a	0,710 (,093) ^a	1,175 (,128) ^a	1,129 (,068) ^a	1,682 (,004) ^a
	D2	0,377 (,072) ^a	0,618 (,047) ^a	0,738 (,030) ^b	1,192 (,133) ^a	1,325 (,183) ^b
	C	0,188 (,020) ^a	0,247 (,041) ^a	0,448 (,054) ^a	0,637 (,076) ^a	0,731 (,002) ^a
AH	D1	0,186 (,007) ^a	0,260 (,016) ^a	0,552 (,085) ^a	0,482 (,024) ^b	0,678 (,007) ^a
	D2	0,097 (,034) ^a	0,232 (,016) ^a	0,293 (,007) ^b	0,491 (,012) ^b	0,533 (,093) ^b
	C	0,121 (,033) ^a	0,172 (,023) ^a	0,283 (,027) ^a	0,432 (,052) ^a	0,460 (,002) ^a
ATD	D1	0,114 (,019) ^a	0,154 (,007) ^a	0,256 (,068) ^{ab}	0,345 (,052) ^a	0,378 (,003) ^a
	D2	0,048 (,012) ^a	0,146 (,018) ^a	0,180 (,017) ^b	0,389 (,035) ^a	0,409 (,001) ^a

DO= diámetro del ojo; AC= altura de la cabeza; AM= altura del músculo; ACP= altura del cuerpo; AH= altura del hígado; ATD= altura del tubo digestivo.

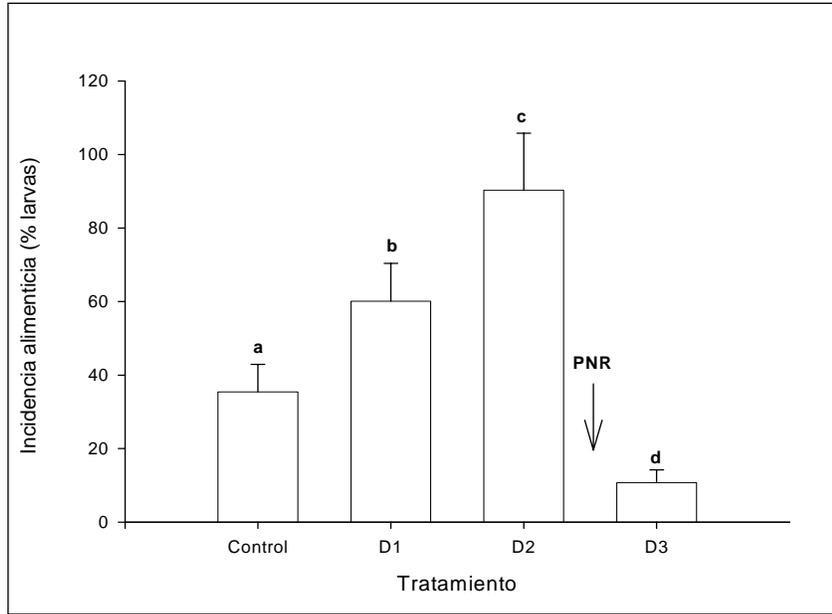


Figura 24. Incidencia alimenticia (porcentaje de larvas con alimento) en la primera alimentación de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), después de un retraso de 0 (control), 1 (D1), 2 (D2) y 3 (D3) días en la primera alimentación. Control = larvas alimentadas el día 2; D1 = larvas alimentadas el día 3; D2 = larvas alimentadas el día 4; D3 = larvas alimentadas el día 5. Las líneas verticales representan la desviación estándar (n = 3). Letras diferentes denotan diferencia significativa ($P < 0,05$). La flecha indica el punto de no retorno (PNR) que ocurre entre los días 4 y 5.

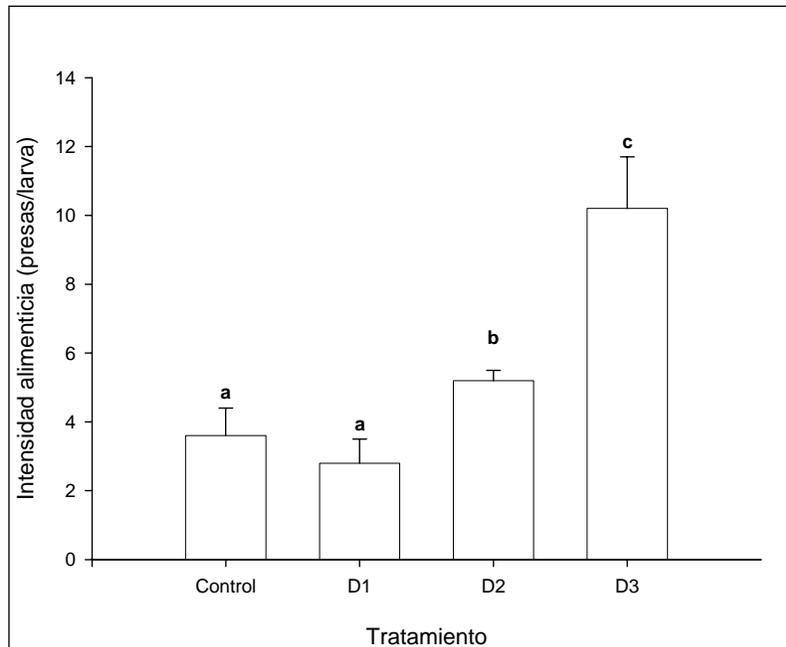


Figura 25. Intensidad alimenticia (número de presas ingeridas) en la primera alimentación de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0 (control), 1 (D1), 2 (D2) y 3 (D3) días en la primera alimentación. Las líneas verticales representan la desviación estándar (n = 3). Letras diferentes denotan diferencia significativa ($P < 0,05$). La edad de las larvas es similar a las de la figura 24.

El retraso de la primera alimentación también afectó la estructura celular del hígado y ambos intestinos (Figs. 26 y 27, págs. 71 y 72, respectivamente). El hígado muestra una degeneración progresiva en la textura de los hepatocitos. Se pierde el arreglo en hileras, característico del hígado. Aumenta el espacio intercelular y se pierde la forma celular. Por su parte, los intestinos anterior y posterior también sufren un proceso degenerativo, básicamente a nivel de la mucosa. El epitelio cilíndrico se deforma en un epitelio cúbico. El borde de cepillo en ambos intestinos desaparece casi por completo.

El área nuclear de los hepatocitos al momento de la primera alimentación fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en las larvas control ($16,6 \pm 2,1 \mu\text{m}^2$) que en las larvas de los tratamientos D1, D2 y D3 ($11,6 \pm 2,5$; $10,4 \pm 2,6$; $10,1 \pm 2,0 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Sin embargo, a partir del día 7, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el área nuclear de los hepatocitos de las larvas control, y los tratamientos D1 y D2 (Fig. 28A, pág. 73).

Al momento de la primera alimentación, la altura de los enterocitos en el intestino anterior no mostró diferencia significativa ($P > 0,05$) entre las larvas control y del tratamiento D1 ($15,7 \pm 3,3$ y $14,9 \pm 2,1 \mu\text{m}$, respectivamente). No obstante, la altura de los enterocitos en estas larvas fueron significativamente mayores que la altura de los enterocitos de las larvas D2 y D3 ($10,2 \pm 1,9$ y $7,2 \pm 1,7 \mu\text{m}$, respectivamente) (Fig. 28B, pág. 73). Desde el día 12, no se observó diferencia significativa en la altura de los enterocitos del intestino anterior entre las larvas control, y tratamientos D1 y D2. En el intestino posterior, la altura de los enterocitos, de las larvas control al momento de la primera alimentación ($14,4 \pm 1,3 \mu\text{m}$) fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que la altura en las larvas de los tratamientos D1 y D2 ($11,3 \pm 1,5$ y $10,7 \pm 1,4 \mu\text{m}$, respectivamente) (Fig. 28C, pág. 73). Al mismo tiempo, éstas fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) que la altura de los enterocitos en las larvas del tratamiento D3 ($8,0 \pm 1,2 \mu\text{m}$). Desde el día 12 no se observaron diferencias significativas en la altura de los enterocitos de las larvas control y los tratamientos D1 y D2.

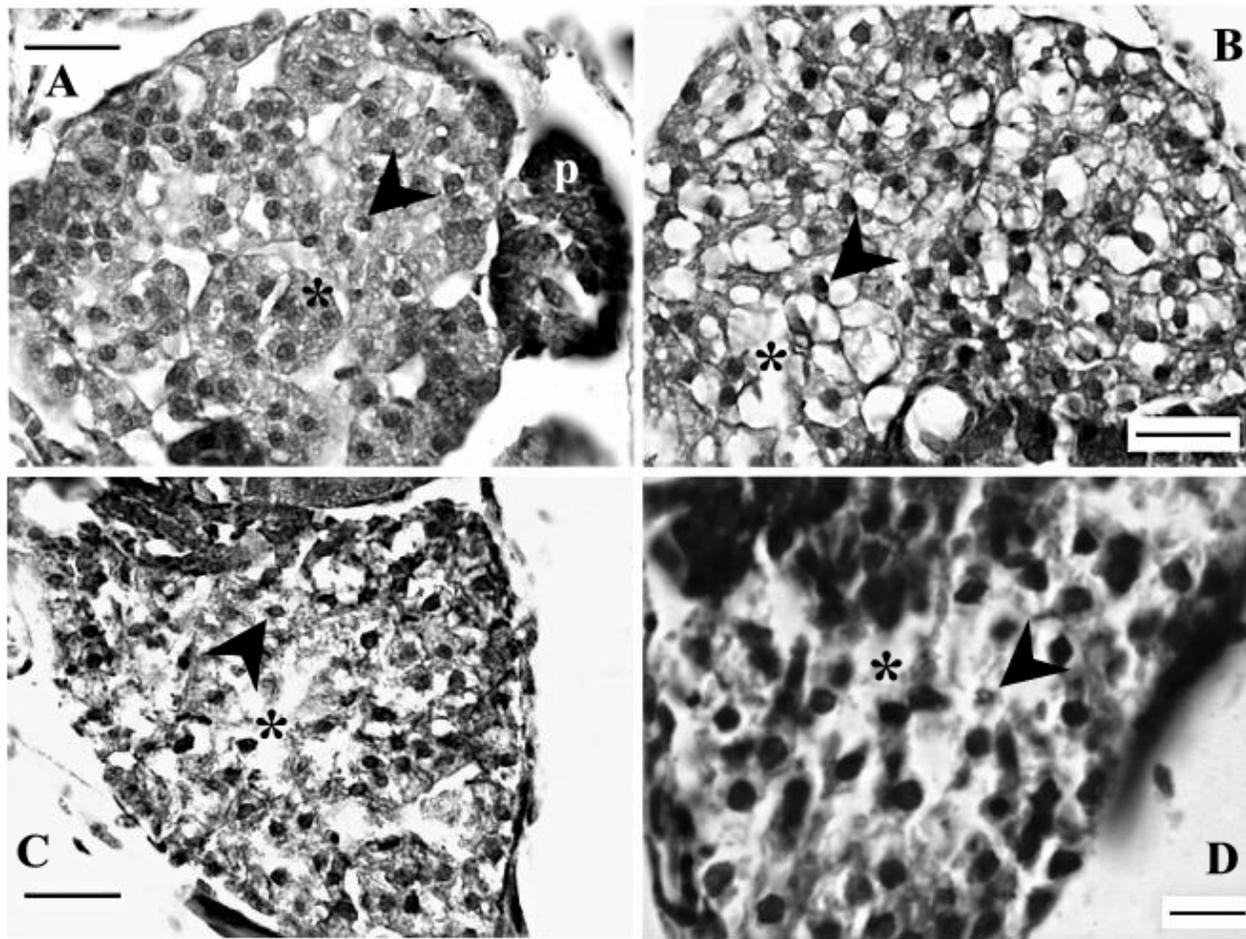


Figura 26. Microfotografías del hígado de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación. A) Larvas control, edad dos días. Barra = 20 μm ; B) Larvas del tratamiento D1, edad tres días. Barra = 20 μm ; C) Larvas del tratamiento D2, edad cuatro días. Barra = 20 μm ; D) Larvas del tratamiento D3, edad cinco días. Barra = 10 μm . Los asteriscos muestran el citoplasma en los hepatocitos, nótese el mayor grado de deterioro celular en la figura D. Las flechas señalan el núcleo de los hepatocitos p = páncreas. Tinción, hematoxilina-eosina.

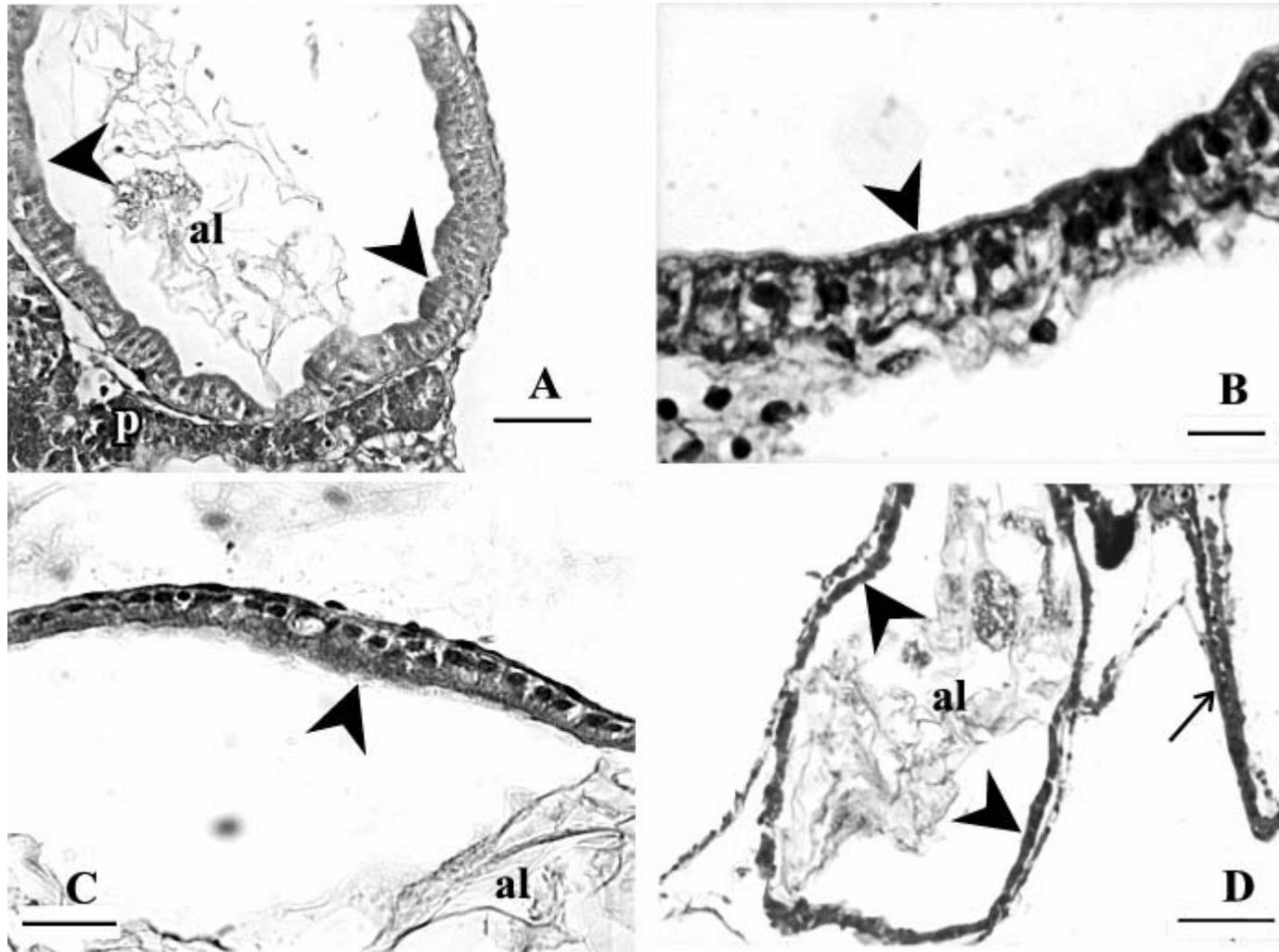


Figura 27. Microfotografías de la mucosa del intestino anterior (cabezas de flechas) de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación. A) Larvas control, edad dos días. Barra = 50 μm ; B) Larvas del tratamiento D1, edad tres días. Barra = 20 μm ; C) Larvas del tratamiento D2, edad cuatro días. Barra = 20 μm ; D) Larvas del tratamiento D3, edad cinco días. La flecha muestra la aleta pectoral, Barra = 100 μm . f = alimento. p = páncreas. Tinción, hematoxilina-eosina.

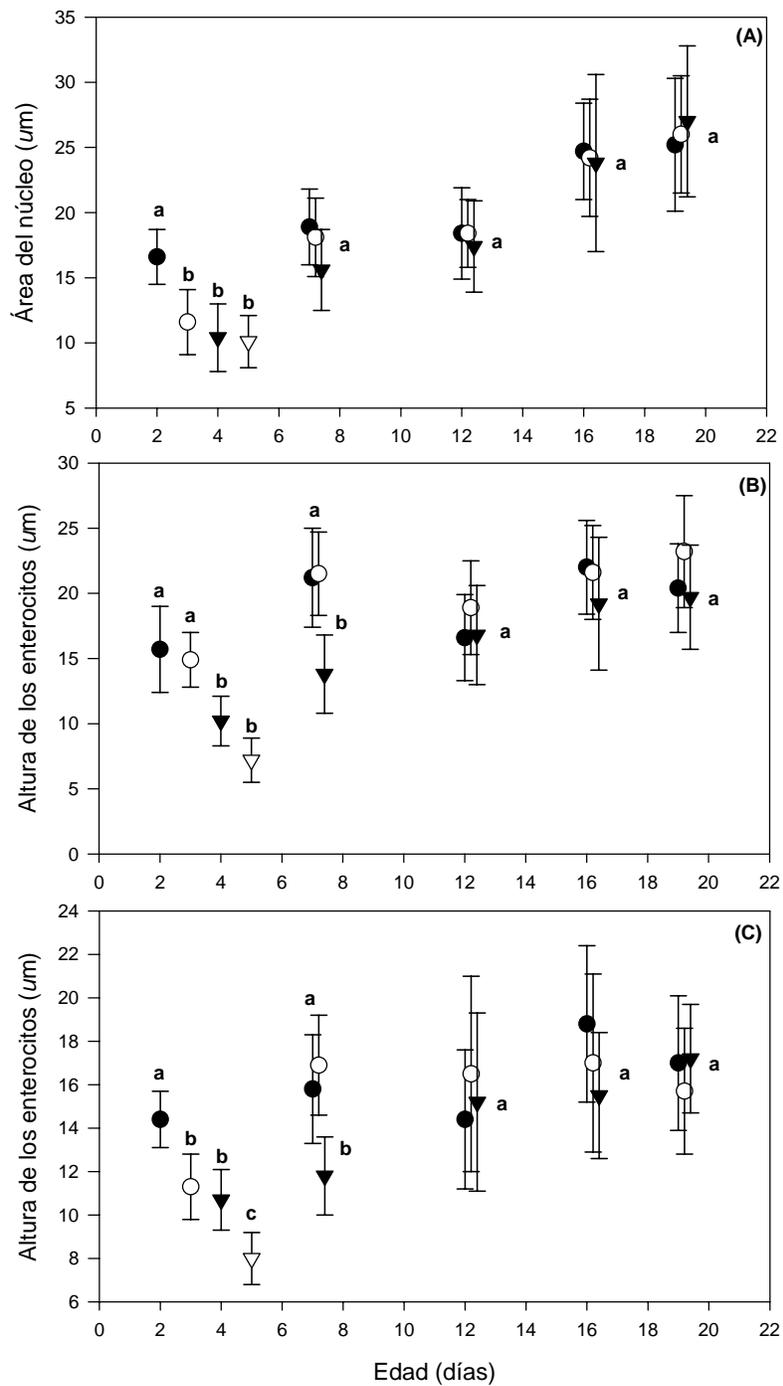


Figura 28. Mediciones del área nuclear de los hepatocitos y altura de los enterocitos en los intestinos de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) después de un retraso de 0, 1, 2 y 3 días en la primera alimentación. Todos los valores representan la media \pm desviación estándar (barras verticales) (n = 30). (A) Área del núcleo de los hepatocitos. (B) Altura de los enterocitos en el intestino anterior (C) Altura de los enterocitos en el intestino posterior. Diferentes letras denotan diferencia significativa ($P < 0,05$) entre tratamientos. Los símbolos son iguales a la figura 22.

VII.3. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y ALIMENTACIÓN DE LARVAS

VII.3.1. Desarrollo y distribución de la actividad enzimática digestiva

El crecimiento de las larvas de la cabrilla arenera siguió una curva exponencial (Fig. 29). Al momento de la primera alimentación (día 2), la longitud total promedio fue de $2,85 \pm 0,28$ mm y al día 30, las larvas presentaron una longitud total de $19,1 \pm 2,05$ mm, es decir, incrementaron su longitud total 6,7 veces.

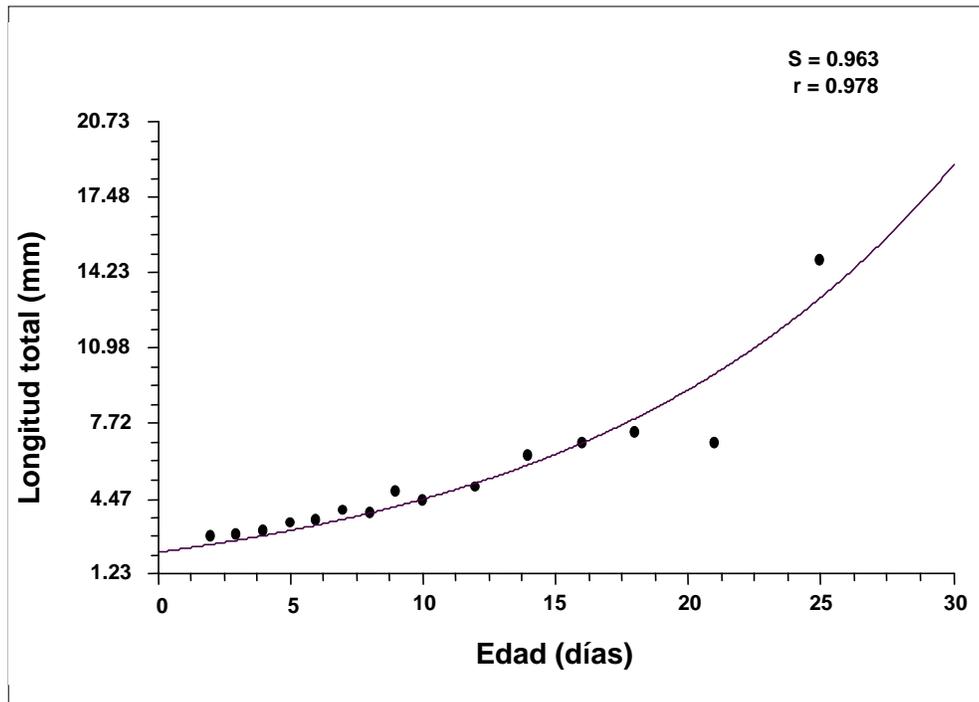


Figura 29. Curva de crecimiento de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) desde la primera alimentación hasta el día 30. Cada punto representa la media (n = 30).

