



Reproducción en cautividad y cultivo larvario de la corvina (*Argyrosomus regius*)

Roser Vallés Bueno

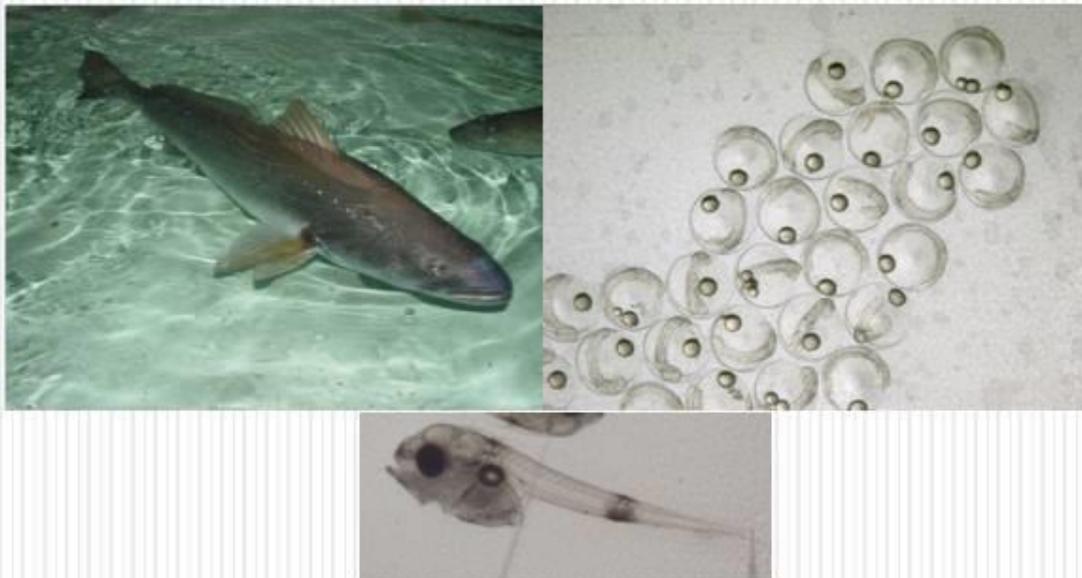


Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

Reproducción en cautividad y cultivo larvario de la corvina (*Argyrosomus regius*)



Roser Vallés Bueno

Julio 2013

Universidad de Barcelona
Facultad de Biología
Departamento de Fisiología

Reproducción en cautividad y cultivo larvario de la corvina (*Argyrosomus regius*)

Memoria presentada por

Roser Vallés Bueno

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Barcelona

Director de tesis: Dra. Alicia Estévez Garcia (Institut de Recerca i Tecnologia
Agroalimentària)

Tutor de tesis: Dra. Isabel Navarro (Universitat de Barcelona)

Dra. Alicia Estévez

Dra. Isabel Navarro

Roser Vallés

Barcelona, julio 2013

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se ha realizado gracias al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la concesión de la beca predoctoral FPI-INIA y por el proyecto RTA2008-00107 titulado “Investigación del control de la reproducción de la corvina (*Argyrosomus regius*) mantenida en cautividad” coordinado por Neil Duncan.

Quiero agradecer sinceramente a la Dra. Alicia Estévez, mi directora de tesis, que sin su ayuda, apoyo y paciencia tampoco hubiera sido posible realizar esta tesis. También quiero agradecer la ayuda y los conocimientos del Dr. Neil Duncan para llevar a cabo el capítulo de reproducción.

Gràcies a tot el personal de suport de l'IRTA i especialment a Magda, Sandra, Miriam, Glòria, Marta Pimentel i Joaquín per l'ajuda rebuda en el cultiu larvari i cultius auxiliars, a Josep Lluís, Esteban i Feliu per l'ajuda amb els reproductors, a Marta Sastre i Noelia per l'ajuda en els mostrejos, anàlisis de lípids i al laboratori en general, a l'equip de manteniment, Rafael, Xavi, David, Ivan y Joan, i sobretot vull donar les gràcies a Olga per ajudar-me en tots i cadascun dels mostrejos i per poder comptar sempre amb ella.

Agradezco también al Dr. Evaristo Mañanós del Instituto de Acuicultura Torre de la Sal del CSIC (Castellón) por enseñarme la técnica ELISA y poder analizar las muestras en su laboratorio. Gracias también a María José Bayarri y a Vanesa por ayudarme en los análisis y resultados de las hormonas esteroideas.

También quiero dar las gracias al Dr. Gordon Bell del “Institute of Aquaculture” de la Universidad de Stirling, Escocia, por dejarme analizar los lípidos de los huevos y las larvas en su laboratorio, y a James Dick y Mathew Sprague por enseñarme a analizarlos. Y sobretodo gracias a Sofia, Laura, Meritxell y Sara por hacer más agradable mi estancia en Escocia.

El apartado del desarrollo del esqueleto no se hubiera realizado sin la colaboración del Dr. Paulo Gavaia del Centro de Ciencias Marinas (CCMAR) de la Universidad del Algarve en Faro, Portugal, por enseñarme la técnica de la doble tinción en las larvas, y de la financiación recibida para realizar la estancia de COST Action FA0801–LARVANET (Short Term Scientific Mission). Y gracias también a Gisela Dionísio por ayudarme con la tinción de las larvas.

En la parte del estudio de la selectividad de las larvas han participado otros investigadores a quien quiero agradecer su trabajo. La Dra. Sofia Morais del IRTA-Sant Carles de la Ràpita por su ayuda durante todo el experimento y por el apoyo económico (proyecto AGL2011-23502:” Formulaciónes alternativas de piensos para peces: Efecto sobre el metabolismo lipídico y sobre los gastro- y neuropéptidos que regulan la ingesta en larvas y juveniles”) y al Dr. Xavier Gómez de la Universitat de Lleida por realizar los análisis con el citómetro de flujo. También dar las gracias a Kruno por su ayuda en los muestreos.

Finalment, vull donar les gràcies a la meva família. Als meus pares perquè sempre heu estat al meu costat i perquè sense vosaltres no hagués arribat fins aquí, i al Manel per tota la confiança i l'amor que m'has donat en aquest anys i per la paciència que has tingut en els mals moments. Moltes gràcies!

ÍNDICE

Introducción	1
Objetivos	7
Capítulo 1. Reproducción en cautividad de la corvina de origen salvaje y de cultivo	11
1. Introducción	13
2. Materiales y métodos	14
Análisis hormonas esteroides	14
Obtención de gametos	14
Calidad de las puestas	15
Composición en lípidos, clases de lípidos y perfil de ácidos grasos de los huevos y larvas de corvina	16
3. Descripción de los stocks de reproductores	17
Reproductores cultivados	17
Reproductores salvajes	17
4. Resultados	19
4.1. Reproductores cultivados	19
Crecimiento	19
Mortalidad	21
Niveles de hormonas esteroides en sangre	21
Obtención de puestas	23
Fecundidad	24
Calidad de las puestas	25
Composición en lípidos, clases de lípidos y perfil de ácidos grasos de los huevos y larvas de corvina obtenidos a partir de reproductores cultivados	27
4.2. Reproductores salvajes	29
Crecimiento	29
Obtención de puestas	30
Fecundidad	33
Calidad de las puestas	34
Composición en lípidos, clases de lípidos y perfil de ácidos grasos de los huevos y larvas de corvina obtenidos a partir de reproductores salvajes	36
4.3. Comparación entre corvinas cultivadas y salvajes	40
Crecimiento	41

Obtención de puestas	41
Fecundidad	42
Calidad de las puestas	43
Composición en lípidos, clases de lípidos y perfil de ácidos grasos de los huevos y larvas de corvina	43
5. Discusión	45
6. Conclusiones	50
7. Bibliografía	52
Capítulo 2. Cultivo larvario de la corvina	57
1. Osteología del esqueleto axial y apendicular de la corvina <i>Argyrosomus regius</i> (Sciaenidae) y desarrollo temprano del esqueleto en dos instalaciones de cultivo	59
Introducción	61
Materiales y métodos	62
Resultados	63
Discusión	69
Bibliografía	72
2. Condiciones de luz durante el cultivo larvario de la corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	77
Introducción	79
Materiales y métodos	79
Resultados	81
Discusión	85
Bibliografía	87
3. Uso de Ox-Aquaculture [®] para la desinfección de las presas vivas y las larvas de corvina, <i>Argyrosomus regius</i> (Asso, 1801)	91
Introducción	93
Materiales y métodos	94
Resultados	95
Discusión	99
Bibliografía	101
4. Uso de microesferas fluorescentes para determinar la selección de las larvas de corvina por diferentes tipos de artemia enriquecida	105
Introducción	107
Materiales y métodos	107
Resultados	110
Discusión	115
Bibliografía	117

5. Efecto de diferentes niveles de ácido docosahexanoico (DHA) en el enriquecimiento de presas vivas sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	121
Introducción	123
Materiales y métodos	124
Resultados	125
Discusión	129
Bibliografía	131
Discusión general	135
Bibliografía general	141
Conclusiones generales	145
Anexos	149

Introducción general

Acuicultura mundial

La acuicultura no es solo un complemento a la pesca sino que es la ganadería con mayor futuro ya que tiene a su favor la disposición del 70% de la superficie del planeta Tierra, no requiere el consumo de agua dulce y los animales acuáticos son más eficientes a la hora de convertir el alimento que los terrestres. Los retos que se deben superar son la optimización de las fuentes de ingredientes para los piensos, avances tecnológicos para adaptar las granjas a condiciones ambientales difíciles y el control de la sanidad de las especies cultivadas. La acuicultura proporciona más de la mitad de los alimentos de origen acuático a la población mundial ya que en 2010, la acuicultura mundial produjo 78.9 millones de toneladas de productos acuáticos frente a los 89.5 millones de toneladas procedentes de la pesca (APROMAR 2012).

Según la FAO (2012) en los últimos 30 años (1980-2010) la producción mundial de animales acuáticos (tanto de agua salada como dulce y salobre) se ha multiplicado por doce con una media anual del 8.8%. Esta producción ha alcanzado un máximo de 60 millones de toneladas en 2010. Se cultivan aproximadamente 600 especies acuáticas en 190 países y entre estas especies se encuentran peces (49.6%), moluscos (18%), crustáceos (7.3%), anfibios y reptiles acuáticos (0.5%) y otros como los erizos de mar, tunicados y medusas. En 2010, Asia representó el 87% del volumen de la producción mundial mientras que Europa solo representó el 4.2%. La acuicultura marina representó aproximadamente el 29.2% de la producción acuícola mundial en 2010 compuesta por moluscos (75.5%), peces (18.7%), crustáceos (3.8%) y otros. Entre las especies de peces marinos destacan los dentones, lubinas, esciénidos, meros, lisas, rodaballo, pargos, cobia, bacalao y atunes. Y entre las especies de esciénidos encontramos, el corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*) en China, EEUU, Israel, Méjico y Taiwán, el verrugato del sur (*Argyrosomus japonicus*) en Australia, Taiwán y sur de África, el verrugato fusco (*Umbrina cirrosa*) en Chipre, Grecia, Italia y Turquía, el corvallo (*Sciaenops umbrina*) en Grecia y Turquía y la corvina (*Argyrosomus regius*) en España, Francia, Italia, Egipto, Marruecos y Turquía (Cárdenas 2010). La producción acuícola mundial de esciénidos en 2010 fue de 150000 toneladas (FAO 2012) siendo la del corvinón ocelado de 54509 t y la de la corvina de 14596 t.

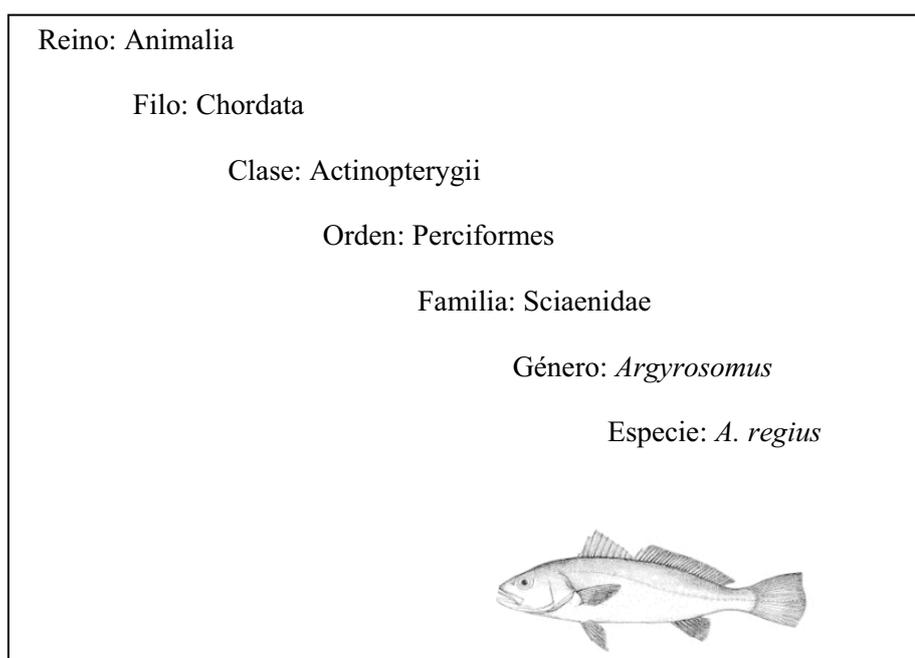
La acuicultura de la corvina (*Argyrosomus regius*) empieza en los años 90 en Francia con una producción anual de 30 t en el 1997. En el 2009 la producción de corvina alcanzó las 2200 t en Egipto, 1348 t en España, 418 t en Francia, 102 t en Italia y 44 t en Portugal (FAO 2011). En el año 2011, la producción disminuyó un 11.4% respecto al año anterior debido al poco conocimiento de la especie por parte de la población y consumidores, y por la prohibición transitoria de su cultivo en Canarias. La corvina es una especie con un alto potencial en la acuicultura debido a su rápido crecimiento (alrededor de 1 kg por año) y buenos índices de conversión (Jiménez et al. 2005), y por la buena calidad de su carne debido al bajo contenido en grasa (Poli et al. 2003). Las técnicas de cultivo que se utilizan en el Mediterráneo son parecidas a las usadas para la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y la dorada (*Sparus aurata*), y el engorde en el mar se realiza en jaulas flotantes circulares de 25 m de diámetro. Hasta hace poco, solamente

dos instalaciones francesas, conocedoras del ciclo vital de la corvina, suministraban alevines de corvina a Europa, pero recientemente se han publicado trabajos de inducción a la puesta mediante tratamientos hormonales (Duncan et al. 2012) que permitirán avanzar en su cultivo no solo en Francia sino en otros países del área del Mediterráneo.

Descripción general de la Corvina (*Argyrosomus regius*)

La corvina pertenece a la familia Sciaenidae (Fig. 1) que está formada por 70 géneros y 270 especies que se localizan en el Indo-Pacífico, el Caribe y las aguas templadas de los océanos Pacífico y Atlántico, y en el Mediterráneo. A los esciéndidos se les conoce como peces roncadores por los sonidos que producen mediante la vibración de unos músculos insertados en las paredes de la vejiga natatoria durante la época de reproducción (Legardère y Mariani, 2006). Estos sonidos permiten a los pescadores localizar fácilmente grandes bancos de peces a larga distancia. Se encuentran en aguas costeras y en aguas de mayor profundidad (hasta 250-300 m), sobre fondos arenosos, fangosos y rocosos. Son peces euritermos y eurihalinos lo que les permite penetrar en la desembocadura de los ríos y en estuarios donde realizan la puesta.

Figura 1. Posición sistemática de la corvina.



La corvina presenta un cuerpo alargado de color gris-plateado con una cabeza relativamente grande. Presenta dos aletas dorsales, la segunda (1 radio duro y 26 blandos) mucho más larga que la primera (9-10 radios duros) y una aleta anal formada por 2 radios duros y 7 u 8 radios blandos. Destaca el brillo intenso de su línea lateral lo que la hace visible a simple vista. En la boca se encuentran dientes pequeños dispuestos en varias series con una zona interior de color amarillo dorado. Los mayores individuos capturados llegan a alcanzar los 2 m de longitud y 50 kg de peso (FAO, Pesca y

Acuicultura, Programa de información de especies acuáticas), aunque lo más habitual es capturar peces de 50 cm a 1 m de longitud. Los otolitos son de gran tamaño y han sido usados como amuletos por los pescadores del sur de la Península Ibérica (Cárdenas 2010).

La corvina se alimenta de peces más pequeños como los clupeidos y mugílidos, y también de crustáceos, moluscos y poliquetos (Jiménez et al. 2005). Es una especie gregaria que en primavera se localiza en las desembocaduras de los ríos y lagunas estuáricas donde realizan el desove abandonándolos a finales de julio y permaneciendo en aguas costeras hasta el principio de otoño donde se dirigen a aguas más profundas en invierno. Las larvas se mantienen en los estuarios hasta que son juveniles que se trasladan a otros hábitats hasta que alcanzan la madurez sexual y vuelven a los estuarios para reproducirse. Los machos de corvina alcanzan la madurez sexual a partir de los 3 años con una longitud de 61.6 cm, mientras que las hembras maduran por primera vez entre los 3 y 5 años de edad cuando alcanzan una longitud de 70-110 cm (González-Quirós et al. 2011).

Reproducción en cautividad

Los esciénidos son un grupo de peces que maduran en cautividad pero no consiguen realizar la puesta, por lo que necesitan ser inducidos mediante tratamientos hormonales, exceptuando al corvinón ocelado del cual se han obtenido puestas mediante manipulación ambiental (Arnold et al. 1977). Las hormonas que se han utilizado han sido la GCH (gonadotropina corionica humana) y la LHRHa (análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante) en el verrugato del sur (Fielder y Heasman, 2011), la LHRHa en el corvinón ocelado (Thomas y Boyd, 1988) y la GnRHa (agonista de la hormona liberadora de gonadotropina) en el verrugato fusco (Bárbaro et al. 2002; Mylonas et al. 2004; Basaran et al. 2009) y la corvina (Duncan et al. 2012). Después de la inducción hormonal el desove se produce entre las 30 y 90 horas, a una temperatura del agua superior a los 16°C y con fecundidades medias entre 30000 y 350000 huevos por kg de hembra (Cárdenas 2010).

Figura 2. Ejemplar de reproductor de corvina estabulado en el IRTA.



La corvina empieza a diferenciarse sexualmente a los seis meses y los machos y las hembras alcanzan la pubertad a los 2 y 3 años de edad, respectivamente (Schiaivone et al. 2012). Las primeras puestas de corvina obtenidas en España mediante inducción

hormonal fueron en 2006 con inyección e implante de LHRH (Grau et al. 2007) y en 2007 con inyección e implante de GnRH α (Duncan et al. 2012). En general, las puestas se realizaron entre abril y junio, con una fecundidad media de 498141 huevos kg⁻¹ de hembra en 2008 y una tasa de fecundación y eclosión de los huevos del 38-100% y 30-74% respectivamente (PLANACOR 2009).

Cultivo larvario

Es poca la información sobre el cultivo larvario de los esciénidos, pero existen algunos trabajos sobre el verrugato fusco (Zaiss et al. 2006) que utiliza una temperatura de 22.7±0.7°C, un fotoperiodo de 24hL:0hO y 600 lux de intensidad durante el cultivo. La secuencia alimentaria es a base de rotíferos enriquecidos desde el día 2 al 13 después de la eclosión (densidad de 2 rotíferos mL⁻¹), del día 6 al 32 con *Artemia* (0.5 nauplios mL⁻¹) y pienso a partir del día 22. Los parámetros utilizados para el cultivo larvario del verrugato del sur (Fielder y Heasman, 2011) son a una temperatura entre 20 y 24°C, la salinidad entre 5 y 35‰, el fotoperiodo de 12hL:12hO o 18hL:6hO, la intensidad de luz entre 225 y 400 lux, la densidad de 10 larvas L⁻¹, y una secuencia alimentaria con rotífero del día 3 al 16 (20 rotífero mL⁻¹), con *Artemia* del día 12 al 39 (0.2-2 *Artemia* mL⁻¹) y pienso a partir del día 22.

El cultivo larvario de la corvina en España, se ha realizado en tanques de 250 a 1000 L, a una temperatura de 18-25°C, con una intensidad lumínica entre 500 y 3000 lux, un fotoperiodo entre 12 y 24 h de luz y a una densidad de 25-100 larvas L⁻¹ (PLANACOR 2009). La secuencia alimentaria para obtener una buena supervivencia de las larvas es con rotífero enriquecido desde el día 2 al 15 después de la eclosión, *Artemia* enriquecida del día 12 al 30 y pienso a partir del día 20 (Roo et al. 2010). La supervivencia larvaria a los 30 días oscila entre el 11 y 63% y la mayor mortalidad es debida al canibalismo generalmente observado al final del cultivo larvario (PLANACOR 2009) igual que en el corvinón ocelado (Battaglione y Talbot, 1994).

Figura 3. Desarrollo larvario de la corvina a una temperatura entre 19 y 24°C. Las fotos del día 18 y 25 son de Jiménez et al. 2005.



Objetivos

Los objetivos principales de esta tesis son estudiar la reproducción en cautividad y el cultivo larvario de la corvina (*Argyrosomus regius*). La tesis está dividida en dos capítulos:

Capítulo 1. Optimización de los tratamientos hormonales adecuados para la reproducción en cautividad de la corvina tanto de origen salvaje como de cultivo con el fin de obtener huevos y larvas de buena calidad y comparación entre las puestas obtenidas de los reproductores salvajes y las de los reproductores de cultivo.

Capítulo 2. Estudio del cultivo larvario, determinación de los parámetros que influyen en el crecimiento y la supervivencia larvaria. Se ha subdividido en 5 puntos:

1. Desarrollo del esqueleto de las larvas de corvina con el fin de determinar posibles deformaciones esqueléticas.
2. Condiciones de luz (fotoperiodo e intensidad de luz) adecuadas para obtener un buen crecimiento y supervivencia larvaria.
3. Desinfección con Ox-Aquacultre[®] de las presas vivas y las larvas, efecto en el crecimiento y la supervivencia larvaria.
4. Selección de presas por parte de las larvas de corvina mediante el marcaje de nauplios de *Artemia* con microesferas fluorescentes.
5. Estudio de los requerimientos nutricionales y el nivel adecuado de ácido docosahexanoico (DHA) en las presas vivas para obtener un mayor crecimiento y supervivencia de las larvas de corvina.

Capítulo 1. Reproducción en cautividad de la corvina de origen salvaje y de cultivo

1. Introducción

Para establecer un protocolo de desove de peces marinos es necesario previamente conocer la estrategia reproductiva y el ciclo de maduración de la especie, por lo que se debe determinar el momento de la diferenciación sexual, la maduración de los reproductores en función de las condiciones ambientales, la endocrinología de la reproducción, las necesidades nutricionales de los reproductores, el comportamiento durante el desove y las características de los huevos.

Los esciénidos son peces gonocoristas, con un sexo determinado después de la diferenciación sexual. La corvina empieza a diferenciarse sexualmente a los seis meses de edad alcanzando la pubertad a los 2 y 3 años de edad en machos y hembras, respectivamente (Schiavone et al. 2012). La primera maduración gonadal en hembras de corvina salvaje se produce cuando alcanzan un peso de 8 kg en las costas del Algarve, Portugal (Nuno Prista, Univ. Lisboa, Fac. Ciencias, Inst. Oceanografía, com. pers) o una talla de 70-110 cm en el sur de España (González-Quirós et al. 2011). En primavera, durante la época reproductiva, las corvinas se agrupan en estuarios o lagunas costeras para el desove abandonándolos a finales de julio y permaneciendo en aguas costeras hasta el principio de otoño desde donde se dirigen a aguas más profundas en invierno. La reproducción de los esciénidos tiene lugar en primavera y verano (Cárdenas 2010) y en el caso de la corvina las puestas se realizan entre marzo y agosto (Jiménez et al. 2005).

La corvina, *Argyrosomus regius*, se cultiva desde hace apenas dos décadas. Todas las instalaciones dedicadas al cultivo larvario de esta especie han constituido su stock de reproductores a partir de individuos salvajes y pocas instalaciones cuentan hoy en día con un stock de reproductores procedente de animales nacidos en cautividad. A fin de implementar en el futuro programas de mejora genética, es imprescindible poder contar en las instalaciones con ejemplares nacidos en cautividad para evaluar su viabilidad como reproductores, examinar su variabilidad genética y establecer los periodos de tiempo que transcurren desde que se obtienen juveniles, se produce la pubertad y la maduración sexual, evaluando al mismo tiempo la proporción de sexos de las poblaciones en cultivo.

Dado el poco tiempo que se ha estado cultivando en cautividad la corvina y el relativo desconocimiento de sus características reproductivas, uno de los objetivos de esta tesis ha sido establecer las pautas de ovulación, maduración y puesta desde un punto de vista endocrinológico, optimizar la inducción hormonal a la puesta y determinar los parámetros de calidad de las puestas tanto en ejemplares capturados en el medio natural e identificados en la tesis como “reproductores salvajes” como en ejemplares procedentes de instalaciones de cultivo (“reproductores cultivados”).

Un segundo objetivo ha sido determinar los efectos a nivel de cantidad y calidad de las puestas que un cambio de fotoperiodo natural a constante puede tener en la reproducción de la corvina.

Por último un tercer objetivo ha sido comparar las puestas obtenidas entre individuos de origen salvaje y los procedentes de cultivo.

2. Materiales y métodos

Análisis de hormonas esteroideas

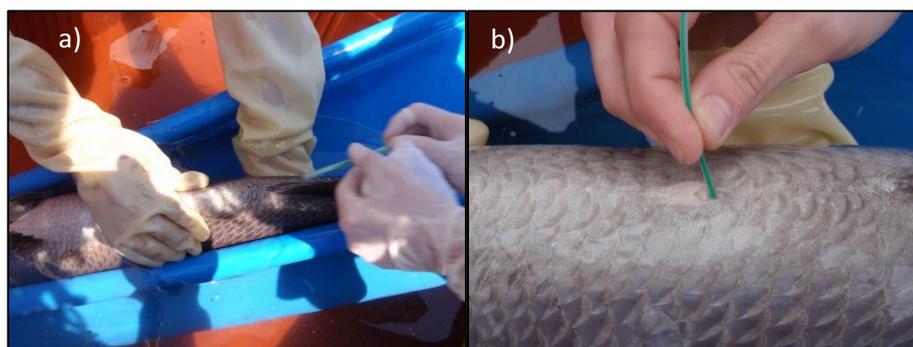
Entre los meses de febrero de 2009 a octubre de 2010, se realizaron extracciones de sangre con periodicidad mensual, coincidiendo con los controles de peso y talla de todos los peces del stock de reproductores cultivados (estos análisis no se realizaron con el stock de reproductores salvajes), una vez anestesiados con MS-222 (70 mg L^{-1}). Las muestras de sangre (2 mL) se centrifugaron a 3000g, a 4°C durante 5 minutos para separar el plasma. La muestra de plasma se guardó a -80°C para su posterior análisis de esteroideos.

Para el análisis de las hormonas esteroideas (testosterona (T) en machos y hembras, 11-ketotestosterona (11-KT) en machos y estradiol (E_2) en hembras) el plasma se sometió a una primera extracción con metanol (6:1 v/v), tras centrifugar (3000 g, 4°C , 15 min) el pellet se re-extrajo dos veces más con metanol. El sobrenadante de las distintas extracciones se mezcló en un pool, se secó, se diluyó en tampón fosfato y se conservó a -20°C hasta su análisis mediante ELISA. Los niveles de E_2 , T y 11-KT se cuantificaron en placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) recubiertas con anticuerpo “mouse anti-rabbit IgG monoclonal “(Cayman Chemical) y dejándolas toda la noche en incubación (4°C). Al día siguiente se añadió el reactivo Ellman (34 mM acetiltiocolina, 27 mM ácido ditio-bid-2-nitriobenzoico, en 0.1 M fosfato de potasio, pH 7.4) en completa oscuridad durante 4 h y se midió la absorbancia a 405 nm.

Obtención de gametos

Mensualmente, coincidiendo con los muestreos de peso y talla, se procedía a realizar un masaje abdominal a los machos, para comprobar si eran fluyentes, y una biopsia por canulación en las hembras, para extraer una muestra de ovario y determinar el tamaño de los ovocitos y su estado de maduración (Fig. 1). Este análisis se efectuó tanto en los reproductores cultivados como salvajes.

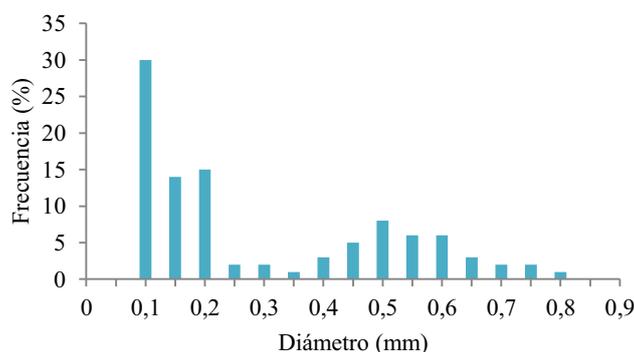
Figura 1. (a) Masaje abdominal a un macho y (b) biopsia por canulación en una hembra de corvina previamente anestesiados con MS-222.



La calidad del esperma se determinaba mediante el recuento de espermatozoides móviles (porcentaje de movilidad) y la duración de dicha movilidad. El esperma extraído de los machos se situaba en un portaobjetos y se mezclaba con agua de mar (1:19, v:v) a fin de activar el movimiento de los espermatozoides. Tras la observación microscópica se anotaba el porcentaje (respecto del total) de espermatozoides móviles y el tiempo que transcurría desde la activación hasta el fin de la movilidad. Porcentajes altos de movilidad y mayor duración de dicha movilidad indican una buena calidad del esperma y que el macho está listo para la inducción a la puesta.

Para la estimación del tamaño ovocitario, la muestra de ovocitos conseguida por biopsia se evaluaba bajo una lupa Nikon (SMZ, Nikon, Japon) conectada a una cámara digital Olympus DP25 (Olympus, Alemania) conectada a su vez a un analizador de imagen (Analysis, SIS, Alemania). Tras medir el diámetro de 150 ovocitos se obtenía un histograma de frecuencia (Fig. 2 y Anexo 1). La presencia de un alto grado de ovocitos con tamaño mayor a 0.5 mm y una distribución bimodal de los diámetros ovocitarios indicaba el grado de madurez gonadal de la hembra y que estaba preparada para la inducción hormonal a la puesta.

Figura 2. Histograma de frecuencia del tamaño de ovocitos (n=150) de la hembra número 17 (6.6 kg de peso) mostrando una distribución bimodal. La muestra fue recogida en abril del 2009, a una temperatura de 16.3°C.



De esta manera, si en los muestreos mensuales se detectaban machos fluyentes y hembras con un tamaño de ovocitos mayor a 0.5 mm, se procedía a la inducción a la puesta. Las inducciones se realizaron mediante una inyección intramuscular o implante de GnRH α (des-Gly10, [D-Ala6]-gonadotropin releasing hormone, Sigma, España, comercializada como LHRH α) a una concentración de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en machos y 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en hembras (Duncan et al. 2012).

Calidad de las puestas

Las puestas producidas tras las distintas inducciones hormonales se recogieron cada mañana a la salida del tanque de reproductores en un tanque cilindrocónico con dos ventanas en los laterales cubiertas con una malla de 500 μm inmerso en un tanque de 100 L conectado a su vez al sistema de recirculación IRTAMAR[®]. La separación de huevos flotantes (HF) y no flotantes (HNF) se realizó utilizando una probeta de 2 L

donde los huevos se dejaban durante 30 min a fin de obtener una buena separación de las dos fracciones, anotándose posteriormente el volumen de HF y HNF. A continuación se contaba el número de huevos de la fracción flotante, y mediante el uso de una lupa (Nikon SMZ800, Nikon, Tokyo, Japan) dotada de una cámara digital Olympus DP25 y conectada a un analizador de imagen (AnalySIS, SIS GmbH, Germany) se obtenían el estadio de desarrollo embrionario, la tasa de fecundación (%) y el diámetro de los huevos (μm). Paralelamente se estimaba el peso seco (μg), después de su secado en una estufa a 60°C durante 24 h, con una microbalanza (Metler Toledo MX5). Una muestra de huevos se situaba en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc) (un huevo en cada pocillo) incubándose a 19°C a fin de estimar la tasa de eclosión (%) y la supervivencia larvaria a día 3 y 5 (%) después de la eclosión y anotar el último día de vida de la larva mantenida en ayuno. Parte de los huevos se conservaron a -20°C después de su lavado con agua destilada, para posteriormente proceder al análisis de lípidos. Los huevos sobrantes se incubaron en cubiletes cilíndricos de 35 L inmersos en un tanque de 1500 L a una densidad de 500 huevos L^{-1} , a 18°C y en oscuridad hasta la eclosión (48 h). Los cubiletes contenían tres ventanas laterales y una en el fondo cubiertas con una malla de $150 \mu\text{m}$ y contaban con un sistema de aireación y renovación de agua (air-lift) propio. Al día siguiente de la eclosión de las larvas, éstas se sacrificaron con una sobredosis de MS-222, se lavaron con agua destilada y se conservaron a -20°C para el análisis de lípidos.