La actividad enzimática digestiva de las larvas de la cabrilla arenera se evidencia temprano en el desarrollo. Todas las técnicas enzimoquímicas que se probaron dieron una reacción positiva desde el día 2 (inicio de la alimentación exógena), lo cual indica que desde los primeros días de desarrollo, los enterocitos cuentan con la presencia de enzimas digestivas que permiten digerir el alimento ingerido.

VII.3.1.2. Fosfatasa alcalina (E.C. 3.1.3.1).

La actividad de la fosfatasa alcalina se evidenció a partir del inicio de la alimentación exógena, siendo la mucosa de ambos intestinos el único sitio donde se observó la presente enzima, específicamente a nivel del borde de cepillo (Tabla VII) (Fig. 30A-D, pág. 76). A partir del día 6 y hasta el final del bioensayo, se observó la actividad de la fosfatasa alcalina en el hígado (Fig. 30B-C, pág. 76).

Desde el día 16 se observó un incremento en la intensidad de la reacción tanto en los intestinos como en el hígado. A partir del día 20 en que se observó la presencia de los ciegos pilóricos, también fue evidente la presencia de la actividad de la fosfatasa alcalina en la superficie apical de la mucosa pilórica (Tabla VII).

Tanto el páncreas, como el estómago y el esófago, no presentaron actividad de la fosfatasa alcalina durante todo el período de estudio.

Tabla VII. Actividad de fosfatasa alcalina en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los símbolos indican la intensidad de la reacción.

Edad (días)	Región del Sistema Digestivo						
	Esófago	Estómago	Intestino Anterior	Intestino Posterior	Hígado	Páncreas	Ciegos Pilóricos
2	-	*	+	+	-	-	*
6	-	*	+	+	+	-	*
10	-	*	+	+	+	-	*
15	-	*	+++	++	+	-	*
20	-	-	+++	++	++	-	+
25	-	-	+++	++	++	-	+
30	-	-	+++	++	+++	-	+++

* Estructuras no desarrolladas a esta edad.

(-) reacción negativa; (+) reacción débil; (++) reacción moderada; (+++) reacción fuerte.

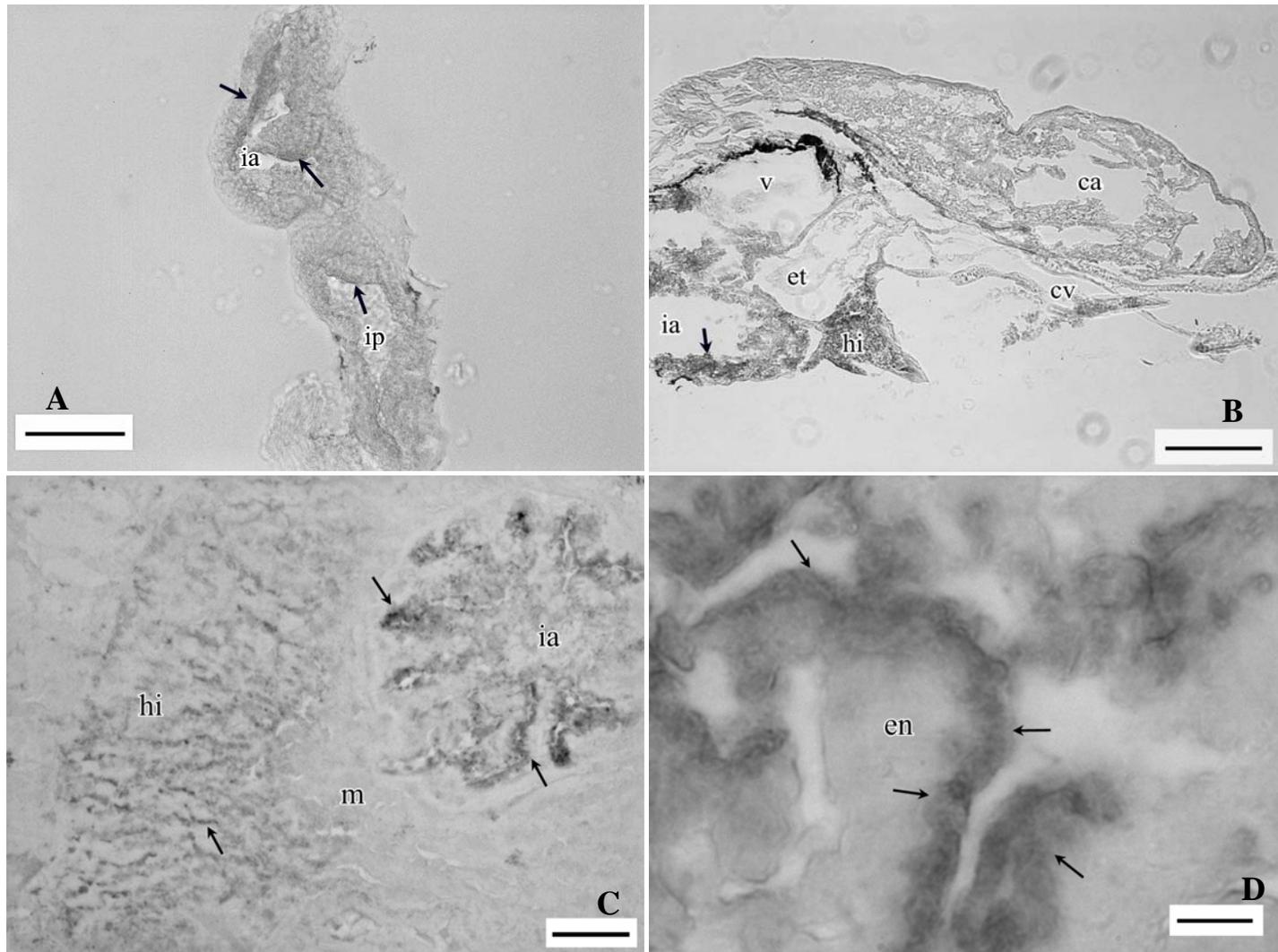


Figura 30. Sitios de actividad (flechas) de la fosfatasa alcalina en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). A) Larva de 2 días. Barra = 50 μm . B) Larva de 10 días. Barra = 200 μm . C) Larva de 20 días. Barra = 100 μm . D) Larva de 25 días. Sección del intestino anterior. Barra = 20 μm . et = estómago; ca = cabeza; cv = cavidad bucal; en enterocitos hi = hígado; ia = intestino anterior; ip = intestino posterior; m = túnica muscular; v = vejiga gaseosa.

VII.3.1.3. Fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2)

El perfil de actividad de la fosfatasa ácida es similar al observado para la fosfatasa alcalina. Se observa desde la primera alimentación en la mucosa intestinal y permanece hasta el día 30 (Tabla VIII) (Fig. 31B-D, pág. 78). Para el día 6 se observa una reacción positiva en el hígado (Fig. 31A, pág. 78) y se mantiene durante todo el período de estudio (Tabla VIII).

La actividad de la fosfatasa ácida muestra un incremento moderado en la mucosa intestinal, pero no en el hígado, a partir del día 15 (Tabla VIII). A partir del día 20 se observó una débil actividad de la fosfatasa ácida en la mucosa de los ciegos pilóricos (Fig. 31C, pág. 78), permaneciendo constante hasta el final del experimento.

Al igual que en el caso de la fosfatasa alcalina, el páncreas, el estómago y el esófago, no presentaron actividad durante todo el período de estudio.

Tabla VIII.- Actividad de fosfatasa ácida en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los símbolos indican la intensidad de la reacción.

Edad (días)	Región del Sistema Digestivo						
	Esófago	Estómago	Intestino Anterior	Intestino Posterior	Hígado	Páncreas	Ciegos Pilóricos
2	-	*	+	+	-	-	*
6	-	*	+	+	+	-	*
10	-	*	+	+	+	-	*
15	-	*	++	++	+	-	*
20	-	-	++	++	+	-	+
25	-	-	++	++	+	-	+
30	-	-	++	++	+	-	+

* Estructuras no desarrolladas a esta edad.

(-) reacción negativa; (+) reacción débil; (++) reacción moderada; (+++) reacción fuerte.

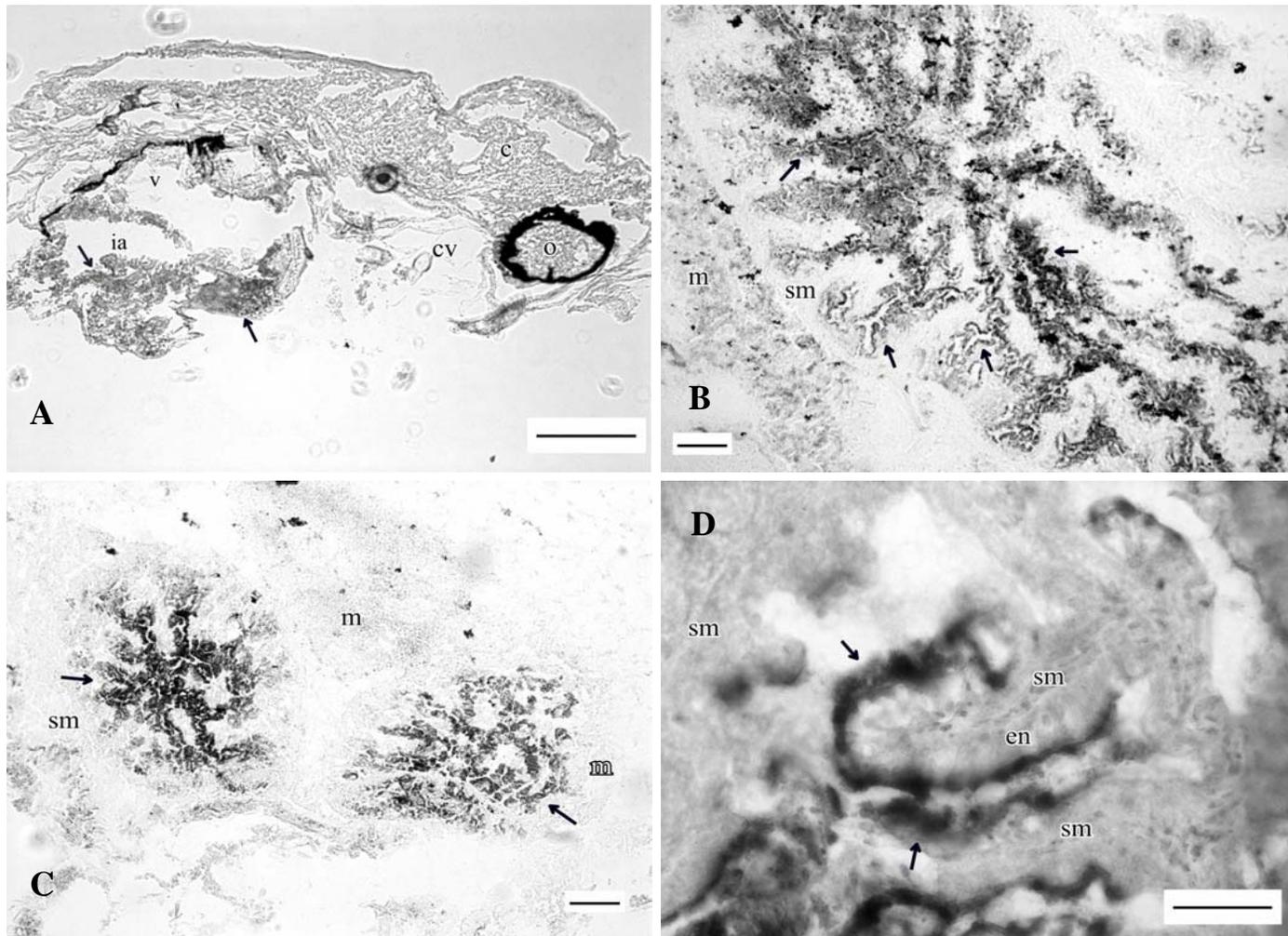


Figura 31. Sitios de actividad (flechas) de la fosfatasa ácida en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). A) Larva de 6 días. Barra = 200 μm . B) Larva de 10 días. Sección del intestino anterior. Barra = 100 μm . C) Larva de 20 días. Actividad en dos ciegos pilóricos. Barra = 100 μm . D) Larva de 25 días. Sección del intestino posterior. Barra = 50 μm . c = cerebro; cv = cavidad bucal; en = enterocitos; ia = intestino anterior; m = túnica muscular; sm = túnica submucosa.

VII.3.1.4. Esterasa no específica (E.C. 3.1.1.1).

La esterasa no específica fue detectada desde el día de la primera alimentación (Fig. 32A, pág. 80) y se mantuvo durante el resto del experimento (Tabla IX). La intensidad de la reacción permitió observar que los sitios de distribución fueron tanto en el lumen como en el borde plumoso y región supranuclear de los enterocitos de ambos intestinos (Fig. 32B, pág. 80). Así mismo, fue posible observar una reacción positiva en el hígado aunque a una menor intensidad (Tabla IX). Este patrón de distribución, intestinal y hepático, fue registrado durante todo el período de estudio (Tabla IX).

A partir del día 25, la actividad enzimática fue localizada en la mucosa del estómago y en los ciegos pilóricos (lumen y borde de cepillo) (Fig. 32C-D, pág. 80). Es interesante notar el hecho de que desde el principio de la alimentación exógena, la actividad de la esterasa no específica fue más intensa que el resto de las enzimas determinadas.

Al igual que las fosfatasa, no se observó actividad de la esterasa no específica en el esófago, ni en el páncreas (Tabla IX).

Tabla IX. Actividad de esterasa no específica en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los símbolos indican la intensidad de la reacción.

Edad (días)	Región del Sistema Digestivo						
	Esófago	Estómago	Intestino Anterior	Intestino Posterior	Hígado	Páncreas	Ciegos Pilóricos
2	-	*	+++	+++	+	-	*
6	-	*	++	++	+	-	*
10	-	*	++	++	+	-	*
15	-	*	+++	+++	+	-	*
20	-	-	+++	+++	+	-	-
25	-	+	+++	+++	+	-	++
30	-	+	+++	+++	+	-	+++

* Estructuras no desarrolladas a esta edad.

(-) reacción negativa; (+) reacción débil; (++) reacción moderada; (+++) reacción fuerte.

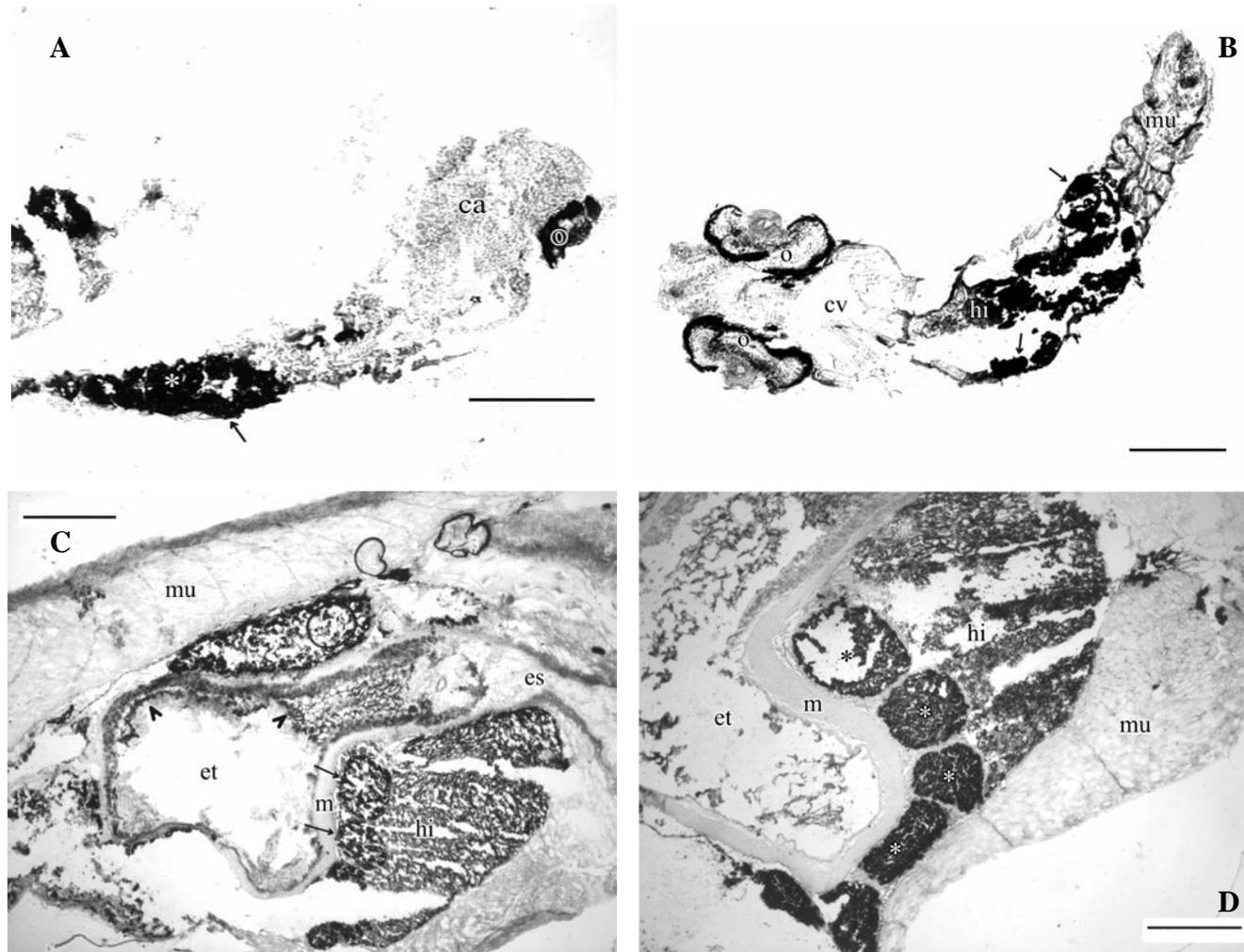


Figura 32. Sitios de actividad de esterasa no específica en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). A) Larva de 2 días. La actividad se observa en todo el lumen (asterisco y flecha). Barra = 200 μ m. B) Larva de 10 días. Las flechas indican los sitios de actividad. Barra = 200 μ m. C) Larva de 20 días. Se observa actividad en el estómago (cabezas de flechas). Las flechas indican la actividad en los ciegos pilóricos. También se observa actividad en el hígado. Barra = 500 μ m. D) Larva de 25 días. Los asteriscos indican la actividad en los ciegos pilóricos e hígado. Barra = 500 μ m. ca = cabeza; cv = cavidad bucal; es = esófago; et = estómago, hi = hígado; m = túnica muscular; mu = músculo axial; o = ojo.

VII.3.1.5. Aminopeptidasa M (E.C. 3.4.11.2).

La actividad de la aminopeptidasa M se observó desde el momento de la primera alimentación en el día 2 (Tabla X), básicamente, el sitio de actividad fue la mucosa intestinal (Fig. 33A-B, pág. 82), a nivel del borde de cepillo de los enterocitos.

Este patrón de actividad se mantuvo hasta el día 20 en el que se observó un moderado incremento en la actividad enzimática, alcanzando un máximo al final del período de estudio (Tabla X) (Fig. 33C, pág. 82). De la misma forma, la actividad de la aminopeptidasa M fue observada en la mucosa de los ciegos pilóricos (Fig. 33D, pág. 82).

Durante todo el período de estudio no se observó actividad enzimática en el hígado, páncreas, estómago, ni esófago (Tabla X).

Tabla X. Actividad de aminopeptidasa M en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los símbolos indican la intensidad de la reacción.

Edad (días)	Región del Sistema Digestivo						
	Esófago	Estómago	Intestino Anterior	Intestino Posterior	Hígado	Páncreas	Ciegos Pilóricos
2	-	*	+	+	-	-	*
6	-	*	+	+	-	-	*
10	-	*	+	+	-	-	*
15	-	*	+	+	-	-	*
20	-	-	++	++	-	-	++
25	-	-	++	++	-	-	++
30	-	-	+++	+++	-	-	+++

* Estructuras no desarrolladas a esta edad.

(-) reacción negativa; (+) reacción débil; (++) reacción moderada; (+++) reacción fuerte.

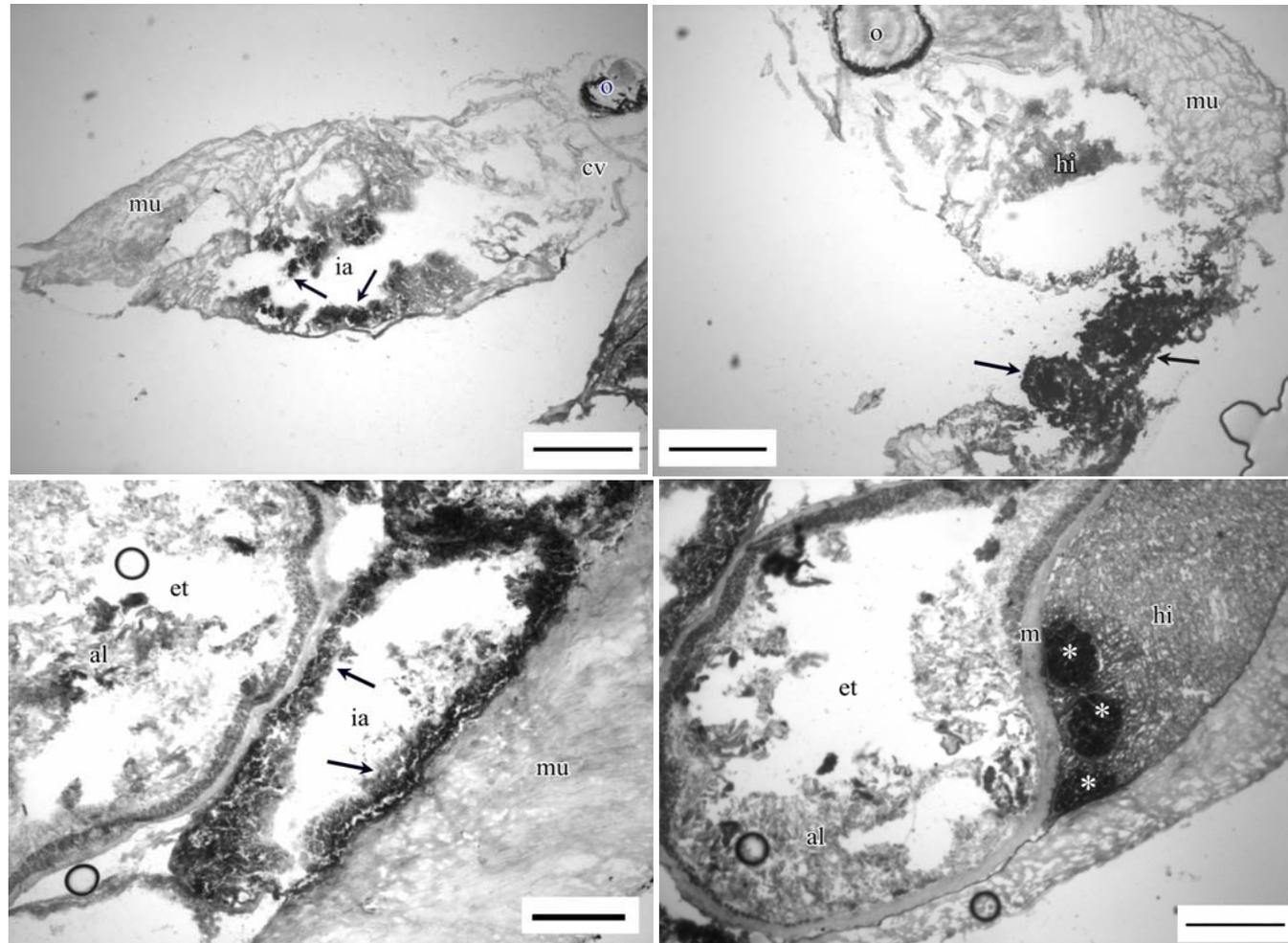


Figura 33. Sitios de actividad de aminopeptidasa M en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). A) Larva de 6 días. Los sitios de actividad (flechas) se observan en la mucosa intestinal. Barra = 500 μ m. B) Larva de 10 días. Las flechas señalan los sitios de actividad. Barra = 500 μ m. C) Larva de 15 días. Las flechas indican los sitios de actividad en la mucosa intestinal. Barra = 500 μ m. D) Larva de 25 días. Nótese la actividad de la enzima en los tres ciegos pilóricos. Barra = 500 μ m. al=alimento; cv = cavidad bucal; et= estómago; hi= hígado; ia = intestino anterior; m = túnica submucosa; mu= musculatura axial; o= ojo.

VII.3.1.6. Dipeptidil aminopeptidasa IV (E.C. 3.4.14.4).

La actividad de la dipeptidil aminopeptidasa IV fue observada desde la primera alimentación (Tabla XI). Los sitios de actividad fueron el hígado y la mucosa de ambos intestinos (Fig. 34A, pág. 84).

A partir del día 15 se observó un incremento en la actividad de esta enzima, alcanzando un máximo a partir del día 20 y permaneciendo sin cambios hasta el final del período de estudio (Tabla XI). Desde del día 20, la actividad de la dipeptidil aminopeptidasa IV fue detectada en los ciegos pilóricos (Tabla XI) (Fig. 34D, pág. 84) y se incrementa ligeramente para el día 30. En contraparte, la actividad de esta enzima en el hígado disminuye ligeramente a partir del día 20 (Fig. 34D, pág. 84).

Al igual que las enzimas digestivas mencionadas anteriormente, no se observó actividad de la dipeptidil aminopeptidasa IV en el esófago y páncreas.

Tabla XI.- Actividad de dipeptidil-aminopeptidasa IV en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los símbolos indican la intensidad de la reacción.

Edad (días)	Región del Sistema Digestivo						
	Esófago	Estómago	Intestino Anterior	Intestino Posterior	Hígado	Páncreas	Ciegos Pilóricos
2	-	*	+	+	+	-	*
6	-	*	+	+	+	-	*
10	-	*	+	+	++	-	*
15	-	*	++	++	++	-	*
20	-	-	+++	+++	+	-	++
25	-	-	+++	+++	+	-	+++
30	-	-	+++	+++	+	-	+++

* Estructuras aún no desarrolladas a esta edad.

(-) reacción negativa; (+) reacción débil; (++) reacción moderada; (+++) reacción fuerte.

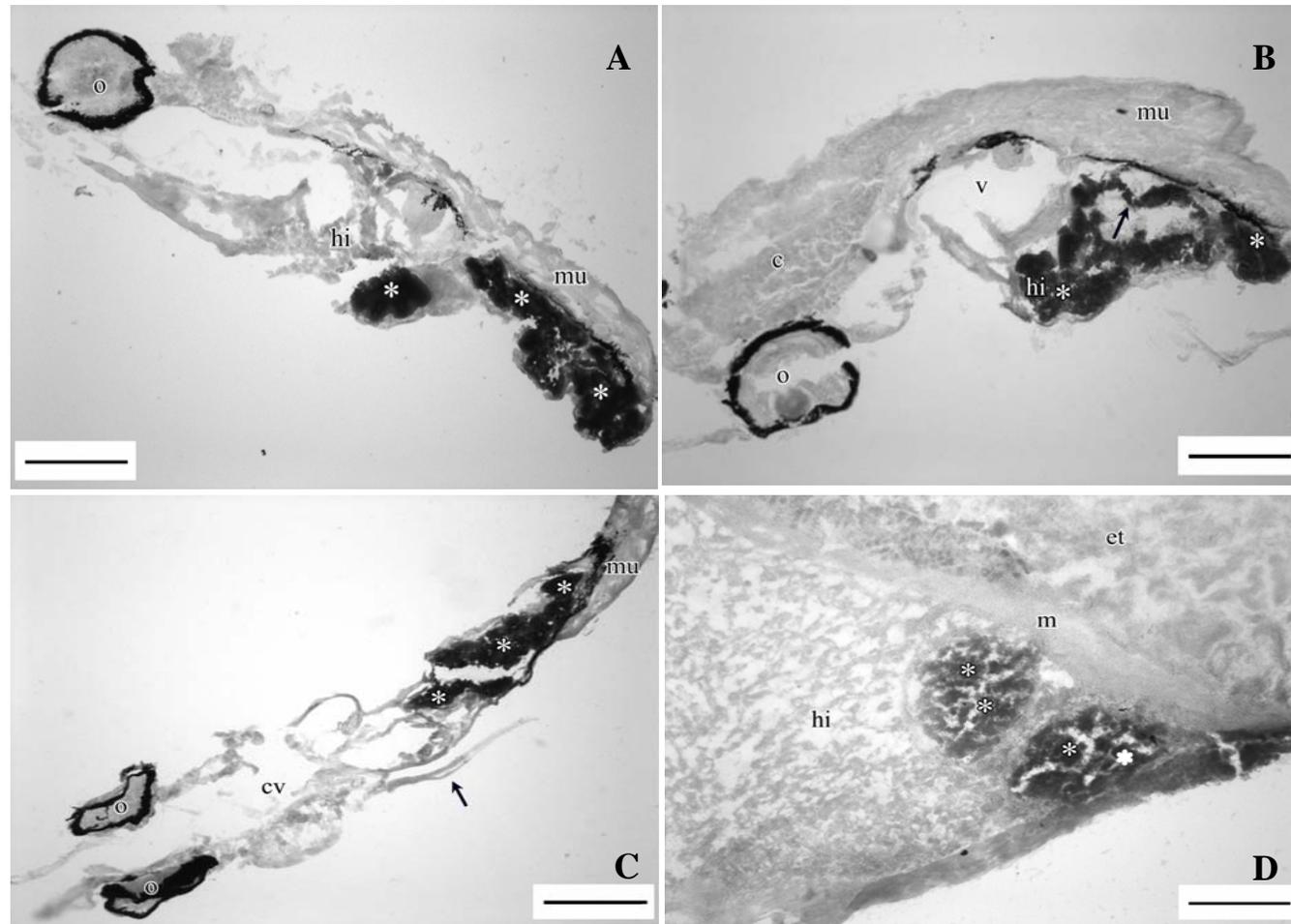


Figura 34. Sitios de actividad de dipeptidil aminopeptidasa IV en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). A) Larva de 5 días. Los asteriscos denotan los sitios de actividad enzimática. Barra = 500 μ m. B) Larva de 10 días. La flecha y los asteriscos señalan los sitios de actividad. Barra = 500 μ m. C) Larva de 10 días, vista superior. Los asteriscos señalan los sitios de actividad enzimática. La flecha señala una aleta pectoral. Barra = 500 μ m. D) Larva de 25 días. Reacción positiva (asteriscos) en dos ciegos pilóricos. Barra = 500 μ m. c = cerebro; et = estómago; g = vejiga gaseosa; hi = hígado; m = túnica muscular; mu = musculatura axial; o = ojo;

VII.3.2. Efecto del destete en el desarrollo y condición nutricional.

La sustitución del alimento vivo (AV) por la dieta microparticulada (DMP) tuvo un efecto significativo ($P < 0,05$) en el crecimiento de las larvas de la cabrilla arenera. Las larvas que fueron alimentadas con AV tuvieron un mayor peso seco (PS), longitudes notocordal (LN) y total (LT) y tasa específica de crecimiento (TEC) que las larvas alimentadas con la DMP a partir del día 27 (Tabla XII).

Tabla XII. Crecimiento de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) alimentadas con alimento vivo o una dieta microparticulada a partir del día 17.

	Edad (días)							
	15		21		27		33	
	AV	DMP	AV	DMP	AV	DMP	AV	DMP
LN	4.55 (0.47) ^a	4.55 (0.42) ^a	7.23 (0.94) ^a	6.64 (0.76) ^a	8.44 (1.40) ^a	6.83 (0.49) ^a	16.39 (2.73) ^a	9.36 (1.26) ^b
LT	5.37 (0.55) ^a	5.36 (0.43) ^a	8.69 (1.21) ^a	7.98 (0.93) ^a	10.41 (1.54) ^a	8.41 (0.59) ^a	20.89 (3.82) ^a	12.11 (1.63) ^b
PS	28.75(0.47) ^a	28.99(0.08) ^a	293.64(0.68) ^a	264.23(2.77) ^b	949.9(24.75) ^a	628.78(7.03) ^b	2490.04(14.11) ^a	1046.11(33.42) ^b
TEC	5.37 ^a	5.36 ^a	8.02 ^a	6.63 ^a	3.01 ^a	0.87 ^b	11.61 ^a	6.08 ^b

AV = Alimento vivo

DMP = Dieta microparticulada

Las longitudes notocordal (LN) y total (LT) están en mm.

El peso seco (PS) está expresado en µg/larva.

TEC = tasa específica de crecimiento.

Los valores representan la media (desviación estándar).

Diferentes superíndices denotan diferencia significativa ($P < 0,05$) en cada día.

Así mismo, no se observó diferencia significativa entre las larvas alimentadas con AV y DMP en la altura de la cabeza (AC), longitud de la cabeza (LCA) y diámetro del ojo (OJ) durante el período de estudio (Fig. 35A-C, pág. 86). Sin embargo, las larvas alimentadas con AV presentaron valores de la altura del músculo (AM) significativamente mayores ($P < 0,05$) que las larvas alimentadas con la DMP (Fig. 35D, pág. 86). Es interesante resaltar el hecho de que las diferencias significativas fueron evidentes a partir del día 27.

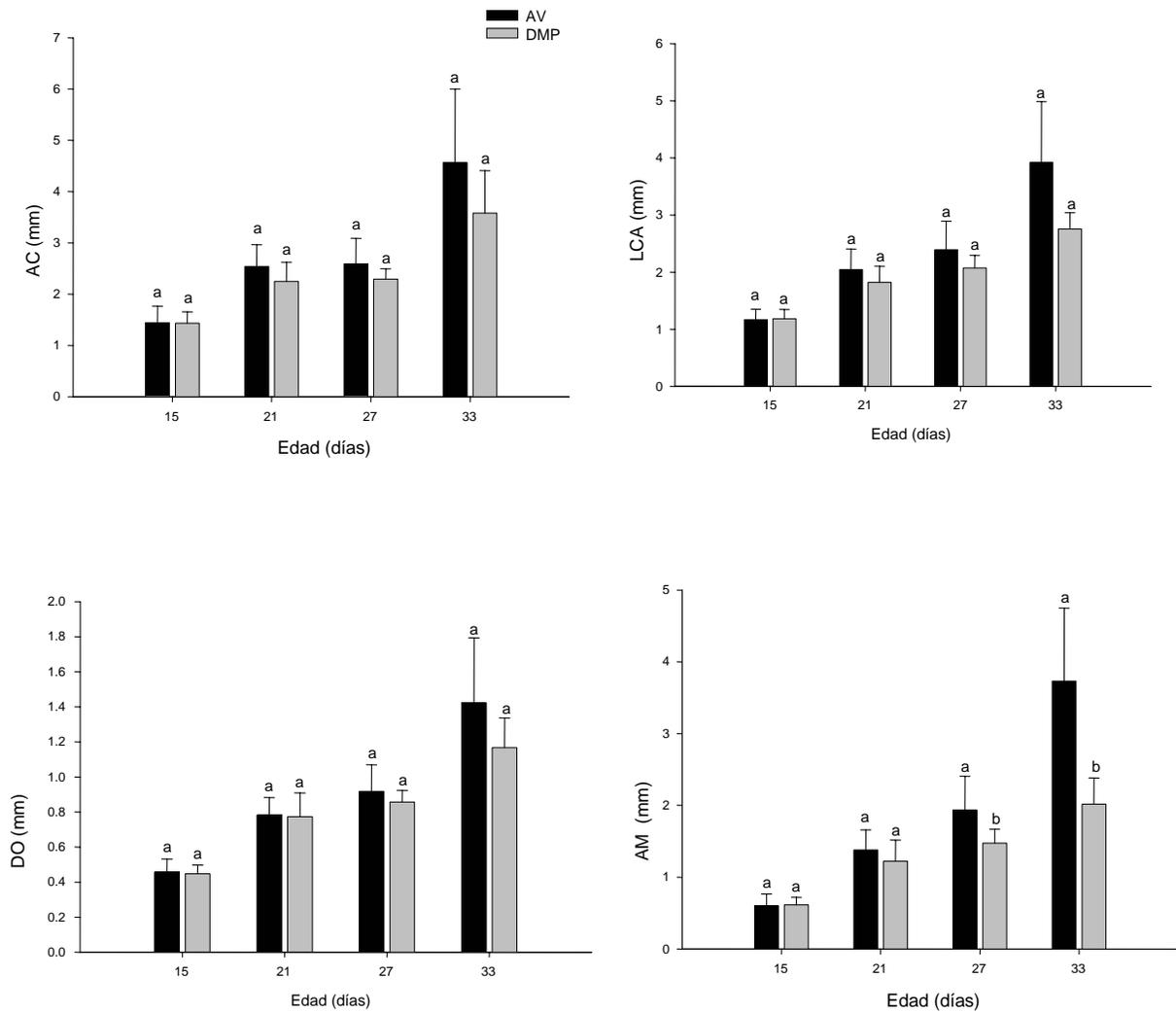


Figura 35. Mediciones morfométricas de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) alimentadas con alimento vivo (AV) o una dieta microparticulada (DMP) a partir del día 17. A) AC = Altura de la cabeza; B) LCA = Longitud de la cabeza; C) DO = Diámetro del ojo; D) AM = Altura del músculo. Los valores representan la media \pm desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencia significativa ($P < 0.05$) a cada edad.

El análisis histológico reveló que a partir del día 21, las larvas alimentadas con AV presentaban una altura de los enterocitos del intestino anterior ($22,02 \pm 3,28 \mu\text{m}$) y área del

núcleo de los hepatocitos ($22,51 \pm 3,59 \mu\text{m}^2$), significativamente mayores ($P < 0,05$) a los valores observados en las larvas alimentadas con la DMP ($16,80 \pm 3,35 \mu\text{m}$; $17,93 \pm 2,21 \mu\text{m}^2$, respectivamente) (Fig. 36A, B, pág. 87).

A lo largo del período de estudio, e independientemente del tipo de alimento suministrado, se observaron vacuolas acidófilas de diferentes tamaños en la región apical de los enterocitos del intestino posterior, resultado de la absorción de proteínas por pinocitosis (Figs. 37 y 38, págs. 88 y 89, respectivamente).

El análisis estadístico de la distribución de frecuencias del área de las vacuolas pinocitóticas indicó que, a partir del día 21, el área de las vacuolas observadas en las larvas alimentadas con el AV presentan un área significativamente mayor con respecto a las observadas en las larvas alimentadas con la DMP (Fig. 39, pág. 90).

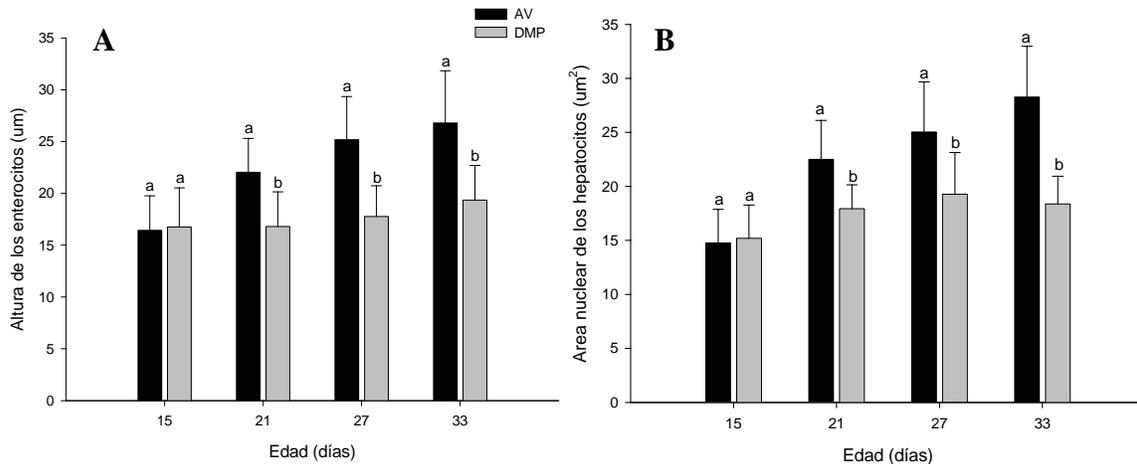


Figura 36. Mediciones de la altura de los enterocitos y área nuclear de los hepatocitos de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) alimentadas con alimento vivo (AV) o una dieta microparticulada (DMP) a partir del día 17. A) Altura de los enterocitos; B) Área del núcleo de los hepatocitos. Los valores representan la media \pm desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencia significativa ($P < 0,05$) a cada edad.

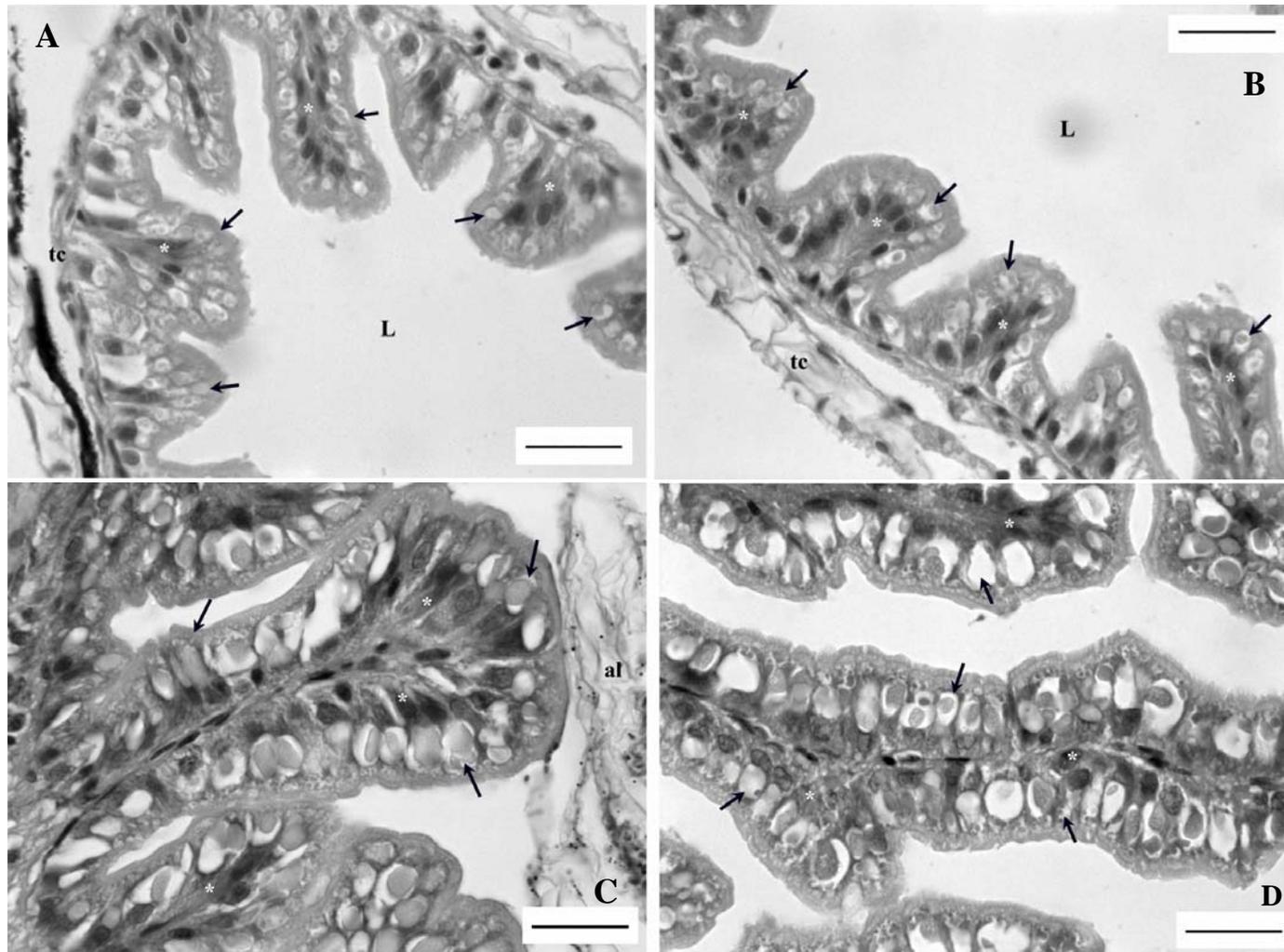


Figura 37. Microfotografías de las vacuolas pinocitóticas (flechas) en el intestino posterior de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) alimentadas con alimento vivo (AV) o una dieta microparticulada (DMP). A) Día 15 AV; B) Día 15 DMP; C) Día 21 AV; D) Día 21 DMP. Los asteriscos muestran los núcleos de los enterocitos; al = alimento; L = lumen; tc = tejido conectivo. Tinción; hematoxilina-eosina. Barras = 20 μ m.