Composición en lípidos, clases de lípidos y perfil de ácidos grasos de los huevos y larvas de corvina

La extracción de lípidos en huevos y larvas de 1 día se realizó mediante el método de Folch et al. (1957). Tras evaporación del solvente (cloroformo) con nitrógeno y posterior secado durante 16 horas en oscuridad, se cuantificaron los lípidos totales de las muestras mediante gravimetría, conservando los lípidos en Cloroformo:Metanol (2:1, v:v) y 0.01% de butilhidroxitolueno (BHT) a una concentración de 10 mg mL^{-1} y gas nitrógeno a -20°C . La transmetilación de los lípidos en ácidos grasos se realizó mediante catalización ácida con metanol sulfúrico (Christie 1982). Los metilésteres de ácidos grasos (FAMES) se recogieron en C:M (1:1, v:v) con BHT (0.01%) y se evaporaron con gas nitrógeno. Los FAMES se purificaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) y se analizaron mediante cromatografía gas-líquido en un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC (Thermo Finnigan, Milan, Italia) equipado con una columna capilar de $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ id. (BPX 70, SGE Europe Ltd., UK) con inyección “on-column” y detección por ionización de llama utilizando helio en flujo constante (1.2 mL min^{-1}). Los ácidos grasos fueron identificados mediante comparación con estándares comerciales (Supelco Inc., Madrid) y un aceite de pescado bien caracterizado (Marinol C38, Stepan, USA) y cuantificado en relación al estándar interno (21:0) añadido antes de la transmetilación.

Las clases de lípidos se cuantificaron mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) (Olsen y Henderson, 1989). Los medios de desarrollo empleados fueron metilacetato, isopropanol, cloroformo, metanol y cloruro de sodio para lípidos

polares e isohehexano, dietil éter y ácido acético para los lípidos neutros. Una vez desarrolladas las placas en los dos solventes, y tras su secado, las manchas producidas por cada clase de lípido se revelaron mediante el reactivo de Fewster (3% de acetato de cobre en 8% de ácido fosfórico, v:v) y se quemaron en una estufa a 120°C. Las clases de lípidos se cuantificaron tras el revelado usando un densitómetro (Camag 3 TLC Scanner, Switzerland) y el programa winCATS (Planar Chromatography Manager Software, versión 1.2.0).

3. Descripción de los stocks de reproductores

Reproductores cultivados

En octubre de 2008, un total de 23 corvinas de un stock de 140 reproductores estabulados en el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) de las Palmas de Gran Canaria se transportaron hasta las instalaciones del IRTA con un peso medio de 6.1 ± 1.2 kg. Los peces procedían de juveniles suministrados por un criadero comercial francés y fueron engordados en jaulas en Tenerife hasta alcanzar un peso de 1.5 kg. Desde las jaulas se trasladaron inicialmente al ICCM donde se alojaron en tanques de 10 m^3 con fotoperiodo natural, temperatura de 18-24°C y se alimentaron con pienso Vitalis Repro (Skretting).

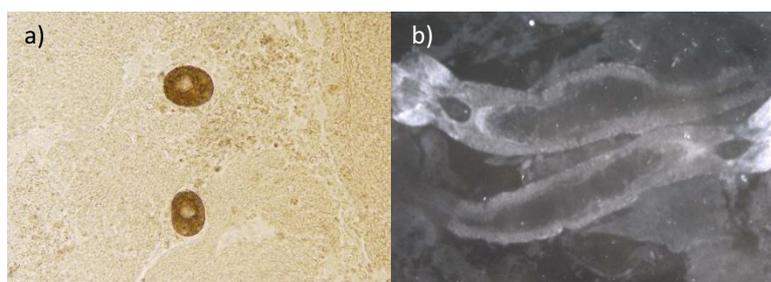
Una vez en el IRTA, los peces se estabularon en dos tanques rectangulares de 18 m^2 (3 x 6 m) y 80 cm de profundidad (C1 y C2) bajo condiciones de fotoperiodo natural (15hL:9hO en verano y 9hL:15hO en invierno) y temperatura constante ($18 \pm 4^\circ\text{C}$). Después de la primera época de puestas (julio 2009) y hasta el final del experimento el fotoperiodo se mantuvo constante a 14hL:10hO. Desde el primer día los reproductores se alimentaron diariamente con pienso Vitalis Repro hasta febrero del 2010 que se substituyó por Vitalis Cal (Skretting) debido a que contiene mayor cantidad de proteína y grasa (54 y 18% de la materia seca, respectivamente) por la introducción de harina de calamar en los ingredientes frente al pienso Vitalis Repro (52% de proteína y 16% de grasa, Skretting com. pers.).

Reproductores salvajes

El stock de reproductores salvajes (N=32; 11 kg de peso medio) se obtuvo mediante pesca con almadraba en las costas del Algarve portugués. Los peces se acondicionaron previamente a la cautividad en la empresa Flying-Sharks (www.flyingsharks.eu) antes de su transporte por carretera hasta las instalaciones del IRTA en noviembre de 2008. Una vez en el IRTA los peces se trasladaron a un raceway de 50 m^3 y 1 m de profundidad con temperatura y fotoperiodo naturales. Durante las primeras semanas se alimentaron con sardina y calamar introduciéndose paulatinamente pienso comercial Vitalis Repro (Skretting) hasta lograr que su alimentación fuera de pienso tres días a la semana y calamar o sardina un día. En febrero del 2010 el pienso se cambió por el pienso comercial Vitalis Cal (Skretting).

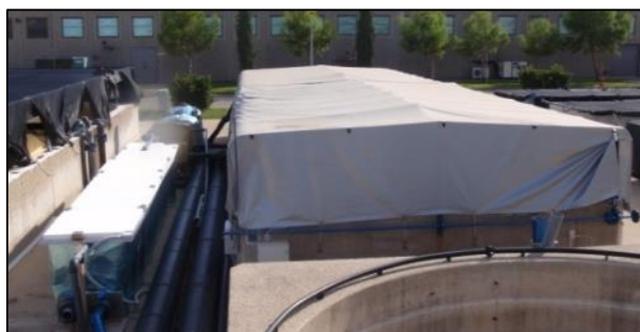
En el invierno de 2008 (entre noviembre y febrero) la temperatura disminuyó por debajo del mínimo para esta especie (14°C) hasta alcanzar los 12°C por lo que los peces dejaron de alimentarse. La falta de alimentación provocó un débil estado de salud de los peces que comenzaron a ser parasitados por copépodos y *Monogenea* que infectaron piel y branquias. Para eliminar estos parásitos se realizaron semanalmente baños de formol (100 mg L⁻¹) y se administró el antihelmíntico Praziquantel (50 mg kg⁻¹) en solución salina (9%) directamente al estómago mediante una cánula, en peces anestesiados con MS-222 a fin de eliminar posibles parásitos intestinales. Posteriormente los peces fueron infectados por el dinoflagelado *Amyloodinium* sp. que provoca una enfermedad conocida como “Marine Velvet” dado el aspecto aterciopelado que provoca en la piel y branquias. La enfermedad provocó apatía y falta de movimiento de los animales, que quedaban aletargados en el fondo del tanque y posteriormente provocó una alta mortalidad. Esta infección fue controlada con baños de H₂O₂ (200 ppm) durante una hora a fin de eliminar las dinosporas (Francis-Floyd y Floyd, 2011).

Figura 3. (a) Dinoflagelado *Amyloodinium* sp. y (b) parásito trematodo encontrados en las branquias de los peces. Foto realizada por Karl Andree.



Debido a estos problemas de aclimatación y parasitación derivados en parte a la baja temperatura experimentada en el invierno del 2008 y a la inadecuada alimentación de los peces, no se observó ningún tipo de maduración en la época natural de puesta (primavera 2009), por lo que para evitar bajadas (o subidas) bruscas de temperatura se instaló un sistema de recirculación (Fig.m4) a fin de mantener la temperatura del agua constante y dentro del rango tolerado por la especie (17.9±2.0°C). Así, mientras que en el año 2008 se registraron 13 bajas por inanición e infecciones por parásitos, en los dos años siguientes (2009-2011) solo se registró una baja.

Figura 4. Tanque de la corvina salvaje cubierto por una lona blanca y a la izquierda el sistema de recirculación de agua.



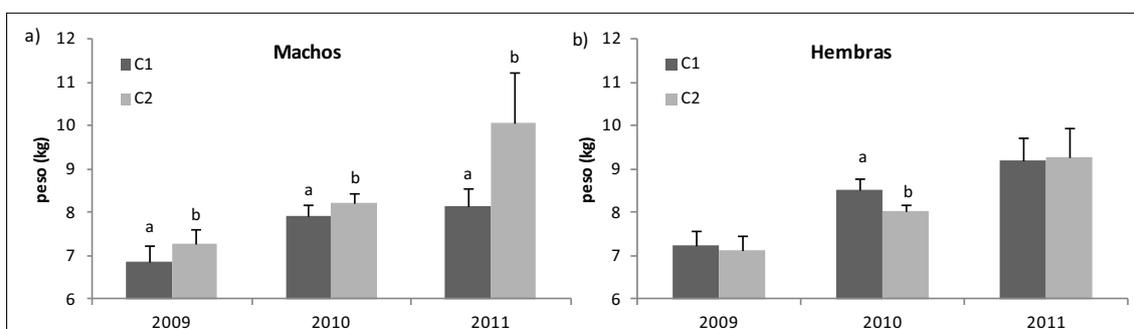
4. Resultados

4.1. Reproductores cultivados

Crecimiento

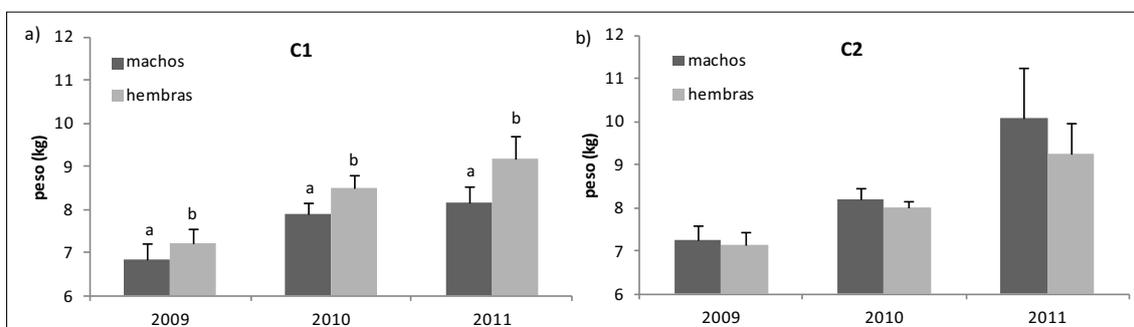
El peso y la talla de cada individuo se determinaron mensualmente con los peces previamente anestesiados con MS-222 (70 mg l⁻¹). En la figura 5 se muestra el crecimiento en peso de machos y hembras a lo largo de los tres años. Los machos del tanque C2 fueron significativamente mayores que los del tanque C1 y crecieron más a lo largo de los años de estabulación, especialmente en el año 2011. En el caso de las hembras sucede lo contrario, siempre fueron menores las del tanque C2 aunque solo se observan diferencias significativas en el año 2010 (P=0.001).

Figura 5. Crecimiento en peso (kg, media±SD) de (a) los machos y (b) las hembras en cada tanque a lo largo del periodo de experimentación (2009-2011). Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05) de crecimiento entre los tanques C1 y C2.



La figura 6 muestra el crecimiento en peso de los machos y las hembras de cada tanque y se observa, como ya se veía en la figura 5, que en el caso del tanque C1 las hembras siempre fueron más grandes que los machos y en el tanque C2 ambos sexos presentaron pesos similares y sin diferencias significativas (P>0.05).

Figura 6. Crecimiento en peso (kg, media±SD) de los machos y las hembras de los tanques (a) C1 y (b) C2 a lo largo del periodo de experimentación (2009-2011). Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05) de crecimiento entre machos y hembras.



En cuanto al crecimiento en longitud, los resultados se muestran en las figuras 7 y 8. Los resultados que se obtienen son muy parecidos a los de crecimiento en peso cuando se comparan los dos tanques, de manera que los machos del C2 son significativamente

($P < 0.05$) más largos que los del C1 en los tres años de duración del estudio, mientras que en las hembras no se encuentran diferencias significativas entre los dos tanques (Fig. 7). Dentro de un mismo tanque, y al igual que ocurría con el peso, las hembras del C1 son más largas ($P = 0.012$) que los machos sólo en el 2011 mientras que en el C2, los machos son más largos ($P < 0.05$) que las hembras a lo largo de los tres años (Fig. 8).

Figura 7. Crecimiento en talla (cm, media±SD) de los (a) machos y las (b) hembras en cada tanque a lo largo del periodo de experimentación (2009-2011). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de crecimiento entre los tanques C1 y C2.

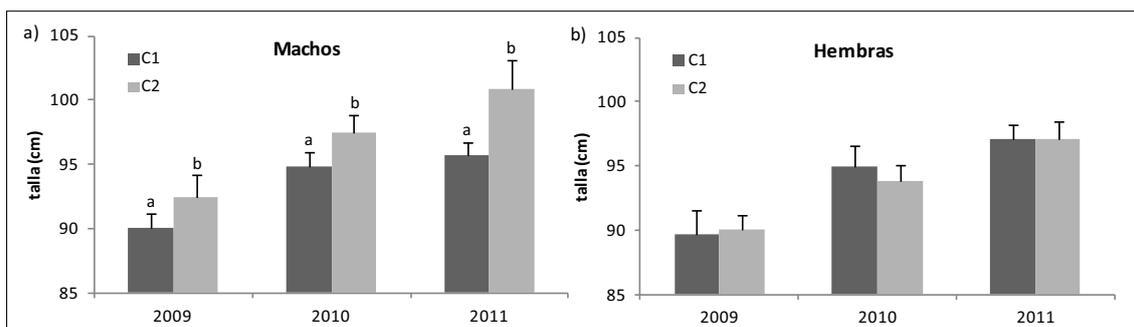
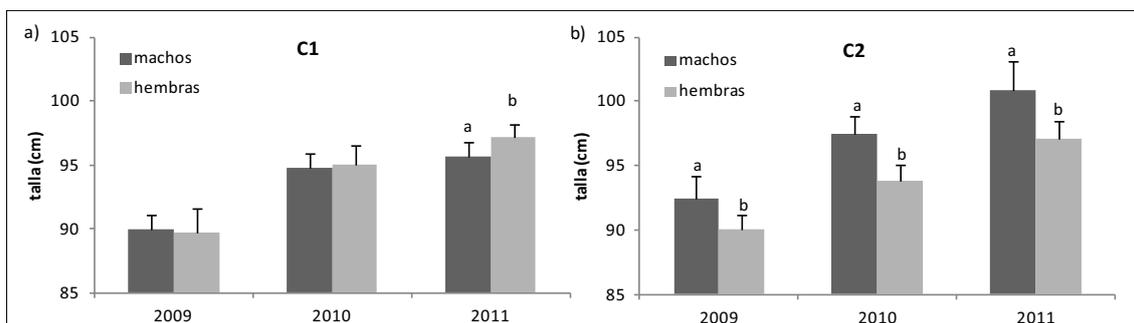
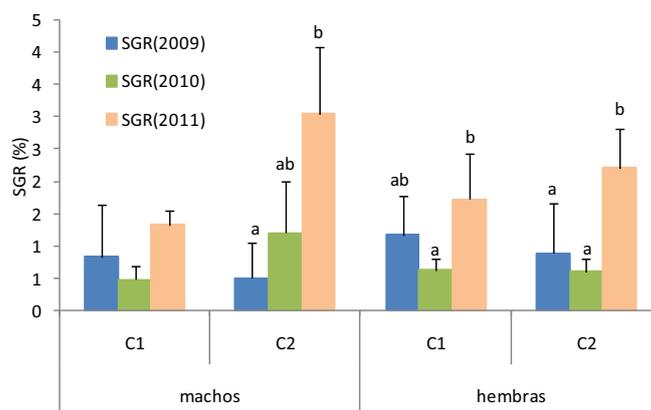


Figura 8. Crecimiento en talla (cm, media±SD) de los machos y las hembras en el tanque (a) C1 y (b) C2 a lo largo del periodo de experimentación (2009-2011). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de crecimiento entre machos y hembras.



La tasa específica de crecimiento (SGR) de 2009, 2010 y 2011 de los machos y las hembras del tanque C1 y C2 se encuentra en la figura 9. En los machos del C1 no se encuentran diferencias significativas entre los tres años aunque se observa una disminución de la SGR en 2010, mientras que la SGR de las hembras de este mismo tanque aumenta significativamente del 2010 al 2011. La SGR de los machos y las hembras del tanque C2 es significativamente mayor en el 2011. No se encuentran diferencias significativas de la tasa de crecimiento específico ni entre hembras y machos ni entre tanques de un mismo año.

Figura 9. Tasa específica de crecimiento (% , media±SD) de los machos y las hembras de los tanques C1 y C2 de 2009, 2010 y 2011. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre años.



Mortalidad

Durante el año 2009, solamente se registraron dos bajas en el tanque C2. Por otro lado, cuatro individuos (dos del tanque C1 y dos del C2) no mostraron el suficiente grado de madurez sexual como para poder extraer gametos (esperma por masaje abdominal u ovocitos por canulación) por lo que se descartaron para el estudio. En julio de 2010, después de la época de reproducción, se registraron tres bajas (un macho y dos hembras en el tanque C1), y una más (un macho) al final del año.

A lo largo de los tres años de estudio se ha podido constatar que la corvina es una especie muy sensible al estrés causado por la manipulación en los muestreos ya sea para hacer controles periódicos de peso y talla, como para la toma de muestras de sangre o las inducciones hormonales a la puesta. La reacción más habitual de los peces era cesar su alimentación durante la semana siguiente al muestreo lo que provocaba un debilitamiento generalizado de los peces que en ocasiones derivó en muerte. Además, y debido muy probablemente al estrés, varios peces mostraron inflamación ocular seguida de la pérdida del ojo y de visión y de la ingesta de alimento.

Niveles de hormonas esteroideas en sangre

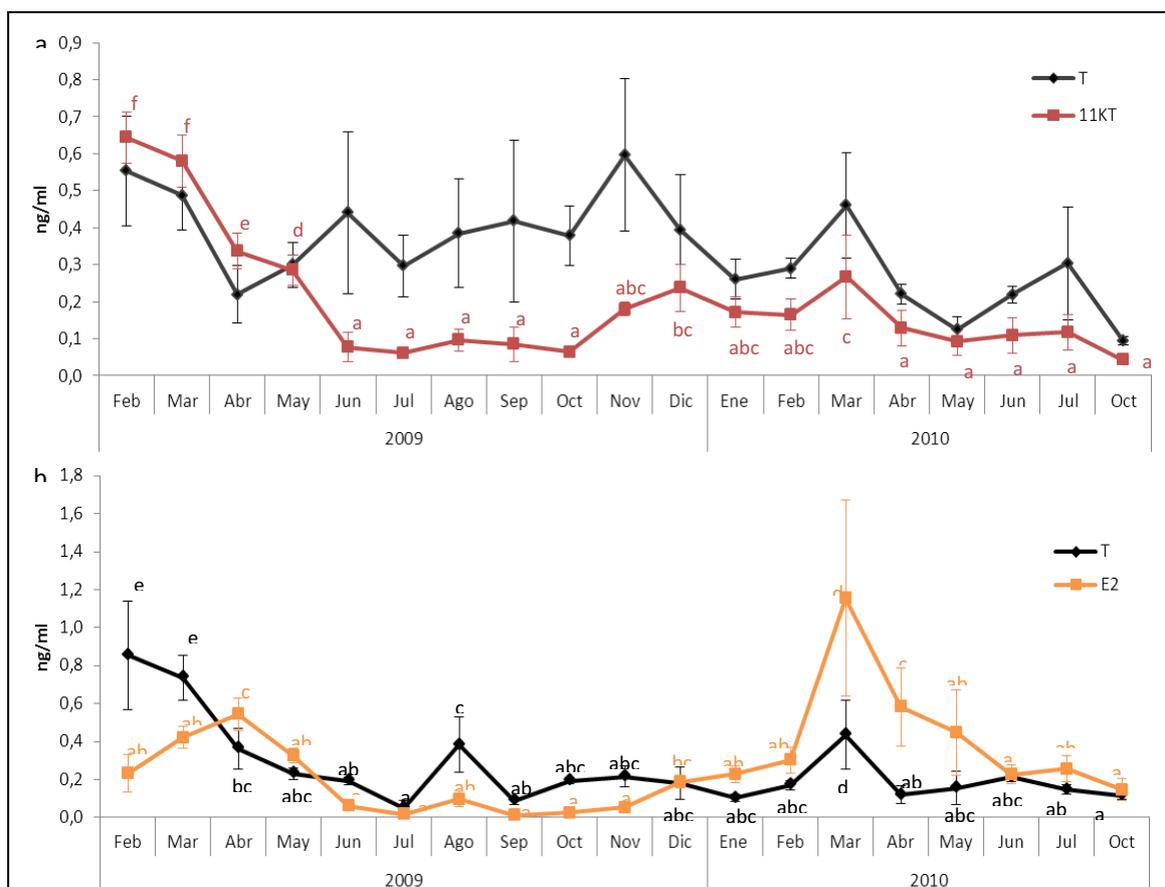
Entre los meses de febrero de 2009 a octubre de 2010, se realizaron extracciones de sangre con periodicidad mensual, coincidiendo con los controles de peso y talla de todos los peces del stock, una vez anestesiados con MS-222 (70 mg L^{-1}). Las muestras de sangre se procesaron para obtener el plasma y con él analizar los niveles de hormonas esteroideas tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos.

La figura 9a muestra los resultados obtenidos del análisis de 11-ketotestosterona (11-KT) y testosterona (T) en el plasma de los machos. Se observa una evolución a lo largo del año en el contenido plasmático de estas hormonas, de manera que los niveles máximos de 11-KT se observan en febrero y marzo de 2009 ($0.64 \pm 0.07 \text{ ng mL}^{-1}$ y $0.58 \pm 0.07 \text{ ng mL}^{-1}$ respectivamente) disminuyendo posteriormente hasta alcanzar

niveles basales en el mes de junio, volviendo a remontar de nuevo a lo largo del mes de noviembre hasta un nuevo máximo en marzo de 2010 ($0.27 \pm 0.11 \text{ ng mL}^{-1}$). En cuanto a los niveles plasmáticos de T, no se observaron diferencias significativas en los años 2009 y 2010 debido a la gran variabilidad de los resultados obtenidos.

La figura 9b muestra la evolución de los niveles plasmáticos de estradiol (E_2) y testosterona (T) en las hembras. Por lo que se refiere al E_2 , se observa un aumento de los niveles en febrero alcanzando un máximo en abril ($0.54 \pm 0.09 \text{ ng mL}^{-1}$) disminuyendo posteriormente hasta llegar a niveles basales en junio. En diciembre se observa un nuevo aumento de la concentración de E_2 en sangre hasta alcanzar un máximo en marzo del 2010 ($1.15 \pm 0.52 \text{ ng mL}^{-1}$). La concentración máxima de T en hembras se observa en febrero y marzo de 2009 ($0.86 \pm 0.29 \text{ ng mL}^{-1}$ y $0.74 \pm 0.12 \text{ ng mL}^{-1}$ respectivamente) disminuyendo después hasta su nivel mínimo en julio. En agosto se produce un aumento repentino de la concentración de T en sangre pero en septiembre vuelve a estar en su nivel basal. En marzo del 2010 se observa un máximo ($0.44 \pm 0.18 \text{ ng mL}^{-1}$) pero de menor concentración que el del año anterior.

Figura 9. Niveles (ng mL^{-1} , media \pm SEM) de (a) testosterona (T) y 11-ketotestosterona (11KT) en sangre de machos y (b) testosterona (T) y estradiol (E_2) en hembras. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los meses de la misma hormona. Machos (N=6) y hembras (N=12 en 2009; N=11 en 2010).

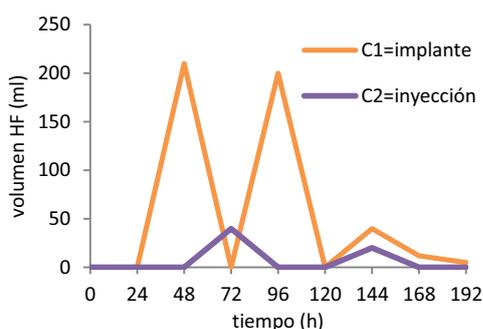


Obtención de puestas

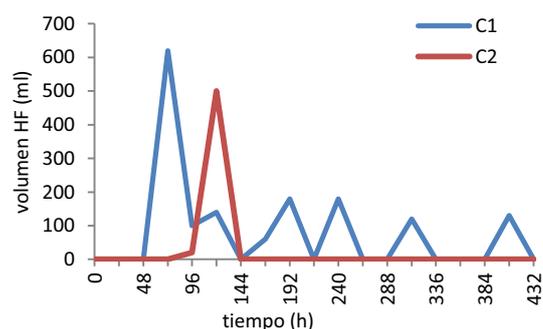
En 2009 se realizaron dos inducciones, una en abril (16.3°C, Fig. 10a) mediante un implante de GnRHa en los individuos del tanque C1 (seis hembras y tres machos) e inyección en los individuos del tanque C2 (seis hembras y tres machos) y otra en mayo (17.7°C, Fig. 10b) utilizando implantes hormonales en ambos tanques. En el mes de abril se obtuvieron cinco puestas en el tanque C1, la primera a las 48 h y la segunda a las 96 h, de 210 y 200 mL respectivamente, que se incubaron dando lugar a la eclosión de larvas viables y a otras tres puestas más en horas sucesivas que no llegaron a eclosionar. En el tanque C2 (inducción mediante inyección) se obtuvieron dos puestas de poco volumen (40 y 20 mL respectivamente), a las 72 h y 144 h, sin eclosión larvaria. En mayo se obtuvieron ocho puestas en el tanque C1 y dos en el tanque C2, tal como muestra la figura 10b. En el caso de las ocho puestas del C1 solo las dos primeras fueron viables.

Figura 10. Puestas obtenidas a partir de las inducciones realizadas en (a) abril y (b) mayo de 2009. Se indica el número de machos y hembras inducidos, el peso medio y el número de puestas así como el tiempo en horas desde la inducción. Los números rojos indican puestas sin eclosión.

a)		C1=Implante	C2=Inyección
Machos	N	3	3
	peso (kg)	6.58±0.56	7.10±1.38
Hembras	N	6	6
	peso (kg)	7.25±1.24	7.22±0.62
Puestas	1ª	48 h	72 h
	2ª	96 h	144 h
	3ª	144 h	
	4ª	168 h	
	5ª	192 h	



b)		C1=implante	C2=implante
Machos	N	3	3
	peso (kg)	6,72±0,62	7,23±1,47
Hembras	N	6	6
	peso (kg)	7,37±1,33	7,35±0,90
Puestas	1ª	72 h	96 h
	2ª	96 h	120 h
	3ª	120 h	
	4ª	168 h	
	5ª	192 h	
	6ª	240 h	
	7ª	312 h	
	8ª	408 h	



En 2010 (tabla 1), se realizaron tres inducciones mediante inyección de GnRHa en el tanque C1, en abril (16°C), mayo (17.5°C) y junio (17.9°C), pero los peces sólo respondieron a la inducción realizada en mayo con dos puestas a las 48 y 72 h siendo la primera de mayor volumen (700 mL). Observando los histogramas de frecuencias del tamaño de los ovocitos extraídos de las hembras (Anexo 1) se detecta claramente que

tres hembras en abril (nº 8, 9 y 11) y dos en junio (nº 7 y 9) presentaban una distribución bimodal de ovocitos mientras que en mayo, todas las hembras (seis en total) presentaban una distribución bimodal. En el tanque C2 se realizaron dos inducciones mediante inyección de GnRHa, en mayo y junio, pero no se obtuvo ninguna puesta ya que sólo una de las hembras (nº 16) mostró una distribución bimodal del tamaño ovocitario en el mes de mayo (Anexo 1).

En 2011, se realizaron cuatro inducciones, en junio (17.9°C), julio (17.8°C), agosto (18.5°C) y septiembre (18.3°C), mediante inyección de GnRHa en los peces maduros del tanque C1 pero sólo se obtuvo una puesta sin eclosión en los meses de julio, agosto y septiembre (Tabla 1).

Tabla 1. Puestas obtenidas en el tanque C1 tras las inducciones realizadas en (a) mayo de 2010 y (b) en julio, (c) agosto y (d) septiembre de 2011. Los números rojos indican puestas sin eclosión larvaria.

a) 2010		C1=Inyección	b) 2011		C1=Inyección
Machos	N	3	Machos	N	1
	peso (kg)	8.11±1.14		peso (kg)	8.96
Hembras	N	6	Hembras	N	2
	peso (kg)	8.81±1.59		peso (kg)	10.8±1.6
Puestas	1 ^a	48 h	Puestas	1 ^a	48 h
	2 ^a	72 h			

c) 2011		C1=Inyección	d) 2011		C1=Inyección
Machos	N	2	Machos	N	1
	peso (kg)	8.60±0.93		peso (kg)	9.63
Hembras	N	2	Hembras	N	1
	peso (kg)	10.6±1.3		peso (kg)	10.28
Puestas	1 ^a	48 h	Puestas	1 ^a	48 h

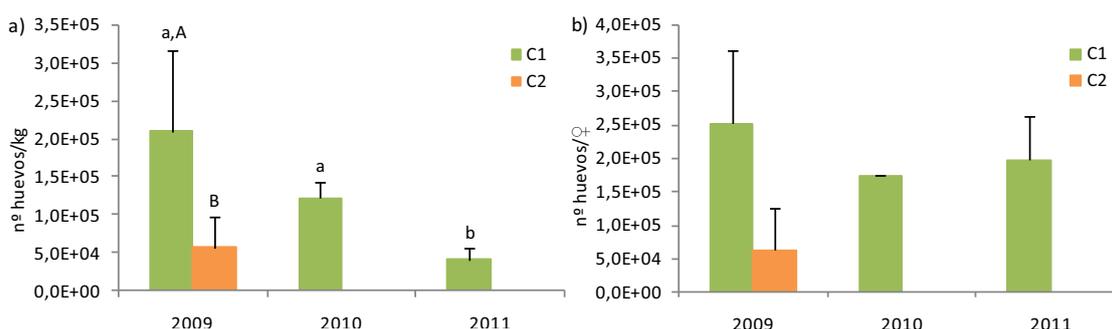
Fecundidad

La figura 11a muestra los resultados de fecundidad (nº de huevos kg⁻¹ de hembra) de los reproductores cultivados. No se observan diferencias significativas (P>0.05) entre los valores obtenidos en 2009 y 2010 pero el valor sí resulta significativamente menor (P=0.001) en 2011. En el tanque C1 se obtuvo una mayor cantidad de huevos en 2009 mientras que en los años 2010 y 2011 la fecundidad de los individuos del tanque C2 fue nula, al no obtenerse ninguna puesta. En lo que se refiere al número total de huevos obtenidos en el tanque C1, se observa una clara disminución del total de huevos por kg de hembra – de 2.5x10⁶ en 2009 a 1x10⁶ en 2010 y 1.1x10⁶ en 2011- a pesar de que el peso de las hembras aumentó desde 7.2±1.3 kg en el año 2009, a 8.8±1.6 kg en 2010 y 10.6±1.2 kg en 2011. En el tanque C2 solo se recogieron un total de 700000 huevos en el año 2009 con un peso medio de las hembras de 7.3±0.8 kg.

La figura 11b muestra los resultados de fecundidad en cuanto a número de huevos hembra⁻¹. No se observan diferencias significativas ni entre los distintos años ni entre

los tanques C1 y C2 en 2009 (año en el que se obtuvieron puestas en el tanque C2). El número de hembras utilizadas en las distintas inducciones hormonales no cambió de forma significativa entre los distintos años, así en 2009 se utilizaron un total de nueve hembras en el tanque C1, mientras que tanto en 2010 como en 2011 se utilizaron seis hembras. De la misma manera, en el tanque C2 se indujeron diez hembras en el año 2009.

Figura 11. Fecundidad de la corvina en (a) nº huevos/kg (media±SD) y (b) nº huevos/hembra (media±SD) en los tres años de estudio. Diferentes letras minúsculas (a,b) indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre años mientras que las letras mayúsculas (A,B) indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre tanques.



Calidad de las puestas

En el Anexo 2 y en la tabla 2 se presentan los parámetros de calidad de las puestas de reproductores cultivados considerados en este estudio. Así, en el año 2009 el volumen total de huevos flotantes (HF) obtenido en abril (467 mL en C1 y 60 mL en C2) fue mucho menor al obtenido en mayo tanto en el tanque C1 (1530 mL) como en el C2 (520 mL). En el año 2010 el volumen de HF obtenido en el mes de mayo (960 mL) fue similar al obtenido en 2009, mientras que en el año 2011 las puestas fueron de muy poco volumen (300 ± 156 mL). Las tasas de fecundación fueron significativamente mayores en las puestas de mayo del 2009 ($83.4\pm 13.2\%$ en el tanque C1 y $87.0\pm 14.1\%$ en el C2). El diámetro de los huevos del tanque C1 de las puestas de abril y mayo del 2009 (1011.0 ± 14.0 y 977.7 ± 23.8 μm , respectivamente) fue significativamente mayor ($P=0.045$) que el de los huevos de las puestas de 2011 (948.3 ± 7.9 μm). No existen diferencias significativas en el peso seco de los huevos entre las puestas de los tres años. La tasa de eclosión de los huevos del tanque C2 de mayo de 2009 ($86.7\pm 17.4\%$) fue significativamente mayor que la de las puestas del tanque C1 de mayo de 2009 y 2010 ($32.5\pm 34.9\%$ y $16.0\pm 11.5\%$ respectivamente). Sin embargo, los huevos de las puestas del tanque C2 de abril de 2009 y del C1 de 2011 no eclosionaron. La supervivencia larvaria a día 3 no presentó diferencias significativas ni entre los años 2009 y 2010 ni entre los tanques de origen. Sin embargo la supervivencia de las larvas a día 5 fue significativamente mayor en las puestas de abril de 2009 y de mayo de 2010 ($72.0\pm 5.4\%$ y $68.6\pm 18.7\%$ respectivamente) del tanque C1 frente a las obtenidas en el tanque C2. Las larvas que sobrevivieron más días en ayuno fueron las obtenidas a partir de las puestas de abril de 2009 del tanque C1 (11 ± 0.7 días).

Tabla 2. Valores medios (media±SD) de los parámetros de calidad (volumen de huevos flotantes, volumen de huevos no flotantes, tasa de fecundación, diámetro, peso seco, tasa de eclosión, supervivencia larvaria a día 3, supervivencia larvaria a día 5 y último día de vida de la larva en ayuno) de las puestas obtenidas en los tres años de estudio. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.05) entre puestas.

	2009				2010	2011		
	abril		mayo		mayo	julio	agosto	sept
	C1	C2	C1	C2	C1	C1		
HUEVOS								
volumen HF (mL)	467	60	1530	520	960	200	480	220
volumen HNF (mL)	465	555	1040	340	340	110	20	0
fecundación (%)	81.7±21.4 ^{ab}	0 ^a	83.4±13.2 ^b	87.0±14.1 ^b	61±41 ^{ab}	6.7±8.3 ^a		
diámetro (µm)	1011.0±14.0 ^a	977±3.0 ^{ab}	977.7±23.8 ^a	969.5±18.6 ^{ab}	984.9±60.9 ^{ab}	948.3±7.9 ^b		
peso seco (µg)	54.2±4.6	50.1±6.2	54.9±4.2	50.9±5.6	54.5±10.4	47.5±1.9		
eclosión (%)	35.4±2.2 ^{ab}	0	32.5±34.9 ^a	86.7±17.4 ^b	16.0±11.5 ^a	0	0	0
LARVAS								
superv día 3 (%)	74.4±5.3	0	49.6±26.2	61.0±14.7	70.8±15.6	0	0	0
superv día 5 (%)	72.0±5.4 ^a	0	43.0±28.1 ^{ab}	7.7±3.0 ^b	68.6±18.7 ^a	0	0	0
último día vida	11.0±0.7 ^a	0	6.1±1.1 ^b	6.0±0.0 ^{bc}	8.3±1.1 ^c	0	0	0

Para establecer los parámetros que mejor indican la calidad de las puestas se ha empleado el índice de correlación de Pearson (P<0.05) (Samacee et al. 2009) calculándose además la regresión lineal entre los diferentes parámetros de las puestas en las que la inducción se realizó mediante implante, es decir, las puestas del tanque C1 de abril y mayo del 2009 y las del tanque C2 de mayo de 2009. Los parámetros mejor relacionados, y para los que se obtuvo una correlación de Pearson significativa, se encuentran detallados en la tabla 3. Así, existe una correlación positiva entre el volumen de huevos flotantes y la tasa de fecundación, entre el diámetro del huevo y el peso seco y entre el diámetro del huevo y la supervivencia larvaria a día 5. Por otro lado, la tasa de eclosión muestra una correlación positiva con la supervivencia de las larvas a día 3 y el tiempo de duración de las larvas en ayuno. La supervivencia larvaria, tanto a día 3 como a día 5, se relacionan positivamente entre ellas así como con el último día de supervivencia larvaria en ayuno.

Tabla 3. Coeficiente de correlación de Pearson (P<0.05) y regresión lineal entre los distintos parámetros de calidad de las puestas de los tanques C1 (abril y mayo del 2009) y C2 (mayo de 2009).

Parámetros	Valor de P	Coef. Correl	R ²	Recta de Regresión lineal
vol HF - fecund	p=0.044	coef=0.527	R ² =0.277	vol HF = -39.498 + (2.861*fertiliz)
fecund - último día	p=0.038	coef=0.539	R ² =0.291	fertiliz = 51.462 + (4.464*último día)
diámetro - peso	p=0.016	coef=0.627	R ² =0.393	diámetro = 809.986 + (2.472*peso)
diámetro - sup día 5	p=0.035	coef=0.546	R ² =0.298	diámetro = 987.177+(0.402* sup día 5)
eclosión - sup día 3	p=0.003	coef=0.704	R ² =0.495	eclosión = 0.941 + (0.749* sup día 3)
eclosión - último día	p=0.034	coef=0.548	R ² =0.300	eclosión = 5.910 + (4.975*último día)
sup día 3 – sup día 5	p=0.000	coef=0.823	R ² =0.678	sup día 3 = 13.818+(0.865* sup día 5)
sup día 3 – último día	p=0.000	coef=0.877	R ² =0.770	sup día 3 = 2.682+(7.487*último día)
sup día 5 – último día	p=0.000	coef=0.815	R ² =0.665	sup día 5=-3.318+(6.622* último día)

Composición en lípidos, clases de lípidos y perfil de ácidos grasos de los huevos y larvas de corvina obtenidos a partir de reproductores cultivados

La tabla 4 muestra los resultados en cuanto a composición de ácidos grasos y lípidos totales de los huevos. En las puestas obtenidas en los tanques C1 y C2 en 2009 sólo se observan diferencias significativas ($P=0.022$) en el contenido de 22:5n-3 (ácido docosapentanoico, DPA). Sin embargo, comparando los resultados del perfil de ácidos grasos de las puestas de 2009 y 2010 se observan diferencias significativas en el total de ácidos grasos saturados i monoinsaturados (mayor en 2010 que en 2009), y en el total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)(mayor en 2009). A fin de estimar la relación entre la composición en ácidos grasos y la calidad de las puestas se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (tabla 5). Así, el contenido en n-6 PUFA está directamente relacionado con el tiempo de supervivencia de las larvas en ayuno, mientras que los n-3 PUFA están relacionados con la supervivencia larvaria tanto a día 3, como a día 5 después de la eclosión y también con el tiempo de supervivencia de la larva en ayuno.

Tabla 4. Lípidos totales (mg g^{-1} peso seco, media \pm SD), ácidos grasos totales (mg g^{-1} lípidos, media \pm SD) y perfil de ácidos grasos (% , media \pm SD) de los huevos obtenidos en los tanques C1 (N=12) y C2 (N=4) en el año 2009 (N=16) y en el tanque C1 en 2010 (N=2). Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos en mayúscula indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tanques C1 y C2, y en minúscula indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre 2009 y 2010.

Ácidos grasos (% total)	C1 2009	C2 2009	2009	2010
Total lípidos (mg g^{-1} peso seco)	185.3 \pm 29.2	171.6 \pm 33.2	181.9 \pm 29.7	160.9 \pm 9.3
Total ác. grasos (mg g^{-1} lípidos)	591.7 \pm 16.7	582.6 \pm 17.9	589.4 \pm 16.9	545.1 \pm 92.8
16:0	18.96 \pm 0.65	19.81 \pm 1.19	19.17 \pm 0.86 ^a	21.63 \pm 2.38 ^b
18:0	4.42 \pm 0.29	4.44 \pm 0.29	4.43 \pm 0.28 ^a	3.92 \pm 0.61 ^b
Σ saturados	27.01 \pm 0.84	27.62 \pm 1.31	27.17 \pm 0.97 ^a	30.01 \pm 3.57 ^b
16:1n-7	9.31 \pm 0.39	9.07 \pm 0.52	9.25 \pm 0.42 ^a	11.50 \pm 0.75 ^b
18:1n-9	14.62 \pm 0.92	14.00 \pm 0.48	14.47 \pm 0.86	14.78 \pm 1.00
Σ monoinsaturados	28.38 \pm 0.85	27.37 \pm 0.78	28.13 \pm 0.93 ^a	31.08 \pm 2.23 ^b
18:2n-6	11.75 \pm 0.61	11.45 \pm 0.47	11.67 \pm 0.58 ^a	8.17 \pm 0.29 ^b
20:4n-6	0.98 \pm 0.07	1.04 \pm 0.09	0.99 \pm 0.08	0.95 \pm 0.13
Σ n-6 PUFA	13.48 \pm 0.58	13.27 \pm 0.37	13.43 \pm 0.54 ^a	9.90 \pm 0.46 ^b
20:5n-3	8.69 \pm 0.78	9.06 \pm 1.00	8.78 \pm 0.82	7.96 \pm 1.35
22:5n-3	2.25 \pm 0.07 ^A	2.41 \pm 0.18 ^B	2.29 \pm 0.12 ^a	1.85 \pm 0.24 ^b
22:6n-3	16.50 \pm 0.80	16.84 \pm 0.42	16.58 \pm 0.72	15.57 \pm 3.63
Σ n-3 PUFA	29.96 \pm 1.11	30.67 \pm 1.47	30.14 \pm 1.20	27.76 \pm 5.34
Σ PUFA	44.61 \pm 0.89	45.01 \pm 1.31	44.71 \pm 0.98 ^a	38.90 \pm 5.79 ^b
eclosión (%)			43.9 \pm 34.9	16.0 \pm 11.5
superv. larvas día 3 (%)			56.8 \pm 22.7	70.8 \pm 15.6
superv. larvas día 5 (%)			41.7 \pm 30.1	68.6 \pm 18.7
último día vida larva			7.1 \pm 2.3	8.3 \pm 1.1

Tabla 5. Índice de correlación de Pearson ($P < 0.05$) y rectas de regresión lineal entre los ácidos grasos (saturados, monoinsaturados, n-6 PUFA y n-3 PUFA) y los parámetros de calidad de la puesta (tasa de eclosión, supervivencia de las larvas a día 3, supervivencia a día 5 y último día de vida larvaria en ayuno).

Parámetros	Valor de P	Coef. Correl.		Recta de Regresión lineal
n-6 PUFA - último día	p=0.021	coef=-0.786	$R^2=0.618$	n-6 PUFA = 14.930+(0.202*último día)
n-3 PUFA - sup día 3	p=0.013	coef=0.817	$R^2=0.667$	n-3 PUFA = 27.784+(0.038*sup día 3)
n-3 PUFA - sup día 5	p=0.015	coef=0.809	$R^2=0.654$	n-3 PUFA = 28.174+(0.034*sup día 5)
n-3 PUFA - último día	p=0.007	coef=0.857	$R^2=0.734$	n-3 PUFA = 26.966+(0.400*último día)

La composición de lípidos y ácidos grasos de las larvas de 1 día se muestra en la tabla 6, aunque sin mostrar diferencias estadísticas, ya que en el año 2010 sólo fue posible analizar una puesta.

Tabla 6. Lípidos totales (mg g^{-1} peso seco, media \pm SD), ácidos grasos totales (mg g^{-1} lípidos, media \pm SD) y composición en ácidos grasos (% , media \pm SD) de las larvas obtenidas a partir de las puestas de 2009 (N=2) y 2010 (N=1). Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran.

Ácidos grasos (% total)	2009	2010
Total lípidos (mg g^{-1} peso seco)	65.3 \pm 11.6	115.6
Total ác. grasos (mg g^{-1} lípidos)	561.3 \pm 3.5	543.2
16:0	19.17 \pm 0.26	19.84
18:0	5.27 \pm 0.11	4.56
Σ saturados	28.14 \pm 0.39	28.46
16:1n-7	8.59 \pm 0.35	10.03
18:1n-9	13.61 \pm 0.73	13.09
Σ monoinsaturados	27.12 \pm 1.30	27.84
18:2n-6	10.20 \pm 0.09	7.67
20:4n-6	1.38 \pm 0.11	1.48
Σ n-6 PUFA	12.43 \pm 0.20	10.01
20:5n-3	9.15 \pm 0.28	8.72
22:5n-3	2.23 \pm 0.13	2.15
22:6n-3	17.80 \pm 1.11	19.47
Σ n-3 PUFA	31.32 \pm 1.49	32.51
Σ PUFA	44.74 \pm 1.69	43.69

Las clases de lípidos se muestran en la tabla 7. Se detectaron diferencias significativas entre la composición en clases de lípidos de los huevos del tanque C1 y C2 del 2009 dado que los niveles de esfingomielina (SM) y fosfatidilserina/fosfatidilinositol (PS/PI) fueron mayores en los huevos obtenidos en el tanque C1 y la fosfatidiletanolamina (PE) mayor en los del C2 (tabla 7a). No se pudo determinar si existen diferencias significativas entre los dos años 2009 y 2010 dado que en este último año 2010 sólo se pudo analizar una puesta, aunque se observa que el contenido en lípidos polares fue mayor en 2010 y el de lípidos neutros menor en 2009. Las clases de lípidos de las larvas de 1 día se presentan en la tabla 7b. Tampoco en este caso se pudieron realizar comparaciones dado que en 2010 solo se contó con el análisis de una puesta. Los resultados muestran la misma tendencia observada en los huevos por lo que en las larvas recién eclosionadas la cantidad de lípidos polares fue mayor en 2010.

Tabla 7. Clases de lípidos (% , media±SD) de (a) los huevos y (b) las larvas de 1 día de las puestas de 2009 (N=16 para huevos y N=2 para larvas) y de 2010 (N=1). Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.05) entre los tanques C1 y C2 de 2009. LPC: lisofosfatidilcolina, SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina, PS/PI: fosfatidilserina/fosfatidilinositol, PA/CL: ácido fosfatídico/cardiolipina, PE: fosfatidiletanolamina, CHOL: colesterol, FFA: ácidos grasos libres, TAG: triglicéridos, SE+W: ésteres de esterol y ceras.

a)	C1 2009	C2 2009	2009	2010
LPC	1.46 ± 0.57	1.89 ± 0.98	1.57 ± 0.69	0.91
SM	0.92 ± 0.16 ^a	1.27 ± 0.35 ^b	1.01 ± 0.26	1.69
PC	13.55 ± 0.87	13.46 ± 1.17	13.53 ± 0.91	18.88
PS/PI	1.10 ± 0.35 ^a	1.59 ± 0.17 ^b	1.22 ± 0.38	1.71
PA/CL	0.48 ± 0.69	0.34 ± 0.69	0.45 ± 0.67	0.88
PE	4.97 ± 0.67 ^a	4.21 ± 0.22 ^b	4.78 ± 0.68	8.68
Total lípidos polares	22.49 ± 1.01	22.78 ± 1.19	22.56 ± 1.02	32.76
CHOL	9.70 ± 0.53	10.09 ± 0.46	9.80 ± 0.53	9.26
FFA	4.54 ± 1.73	6.43 ± 2.28	5.01 ± 1.98	0.96
TAG	27.55 ± 1.50	26.35 ± 1.35	27.25 ± 1.52	27.48
SE+W	33.00 ± 2.14	32.90 ± 0.61	32.97 ± 1.86	29.27
Total lípidos neutros	74.79 ± 1.41	75.77 ± 1.18	75.03 ± 1.39	66.97
eclosión (%)	33.2 ± 29.5	86.7 ± 17.4	43.9 ± 34.9	24.1
superv. día 3 (%)	55.8 ± 25.0	61.0 ± 14.7	56.8 ± 22.7	59.8
superv. día 5 (%)	50.2 ± 27.4	7.7 ± 3.0	41.7 ± 30.1	55.4
último día vida	7.3 ± 2.5	6.0 ± 0.0	7.1 ± 2.3	7.5

b)	2009	2010
LPC	2.28 ± 0.21	1.04
SM	0.94 ± 0.05	1.21
PC	6.71 ± 1.35	12.95
PS/PI	2.18 ± 0.01	3.70
PA/CL	1.16 ± 0.20	0.00
PE	3.14 ± 0.18	6.07
Total lípidos polares	16.41 ± 1.16	24.97
CHOL	11.59 ± 0.42	11.90
FFA	20.15 ± 2.30	8.09
TAG	18.30 ± 1.41	21.48
SE+W	28.41 ± 1.14	29.59
Total lípidos neutros	78.45 ± 0.18	71.06
eclosión (%)	35.4 ± 2.2	7.8
superv. día 3 (%)	74.4 ± 5.3	81.8
superv. día 5 (%)	72.0 ± 5.4	81.8
último día vida	11.0 ± 0.7	9.0

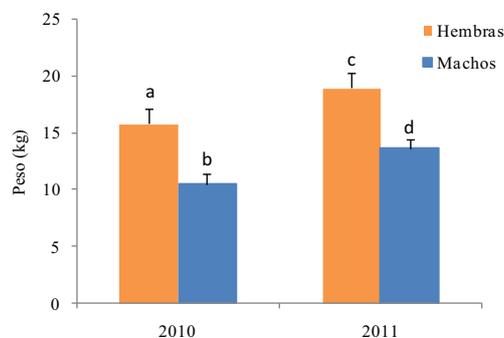
4.2. Reproductores salvajes

Crecimiento

En la época de puesta natural de la especie (abril-junio de 2010 y marzo-mayo 2011) se procedió a examinar el estado de maduración de todos los individuos, registrando también el incremento en peso. Solo se pesaron los individuos suficientemente maduros y preparados para la inducción hormonal, previamente anestesiados con MS-222 (70 mg L⁻¹). En ambos sexos el peso aumentó de forma significativa (P<0.05) entre los años 2010 y 2011(Fig. 12), así los machos crecieron de 10.5±0.9 kg en 2010 a 13.7±0.8 kg en 2011 y las hembras de 15.8±1.3 kg en 2010 a 19.0±1.4 kg en 2011, siendo el

incremento en peso observado en las hembras significativamente mayor que el de los machos.

Figura 12. Peso medio (kg, media±SD) de machos y hembras salvajes en los años 2010 y 2011. Letras distintas indican diferencias significativas (t-student, $P < 0.05$) de crecimiento entre años y entre machos y hembras del mismo año.



Obtención de puestas

A finales del mes de abril del 2010 y marzo del 2011 se evaluó el estado de maduración gonadal mediante masaje abdominal en machos y biopsia ovárica en hembras. Semanalmente, los machos fluyentes ($N = 2, 3$ o 4) con buena calidad de esperma y las hembras ($N = 1$ o 2) con ovocitos con diámetro mayor a 0.5 mm se pesaban y a continuación se administraba una inyección intramuscular de GnRH α (véase apartado de materiales y métodos). Cada hembra seleccionada era inducida por segunda vez al cabo de 30 días, realizándose un seguimiento semanal del diámetro ovocitario.

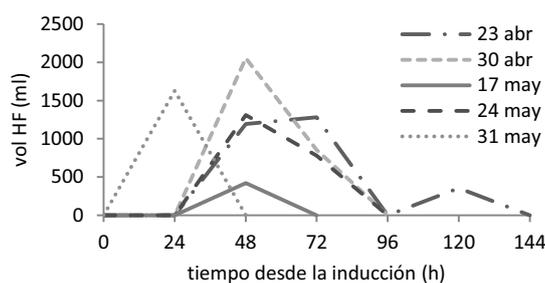
El 23 de abril de 2010 se indujeron hormonalmente tres machos fluyentes y una hembra (nº 15). Como resultado de esta primera inducción se obtuvieron tres puestas (Fig. 13a) a las 48, 72 y 120 h. El histograma de frecuencias del tamaño de los ovocitos de la hembra nº 15 (Fig. 14a) muestra la distribución bimodal esperada para realizar la puesta. De igual manera, la hembra utilizada (nº 19) la semana siguiente mostraba también una distribución bimodal (Fig. 14b) obteniéndose dos puestas a las 48 y 72 h después de la inducción. En la tercera semana de inducción (7 de mayo) no se obtuvo ninguna puesta (Fig. 13a) debido a que la hembra seleccionada (nº 16) carecía de suficientes ovocitos mayores de 0.5 mm siendo la distribución de frecuencias unimodal (Fig. 14c). Todas las puestas del 2010 se obtuvieron 48 h después de la inducción hormonal excepto la del 31 de mayo que ocurrió a las 24 h debido probablemente al aumento de la temperatura del agua (20°C). La última inducción se realizó el 7 de junio y, aunque se detectaron ovocitos mayores de 0.5 mm y una distribución de frecuencias bimodal en la hembra inducida (anexo 3, nº 16), la inducción no fue exitosa. De las cuatro hembras que se indujeron en el año 2010, sólo tres (nº 2, 15 y 19) realizaron puestas tras cada inducción. En el anexo 3 se puede observar que sólo en esas hembras la distribución de frecuencias del diámetro ovocitario era bimodal en el momento de la inducción, mientras que la otra (nº 16) era unimodal. La hembra nº 15 presentó una distribución de frecuencias del tamaño de los ovocitos bimodal al cabo de cuatro semanas después de la inducción, mientras que la hembra nº 19 presentó una

distribución bimodal a partir de la segunda hasta la quinta semana después de la primera inducción. La hembra n° 2 no presentó ninguna distribución bimodal de la frecuencia del tamaño de los ovocitos después de la inducción (Anexo 3).

En el año 2011, el primer muestreo se realizó el 28 de marzo, cuando tres machos y una hembra (n° 12) con ovocitos mayores a 0.5 mm y una distribución de frecuencias bimodal (Fig. 15a) presentaron las características adecuadas para la inducción con GnRH α . De nuevo se obtuvieron tres puestas a las 72, 96 y 168 h pero ni en la primera ni en la última los huevos no llegaron a eclosionar (Fig. 13b). A lo largo de 2011 se realizaron siete inducciones (Fig. 13b) y en sólo dos de ellas, 26 de abril y 9 de mayo, no se obtuvieron puestas. En el primer caso, 26 de abril, la hembra inducida (n° 16) aunque presentaba ovocitos mayores de 0.5 mm y una distribución de frecuencias bimodal (Fig. 15b), la inducción no fue exitosa y no dio lugar a ninguna puesta. Esta hembra (n° 16) también fue sometida a inducción hormonal dos veces en el año 2010 sin ningún éxito. El 9 de mayo, la hembra inducida (n° 1) presentaba ovocitos mayores a 0.5 mm, pero la distribución de frecuencias no era bimodal (Fig. 15c). Si se observan todos los histogramas de la hembra n° 2 (ver anexo 3), la distribución de frecuencias cuando se hizo la primera inducción (18 de abril) era bimodal, así como en las dos semanas siguientes (26 de abril y 4 de mayo) pero no al cabo de cuatro semanas, cuando se hizo la segunda inducción (9 de mayo). La hembra n° 12 tuvo un comportamiento semejante presentando una distribución bimodal en la primera inducción (28 de marzo) y durante las siguientes tres semanas (11, 18 y 26 de abril) pero no cuando se realizó la segunda inducción (2 de mayo) a la cuarta semana. Algo similar ocurre con la hembra n° 15. Mientras que la hembra n° 18 presentó una distribución bimodal en la primera inducción (11 de abril) y al cabo de dos semanas (26 de abril).

Figura 13. Puestas obtenidas a partir de las inducciones hormonales realizadas en a) 2010 y b) 2011. Se indica la fecha de la inducción, el número de machos y hembras inducidos y entre paréntesis el código numérico de la hembra, la temperatura (°C) y el número de puestas obtenidas así como el tiempo en horas desde la inducción. En números rojos se indican las puestas en las que no hubo eclosión.

a)	23/4	30/4	7/5	17/5	24/5	31/5	7/6
♂	3	3	4	4	4	3	2
♀	1(15)	1(19)	1(16)	1(2)	1(15)	1(19)	1(16)
T(°C)	16.8	17.6	15.9	16.7	19.3	20	22.6
1ª puesta	48h	48h		48h	48h	24h	
2ª puesta	72h	72h			72h		
3ª puesta	120h						



b)	28/3	11/4	18/4	26/4	2/5	9/5	16/5
♂	3	3	2	3	3	3	3
♀	1(12)	1(18)	1(2)	1(16)	2(12,18)	1(1)	2(2,15)
T(°C)	16.4	15.3	16.5	16.3	17.7	17.5	20.4
1ª puesta	72h	48h	72h		48h		48h
2ª puesta	96h	96h			72h		72h
3ª puesta	168h						

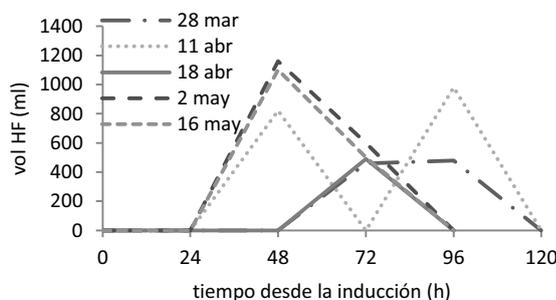


Figura 14. Histograma de frecuencias del diámetro ovocitario (N=150) de las hembras (a) n° 15, (b) n° 19 y (c) n° 16 en 2010.

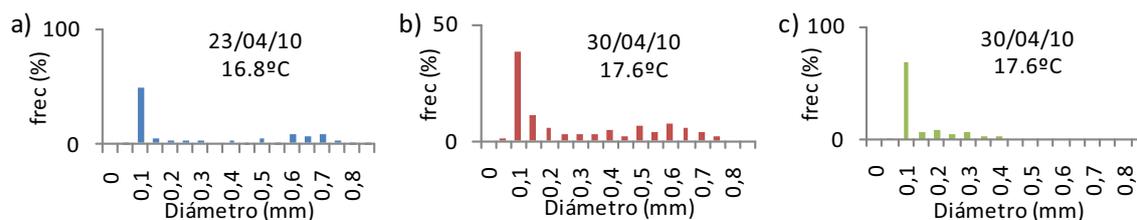
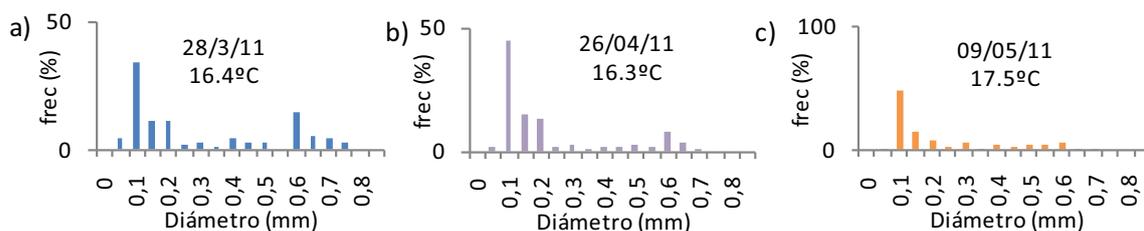


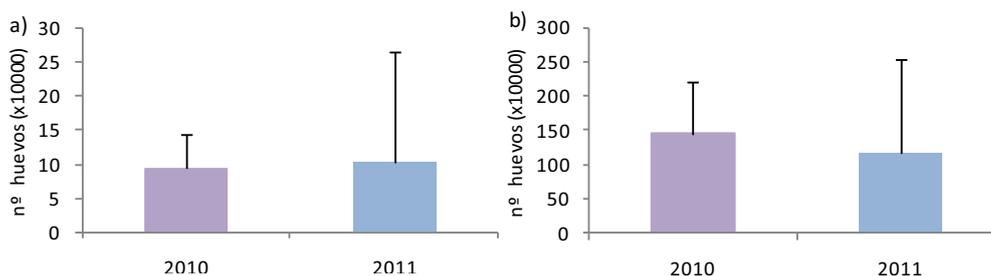
Figura 15. Histograma de frecuencias del diámetro ovocitario (N= 150) de las hembras (a) nº 12, (b) nº 16 y (c) nº 1 en 2011.



Fecundidad

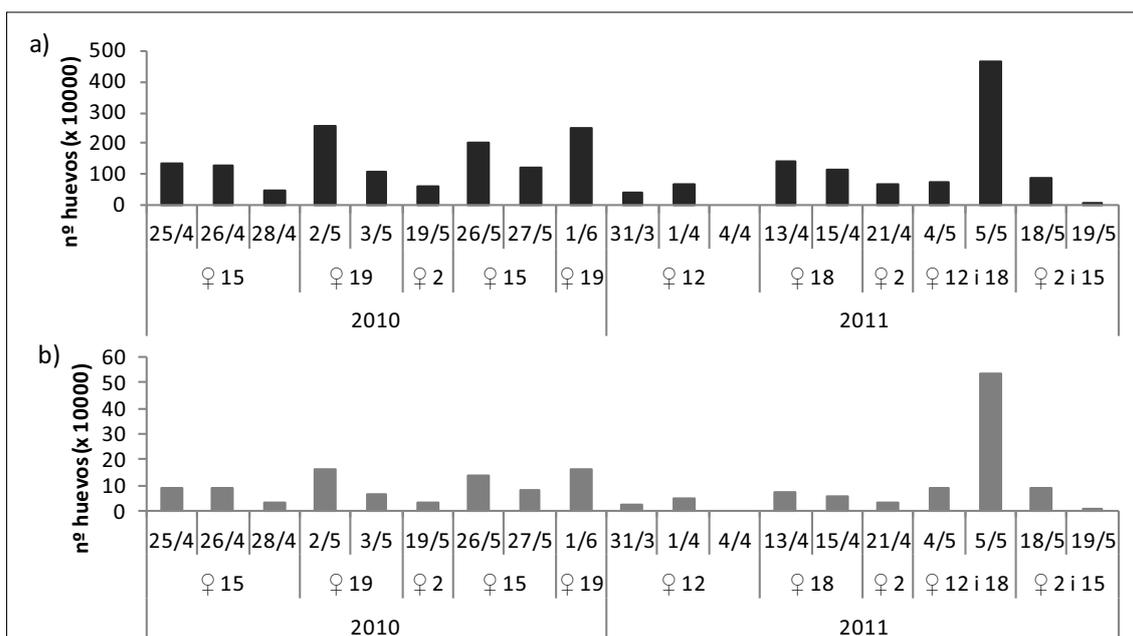
En el año 2010 la fecundidad relativa de la corvina fue de $1.5 \pm 0.8 \times 10^6$ huevos hembra⁻¹ (media±SD) mientras que en 2011 fue de $1.2 \pm 1.4 \times 10^6$ huevos hembra⁻¹ (Fig. 16a) sin observarse diferencias significativas (P=0.61) entre los dos años en parte debido a la gran variabilidad de los datos de 2011. Si expresamos la fecundidad en número de huevos kg⁻¹ de hembra (Fig. 16b) tampoco se observan diferencias significativas (P=0.87) entre 2010 y 2011 siendo de $9.5 \pm 4.9 \times 10^4$ y $10.5 \pm 16.3 \times 10^4$ huevos kg⁻¹ (media±SD) respectivamente.

Figura 16. Fecundidad de la corvina en a) nº huevos hembra⁻¹ (media±SD) y b) nº huevos kg⁻¹ (media±SD) en 2010 y 2011.



La figura 17 muestra el número de huevos obtenidos en cada puesta consecutiva. En todos los casos el número de huevos en la primera puesta (expresado tanto por hembra como por kg) fue siempre mayor, exceptuando las puestas de la hembra nº 12 (31 de marzo y 1 de abril de 2001) y las de las hembras nº 12 y 18 (4 y 5 de mayo de 2011) en las que el número de huevos obtenido fue mayor en la segunda puesta.

Figura 17. Número de huevos obtenidos en puestas consecutivas en 2010 y 2011, a) n° huevos hembra⁻¹ y b) n° huevos kg⁻¹.



Calidad de las puestas

Todos los parámetros recopilados en los años 2010 y 2011 y considerados como una medida de calidad de las puestas se encuentran detallados en el anexo 4.

La tabla 8 muestra los valores medios de estos parámetros. Así el volumen total de huevos obtenidos fue similar en los dos años, aunque en el 2011, un alto porcentaje de los huevos (2770 mL en 2011 frente a 810 mL en 2010) correspondió a la fracción “no flotante”. La tasa de fecundación de los huevos siempre fue mayor del 85.7%, con una media en torno al 94%. El diámetro de los huevos fecundados osciló entre 865.1 y 972.7 mm, mientras que el peso seco fue de 40.2 a 59.2 µg. La tasa de eclosión de las larvas fue siempre mayor del 40% y la supervivencia larvaria a día 3 y 5 después de la eclosión mayor del 70%. Las larvas fueron capaces de sobrevivir más de 8 días en ayuno. La única diferencia significativa entre los huevos obtenidos en 2010 y 2011 se encuentra en la presencia de una o más gotas de grasa, de manera que en el 2010 el porcentaje de huevos con una sola gota de grasa fue mayor que en el 2011 (P=0.046 y P=0.015 respectivamente).

Tabla 8. Valores medios (media±SD) de los parámetros de calidad (volumen de huevos flotantes (HF), volumen de huevos no flotantes (HNF), tasa de fecundación, huevos con una sola gota de grasa, huevos con más de una gota de grasa, diámetro, peso seco, tasa de eclosión, supervivencia larvaria a día 3, supervivencia larvaria a día 5 y último día de vida de la larva en ayuno) de las puestas obtenidas en 2010 y 2011. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (t-Student, P<0.05) entre los dos años.

	2010	2011
HUEVOS		
volumen HF (mL)	9880	7090
volumen HNF (mL)	810	2770
fecundación (%)	95.9 ± 4.9	94.4 ± 7.8
1 gota de grasa (%)	59.1 ± 25.6 ^a	27.7 ± 7.8 ^b
mas de 1 gota de grasa (%)	39.4 ± 25.4 ^a	73.1 ± 27.3 ^b
diámetro (µm)	918.2 ± 25.9	924.9 ± 35.9
peso seco (µg)	48.1 ± 5.0	48.7 ± 5.2
LARVAS		
eclosión (%)	91.8 ± 6.7	87.5 ± 21.3
superv. día 3 (%)	79.2 ± 24.5	85.0 ± 11.3
superv. día 5 (%)	74.3 ± 26.3	72.1 ± 19.9
último día vida	10.4 ± 1.2	7.7 ± 4.4

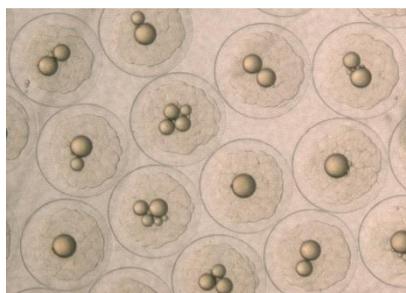
La tabla 9 muestra los índices de correlación de Pearson (Samaee et al. 2009) calculados a fin de estudiar la relación entre los distintos parámetros de calidad de puesta. Existe una correlación positiva y significativa (P<0.05) entre la tasa de fecundación y la supervivencia larvaria a día 3 y 5, lo que parece indicar que la tasa de fecundación de los huevos influye sobre la supervivencia de las larvas en los primeros días de vida. El diámetro de los huevos está relacionado (P<0.05) con el número de gotas de grasa, así los huevos con una sola gota de grasa presentan un diámetro inferior a los que tienen más de una. El diámetro del huevo también está relacionado positivamente (P<0.05) con el peso seco. Finalmente, la supervivencia larvaria a día 3 está positivamente relacionada con la supervivencia a día 5.