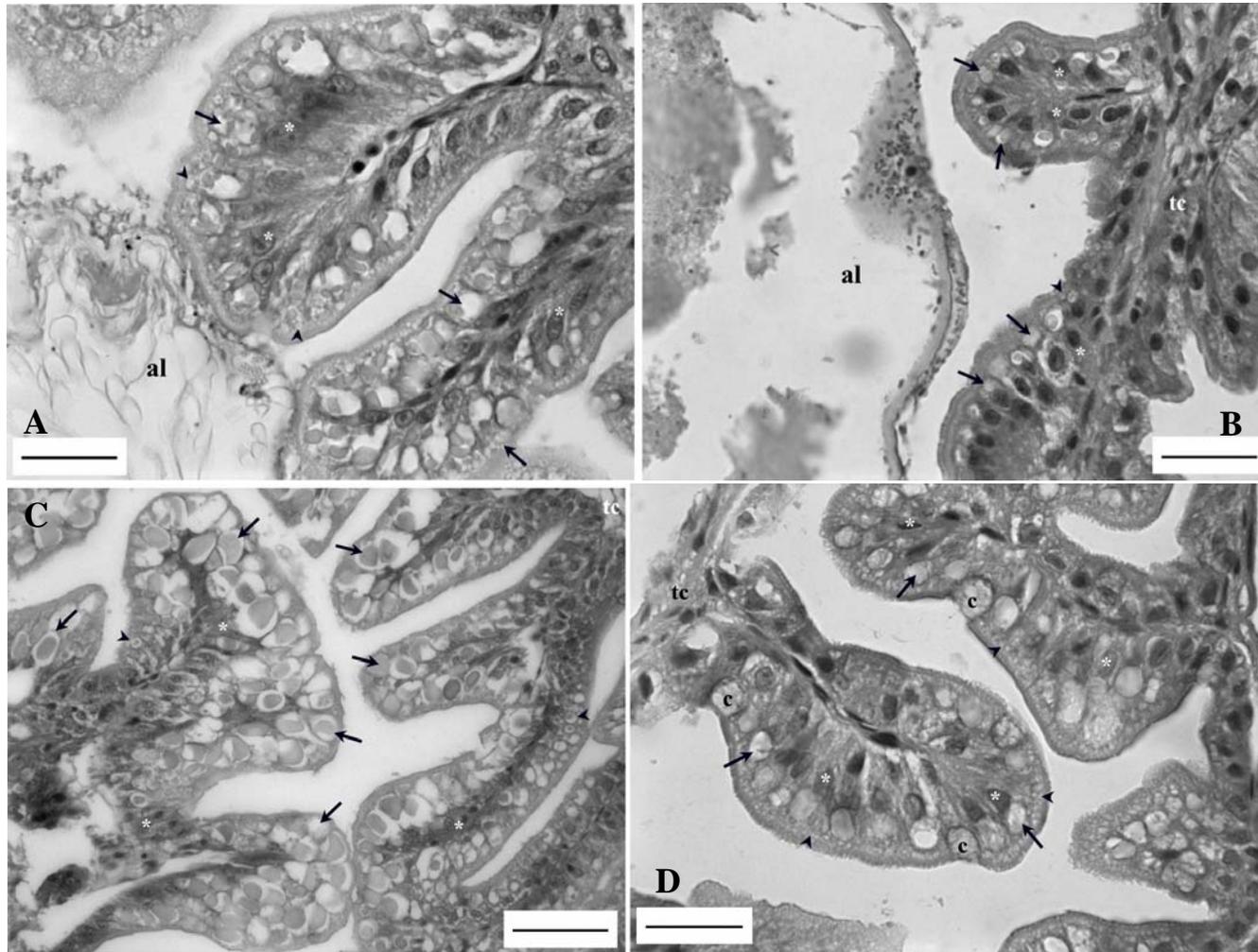


Figura 38. Microfotografías de las vacuolas pinocitóticas (flechas) en el intestino posterior de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) alimentadas con alimento vivo (AV) o una dieta microparticulada (DMP). A) Día 27 AV, barra = 20 μ m; B) Día 27 DMP, barra = 20 μ m; C) Día 33 AV, barra = 50 μ m; D) Día 33 DMP, barra = 20 μ m. Los asteriscos muestran los núcleos de los enterocitos. Las cabezas de flechas muestran vacuolas pinocitóticas de menor tamaño. c = células caliciformes; al = alimento; tc = tejido conectivo. Tinción, hematoxilina-eosina.

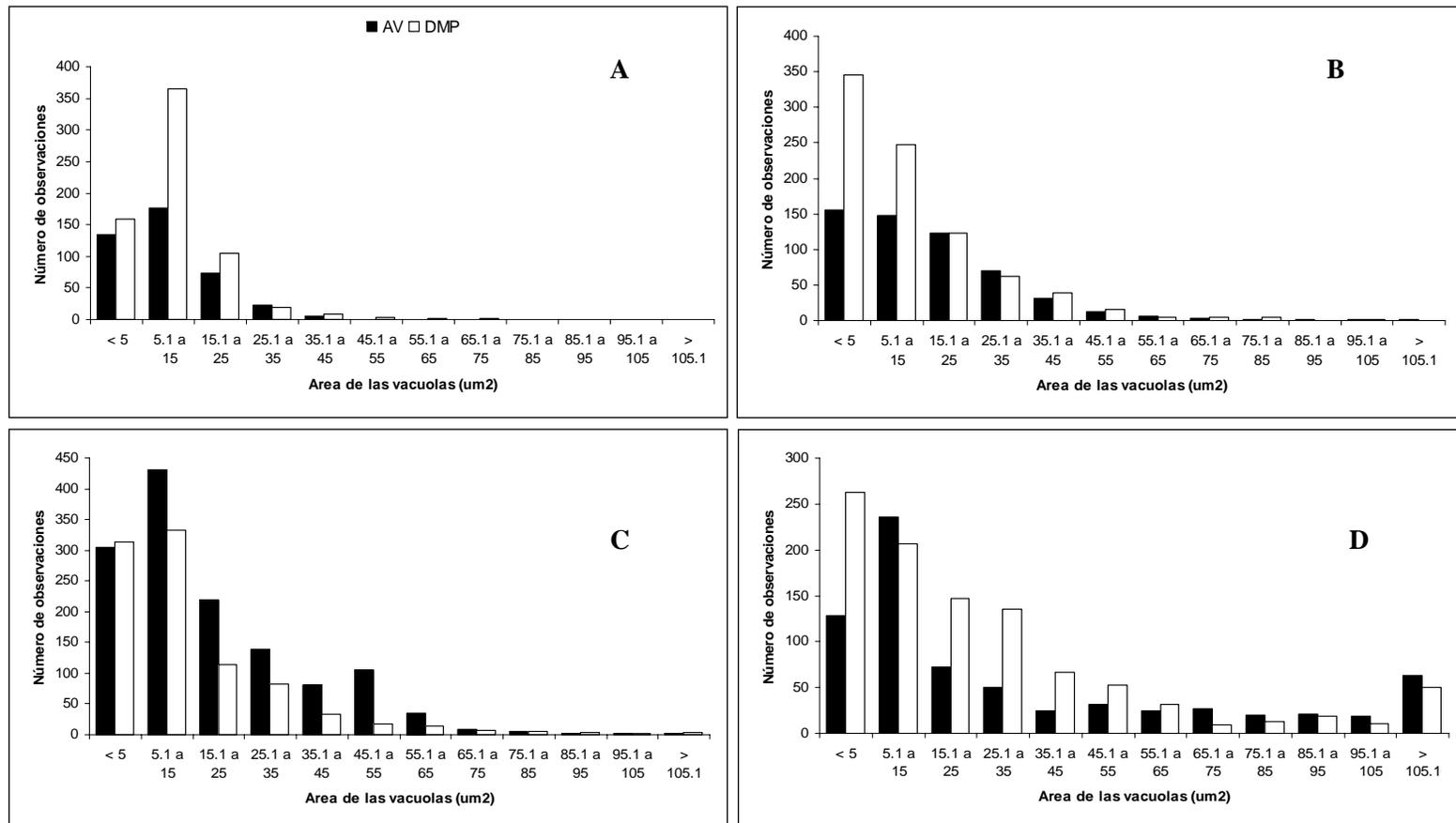


Figura 39. Distribuciones de frecuencias del área de las vacuolas pinocitóticas en el intestino posterior de larvas de la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*). AV: larvas alimentadas con alimento vivo; DMP: larvas alimentadas con dieta microparticulada. A) Larvas de 15 días $X^2 = 116.32$, $p > 0.000$, $n = 1075$; B) Larvas de 21 días; $X^2 = 149.30$, $p < 0.000$, $n = 1402$; C) Larvas de 27 días; $X^2 = 689.97$, $p < 0.000$, $n = 2314$; D) Larvas de 33 días; $X^2 = 249.43$, $p < 0.000$, $n = 1720$.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

El desarrollo del cultivo de larvas de peces marinos demanda la integración del conocimiento de diferentes aspectos involucrados en la alimentación, nutrición y ambiente de cultivo. En conjunto, un mejor conocimiento de la interacción de los factores físicos, técnicos y biológicos ha permitido establecer estrategias de cultivo que alcanzan su máximo en el desarrollo de tecnologías de cultivo a escala comercial. Ejemplo de lo anterior son los estudios realizados con *Dicentrarchus labrax* (Gatesoupe y Robin, 1982; Chatain, 1989; Bernabé y Guissi, 1994; Cahu y Zambonino-Infante, 1994; Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Fontagné *et al.*, 2000) y *Sparus aurata* (Sarasquete *et al.*, 1993; Fernández-Díaz *et al.*, 1994; Ronnestad *et al.*, 1994; Salhi *et al.*, 1994; Sarasquete *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 1997; Kolkovski *et al.*, 1997a; Parra y Yúfera, 2000) en Europa y diferentes especies de lenguados (Fukuhara, 1986; Kanazawa *et al.*, 1989; Kurokawa y Suzuki, 1998; Furuita *et al.*, 1999) en Japón. Bajo este marco, la presente tesis abarca algunos de los aspectos requeridos para desarrollar una mejor planeación de estrategias de alimentación, así como en la evaluación del alimento artificial en el cultivo larval, como un paso hacia el desarrollo de una estrategia integral de cultivo de la cabrilla arenera.

VIII.1. SISTEMA VISUAL Y EFICIENCIA ALIMENTICIA

Las larvas de peces marinos son depredadores visuales (Hunter, 1981). Esto sugiere que la eficiencia alimenticia, depende parcialmente de los cambios estructurales del sistema visual. Los resultados del presente estudio muestran que el desarrollo estructural del ojo de larvas de la cabrilla arenera sigue un patrón general similar al reportado para otras especies de teleósteos (Blaxter y Staines, 1970; Blaxter, 1986; Kvenseth *et al.*, 1996; Roo *et al.*, 1999), en el cual, se identificaron dos períodos de diferenciación, ambos con importantes implicaciones que favorecen el proceso alimenticio de las larvas. El primero

de ellos como una preparación hacia el inicio de la alimentación exógena y el segundo durante el proceso de transformación a juveniles.

Los primeros cambios estructurales en la retina ocurren durante las primeras 12 horas después de la eclosión. La diferenciación de la capa ganglionar, previa a la formación de los conos, indica un desarrollo simultáneo entre los receptores de la retina y el tallo óptico cerebral (Schwassmann, 1965), lo que permite la transmisión de impulsos visuales en el momento en que el ojo es funcional (Kvenseth *et al.*, 1996). La aparición del pigmento epitelial en la retina es una característica de un ojo funcional, ya que permite la recepción de fotones (Kawamura *et al.*, 1984; Carvalho *et al.*, 2004). En las larvas de la cabrilla arenera, el pigmento visual está ausente durante el periodo de alimentación endógena y se observa al momento de la primera alimentación al día 2. En contraste, Porter y Theilacker (1999) observaron que desde la eclosión, la retina de larvas de *Theragra chalcogramma* presentaba pequeños parches de pigmento. Sin embargo, los autores sugirieron que el ojo no es funcional, y reportaron que al momento de la primera alimentación (4 días después de la eclosión) se desarrolla por completo la capa de pigmento. Desafortunadamente, no reportaron la ingesta de alimento en dicho estudio.

Al igual que en otras especies de teleósteos como *Clupea harengus* (Blaxter, 1975), *Pagrus major* (Kawamura *et al.*, 1984), *Pseudopleuronectes americanus*, (Evans y Browman, 2004), los únicos fotorreceptores en la retina de la cabrilla arenera al momento de la primera alimentación son conos sencillos. A pesar de la evidente funcionalidad del ojo y por consiguiente, el inicio de la alimentación exógena, el sistema visual de las larvas de peces al momento de la primera alimentación presenta ciertas limitaciones funcionales (e. g. bajos niveles de sensibilidad y agudeza visual). Más aún, ha sido demostrado que la retina formada por conos sencillos en larvas de peces no puede reaccionar ante cambios en la intensidad de la luz ambiental (Blaxter y Jones, 1967; Ali,

1975), lo cual delimita en cierta medida la distribución y zona de alimentación de las larvas en la columna de agua.

El segundo periodo de diferenciación estructural en el sistema visual de la cabrilla arenera consistió en la aparición de conos dobles y de bastones en la retina a partir del día 16 y finalizando el día 22. De acuerdo a Sandy y Blaxter (1980), los conos dobles se forman de la fusión de dos conos sencillos adyacentes. Kawamura *et al.* (1984) propuso que la aparición de los conos dobles en la retina representaba una preparación hacia un tipo de vida bentónico, y que su presencia está asociada a un incremento en la sensibilidad visual a bajos niveles de luz ambiental. Kvenseth *et al.* (1996) demostraron que la aparición de los conos dobles cambia la organización espacial de los fotorreceptores en la superficie de la retina, lo cual, en conjunto con el incremento en el diámetro del ojo, han sido propuestos como adaptaciones hacia un incremento de la capacidad visual de las larvas que les permita buscar presas dentro de un mayor intervalo de intensidad luminosa, así como permitir la detección de depredadores (Hairston *et al.*, 1982; Blaxter, 1986; Kvenseth *et al.* 1996). En el día 16, durante la etapa de flexión, se observan nuevas células basales en la capa nuclear externa de la retina de la cabrilla arenera. Estas células han sido observadas en otros teleósteos, y si bien los tiempos de aparición y tallas de las larvas en que se han observado son específicos; en todos los casos aparecen durante la transformación a juvenil. Ha sido reportado que tales células son precursoras de otro tipo de fotorreceptores, los bastones (Blaxter y Staines, 1970; Blaxter, 1975; Sandy y Blaxter, 1980; Blaxter, 1986). Ali (1975) mostró que la aparición de los bastones en la retina incrementa la capacidad visual de las larvas, ya que estas células son mucho más sensibles que los conos, lo que trae como consecuencia un incremento en la detección e ingestión de presas. Al día 22 (etapa de postflexión), el sistema visual de la cabrilla arenera está completamente desarrollado en una retina dual (i.e. formada por conos y bastones). En condiciones naturales, después de un periodo larval planctónico, la cabrilla arenera se

asienta en un ambiente bentónico donde se alimenta de invertebrados y peces pequeños (Lluch-Cota, 1995).

Las implicaciones funcionales dentro del proceso alimenticio de estos dos períodos de diferenciación estructural del sistema visual de las larvas de la cabrilla arenera pueden resaltarse si se considera que el desarrollo ontogenético del tubo digestivo también determina en cierto grado la eficiencia alimenticia, ya que en el presente estudio, el número de presas ingeridas está significativamente relacionado con la altura del tubo digestivo ($r^2=0,960$). Recientemente, Peña *et al.* (2003) describieron el desarrollo ontogenético del tubo digestivo. De esta forma se puede establecer una sincronización morfológica y funcional del sistema visual y digestivo, la cual inicia desde el período de alimentación endógena y presenta un primer punto de convergencia en el inicio de la alimentación exógena (Tabla XIII, pág. 95), cuando ambos sistemas alcanzan cierto grado de desarrollo que permite el inicio de la alimentación exógena, una vez finalizadas las reservas vitelinas. Si bien el número de presas ingeridas en este momento es relativamente bajo (1 rotífero por larva) debe considerarse que la densidad de presas puede incrementar el consumo de las mismas por parte de las larvas, lo cual se discutirá en el siguiente apartado.

Los días subsiguientes se caracterizan por un incremento en el tamaño del tubo digestivo y del ojo, con un consecuente incremento en el número de presas ingeridas. Sin embargo, no es sino hasta el día 6 en el que se observa un incremento significativo en el número de presas ingeridas por larva. Este incremento significativo observado a partir del día 6 puede deberse a la torsión del tubo digestivo (Tabla XIII, pág. 95). Peña *et al.* (2003) reportaron que la torsión del tubo digestivo de la cabrilla arenera ocurre entre los días 6 - 9. Govoni *et al.* (1986) asociaron la torsión del tubo digestivo con un incremento en la capacidad alimenticia de las larvas de peces, incrementando el tiempo de permanencia de las presas en el tubo digestivo, así como la digestión y absorción. Por otra parte, el

incremento en tamaño de los caracteres morfométricos, la aparición de nuevos fotorreceptores y el incremento en el tamaño de la boca, aumentan la capacidad natatoria y la sensibilidad visual de las larvas, facilitando la detección y captura de presas más grandes (Li *et al.*, 1985; Roo *et al.*, 1999), lo cual se observó en los tanques de cultivo desde el momento en que se introdujeron nauplios de *Artemia*.

Tabla XIII. Diferenciación de los sistemas digestivo y visual durante el desarrollo de las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*).

Estado de desarrollo	Edad (días)	Tubo digestivo*	Sistema visual	Intensidad alimenticia (presas por larva)	Incidencia alimenticia (% de larvas con alimento)
Eleuteroembrión.	0 (eclosión)	Tubo recto indiferenciado. Boca y ano cerrados.	Lente presente. Retina indiferenciada.	0	0
Larva preflexión.	2 (primera alimentación exógena)	Tubo recto diferenciado en intestinos anterior y posterior. Boca y ano abiertos. Actividad enzimática digestiva**.	Retina diferenciada en estratos. Presencia de conos sencillos. Pigmento visual presente.	1 (rotíferos/larva)	35 %
	3-6	Incremento del tamaño del tubo digestivo. Absorción de nutrientes.	Incremento del tamaño del ojo. Aumento en el número de conos.	7-15 (rotíferos/larva)	100 %
	7-10	Torsión del tubo digestivo.	Incremento del tamaño del ojo. Aumento en el número de conos	20-56 (rotíferos/larva)	100 %
Larva flexión y postflexión.	11-22	Desarrollo del estómago y ciegos pilóricos.	Formación de conos dobles, aparición de bastones.	2-12 (nauplios de <i>Artemia</i> /larva)	100 %

*Peña *et al.* (2003).

**Álvarez-González (2003) y presente estudio.

Ahora bien, considerando los cambios estructurales en el desarrollo de los sistemas visual y digestivo descritos anteriormente, es posible sugerir que las condiciones de cultivo deben adaptarse a las capacidades visuales de las larvas. Por un lado, debido a la baja capacidad visual durante los primeros días de desarrollo, es necesario incrementar la intensidad de luz, así como la fotofase, de tal forma que se favorezca la ingestión de presas. Por otro lado, debido al incremento significativo en el número de presas ingeridas durante el período de torsión del tubo digestivo, es posible sugerir un incremento en la densidad de presas durante este período se vería reflejado en una mayor intensidad alimenticia. Finalmente, durante el período de transformación a juveniles en el que aparecen los bastones y las larvas se asientan en el fondo de los tanques de cultivo (*obs. per.*), podría suponerse que una disminución de la intensidad luminosa, favorezca la detección de presas. No obstante, se requieren de ensayos posteriores que corroboren las hipótesis anteriores.

VIII.2. PRIMERA ALIMENTACIÓN Y EFICIENCIA ALIMENTICIA

VIII.2.1. Efecto de la intensidad de luz, color de tanque y densidad de alimento

Durante la transición de la alimentación endógena a exógena las larvas son más susceptibles a inanición ya que deben iniciar la búsqueda e ingesta del alimento (McGurk, 1984; Martin y Wright, 1987; Yin y Blaxter, 1987; Richard *et al.*, 1991; Yúfera *et al.*, 1993), por lo que la implementación de condiciones de cultivo que permitan un mejor desempeño alimenticio durante este cambio, puede incrementar las posibilidades de sobrevivencia.

En el primer experimento se determinó que la presencia de luz afectó significativamente tanto la incidencia, como la intensidad alimenticia de las larvas de la cabrilla arenosa al momento de la primera alimentación, ya que no se observó alimento en las larvas en la oscuridad. Blaxter (1965) y Puvanendran y Brown (1998) argumentan que a mayores intensidades de luz, el aumento en la incidencia alimenticia de larvas de peces se debe a un incremento en el contraste entre la presa y el entorno.

Al momento de la primera alimentación, no se observó diferencia significativa en la intensidad alimenticia de las larvas alimentadas bajo condiciones de luz (100, 400 y 700 lux). Gulbrandsen (1991) reportó una cantidad similar de presas en el tubo digestivo de larvas de *Hippoglossus hippoglossus* en la primera alimentación. Blaxter (1986) sugirió que el número de presas ingeridas por las larvas de peces está influenciado por la saciedad y la temperatura.

La casi nula incidencia e intensidad alimenticia observada en la oscuridad en las larvas de la cabrilla arenosa, también ha sido reportada en otras especies marinas, tanto en ambiente natural como en cultivo (Hunter 1981; Huse 1994; Sánchez-Velasco, 1998; Downing y Litvak, 2001). Huse (1994) sugirió que la presencia de presas en el tubo digestivo se debía a la ingestión accidental durante los procesos de osmorregulación. De acuerdo con Blaxter (1986), las larvas de teleósteos tienen un umbral de estimulación visual de 0,01 lux. A menores intensidades de luz no existe el estímulo visual para diferenciar a las presas, más aún, la carencia de bastones en la retina de las larvas de peces reduce su capacidad visual a bajas intensidades de luz (Ali, 1975). Recientemente, Downing y Litvak (2001) atribuyeron la ingestión de presas por parte de larvas de *Melanogrammus aeglefinus* en la oscuridad, a diferentes modalidades sensoriales como la vía química, la presencia de neuromastos libres o la línea lateral.

Ahora bien, en el segundo experimento se obtuvieron resultados un tanto inesperados. La incidencia alimenticia no fue afectada significativamente por el color del tanque, pero sí por la densidad de presas. Esto puede atribuirse al grado de desarrollo estructural del sistema visual de la cabrilla arenosa al momento de la primera alimentación. La presencia de conos sencillos en la retina de las larvas de la cabrilla arenosa durante la primera alimentación, concuerda con lo reportado en otras especies (Evans y Browman, 2004). Helvik *et al.* (2001) reportaron que la mayoría de los conos sencillos observados en la retina de las larvas de peces durante los primeros días de desarrollo son sensibles al color verde. Recientemente, Evans y Browman (2004) reportaron

que la predominancia de un solo tipo de opsinas en los conos limita la agudeza visual y la sensibilidad a la longitud de onda, las cuales son las responsables del contraste visual entre los objetos (e. g. presas) y el entorno.

Por su parte, la interacción entre el color del tanque y la densidad de presas se observó en los tanques blancos y negros, mientras que en los grises no se observó ningún efecto. La mayor intensidad alimenticia de las larvas de la cabrilla arenera al momento de la primera alimentación se observó en los tanques negros a mayores densidades de presas (10 y 15 rotíferos/ml), mientras que la menor intensidad se observó en los tanques blancos a menor densidad de presas (5 rotíferos/ml). Al respecto puede mencionarse que el efecto de la densidad de presas en la alimentación y crecimiento de larvas de peces está bien documentado. En efecto, una elevada densidad de presas reduce el tiempo de búsqueda por parte de la larva, así como la distancia de reacción, incrementa la tasa de encuentro depredador-presa, y también disminuye el tiempo de manejo de la presa (Houde 1978; Houde et al., 1980; Werner y Blaxter 1981; Tilseth y Ellertsen, 1984; Gulbrandsen 1991; 1993; Hart, 1997; Parra y Yúfera 2000; Rabe y Brown 2001). Por otro lado, el hecho de observar un mayor número de presas ingeridas en los tanques de color negro, sugiere que el color negro proporciona un mayor contraste de los rotíferos en la columna de agua, favoreciendo su localización (Duray *et al.*, 1996, Naas *et al.*, 1996). Mientras que en los tanques de color blanco el reflejo de la luz, afecta la localización de presas al disminuir el contraste de las mismas con el color del fondo (Naas *et al.*, 1996).