En otras especies (p.ej. la dorada) la presencia de más de una gota de grasa se considera un indicador de mala calidad de la puesta, de ahí que a lo largo de este estudio se decidiera observar y anotar el porcentaje de huevos con una o más gotas de grasa (Fig. 18). A la hora de estimar el coeficiente de correlación de Pearson se hizo especial hincapié en ver si la tasa de fecundación o de eclosión estaban relacionadas con el número de gotas de grasa en los ovocitos. No se encontraron correlaciones entre ambos parámetros, la única relación encontrada tiene que ver con el diámetro del huevo. A mayor número de gotas mayor diámetro, por lo que, al menos en el caso de la corvina, el número de gotas de grasa no está relacionado con la calidad de la puesta, al menos en lo que se refiere a fecundación y eclosión (parámetros considerados por los productores como los mejores indicadores de calidad de puesta).

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson ($p < 0.05$) y regresiones lineales entre los distintos parámetros de calidad de las puestas de corvina obtenidas en 2010 y 2011.

Parámetros	Valor de P	Coef. Correl.		Recta de Regresión lineal
fecund - sup día 3	p=0.004	coef=0.672	$R^2=0.452$	fertiliz = $84.66 + (0.15 * \text{sup día 3})$
fecund - sup día 5	p=0.014	coef=0.601	$R^2=0.362$	fertiliz = $85.51 + (0.11 * \text{sup día 5})$
diámetro - 1 gota grasa	p=0.006	coef=-0.651	$R^2=0.424$	diámetro = $948.45 - (0.65 * 1 \text{ gota grasa})$
diámetro - más de 1 gota	p=0.009	coef=0.633	$R^2=0.400$	diámetro = $884.74 + (0.63 * \text{más 1 gota})$
diámetro - peso	p=0.003	coef=0.684	$R^2=0.468$	diámetro = $718.33 + (4.17 * \text{peso})$
1 gota - más de 1 gota	p=0.000	coef=-0.997	$R^2=0.994$	1 gota grasa = $98.75 - (0.99 * \text{más 1 gota})$
sup día 3 - sup día 5	p=0.001	coef=0.762	$R^2=0.581$	sup día 3 = $34.54 + (0.64 * \text{sup día 5})$

Figura 18. Huevos de corvina fertilizados y en estado de división con una o más de una gota de grasa. Puesta del 13 de abril de 2011.



Composición en lípidos, clases de lípidos y perfil de ácidos grasos de los huevos y larvas obtenidos a partir de reproductores salvajes

La tabla 10 muestra la composición total de lípidos y ácidos grasos y el perfil cualitativo de los ácidos grasos de los huevos obtenidos de las puestas correspondientes a tres hembras en el año 2010 (nº 2, 15 y 19) y tres en el 2011 (nº 2, 12 y 18). No se observan diferencias significativas ni en el total de lípidos ni en el de ácidos grasos entre las distintas hembras. Tampoco se observan diferencias en el perfil de ácidos grasos de los huevos obtenidos de cada hembra, excepto en el año 2011, que los huevos de la hembra nº 12 tienen mayor cantidad de ácidos grasos saturados que la hembra 18 ($P=0.044$).

En la tabla 11 se muestran los valores medios de composición de todas las puestas obtenidas en 2010 y 2011, sin tener en cuenta su origen. En este caso sí se observan diferencias significativas en el contenido total de lípidos y de ácidos grasos en los huevos, en ambos casos mayores en 2010 que en 2011. En cuanto al perfil de ácidos grasos, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados fueron significativamente mayores ($P \leq 0.03$) en los huevos obtenidos en 2010 mientras que el contenido en PUFAs fue significativamente mayor ($P=0.000$) en los obtenidas en 2011.

Tabla 10. Lípidos totales (mg g⁻¹ peso seco, media±SD), ácidos grasos totales (mg g⁻¹ lípidos, media±SD) y composición en ácidos grasos (% , media±SD) de los huevos obtenidos en 2010 y 2011. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.05) entre hembras del mismo año. Sólo se obtuvo una puesta de la hembra n° 2 en 2011 por lo que para ese año sólo se comparan los resultados de la composición lipídica de los huevos de las hembras 12 y 18.

Ác. grasos (% total)	2010			2011		
	Hembra 2	Hembra 15	Hembra 19	Hembra 12	Hembra 18	Hembra 2
Lípidos totales (mg g ⁻¹ peso seco)	155.5±21.9	154.7±15.7	163.6±20.1	109.9±5.9	95.8±21.7	109.42
Total ác. grasos (mg g ⁻¹ lípidos)	566.6±20.6	570.0±17.0	582.7±13.5	259.6±27.7	399.8±74.9	531.92
16:0	18.57±0.69	19.70±1.09	20.75±0.91	22.69±2.40 ^a	15.19±0.12 ^b	14.04
18:0	4.44±0.17	4.29±0.20	3.77±0.03	7.47±0.33	6.37±0.61	6.11
Σsaturados	26.63±0.90	27.67±0.95	28.49±0.69	31.43±2.58 ^a	22.65±0.71 ^b	20.97
16:1n-7	9.87±0.46	10.84±0.76	10.72±0.09	7.63±1.64	5.25±0.59	4.68
18:1n-9	15.08±0.07	13.55±0.29	13.57±0.67	7.53±10.03	12.81±1.12	14.51
Σmonoinsaturados	29.81±0.51	29.14±1.04	28.90±0.75	20.51±7.86	21.85±1.94	23.26
18:2n-6	7.36±0.18	6.49±0.28	5.26±0.19	4.53±1.69	5.25±1.64	5.30
20:4n-6	1.11±0.13	0.95±0.05	1.05±0.08	1.55±0.20	1.51±0.12	2.23
Σn-6 PUFA	9.21±0.24	8.29±0.28	7.02±0.26	6.91±1.99	7.47±1.93	8.68
20:5n-3	8.56±0.46	9.14±0.76	10.06±0.74	9.79±1.29	13.64±1.98	14.63
22:5n-3	2.13±0.01	2.20±0.09	2.09±0.08	2.52±0.23	5.02±1.31	3.95
22:6n-3	20.38±0.48	20.08±0.84	19.88±0.98	25.39±1.52	25.75±3.69	25.10
Σn-3 PUFA	33.37±1.14	33.79±1.84	34.43±0.14	39.83±3.10	46.69±4.55	45.95
ΣPUFA	43.56±1.41	43.19±1.85	42.61±0.33	47.79±5.27	55.03±2.56	55.38

Tabla 11. Lípidos totales (mg g⁻¹ peso seco, media±SD), ácidos grasos totales (mg g⁻¹ lípidos, media±SD), composición en ácidos grasos (% , media±SD) y parámetros de la puesta (tasa de eclosión, supervivencia a día 3 y 5 (%) y último día de vida de las larvas en ayuno) de los huevos obtenidos de las puestas de 2010 y 2011. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.03) entre años.

Ác. Grasos (% total)	2010	2011
Total lípidos (mg g ⁻¹ peso seco)	157.5 ± 16.4 ^a	102.4 ± 12.5 ^b
Total ác. grasos (mg g ⁻¹ lípidos)	573.1 ± 16.2 ^a	416.6 ± 150.9 ^b
16:0	19.79 ± 1.19 ^a	17.09 ± 3.35 ^b
18:0	4.16 ± 0.31 ^a	6.54 ± 0.67 ^b
Σsaturados	27.71 ± 1.03 ^a	24.62 ± 4.06 ^b
16:1n-7	10.61 ± 0.66 ^a	6.04 ± 1.24 ^b
18:1n-9	13.86 ± 0.74	11.54 ± 4.37
Σmonoinsaturados	29.20 ± 0.86 ^a	21.65 ± 3.08 ^b
18:2n-6	6.30 ± 0.82 ^a	5.09 ± 0.91 ^b
20:4n-6	1.01 ± 0.09 ^a	1.68 ± 0.26 ^b
Σn-6 PUFA	8.09 ± 0.86	7.61 ± 1.14
20:5n-3	9.30 ± 0.86 ^a	12.63 ± 2.01 ^b
22:5n-3	2.15 ± 0.09 ^a	3.69 ± 1.06 ^b
22:6n-3	20.08 ± 0.77 ^a	26.29 ± 1.79 ^b
Σn-3 PUFA	33.90 ± 1.35 ^a	44.80 ± 3.50 ^b
ΣPUFA	43.09 ± 1.37 ^a	53.34 ± 3.82 ^b
eclosión (%)	91.82 ± 6.75	68.03 ± 42.75
superv. día 3(%)	79.22 ± 24.55	66.11 ± 38.74
superv. día 5(%)	74.31 ± 26.49	56.07 ± 36.16
ultimo día vida	10.44 ± 1.21	7.67 ± 4.37

Cuando se estimaron los coeficientes de correlación de Pearson (Tabla 12, P<0.05) entre la composición de ácidos grasos de los huevos y los parámetros de calidad de las puestas (tabla 12a) del año 2010 se observa que existe una correlación positiva entre la

concentración de ácidos grasos saturados y la eclosión. Sin embargo en el año 2011 (tabla 12b) la relación entre estos dos factores (contenido total de saturados y tasa de eclosión) junto con la supervivencia a día 3 y 5, y el tiempo de supervivencia de las larvas en ayuno es negativa. También se observa una correlación positiva entre la eclosión, la supervivencia larvaria a día 3 y al tiempo de supervivencia de las larvas en ayuno con la cantidad de PUFA.

Tabla 12. Correlación de Pearson ($P < 0.05$) y regresión lineal entre los ácidos grasos (saturados, monoinsaturados, n-6 PUFA, n-3 PUFA y total de PUFA) y parámetros de la puesta (eclosión, supervivencia a día 3, supervivencia a día 5 y último día) de los huevos de a) 2010 y b) 2011.

Parámetros	Valor de P	Coef. Correl.		Recta de Regresión lineal
a) 2010				
saturados - eclosión	P=0.022	Coef=0.744	R ² =0.554	saturados = 18.90 + (0.10*eclosión)
b) 2011				
saturados - eclosión	p=0.005	coef=-0.837	R ² =0.701	saturados = 30.03 - (0.08*eclosión)
saturados - sup día 3	p=0.001	coef=-0.913	R ² =0.833	saturados = 30.95 - (0.10*sup día 3)
saturados - sup día 5	p=0.006	coef=-0.829	R ² =0.688	saturados = 29.84 - (0.09*sup día 5)
saturados - último día	p=0.000	coef=-0.949	R ² =0.901	saturados = 31.39 - (0.88*último día)
n-3 PUFA - sup día 3	p=0.036	coef=0.700	R ² =0.490	n-3 PUFA = 40.62 + (0.06*sup día 3)
n-3 PUFA-último día vida	p=0.013	coef=0.783	R ² =0.614	n-3 PUFA = 39.99+(0.63*último día)
PUFA - eclosión	p=0.045	coef=0.676	R ² =0.458	ΣPUFA = 49.22 + (0.06*eclosión)
PUFA - sup día 3	p=0.018	coef=0.758	R ² =0.575	ΣPUFA = 48.39 + (0.07*sup día 3)
PUFA - último día vida	p=0.007	coef=0.812	R ² =0.666	ΣPUFA = 47.86 + (0.72*último día)

La tabla 13 muestra la composición en lípidos y ácidos grasos de las larvas de 1 día obtenidas a partir de las puestas de 2010 y 2011. Tanto el total de lípidos como ácidos grasos fue similar en todas las larvas y las únicas diferencias significativas encontradas en cuanto al perfil de ácidos grasos se deben a que en el año 2010 la cantidad de ácidos grasos saturados de las larvas obtenidas a partir de las puestas de las hembras n° 15 y 19 fue mayor ($P=0.012$) que en el de las larvas de la hembra 2, mientras que las larvas de la hembra 2 presentaron un mayor contenido ($P=0.004$) en n-6 PUFA. En el año 2011 no se encuentran diferencias significativas entre la composición de ácidos grasos de las larvas obtenidas a partir de las puestas de las diferentes hembras. Si comparamos la composición en ácidos grasos de las larvas obtenidas en 2010 y 2011 (tabla 14), se observa que el contenido en ácidos grasos saturados y monoinsaturados fue mayor ($P \leq 0.002$) en 2010, mientras que el contenido de PUFA fue mayor ($P=0.000$) en 2011.

Tabla 13. Lípidos totales (mg g⁻¹ peso seco, media±SD), ácidos grasos totales (mg g⁻¹ lípidos, media±SD) y composición en ácidos grasos (% , media±SD) de las larvas de 1 día de las puestas de 2010 y 2011. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.03) entre hembras del mismo año.

Ác. grasos (% total)	2010			2011				
	H 2	H 15	H 19	H 12	H 18	H 2	H 12+18	H 2+15
Total lípidos (mg g ⁻¹ peso seco)	134.4±39.6	139.9±73.9	136.9±4.5	117.6	65.5	51.7	116.6±15.8	144.0±20.2
Total ac. grasos (mg g ⁻¹ lípidos)	563.9±14.3	537.7±33.3	531.0±26.4	156.0	713.5	796.6	423.0±134.4	463.9±15.9
16:0	18.24±0.15 ^a	19.91±0.79 ^b	19.92±0.08 ^b	11.58	15.88	18.22	15.77±5.01	16.12±1.87
18:0	4.90±0.16 ^a	5.31±0.18 ^b	4.85±0.11 ^a	6.88	6.33	7.97	7.16±1.75	6.88±0.06
Σsaturados	26.91±0.31 ^a	29.38±0.93 ^b	28.69±0.49 ^b	18.46	23.55	28.14	23.79±7.04	23.93±2.20
16:1n-7	9.77±0.15	10.10±0.46	9.80±0.27	3.42	6.28	7.97	5.24 ±1.15	5.47±1.12
18:1n-9	15.25±0.12	13.67±0.46	13.66±0.96	10.48	12.16	13.88	12.19±3.27	11.60±2.27
Σmonoinsaturados	30.35±0.39	29.26±1.05	28.76±1.58	16.68	22.32	25.42	20.77±5.42	20.65±4.28
18:2n-6	7.42±0.23 ^a	6.08±0.16 ^b	5.28±0.53 ^c	2.50	4.17	5.62	5.25±0.78	4.74±0.75
20:4n-6	1.34±0.11	1.36±0.06	1.50±0.19	2.01	1.39	2.39	2.32±0.69	1.98±0.45
Σn-6 PUFA	9.55±0.05 ^a	8.28±0.22 ^b	7.60±0.72 ^b	4.83	6.33	8.88	8.54±1.62	7.53±0.26
20:5n-3	7.99±0.29	8.19±0.72	9.31±0.50	13.17	14.00	10.67	11.10±1.70	12.96±1.27
22:5n-3	2.12±0.03	2.13±0.11	2.12±0.05	3.64	4.22	3.43	3.98±1.71	3.74±0.64
22:6n-3	20.03±0.46	19.73±0.66	20.32±2.04	40.34	26.84	21.20	29.24±7.17	28.24±4.36
Σn-3 PUFA	32.23±0.02	32.05±1.67	33.83±1.45	60.03	46.91	36.57	46.09±10.84	47.01±6.71
ΣPUFA	42.74±0.09	41.35±1.68	42.55±2.06	64.86	54.14	46.44	55.44±12.46	55.43±6.48

Tabla 14. Lípidos totales (mg g⁻¹ peso seco, media±SD), ácidos grasos totales (mg g⁻¹ lípidos, media±SD), composición en ácidos grasos (% , media±SD) y parámetros de la puesta (eclosión, supervivencia a día 3 y 5 (%) y último día de vida) de las larvas de 1 día obtenidas de las puestas de 2010 (n=10) y 2011 (n=7). Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.02) entre años.

Ác. grasos (% total)	2010	2011
Total lípidos (mg g ⁻¹ peso seco)	137.9 ± 51.1	108.0 ± 37.6
Total ac. grasos (mg g ⁻¹ lípidos)	540.9 ± 28.7	491.4 ± 217.6
16:0	19.58 ± 0.88 ^a	15.63 ± 2.95 ^b
18:0	5.09 ± 0.27 ^a	7.04 ± 0.87 ^b
Σsaturados	28.68 ± 1.19 ^a	23.66 ± 4.12 ^b
16:1n-7	9.94 ± 0.37 ^a	5.58 ± 1.51 ^b
18:1n-9	13.98 ± 0.86 ^a	12.02 ± 1.92 ^b
Σmonoinsaturados	29.33 ± 1.18 ^a	21.04 ± 3.83 ^b
18:2n-6	6.11 ± 0.83 ^a	4.61 ± 1.13 ^b
20:4n-6	1.40 ± 0.13 ^a	2.06 ± 0.48 ^b
Σn-6 PUFA	8.33 ± 0.80	7.45 ± 1.59
20:5n-3	8.48 ± 0.79 ^a	12.28 ± 1.56 ^b
22:5n-3	2.13 ± 0.08 ^a	3.82 ± 0.79 ^b
22:6n-3	19.97 ± 1.10 ^a	29.05 ± 6.66 ^b
Σn-3 PUFA	32.62 ± 1.55 ^a	47.10 ± 8.59 ^b
ΣPUFA	41.99 ± 1.63 ^a	55.31 ± 7.84 ^b
Eclosión (%)	91.82 ± 6.75	68.03 ± 42.75
superv. día 3 (%)	79.22 ± 24.55	66.11 ± 38.74
superv. día 5 (%)	74.31 ± 26.49	56.07 ± 36.16
último día vida	10.44 ± 1.21	7.67 ± 4.37

Los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos entre la composición de ácidos grasos y los parámetros de calidad de las larvas se muestran en la tabla 15. En el año 2010 (tabla 15a) se observa una correlación positiva entre el contenido de ácidos grasos saturados y la eclosión, mientras que en el 2011 (tabla 15b) la cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados se correlaciona positivamente con la supervivencia de las

larvas a día 3, mientras el contenido en PUFA muestra una correlación negativa con esta supervivencia.

Tabla 15. Correlación de Pearson ($P < 0.05$) y regresión lineal entre los ácidos grasos (saturados, monoinsaturados, n-6 PUFA, n-3 PUFA y total de PUFA) y parámetros de la puesta (eclosión, supervivencia día 3, supervivencia día 5 y último día) de las larvas de 1 día de a) 2010 y b) 2011.

Parámetros	Valor de P	Coef. Correl.		Recta de Regresión lineal
a) 2010				
saturados - eclosión	p=0.006	coef=0.824	$R^2=0.679$	saturados=16.27+(0.14*eclosión)
b) 2011				
saturados - sup día 3	p=0.008	coef=0.928	$R^2=0.862$	saturados=-21.05+(0.52* sup día 3)
monoins - sup día 3	p=0.013	coef=0.906	$R^2=0.821$	monoinsat=-21.32+(0.49* sup día 3)
n-3 PUFA - sup día 3	p=0.022	coef=-0.875	$R^2=0.766$	n-3 PUFA=125.65-(0.91* sup día 3)
PUFA - sup día 3	p=0.006	coef=-0.934	$R^2=0.873$	Σ PUFA=142.37-(1.00* sup día 3)

Los resultados del análisis de clases de lípidos de huevos y larvas de 1 día obtenidos en 2010 se muestran en la tabla 16. De la hembra 2 sólo se pudo analizar una puesta por lo que no se tiene en cuenta en el análisis estadístico. La composición en cuanto al contenido en lípidos polares y neutros de los huevos y las larvas es bastante parecida entre las hembras y sólo se observan diferencias significativas en el contenido de fosfatidilcolina (PC) que es mayor en los huevos de la hembra 19 respecto a la 15 ($P=0.015$), y en la cantidad de ésteres de esterol y ceras (SE+W) que es mayor en las larvas de la hembra 15 ($P=0.021$).

Tabla 16. Clases de lípidos (% , media±SD) de huevos y larvas de 1 día de las puestas de 2010. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0.03$) entre hembras. Análisis de cinco puestas de la hembra 15 y tres de la hembra 19. LPC: lisofosfatidilcolina, SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina, PS/PI: fosfatidilserina/fosfatidilinositol, PA/CL: ácido fosfatídico/cardioplipina, PE: fosfatidiletanolamina, CHOL: colesterol, FFA: ácidos grasos libres, TAG: triglicéridos, SE+W: ésteres de esterol y ceras.

	HUEVOS			LARVAS 1 días		
	Hembra 15	Hembra 19	Hembra 2	Hembra 15	Hembra 19	Hembra 2
LPC	1.88 ± 0.96	0.91 ± 0.07	0.86	1.16 ± 0.43	1.71 ± 1.41	1.20
SM	1.60 ± 0.11	1.79 ± 0.17	1.46	1.39 ± 0.16	1.70 ± 0.24	1.67
PC	15.61 ± 0.50 ^a	17.18 ± 0.87 ^b	16.05	14.38 ± 1.38	14.37 ± 2.90	15.82
PS/PI	1.41 ± 0.65	1.51 ± 0.11	1.63	4.17 ± 0.28	4.42 ± 0.65	3.30
PA/CL	0.93 ± 0.67	1.25 ± 0.60	1.48	1.04 ± 0.38	1.46 ± 0.20	0.85
PE	6.30 ± 0.53	6.18 ± 0.71	4.90	7.22 ± 0.79	6.95 ± 1.06	6.51
Total lípidos polares	27.73 ± 0.90	28.82 ± 1.13	26.39	29.37 ± 1.63	30.62 ± 3.51	29.35
CHOL	10.40 ± 0.41	10.62 ± 0.28	10.40	13.06 ± 0.64	13.39 ± 0.86	12.20
FFA	2.80 ± 0.86	1.65 ± 0.57	1.75	8.79 ± 1.80	9.69 ± 6.40	7.25
TAG	27.85 ± 1.16	29.71 ± 0.86	31.20	20.52 ± 1.94	20.27 ± 1.73	24.38
SE+W	30.61 ± 1.72	29.05 ± 0.53	30.26	23.48 ± 0.99 ^a	18.27 ± 3.74 ^b	23.80
Total lípidos neutros	71.66 ± 1.02	71.04 ± 1.21	73.61	65.84 ± 1.60	61.61 ± 3.05	67.62

4.3. Comparación entre corvinas cultivadas y salvajes

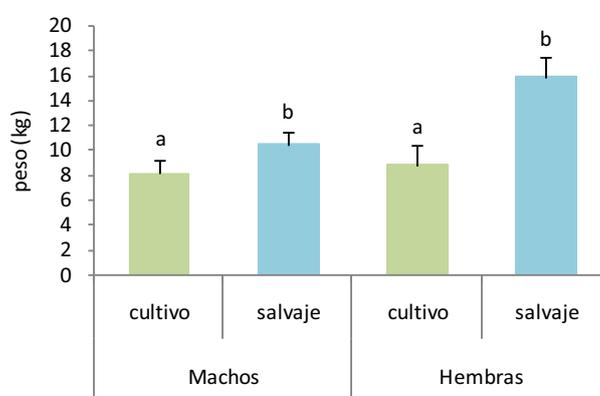
A fin de poder comparar los resultados de la inducción hormonal y la calidad de las puestas entre los dos stocks de reproductores, salvajes y cultivados, y ver si existen

diferencias en función del origen del stock, hemos comparado los resultados obtenidos en el año 2010 usando como método de inducción a la puesta la inyección intramuscular de GnRH_a.

Crecimiento

En la figura 19 se representa el peso de los reproductores utilizados en el año 2010. Tanto los machos como las hembras cultivados fueron significativamente ($p=0.000$) menores que los de origen salvaje (10.5 ± 0.9 kg y 8.1 ± 1.1 kg para los machos salvajes y cultivados, respectivamente y 15.9 ± 1.6 kg y 8.8 ± 1.6 kg para las hembras salvajes y cultivadas, respectivamente).

Figura 19. Peso (kg, media \pm SD) de los machos y las hembras de origen salvaje y cultivo en 2010. Letras distintas indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre individuos salvajes y cultivados.



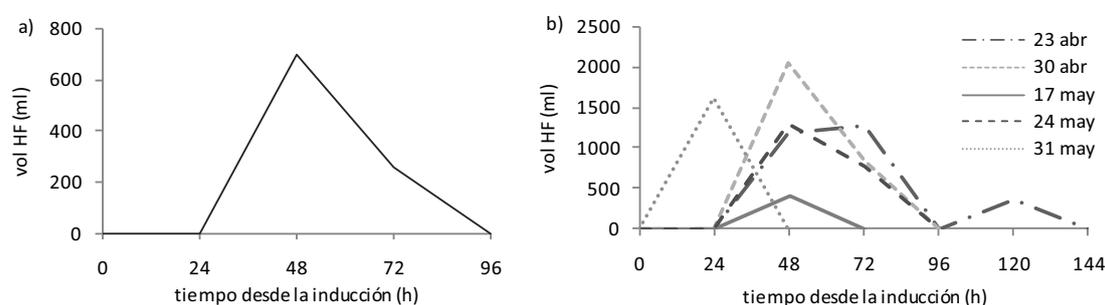
Obtención de puestas

En la tabla 17 se indican todas las inducciones que se llevaron a cabo durante el año 2010. Hay que destacar aquí que la manipulación a la que se sometió a los reproductores fue muy distinta, así en el caso de las corvinas de cultivo todos los individuos del tanque fueron muestreados e inducidos una vez al mes, mientras que las corvinas salvajes se indujeron semanalmente muestreando entre tres y cuatro machos y una hembra. De las tres inducciones realizadas en 2010 a las corvinas de cultivo (abril, mayo y junio) sólo se obtuvieron dos puestas en mayo, a las 48 y 72 h de la inducción con un volumen de huevos flotantes de 700 y 260 mL respectivamente (Fig. 20). Las corvinas salvajes se indujeron durante siete semanas consecutivas (abril-junio) obteniéndose cinco puestas de uno o varios días de duración. En todos los casos, la primera puesta se recogió a las 48 h de la inyección, excepto la puesta del 31 de mayo que se adelantó 24 h debido probablemente al aumento de la temperatura del agua (20°C). El volumen de huevos flotantes obtenidos de estas puestas osciló desde 355 mL hasta 2.06 L (Fig. 20).

Tabla 17. Inducciones a la puesta mediante inyección de GnRH en 2010 de reproductores de corvina de cultivo y salvajes. n=nº de individuos inducidos de cada sexo y entre paréntesis código numérico de cada hembra utilizada en la inducción.

	Cultivo			Salvaje						
	16 abr	17 may	15 jun	23 abr	30 abr	7 may	17 may	24 may	31 may	7 jun
n ♂	2	3	3	3	3	4	4	4	3	2
n ♀	2	6	2	1(15)	1(19)	1(16)	1(2)	1(15)	1(19)	1(16)
T (°C)	16.0	17.5	17.9	16.8	17.6	15.9	16.7	19.3	20	22.6
1ª puesta		48 h		48 h	48 h		48 h	48 h	24 h	
2ª puesta		72 h		72 h	72 h			72 h		
3ª puesta				120 h						

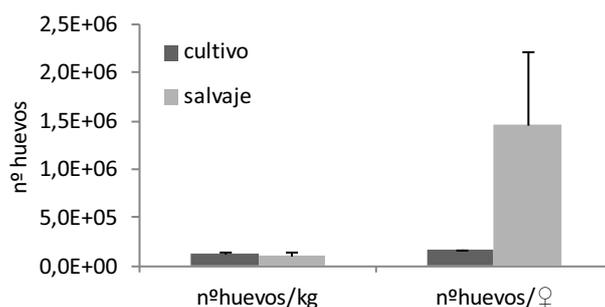
Figura 20. Volumen de huevos flotantes (HF, mL) obtenidos tras las puestas de corvinas de (a) cultivo y (b) salvaje en 2010.



Fecundidad

En la figura 21 se muestran los resultados de fecundidad expresados tanto en nº huevos kg^{-1} como en nº huevos hembra^{-1} de las corvinas tanto de origen salvaje como de cultivo en el año 2010. No se observan diferencias significativas en los valores del nº huevos kg^{-1} entre las hembras salvajes y de cultivo ($1.22 \pm 0.22 \times 10^5$ huevos y $9.51 \pm 4.88 \times 10^4$ huevos respectivamente). Sin embargo sí hay diferencias, aunque no se ha podido precisar si son significativas o no al carecer de suficiente número de puestas (solo una) en el caso de las hembras de cultivo, en los valores del nº huevos hembra^{-1} , siendo mayor en las corvinas salvajes ($1.46 \pm 0.76 \times 10^6$ huevos) que en las de cultivo ($1.75 \pm 0.00 \times 10^5$ huevos).

Figura 21. Fecundidad (nº huevos kg^{-1} y nº huevos hembra^{-1}) de las hembras de corvina salvaje y cultivo en 2010.



Calidad de las puestas

Los valores medios de los parámetros de calidad de puesta considerados en este estudio están representados en la tabla 18. El volumen medio de huevos flotantes por puesta de las corvinas de cultivo fue de 0.5 L, aproximadamente la mitad que el volumen de huevos flotantes de las corvinas salvajes (1.1 L). Las tasas de fecundación y de eclosión de los huevos obtenidos de las corvinas salvajes fueron significativamente mayores ($P=0.013$ y $P=0.000$) que las de los de cultivo ($95.9\pm 4.9\%$ y $61.0\pm 41.0\%$ de fecundación, respectivamente y $91.8\pm 6.7\%$ y $16.0\pm 11.5\%$ de eclosión, respectivamente). Por otra parte, el diámetro de los huevos de las corvinas de cultivo fue significativamente mayor ($P=0.025$) que el de las salvajes ($984.9\pm 60.9 \mu\text{m}$ y $918.2\pm 25.9 \mu\text{m}$ respectivamente), mientras que el peso seco no mostró diferencias significativas. En el caso de la supervivencia larvaria a día 3 y 5 después de la eclosión, ambos valores fueron muy parecidos entre los dos orígenes de los reproductores. Sin embargo, el tiempo de supervivencia de las larvas en ayuno fue mayor ($P=0.043$) para las larvas obtenidas de las puestas de corvina salvaje (10.4 ± 1.2 días) que para las que se obtuvieron a partir de las puestas de corvina de cultivo (8.3 ± 1.1 días).

Tabla 18. Valores medios (media \pm SD) de los parámetros de calidad (volumen de huevos flotantes (HF), volumen de huevos no flotantes (HNF), tasa de fecundación, diámetro, peso seco, tasa de eclosión, supervivencia larvaria a día 3, supervivencia larvaria a día 5 y último día de vida de la larva en ayuno) de las puestas de las corvinas de cultivo y de las salvajes en 2010. Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre individuos de cultivo y salvajes.

	Cultivo	Salvaje
HUEVOS		
vol HF (mL)	960	9880
vol HNF (mL)	340	810
fecundación (%)	61.0 ± 41.0^a	95.9 ± 4.9^b
diámetro (μm)	984.9 ± 60.9^a	918.2 ± 25.9^b
peso (μg)	54.5 ± 10.4	48.1 ± 5.0
eclosión (%)	16.0 ± 11.5^a	91.8 ± 6.7^b
LARVAS		
superv. día 3 (%)	70.8 ± 15.6	79.2 ± 24.5
superv. día 5 (%)	68.6 ± 18.7	74.3 ± 26.5
último día vida	8.3 ± 1.1^a	10.4 ± 1.2^b

Composición en lípidos, clases de lípidos y perfil de ácidos grasos de los huevos y larvas de corvina salvaje y cultivada

En la tabla 19 se muestran los resultados del total de lípidos (mg g^{-1} de peso seco) y de ácidos grasos (mg g^{-1} de lípidos) así como la composición relativa (% del total de ácidos grasos) en ácidos grasos de los huevos y larvas de 1 día obtenidos tras la inducción hormonal mediante inyección de las corvinas de cultivo y salvajes en el año 2010. No se observan diferencias significativas en el contenido total de lípidos y ácidos grasos de huevos y larvas de los dos orígenes, aunque sí en el perfil de ácidos grasos. Así, se observan diferencias significativas ($P<0.05$) en el contenido de ácidos grasos monoinsaturados y n-6 PUFA mayor en los huevos procedentes de las corvinas de

cultivo, y en el contenido de 20:5n-3 (EPA), 22:6n-3 (DHA), y los totales de n-3 PUFA y PUFA que fue significativamente menor.

En el caso de las larvas de 1 día sólo se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido de 18:2n-6 y n-6 PUFA mayores en las larvas obtenidas de las corvinas de cultivo.

Tabla 19. Lípidos totales (mg g^{-1} peso seco, media \pm SD), ácidos grasos totales (mg g^{-1} lípidos, media \pm SD) y composición en ácidos grasos (% total, media \pm SD) de huevos y larvas de 1 día obtenidos de las puestas de corvina cultivo y salvaje en 2010. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre corvinas de cultivo y salvajes.

Ácidos grasos (% total)	Huevos		Larvas 1 día	
	Cultivo	Salvaje	Cultivo	Salvaje
Total lípidos (mg g^{-1} peso seco)	160.9 \pm 9.29	157.5 \pm 16.4	82.1 \pm 30.2	137.9 \pm 51.1
Total ác. grasos (mg g^{-1} lípidos)	545.1 \pm 92.8	573.1 \pm 16.2	555.3 \pm 10.8	540.9 \pm 28.7
16:0	21.63 \pm 2.38	19.79 \pm 1.19	19.39 \pm 0.43	19.58 \pm 0.88
18:0	3.92 \pm 0.61	4.16 \pm 0.31	5.03 \pm 0.42	5.09 \pm 0.27
Σ saturados	30.01 \pm 3.57	27.71 \pm 1.03	28.25 \pm 0.33	28.68 \pm 1.19
16:1n-7	11.50 \pm 0.75	10.61 \pm 0.66	9.07 \pm 0.87	9.94 \pm 0.37
18:1n-9	14.78 \pm 1.00	13.86 \pm 0.74	13.44 \pm 0.60	13.98 \pm 0.86
Σ monoinsaturados	31.08 \pm 2.23 ^a	29.20 \pm 0.86 ^b	27.36 \pm 1.01	29.33 \pm 1.18
18:2n-6	8.17 \pm 0.29 ^a	6.30 \pm 0.82 ^b	9.36 \pm 1.46 ^a	6.11 \pm 0.83 ^b
20:4n-6	0.95 \pm 0.13	1.01 \pm 0.09	1.41 \pm 0.10	1.40 \pm 0.13
Σ n-6 PUFA	9.90 \pm 0.46 ^a	8.09 \pm 0.86 ^b	11.62 \pm 1.40 ^a	8.33 \pm 0.80 ^b
20:5n-3	7.96 \pm 1.35	9.30 \pm 0.86	9.01 \pm 0.32	8.48 \pm 0.79
22:5n-3	1.85 \pm 0.24 ^a	2.15 \pm 0.09 ^b	2.20 \pm 0.10	2.13 \pm 0.08
22:6n-3	15.57 \pm 3.63 ^a	20.08 \pm 0.77 ^b	18.36 \pm 1.24	19.97 \pm 1.10
Σ n-3 PUFA	27.76 \pm 5.34 ^a	33.90 \pm 1.35 ^b	31.72 \pm 1.26	32.62 \pm 1.55
Σ PUFA	38.90 \pm 5.79 ^a	43.09 \pm 1.37 ^b	44.39 \pm 1.34	41.99 \pm 1.63

Las clases de lípidos de los huevos y las larvas obtenidos a partir de corvinas salvajes y de cultivo se muestran en la tabla 20. En el caso de los huevos se observan diferencias significativas entre las puestas de los dos orígenes sobre todo en cuanto a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y cardiolipina/ácido fosfatídico (PA/CL) en todos los casos siempre con un mayor contenido en los huevos procedentes de individuos salvajes, sin observarse diferencias ni en el contenido total de lípidos polares ni en ninguna de las clases de lípidos neutros. Las larvas de 1 día mostraron sobre todo diferencias en cuanto al contenido en fosfatidilcolina (PC) y etanolamina (PE), el total de lípidos polares y los contenidos de colesterol (CHOL) y ésteres de esteroles, siendo en unos casos (PC, PE, total PL y CHOL) mayores en las larvas procedentes de puestas de individuos salvajes y en otras (SE y total lípidos neutros) en las procedentes de las cultivadas. Hay que tener en cuenta que los lípidos neutros forman parte mayoritariamente de la gota de grasa del vitelo de la larva mientras que los fosfolípidos (lípidos polares) forman parte de los tejidos del embrión y la larva.

Tabla 20. Clases de lípidos (% , media \pm SD) de los huevos y las larvas de 1 día obtenidos de las puestas de las corvinas de cultivo y salvajes durante el 2010. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las obtenidas de corvinas de cultivo y salvaje. LPC: lisofosfatidilcolina, SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina, PS/PI: fosfatidilserina/fosfatidilinositol, PA/CL: ácido fosfatídico/cardioplipina, PE: fosfatidiletanolamina, CHOL: colesterol, FFA: ácidos grasos libres, TAG: triglicéridos, SE+W: ésteres de esteroles y ceras.

	Huevos		Larvas 1 día	
	Cultivo	Salvajes	Cultivo	Salvajes
LPC	1.53 \pm 0.69	1.44 \pm 0.85	1.87 \pm 0.73	1.35 \pm 0.82
SM	1.05 \pm 0.30 ^a	1.65 \pm 0.16 ^b	1.03 \pm 0.16 ^a	1.53 \pm 0.23 ^b
PC	13.84 \pm 1.57 ^a	16.18 \pm 0.95 ^b	8.79 \pm 3.73 ^a	14.54 \pm 1.81 ^b
PS/PI	1.25 \pm 0.39	1.47 \pm 0.47	2.69 \pm 0.87 ^a	4.16 \pm 0.51 ^b
PA/CL	0.47 \pm 0.66 ^a	1.10 \pm 0.60 ^b	0.77 \pm 0.68	1.16 \pm 0.37
PE	5.01 \pm 1.15 ^a	6.11 \pm 0.69 ^b	4.11 \pm 1.70 ^a	7.05 \pm 0.81 ^b
Total lípidos polares	23.16 \pm 2.66	27.94 \pm 1.16	19.26 \pm 5.01 ^a	29.78 \pm 2.19 ^b
CHOL	9.77 \pm 0.53	10.47 \pm 0.34	11.69 \pm 0.35 ^a	13.07 \pm 0.72 ^b
FFA	4.77 \pm 2.16	2.30 \pm 0.90	16.13 \pm 7.15 ^a	8.92 \pm 3.53 ^b
TAG	27.26 \pm 1.47	28.84 \pm 1.56	19.36 \pm 2.09	20.86 \pm 2.09
SE+W	32.76 \pm 2.01	30.05 \pm 1.45	28.80 \pm 1.05 ^a	21.78 \pm 3.30 ^b
Total lípidos neutros	74.56 \pm 2.37	71.67 \pm 1.23	75.98 \pm 4.27 ^a	64.63 \pm 3.01 ^b

5. Discusión

Reproductores cultivados

Las hembras de corvina o no son diferentes o son ligeramente más grandes en peso que los machos.

Los resultados de los niveles de hormonas esteroideas en sangre, analizados solo en los reproductores cultivados, nos permiten identificar los periodos de gametogénesis y puesta en la corvina tanto para machos como para hembras. Así, la gametogénesis comenzaría en noviembre-diciembre (indicado por el aumento de la 11-KT en machos y la testosterona y estradiol en hembras) y terminaría en marzo (niveles máximos de las hormonas) justo antes de la época de puesta (abril-mayo). Los primeros machos fluyentes se observan en el mes de marzo de 2009 (justo después del nivel máximo de 11-KT) y hasta el mes de junio coincidiendo con el nivel mínimo de 11-KT. En el año 2010, sin embargo, los primeros machos fluyentes se observan en febrero mientras que la concentración máxima de 11-KT se detecta en marzo. En las hembras se observan ovocitos en estado de vitelogenesis (tamaño mayor a 0.5 mm) a partir del mes de abril de 2009 coincidiendo con el nivel máximo de estradiol hasta el mes de junio cuando los ovocitos se encuentran en atresia y la concentración de estradiol en sangre es mínima. En el año 2010 también se encuentran hembras con los ovocitos en estado de vitelogenesis en abril aunque la concentración máxima de estradiol se produce en marzo. Tanto en machos como en hembras, los niveles de hormonas esteroideas así como la presencia de esperma y ovocitos en vitelogenesis se mantiene durante todo el periodo de puesta por lo que una misma hembra es capaz de producir varias puestas durante un mismo periodo reproductivo. En lubina (*Dicentrarchus labrax*) también se ha observado que los niveles de estradiol en sangre aumentan junto con el porcentaje de ovocitos en estado de vitelogenesis (Prat et al. 1990; Zanuy et al. 1995) coincidiendo el

nivel máximo de estradiol en sangre con el máximo porcentaje de ovocitos en dicho estado (Mañanós et al. 1997). En otras especies, como el corvinón ocelado (Kucherka et al. 2006), el serránido japonés (*Lateolabrax maculatus*) (Lee y Yang, 2002) y el pez limón (*Seriola dumerilii*) (Mandich et al. 2004) también se ha encontrado dicho paralelismo entre los niveles máximos de estradiol y el máximo porcentaje de ovocitos en vitelogenesis.

La temperatura es uno de los factores ambientales que más afecta a la maduración de los peces (Bromage et al. 2001). En el caso de la corvina la maduración gonadal se produce a una temperatura media de $16.5 \pm 1.4^\circ\text{C}$ mientras que la puesta se realiza a $17.2 \pm 0.8^\circ\text{C}$. En otras especies de esciéndidos inducidos hormonalmente el desove se realiza cuando la temperatura del agua es de $22-25^\circ\text{C}$ en el caso del verrugato del sur (Battaglione y Talbot, 1994), de $16-18^\circ\text{C}$ en la corvina pampera (*Cilus gilberti*) (Cárdenas et al. 2009), $19-24^\circ\text{C}$ en el verrugato fusco (Bárbaro et al. 2002; Mylonas et al. 2004; Basaran et al. 2009) y de 25°C en el corvinón ocelado (Thomas y Boyd 1988).

En el año 2009 encontramos machos fluyentes y hembras con ovocitos mayores a 0.5 mm en los meses de abril y mayo. Al año siguiente los encontramos en abril, mayo y también en junio. Y en el último año la maduración no se pudo detectar hasta el mes de junio. Estos cambios en la maduración de los reproductores pudieron ser debidos al cambio de fotoperiodo, de natural (15hL:9hO en verano y 9hL:15hO en invierno) a constante (14hL:8hO) que se realizó en julio de 2009 lo que provocó un retraso en la maduración de la corvina en los siguientes años. Un efecto similar se ha podido observar en lubina cuando se expone a fotoperiodo largo (15hL:9hO) y constante (Zanuy et al. 1995; Mañanós et al. 1997; Prat et al. 1999) provocando no solo un retraso en la maduración y puesta sino también una disminución en la fecundidad y calidad de los huevos. En el caso de la trucha, un fotoperiodo largo aplicado a principios del ciclo reproductivo, seguido de un fotoperiodo corto provoca un adelanto de la puesta 3-4 meses, mientras que el uso de un fotoperiodo corto al inicio del ciclo seguido de un fotoperiodo largo provoca un retraso en la puesta (Bromage et al. 1982). En lubina, Carrillo et al. (1989) también obtienen un retraso en la puesta cuando se aplica un fotoperiodo corto al iniciarse el ciclo y después se cambia a largo.

El uso de implantes hormonales para la inducción a la puesta en corvina produce un mayor número de puestas a lo largo de días sucesivos que si la inducción se realiza por medio de inyección. En el año 2009 la inducción se realizó mediante implantes obteniéndose de dos a ocho puestas por cada inducción, mientras que en abril de 2009 (tanque C2), 2010 y 2011 con inducciones mediante inyección se obtuvieron como máximo dos puestas por cada inducción. Fielder y Heasman (2011) obtuvieron cuatro puestas consecutivas con el verrugato del sur al cabo de 30-35 h de la inducción mediante inyección de GCH (gonadotrofina coriónica humana), mientras que utilizando un implante de LHRHa (Luteinising Hormone Releasing Hormone analogue) se obtuvieron puestas seriadas durante varias semanas.

Las puestas obtenidas tras la inducción de mayo de 2009 fueron de mayor volumen y con mayor porcentaje de eclosión que las obtenidas en abril de ese mismo año, lo que parece indicar que los reproductores estaban más maduros y preparados para la puesta en el mes de mayo y/o que las condiciones ambientales eran mejores, especialmente teniendo en cuenta que la temperatura fue mayor en mayo (17.7°C) que en abril (16.3°C). También pudimos observar que en el año 2010 y 2011 los peces del tanque C2 no respondieron a ningún tipo de inducción, lo que pudo ser debido a una peor condición física de los reproductores del tanque C2 ya que las condiciones ambientales y fisico-químicas del agua eran iguales en los dos tanques. En el caso de los peces del tanque C1 se detectó un continuo deterioro en las condiciones físicas de los peces, necesarias para realizar una puesta de buena calidad, a lo largo de los dos primeros años ya que en el año 2011 no se obtuvieron puestas. La principal causa de este deterioro fue el estrés provocado por los muestreos mensuales que se llevaron a cabo desde el año 2009 para extraer la sangre y analizar el ciclo hormonal de la especie.

Cuando estudiamos con detalle los parámetros de calidad de puesta (diámetro del huevo, tasa de fecundación, tasa de eclosión, tasa de supervivencia larvaria a día 3 y 5 y tiempo que pueden sobrevivir las larvas en ayuno) observamos que las puestas obtenidas en el tanque C1 del mes de abril de 2009 son mejores que las obtenidas en mayo de 2009, en 2010 o en 2011 y mejores que las obtenidas en el tanque C2, aunque el volumen de huevos flotantes sea inferior al de otros años. A la hora de establecer qué parámetros son los más adecuados para valorar la calidad, a partir de las correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados observamos (1) una correlación positiva entre el volumen de huevos flotantes y la tasa de fecundación, (2) una relación clara entre el diámetro del huevo y la supervivencia de las larvas a día 3 (cuanto mayor es el huevo mayor es el volumen del vitelo y la gota de grasa lo que proporciona a la larva mayor cantidad de alimento y energía necesarios para sobrevivir) y (3) una correlación positiva entre la tasa de eclosión de los huevos con la supervivencia de las larvas a día 3 y el tiempo que sobreviven las larvas en ayuno.

Además, los huevos obtenidos en 2009 tienen una mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que los de los años siguientes. Los n-3 PUFA son los componentes mayoritarios de los tejidos de las larvas y están positivamente relacionados con la supervivencia larvaria a día 3 y 5 después de la eclosión y también con el tiempo de supervivencia en ayuno lo que permite confirmar que las puestas de 2009 son las de mejor calidad. En otras especies de peces como en dentón (Samae et al. 2009) y en dorada (Fernández-Palacios et al. 1995) se ha observado que la composición en PUFA está relacionada positivamente con la supervivencia larvaria a día 3 y 5.

No existe una definición clara de calidad del huevo y los parámetros que se utilizan para ello son muy distintos entre las diferentes especies de peces. En las publicaciones existentes al respecto hay una gran cantidad de parámetros considerados como buenos indicadores de calidad, así Giménez et al. (2006) observaron que la supervivencia de las larvas de dentón (*Dentex dentex*) a día 3 y 5 es un buen indicador de la calidad de los

huevos porque está directamente relacionado con la cantidad de reservas endógenas que contiene, Lahnsteiner y Patarnello (2005) y Lahnsteiner et al. (2008) estudiaron la forma de la gota lipídica de los huevos de dorada (*Sparus aurata*) y sargo picudo (*Diplodus puntazzo*) y dentón, respectivamente, concluyendo que una gota lipídica esférica o muy elipsoidal es indicadora de una mala calidad, mientras que una gota lipídica ligeramente elipsoidal indica buena calidad. Otros parámetros relacionados con la morfología del huevo, como el diámetro, el peso seco y la morfología de los blastómeros, han sido utilizados como indicadores de buena o mala calidad de la puesta (Kjorsvik et al. 1990; Shields et al. 1997). Lahnsteiner y Patarnello (2004), sin embargo, consideran una serie de parámetros bioquímicos como indicadores de calidad de la puesta. Samaee y Estévez (2012) y Samaee et al. (2013) demuestran que existe una correlación significativa entre la proporción de ácidos grasos y el contenido de aminoácidos ligados a proteína en los huevos del dentón con la supervivencia de las larvas a día 3 y 5 después de la eclosión.

Reproductores salvajes

En el caso de los reproductores salvajes uno de los principales problemas de aclimatación han sido las infecciones por parásitos monogeneas y *Amyloodinium* sp. en las branquias, y la alta sensibilidad de esta especie a las bajas temperaturas, que provocaron una falta de apetito de algunos individuos y en algunos casos la muerte. Durante el periodo de realización de esta tesis se ha observado que debido a la manipulación durante los muestreos la corvina deja de alimentarse durante unos días por el estrés causado. Otras especies de esciénidos, como la corvinata pintada (*Cynoscion nebulosus*), la corvina de boca amarilla (*Cynoscion xanthulus*) y el corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*) también han mostrado una alta sensibilidad bien a las condiciones de confinamiento o manipulación o a las infecciones por *Amyloodinium ocellatum* (Thomas et al. 1995).

En el año 2010 se realizaron un total de siete inducciones a la puesta y en cinco de ellas se obtuvieron de una a tres puestas siendo la primera a las 48 h después de la inducción. De las cuatro hembras que se indujeron, tres (nº 2, 15 y 19) realizaron puestas tras cada inducción. Tras el análisis de la distribución de frecuencias de los tamaños ovocitarios observamos que las tres presentaron una distribución bimodal en el momento de las inducciones. De estas hembras, la nº 15 presentaba un tamaño de ovocitos adecuado para una segunda inducción a la cuarta semana mientras que la nº 19 estaba preparada para la segunda inducción a partir de la segunda semana. La hembra nº 2 no presentó ninguna distribución bimodal de las frecuencias de los ovocitos después de la primera inducción. En el año 2011 se realizaron siete inducciones pero sólo cinco de ellas fueron exitosas, obteniéndose de una a tres puestas, la primera a las 48 h en tres ocasiones y a las 72 h en las otras dos. Las dos inducciones en las que no se obtuvo ninguna puesta fue debido a que o la hembra escogida no reaccionó a la inyección o a que la hembra no presentaba una distribución de frecuencias bimodal de los ovocitos. Todas las hembras inducidas que realizaron puestas presentaban una distribución de frecuencias bimodal a las dos semanas siguientes de la inducción, por lo que es posible realizar una segunda inducción al cabo de dos semanas en lugar de esperar un mes.

En cuanto a la calidad de las puestas, no se observaron diferencias significativas entre las obtenidas en 2010 y 2011 excepto en el número de gotas de grasa, siendo mayor el número de huevos con una sola gota de grasa en 2010. Éste parámetro fue seleccionado porque en algunas especies de peces marinos el número de gotas de grasa es considerado un parámetro de medida de calidad (Fernández-Palacios et al. 2005). Con los resultados obtenidos en esta tesis hemos demostrado que en la corvina, el número de gotas de grasa no está relacionado con la calidad de la puesta si ésta se mide bajo criterios de fecundación y eclosión (parámetros considerados por los productores como los mejores indicadores de calidad de puesta).

La composición en ácidos grasos de los huevos y las larvas de 1 día son muy similares siendo mayor el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en 2010 y el contenido de PUFA mayor en 2011. En el 2010, la mayor cantidad de ácidos grasos saturados, tanto en los huevos como en las larvas, tiene como consecuencia una mayor eclosión. En cambio, en el 2011, el mayor contenido de ácidos grasos saturados en los huevos provoca una disminución en el porcentaje de eclosión, mientras que al aumentar el contenido de PUFA aumenta la eclosión, la supervivencia larvaria a día 3 y 5 demostrando así que los PUFA son los responsables de aportar la energía necesaria durante los primeros días de vida de las larvas.

Comparación entre corvinas cultivadas y salvajes

Las corvinas de origen salvaje, tanto machos como hembras, presentaron un peso mayor que las corvinas de cultivo. En el caso de las corvinas de cultivo, el 2009 fue el año en que se indujeron por primera vez a la puesta, mientras que en el caso de los reproductores salvajes, es muy probable que hubieran desovado anteriormente sin ayuda de hormonas. Esta diferencia de edad y peso pudo influir en la fecundidad de las hembras durante la época de reproducción y en la calidad de las puestas, siendo las puestas obtenidas a partir de corvinas salvajes las de mayor calidad en cuanto a tasa de fecundación y eclosión y en cuanto a la supervivencia de las larvas en ayuno. Cabe destacar que el diámetro de los huevos de las corvinas salvajes fue significativamente menor que los de las corvinas de cultivo, aunque no parece que el diámetro influya en la calidad de los huevos.

La fecundidad de las hembras de corvina salvaje y de cultivo no muestra diferencias significativas aunque la fecundidad media de las salvajes fue de 122000 huevos kg^{-1} y la de las de cultivo de 95100 huevos kg^{-1} . Estos resultados son parecidos a los obtenidos con otras especies de esciéndidos, como el verrugato del sur con una fecundidad de 100000 huevos kg^{-1} (Battaglione y Talbot, 1994), el verrugato fusco con una fecundidad de 30000 a 200000 huevos kg^{-1} (Barbaro et al. 2002; Mylonas et al. 2004; Basaran et al. 2009) o el corvinón ocelado del que se obtienen 350000 huevos kg^{-1} (Thomas y Boyd, 1988).

Los contenidos de 20:5n-3 (EPA) y 22:6n-3 (DHA), y los totales de n-3 PUFA y PUFA fueron significativamente mayores en los huevos procedentes de las corvinas salvajes. En cuanto a las clases de lípidos, las larvas de 1 día obtenidas de las puestas de las

corvinas salvajes contenían mayor cantidad de lípidos polares en sus tejidos mientras que las procedentes de las puestas de corvinas cultivadas contaban con más sustancias de reserva (ésteres de esteroles y total de lípidos neutros). Estos resultados confirman que la calidad de las puestas de la corvina salvaje fue mayor, ya que la composición lipídica de los huevos y las larvas les proporcionó mayor energía para la eclosión y la supervivencia larvaria en ayuno. Estas diferencias pueden ser debidas a la diferente dieta que se administró a los dos stocks de reproductores, siendo exclusivamente pienso en las corvinas de cultivo mientras que a las corvinas salvajes se les ofrecía calamar o sardina un día a la semana.

6. Conclusiones

Reproductores cultivados

- En el tanque C1, las hembras son de mayor tamaño que los machos, mientras que en el tanque C2 no hay diferencias entre ambos sexos. No hay diferencias significativas entre las tasas de crecimiento (SGR) de las hembras y los machos ni entre los dos tanques en un mismo año.
- La gametogénesis empieza en diciembre y termina en marzo en los años 2009 y 2010, cuando se usa un fotoperiodo natural (15hL:9hO en verano y 9hL:15hO en invierno), tal como indican los resultados del análisis de hormonas esteroideas.
- La maduración de la corvina empieza en abril y acaba en junio (2009 y 2010) y la puesta se realiza en abril y mayo en el 2009 y en mayo en el 2010.
- El cambio en el fotoperiodo, de natural (15hL:9hO en verano y 9hL:15hO en invierno) a constante (14hL:8hO), provoca un retraso en la maduración de la corvina obteniéndose las puestas con dos meses de retraso desde junio a septiembre de 2011.
- Los huevos de las puestas del tanque C1 de abril de 2009 parecen ser de mejor calidad dado su mayor diámetro ($1011 \pm 14 \mu\text{m}$), mayor tasa de eclosión ($35.4 \pm 2.2\%$), mejor supervivencia larvaria a día 5 ($72.0 \pm 5.4\%$) y mayor supervivencia en condiciones de ayuno (11 ± 0.7 días), aunque el volumen de huevos flotantes fue menor respecto a las puestas de mayo de 2009 y 2010. Además, la composición en ácidos grasos de los huevos obtenidos de las puestas de 2009 mostró un mayor contenido en PUFA lo que se tradujo en una mejor composición larvaria, que a su vez influyó en una mayor supervivencia a día 3 y 5 después de la eclosión y una mejor resistencia al ayuno prolongado.
- Las puestas de 2011 pueden considerarse de mala calidad ya que no hubo eclosión de las larvas probablemente debido a las malas condiciones físicas de los peces tras la manipulación excesiva (muestreos mensuales de peso y talla, toma de muestras de sangre, inducción hormonal, etc.) a la que fueron sometidos durante 3 años, aunque tampoco se puede descartar un efecto del cambio de fotoperiodo.

Reproductores salvajes

- Las hembras cuentan con un peso mayor que los machos y muestran una mayor tasa de crecimiento anual.
- La maduración gonadal y la puesta ocurren en un plazo muy reducido de tiempo (primavera) y empieza generalmente en abril terminando alrededor del mes de junio, lo que ha de tenerse en cuenta a la hora de planificar la producción larvaria de esta especie.
- Las puestas se han obtenido siempre entre los meses de abril y mayo, con una temperatura menor o igual a 20°C.
- Después de cada inducción hormonal, el tamaño ovocitario y la distribución bimodal de los ovocitos, considerada como el mejor indicador de la maduración de la hembra, se recupera al cabo de un mes en 2010, pero se adelanta en el caso del año 2011 a apenas dos semanas.
- No hay diferencias significativas entre los parámetros de calidad de puestas y larvas considerados en este estudio entre los años 2010 y 2011. La tasa de fecundación media de los huevos fue del $95.2\pm 6.4\%$, el diámetro de los huevos fecundados de $921.6\pm 30.6 \mu\text{m}$, el peso seco de $48.4\pm 5.0 \mu\text{g}$, la tasa de eclosión del $89.9\pm 14.5\%$, la supervivencia larvaria a día 3 fue del $81.8\pm 19.5\%$, la supervivencia larvaria a día 5 fue del $73.3\pm 23.1\%$ y las larvas sobrevivieron 10.2 ± 1.0 días en ayuno. En cambio, el porcentaje de huevos con más de una gota de grasa fue significativamente mayor en 2011 aunque no parece influir en la calidad de la puesta.
- Los huevos y las larvas de 1 día obtenidos de las puestas de 2010 presentaron mayor contenido en ácidos grasos saturados y monoinsaturados y menor en PUFA que los obtenidos en 2011.

Comparación entre corvinas cultivadas y salvajes

- El peso de las corvinas de origen salvaje era mayor que el de las corvinas de cultivo (G1) lo que pudo influir en la cantidad de puestas obtenidas, como indica el mayor número de huevos por hembra obtenidos a partir de individuos salvajes.
- La inducción a la puesta mediante inyección de GnRH α en la corvina de cultivo fue efectiva en el 33.3% de los casos, mientras que en la corvina salvaje fue del 71.4%.
- El volumen medio de huevos flotantes por puesta de las corvinas de cultivo fue de 0.5 L, mientras que el de las corvinas salvajes fue de 1.1vL, en este caso hay que tener en cuenta la diferencia de peso y talla existente sobre todo en el caso de las hembras.

- Las puestas de la corvina salvaje podrían considerarse como de mejor calidad dada sus mayores tasas de fecundación y eclosión de los huevos, y a la capacidad de las larvas para sobrevivir los primeros días de vida en ayuno.
- Los huevos obtenidos de corvinas salvajes mostraron una composición en ácidos grasos con mayor contenido en n-3 PUFA (en forma de DPA y DHA) y de lípidos polares (en forma de PE y PC) que los procedentes de puestas de corvinas de cultivo, más ricos en n-6 PUFA.
- Las larvas recién eclosionadas no mostraron grandes diferencias en cuanto al perfil de ácidos grasos, excepto en el caso del 18:2n-6 mayor en las cultivadas (y procedente de la soja usada en la fabricación de piensos para reproductores). Sin embargo sí se encontraron diferencias significativas en las clases de lípidos. Las larvas procedentes de reproductores salvajes contenían una mayor cantidad de lípidos polares mientras que las de cultivo contenían mayor cantidad de lípidos neutros, especialmente colesterol y ésteres de esteroles presentes principalmente en la gota de grasa.

7. Bibliografía

Ballagh, D.A., Pankhurst, P.M. y Fielder D.S. 2011. Embryonic development of mulloway, *Argyrosomus japonicus*, an egg surface disinfection using ozone. *Aquaculture* 318, 475-478.

Barbaro, A., Francescon, A., Bertotto, D., Bozzato, G., Di Maria, I., Patarnello, P., Furlan, F. y Colombo, L. 2002. More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonista in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture. *Journal of Applied Ichthyology* 18, 192-199.

Basaran, F., Muhtaroglu, CG., Özden, O. y Özkizilcik, S. 2009. Spawning behaviour of shi drum (*Umbrina cirrosa*) after hormone administration. *Journal of Fisheries Science* 32, 124-133.

Battaglione, SC. y Talbot, RB. 1994. Hormone induction and larval rearing of mulloway, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces Sciaenidae). *Aquaculture* 126, 73-81.

Bromage, N.R., Whitehead, C., Elliot, J., Breton, B. y Matty, A. 1982. Investigations into the importance of daylength on the photoperiodic control of reproduction in the female *rainbow trout*. En: *Reproductive Physiology in Fish.* (ed: C. Richter y H. Goos). Pudoc Press, Wageningen, pp. 233-236.

Bromage, N., Porter, M. Y Randall, C. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with the special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98.

Cárdenas, S. 2009. Acuicultura de Esciénidos en el Mundo. Curso sobre Avances de la Acuicultura. Fundación de la Universidad de Málaga. Vélez-Málaga, Málaga, Julio, 2009.

Cárdenas, S. 2010. Crianza de la Corvina (*Argyrosomus regius*). Cuadernos de Acuicultura nº3. Fundación Observatorio Español de Acuicultura.

Carrillo, M., Bromage, N., Zanuy, S., Serrano, R. y Prat, F. 1989. The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 81, 351-365

Christie, W.W. 1982. Lipid Analysis. Robert Maxwell, M.C., Oxford.

Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Vallés, R. y Mylonas, C.C. 2012. Reproductive development, GnRH-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1273-1286.

Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Valencia, A., Salí, M. y Vergara, J.M. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of githead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 132, 325-337.

Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S. y Robaina, L. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. Informes técnicos del Instituto Canario de Ciencias Marinas. Número 12 (200 pp.). Telde, Gran Canaria.

Fielder, D.S. y Heasman, M.P. 2011. Hatchery Manual for the Production of Australian Bass, Mulloway and Yellowtail Kingfish. Industry & Investment NSW, ISBN 978 1 74256 058 8. 176pp.

Folch, J.M., Lees, M. y Sloane Standley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.

Francis-Floyd, R. y Floyd, M.R. 2011. *Amylodinium ocellatum*, an important parasite of cultured marine fish. Southern Regional Aquaculture Center publication 4705, 1-11.

Giménez, G., Estévez, A., Lahnsteiner, F., Zecevic, B., Bell, J.G., Henderson, R.J., Piñera, J.A. y Sanchez-Prado, J.A. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260, 232-243.

González-Quirós, R., Árbol, J., García-Pacheco, M.M., Silva-García, A.J., Naranjo, J.M. y Morales-Nin, B. 2011. Life-history of meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research* 109, 140-149.

- Holt, G.J., Johnson, A.G., Arnold, C.R., Fable, W.A. y Williams, T.D. 1981 Description of eggs and larvae of laboratory reared red drum, *Sciaenops ocellata*. Copeia 4, 751-756.
- Holt, S.A., Holt, G.J. y Young-Abel, L. 1988. A procedure for identifying sciaenid eggs. Contributions in Marine Science 30 (supplement), 99-108.
- Jiménez, M.T., Pastor, E., Grau, A., Alconchel, I. y Cárdenas, S. 2005. Revisión sobre el cultivo de esciénidos en el mundo, con especial atención a la corvina (*Argyrosomus regius*): Boletín. Instituto Español de Oceanografía 21, 169-176.
- Kjorsvik, E., Mangor Jensen, A. y Holmefjord, I. 1990. Egg quality in fishes. Advances in Marine Biology 26, 71-113.
- Kucherka, W.D., Thomas, P. y Khan, I.A. 2006. Sex differences in circulating steroid hormone levels in the red drum, *Sciaenops ocellatus* L. Aquaculture Research 37, 1464-1472.
- Lahnsteiner, F. y Patarnello, P. 2004. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters. Aquaculture 237, 443-459.
- Lahnsteiner, F. y Patarnello, P. 2005. The shape of the lipid vesicle is a potential marker for egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, and in the sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo*. Aquaculture 246, 423-435.
- Lahnsteiner, F., Giménez, G. y Estévez A. 2008. Egg quality determination based on the shape of the lipid vesicle in common dentex, *Dentex dentex*. Aquaculture Research 39, 144-149.
- Lee, W.K. y Yang, S.W. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). Aquaculture 207, 169-183.
- Mandich, A., Massari, A., Bottero, S., Pizzicori, P., Goos, H. y Marino, G. 2004. Plasma sex steroid and vitellogenin profiles during gonad development in wild Mediterranean amberjack (*Seriola dumerilii*). Marine Biology 144, 127-138.
- Mañanós, E.L., Zanuy, S. y Carrillo, M. 1997. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 β -estradiol and vitellogenin levels. Fish Physiology and Biochemistry 16, 211-222.
- Mylonas, CC., Kyriakou, Y., Sigelaki, I., Georgiou, G., Stephanou, D. y Divanach, P. 2004. Reproductive biology of the of shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRH α . The Israeli Journal of Aquaculture 56, 75-92.

- Olsen, R. E. y Henderson, R.J. 1989. The rapid analysis of neutral and polar lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 129, 189-197.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., de Mones, A. y Fostier, A. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *General and Comparative Endocrinology* 78, 361-373.
- Prat, F., Zanuy, S., Bromage, N. y Carrillo, M. 1999. Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass. *Journal of Fish Biology* 54, 125-137.
- Saka, Ş., Firat, K. y Coban, D. 2006. Embryonic development of Common Dentex (*Dentex dentex* L.) eggs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 30, 35-40.
- Samaee, S.M., Estévez, A., Giménez, G. y Lahnsteiner, F. 2009. Evaluation of quantitative importance of egg lipids and fatty acids during embryos and larvae development in marine pelagophil teleosts: with an emphasis on *Dentex dentex*. *Journal of Experimental Zoology* 311A, 735-751.
- Samaee, S.M. y Estévez, A. 2012. Embryo and larva development in *dentex dentex*, a marine pelagophil teleost: an endeavor to find a series of new fatty acid interrelations. *Journal of Experimental Zoology* 317, 55-72.
- Samaee, S.M., Mente, E. y Estévez, A. 2013. Egg protein bound amino acid content and embryo/larva success in common dentex (*Dentex dentex*), a marine pelagophil teleost. *Animal Biology* 63, 59-75.
- Schiavone, R., Zilli, L., Storelli, C. y Vilella, S. 2012. Changes in hormonal profile, gonads and sperm quality of *Argyrosomus regius* (Pisces, Sciaenidae) during the first sexual differentiation and maturation. *Theriogenology* 77, 888-898.
- Shields, R.J., Brown, N.P. y Bromage, N.R. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture* 155, 1-12.
- Thomas, P. y Boyd, N. 1988. Induced spawning of spotted seatrout, red drum and orangemouth corvina (Family: Sciaenidae) with luteinizing hormone-releasing hormone analog injection. *Contributions in Marine Science* 30, 45-48.
- Thomas, P., Arnold, C.R. y Holt, G.J. 1995. Red drum and other sciaenids. En: *Broodstock management and egg and larval quality*. (ed. N.R. Bromage y R.J. Roberts). Blackwell Science Ltd, Cambridge UK, 118-137.
- Zanuy, S., Prat, F., Carrillo, M. y Bromage, N.R. 1995. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -estradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources* 8, 147-152.