Durante el cultivo larval, una elevada incidencia alimenticia en la primera alimentación exógena puede considerarse como un indicador de que las condiciones de cultivo son favorables de tal forma que permiten el reconocimiento de las presas y el inicio del proceso alimenticio. En un estudio reciente, Ashton y Rust (2003) sugirieron que una incidencia alimenticia superior al 50%, en la primera alimentación en larvas de *Sebastes melanops*, puede considerarse como un buen indicador de la sobrevivencia durante los siguientes días de cultivo. En el presente estudio, la incidencia alimenticia de las larvas de

la cabrilla arenera con respecto a la intensidad de luz sólo fue superior a 50% en las larvas alimentadas a 700 lux (52%), mientras que con respecto al color del tanque y la densidad de presas fue superior a 50% en todos los tratamientos excepto en los tanques grises y blancos a 5 rotíferos/ml (48 y 46%, respectivamente). Con base a esto, podría sugerirse que las condiciones de cultivo que mejor favorecen la incidencia alimenticia durante la primera alimentación de la cabrilla arenera son una intensidad de luz de 700 lux, el color de tanque gris o negro y una densidad de presas superior a 5 rotíferos/ml. No obstante, el efecto de la interacción entre las condiciones de cultivo como el color del tanque, la densidad de presas y la intensidad de luz varía de manera interespecífica, ya que existen reportes contradictorios sobre el efecto de estos factores en el crecimiento de diferentes especies. Duray *et al.* (1996) reportaron que no existe diferencia en la sobrevivencia de larvas de *Epinephelus suillus* en tanques negros y bronceados ("tan tanks"), pero las larvas alcanzaron una mayor talla en los tanques bronceados. Chatain y Ounais-Guschemann (1991) obtuvieron larvas de *Sparus aurata* con mayor talla en tanques blancos, pero la sobrevivencia fue mayor en tanques negros. En contraste, los tanques negros favorecieron un mayor crecimiento en larvas de *Stizostedion vitreum* (Corazza y Nickum, 1981). Downing y Litvak (1999b) reportaron que la combinación de tanques negros con bajas intensidades de luz resultan en un menor crecimiento de larvas de *Melanogrammus aeglefinus* cuando se comparan con tanques blancos y negros a mayores intensidades de luz.

De los resultados obtenidos en el presente estudio, puede afirmarse que el sistema visual presumiblemente es la única vía sensorial involucrada en la alimentación durante los primeros días de desarrollo de la cabrilla arenera, así lo sugiere el hecho de que no se observó ingestión de presas en la oscuridad durante la primera alimentación y a que se observó una mayor eficiencia alimenticia en los tanques de color negro. Sin embargo, son necesarios estudios con respecto al papel y desarrollo de otras vías sensoriales, lo que permitirá tener un mejor entendimiento acerca del proceso alimenticio de las larvas, así

como del efecto de estas condiciones de cultivo en el crecimiento y sobrevivencia de las mismas.

VIII.2.2. Efecto del retraso de la primera alimentación en el desarrollo y eficiencia alimenticia.

Varios autores concuerdan en señalar que las elevadas mortalidades observadas durante los primeros días de desarrollo de los peces son debidas principalmente a depredación, inanición e infección bacteriana, lo cual ha llevado a considerar al período larval como crítico en el ciclo de vida, siendo particularmente más vulnerables durante la primera alimentación (Govoni *et al.*, 1986). La presencia de larvas con síntomas de inanición durante el cultivo ha sido poco descrita. Generalmente, estos análisis se realizan con poblaciones naturales en búsqueda de elementos que permitan establecer la dinámica del reclutamiento en las pesquerías (Theilacker y Watanabe, 1989).

En el presente estudio fue posible observar que un retraso en la primera alimentación de las larvas de la cabrilla arenosa tiene un efecto significativo en el crecimiento, desarrollo y eficiencia alimenticia de las mismas. Lo cual también ha sido descrito en larvas de *Leuresthes tenuis* (May, 1971), *Morone saxatilis* (Rogers y Westin, 1981) y *Sparus aurata* (Yúfera *et al.*, 1993) en condiciones de cultivo.

La descripción de caracteres morfométricos e histológicos permitió distinguir entre las larvas sometidas a un retraso en la alimentación. Así, fue posible distinguir que para el día 5, cuando la mortalidad de las larvas en inanición total alcanza el 100%, todas las mediciones morfométricas de las larvas control fueron significativamente más grandes que las larvas de los tratamientos D1, D2 y D3. Por su parte, también en el día 5, pero a nivel histológico, se observaron diferencias entre las larvas control y las larvas D1, D2 y D3, sobre todo en el caso del área del núcleo de los hepatocitos, lo cual tiene sentido si se considera que es precisamente el hígado el primer sitio de acumulación de glucógeno (Guyot *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 2003), el cual utilizan las larvas como fuente de energía durante los períodos de inanición (Strüssmann y Takashima, 1990).

Un período de no alimentación muy prolongado lleva a las larvas a cierto grado de deterioro morfológico, histológico y fisiológico, del cual la recuperación no es posible y por lo tanto, la muerte es inevitable, aún cuando el alimento esté disponible. Este punto conocido como punto de no retorno (Blaxter y Hempel, 1963), marca el límite de tolerancia de las larvas ante la ausencia de alimento. En el caso de la cabrilla arenosa, el punto de no retorno ocurre cuando la alimentación exógena se retrasa 3 días (i.e. a los 4-5 días después de la eclosión). Lo cual ayuda a entender el hecho de que las larvas D3 no sobrevivieron a un período de inanición de 3 días. Resultados similares en cuanto al punto de no retorno han sido reportados por Lasker *et al.* (1970) en larvas de *Engraulis mordax* y por Yin y Blaxter (1987) para larvas de *Clupea harengus*, *Gadus morhua* y *Platichthys flesus*. No obstante, el tiempo al cual las larvas llegan al punto de no retorno ha sido asociado a la especie, duración del período de alimentación endógena, condición nutricional de los reproductores y temperatura del agua (Lasker *et al.*, 1970; Rogers y Westin, 1981).

Un aspecto a resaltar del presente estudio fue que la capacidad de recuperación de las larvas de la cabrilla arenosa después de un período de inanición, depende del tiempo en que se restringe el alimento, ya que las curvas de crecimiento de las larvas control D1 y D2, fueron similares, pero éstas últimas larvas fueron significativamente más pequeñas al final del experimento. La misma capacidad de recuperación fue reportada por May (1970) y Rogers y Westin (1981) en larvas de *Leuresthes tenuis* y *Morone saxatilis*, respectivamente. Del mismo modo, existen reportes de crecimiento compensatorio en especies como *Pagrus pagrus* (Rueda-González *et al.*, 1995; Yin y Blaxter, 1987) sometidas a ayunos parciales, las cuales crecen igual que los individuos que han sido alimentados.

Los efectos del retraso en la primera alimentación de la cabrilla arenosa no sólo se vieron reflejados a nivel histológico y morfométrico. La eficiencia alimenticia también fue afectada por el retraso de la primera alimentación. La intensidad alimenticia inicial (i.e. el número de presas ingeridas en la primera alimentación de cada tratamiento) se incrementó con el tiempo de inanición. Esto pudo deberse a que después de un período

de inanición, las larvas presentan una respuesta alimenticia activa (Mookerji y Ramakrishna, 1995; Rueda-González et al., 1995; Hart, 1997; Parra y Yúfera, 2000), lo cual resulta en un incremento en el número de presas ingeridas. Sin embargo, el hecho de que las larvas del tratamiento D3 no sobrevivieran, sugiere que a pesar de que fueron capaces de buscar e ingerir alimento después de 3 días de inanición, fueron incapaces de digerir el mismo. Como se mencionó anteriormente, al llegar al punto de no retorno, el deterioro a nivel histológico no permitió la correcta digestión del alimento. Lo anterior corrobora lo descrito por Theilacker (1978) en el sentido de que el tubo digestivo y el hígado son los primeros órganos en resentir los efectos de la inanición. En efecto, el uso de los tejidos como fuente de energía durante la inanición (Collins y Anderson, 1995) produce alteraciones celulares, lo cual dificulta la digestión del alimento, ya que también se afecta la actividad enzimática digestiva (Yúfera *et al.*, 1993).

La descripción del efecto producido por la inanición sobre las larvas de peces en condiciones de cultivo permite identificar grados de deterioro a nivel celular y morfológico que pueden poner en riesgo la calidad de las larvas producidas. Durante este estudio, fue posible establecer la utilidad de ciertos criterios para identificar aquellas características que denotan un deterioro estructural debido a un retraso en la primera alimentación. Tradicionalmente, mediciones (i.e. longitud total, longitud notocordal, altura de la cabeza, etc) e índices morfológicos (i.e. relación diámetro del ojo/altura de la cabeza, longitud de la cabeza/longitud total, etc) han sido utilizados para establecer la condición de las larvas de peces (Ehrlich *et al.*, 1976; Theilacker, 1978; Yúfera *et al.*, 1993).

En la cabrilla arenera, todas las mediciones morfológicas mostraron ser un buen indicador del efecto del retraso en la primera alimentación en el día 5. Sin embargo, a partir del día 14, sólo se distinguieron diferencias entre las larvas control y las larvas D2. Mientras que al final del experimento (día 19), las diferencias entre las larvas control y las larvas D1 sólo fueron evidentes en la LT y la AM. Por su parte, las características histológicas también fueron un buen indicador durante los primeros días de desarrollo, mientras que al

final del experimento no fue posible distinguir entre las larvas control, D1 y D2. Esto dificulta la determinación del efecto de la inanición en las larvas durante la segunda semana de desarrollo mediante el uso de caracteres morfométricos e histológicos. La utilidad de estas técnicas varía entre especies, condiciones de inanición y diseños experimentales, lo cual hace complicada su utilización práctica con fines de comparaciones interespecíficas. Por ejemplo, Ehrlich *et al.* (1976) utilizaron diferentes mediciones morfométricas para establecer la condición de larvas de *Clupea harengus* y *Pleuronectes platessa*. Concluyeron que el ángulo del eje pectoral era un buen indicador del estado de inanición de larvas de ambas especies, mientras que la altura del cuerpo no distinguía entre larvas en inanición y alimentadas en ninguna de las dos especies.

Existe un consenso generalizado entre diferentes autores que señalan que los criterios histológicos son mejores que los morfológicos al momento de hacer comparaciones interespecíficas sobre el grado de inanición de las larvas de peces, aún cuando se considera que consumen más tiempo (Theilacker, 1986; Theilacker y Watanabe, 1989). En el caso de la cabrilla arenosa, los criterios histológicos no permitieron observar los efectos del retraso en la primera alimentación, ya que a partir del día 12 no se observó diferencia significativa en la altura de los enterocitos ó diámetro del núcleo de los hepatocitos en las larvas sometidas a un retraso en la primera alimentación. Lo cual se puede considerar como un reflejo de la elevada capacidad de recuperación exhibida por las larvas. Aún así, sería interesante desarrollar estudios que permitan evaluar si existe algún efecto negativo a nivel fisiológico más que en el estructural. En este sentido, desde hace algunos años se han utilizado caracteres bioquímicos que permiten estimar el estado de condición nutricional. Los más utilizados son la tasa ARN/ADN (Buckley, 1979; Clemmesen, 1996), la actividad enzimática digestiva (Ueberschär y Clemmesen, 1992; Ueberschär, 1993) y la presencia de lípidos (Fraser *et al.*, 1987). De ellos, el más utilizado es la tasa RNA/DNA, la cual permite evaluar, por un lado, la respuesta fisiológica de las larvas ante condiciones de malnutrición, y por otro lado, el potencial de crecimiento (Buckley *et*

al., 1999), lo que representa una herramienta de gran utilidad en pesquerías y con gran potencial en la acuicultura como criterio en la evaluación de la condición nutricional de las larvas bajo diferentes condiciones de cultivo y alimentación. Recientemente, Khemis *et al.* (2000) resaltaron el potencial de la determinación de la tasa RNA/DNA como indicador de la condición nutricional de larvas de *Pseudopleuronectes americanus* al detectar que las larvas alimentadas con alimento vivo presentaron una mayor tasa RNA/DNA que las alimentadas con una dieta artificial.

El presente estudio sugiere que el uso de indicadores morfométricos e histológicos son una herramienta valiosa que permite identificar larvas de la cabrilla arenera que presentan características que denotan malnutrición e inanición durante condiciones de cultivo, sobretodo durante los primeros días de desarrollo (día 5 después de la eclosión). Lo cual puede facilitar la evaluación de la estrategia de cultivo y alimentación, así como la toma de decisiones en cuanto a las condiciones actuales del cultivo. En este sentido, en el último apartado de la presente tesis se discute el uso de los caracteres morfométricos e histológicos como criterios para evaluar el efecto de una dieta microparticulada sobre el desarrollo y crecimiento de las larvas de la cabrilla arenera sometidas a una estrategia de destete.

VIII.3. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y ALIMENTACIÓN DE LARVAS

VIII.3.1. Desarrollo y distribución de la actividad enzimática digestiva.

La caracterización de la organogénesis del sistema digestivo así como de la ontogenia enzimática son pasos fundamentales hacia una mayor comprensión de la fisiología nutricional de las larvas de peces (Segner, 1996). Gracias a la integración de estos estudios, ha sido posible establecer que tanto el tubo digestivo como la actividad enzimática de las larvas de peces están lo suficientemente desarrollados al momento de la primera alimentación para digerir el alimento (Segner *et al.*, 1993). Los días subsiguientes se distinguen por un incremento gradual en la actividad enzimática, así como por la

diferenciación estructural del tubo digestivo. Durante el proceso de transformación a juveniles se adquieren las características morfológicas y enzimáticas que permiten desplegar el patrón enzimático característico de juveniles y adultos (aparición del estómago y ciegos pilóricos, y la secreción de pepsina y ácido clorhídrico) (Kapoor *et al.*, 1975).

Los estudios realizados con las larvas de la cabrilla arenera permiten afirmar que las larvas siguen el patrón general antes mencionado. En un estudio previo, Peña *et al.* (2003) describieron el desarrollo ontogenético del tubo digestivo. Reportaron que al momento de la primera alimentación el tubo digestivo presenta una diferenciación inicial en intestino anterior, intestino posterior y recto. La mucosa intestinal presenta enterocitos con el borde de cepillo bien desarrollado, el cual se consideró como la evidencia estructural de la funcionalidad de estas células. Esto fue reforzado por la detección histoquímica de gránulos positivos al reactivo de Schiff (un colorante específico de carbohidratos) en la región supranuclear de los enterocitos, resultado de la absorción de carbohidratos.

En el presente estudio se detectó, desde el momento de la primera alimentación, la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina en el borde apical de los enterocitos. Las fosfatasas son enzimas que hidrolizan enlaces con fósforo y su presencia es característica de las membranas celulares donde ocurren procesos de absorción (Lojda *et al.*, 1979). Esto corrobora el papel que juegan los enterocitos en el proceso de absorción intestinal desde que se agotan las reservas vitelinas. Al igual que en las larvas de la cabrilla arenera, su actividad ha sido detectada en el intestino e hígado de diferentes especies (Goel y Sastry, 1973; Mitchell *et al.*, 1986; Cousin *et al.*, 1987; Segner *et al.*, 1989; Gawlicka *et al.*, 1995; Tengjaroenkul *et al.*, 2002). Baglolle *et al.* (1998) reportaron la presencia de fosfatasa alcalina en el riñón de larvas de *Pleuronectes ferrungines* y *Paralichthys dentatus* a partir del día 3, y Cousin *et al.* (1987) reportaron la presencia de fosfatasa ácida en el estómago de larvas y juveniles de *Scophthalmus maximus*. En un estudio previo, Álvarez-González (2003) reportó la presencia de fosfatasas ácida y alcalina en eleuteroembriones

de la cabrilla arenera. Debido a que durante el período de alimentación endógena, la absorción de los nutrientes del saco vitelino no ocurre en el incipiente tubo digestivo, la presencia de estas enzimas se asocia con los procesos de absorción del vitelo a través del endotelio de los capilares sanguíneos, donde ha sido demostrada la actividad de las fosfatasa (Lojda *et al.*, 1979; Cousin *et al.*, 1987; Sarasquete *et al.*, 1993).

En las larvas de la cabrilla arenera, la presencia de las fosfatasa fue descrita en el borde de cepillo de los enterocitos de ambos intestinos desde el día 2 hasta el día 30. No se observó un patrón de distribución diferencial entre ambos intestinos. Igualmente, Baglolle *et al.* (1998) no reportan ninguna distribución diferencial en la actividad de fosfatasa alcalina en larvas de *Paralichthys dentatus* y *Pleuronectes ferrunginea*. En estudios realizados en larvas de especies como *Ctenopharyngodon idella* (Stroband *et al.*, 1979), *Coregonus lavaretus* (Segner *et al.*, 1989) y *Sparus aurata* (Sarasquete *et al.*, 1993), en los cuales también se utilizó la enzimohistoquímica, sí se reportó una mayor presencia de fosfatasa alcalina en el intestino anterior desde los primeros días de desarrollo. Estos resultados sugieren que la absorción de nutrientes ocurre de manera más activa en el intestino anterior que en el intestino posterior (Stroband *et al.*, 1979; Segner *et al.*, 1989; Tengjaroenkul *et al.*, 2000).

A partir del día 15, la intensidad de la reacción de ambas fosfatasa se incrementó en ambos intestinos de las larvas de la cabrilla arenera. Posteriormente, se hizo evidente una reacción positiva en los ciegos pilóricos. Dicho incremento en la actividad enzimática es característico de las larvas de peces (Segner *et al.*, 1989; Moyano *et al.*, 1996). De hecho, el incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina ha sido considerado como un indicador del proceso de maduración de la función digestiva y de absorción de los enterocitos (Cahu y Zambonino-Infante, 1997; 2001). La maduración de la función digestiva del intestino también involucra al citosol de los enterocitos, como una disminución de la actividad de la enzimas citosólica leucina aminopeptidasa (Cahu y Zambonino-Infante, 2001). Simultáneamente, ocurre el inicio de la actividad secretora de

las glándulas gástricas, dando inicio a la digestión proteica ácida. Esto implica que se incrementa la absorción de nutrientes, mientras que la digestión intracelular disminuye gracias a la presencia de la pepsina a nivel gástrico.

Álvarez-González (2003) reportó que el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina en larvas de la cabrilla arenosa ocurre 12 días después de la eclosión, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. En ese mismo día, se registró el inicio de la actividad pepsina en el estómago, confirmando la madurez digestiva de la cabrilla arenosa. Sin embargo, el autor no presentó datos con respecto a la talla de las larvas al inicio de la secreción de pepsina. Previamente, Peña *et al.* (2003) reportaron la presencia de las glándulas gástricas en larvas de la cabrilla arenosa de 16 días de edad con una talla promedio de 7,2 mm a 25° C.

Durante el desarrollo de la actividad enzimática digestiva de las larvas de peces, dentro de las enzimas más estudiadas son aquellas sintetizadas en el páncreas y que actúan en el lumen intestinal participando en la digestión de proteínas. Particularmente, han sido estudiadas la acción de las endopeptidasas tripsina y quimotripsina, las cuales han sido reportadas en larvas de muchas especies (Alliot *et al.*, 1977; Takii *et al.*, 1985; Baragi y Novell, 1986; Oozeki y Bailey, 1995; Cahu *et al.*, 1998; Lazo *et al.*, 2000b). Gracias a la acción hidrolítica de estas enzimas, se generan polipéptidos que posteriormente son hidrolizados por una serie de enzimas (exoproteasas) que son sintetizadas en la mucosa intestinal, y que actúan a nivel de la membrana de los enterocitos. Dentro de las exoproteasas más estudiadas en las larvas de peces figuran la leucina-aminopeptidasa (Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Tengjaroenkul *et al.*, 2002), carboxilpeptidasa (Baragi y Lovell, 1986), aminopeptidasa (Mitchell *et al.*, 1986; Cousin *et al.*, 1987; Segner *et al.*, 1989; Segner *et al.*, 1993; Gawlicka, *et al.*, 1995;) y dipeptidil aminopeptidasa IV (Tengjaroenkul *et al.*, 2002). Estas enzimas han sido detectadas desde el inicio de la alimentación exógena y su presencia ha sido asociada con la maduración de los enterocitos.

En el presente estudio, se detectó por primera vez la acción de las exoproteasas aminopeptidasa y dipeptidil aminopeptidasa IV en las larvas de la cabrilla arenera desde el momento de la primera alimentación. Al igual que en otras especies de peces, el sitio de actividad fue a nivel de la membrana del borde de cepillo e incluso en la región supranuclear de los enterocitos en ambos intestinos y en los ciegos pilóricos a partir del día 20. Estas enzimas hidrolizan el enlace amino terminal de los oligopéptidos que han sido generados de la acción hidrolítica de las endopeptidasas (i.e. tripsina y quimotripsina) en el lumen intestinal (Lojda *et al.*, 1979). Como resultado de la acción de la aminopeptidasa y dipeptidil aminopeptidasa IV, se producen péptidos más pequeños y aminoácidos libres que posteriormente son absorbidos a través del borde de cepillo de los enterocitos. Debido a que los sustratos de estas enzimas se producen solamente después de la acción de las endopeptidasas, la presencia de estas exoproteasas sugiere que las larvas de la cabrilla arenera presentan la maquinaria enzimática para realizar la digestión de proteínas desde el inicio de la alimentación exógena. En efecto, recientemente, Álvarez-González (2003) detectó la presencia de tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa en las larvas de la cabrilla arenera desde el momento de la eclosión y posteriormente se registró un incremento gradual en su actividad.

Otro aspecto importante en la capacidad digestiva de las larvas es la de hidrolizar lípidos. La digestión de lípidos ocurre por la acción de las lipasas y esterases, las cuales hidrolizan ésteres carboxílicos de ácidos grasos (Lojda *et al.*, 1979). Recientemente, Peña *et al.* (2003) reportaron la presencia de vacuolas supranucleares en los enterocitos de la cabrilla arenera a partir del día 6. La presencia de dichas vacuolas ha sido relacionada con la absorción y almacenamiento de lípidos (Tanaka, 1973; Watanabe y Sawada, 1985; Deplano *et al.*, 1991; Sarasquete *et al.*, 1995). En el presente estudio, las larvas de la cabrilla arenera presentaron la actividad de la esterasa no específica desde el inicio de la alimentación exógena. En un estudio previo, Álvarez-González (2003) reportó la presencia de lipasa y esterasa no específica en larvas de la cabrilla arenera desde el momento de

la eclosión, que en conjunto con los resultados presentados en este estudio, permiten establecer la capacidad que presentan las larvas para digerir lípidos desde el inicio de la alimentación exógena. Más aún, la presencia de la esterasa no específica en la región supranuclear de los enterocitos sugiere que esta enzima participa de forma activa en los procesos de digestión intracelular y absorción de lípidos en la mucosa intestinal (Goel y Sastry, 1973; Segner *et al.*, 1989; Tengjaroenkul *et al.*, 2000).