Capítulo 2. Cultivo larvario de la corvina

1. Osteología del esqueleto axial y apendicular de la corvina *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) y desarrollo temprano del esqueleto en dos instalaciones de cultivo

Introducción

La corvina, *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) es una especie recientemente adaptada para la acuicultura, y presenta un alto valor económico en el Mediterráneo y en la parte sur de la costa Atlántica Europea. Esta especie muestra una tasa de crecimiento elevada (aprox. 1 kg año⁻¹) y un rápido desarrollo larvario (Estévez et al. 2007; Roo et al. 2010). Se ha realizado una descripción preliminar de las primeras etapas de desarrollo de la corvina por Cárdenas (2011), sin embargo, el desarrollo osteológico todavía es poco conocido en larvas y juveniles de esta especie y otros esciénidos. Las características osteológicas se han utilizado durante años como herramientas para describir las características fenotípicas que permiten la identificación de especies y su filogenia (Feltham y Marquiss, 1989), pero también para evaluar la calidad de numerosas especies de peces cultivados (Boglione et al. 2003; Fraser et al. 2004). El desarrollo osteológico de las larvas de peces se ha descrito para clupeidos como la sardina (Matsuoka 1997), para espáridos como la dorada (*Sparus aurata*), la dorada del Japón (*Pagrus major*), el dentón (*dentex dentex*) y el sargo (*Diplodus sargus*) (Matsuoka 1985, 1987; Koumoundouros et al. 1997a, 2001a; Sfakianakis et al. 2003), para meros como el mero moreno (*Epinephelus marginatus*) y el mero carcelario (*Epinephelus septemfasciatus*) (Nagano et al. 2007; Boglione et al. 2009), y para la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Koumoundouros et al. 2001b) entre otros.

Durante mucho tiempo, las deformaciones esqueléticas han sido identificadas como un obstáculo para la producción de juveniles de calidad y para programas de repoblamiento (Hickey 1972; Le Vay et al. 2007). En el cultivo larvario, las deformaciones esqueléticas son indeseables para el bienestar de los peces, porque afectan al estado físico y disminuyen el valor de mercado. Los peces deformados se descartan manualmente (Divanach et al. 1997; Koumoundouros et al. 1997a, 1997b, 1999) lo que representa una pérdida económica significativa para los acuicultores. Hay diferentes tipos de deformaciones esqueléticas y se pueden encontrar desde el cráneo hasta la cola. Se ha observado que un gran número de factores nutricionales, genéticos y ambientales influyen en el desarrollo de los huesos (Cahu et al. 2003), y no solo afectan a la morfología externa sino también al crecimiento y la supervivencia. Se ha realizado una revisión por Lall y Lewis-McCrea (2007) y Koumoundouros (2010) sobre las causas multifactoriales que provocan la aparición de deformaciones esqueléticas en acuicultura. El conocimiento de las deformaciones en las primeras etapas de vida de los peces es una herramienta vital para la evaluación de la calidad y la gestión de las granjas. Sin embargo, existe poca información sobre el desarrollo osteológico de la columna vertebral y las aletas de la larva de corvina.

Este estudio describe la osteología de la columna vertebral y las aletas de la larva de corvina. Además, también compara el desarrollo de estas estructuras entre las larvas cultivadas en dos instalaciones diferentes, por un lado el centro de investigación IPIMAR en Olhão (Portugal) y por el otro el centro de investigación IRTA-SCR en Sant Carles de la Ràpita (España), donde los peces fueron sometidos a condiciones de cultivo intensivo pero con diferentes regímenes de luz y temperatura.

Materiales y métodos

Los huevos fertilizados se obtuvieron de reproductores de corvina de origen salvaje estabulados en el IPIMAR y en el IRTA mediante una inyección de GnRHa (Duncan et al. 2008). Los huevos y las larvas de ambas localidades fueron incubados y cultivadas en las condiciones que se muestran en la tabla 1. La temperatura y la salinidad fueron registradas diariamente, mientras que el amoníaco y los nitritos se registraron una vez a la semana comprobando que los valores estuvieran por debajo de los límites aceptables durante todo el experimento. Del día 2 al 15, las larvas de ambas localidades fueron alimentadas con rotíferos enriquecidos (2 h, 26°C, 250 individuos mL⁻¹, 0.15 g L⁻¹ Easy Selco, INVE, Bélgica) manteniendo una densidad de 10 rotíferos mL⁻¹. Del día 14 al 50, las larvas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecida (18 h, 28°C, 300 individuos mL⁻¹, 0.6 g L⁻¹ Easy Selco) manteniendo una densidad de 1 ind mL⁻¹. El día 17 en IPIMAR y el 20 en IRTA-SCR se añadió pienso (Gemma Micro 300, Skretting, Noruega).

Tabla 1. Condiciones del cultivo larvario de la corvina utilizado en las instalaciones de IPIMAR e IRTA-SCR.

	Instalación	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (intensidad luz)	O ₂ (mg/L)	Salinidad (‰)	Densidad (individuos/L)	Tasa de eclosión (%)
Huevos	IRTA-SCR	18.7±0.4	0hL:24hO	6.7±0.4	36.3±0.1	2600	97.0±2.0
	IPIMAR	20.0±0.5	14hL:10hO	5.4±1.0	37.1±1.0	2600	95.0±2.0
Larvas	IRTA-SCR	18.3±0.5	18hL:6hO (500 lux)	7.0±0.6	36.3±0.9	50	-
	IPIMAR	19.8±1.0	14hL:10hO (1500 lux)	5.4±0.9	37.1±1.0	50	-

Cada día desde el día 0 al 20 y cada dos días desde el 20 hasta el día 50 de cultivo, se tomaron 20 larvas que fueron anestesiadas con MS-222 (Sigma-Aldrich, Saint Louis) y fijadas durante toda la noche en paraformaldehído tamponado al 4%. Las larvas se lavaron durante 30 min con un tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4 y se conservaron en etanol al 70% a 4°C hasta su posterior tinción. Las larvas fueron teñidas para la detección del hueso y el cartílago mediante una adaptación del método descrito anteriormente como tinción de ácido libre con rojo de alizarina S y azul de alcian 8GX (Walker y Kimmel, 2007). Las fotografías y las mediciones de la longitud total de las larvas teñidas fueron realizadas con un estereomicroscopio (Leica MZ9.0) equipado con una cámara (sistema de análisis CellF[®], Olympus, Hamburgo, Alemania) en IPIMAR y una lupa (Nikon SMZ800, Nikon, Tokio, Japón) conectada a una cámara digital (Olympus DP25, Olympus, Alemania) y a un analizador de imagen (analySIS, SIS, GmbH, Alemania) en el IRTA-SCR. Se han utilizado los individuos de IPIMAR para describir e ilustrar el esqueleto completamente formado y los individuos de IPIMAR y del IRTA-SCR para describir, ilustrar y comparar el desarrollo esquelético en las primeras etapas de vida. Los análisis merísticos de las aletas y la columna vertebral se realizaron al final del experimento (día 50) utilizando un total de 20 individuos de IPIMAR seleccionados al azar. Las representaciones esquemáticas del desarrollo de las estructuras esqueléticas fueron dibujadas en fotografías de larvas teñidas con Adobe[®]

Illustrator[®] CS4 (14.0.0). La terminología usada se ha obtenido de Matsuoka (1985, 1987) y Boglione et al. (2001) con algunas adaptaciones para la corvina.

Resultados

Columna vertebral

La columna vertebral de los individuos más grandes analizados en IPIMAR (Fig. 1a) estaba compuesta por (i) 25 vértebras distribuidas en cinco cefálicas, cinco pre-hemales (con parapófisis), once hemales (con arcos neurales y hemales) y tres vértebras caudales (con arcos neurales y hemales modificados para apoyar la aleta caudal) incluyendo el urostilo (un cuerpo vertebral modificado orientado ascendentemente); y (ii) nueve pares de costillas pleurales y epipleurales (Fig. 2, Tabla 2). Estos son valores modales, lo que explica por qué la suma de los diferentes tipos de vértebras no suman el número total de vértebras.

Figura 1. (a) Juvenil de corvina (35 días) teñido para la detección del hueso y el cartilago, con el esqueleto axial, craneal y apendicular totalmente formado. (b) Zona abdominal ampliada donde se observan las costillas pleurales y epipleurales. El rectángulo en (a) representa la zona ampliificada de (b). AF: aleta anal, CaV: vértebras caudales, CF: aleta caudal, DF: aleta dorsal, EpR: costillas epipleurales, Lt: lepidotrichia. PR: costillas pleurales, Sp: espinas, Ur: urostilo. Barras de medida: (a)=1.5 mm; (b)=0.5 mm

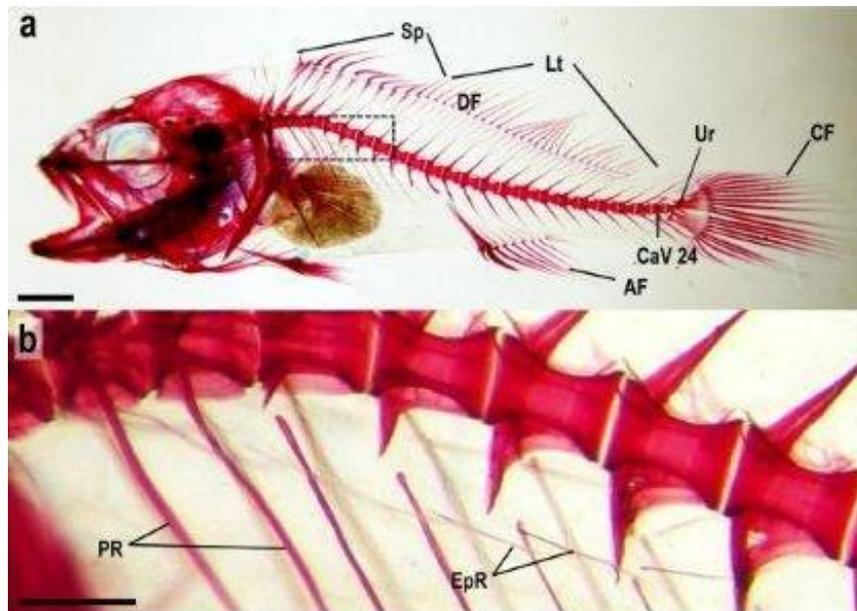
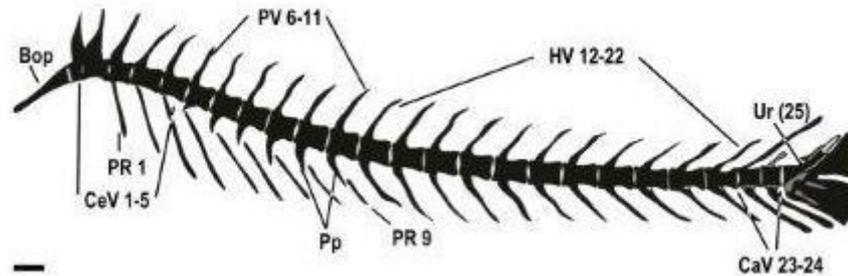


Figura 2. Representación esquemática del esqueleto de una larva de corvina de 25 días (IPIMAR). Las zonas grises representan el cartílago, las zonas negras representan las estructuras mineralizadas y las zonas blancas representan la notocorda. Bop: proceso basioccipital, CeV: vértebras cefálicas, CaV: vértebras caudales, HV: vértebras hemales, Pp: parapófisis, PR: costillas pleurales, PV: vértebras pre-hemales, Ur: urostilo. Barra de medida=0.5 mm.



Aletas

El esqueleto apendicular de la corvina se compone de dos aletas pectorales, dos pélvicas, una dorsal, una anal y una caudal. En este trabajo sólo se describe la ontogenia y la anatomía esquelética de las aletas dorsal, anal y caudal. Los individuos más grandes y de mayor edad de IPIMAR muestran una aleta dorsal compuesta por 11 espinas duras anteriores y 27 radios suaves posteriores o también llamado lepidotrichia. Además, la aleta dorsal posee un soporte interno de elementos intracartilaginosos formado por 3 pre-dorsales, 35 pterigióforos proximales (más la suspensión), 35 pterigióforos intermedios y 36 pterigióforos distales (Fig. 3a, 3d; Tabla 2). Las dos primeras espinas duras y los dos últimos radios suaves (lepidotrichia) se articulan con un pterigióforo mientras que las otras espinas duras y la lepidotrichia se articulan cada una con un pterigióforo (Fig. 3a).

La aleta anal se compone por un esqueleto interno intracartilaginoso, formado por 7 pterigióforos proximales (más la suspensión), 7 pterigióforos intermedios y 7 pterigióforos distales y un esqueleto externo formado por 2 espinas duras y 8 radios suaves llamados lepidotrichia (Fig. 3b, 3c, Tabla 2). Las dos espinas duras y la séptima y la octava lepidotrichia se articulan con un pterigióforo y los restantes radios suaves o lepidotrichia se articulan cada una con un pterigióforo. El primer pterigióforo proximal se articula con la espina hemal de la vértebra 12 (Fig. 4f).

La aleta caudal está compuesta por 5 dermatotrichia dorsales y 6 ventrales, articulándose dorsalmente con los epurales y el arco neural modificado y ventralmente con los dos arcos hemales modificados (Fig. 3e). La mayor parte de la lepidotrichia se articula con los cinco hipurales y la parhipural. Sobre el urostilo se observa dorsalmente un uroneural intramembranoso. También se observan dos cartílagos accesorios entre los dos arcos hemales modificados y entre el arco hemal modificado 24 y el parhipural.

Tabla 2. Características merísticas de la corvina de IPIMAR.

Esqueleto	Estructura		Moda	Rango
Axial	Columna vertebral	Cefálica	5	4-5
		Pre-hemal	5	5-6
		Hemal	11	10-12
		Caudal	3	3
		Total	25	23-26*
	Costillas epipleurales	9	8-10	
	Costillas pleurales	9	7-9	
Apendicular	Aleta dorsal	Espinas	11	10-11
		Lepidotrichia	27	25-30
	Aleta anal	Espinas	2	2
		Lepidotrichia	8	7-8
	Aleta caudal	Dermatotrichia	11	10-12
		Lepidotrichia	20	19-22

*Se incluye el Urostilo.

Figura 3. Representación esquemática de las aletas de una larva de corvina de 25 días (IPIMAR) en la que se muestra las estructuras esqueléticas prácticamente formadas. (a) aleta dorsal, (b) aleta anal, (c) ampliación del segundo pterigióforo y su correspondiente lepidotrichia de la aleta anal, (d) ampliación del séptimo pterigióforo y su correspondiente lepidotrichia de la aleta dorsal, (e) aleta caudal. Las zonas grises representan cartílago, las negras estructuras mineralizadas y las blancas la notocorda. Ac: cartílago accesorio, AnPT: pterigióforos de la aleta anal, CaDt; dermatotrichia de la aleta caudal, CaLt: lepidotrichia de la aleta caudal, DPt: pterigióforo distal, DoPt: pterigióforo de la aleta dorsal, Ep: epural, Hy: hipural, IPt: pterigióforo intermedio, MoHS: arco hemal modificado, MoNS: arco neural modificado, PPt: pterigióforo proximal, PrD: predorsal, PrH: parhipural, R: radios suaves o lepidotrichia, S: espina, Ur: urostilo, UrN: uroneural. Barra de escala = 0.5 mm.

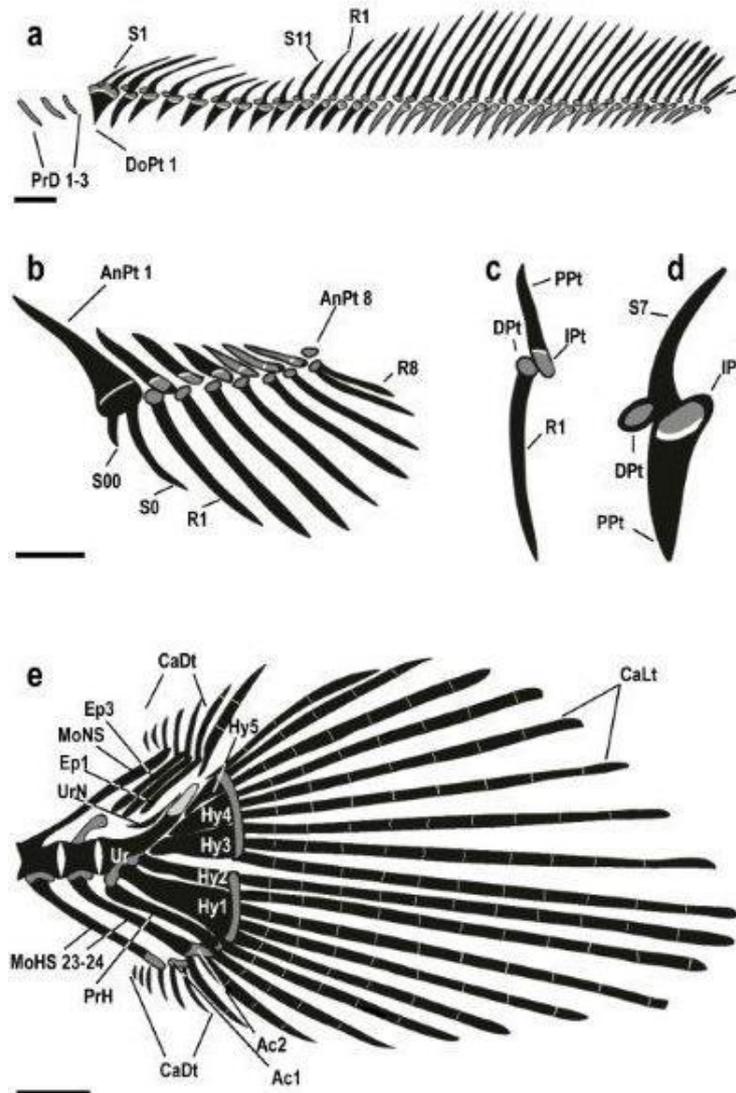
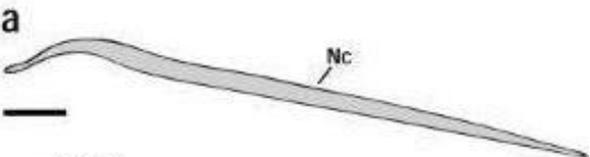
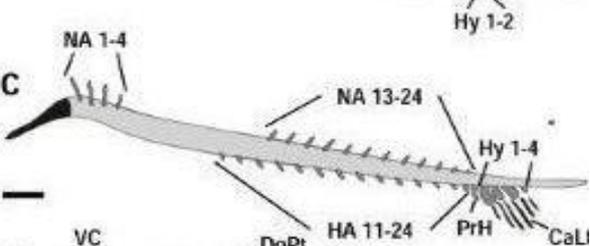
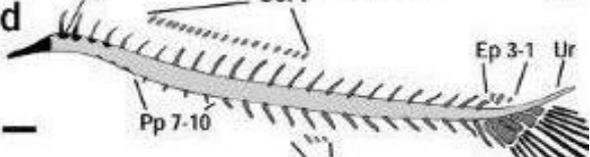
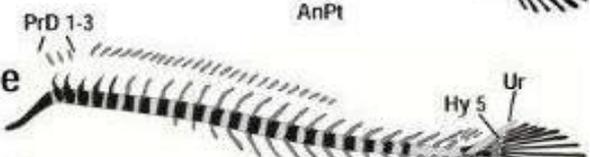


Figura 4. Representación esquemática del desarrollo del esqueleto axial y apendicular de la larva de corvina cultivada en IPIMAR y en IRTA-SCR dividido en seis estados diferentes de desarrollo (a-f). En las columnas de la parte de la derecha están representadas la edad y la longitud total de las larvas en cada estado de desarrollo. Las partes grises representan cartílago, las negras estructuras mineralizadas y las blancas la notocorda. AnLt: lepidotrichia de la aleta anal, AnPt: pterigióforos de la aleta anal, AnSp: espinas duras de la aleta anal, Bop: proceso basioccipital, CaDt: dermatotrichia de la aleta caudal, CaLt: lepidotrichia de la aleta caudal, DoLt: lepidotrichia de la aleta dorsal, DoPt: pterigióforos de la aleta dorsal, DoSp: espinas duras de la aleta dorsal, Ep: epurales, HA: arco hemal, Hy: hipural, NA: arco neural, Nc: notocorda, Pp: parapofisis, PrD: predorsales, PrH: parhipural, Ur: urostilo, VC: centros vertebrales. En el estado de desarrollo (c), aunque no está representado, en las larvas del IRTA-SCR los arcos neurales 2 y 3 presentan signos de mineralización (*). En el IRTA-SCR, dos peces de 28 días se ilustran en dos estados de desarrollo, (c) y (d), debido a la gran variabilidad de talla que existe en esta especie (§). Barra de escala = 0.5 mm.

Estado de desarrollo	Edad (días)		Longitud total (mm)	
	IPIMAR	IRTA-SCR	IPIMAR	IRTA-SCR
	6	19	3.56	3.99
	10	22	4.05	4.93
	14	28§	4.85	5.47
	16	28§	5.42	6.01
	18	40	5.58	6.06
	30	50	12.46	11.38

Desarrollo de la columna vertebral

El desarrollo de la columna vertebral se evaluó en muestras de IPIMAR y de IRTA-SCR. No se detectaron diferencias en los estados embrionarios ni en los estados larvarios tempranos entre los individuos cultivados en ambas instalaciones bajo diferentes condiciones ambientales. En estas etapas no se formó ningún elemento óseo o cartilaginoso del esqueleto axial. El desarrollo osteológico de la corvina se dividió en seis etapas distintas desde la (a) a la (f) (Fig. 4). La única estructura de apoyo presente en la primera etapa de desarrollo (Fig. 1a) fue la notocorda, y se observa en larvas de 6 días y 3.5 mm de longitud total (Lt) en IPIMAR y de 19 días y 3.99 mm Lt en IRTA-SCR. Los arcos neurales 2 y 3 fueron los primeros elementos del esqueleto axial que se formaron, seguidos por los arcos neurales 1 y 4 (Fig. 4b). Los arcos aparecen cartilaginosos a través de la columna vertebral (Fig. 4). Los dos primeros arcos neurales (2-3) empezaron a osificarse en larvas de 28 días y 5.47 mm Lt del IRTA-SCR, mientras que las de IPIMAR, los mismos arcos neurales 2-3 ya se habían desarrollado en larvas más pequeñas (14 días con 4.85 mm Lt), mostrando también los arcos neurales 1 y 4 y los arcos neurales 13-24 (Fig. 4c). La osificación inicial de los arcos neurales y las vértebras primordiales fue detectada en larvas de 16 días con una Lt de 5.42 mm (Fig. 4d), cuando el resto de los arcos neurales (cartilaginosos) ya estaban presentes. En el estado de desarrollo (d), empezó la flexión hacia arriba de la parte posterior de la notocorda formándose el urostilo. El cartílago de los arcos neurales 1-4 sufrió una osificación pericondral y una deposición mineral sobre la vaina fibrosa de la notocorda, rodeando el arco neural y extendiéndose bilateralmente en dirección dorso-ventral mediante mineralización pericordal, formando los centros vertebrales (Fig. 4d). Este proceso sólo se observó para estas cuatro vértebras, mientras que las restantes se formaron mediante la deposición mineral en los centros de mineralización neural y hemal (sitios de fijación para la notocorda) en la base de los arcos, que se extendía ventral y dorsalmente formando el cordacentro. Estas últimas vértebras se formaron en sentido anteroposterior, dando lugar a la columna vertebral. Debido a la alta variabilidad en el tamaño de las larvas a día 28 en el IRTA-SCR, individuos de la misma edad sirvieron como modelos para representar los estados de desarrollo (c) y (d). Las larvas del estado de desarrollo (e) muestran una columna vertebral altamente osificada. En esta etapa, sólo la vértebra hemal 22, las caudales 23 y 24 y sus correspondientes arcos no mostraron signos de mineralización. Mientras que el urostilo comenzó a osificarse dorsalmente.

Los primeros arcos hemales cartilaginosos que aparecieron fueron el 12 y el 13, poco después de la aparición de los arcos neurales 2 y 3 (no se muestra). En el estado de desarrollo (c), los arcos hemales 11-24 ya estaban presentes (Fig. 4c). Las parapófisis de las vértebras pre-hemales sólo fueron visibles en el estado de desarrollo (d), inmediatamente antes de la formación del centro de mineralización de las vértebras hemales (Fig. 4d). En el estado de desarrollo (f) (Fig. 4f), todos los centros vertebrales y los arcos estaban mineralizados, mostrando todos los elementos vertebrales. En etapas

posteriores, las estructuras crecieron en tamaño y complejidad trabecular, junto con un aumento del volumen del hueso (Fig. 1a).

Desarrollo de las aletas

El desarrollo de las aletas se evaluó en individuos de IPIMAR y de IRTA-SCR (Fig. 4). Los primeros elementos de la aleta dorsal que se formaron fueron los pterigióforos proximales de la porción media de la aleta en el estado de desarrollo (d). Los pterigióforos continuaron desarrollándose hacia la parte anterior y posterior (Fig. 4e), seguidos por los tres pre-dorsales. En el estado de desarrollo (f), las espinas y la lepidotrichia ya estaban formadas y osificadas, sin embargo, los pre-dorsales y los pterigióforos posteriores eran todavía cartilagosos o empezaban a mineralizarse. Los pterigióforos distales seguían siendo cartilagosos en esta etapa (Fig. 4f).

El desarrollo de la aleta anal siguió un patrón similar al de la aleta dorsal, con los tres primeros pterigióforos proximales formados en el estado de desarrollo (d) en la parte media de la aleta. En el estado de desarrollo (e), se formaron seis pterigióforos proximales y las tres primeras lepidotrichias mineralizadas. En el estado de desarrollo (f), todas las espinas y la lepidotrichia estaban formadas y mineralizadas, mientras que los tres últimos pterigióforos proximales y la suspensión permanecieron cartilagosos (Fig. 3b, 4f).

Los primeros elementos que se formaron en la aleta caudal fueron los hipurales 1 y 2 (Fig. 4b). En el estado de desarrollo (c), los hipurales 3 y 4, los parhipurales y la primera lepidotrichia mineralizada ya estaban presentes (Fig. 4c). Los tres epurales se formaron dorsalmente acompañando la flexión inicial del urostilo en las larvas del estado de desarrollo (d). En el siguiente estado de desarrollo (e), el hipural 5 ya estaba presente, mientras que los otros comenzaron a calcificarse por osificación pericondral. En el estado de desarrollo (f), se encontró formada la mayoría de la dermatotrichia y los elementos restantes de la aleta caudal estaban casi completamente formados y mineralizados, excepto el urostilo y los epurales, que todavía estaban llevando a cabo la osificación (Fig. 4f).

Discusión

Las larvas de la corvina mostraron un crecimiento rápido en ambas instalaciones de cultivo. Bajo una intensidad de luz más fuerte y una temperatura de 20°C se detectó mayor crecimiento y un desarrollo esquelético más rápido obteniéndose un esqueleto completamente formado a día 30. El modelo de formación de los elementos esqueléticos en corvina parece ser similar al de otras especies de peces, como la breca (*Pagellus erythrinus*) o el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*), en los cuales los procesos neurales 1-4 y 11-21 y 2-3 y 15-18 respectivamente, fueron los primeros en observarse en la columna vertebral (Sfakianakis et al. 2004, 2005). Durante el desarrollo de la corvina, la osificación vertebral también es parecida a lo que se ha observado en otras especies, en

la cual, durante la formación del centro de la vértebra, la osificación pericordal se observa antes de la mineralización de la vaina fibrosa de la notocorda (Schaeffer 1967). Este proceso se ha descrito en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el cual el cordacentro se forma en un patrón segmentado por la mineralización de la notocorda. Esto da lugar a anillos mineralizados en el lado dorsal o ventral de la notocorda (probablemente debido a la contribución del cordoblasto) y se extiende alrededor de la vaina de la notocorda, seguida de la movilización osteoblástica y la formación del hueso pericordal (Grotmol et al. 2003, 2005; Nordvik et al. 2005). Asimismo, durante la formación temprana del centrum en larvas de pez cebra (*Danio rerio*), una matriz osteoide acelular producida por la notocorda se deposita en un patrón de rayas periódico (Fleming et al. 2001). En larvas de medaka (*Oryzias latipes*), se ha demostrado que el centro surge de hueso acelular depositado alrededor de la notocorda (Ekanayake y Hall, 1988). Sin embargo, un estudio más reciente muestra que la deposición del hueso pericordal ocurre después de la mineralización de la vaina de la notocorda (Inohaya et al. 2007). A diferencia de los salmónidos (*S. salar*) y los ciprínidos (*D. rerio*) e igual que los adriánictidos (*O. latipes*), la corvina (*A. regius*) posee un hueso acelular. Los distintos tipos de hueso (celulares y acelulares) que se encuentran en diferentes especies de peces muy separadas filogenéticamente indican que el modelo ontogénico del desarrollo de los elementos vertebrales se estableció en los primeros linajes de los peces teleósteos (Arratia et al. 2001).

Las características merísticas caracterizan una especie determinada (Lewis y Lall, 2006). En dorada, se ha observado que las larvas de cultivo muestran una mayor variabilidad en el número de elementos esqueléticos que las larvas capturadas en el mar (Bogliione et al. 2001). Estas diferencias entre larvas de cultivo y salvajes, junto con la presencia de deformaciones esqueléticas, se han propuesto como un indicador de que las condiciones de cultivo no son las óptimas (Lewis y Lall, 2006). En este trabajo, los individuos cultivados en IPIMAR que fueron utilizados para realizar el análisis merístico, muestran números de estructuras esqueléticas similares a las descritas para la corvina en la literatura (Whitehead et al. 1986; Fischer et al. 1987; Griffiths y Heemstra, 1995; Dulčić et al. 2009), lo que indica que los individuos cultivados no difirieron significativamente de los salvajes.

Teniendo en cuenta la composición final de la columna vertebral, la corvina muestra un número de vértebras (25) similares a las que se han descrito para otras especies de la misma familia, como en corvinón ocelado (Topp y Cole, 1968), indicando que podría ser una característica conservada entre los esciénidos. En una revisión de Fahay (2007), la mayoría de los esciénidos descritos mostraron 25 vértebras a lo largo de la columna vertebral lo que demuestra que el número de vértebras está conservado entre las especies de este grupo, ya que tienen un estilo de vida comparable. Sin embargo, en el verrugato de Manchuria se encuentran 29 vértebras (Taniguchi 1969) indicando que existen algunas diferencias dentro de los esciénidos. Por otro lado, el número de vértebras es muy variable entre las diferentes especies de teleósteos, desde 19 vértebras en el pez globo (Abe 1952), a 33 en el pez cebra (Sanger y McCune, 2002), 51 en la

sardina japonesa y europea (*Sardinops melanostictus* y *Sardina pilchardus*, respectivamente) (García y Moyano, 1990; Matsuoka 1997), 57-60 en el salmón (Kacem et al. 1998; Witten et al. 2006), 76 en el pez aguja (*Belone belone*) y 115 en la anguila europea (*Anguilla anguilla*) (García y Moyano, 1990).

La estructura final de la aleta caudal también parece conservarse entre los esciéndidos, aunque el número de cartílagos accesorios es variable. Si nos fijamos en la composición numérica, las aletas dorsal, anal y caudal de la corvina son diferentes a las del corvinón ocelado (Topp y Cole, 1968). Otras especies que comparten la misma composición de elementos de la aleta caudal, son la dorada (Koumoundouros et al. 1997a), la breca (Sfakianakis et al. 2004), el sargo picudo (Sfakianakis et al. 2005), y el *Dinolestes lewini* (Fraser 1971).

En ambas instalaciones de cultivo, el desarrollo osteológico de las larvas de corvina fue similar aunque se observaron diferencias en el crecimiento, lo que conduce a una formación de los elementos esqueléticos más temprana en los individuos cultivados en IPIMAR comparado con los cultivados en IRTA-SCR, debido a las diferentes condiciones ambientales utilizadas. Por consiguiente, en IPIMAR, las larvas de 35 días muestran todas las estructuras esqueléticas y un esqueleto completamente osificado, mientras que las larvas del IRTA-SCR no lo muestran hasta el día 50. Además, al comparar las larvas con longitudes similares, se pudo observar que las cultivadas en IPIMAR presentaron un esqueleto más desarrollado que las cultivadas en IRTA-SCR. A pesar de que en un principio, este estudio no tenía en cuenta las diferencias en cuanto a los parámetros del cultivo, se demuestra que el desarrollo del esqueleto de las larvas de corvina es dependiente de las condiciones ambientales, tales como la luz y la temperatura. Para numerosas especies se ha demostrado que la temperatura influye sobre el rendimiento de los peces, de manera que cuando la temperatura no es la óptima se reduce el crecimiento y se retrasa el desarrollo esquelético, y posteriormente aumenta la incidencia de las deformaciones (Hart et al. 1996; Sfakianakis et al. 2004; Wargelius et al. 2005; Georgakopoulou et al. 2010). Otras especies de esciéndidos expuestas a temperaturas más altas presentan cocientes más altos de ARN:ADN, lo que indica un potencial de crecimiento mayor (Rooper et al. 1997). En estudios anteriores, se ha demostrado que la intensidad de la luz, la longitud de onda y el fotoperiodo afectan significativamente al crecimiento, a la deposición mineral en las vértebras y a la formación del esqueleto, de manera que peces expuestos a un fotoperiodo más largo muestran un mayor peso y longitud (Moustakas et al. 2004; Fjellidal et al. 2005; Blanco-Vives et al. 2010; Villamizar et al. 2011). Los resultados actuales están de acuerdo con esos estudios ya que las larvas más largas provienen de un cultivo con una mayor temperatura y un fotoperiodo más largo. Además, la intensidad de luz también puede facilitar la capacidad de los peces para detectar a la presa, lo que les permite alimentarse más eficientemente (Boeuf y Le Bail, 1999). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los cambios de temperatura, de intensidad de luz y fotoperiodo, o una combinación de éstos, tienen un efecto en el desarrollo esquelético de la corvina. De esta manera, en un futuro se deben realizar estudios destinados a conseguir las

condiciones óptimas necesarias para maximizar la tasa de crecimiento, sin comprometer la osteogénesis y la calidad de los alevines producidos.

Este estudio describe por primera vez la osteología temprana del esqueleto axial y apendicular de las larvas de corvina cultivadas y destaca la importancia de optimizar los protocolos de cultivo para mejorar la calidad y productividad de la larva. Utilizando los patrones estandarizados del desarrollo esquelético presentados en este trabajo, se puede determinar la calidad de los individuos mediante las deformaciones esqueléticas producidas durante el cultivo de la corvina. La descripción osteológica de las larvas y juveniles de corvina puede servir como una referencia para otros estudios de evaluación de la calidad de las larvas y la influencia de los factores bióticos y abióticos en la esquelotogénesis de esta especie y la aparición de deformaciones esqueléticas.

Bibliografía

Abe, T. 1952: Taxonomic studies on the puffers (Tetraodontidae, Teleostei) from Japan and adjacent regions - VII. Concluding remarks, with the introduction of two new genera, Fugu and Boesemanichthys. Japanese Journal of Ichthyology 2, 35-44.

Arratia, G., Schultze, H.P. y Casciotta, J. 2001. Vertebral column and associated elements in Dipnoans and comparison with other fishes: development and homology. Journal of Morphology 250, 101-172.

Blanco-Vives, B., Villamizar, N., Ramos, J., Bayarri, M. J., Chereguini, O. y Sánchez-Vázquez, F. J. 2010. Effect of daily thermo- and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture 306, 137-145.

Boeuf, G. y Le Bail, P.Y. 1999. Does light have an influence on fish growth? Aquaculture 177, 129-152.

Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M. y Cataudella, S. 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). Aquaculture 192, 1-22.

Boglione, C., Costa, C., Di Dato, P., Ferzini, G., Scardi, M. y Cataudella, S. 2003. Skeletal quality assessment of reared and wild sharpnose sea bream and pandora juveniles. Aquaculture 227, 373-394.

Boglione, C., Marino, G., Giganti, M., Longobardi, A., De Marzi, P. y Cataudella, S. 2009. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. Aquaculture 291, 48-60.

Cahu, C., Infante, J. Z. y Takeuchi, T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture 227, 245-258.

Cárdenas, S. 2011. Cuadernos de acuicultura. Cultivo de corvina (*Argyrosomus regius*). Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, Spain.

Divanach, P., Papandroulakis, N., Anastasiadis, P., Koumoundouros, G. y Kentouri, M. 1997. Effect of water currents during postlarval and nursery phase on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder. *Aquaculture* 156, 145-155.

Dulčić, J., Bratulović, V. y Glamuzina, B. 2009. The meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801), in Croatian waters (Neretva channel, Southern Adriatic): recovery of the population or an escape from mariculture? *Ann. Ser. Hist. Nat.* 19, 155-158.

Duncan, N., Estévez, A., Padrós, F., Aguilera, C., Montero, F.E., Norambuena, F., Carazo, I., Carbó, R. y Mylonas, C.C. 2008. Acclimation to captivity and GnRH α -induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). *Cybium* 32, 332-333.

Ekanayake, S. y Hall, B.K. 1988. Ultrastructure of the osteogenesis of acellular vertebral bone in the Japanese medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei, Cyprinodontidae). *American Journal of Anatomy* 182, 241-249.

Estévez, A., Treviño, L. y Gisbert, E. 2007. La densidad larvaria inicial afecta al crecimiento pero no a la supervivencia de las larvas de corvina (*Argyrosomus regius*) en cultivo. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, Spain.

Fahay, M.P. 2007. Early stages of fishes in the western north Atlantic ocean, II. Northwest Atlantic Fisheries Organization, Dartmouth, NS, Canada.

Feltham, M.J. y Marquiss, M. 1989. The use of first vertebrae in separating, and estimating the size of trout (*Salmo trutta*) and salmon (*Salmo salar*) in bone remains. *Journal of Zoology* 219, 113-122.

Fischer, W., Schneider, M. y Bauchot, M.L. 1987. *Mediterranee et Mer Noire. Zone de peche* 37, révision 1. FAO, Rome, Italy.

Fjelldal, P.G., Nordgarden, U., Berg, A., Grotmol, S., Totland, G.K., Wargelius, A. y Hansen, T. 2005. Vertebrae of the trunk and tail display different growth rates in response to photoperiod in Atlantic salmon *Salmo salar* L., post-smolts. *Aquaculture* 250, 516-524.

Fleming, A., Keynes, R.J. y Tannahill, D. 2001. The role of the notochord in vertebral column formation. *Journal of Anatomy* 199, 177-180.

Fraser, T.H. 1971. The fish *Dinolestes lewini* with comments on its osteology and relationships. *Japanese Journal Ichthyology* 18, 157-163.

Fraser, M.R., Anderson, T.A. y de Nys, R. 2004. Ontogenic development of the spine and spinal deformities in larval barramundi (*Lates calcarifer*) culture. *Aquaculture* 242, 697-711.

García, A.M.A. y Moyano, P.D. 1990. Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cádiz, Spain.

Georgakopoulou, E., Katharios, P., Divanach, P. y Koumoundouros, G. 2010. Effect of temperature on the development of skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 308, 13-19.

Griffiths, M.H. y Heemstra, P.C. 1995. A contribution to the taxonomy of the marine fish genus *Argyrosomus* (Perciformes: Sciaenidae), with descriptions of two new species from Southern Africa. *Ichthyology Bulletin, J.L.B. Smith Inst. Ichthyol.* 65, 1-40.

Grotmol, S., Kryvi, H., Nordvik, K. y Totland, G.K. 2003. Notochord segmentation may lay down the pathway for the development of the vertebral bodies in the Atlantic salmon. *Anatomy and Embryology* 207, 263-272.

Grotmol, S., Nordvik, K., Kryvi, H. y Totland, G.K. 2005. A segmental pattern of alkaline phosphatase activity within the notochord coincides with the initial formation of the vertebral bodies. *Journal of Anatomy* 206, 427-436.

Hart, P.R., Hutchinson, W.G. y Purser, G.J. 1996. Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery-reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther, 1862). *Aquaculture* 144, 303-311.

Hickey, C.R. 1972. Common abnormalities in fishes: their causes and effects. NY Ocean Science Laboratory, NY, USA.

Inohaya, K., Takano, Y. y Kudo, A. 2007. The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: in vivo visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish. *Developmental Dynamics* 236, 3031-3046.

Kacem, A., Meunier, F.J. y Baglinière, J.L. 1998. A quantitative study of morphological and histological changes in the skeleton of *Salmo salar* during its anadromous migration. *Journal of Fish Biology* 53, 1096-1109.

Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S. y Kentouri, M. 1997a. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* 149, 215-226.

Koumoundouros, G., Oran, G., Divanach, P., Stefanakis, S. y Kentouri, M. 1997b. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture* 156, 165-177.

Koumoundouros, G., Divanach, P. y Kentouri, M. 1999. Osteological development of the vertebral column and of the complex in *Dentex dentex*. *Journal of Fish Biology* 54, 424-436.

- Koumoundouros, G., Divanach, P. y Kentouri, M. 2001a. The effects of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). *Aquaculture* 200, 285-304.
- Koumoundouros, G., Maingot, E., Divanach, P. y Kentouri, M. 2001b. Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture* 209, 49-58.
- Koumoundouros, G. 2010. Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. En: *Recent advances in aquaculture research* (ed. G. Koumoundouros), Transworld Research Network, Kerala, India, 125-148.
- Lall, S.P. y Lewis-McCrea, L.M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - an overview. *Aquaculture* 267, 3-19.
- Le Vay, L., Carvalho, G.R., Quintio, E.T., Lebata, J.H., Ut, V.N. y Fushimi, H. 2007. Quality of hatchery-reared juveniles for marine fisheries stock enhancement. *Aquaculture* 268, 169-180.
- Lewis, L.M. y Lall, S.P. 2006. Development of the axial skeleton and skeletal abnormalities of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) from first feeding through metamorphosis. *Aquaculture* 257, 124-135.
- Matsuoka, M. 1985. Osteological development in the red sea bream, *Pagrus major*. *Japanese Journal of Ichthyology* 32, 35-51.
- Matsuoka, M. 1987. Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in the red sea bream. *Bulletin of the Seikai National Fisheries Research Laboratory* 65, 1-114.
- Matsuoka, M. 1997. Osteological development in the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*. *Ichthyology Research* 44, 275-295.
- Moustakas, C.T., Watanabe, W.O. y Copeland, K.A. 2004. Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival, and osmoregulatory ability of larval flounder *Paralichthys lethostigma*. *Aquaculture* 229, 159-179.
- Nagano, N., Hozawa, A., Fujiki, W., Yamada, T., Miyaki, K., Sakakura, Y. y Hagiwara, A. 2007. Skeletal development and deformities in cultured larval and juvenile seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Aquaculture Research* 38, 121-130.
- Nordvik, K., Kryvi, H., Totland, G.K. y Grotmol, S. 2005. The salmon vertebral body develops through mineralization of two preformed tissues that are encompassed by two layers of bone. *Journal of Anatomy* 206, 103-114.
- Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D. y Fernández-Palacios, H. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82-88.

- Rooker, J.R., Holt, G.J. y Holt, S.A. 1997. Condition of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) from estuarine nursery habitats. *Marine Biology* 127, 387-394.
- Sanger, T.J. y McCune, A.R. 2002. Comparative osteology of the Danio (Cyprinidae: Ostariophysi) axial skeleton with comments on Danio relationships based on molecules and morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society* 135, 529-546.
- Schaeffer, B. 1967. Osteichthyan vertebrae. *Journal of the Linnean Society of London Zoology* 47, 185-195.
- Sfakianakis, D. G., Koumoundouros, G., Anezaki, L., Divanach, P. y Kentouri, M. 2003. Development of a saddleback-like síndrome in reared white seabream *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 217, 673-676.
- Sfakianakis, D.G., Koumoundouros, G., Divanach, P. y Kentouri, M. 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture* 232, 407-424.
- Sfakianakis, D.G., Doxa, C.K., Kouttouki, S., Koumoundouros, G., Maingot, E., Divanach, P. y Kentouri, M. 2005. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *Aquaculture*, 250, 36-46.
- Taniguchi, N. 1969. Comparative osteology of the Sciaenid fishes from Japan and its adjacent waters – II. Vertebrae. *Japanese Journal of Ichthyology* 16, 153-156.
- Topp, R.W. y Cole, C.F. 1968. An osteological study of the Sciaenid genus, *Sciaenops gill* (Teleostei, Sciaenidae). *Bulletin of Marine Science* 18, 902-945.
- Villamizar, N., Blanco-Vives, B., Migaud, H., Davie, A., Carboni, S. y Sánchez-Vázquez, F.J. 2011. Effects of light during early development of some aquacultured teleosts: a review. *Aquaculture* 315, 86-94.
- Walker, M.B. y Kimmel, C.B. 2007. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotechnic & Histochemistry* 82, 23-28.
- Wargelius, A., Fjellidal, P.G. y Hansen, T. 2005. Heat shock during early somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Development Genes and Evolution* 215, 350-357.
- Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J. y Tortonese, E. 1986. Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean, Vol. II. UNESCO, Paris, France.
- Witten, P.E., Obach, A., Huysseune, A. y Baeverfjord, G. 2006. Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): development, aggravation and pathways of containment. *Aquaculture* 258, 164-172.

2. Condiciones de luz durante el cultivo larvario de la corvina (*Argyrosomus regius*)

Introducción

La corvina (*Argyrosomus regius*) se considera una nueva especie para la diversificación de la acuicultura mediterránea debido al rápido crecimiento de los juveniles en jaulas marinas (El-Shebly et al. 2007; Jiménez et al. 2005) y a la calidad del filete (Poli et al. 2003). El control de la reproducción, el canibalismo y la baja supervivencia después del destete y las diferencias en el crecimiento de los juveniles han sido identificados como los principales cuellos de botella para su producción comercial. Actualmente, el desove de la corvina en cautividad se ha logrado mediante el uso de inyecciones e implantes de GnRHa (Duncan et al. 2012). Para maximizar el crecimiento y la supervivencia bajo condiciones de cultivo es importante comprender las limitaciones físicas y biológicas de las larvas. Sólo se han estudiado los efectos de la densidad larvaria y la secuencia de alimentación de las presas vivas en las larvas de corvina (Estévez et al. 2007; Roo et al. 2010) mientras que no existe información sobre las condiciones óptimas de luz durante el cultivo larvario.

Todas las etapas de la vida de los peces marinos, desde el embrión hasta el adulto, están influenciadas por la luz (Mangor-Jensen y Waiwood, 1995). Estudios realizados sobre los requerimientos de luz en diferentes especies marinas han demostrado que cada especie necesita una determinada luz. En general, se ha observado que un aumento de las horas de día mejora las tasas de crecimiento en el bacalao del Atlántico (Puvanendran y Brown, 2002), besugo (Chatain y Ounais-Guschemann, 1991) y pargo (Fielder et al. 2002), mientras que en la lubina tiene un efecto negativo sobre el desarrollo larvario (Barahona-Fernandes, 1979; Ronzani-Cerqueira y Chatain, 1991). La visión, la glándula pineal y los fotorreceptores profundos del cerebro desempeñan un papel importante durante el desarrollo larvario (Villamizar et al. 2011), así la luz no sólo se utiliza para la visión y la alimentación (Boeuf y Le Bail, 1999) sino también para sincronizar la eclosión de las larvas en algunas especies como el fletán del Atlántico (Helvik y Bernt, 1993), para conseguir un crecimiento más rápido (Chatain y Ounais-Guschemann, 1991; Fielder et al. 2002; Kiyono y Hirano, 1981; Puvanendran y Brown, 2002) y para el desarrollo de estructuras como las aletas y los dientes o la vejiga natatoria (Villamizar et al. 2011).

Teniendo en cuenta la falta de información sobre las condiciones de luz necesarias durante el cultivo larvario de la corvina, el objetivo principal de este estudio fue establecer la intensidad de la luz y el fotoperíodo adecuados para el crecimiento y la supervivencia de las larvas durante los primeros 30 días de cultivo intensivo.

Materiales y métodos

Los huevos fertilizados se obtuvieron de reproductores de corvina de origen salvaje estabulados en el IRTA mediante una inyección de GnRHa (Duncan et al. 2012). Los huevos se incubaron en cubiletes de 35 L inmersos en tanques de 2000 L, a una temperatura de 18°C y en oscuridad hasta su eclosión a las 48 horas. Las larvas se

contaron volumétricamente y se trasladaron a tanques de 500 L cilindro cónicos negros con una densidad de 50 larvas L⁻¹. Los tanques (tres tanques por tratamiento) fueron conectados a una unidad de recirculación de agua (IRTAMAR[®]) y la temperatura del agua fue de 19.0±0.5°C, la salinidad de 34.8±0.1‰ y el pH de 8.1±0.1. Los parámetros del agua (oxígeno, temperatura, salinidad y tasa de flujo) fueron comprobados y registrados diariamente mientras que los nitritos y el amonio se registraron una vez a la semana (valores siempre inferiores a 0.4 mg L⁻¹). La presión total de gas se midió periódicamente para comprobar la eficacia de las columnas de desgasificación usando un tensiómetro 300E[™] (In-situ Inc., USA), la presión total de gas se mantuvo siempre entre 95 y 100%. Las larvas de 2 a 15 días fueron alimentadas con rotífero (*Brachionus* sp.) enriquecido (2 h, 26°C, 250 ind mL⁻¹, 0.15 g L⁻¹ Easy Selco, INVE, Bélgica) dos veces al día para mantener una densidad de 10 rotíferos mL⁻¹ utilizando la técnica del agua verde (*Tetraselmis chuii*). Los nauplios de *Artemia* enriquecidos (18 h, 28°C, 300 ind mL⁻¹, 0.6 g L⁻¹ Easy Selco, INVE, Bélgica) se añadieron entre los días 14 y 30 aumentando las cantidades y dosis de 1 a 5 ind mL⁻¹ según el crecimiento de las larvas para suministrarles el suficiente alimento y evitar la escasez de alimento lo que podría inducir al canibalismo. A partir del día 20, se les suministró alimento seco a mano (Gemma Micro 300, Skretting, Noruega). Desde el día 5 se usaron “skimmers” para eliminar la grasa de la superficie y facilitar la correcta inflación de la vejiga natatoria de las larvas.

El primer experimento se llevó a cabo para estudiar el efecto de la intensidad de la luz, por lo que se probaron tres intensidades diferentes: 50, 500 y 1000 lux (o 0.63, 6.27 y 12.53 $\mu\text{m E}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente). La luz era proporcionada por dos lámparas fluorescentes de luz neutra (Philips Master TL-D 58 W/840) colocadas a 1 m de la superficie del agua de los tanques. Cada tanque se encontraba aislado de los demás mediante una cortina opaca negra. La intensidad de la luz fue regulada con un potenciómetro manual conectado a cada lámpara fluorescente (Philips LPS100) y medido diariamente en la superficie del agua de cada tanque con un luxómetro (medidor de LUX de Lutron LX-101). Para todos los tratamientos se utilizó el mismo fotoperiodo de 16hL:8hO.

En el segundo experimento se analizaron los efectos de cuatro fotoperiodos distintos: 24hL:0hO, 16hL:8hO, 12hL:12hO y 8HL:16hO manteniendo la intensidad de la luz a 500 lux ($6.27 \mu\text{m E}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la superficie del agua y con el mismo sistema (color del tanque, lámparas fluorescentes de luz neutra y cortina negra) que en el experimento 1. La intensidad de la luz y el fotoperiodo fueron seleccionados teniendo en cuenta los trabajos previos realizados con una especie similar *Argyrosomus japonicus* (Ballagh et al. 2008).

Diez larvas de cada tanque (30 por tratamiento) fueron elegidas arbitrariamente los días 1, 5, 8, 12, 16, 20, 26, 30 en el experimento de la intensidad de la luz y los días 1, 4, 7, 9, 12, 15, 20, 26, 30 en el experimento del fotoperiodo y se anestesiaron con MS-222. La longitud estándar se midió usando una lupa (Nikon SMZ800, Nikon, Tokio, Japón) conectada a una cámara digital (Olympus DP25, Olympus, Alemania) conectada a la

vez a un analizador de imagen (AnalySIS, SIS GmbH, Alemania). Las fotografías tomadas también se utilizaron para determinar la presencia o ausencia de alimento en el intestino mediante el índice de Puvanendran y Brown (2002) y examinar la inflamación de la vejiga natatoria. Las mismas larvas se recolectaron en una malla, se lavaron con agua destilada, se secaron a 60°C durante 24 h y se pesaron para obtener el peso seco. La tasa específica de crecimiento (SGR) se calculó para los días 0-15 y 16-30 mediante la siguiente ecuación: $SGR = ((\ln(Wt) - \ln(Wo)) / t) \times 100$. Donde Wt es el peso seco final (mg), Wo es el del peso seco inicial (mg), y t es el tiempo (días) (Buckley et al. 1987). La supervivencia se obtuvo al final del experimento contando las larvas restantes.

Todos los datos se analizaron mediante el paquete estadístico Sigma Stat 3.1 (Systat Software Inc., USA). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante un ANOVA o t-Student ($P \leq 0.05$) seguido de una comparación por pares mediante los test de Tukey o de Dunn ($P \leq 0.05$). Los datos de porcentaje fueron previamente transformados con arcsin.

Resultados

Experimento 1. Intensidad de luz

La intensidad de luz tiene un efecto claro en el crecimiento larvario de la corvina. Las larvas cultivadas a 50 lux crecieron lentamente durante la fase de alimentación con rotífero (de 28.5 µg en el día 5 a 37.1 µg en el día 12), mostrando un peso seco significativamente menor ($P = 0.026$) que las larvas cultivadas a 500 o 1000 lux (Fig. 1). Durante la etapa de alimentación con *Artemia*, las larvas cultivadas a 500 y 1000 lux mostraron un mayor peso seco que las cultivadas a 50 lux, aunque éstas mostraban un claro incremento en peso seco (de 37.5 µg en el día 16 a 130.4 µg en el día 30) (Fig. 1). La tasa específica de crecimiento (SGR) no fue significativamente diferente entre los tres grupos durante el período de alimentación con rotíferos, pero sí que fue significativamente más alta en las larvas cultivadas a 500 y 1000 lux en el periodo de alimentación con *Artemia* (Fig. 2). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las larvas cultivadas a 500 y 1000 lux, aunque los valores de SGR y peso seco fueron ligeramente superiores para las larvas mantenidas a 500 lux (SGR $9.39 \pm 1.62\%$ a 500 lux y $7.67 \pm 0.52\%$ a 1000 lux). La ingestión de rotífero no pudo evaluarse porque todas las larvas tenían el intestino vacío debido a que el muestreo se realizó antes de la administración del alimento. Por otra parte, la inflamación de la vejiga natatoria fue más rápida en los tratamientos de 50 y 500 lux, en los cuales más del 95% de las larvas inflaron totalmente la vejiga natatoria antes del día 8. A día 16, todas las larvas de los tres tratamientos presentaban la vejiga natatoria hinchada (Fig. 3).

La supervivencia no se vio afectada por las diferentes intensidades utilizadas ya que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 1).

Figura 1. Peso seco (μg , media \pm SD) de las larvas durante los primeros 30 días de cultivo usando diferentes intensidades de luz. La gráfica insertada muestra en detalle el peso seco de las larvas durante los primeros 16 días de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.026$ a día 15 y $P=0.013$ a día 30).

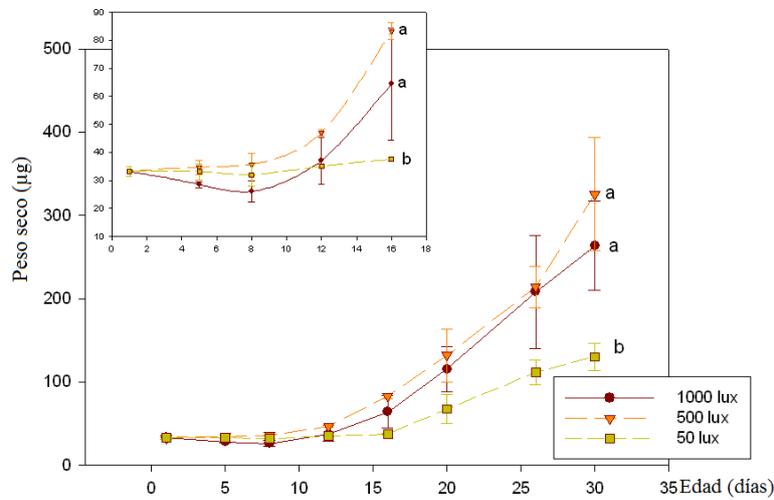


Figura 2. Tasa de crecimiento específica (SGR, %, media \pm SD) de las larvas cultivadas con diferentes intensidades de luz separados en dos periodos, del día 1 al 15 (SGR_{1-15}) y del día 16 al 30 (SGR_{16-30}). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.015$).

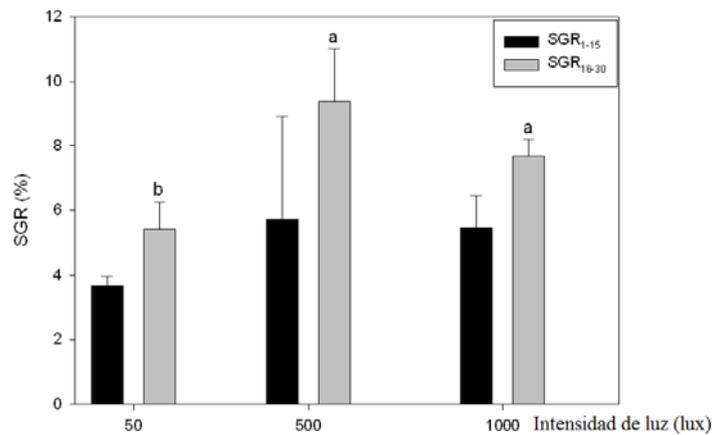


Figura 3. Porcentaje de larvas con la vejiga natatoria totalmente hinchada (media \pm SD) a día 5, 8 y 16 cultivadas a diferentes intensidades de luz.

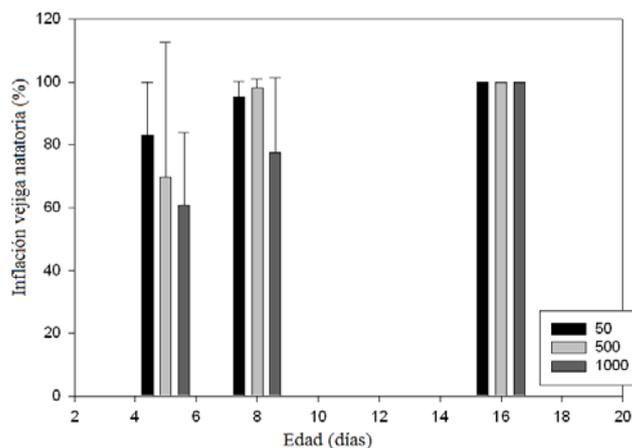


Tabla 1. Longitud estándar (LS, mm, media±SD), peso seco (PS, mg, media±SD) y supervivencia (Superv, %, media±SD) de las larvas de 30 días cultivadas con diferentes intensidades de luz y fotoperiodo.

Intensidad de luz (lux)	Fotoperiodo (h)	LS (mm)	PS (mg)	Superv (%)
50	16L:8O	4.69 ± 0.11 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	9.59 ± 5.82
500		5.66 ± 0.17 ^b	0.33 ± 0.07 ^b	17.88 ± 5.32
1000		5.07 ± 0.42 ^b	0.21 ± 0.09 ^b	15.27 ± 10.10
500	24L:0O	9.41 ± 0.10 ^a	2.22 ± 0.34 ^a	6.18 ± 1.85 ^a
	16L:8O	8.45 ± 1.74 ^a	2.12 ± 1.35 ^a	13.79 ± 5.01 ^{ab}
	12L:12O	6.96 ± 0.15 ^b	0.80 ± 0.11 ^b	27.26 ± 0.01 ^b
	8L:16O	6.53 ± 0.79 ^b	0.63 ± 0.17 ^b	47.74 ± 14.46 ^c

*Superíndices indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.

Experimento 2. Fotoperiodo.

El fotoperiodo provoca un efecto significativo en la longitud y el peso seco de las larvas, la supervivencia, la SGR y el llenado del intestino. Durante el periodo de alimentación con rotífero no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a peso seco (Fig. 4, P=0.07) o SGR (Fig. 5, P=0.33). Al final del experimento, a día 30, las larvas cultivadas a 24hL:0hO o 16hL:8hO fueron significativamente más largas y más pesadas que las cultivadas a 12hL:12hO o 8HL:16hO (Tabla 1). Por el contrario, las larvas cultivadas con el fotoperiodo de 24 h de luz tenían mayores tasas de mortalidad al final del período experimental que las cultivadas con 16, 12 u 8 h de luz (Tabla 1, P<0.001.). La disminución de la duración del día mejoró la supervivencia como resultado de una reducción en el canibalismo y en la hiperinflación de la vejiga natatoria, como se observó en los tanques sometidos a luz continua y 16hL:8hO a partir del día 20 (Fig. 6). Aunque se observa una gran variación en la ingestión de rotíferos entre las réplicas, las larvas cultivadas con fotoperiodo corto mostraron una menor ingestión de presas en comparación con el tratamiento de luz continua, donde el índice de llenado del intestino fue superior al 55% (Fig. 7).

Figura 4. Crecimiento en peso seco (µg, media±SD) de las larvas durante los primeros 30 días de cultivo con diferentes fotoperiodos. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P=0.013 a día 25 y P=0.044 a día 30).

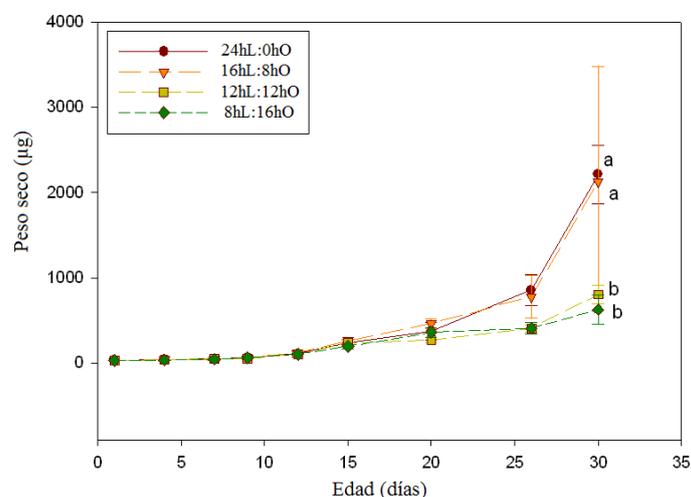


Figura 5. Tasa específica de crecimiento (SGR, %, media±SD) de las larvas del día 1 al 15 (SGR_{1-15}) y del día 16 al 30 (SGR_{16-30}) de cultivo usando diferentes fotoperíodos. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.049$).

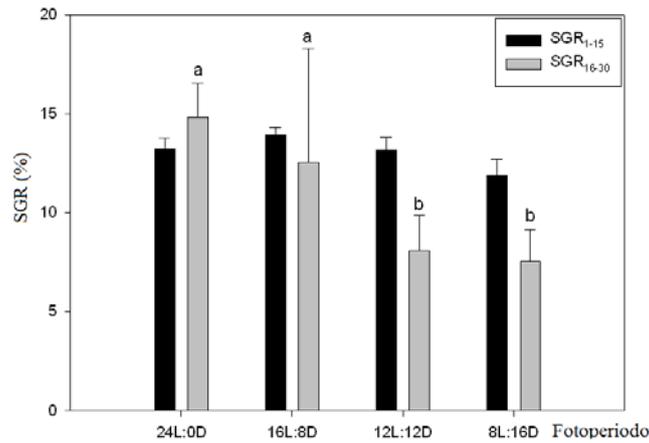


Figura 6. Larvas de corvina de 26 días mostrando una vejiga natatoria normal (\Rightarrow) e hiperinflación de la vejiga natatoria (\rightarrow).

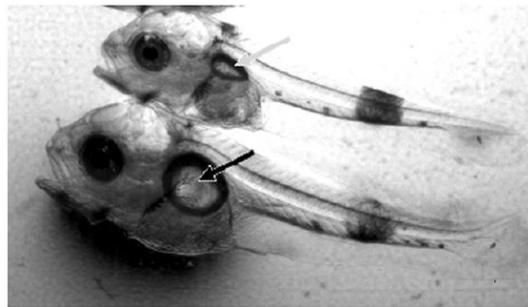
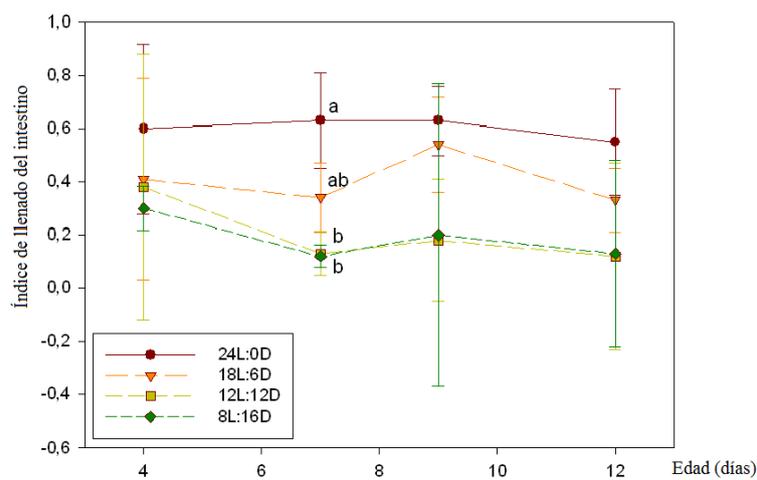


Figura 7. Índice de llenado del intestino (media±SD) de las larvas de corvina cultivadas con diferentes fotoperíodos. N = 12 larvas por tanque. Letras distintas indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre tratamientos.



Discusión

En el cultivo intensivo de peces existe una tendencia a extender la duración de la luz diaria para conseguir la máxima ingestión de alimento y un mayor crecimiento. Así, durante el desarrollo de protocolos para el cultivo larvario de nuevas especies de peces marinos, los productores tienden a usar altas intensidades de luz y fotoperiodos largos sin tener en cuenta las condiciones que las larvas encuentran en la naturaleza. En el caso de la corvina (*Argyrosomus regius*), el presente estudio indica que altas intensidades de luz (500 a 1000 lux) y un fotoperiodo con 12 o 16 horas de luz son los más adecuados para lograr un buen crecimiento y supervivencia de las larvas. Estas condiciones son bastante similares a las encontradas en otras especies de peces marinos como la dorada (Tandler y Mason, 1983), la dorada del Pacífico (Fielder et al. 2002) o el dentón (Giménez y Estévez, 2008). En el caso de la corvina, el uso de una baja intensidad de luz (50 lux) reduce la captura de las presas y el crecimiento de las larvas, especialmente durante los primeros 15 días cuando sólo se utilizan los rotíferos (transparentes) como presas vivas. La mayoría de los peces marinos, en el inicio de la alimentación exógena tienen una retina poco desarrollada, de manera que en condiciones de baja intensidad de luz se reduce la capacidad visual de las larvas (Peña et al. 2004) y no pueden distinguir claramente la presa. Los rotíferos y los nauplios de *Artemia* difieren en tamaño, actividad y transparencia y estas características tienen una clara influencia en la detección por parte de las larvas. Así, las larvas cultivadas a 50 lux mostraron una mayor tasa de crecimiento durante el periodo de *Artemia* (a partir del día 15) aunque sin alcanzar el crecimiento de las larvas cultivadas a mayores intensidades de luz que parecían ser capaces de detectar y alimentarse mejor de rotíferos. En especies de altas latitudes como el bacalao (*Gadus morhua*) la intensidad de la luz tiene un efecto positivo sobre la supervivencia larvaria, ya que las larvas cultivadas a 2400 lux mostraron mayores tasas de supervivencia que aquellas cultivadas a 300 lux (Puvanendran y Brown, 2002). Bajo una alta intensidad de luz, la actividad y la velocidad de natación de las larvas aumentan provocando una expansión de la zona de búsqueda de las presas que beneficia la actividad alimentaria y como consecuencia el crecimiento y la supervivencia (Batty 1987). Sin embargo, para otras especies como la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la intensidad de la luz tiene un efecto positivo sobre el crecimiento pero negativo en la supervivencia de las larvas (Barahona-Fernandes, 1979). En el caso de la corvina, la intensidad de la luz no tiene un efecto significativo sobre la supervivencia, de igual manera que ocurre en el verrugato del sur (*Argyrosomus japonicus*) que intensidades de 10 y 1000 $\mu\text{m E}^{-2} \text{s}^{-1}$ no afectaron a la supervivencia ni al crecimiento de las larvas (Ballagh et al. 2008).