A partir del día 15 se observó la actividad de la esterasa no específica en la mucosa de los ciegos pilóricos e incluso se observó en el estómago. Esto concuerda con lo reportado por otros autores en larvas de *Pleuronectes ferruginea* (Baglolle *et al.*, 1998) y *Coregonus lavaretus* (Segner *et al.*, 1989). Al igual que en el presente estudio, la presencia de la actividad de la esterasa no específica ha sido descrita en los hepatocitos y en las glándulas gástricas de *Coregonus lavaretus* (Segner *et al.*, 1989). En contraste, Gawlicka *et al.* (1995) reportaron la ausencia de esta enzima en el intestino anterior de larvas y juveniles de *Acipenser transmontanus*, no obstante, se detectó la presencia de esta enzima en los enterocitos de los ciegos pilóricos.

De manera general, a partir del día 15 se observó un incremento en las intensidades de las enzimas digestivas determinadas en el presente estudio, excepto por la esterasa no específica. Segner *et al.* (1989) describieron un patrón similar a partir del día 13, en larvas de *Coregonus lavaretus*. El aumento de la actividad enzimática durante el desarrollo de las larvas de peces ha sido registrado en numerosas larvas de peces, incluyendo la cabrilla arenera (Álvarez-González, 2003), lo cual incrementa la capacidad digestiva de las mismas (Segner, 1996). Varios autores han señalado que este incremento en la capacidad digestiva obedece a una mayor cantidad de alimento ingerido y a las propiedades nutricionales del mismo (Kawai e Ikeda, 1972; Lauff y Hofer, 1984; Govoni *et al.*, 1986; Cousin *et al.*, 1987; Pedersen *et al.*, 1987). No obstante, no se descarta la posibilidad de que este incremento en la actividad de las enzimas digestivas responda a

una programación genética como parte de un proceso natural de maduración (Segner *et al.*, 1989; Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

Durante la presente tesis, el uso de la enzimohistoquímica permitió detectar los sitios de actividad enzimática. Sin embargo, es particularmente complicado describir algún incremento cuantitativo de la actividad, lo cual es posible utilizando las técnicas bioquímicas. El uso de una clasificación semicuantitativa plantea un problema de interpretación, impidiendo alguna comparación práctica en cuanto a las causas de los cambios en la actividad enzimática observada. Por ejemplo, Tegjaroenkul *et al.* (2002) no observaron efectos en la actividad enzimática digestiva de larvas de *Oreochromis niloticus* alimentadas con una dieta artificial desde la primer alimentación utilizando enzimohistoquímica, mientras que con estudios bioquímicos ha sido posible detectar el efecto del tipo de alimento en la actividad enzimática en larvas de *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante y Cahu, 1994). En el mismo sentido, en el caso de la esterasa no específica detectada por enzimohistoquímica en el presente estudio, no fue posible observar variaciones durante el desarrollo de las larvas de la cabrilla arenosa. Contrariamente, Álvarez-González (2003), utilizando técnicas bioquímicas, demostró el efecto de diferentes sustratos y del tipo de alimento vivo en la actividad de la esterasa no específica de las larvas.

De lo anterior resalta que ambas técnicas son útiles en cuanto a la determinación de la actividad enzimática digestiva de las larvas de peces. Por supuesto, ambas tienen pros y contras inherentes a cada técnica. Por lo que la elección del tipo de técnica debe estar basada en una evaluación de los objetivos e hipótesis que se pretenden comprobar. Si la intención es detectar la presencia y/o corroborar los sitios de actividad de una enzima específica, la enzimohistoquímica es la mejor opción. Si por el contrario, se desea comprender la evolución de la actividad enzimática durante el desarrollo larval, así como los efectos de diferentes factores como el tipo de alimento, entonces las técnicas bioquímicas son recomendables.

La presencia de las enzimas intestinales, como fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, aminopeptidasa, dipeptidil aminopeptidasa IV y esterasa no específica, ha sido aceptada como un indicador de la funcionalidad intestinal en las larvas de peces (Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Baglolle *et al.*, 1998). La presencia de estas enzimas en las larvas de la cabrilla arenera desde el inicio de la alimentación exógena permite afirmar que la función intestinal (digestión y absorción) está desarrollada a partir de que se agotan las reservas vitelinas, permitiendo que las larvas puedan digerir y absorber el alimento suministrado.

VIII.3.2. Efecto del destete en el desarrollo y condición nutricional.

Uno de los principales retos al realizar la sustitución del alimento vivo por una dieta artificial, es establecer el momento adecuado para iniciar el destete. Varias características han sido consideradas como indicadoras de este momento. Por un lado, el grado de desarrollo morfológico del tubo digestivo, específicamente a partir de cuando aparecen las glándulas gástricas (Segner *et al.*, 1993; Bisbal y Bengtson, 1995). Por otro lado, el momento en que ocurre la madurez de la capacidad digestiva (Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Kolkovski, 2001).

En el caso de la cabrilla arenera, ambos aspectos han sido descritos. Peña *et al.* (2003) describieron el desarrollo ontogenético del tubo digestivo y reportaron la presencia de las glándulas gástricas a partir del día 16, cuando las larvas presentan una longitud total promedio de 7,2 mm. Por su parte, ha sido reportada la presencia de pepsina a partir de los 12 días (Álvarez-González, 2003), que coincide con la madurez intestinal (i.e. incremento de la acción de las fosfatasas y disminución en la actividad de las exoproteasas). Con esto en mente, en el presente estudio se realizó una estrategia de destete temprano a partir del día 17.

Las larvas de la cabrilla arenera aceptaron la dieta artificial desde el inicio del período de coalimentación, lo cual fue confirmado por observación directa del tubo digestivo. Esto permite afirmar que la dieta elaborada a base de quistes desencapsulados de *Artemia* utilizada en el presente estudio contenía los componentes químicos necesarios que funcionan como atraxtantes y que promueven la ingestión de la dieta artificial (Dempsey, 1978; Kolkovski *et al.*, 1997b; Hidaka *et al.*, 2000; Papatryphon y Soares; 2000; Liang *et al.*, 2001).

Al igual a lo observado en otras especies de peces (Ehrlich *et al.*, 1989; Baskerville-Bridges y Kling, 2000; Guthrie *et al.*, 2000; Koven *et al.*, 2001), a pesar de la aceptación de la dieta artificial por parte de las larvas de la cabrilla arenera, al final del bioensayo éstas presentaron una longitud menor que las larvas alimentadas exclusivamente con el alimento vivo.

Los resultados obtenidos en esta tesis con respecto al crecimiento de las larvas alimentadas con la dieta artificial son similares a los reportados por Álvarez-González (2003). En dicho estudio se comparó el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de la cabrilla alimentadas con tres dietas artificiales, cuya diferencia fue la fuente de proteína utilizada (hidrolizado de proteína de pescado, harina de calamar y harina de sangre de res, a un nivel de inclusión de 15 % base húmeda, como sustitutos de harina de sardina) y el día de inicio del destete (días 17 y 22). En las larvas destetadas a partir del día 17, el mejor crecimiento se observó en las larvas alimentadas con el hidrolizado de pescado, que a los 30 días presentaron una LT de $9,6 \pm 1,1$ mm longitud notocordal. Dichos resultados son superiores a los obtenidos en el presente estudio ($9,36 \pm 1,1$ mm longitud notocordal a los 33 días). Al respecto, las diferencias pueden atribuirse a la presencia del hidrolizado de proteína, el cual incorpora en la dieta péptidos pequeños y aminoácidos libres que facilitan su digestión y absorción en el tubo digestivo de las larvas, así como inducir una maduración temprana de la función digestiva de las larvas (Zambonino-Infante *et al.*, 1997; Kolkovski, 2001). No obstante, los quistes desencapsulados de *Artemia*

que se utilizaron como principal fuente de proteína en la dieta artificial utilizada en el presente estudio contienen proteínas cuyo peso molecular fluctúa entre los 7,4 y 49,2 kDa (García-Ortega, 2000), lo cual la presenta como una atractiva fuente de proteínas que puede ser digerida y asimilada por las larvas de la cabrilla arenosa. Además, los perfiles de aminoácidos y ácidos grasos no difieren a los de nauplios de *Artemia* (García-Ortega *et al.*, 1998). En este sentido, Kolkovski *et al.* (1997b) demostraron que la adición de extractos de *Artemia* en dietas artificiales ofrecidas a larvas de *Sparus aurata* incrementaban la ingesta de dichas dietas.

Con respecto a la formulación de las dietas artificiales, recientemente, Koven *et al.* (2001) y Kolkovski (2001) propusieron que las diferencias observadas en el crecimiento de larvas alimentadas con una dieta microparticulada y alimento vivo pueden deberse a que las dietas artificiales carecen de factores nutricionales que no promueven una óptima respuesta digestiva por parte de las larvas, facilitando la digestión y asimilación de la dieta. Así mismo, demostraron que para que una dieta microparticulada sea considerada como adecuada para mantener las tasas de crecimiento y sobrevivencia aceptables, su formulación no debe basarse simplemente en "imitar" la composición bioquímica del alimento vivo, sino que deben incorporarse factores nutritivos como neuropéptidos que regulan el control hormonal de la alimentación y secreción endócrina, como bombesina, la cual estimula la actividad enzimática y la peristalsis.

Un aspecto que debe tomarse en cuenta durante la planeación de una estrategia de destete es la duración del período de coalimentación, el cual es considerado un paso importante en el proceso de destete (Rosenlund *et al.*, 1997; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Lazo, 2000; Lazo *et al.*, 2000a). De hecho, mientras mayor sea este período de transición, mejores resultados se observan en cuanto al crecimiento de las larvas (Hart y Purser, 1995). Durante el presente estudio, posterior al período de coalimentación se observó una elevada tasa de mortalidad en las larvas, lo cual sugiere que una coalimentación de 4 días no fue suficiente para que las larvas se adaptaran a un nuevo

alimento. No obstante, este aspecto requiere de más estudios que permitan establecer la duración óptima del período de coalimentación.

Muchos de los bioensayos en los que se emplea una dieta artificial, evalúan los efectos de estas dietas sobre las larvas en términos de sobrevivencia y crecimiento. Sin embargo, no puede pasarse por alto el hecho de que una dieta artificial produce efectos morfofisiológicos en las larvas de peces. La descripción de estos efectos puede ser una herramienta valiosa para evaluar la calidad y adecuación de las dietas artificiales (Bengtson, 1993). De esta manera, varios autores han reportado el uso de caracteres histológicos a nivel hepático e intestinal (Segner *et al.*, 1987; 1988; 1993; Segner y Witt, 1990; Segner y Rosch, 1990; Baskerville-Bridges *et al.*, 2000 Caballero *et al.*, 2003), fisiológicos como la tasa RNA/DNA, actividad enzimática, eficiencia de la asimilación (Shimeno *et al.*, 1981a, 1981b; Holt, 1993; Nolting *et al.*, 1999; Khemis *et al.*, 2000) e incluso conductuales (Stradmeyer, 1989). Con esto en mente, se describió el efecto de la dieta microparticulada en el desarrollo de las larvas utilizando criterios morfométricos e histológicos.

El uso de la dieta artificial produjo efectos a nivel histológico y morfométrico en las larvas de la cabrilla arenosa. Histológicamente, los valores del área del núcleo de los hepatocitos y la altura de los enterocitos fueron significativamente más pequeños que los valores registrados en las larvas alimentadas con el alimento vivo a partir del día 21 (al final del período de coalimentación). Estos resultados son comparables a los observados por Segner y Rösch (1990) en larvas de *Coregonus lavaretus*, quienes evaluaron el efecto de cuatro dietas artificiales y alimento vivo (zooplancton) en la estructura histológica del hígado. Ellos reportaron que en las larvas alimentadas con alimento vivo (zooplancton) el núcleo de los hepatocitos era más grande y sugirieron que esta característica era indicativa de un elevado metabolismo hepático. Anteriormente, Segner *et al.* (1988) demostraron que el tamaño del núcleo de los hepatocitos es un indicador de la condición nutricional de los peces, lo cual fue corroborado posteriormente por Strüssman y

Takashima (1990) y Segner *et al.* (1993). Al igual que en el hígado, la diferencia en la altura de los enterocitos puede considerarse como un reflejo de la condición nutricional de las larvas debido a una baja absorción de la dieta artificial. Segner *et al.* (1993) reportaron un efecto similar en la altura de los enterocitos en larvas de *Clarias gariepinus* y *Coregonus lavaretus* alimentadas con dietas artificiales, comparadas con larvas alimentadas con alimento vivo (nauplios de *Artemia*). Cahu y Zambonino-Infante (1994, 2001) reportaron que el destete temprano retrasa el desarrollo y particularmente pueden afectar la capacidad de absorción y digestión intracelular de las larvas, ya que pueden dañar la estructura de los enterocitos, así como las funciones secretoras del páncreas. Esto sugiere que las larvas de la cabrilla arenera alimentadas con una dieta artificial a partir del día 17, presentan signos de malnutrición ya que tanto el núcleo de los hepatocitos (sitio de transcripción de la síntesis de proteínas) como los enterocitos (sitio de absorción y transporte de los nutrientes) reflejan la actividad metabólica celular, la cual puede variar en función al estado nutricional (Theilacker y Watanabe, 1989; Strüsmann y Takachima, 1990; Segner *et al.*, 1993).

Por otro lado, morfológicamente las larvas de la cabrilla arenera alimentadas con la dieta artificial también presentaron valores morfométricos significativamente inferiores que las larvas alimentadas con alimento vivo. Fuera de la longitud total ó el peso, no se encontraron reportes sobre los efectos morfométricos de una dieta artificial sobre el crecimiento de las larvas de peces. Es interesante notar el hecho de que los efectos a un nivel morfométrico sólo se detectaron al día 27 en la AM. Esta diferencia en el tiempo en que se detectaron los efectos histológicos y morfológicos, sugiere que los efectos morfológicos son un reflejo de la respuesta fisiológica de las larvas, la cual, a su vez, es influenciada por la presencia de la dieta artificial.

Durante el presente estudio se observó la presencia de vacuolas pinocitóticas en la región supranuclear de los enterocitos del intestino posterior, en las larvas de la cabrilla arenera alimentadas ya sea con alimento vivo o con la dieta artificial. Ha sido

demostrado que la presencia de estas vacuolas en la superficie apical de los enterocitos del intestino posterior es debido a la absorción de proteínas ó polipéptidos por pinocitosis en larvas y juveniles de peces (Watanabe, 1981). En un estudio previo, Peña *et al.* (2003) reportaron la aparición de éstas vacuolas en el intestino posterior en larvas de la cabrilla arenera a partir del día 6. En ese mismo estudio, para el día 16 el número y tamaño de dichas vacuolas disminuye, coincidiendo con la aparición de las glándulas gástricas y finalmente desaparecen alrededor del día 24. El calendario de alimentación empleado en ese estudio fue: rotíferos del día 2-13, nauplios de *Artemia* enriquecidos durante los días 13-17; *Artemia* de 12 días de edad durante los días 14 a 26 y una dieta artificial semiseca del día 20-30. Estos resultados contrastan con lo encontrado en el presente estudio donde se observaron vacuolas pinocitóticas aún después de la aparición de un estómago funcional. Varios factores deben considerarse al respecto. Por un lado, el calendario de alimentación fue diferente, en el presente trabajo no se administraron adultos de *Artemia* y los nauplios de *Artemia* se dieron hasta el día 20. A pesar de esto, la diferencia principal puede ser atribuída a la naturaleza de la dieta artificial utilizada. Desafortunadamente, no se tienen más datos acerca de la composición proximal de la dieta artificial utilizada por Peña *et al.* (2003), lo cual podría brindar más elementos para explicar esta discrepancia en los resultados. Sin embargo, la presencia de vacuolas pinocitóticas ha sido reportadas en juveniles de otras especies (Watanabe, 1982a). Watanabe (1984) señala que en los juveniles de peces, aún cuando existe un estómago funcional (que implica la hidrólisis ácida por parte de la pepsina), el tiempo requerido para llevar a cabo la digestión intracelular es mucho mayor que en las larvas, lo cual es apoyado por el hecho de que el nivel de actividad de las enzimas citosólicas disminuye con el inicio de la funcionalidad ácida, como parte del proceso de maduración de tubo digestivo (Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

A pesar de la presencia de vacuolas pinocitóticas en el intestino de las larvas de la cabrilla arenera bajo diferentes regimenes alimenticios, se observaron diferencias

significativas en cuanto al diámetro de las vacuolas. Las vacuolas presentes en las larvas alimentadas con alimento vivo son más grandes y numerosas que las observadas en las larvas alimentadas con la dieta artificial. Esta diferencia da un indicio de la capacidad de absorción y transporte de los enterocitos, que puede estar relacionado con las características nutricionales de los alimentos, así lo sugirieron Baskerville-Brigdes y Kling (2000) quienes reportaron la presencia de vacuolas pinocitóticas más grandes en larvas de *Gadus morhua* alimentadas con alimento vivo que las alimentadas con dietas microparticuladas.

Considerando los resultados del presente estudio, se puede afirmar que los caracteres histológicos y morfométricos representan una herramienta útil en la evaluación de la calidad de las dietas artificiales empleadas en el cultivo de la cabrilla arenera. Siendo más recomendables los histológicos ya que permiten identificar los efectos producidos por la dieta artificial antes que a nivel morfométrico. Esto representa cierta ventaja durante el cultivo de larvas, ya que permitiría tomar decisiones acerca de la dieta suministrada antes de que los efectos producidos por la misma sean irreversibles y se ponga en riesgo la calidad de la semilla producida.

Por otro lado, si bien las mediciones histológicas de la absorción de proteínas no permitieron una firme estimación cuantitativa de la tasa de absorción proteica y digestión intracelular, sí permiten tener una idea general acerca de la funcionalidad de los enterocitos. De esta forma, el hecho de observar vacuolas más grandes y numerosas en las larvas alimentadas con alimento vivo sugiere que las proteínas presentes en el alimento vivo se absorben y acumulan más rápidamente que las presentes en la dieta microparticulada.

IX. CONCLUSIONES

IX.1. Sistema visual y eficiencia alimentica.

- El desarrollo del sistema visual de las larvas de la cabrilla arenera sigue un patrón general descrito en larvas de peces, el cual consiste en la aparición de conos y la posterior aparición de los bastones.
- La presencia de pigmento visual en la retina a partir del día 2 en larvas de la cabrilla arenera es un indicador de la funcionalidad del ojo, ya que permite la captación de fotones.
- Dos periodos de diferenciación son evidentes durante el desarrollo del sistema visual de las larvas de la cabrilla arenera. Uno durante el periodo de alimentación endógena (desde la eclosión hasta el día 2) como preparación al inicio de la alimentación exógena y otro, como una adaptación hacia un cambio de vida bentónico al momento de la transformación a juvenil (días 14 al 22).
- La intensidad alimenticia (número de presas ingeridas) de las larvas de la cabrilla arenera se incrementa significativamente durante el período de torsión del tubo digestivo que ocurre durante los días 6 - 9 a 25° C.

IX.2. Primera alimentación y eficiencia alimenticia

- Las larvas de la cabrilla arenera son depredadores visuales que a una intensidad de luz de 700 lux incrementan significativamente la incidencia alimenticia (porcentaje de larvas con alimento). Sin embargo, la intensidad luminosa no presenta ningún efecto significativo sobre el número de presas ingeridas por larva.
- Durante la primera alimentación, las larvas de la cabrilla arenera alimentadas con mayores densidades de presas presentan una mayor eficiencia alimenticia. Por su parte, el color del tanque de cultivo no afecta de manera significativa la

incidencia alimenticia, presumiblemente por el grado de desarrollo de la retina al momento de la primera alimentación.

- Las larvas de la cabrilla arenera tienen una amplia capacidad de recuperación a un período de inanición inicial, no superior a 3 días, posteriormente, el punto de no retorno ocurre entre los 4 y 5 días después de la eclosión.
- Los criterios histológicos (altura de los enterocitos y diámetro de los hepatocitos) y morfométricos (ACP, DO, AH, ATD, AM y AC) representan un buen indicador del grado de inanición de las larvas de la cabrilla arenera durante los primeros 5 días de desarrollo.
- Los criterios morfométricos (AM y LT) son un buen indicador del grado de inanición a partir de las dos semanas de desarrollo en larvas que han sido sometidas a un retraso de un día en la primera alimentación, mientras que el DO, la AC, la AM, la ACP y la AH permiten distinguir a las larvas que han sufrido un retraso de dos días en la primera alimentación.

IX.3. Fisiología digestiva y alimentación de larvas.

- Al igual que en larvas de otras especies, la actividad enzimática digestiva en las larvas de la cabrilla arenera es evidente desde el inicio de la alimentación exógena (día 2).
- Los enterocitos son los principales sitios de actividad de las fosfatasa ácida y alcalina, aminopeptidasa M, dipeptidil aminopeptidasa IV y esterasa no específica, esto corrobora el papel que presentan en la digestión y absorción de nutrientes.
- Existe un incremento en la actividad enzimática digestiva alrededor del día 15, señalando el inicio de la madurez digestiva de las larvas de la cabrilla arenera.

- El uso de una dieta artificial produjo efectos a nivel histológico que se evidencian a partir del día 21 y que posteriormente se reflejan a nivel morfométrico a partir del día 27, sugiriendo cierto grado de malnutrición en las larvas de la cabrilla arenosa.
- La detección de los daños a nivel histológico es una herramienta útil en las estrategias de evaluación de una dieta artificial durante el cultivo de las larvas de la cabrilla arenosa.

X. RECOMENDACIONES

Con base a los resultados expuestos en la presente tesis, se recomienda seguir un esquema de cultivo con las condiciones necesarias que favorezcan un incremento en la eficiencia alimenticia de las larvas de la cabrilla arenera. La tabla XIV (pág. 122) resume las condiciones de cultivo recomendadas.

Igual de importante resulta establecer un calendario de alimentación basado en el grado de desarrollo de las larvas que permita optimizar el crecimiento y supervivencia de las mismas. La figura 40 (pág. 122) muestra un calendario de alimentación de acuerdo a factores como el tamaño de la boca y la talla total de las larvas de la cabrilla arenera. Así, se recomienda iniciar el destete a partir de los días 17 ó 18, realizando la transición de nauplios de *Artemia* a la dieta artificial, eliminando el suministro de juveniles y adultos de *Artemia*. Es importante establecer un período de co-alimentación no menor a 7 días, de tal forma que se de el tiempo adecuado a las larvas de adaptarse al nuevo alimento. Es recomendable que a partir del inicio del período de coalimentación se incremente la frecuencia alimenticia a 3 ó 4 veces al día. El tamaño inicial de partícula del alimento artificial ha de ser similar al tamaño de los nauplios de artemia (300-500 μm).

Por otro lado, durante la presente tesis se establecieron caracteres histológicos y morfométricos que permiten evaluar el grado de inanición de las larvas de la cabrilla arenera. Dichos análisis representan una herramienta importante dentro de los esquemas de evaluación de las condiciones de cultivo y del tipo de alimento suministrado. Es por ello que se recomienda realizar un monitoreo de las larvas en cultivo, principalmente antes, durante y después de los dos períodos críticos relacionados con la alimentación, i.e. primera alimentación y destete.

Tabla XIV. Condiciones recomendadas durante el cultivo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*).

Condiciones	Valores
Temperatura	24 – 25° C
Salinidad	34 - 35 ups
Intensidad de luz	700 lux, mínimo
Densidad de presas	10 rotíferos/ml 5 nauplios/ml
Color de tanque	Negro con fondo blanco
Fotoperíodo	10:14

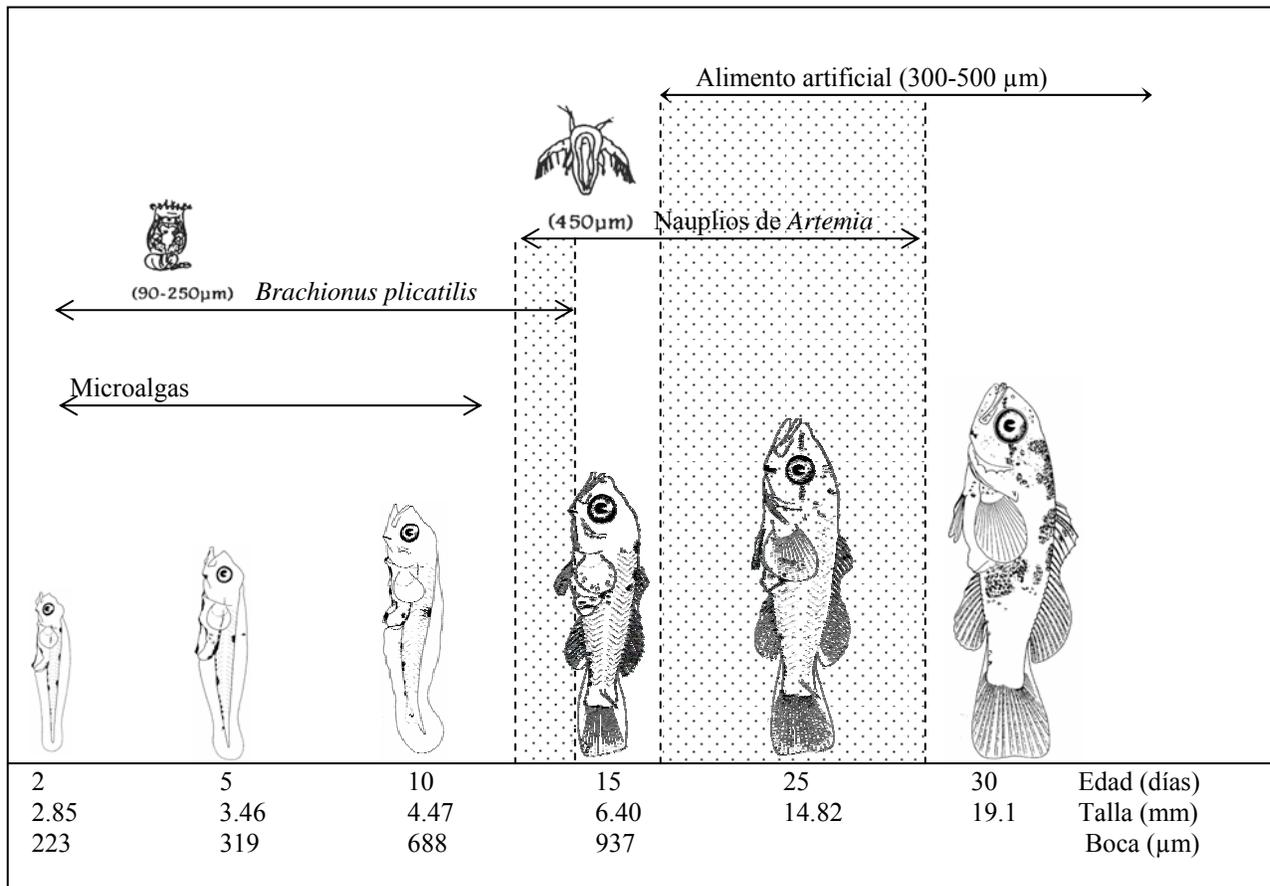


Figura 40. Esquema de alimentación recomendado durante el cultivo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*).

XI. PERSPECTIVAS

A pesar del avance logrado durante los últimos años en el cultivo de larvas de la cabrilla arenera, aún existen aspectos relacionados con la alimentación y nutrición que deben estudiarse de tal forma que pueda tenerse una visión integral sobre la fisiología digestiva de las larvas de la cabrilla arenera.

Así, la descripción del comportamiento alimenticio de las larvas de la cabrilla arenera, aportará elementos valiosos con respecto al proceso alimenticio que puedan considerarse durante el inicio de la alimentación exógena y durante la transición de un alimento vivo a un alimento inerte.

Igual de relevante es elaborar estudios que permitan esclarecer el grado de participación de otras vías sensoriales como la química y mecánica en el proceso alimenticio de las larvas de la cabrilla arenera.

La evaluación de diferentes dietas artificiales permitirá lograr avances en la determinación de los requerimientos nutricionales de las larvas de la cabrilla arenera; y en conjunto con la implementación de un esquema de evaluación del desempeño de la dieta sobre la condición nutricional de las larvas, será posible proponer estrategias de cultivo integrales que permitan incrementar la supervivencia de las larvas.

XII. REFERENCIAS

- Ali, M. A. 1975. Retinomotor responses. 313-355 pp. In: *Vision in Fishes. New Approaches in Research*. A.M. Ali (ed.). Plenum Press, New York.
- Alliot, E., Pastoureaud, A. Trelu, J. Nedelec. 1977. Evolution des activites enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvare du bar (*Dicentrarchus labrax*) variations des proteinogrammes et des zymogrammes. *3rd meeting of ICES. Actes de Colloques du C.N.E.X.O.* 85-91.
- Álvarez-González, C.A. 1999. Optimización del proceso de producción de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 108 pp.
- Álvarez-González, C.A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei:Serranidae). Tesis doctoral. CICIMAR-IPN. 164 pp.
- Álvarez-González C. A., Ortíz-Galindo J. L., Dumas S., Martínez-Díaz S., Hernández-Ceballos D. E., Grayeb-Del Alamo T., Moreno-Legorreta M., Peña M. R., Civera-Cerecedo R. 2001a. Effect of stocking density on the growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *J. World Aquacult. Soc.* **32**, 130-137.
- Álvarez-González, C.A., Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Moreno-Legorreta, M., Grayeb-Del Alamo, T. 2001b. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus* fed practical diets. *Aquaculture* **194**, 151-159.
- Anguas-Vélez B.H., Civera-Cerecedo R., Contreras-Holguín M., Rueda-Jasso R.A., Guillaume, J. 2000a. Preliminary study on the timing of weaning of spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, larvae with a prepared diet: effects on growth and survival. *J. Applied Aquacult.* **10**, 1-15.
- Anguas-Vélez, B.H., Civera-Cerecedo, R., Cadena-Roa, M., Guillaume, J., Martínez-Díaz, S. 2000b. Studies on the nutrition of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*: effect of the dietary protein level on growth and protein utilization in juveniles fed semipurified diets. *J. World Aquacult. Soc.* **31**, 580-591.
- Ashton N., Rust M.B. 2003. Effect of light intensity on feeding incidence and survival of preflexion larval black rockfish (*Sebastes melanops*). 27th Larval fish conference. August 20-23, Santa Cruz, California. Book of Abstracts.
- Avilés-Quevedo A., McGregor-Pardo U., Rodríguez-Ramos R., Morales-Castro O, Huerta-Bello M. A., Iizawa M. 1995. *Biología y cultivo de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Steindachner, 1868)*. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras, La Paz. Secretaría de Pesca. México. 35 pp.
- Baglolle, C. J., Goff, G.P., Wright, G.M. 1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *J. Fish Bio.* **53**, 767-784.
- Balon, E. K. 1981. Saltatory processes and altricial to precocial forms in the ontogeny of fishes. *Amer. Zool.* **21**, 573-596.
- Balon, E.K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* **113**, 178-185.
- Balon, E. K. 1985. The theory of saltatory ontogeny and life history models revisited. *Early life hist. fish.* 13-28.
- Balon, E. K. 1986. Types of feeding in the ontogeny of fishes and the life-history model. 11-24 pp. In: *Contemporary studies on fish feeding: the proceedings of GUTSHOP'84. papers from workshop on fish food habits held at the Asilomar Conference Center. Simenstad, Cailliet (eds.)*. Pacific Grove, California, U.S.A. December 2-6.

- Baragi, V., Lovell, R.T. 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **115**, 478-484.
- Barnabé, G., Guissi, A. 1994. Adaptations of the feeding behaviour of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternanting live-food/compound-food feeding regime. *Aquacult. Fish. Man.* **25**, 537-546.
- Baskerville-Bridges, B., Kling, L.J. 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquacult. Nut.* **6**, 171-182.
- Batty, R. S., Blaxter, J. H. S., Libby, D. A. 1986. Herring (*Clupea harengus*) filter-feeding in the dark. *Mar. Biol.* **91**, 371-375.
- Bengtson, D. A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. *J. World Aquacult. Soc.* **24**, 285-293.
- Bisbal, G.A., Bengtson, D.A. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish Biol.* **47**, 277-291.
- Blaxter J.H.S. 1965. The feeding of herring larvae and their ecology in relation to feeding. *CalCOFI Report* **10**, 79-88.
- Blaxter J. H. S. 1975. The eye of larval fish. 427-443 pp. *In: Vision in Fishes. New Approaches in Research.* M.A. Ali (ed.). Plenum Press. New York.
- Blaxter J. H. S. 1986. Development of sense organs and behaviour of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **115**, 98-114.
- Blaxter, J.H.S., Hempel, G. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). *J. Cons. Int. Explor. Mer.* **28**, 211-240.
- Blaxter J. H. S., Jones M. P. 1967. The development of the retina and retinomotor responses in the herring. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **47**, 677-697.
- Blaxter J. H. S., Staines M. 1970. Pure-cone retinae and retinomotor responses in larval teleosts. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **50**, 449-460.
- Boulhic, M., Gabaudan, J. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **102**, 373-396.
- Bromley, P. J. 1977. Methods of weaning juvenile hatchedry reared sole (*Solea solea* L.) from live food to prepared diets. *Aquaculture* **12**, 337-347.
- Buckley, L. J. 1979. Relationships between RNA-DNA ratio, prey density, and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *J. Fish. Res. Board Can.* **36**, 1497-1502.
- Buckley, L., Caldarone, E., Ong, T.L. 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid-base indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia* **401**, 265-277.
- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjorsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A.J., Rosenlund, G. 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* **225**, 325-340.
- Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J.L. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* **109A**, 213-222.
- Cahu C. L., Zambonino-Infante J. L. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquacult. Inter.* **5**, 151-160.
- Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* **200**, 161-180.
- Cahu, C. L., J.L. Zambonino-Infante, A. Péres, P. Quazuguel, M.M. Le Gall. 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. *Aquaculture* **161**, 479-489.

- Cahu, C. L., Zambonino, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* **171**, 109-119.
- Calzada, B.A., A. Medina y M.L. González de Canales. 1998. Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *J. Fish Biol.* **53**, 340-365.
- Cañavate, P. J., Fernández-Díaz, C. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* **174**, 255-263.
- Carrasco-Chávez, V. 2004. Variación de ácidos grasos durante la ontogenia inicial y requerimientos lipídicos de juveniles en cautiverio de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. 76 pp.
- Carvalho, P.S.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E. 2004. Biochemical, histological and behavioural aspects of visual function during early development of rainbow trout. *J. Fish Biol.* **64**, 833-850.
- Chatain, B. 1989. Problems related to the lack of functional swimbladder in intensive rearing of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Adv. Trop. Aquacult.* 699-709.
- Chatain, B., Ounais-Guschemann, N. 1991. The relationship between light and larvae of *sparus aurata*. In: Larvi '91-Fish and Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers, F. Olliver (eds.). European Aquaculture Society, Special Publication No. 15. Ghent, Belgium.
- Chu, F. L. E., Ozkizilcik, S. 1999. Acceptability of complex microencapsulated diets by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **237**, 1-9.
- Civera R., Ortiz J.L., Dumas S., Nolasco H., Alvarez A., Anguas B., Peña R., Rosales M., Carrasco V., García R., Goytortúa E. 2002. *Avances en la nutrición de la cabrilla arenera*. 352-406 pp. In: *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés, N. Simoes (eds.). Universidad Autónoma de Nuevo León. Mexico.
- Clemmesen, C. 1996. Importance and limits of RNA/DNA ratios as a measure of nutritional condition in fish larvae. *Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources*, 67-82.
- Cobcroft J.M., Pankhurst P.M., Hart P.R., Battaglione S.C. 2001. The effects of light intensity and algae-induced turbidity on feeding behaviour of larval striped trumpeter. *J. Fish Biol.* **59**, 1181-1197.
- Collins, A.L., Anderson, T.A. 1995. The regulation of endogenous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *J. Fish Biol.* **47**, 1004-1015.
- Corazza, L., Nickum, J.G. 1981. Positive phototaxis during initial feeding stages of walleye larvae. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Int. Explor. Mer* **178**, 492-494.
- Cousin, J. C. B., Baudin-Laurencin, F., Gabaudan, J. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* **30**, 15-33.
- Cuenca, E.M., García-Gallego, M. 1987. Ingesta y conducta alimentaria. 1-47 pp. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta, (eds.). *Nutrición en Acuicultura I. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura*. Madrid.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Dévelop.* **24**, 807-833.
- Dabrowski, K., Bardega, R. 1984. Mouth size and predicted food size preferences of larvae of three cyprinid fish species. *Aquaculture* **40**, 41-46.
- Davenport, H. A. 1960. *Histological and histochemical techniques*. W. B. Saunders Company. Philadelphia, 401pp.
- Dempsey, C.H. 1978. Chemical stimuli as a factor of feeding and intraspecific behaviour of herring larvae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **58**, 739-747.

- Deplano, M., Connes, R., Diaz, J.P., Barnabé, G. 1991. Variation in the absorption of macromolecular proteins in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Mar. Biol.* **32**, 29-36.
- Díaz, J. P., Guyot, E., Vigier, S., Connes, R. 1997. First events in lipid absorption during post-embryonic development of the anterior intestine in gilt-head sea bream. *J. Fish Biol.* **51**, 180-192.
- Downing G., Litvak M.K. 1999a. The effect of photoperiod, tank color and light intensity on growth of larval haddock. *Aquacult. Inter.* **7**, 369-382.
- Downing G. y Litvak M.K. 1999b. The influence of light intensity on growth of larval haddock. *North American Journal of Aquaculture* **61**, 135-140.
- Downing G., Litvak M.K. 2001. The effect of light intensity and spectrum on the incidence of first feeding by larval haddock. *J. Fish Biol.* **59**, 1566-1578.
- Duray, M.N., Estudillo, C.B., Alpasan, L.G. 1996. The effect of background color and rotifer density on rotifer intake, growth and survival of the grouper (*Epinephelus suillus*) larvae. *Aquaculture* **146**, 217-224.
- Ehrlich, K.F., Blaxter, J.H.S.; Pemberton, R., 1976: Morphological and histological changes during the growth and starvation of herring and plaice larvae. *Mar. Biol.* **34**, 105-118.
- Ehrlich, K. F., Cantin, M.C., Rust, M.B., Grant, B. 1989. Growth and survival of larval and postlarval smallmouth bass fed a commercially prepared dry feed and/or *Artemia* nauplii. *J. World Aquacult. Soc.* **20**, 1-6.
- Evans B.I., Browman H. 2004. Variation in the development of fish retina. 145-166 pp. In: *The development of form and function in fishes and the question of larval adaptation*. Govoni, J.J. (ed.) American Fisheries Society, Symposium 40, Bethesda, Maryland.
- Fernández-Díaz, C., Pascual, E., Yúfera, M. 1994. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.* **118**, 323-328.
- Ferraris, R.P., Tan, J.D., de la Cruz, M.C. 1987. Development of the digestive tract of the milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): histology and histochemistry. *Aquaculture* **61**, 241-257.
- Fontagné, S., Robin, J., Corraze, G., Bergot, P. 2000. Growth and survival of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed from first feeding on compound diets containing medium-chain triacylglycerols. *Aquaculture* **190**, 261-271.
- Fraser, A. J., Sargent, J. R., Gamble, J. C., Maclachlan, P. 1987. Lipid class and fatty acid composition as indicators of the nutritional condition of larval Atlantic herring. *Amer. Fish. Soc. Symp.* **2**, 129-143.
- Fukuhara, O. 1986. Morphological and functional development of japanese flounder in early life stage. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **52**, 81-91.
- Furuita, H., Konishi, K., Takeuchi, T. 1999. Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in *Artemia* nauplii on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olicaveus*. *Aquaculture* **170**, 59-69.
- García-Gómez, R. E. 2003. Efectos en el crecimiento y supervivencia de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en dos tipos de destete con dietas microparticuladas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 57 pp.
- García-Ortega, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. 287-298 pp. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, E., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerveredo, R. (eds.) Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre 2000, Mérida Yucatán. México.
- García-Ortega, A., Verte J.A.J., Segner, H., Coutteau P., Huisman, E.A., Zorruelos, P. 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of

- the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* **161**, 501-514.
- García-Ortega, A., Koussoulaki, A., Boer, H., Verreth, J. 2000a. In vitro protein digestibility of *Artemia* decapsulated cysts and nauplii, and of microbound diets for larval fish. *Aquacult. Res.* **31**, 475-477.
- García-Ortega, A., J. Verreth, A. van Hoornyck, H. Segner. 2000b. Heat treatment affects protein quality and protease activity in decapsulated cysts of *Artemia* when used as starter food for larvae of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquacult. Nut.* **6**, 25-31.
- García-Ortega, A., Huisman, E.A., Sorgeloos, P., Verreth, J. 2001. Evaluation of protein quality in microbound starter diets made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal for fish larvae. *J. World Aquacult. Soc.* **32**, 317-329.
- García-Ortega, A., Abdo, I., Hernández, C. 2003. Weaning of bullseye buffer (*Sphoeroides annulatus*) from live food to microparticulate diets made with decapsulated cysts of *Artemia* and Fishmeal. *Aquacult. Int.* **11**, 183-194.
- Gatesoupe, F. J. 1983. Weaning of sole, *Solea solea*, before metamorphosis, achieved with high growth and survival rates. *Aquaculture* **32**, 401-404.
- Gatesoupe, F. J., Robin, J.H. 1982. The dietary value for sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed with or without a laboratory cultured alga. *Aquaculture* **27**, 121-127.
- Gawlicka, A., Teh, S.J., Hung, S.S.O., Hinton, D.E., de la Noüe, J. 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of the white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiol. Biochem.* **14**, 357-371.
- Goel, K. A., Sastry, K. V. 1973. Distribution of alkaline phosphatase in the digestive system of a few teleost fishes. *Acta Histochem. Bd.* **47**, 8-14.
- Govoni J. J., Boehlert G. W., Watanabe Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Env. Biol. Fishes* **16**, 59-77.
- Gulbrandsen J. 1991. Functional response of Atlantic halibut larvae related to prey density and distribution. *Aquaculture* **94**, 89-98.
- Gulbrandsen J. 1993. Prey consumption of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: selectivity or availability? *Aquaculture* **116**, 159-170.
- Guthrie, K.M., Rust, M.B., Langdon, C.J., Barrows, F.T. 2000. Acceptability of various microparticulate diets to first-feeding walleye *Stizostedion vitreum* larvae. *Aquacult. Nut.* **6**, 153-158.
- Guyot, E., Diaz, J.P., Connes, R. 1995. Organogenesis of the liver in sea bream. *J. Fish Biol.* **47**, 427-437.
- Hairston N. G., Li K. T. Easter S. S. 1982. Fish vision and the detection of planktonic prey. *Science* **218**, 1240-1242.
- Hall, K.C., Bellwood, D.R. 1995. Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of *Pomacentrus coelestis*, a marine aquarium fish species. *J. Fish Biol.* **47**, 438-454.
- Hart P.J.B. 1997. Foraging Tactics. 104-133 pp. In: *Behavioural Ecology of Teleost Fishes*. Godin, J.G.J. (ed.). Oxford University Press. Great Britain.
- Hart, P.R., Purser, G.J. 1995. Weaning of hatchery-reared greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther) from live to artificial diets: Effects of age and duration of the changeover period. *Aquaculture* **145**, 171-181.
- Hastings, A.P. 1989. Protogynous hermaphroditism in *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae). *Copeia* **1**, 184-188.
- Helvik J. V., Karlsen O. 1996. The effect of light-and dark-rearing on the development of the eyes of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) yolk-sac larvae. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* **28**, 107-121.

- Helvik J.V., Drivenes O., Harboe T., Seo H.C. 2001. Topography of different photoreceptor cell types in the larval retina of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J. Exp. Biol.* **204**, 2553-2559.
- Hidaka, I., Kohbara, J., Araki, T., Morishita, T., Miyajima, T., Shimizu, S., Kuriyama, I. 2000. Identification of feeding stimulants from a jack mackerel extract for young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* **181**, 115-126.
- Hjelmeland, K., Pedersen, B. H., Nilssen, E.M. 1988. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacea prey. *Mar. Biol.* **98**, 331-335.
- Holt, G. J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. *J. World Aquacult. Soc.* **24**, 225-230.
- Houde E.D. 1978. Critical food concentrations for larvae of three species of subtropical marine fishes. *Bull. Mar. Sci.* **3**, 395-411.
- Houde, E. D., Schekter, R. C. 1980. Feeding by marine fish larvae: developmental and functional responses. *Env. Biol. Fish.* **5**, 315-334.
- Hunter J.R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. 34-77 pp. In: *Marine Fish Larvae. Morphology, Ecology and Relation to Fisheries*. Lasker, R. (ed.). University of Washington Press, Seattle.
- Huse I. 1994. Feeding at different illumination levels in larvae of three marine teleost species: cod *Gadus morhua* L., plaice, *Pleuronectes platessa* L., and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquacult. Fish. Man.* **25**, 687-695.
- Inui, Y., Egusa, S. 1967. Histological changes observed in glass eel liver during starvation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **33**, 181-189.
- Iwai, T. 1969. Fine structure of gut epithelial cells of larval and juvenile carp during absorption of fat and protein. *Arch. histol. jap.* **30**, 183-199.
- Iwai, T., Tanaka, M. 1968. The comparative study of the digestive tract of teleost larvae. III. Epithelial cells in the posterior gut of halfbeak larvae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **34**, 44-48.
- Izquierdo, M. S. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae." *Aquacult. Nutr.* **2**, 183-191.
- Kanazawa, A. 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* **155**, 129-134.
- Kanazawa, A., Koshio, S., Teshima, S.I. 1989. Growth and survival of larval red sea bream *Pagrus major* and japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets. *J. World Aquacult. Soc.* **20**, 31-37.
- Kapoor, B.G., Smith, H., Verighina, I.A. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.* **13**, 109-239.
- Kawamura G., Tsuda R., Kumai H. Ohashi S. 1984. The visual cell morphology of *Pagrus major* and its adaptive changes with shift from pelagic to benthic habitats. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **50**, 1975-1980.
- Kawai, S., Ikeda, S. 1972. Studies on digestive enzymes of fishes-II. Effects of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **38**, 265-270.
- Kestemont, P., Baras, E. 2001. Environmental factors and feed intake: mechanisms and interactions. 131-156 pp. En: Houlihan, D., T. Boujard, M. Jobling (eds.) *Food Intake in Fish*. Blackwell Science. Oxford.
- Khemis, I. B., de la Noue, J., Audet, C. 2000. Feeding larvae of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) with live prey or microencapsulated diets: linear growth and protein, RNA and DNA content. *Aquacult. Res.* **31**, 377-386.
- Kjørsvik E., van der Meer T., Kryvi H., Arnfinnson J., Kvenseth P. G. 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. *J. Fish Biol.* **38**, 1-15.

- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-Implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* **200**, 181-201.
- Kolkovski, S., Arieli, A., Tandler, A. 1997a. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquacult. Int.* **5**, 527-536.
- Kolkovski, S., Koven, W., Tandler, A. 1997b. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* **155**, 193-205.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A. 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* **194**, 107-121.
- Kurokawa T., Suzuki T. 1995. Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using anti-trypsinogen antibody. *J. Fish Biol.* **46**, 292-301.
- Kurokawa, T., Suzuki, T. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in the larvae of the japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **141**, 267-276.
- Kurokawa, T., Suzuki, T. 1998. Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **162**, 113-124.
- Kvenseth A. M., Pittman K. Helvik J. V. 1996. Eye development in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): differentiation and development of the retina from early yolk-sac stages through metamorphosis. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* **53**, 2524-2532.
- Lasker, R.; Feder, H.M.; Theilacker, G.H.; May, R.C., 1970. Feeding, growth, and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. *Mar. Biol.* **5**, 345-353.
- Lauff, M., Hofer, R. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* **37**, 335-346.
- Lavens, P., Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361.
- Lavens, P, Sorgeloos, P., Dhert, P, Drevresse, B. 1995. Larval Foods. 373-397 pp. En: Broodstock Management and Egg and Larval Quality. N. Bromage, R. J. Roberts (eds.). Blackwell Science, Oxford.
- Lazo, J. P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. 300-312 pp. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.
- Lazo, J. P., Dinis, M.T., Holt; G.J., Faulk, C., Arnold, C.R. 2000a. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* **188**, 339-351.
- Lazo, J. P., Holt, G.J., Arnold, C.R. 2000b. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquacult. Nut.* **6**, 183-192.
- Leeson, T.S., Leeson, C.R., Paparo, A.A. 1990. Texo-Atlas de histología. Interamericana-Mc Graw Hill. México. 741 pp.
- Li K. T., Wetterer J.K., Hairston N. G. 1985. Fish size, visual resolution, and prey selectivity. *Ecology* **66**, 1729-1735.
- Liang, X. F., Oku, H., Ogata, H. Y., Liu, J., He, X. 2001. Weaning chinese perch *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) onto artificial diets based upon its specific sensory modality in feeding. *Aquacult. Res.* **32** (Suppl. 1.), 76-82.
- Lluch-Cota D. 1995. Aspectos reproductivos de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Pices:Serranidae) en Bahía Magdalena-Almejas, B.C.S. México. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 171 pp.

- Lojda, Z., Gossrau, R., Schiebler, T.H. 1979. Enzyme histochemistry: A laboratory manual. Springer, New York. 339 pp.
- Luizi, S. F., Gara, B., Shields, R. J., Bromage, N.R. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture* **176**, 101-116.
- Marliave, J. B. 1994. Green water: Optical rather than nutritional effect. AZA Conference Proceedings, Atlanta, GA.
- Martin, F. D., Wright, D. A. 1987. Nutritional state analysis and its use in predicting striped bass recruitment: laboratory calibration. 109-114pp. In: Hoyt, R.D. (ed.) 10th Annual larval fish conference. American Fisheries Society Symposium. Miami, Florida. USA.
- Martínez-Díaz, S. F., Martínez-Pecero, R., Rosales-Velázquez, Alvarado-Castillo R., Pérez-España, H., Tucker, Jr. J. W. 2001. Voluntary spawning, early development, and completion of the life cycle of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* in the laboratory. *J. World Aquacult. Soc.* **32**, 122-129.
- Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, R. Martínez- Pecero y J.L. Orfíz-Galindo. 1990. Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base en su biología temprana. 68-74 pp. En: G. de la Lanza-Espino y J.L. Arredondo-Figueroa (eds.) La Acuicultura en México: de los conceptos a la producción. UNAM. México.
- May, R.C. 1970. Feeding larval marine fishes in the laboratory: a review. *Calif. Mar. Res. Comm., CalCOFI Report* **14**, 76-83.
- May, R.C., 1971. Effects of delayed initial feeding on larvae of the grunion *Leuresthes tenuis* (Ayres). *Fish. Bull.* **69**, 411-425.
- McFadzen, I. R. B., Lowe, D.M., Coombs, S.H. 1994. Histological changes in starved turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) quantified by digital image analysis. *J. Fish Biol.* **44**, 255-262.
- McGurk, M.D., 1984. Effects of delayed feeding and temperature on the age of irreversible starvation and on the rates of growth and mortality of pacific herring larvae. *Mar. Biol.* **84**, 13-26.
- Miller, D.J., Lea, R.N. 1972. Guide to the coastal marine fishes of California. *Calif. Fish Bull.* **157**, 249 pp.
- Mitchell, L. G., Nickum, J.G., Long, M.T. 1986. Histochemical localization of some digestive enzymes in larval walleyes. *Progr. Fish Cult.* **48**, 279-281.
- Mookerji, N.; Ramakrishna, R. T. 1995. Prey capture success, feeding frequency and daily food intakes rates in rohu, *Labeo rohita* (Ham.) and singhi, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) larvae. *J. Appl. Ichthyol.* **11**, 37-49.
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gillthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 121-130.
- Munilla-Morán, R., Stark J.R., Barbour, A. 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* **88**, 337-350.
- Muñetón-Gómez M. S., Ochoa-Báez R. I., Torres-Villegas J. R. 1989. Valoración de la inclusión doble alginato-parafina aplicada para estudios histológicos en larvas de peces. *Inv. Mar. CICIMAR* **4**, 281-284.
- Naas K., Huse I., Iglesias J. 1996. Illumination in first feeding tanks for marine fish larvae. *Aquacult. Eng.* **15**, 291-300.
- Nolting, M., Ueberschär, B., Rosenthal, H. 1999. Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using live prey and compound diets. *J. Appl. Ichthyol.* **15**, 138-142.

- O'Connell, C.P., 1976. Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **25**, 285-312.
- O'Connell, C. P., 1980. Percentage of starving northern anchovy *Engraulis mordax*, larvae in the sea as estimated by histological methods. *Fish. Bull.* **78**, 475-489.
- Oozeki, Y., Bailey, K.M. 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Mar. Biol.* **122**, 177-186.
- Oozeki, Y.; Ishii, T.; Hirano, R., 1989. Histological study of the effects of starvation on reared and wild-caught larval stone flounder, *Kareius bicoloratus*. *Mar. Biol.* **100**, 269-275.
- Parra G., Yúfera M. 2000. Feeding, physiology and growth responses in first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to prey density. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **243**, 1-15.
- Papatryphon, E., Soares Jr. J.H. 2000. Identification of feeding stimulants for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture* **185**, 339-352.
- Paul A.J. 1983. Light, temperature, nauplii concentrations, and prey capture by first feeding pollock larvae *Theragra chalcogramma*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **13**, 175-179.
- Pedersen, B.H., Hjelmeland, K. 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following digestion of copepods. *Mar. Biol.* **97**, 467-476.
- Pedersen, B. H., Nilssen, E.M., Hjelmeland, K. 1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. *Mar. Biol.* **94**, 171-181.
- Peña, M. R. 2000. Histología e histoquímica del desarrollo ontogenético del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 112 pp.
- Peña R., Dumas S., Villalejo-Fuerte M., Ortiz-Galindo J.L. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract of reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. *Aquaculture* **219**, 633-644.
- Person Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thebaud, L., Mugnier, C. 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey?. *J. World Aquacult. Soc.* **24**, 211-224.
- Porter S. M., Theilacker G. H. 1999. The development of the digestive tract and eye in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Fish. Bull.* **97**, 722-729.
- Puvanendran V., Brown J. A. 1998. Effect of light intensity on the foraging and growth of Atlantic cod larvae: interpopulation difference? *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **167**, 207-214.
- Rabe J., Brown A.J. 2001. The behaviour, growth, and survival of witch flounder (*Glyptocephalus cynoglossus*) larvae in relation to prey availability: adaptations to an extended larval period. *Fish. Bull.* **99**, 465-474.
- Reitan, I. K., Rainuzzo, R.J., Oie, G., Olsen, Y. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* **155**, 207-221.
- Ribeiro, L., Sarasquete, C., Dinis, M.T. 1999a. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* **171**, 293-308.
- Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu, M.T. Dinis. 1999b. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* **179**, 465-473.
- Richard, P. Bergeron, J. P., Boulhic, M., Galols, R., Person-Le Ruyet, J., 1991. Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **72**, 69-77.
- Rogers, B.A. Westin, D.T., 1981. Laboratory studies on effects of temperature and delayed initial feeding on development of striped bass larvae. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **110**, 100-110.
- Rønnestad, I., Koven, W.M., Tandler, A., Harel, M., Fyhn, H.J. 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mar. Biol.* **120**, 187-196.

- Roo F. J., Socorro J., Izquierdo M. S., Caballero M. J., Hernández-Cruz C. M., Fernández A., Fernández-Palacios H. 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. *Aquaculture* **179**, 499-512.
- Rosales-Velázquez M. O. 1997. *Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio*. Masters thesis. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. México. 62 pp.
- Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* **155**, 183-191.
- Rueda-González, F.M., Martínez-López, F.J., Zamora-Navarro, S., Kentouri, M., Divanach, P. 1995. Compensatory growth in *Pagrus pagrus* during re-feeding after fasting. In: Castelló-Ovary, F., Calderer-Reig, A. (eds.) Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura. Sant Carles de la Rapita, 10-13 Mayo 1995. Universitat de Barcelona.
- Russello, M., Ingley, M. 2000. An innovative liquid diet for marine fish larvae. *The Advocate*. February.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., González, M., Fernández-Palacios, H. 1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **124**, 275-282.
- Sánchez-Velasco, L. 1998. Diet composition and feeding habits of fish larvae of two co-occurring species (Pices: Callionymidae and Bothidae) in the North-western Mediterranean. *ICES J. Mar. Sci.* **55**, 299-308.
- Sánchez-Velasco, L. Contreras-Arredondo, I., Esqueda-Escárcega. 1999. Diet composition of *Euthynnus lineatus* and *Auxis* sp. Larvae (Pisces: Scombridae) in the Gulf of California. *Bull. Mar. Sci.* **65**, 687-698.
- Sandy J. M. y Blaxter J. H. S. 1980. A study of retinal development in larval herring and sole. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **60**, 59-71.
- Sarasquete, M. C., Polo, A., González de Canales, M.L. 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. *Histochem. J.* **25**, 430-437.
- Sarasquete M. C., Polo A., Yúfera M. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* **130**, 79-92.
- Schwassmann H. O. 1965. Functional development of visual pathways in larval sardines and anchovies. *CalCOFI Report* **10**, 64-70.
- Segner, H. 1996. Nutritional physiology in fish larvae. 1-24 pp. In: 6th Int. Course on Fish Larvae Nutrition (ERASMUS) Verreth, J. (ed.) May 6-14.
- Segner, H., Rösch, R. 1990. Development of dry food for larvae of *Coregonus lavaretus* L. II. Liver histology. *Aquaculture* **91**, 117-130.
- Segner, H., Rösch, R. 1998. Ontogeny of digestive and metabolic functions in *Coregonus lavaretus*. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **50**, 1-14.
- Segner, H., Witt, U. 1990. Weaning experiments with turbot (*Scophthalmus maximus*): electron microscopic study of liver. *Mar. Biol.* **105**, 353-361.
- Segner, H., Burkhardt, P., Avila, E.M., Juario, J.V., Storch, V. 1987. Nutrition-related histopathology of the intestine of the milkfish *Chanos chanos* fry. *Dis. Aquat. Org.* **2**, 99-107.
- Segner, H., Rösch, R., Schmidt, H., von Poeppinghausen, K.J. 1988. Studies on the suitability of commercial dry diets for rearing of larval *Coregonus lavaretus* from Lake Constance. *Aquat. Liv. Res.* **1**, 231-238.
- Segner, H., Rösch, R., Schmidt, H., Von Poeppinghausen, K.J. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.* **35**, 249-263.

- Segner, H., Rösch, R., Verreth, J., Witt, U. 1993. Larval nutritional physiology: Studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquacult. Soc.* **24**, 121-134.
- Sepesca. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la cabrilla. Sepesca/UABCS. México. 93 pp.
- Shimeno, S., Takeda, M., Takayama, S., Fikui, A., Sasaki, H., Kajiyama, H. 1981a. Adaptation of hepatopancreatic enzymes to dietary carbohydrate in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **47**, 71-77.
- Shimeno, S., Hosokawa, H., Takeda, M., Takayama, S., Fukui, A., Sasaki, H. 1981. Adaptation of hepatic enzymes to dietary lipid in young yellowtail. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **47**, 63-69.
- Stottrup, J. G., Norsker, N.H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* **155**, 231-247.
- Stradmeyer, L. 1989. A behavioural method to test feeding responses of fish to pelleted diets. *Aquaculture* **79**, 303-310.
- Stroband, H. W. J., Dabrowski, K.R. 1979. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae. 355-376 pp. In: M. Fontaine (ed.). La nutrition des poissons. CNERNA. Paris.
- Stroband, H.W.J., van der Meer, H., Timmermans, L.P.M. 1979. Regional functional differentiation in the gut of the grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Histochemistry* **64**, 235-249.
- Stroband, H.W.J., van der Veen, H. 1981. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp, *Ctenopharyngodon idella*. *J. Exp. Zool.* **218**, 149-156.
- Strüssmann, C. A., Takashima, F. 1990. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *J. Fish Biol.* **36**, 59-65.
- Takii, K., Shimeno, S., Takeda, M. 1985. Changes in digestive enzyme activities in eel after feeding. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **51**, 2027-2031.
- Tanaka, M. 1973. Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae. Ph. D. Thesis. Kyoto University. Japan. 136 pp.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Caceci, T., Smith, S.A. 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* **182**, 317-327.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Smith, S. A., Chatreewongsin, U. 2002. Ontogenetic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* **211**, 241-251.
- Theilacker, G.H. 1978: Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. *Fish. Bull.* **76**, 403-414.
- Theilacker, G.H. 1986. Starvation-induced mortality of young sea-caught jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, determined with histological and morphological methods. *Fish. Bull.* **84**, 1-17.
- Theilacker, G.H., Porter, S.M. 1995. Condition of larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, in the western Gulf of Alaska assessed with histological and shrinkage indices. *Fish. Bull.* **93**, 333-344.
- Theilacker, G.H., Watanabe, Y. 1989. Midgut cell height defines nutritional status of laboratory raised larval Northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* **87**, 457-469.
- Tilseth S., Ellertsen B. 1984. Food consumption rate and gut evacuation processes of first feeding cod larvae (*Gadus morhua* L.). 167-182 pp. In: The propagation of cod *Gadus morhua* L. Part 1. E. Dahl, D.S. Danelssen, E. Moksness, P. Solendal (eds.). An International Symposium, arendal.

- Tuker, J.W. 1998. Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, U.S.A. 750 pp.
- Ueberschär, B. 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. 234-239 pp. In: Walther, B.T., Fyhn, H.J. (eds.) Physiological and biochemical aspects of fish development.
- Ueberschär, B.; Clemmesen, C., 1992. A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by two biochemical methods- tryptic enzyme activity and RNA/DNA ratio measurements. *ICES J. Mar. Sci.* **49**, 245-249.
- Walford, J., Lam, T.J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* **109**, 187-205.
- Watanabe, Y. 1981. Ingestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvae or juveniles of some teleosts. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **47**, 1299-1307.
- Watanabe, Y. 1982a. Intracellular digestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells of teleost larvae and juveniles. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **48**, 37-42.
- Watanabe, Y. 1982b. Ultrastructure of epithelial cells of the anteromedian intestine and the rectum in larval and juvenile teleosts. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **33**, 217-228.
- Watanabe, Y. 1984a. An ultrastructural study of the intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nozawae*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **50**, 409-416.
- Watanabe, Y. 1984b. Postembryonic development of intestinal epithelium of Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*). *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* **46**, 1-14.
- Watanabe, Y., Sawada, N. 1985. Larval development of digestive organs and intestinal absorptive functions in the freshwater goby *Chaenogobius annularis*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* **47**, 1-10.
- Werner R.G., Blaxter J.H.S. 1981. The effect of prey density on mortality, growth and food consumption in larval herring (*Clupea harengus* L.). *Rapp. Proc.-v. Con. Int. Exp. Mer* **178**, 405-408.
- Yin, M.C., Blaxter, J.H.S. 1986. Morphological changes during growth and starvation of larval cod (*Gadus morhua* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **104**, 215-228.
- Yin, M.C., Blaxter, J.H.S. 1987. Feeding ability and survival during starvation of marine fish larvae reared in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **105**, 73-83.
- Yúfera, M. Pascual, E. Polo, A. Sarasquete, M.C. 1993. Effect of starvation of the feeding ability of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae at first feeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **169**, 259-272.
- Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **12**, 399-408.
- Zambonino-Infante, J. L. Cahu, C.L. Péres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* **139**, 129-138.
- Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C.L., Péres, A. 1997. Partial substitution of Di- and Tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* **127**, 608-614.

XIII. PRODUCTOS

La presente tesis ha generado los siguientes productos:

Publicaciones terminadas:

Peña R., Dumas, S. 2003. La larva por su boca muere. *Ciencia y Desarrollo*. En prensa.

Peña, R., Dumas, S., Saldivar-Lucio, R., Trasviña, A., García, G., Hernández-Ceballos. 2004.

Effect of Light intensity on feeding ability of the spotted sand bass larvae at first feeding. *Aquaculture Research* **35**, 345-349.

Peña, R., Dumas, Trasviña, A., García, G. y Pliego Cortéz, H. 2005. Effect of rearing tank colour and prey density on feeding ability of the spotted sand bass larvae at first feeding. *Aquaculture Research*. Aceptada.

Peña, R. y Dumas, S. 2005. Effect of delayed first feeding on development and feeding ability of the spotted sand bass larvae. *Journal of Fish Biology*. En prensa.

Publicaciones en preparación:

Peña, R., Dumas, S. Development and distribution of enzymatic activity of the spotted sand bass larvae. A someterse a *Aquaculture*.

Peña, R., Dumas, S. 2004. Development of the eye and feeding ability of the spotted sand bass larvae. A someterse a *Journal of Fish Biology*.

XIV. ANEXO

Técnicas enzimo histoquímicas

FOSFATASA ALCALINA (E.C. 3.1.3.1). Azo-couplig modified alter Pearse (1953). Tomado de Lojda *et al.* (1979).

Medio de incubación:

1-Naftol fosfato, sal de sodio or 1-naftol ácido fosfórico	25-50 mg
Disolver en Tris-HCl bufer, pH 9.2-9.4	50 ml
Fast blue BB, RR, B, VB, or Fast red TR	50 mg

Agitar fuertemente, checar pH, si es necesario, ajustar con NaOH, filtrar.

Tiempo de incubación:

3-60 minutos a temperatura ambiente ó a 37° C.

Tratamiento post-incubación:

Eliminar medio de incubación
Enjuagar con agua destilada
Colocar en formol 4%, a temperatura ambiente, durante varias horas para eliminar burbujas de aire en el tejido.
Enjuagar con agua corriente
Cuando sea necesario, contrateñir los núcleos con Nuclear Fast Red o hematoxilina, dependiendo del colorante utilizado.
Montar.

FOSFATASA ACIDA (E.C. 3.1.3.2). Metal salt procedure modified after Gomori (1950). Tomado de Lojda *et al.* (1979).

Medio de incubación:

0.1 M bufer acetato pH 5 o 6	50 ml
0.24 % Nitrato de plomo	50 ml
3 % 2-Glicerofosfato	10 ml

Agitar y dejar a la temperatura de incubación durante 10-30 min, filtrar.

Tiempo de incubación:

10-60 minutos a 37 ° C ó 2 hrs a temperatura ambiente.

Tratamiento post-incubación:

Eliminar medio de incubación
Enjuagar en dos cambios de agua destilada, 1 minuto en cada uno
Colocar en sulfuro de amonio amarillo 0.5 –1 %, 1-2 minutos
Enjuagar en agua destilada
Montar.

ESTERASA NO ESPECIFICA (E.C. 3.1.1.1). Simultaneous azo-coupling with 1-naphthyl acetate and stable diazonium salts modified after Gomori (1952). Tomado de Lojda *et al.* (1979).

Medio de incubación:

1-Naftol acetato	10 mg
Disolver en acetona	1 ml
0.1 M buffer fosfato, pH 7.4	50 ml
Fast Blue B	50-100 mg

Mezclar bien y filtrar.

Tiempo de incubación:

3-30 minutos a temperatura ambiente.

Tratamiento post-incubación:

Eliminar el medio de inclusión
Lavar en agua destilada
Formol 4 % varias horas (elimina las burbujas presentes en el tejido)
Lavar en agua corriente 10 minutos
Montar.

AMINOPEPTIDASA M (E.C. 3.4.11.2). Simultaneous azo-coupling modified alter Nachlas *et al.* (1960). Tomado de Lojda *et al.* (1979).

Medio de incubación:

L-Alanil- ó L-lucil-4-metoxi-2-naftilamida	5 mg
Disolver en N,N-dimetilformamida	0,5 ml
0.1 M bufer fosfato o buffer acetato, pH 6.5 – 7.5	10 ml
Fast blue B	10 mg

Mezclar y filtrar.

Tiempo de incubación:

5-45 minutos a temperatura ambiente ó 37° C.

Tratamiento post-incubación:

Eliminar medio de incubación
Enjuagar con agua destilada
Colocar en sulfato de cobre 2 % por 5 minutos
Enjuagar con agua destilada
Colocar en formol 4 % por 2 horas
Enjuagar con agua destilada
Montar.

DIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASA IV (E.C. 3.4.14.4). Simultaneous azo-coupling after Lojda (1977). Tomado de Lojda *et al.* (1979).

Medio de incubación:

Glicil-propil-4-metoxi-2-naftilamida	4 mg
Disolver en N,N-dimetilformamida	0,5 ml
Buffered Fast blue B	10 ml

(10 mg fast blue B disueltos en 10 ml de 0.1 M buffer fosfato, pH 7.2-7.5)
Mezclar bien y filtrar.

Tiempo de incubación:

5 – 90 minutos a temperatura ambiente o 37° C.

Tratamiento post-incubación:

Eliminar medio de incubación

Enjuagar con agua destilada

Colocar en sulfato de cobre 2 %, de 15 minutos a varias horas

Enjuagar con agua destilada

Colocar en formol 4 % varias horas

Enjuagar con agua destilada