El mayor crecimiento de las larvas de corvina se obtuvo con un fotoperiodo de 16 y 24 h de luz y con una intensidad media (500 lux) aunque la supervivencia fue menor. Las larvas cultivadas bajo fotoperiodos largos (24 y 16 h de luz) mostraron una mayor incidencia en la alimentación que las cultivadas bajo fotoperiodos cortos (12 u 8 h de luz). Los fotoperiodos largos podrían haber producido un incremento en la actividad de las larvas y una alta tasa de encuentro entre larva y presa, y como consecuencia un

mayor consumo de presas vivas y un mayor crecimiento de las larvas. Sin embargo, estos fotoperiodos largos pueden inducir síntomas de estrés en las larvas como el síndrome de la vejiga natatoria (Kiyono y Hirano, 1981; Ronzani-Cerqueira y Chatain, 1991) o un aumento del canibalismo (Baras et al. 2000). Las larvas de corvina y lubina parecen crecer mejor con fotoperiodos largos, que podrían asemejarse al fotoperiodo natural que las larvas encuentran cuando inician la alimentación exógena en el mar. Éstas mismas larvas, así como las larvas de dorada (Baras et al. 2000), son "caníbales destructivos" (Brown et al. 2003) que atacan en grupo y se alimentan de las larvas más pequeñas o más débiles. El canibalismo también se ha observado en otros esciénidos como la corvina del sur (*Argyrosomus hololepidotus*) por Battaglione y Talbot (1994) y el verrugato del sur (*Argyrosomus japonicus*) por Ballagh et al. (2008) y puede reducirse manteniendo las larvas alimentadas a saciedad aumentando la frecuencia de alimentación o la densidad de las presas o reduciendo el número de horas de luz teniendo en cuenta que la vista juega un papel importante en el canibalismo (Ballagh et al. 2008).

Otra causa de mortalidad fue la hiperinflación de la vejiga natatoria (hipertrofia) provocada por una sobresaturación de gas o estrés. Teniendo en cuenta que en el presente estudio todos los tanques estaban dotados de columnas de desgasificación en la entrada del agua y la presión total de gas se medía periódicamente, la hiperinflación de la vejiga natatoria sólo puede ser consecuencia de un estrés derivado de la luz. Se han encontrado casos parecidos de estrés en lubina cultivada bajo fotoperiodos largos (Villamizar et al. 2011) mientras que Roo et al. (2010) encontró hiperinflación de la vejiga natatoria en larvas de corvina cuando los nauplios de *Artemia* fueron introducidos demasiado temprano. Shields et al. (2003) y Grotmol et al. (2005) observaron que las larvas de bacalao parecen ser vulnerables a la hiperinflación de la vejiga natatoria bajo condiciones de cultivo intensivo. En todos los casos citados, una condición estresante (fotoperiodo largo, introducción de la presa demasiado pronto, cultivo intensivo y alta densidad larvaria) puede provocar que las larvas tomen demasiado aire en la superficie del agua induciendo la hipertrofia de la vejiga natatoria. En todos los casos se observaron larvas flotantes en la superficie del agua y una posterior muerte como consecuencia de la imposibilidad de natación y alimentación.

En resumen, el cultivo larvario de la corvina requiere una intensidad de luz y un fotoperiodo adecuados para asegurar una correcta inflación de la vejiga natatoria, un buen crecimiento y una mayor supervivencia. Según los resultados de los experimentos actuales se aconseja que durante el periodo de la alimentación de las larvas con rotífero (del día 1 al 15) se utilice una intensidad de luz media (500 lux) o alta (1000 lux) y un fotoperiodo largo (de 16 a 24 h luz) para obtener un buen crecimiento y supervivencia, mientras que cuando las larvas se alimentan con *Artemia* (a partir del día 16) el fotoperiodo debe ser de 16hL:8hO para maximizar la tasa de alimentación y el crecimiento y evitar la hiperinflación de la vejiga natatoria y el canibalismo con el fin de mejorar la tasa de supervivencia.

Bibliografía

- Ballagh, D.A., Pankhurst, P.M. y Fielder, D.S. 2008. Photoperiod and feeding interval requirements of juvenile mullet, *Argyrosomus japonicus*. *Aquaculture* 277, 52-57.
- Barahona-Fernandes, M.H. 1979. Some effects of light intensity and photoperiod on the sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) reared at the Centre Océanologique de Bretagne. *Aquaculture* 17, 311-321.
- Baras, E., Maxi, M.Y.J., Ndao, M. y Mélard, C. 2000. Sibling cannibalism in dorada under experimental conditions. II. Effect of initial size heterogeneity, diet and light regime on early cannibalism. *Journal of Fish Biology* 57, 1021-1036.
- Battaglione, S.C. y Talbot, R.B. 1994. Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture* 126, 73-81.
- Batty, R.S. 1987. Effect of light intensity on activity and food-searching of larval herring, *Clupea harengus*, a laboratory study. *Marine Biology* 94, 323-327.
- Boeuf, G. y Le Bail, P. 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177, 129-152.
- Brown, J.A., Minkoff, G. y Puvanendran, V. 2003. Larviculture of Atlantic cod (*Gadus morhua*): progress, protocols and problems. *Aquaculture* 227, 357-372.
- Buckley, L.J., Halavik, T.A., Smigielski, A.S. y Laurence, G.C. 1987. Growth and survival of the larvae of three species of temperate marine fishes reared at discrete prey densities. En: 10th Annual Larval Fish Conference American Fisheries Society Symposium 2, 82-92 (Bethesda, USA).
- Chatain, B. y Ounais-Guschemann, N. 1991. The relationships between light and larvae of *Sparus aurata*. En: Larvi '91 (ed. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier), European Aquaculture Society, Special Publication, Vol. 15, Gent, Belgium, 310-313.
- Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Vallés, R. y Mylonas, C.C. 2012. Reproductive development, GnRH-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1273-1286.
- El-Shebly, A.A., El-Kady, M.A.H., Hussin, A.B. y Hossain, M.Y. 2007. Preliminary observations on the pond culture of meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Sciaenidae) in Egypt. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 2 (5), 345-352.
- Estévez, A., Treviño, L. y Gisbert, E. 2007. La densidad larvaria inicial afecta al crecimiento pero no a la supervivencia de las larvas de corvina (*Argyrosomus regius*) en cultivo. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, España, 24-28 September 2007.
- Fielder, D.S., Bardsley, W.J., Allan, G.L. y Pankhurst, P.M. 2002. Effect of photoperiod on growth and survival of snapper *Pagrus auratus* larvae. *Aquaculture* 211, 135-150.

Giménez, G. y Estévez, A. 2008. Effect of larval and prey density, prey dose and light conditions on first feeding common dentex (*Dentex dentex* L.) larvae. *Aquaculture Research* 39, 77-84.

Grotmol, S., Krivy, H. y Totland, G.K. 2005. Deformation of notochord by pressure from the swim bladder may cause malformation of the vertebral column in cultured Atlantic cod *Gadus morhua* larvae: a case study. *Diseases of Aquatic Organisms* 65, 121-128.

Helvik, J.V. y Bernt, T.W. 1993. Development of hatchability in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) embryos. *International Journal of Developmental Biology* 37, 487-490.

Jiménez, M.T., Pastro, E., Grau, A., Alconchel, J.I. y Cárdenas, S. 2005. Revisión sobre el cultivo de esciéndidos en el mundo y presentación del Plan Nacional de Cría de corvina (*Argyrosomus regius*). X Congreso Nacional de Acuicultura. Valencia, España, 17-21 October 2005.

Kiyono, M. y Hirano, R. 1981. Effects of light on feeding and growth of Black porgy, *Mylio macrocephalus* (Basilewsky), postlarvae and juveniles. *Rapports et Procésverbaux des Réunions, Conseil International Pour L'exploration de la Mer* 178, 334-336.

Mangor-Jensen, A. y Waiwood, K.G. 1995. The effect of light exposure on buoyancy of halibut eggs. *Journal of Fish Biology* 47, 18-25.

Peña, R., Dumas, S., Saldivar-Lucio, R., García, G., Trasviña, A. y Hernandez-Ceballos, D. 2004. The effect of light intensity on first feeding of the spotted sand bass *Paralabrax maculofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquaculture Research* 35, 345-359.

Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., Lupi, P. y Bonelli, A. 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial size fish. *Aquaculture International* 11, 301-311.

Puvanendran, V. y Brown, J. 2002. Foraging, growth and survival of Atlantic cod larvae reared in different light intensities and photoperiods. *Aquaculture* 214, 131-151.

Ronzani-Cerqueira, V. y Chatain, B. 1991. Photoperiodic effects on the growth and feeding rhythm of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae in intensive rearing. En: Larvi '91, (ed. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier), European Aquaculture Society, Special Publication, Vol. 15, Gent, Belgium, 304-306.

Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D. y Fernández-Palacios, H. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82-88.

Shields, R.J., Irwin, S., Smith, P.L. y McEvoy, L.A. 2003. Effects of diet transition régime on survival, growth and lipid composition of intensively reared Atlantic cod, *Gadus morhua*, larvae. *Aquaculture International* 11, 119-130.

Tandler, A. y Mason, C. 1983. Light and food density effects on growth and survival of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus, Sparidae). *World Mariculture Society, Special Publication* 3, 103-116.

Villamizar, N., Blanco-Vives, B., Migaud, H., Davie, A., Carboni, S. y Sánchez-Vázquez, F.J. 2011. Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: a review. *Aquaculture* 315, 86-94.

3. Uso de Ox-Aquaculture[©] para la desinfección de las presas vivas y las larvas de corvina, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801).

Introducción

La producción intensiva de las larvas de peces es muy susceptible a la proliferación de bacterias que pueden causar un crecimiento bajo o una mortalidad masiva de las larvas. En la mayoría de los casos, la mortalidad no se puede atribuir a patógenos específicos, sino a la proliferación de bacterias oportunistas (Olafsen 2001). El ambiente de cultivo, con alta densidad larvaria y alta carga de materia orgánica, es muy susceptible al crecimiento bacteriano. Habitualmente, cuando las larvas eclosionan son colonizadas por algunas bacterias, que proceden de la superficie del huevo o del agua. Tan pronto comienzan a capturar e ingerir presas vivas el número de bacterias en las larvas aumenta exponencialmente. Estas bacterias se encuentran principalmente en el intestino de las larvas, siendo la especie *Vibrio* la principal bacteria de la microbiota intestinal que proviene principalmente de bacterias asociadas a las presas vivas (Skjermo y Vadstein 1993; Verschuere et al. 1997).

Las presas vivas (rotíferos y *Artemia*) llevan una gran diversidad de microbiota asociada que, aunque no son patógenas para ellas, sí que pueden causar efectos perjudiciales a las larvas que las depredan (Dhert et al. 2001; Giménez et al. 2006). Los grupos dominantes de bacterias en el rotífero son *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas* con valores de 10^7 UFC mL⁻¹ en el agua de cultivo y 10^4 - 10^5 UFC rotíferos⁻¹ (Nicolas et al. 1989). En *Artemia* también se han encontrado niveles similares de estos grupos de bacterias (Austin y Allen, 1981). La mayoría de las cepas bacterianas asociadas a los rotíferos se encuentran en la superficie externa (Munro et al. 1999) por lo que se han realizado varios estudios para reducir la carga bacteriana en rotíferos y *Artemia* antes de introducirlos en los tanques de las larvas, como por ejemplo baños de agua dulce (Rodríguez et al. 1991), antibióticos (Haamed y Balasubramanian, 2000), productos químicos (Gomez-Gil et al. 1994; Martinez-Diaz et al. 2003; Giménez et al. 2006), radiación ultravioleta (UV) (Munro et al. 1999) y agua de mar tratada con ozono (Davis y Arnold, 1997). El uso de antibióticos en las presas vivas para reducir la flora bacteriana tiene efectos secundarios ya que interaccionan con la microflora intestinal de las larvas y aumenta la resistencia a las cepas de bacterias y también tiene un claro impacto ambiental (Minkoff y Broadhurst, 1994), mientras que el uso de productos químicos, como el formaldehído, puede provocar la formación de subproductos o compuestos tóxicos para las larvas (Haamed y Balasubramanian, 2000).

El peróxido de hidrógeno es un metabolito natural producido por el metabolismo oxidativo de las células, que es fácilmente degradado en agua y oxígeno mediante reacción química y enzimática en presencia de materia orgánica (algas, zooplancton y bacterias heterotróficas), luz y turbulencia. El peróxido de hidrógeno ha demostrado ser muy eficaz en la desinfección de presas vivas (Gomez-Gil et al. 1994; Martinez Diaz et al. 2003; Giménez et al. 2006) y peces (Lumsden et al. 1998; Derksen et al. 1999; Gaikowski et al. 1999; Thomas Jinu y Goodwin, 2004; Avedaño-Herrera et al. 2006; Giménez et al. 2009). Está considerado como un producto de bajo riesgo por la “US Food and Drug Administration” y se utiliza comúnmente para tratar distintos tipos de patologías como las infecciones micóticas externas en peces de agua dulce (Rach et al.

2005) y sus huevos, la enfermedad bacteriana de las branquias en salmónidos y la enfermedad “columnaris” en peces de agua dulce y en el bagre de canal (Schmidt et al. 2006). En el caso del salmón se utiliza comúnmente para el tratamiento del “sea lice” en Canadá, Escocia, Irlanda, Noruega y Chile (Bruno y Raynard, 1994).

El objetivo de este estudio fue probar la capacidad de desinfección del Ox-Aquaculture[®], un producto comercial derivado del peróxido de hidrógeno (50% de peróxido de hidrógeno), en presas vivas, *Brachionus sp.* y *Artemia* franciscana, y en larvas de corvina con el fin de estudiar su eficacia como desinfectante bacteriano y evaluar sus efectos sobre la composición y la supervivencia de las presas vivas y sobre el crecimiento y la supervivencia de las larvas. La corvina fue seleccionada para el estudio, no sólo porque se considera una nueva especie para la diversificación de la acuicultura en Europa sino también porque es propensa a la mortalidad derivada de las condiciones de estrés (luz y alimentación inadecuada así como la manipulación).

Materiales y métodos

Los huevos fertilizados se obtuvieron de reproductores de corvina de origen salvaje estabulados en el IRTA mediante una inyección de GnRHa (Duncan et al. 2012). Los huevos se incubaron en cubiletes de 35 L inmersos en tanques de 2000 L, a una temperatura de 18°C y en oscuridad hasta su eclosión a las 48 horas. Las larvas se contaron volumétricamente y se trasladaron a tanques de 100 L a una densidad de 50 larvas L⁻¹. Los tanques (cuatro tanques por tratamiento) fueron conectados a una unidad de recirculación de agua (IRTAMAR[®]) y la temperatura del agua se mantuvo a 18.0±1.0°C, la salinidad a 36.5±0.5‰ y el pH a 8.0±0.1. Los parámetros del agua fueron comprobados y registrados diariamente mientras que los nitritos y el amoníaco se registraron una vez a la semana (valores siempre inferiores a 0.4 mg L⁻¹). El fotoperiodo fue de 16hL:8hO y la intensidad de luz de 500 lux. Las larvas de 2 a 15 días fueron alimentadas con rotífero (*Brachionus sp.*) enriquecido (2 h, 26°C, 250 ind mL⁻¹, 0.15 g L⁻¹ Easy Selco, INVE, Bélgica) dos veces al día para mantener una densidad de 10 rotíferos mL⁻¹ utilizando la técnica del agua verde (*Tetraselmis chuii*). Los nauplios de *Artemia* enriquecidos (18 h, 28°C, 300 ind mL⁻¹, 0.6 g L⁻¹ Easy Selco, INVE, Bélgica) se añadieron entre los días 14 y 25 a una densidad de 1 ind mL⁻¹.

En este experimento se ensayaron cuatro tratamientos diferentes. En el tratamiento A (control) no se realizó ninguna desinfección de las presas ni de las larvas, en el tratamiento B sólo fueron desinfectadas las larvas, en el tratamiento C sólo se desinfectaron las presas vivas y en el tratamiento D se desinfectaron las presas vivas y las larvas.

Las larvas de corvina fueron desinfectadas en los tanques de cultivo el día 1 y el 13 con 20 mg L⁻¹ de Ox-Aquaculture[®] durante 1 hora (Giménez et al. 2009). Los rotíferos se enriquecieron, se lavaron y se desinfectaron con 40 mg L⁻¹ Ox-Aquaculture[®] durante 15 minutos. Los nauplios de *Artemia* enriquecidos, se lavaron y se desinfectaron con 8000

mg L⁻¹ de Ox-Aquaculture[®] durante 5 min. Estas condiciones para la desinfección de las presas vivas dieron los mejores resultados en supervivencia y reducción de la carga bacteriana en un estudio anterior de Giménez et al. (2006).

Diez larvas de cada tanque se eligieron arbitrariamente los días 1, 3, 6, 13, 16, 20 y 25 y se anestesiaron con MS-222 para medir la longitud estándar y el peso seco. La longitud estándar se midió usando una lupa (Nikon SMZ800, Nikon, Tokio, Japón) conectada a una cámara digital (Olympus DP25, Olympus, Alemania) conectada a su vez a un analizador de imagen (analySIS, SIS GmbH, Alemania). Las mismas larvas se recolectaron en una malla, se lavaron con agua destilada, se secaron a 60°C durante 24 h y se pesaron para obtener el peso seco. La supervivencia se obtuvo al final del experimento (día 25) contando las larvas restantes.

Para el análisis de la carga bacteriana se tomaron 10 larvas de cada tanque los días 1 y 13, mientras que el rotífero y la *Artemia* fueron muestreados varias veces durante todo el experimento. Todas las muestras se obtuvieron antes y después de la exposición al producto para estimar el efecto del peróxido de hidrógeno en la reducción de la carga bacteriana. 10 larvas, 50000 rotíferos y 10000 *Artemias* fueron lavados, filtrados y homogeneizados en un homogeneizador manual estéril con 5 mL de solución salina estéril. Se realizaron diluciones secuenciales de 1 mL de muestra homogeneizada en 10 mL de solución salina estéril y 100 µL de cada dilución se colocó en las placas (por triplicado) de TSA (agar de soya tríptico) y TCBS (tiosulfato citrato sales biliares sacarosa). Después de 24 h de incubación a temperatura ambiente se estimaron las unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo directo.

Para comprobar el efecto del peróxido de hidrógeno en la composición de ácidos grasos de las presas vivas, se tomaron muestras de rotíferos antes y después de la desinfección y se analizaron por duplicado como en Giménez et al. (2006).

La supervivencia de las presas vivas (rotíferos y *Artemia*) después de la desinfección se estimó por conteo directo de tres submuestras de 1 mL.

Todos los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante un ANOVA o t-Student ($P \leq 0.05$) seguido de una comparación por pares mediante los test de Tukey o de Dunn ($P \leq 0.05$).

Resultados

El crecimiento de las larvas en longitud estándar (LS) y peso seco (PS) se muestra en la tabla 1. Las larvas de los tratamientos A y D mostraron el mayor y el menor crecimiento en longitud y peso, respectivamente, mientras que las de los tratamientos B y C consiguieron un crecimiento intermedio. Al final del estudio, los tratamientos D (presas vivas y larvas desinfectadas) y B (sólo las larvas desinfectadas) tuvieron la tasa más alta

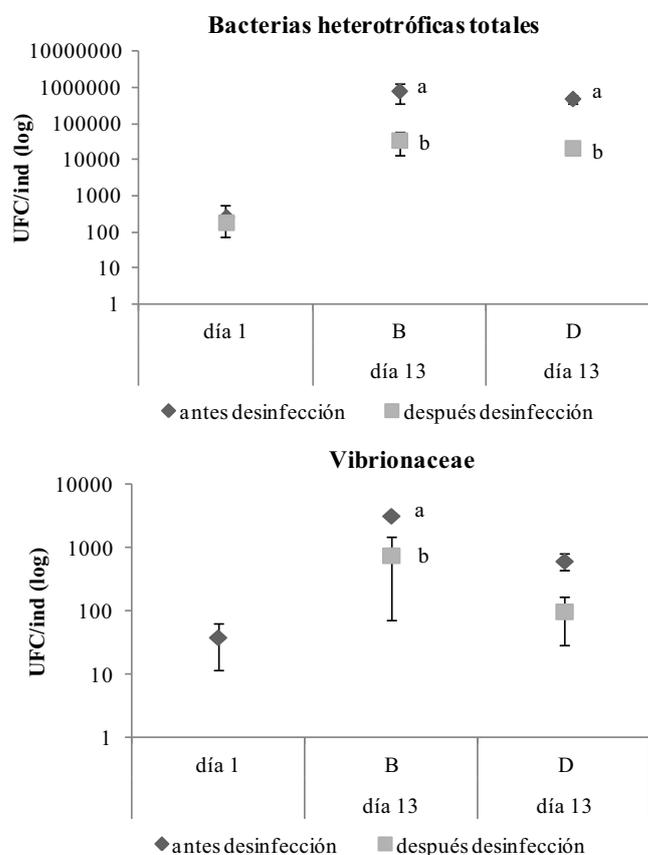
de supervivencia ($36.0 \pm 10.6\%$ y $28.0 \pm 2.9\%$ respectivamente) mientras que el tratamiento A (control) tuvo la más baja ($14.7 \pm 9.0\%$).

Tabla 1. Longitud estándar (LS, mm, media \pm SD), peso seco (PS, mg, media \pm SD) y tasa de supervivencia (superv, %, media \pm SD) de las larvas de corvina a día 25. Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos.

Tratamiento	PS (mg)	LS (mm)	Superv (%)
A	0.53 ± 0.25^a	5.83 ± 0.47^a	14.67 ± 9.02^a
B	0.39 ± 0.09^{ab}	5.45 ± 0.20^{ab}	28 ± 2.94^b
C	0.40 ± 0.05^{ab}	5.60 ± 0.13^{ab}	25.67 ± 4.99^{ab}
D	0.32 ± 0.05^b	5.35 ± 0.23^b	36 ± 10.61^b

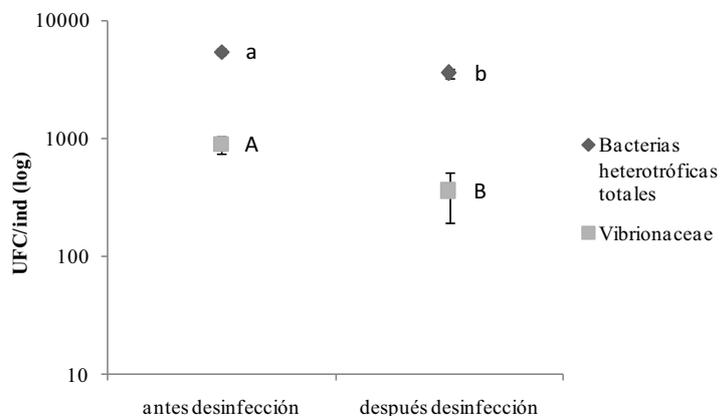
En la figura 1 se presentan los resultados de la carga bacteriana (bacterias heterotróficas totales y *Vibrionaceae*) encontrados en las larvas de corvina de 1 y 13 días antes y después de la desinfección con peróxido de hidrógeno. Antes de la desinfección, los valores de bacterias heterotróficas totales en larvas de 1 día fueron de $2.71 \pm 2.79 \times 10^2$ UFC ind⁻¹ y en larvas de 13 días fueron de $8.34 \pm 4.51 \times 10^5$ UFC ind⁻¹ y $5.09 \pm 1.35 \times 10^5$ UFC ind⁻¹ en los tratamientos B y D respectivamente. Después de la desinfección con Ox-Aquacultre[®], los valores de las bacterias heterotróficas totales en las larvas de 1 día disminuyeron hasta $1.90 \pm 1.13 \times 10^2$ UFC ind⁻¹ y en las larvas de 13 días disminuyeron significativamente hasta $3.59 \pm 2.16 \times 10^4$ UFC ind⁻¹ y $2.18 \pm 0.77 \times 10^4$ UFC ind⁻¹ en los tratamientos B y D respectivamente ($P < 0.05$). Los valores de las *Vibrionaceae* antes de la desinfección fueron de $3.89 \pm 2.68 \times 10^1$ UFC ind⁻¹ en larvas de 1 día y de $3.25 \pm 0.12 \times 10^3$ UFC ind⁻¹ y $6.25 \pm 1.77 \times 10^2$ UFC ind⁻¹ en larvas de 13 días de los tratamientos B y D respectivamente. Después de la desinfección, solamente en el tratamiento B, las *Vibrionaceae* disminuyeron significativamente hasta $7.72 \pm 7.00 \times 10^2$ UFC ind⁻¹ ($P = 0.018$), mientras que en las larvas de 1 y 13 días (tratamiento D) la reducción de las *Vibrionaceae* (0 y $1.00 \pm 0.71 \times 10^2$ UFC ind⁻¹ respectivamente) no fue estadísticamente significativa ($P = 0.066$ y $P = 0.060$ respectivamente).

Figura 1. Carga bacteriana (UFC ind⁻¹, media±SD) en larvas de corvina de 1 y 13 días antes y después de la desinfección con Ox-Aquaculture[®] en los tratamientos B y D. Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05) entre antes y después de la desinfección.



Los valores de bacterias heterotróficas totales y las *Vibrionaceae* (UFC ind⁻¹) encontrados en los rotíferos antes y después de la desinfección se muestran en la figura 2. Antes de la desinfección, el valor obtenido de bacterias heterotróficas totales fue de $5.47 \pm 0.38 \times 10^3$ UFC ind⁻¹ reduciéndose significativamente a $3.58 \pm 0.32 \times 10^3$ UFC ind⁻¹ después de la desinfección con Ox-Aquaculture[®] (P=0.003). Los valores de *Vibrionaceae* se redujeron significativamente después de la desinfección de $8.91 \pm 1.47 \times 10^2$ UFC ind⁻¹ a $3.59 \pm 1.63 \times 10^2$ UFC ind⁻¹ (P=0.014).

Figura 2. Carga bacteriana (UFC ind⁻¹, media±SD) en el rotífero antes y después de la desinfección con Ox-Aquaculture[®]. Letras minúsculas (a,b) indican diferencias significativas (P<0.05) entre los valores de bacterias heterotróficas totales antes y después de la desinfección y las letras mayúsculas (A,B) entre los valores de *Vibrionaceae*.



No se observaron diferencias significativas en el total de lípidos y ácidos grasos ni en la composición de ácidos grasos (Tabla 2) de los rotíferos antes y después de la desinfección con Ox-Aquaculture[®]. La supervivencia de los rotíferos después de la desinfección fue del 77.5±8.1% a lo largo del experimento.

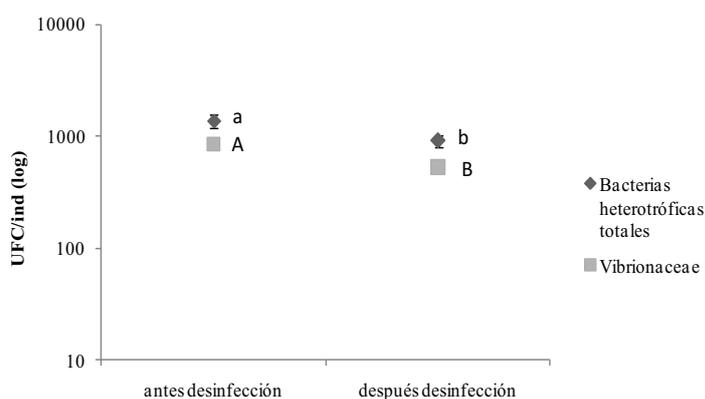
Tabla 2. Contenido de lípidos totales (mg g⁻¹ peso seco) y ácidos grasos totales (mg g⁻¹ lípidos) y composición de ácidos grasos (%) de rotíferos desinfectados y no desinfectados con Ox-Aquaculture[®].

	Rotífero desinfectado	Rotífero no desinfectado
Total lípidos (mg g ⁻¹ peso seco)	72.7	80.1
Total ácidos grasos (mg g ⁻¹ lípidos)	487.6	422.3
16:0	9.34	10.74
18:0	4.33	4.98
Total saturados	17.64	19.62
16:1n-7	14.04	14.81
18:1n-9	22.99	24.06
Total monoinsaturados	46.95	48.22
18:2n-6	9.42	9.80
20:4n-6	1.30	1.49
Total n-6 PUFA	13.27	14.13
18:3n-3	3.44	3.02
20:5n-3	5.68	5.84
22:5n-3	2.12	1.67
22:6n-3	4.70	4.82
Total n-3 PUFA	20.65	16.65

En la figura 3 se muestra el valor de las bacterias heterotróficas totales y el de las *Vibrionaceae* (UFC ind⁻¹) en la *Artemia* antes y después de la desinfección con Ox-Aquaculture[®]. El valor de las bacterias heterotróficas totales se redujo significativamente (P=0.022) de 1.38±0.20 x 10³ a 9.07±1.02 x 10² UFC ind⁻¹. Lo

mismo puede decirse de las *Vibrionaceae* que su valor disminuyó significativamente de $8.40 \pm 0.30 \times 10^2$ a $5.23 \pm 0.41 \times 10^2$ UFC ind⁻¹ (P=0.000). La supervivencia de la *Artemia* después de la desinfección fue del $95.6 \pm 6.7\%$ a lo largo del experimento.

Figura 3. Carga bacteriana (UFC ind⁻¹, media±SD) en la *Artemia* antes y después de la desinfección con Ox-Aquaculture[®]. Letras minúsculas (a,b) indican diferencias significativas (P<0.05) entre los valores de bacterias heterotróficas totales antes y después de la desinfección y las letras mayúsculas (A,B) entre los valores de *Vibrionaceae*.



Discusión

Las larvas de los tratamientos B y D obtuvieron tasas más altas de supervivencia que las del tratamiento A (control) lo que indica que la desinfección de las larvas con Ox-Aquaculture[®] tiene un efecto positivo durante el cultivo larvario de la corvina. Giménez et al. (2009) también obtuvieron una mayor supervivencia en larvas de dorada y dentón cuando las desinfectaron con el mismo producto aunque con diferentes concentraciones. Se registró una reducción en la carga bacteriana de las larvas (bacterias heterotróficas totales y *Vibrionaceae*) después de la desinfección. El tratamiento D, donde se desinfectaron las presas vivas y las larvas, obtuvo los mejores valores de supervivencia de las larvas, mientras que la desinfección sólo de las presas vivas no tuvo ningún efecto significativo sobre la supervivencia larvaria, siendo los resultados del tratamiento C similares a los del tratamiento A (control). Nicolas et al. (1989) observaron que la alimentación de las larvas varía dependiendo de la carga bacteriana de las presas vivas, provocando que las larvas de rodaballo no ingirieran las presas que contenían un gran número de bacterias. Munro et al. (1994) también observaron que la supervivencia larvaria se correlaciona positivamente cuando la colonización del intestino por parte de las bacterias es lenta. Así, la colonización rápida de las bacterias en el intestino de las larvas es nociva debido a la presencia de colonizadores de rápido crecimiento (Vadstein et al. 1993) y la única forma de reducir la tasa de colonización es la desinfección previa de los rotíferos, especialmente teniendo en cuenta que la mayoría de las bacterias asociadas a los rotíferos se encuentran en la superficie de éste. Esto podría explicar por qué las larvas del tratamiento D (larvas y presas vivas desinfectadas con Ox-Aquaculture[®]) obtienen una tasa de supervivencia mayor que el resto de los tratamientos.

Cuando las larvas de corvina de 13 días se desinfectaron con Ox-Aquaculture[®] las bacterias heterotróficas totales se redujeron significativamente. Las *Vibrionaceae* estaban presentes en cantidades bajas, y aun así, después de la desinfección, se observó una reducción aunque sólo en el tratamiento B fue estadísticamente significativa. Aunque el peróxido de hidrógeno es un metabolito natural, Gaikowski et al. (1999) observaron una reducción en la tasa de supervivencia de diferentes peces de agua fría, caliente y templada dependiendo de la etapa de vida en la que se encuentran cuando se les expone al producto. La concentración óptima de peróxido de hidrógeno depende de la especie, por ejemplo, la supervivencia de las larvas de dorada y dentón disminuye si se utilizan concentraciones superiores a 50 mg L⁻¹ y 20 mg L⁻¹ respectivamente (Giménez et al. 2009). Durante el engorde del bagre de canal no se pueden superar concentraciones de 75 mg L⁻¹ (Thomas Jinu y Goodwin, 2004), mientras que rodaballos de 8-10 g tienen dificultades respiratorias cuando se tratan con 30 mg L⁻¹ de H₂O₂ (Avedaño Herrera et al. 2006). Finalmente, truchas arco iris expuestas a concentraciones superiores a 100 mg L⁻¹ de H₂O₂ les provoca un aumento de la frecuencia respiratoria y un estado de agitación (Derksen et al. 1999).

Los valores de las bacterias heterotróficas totales y las *Vibrionaceae* se redujeron significativamente en los rotíferos tratados con Ox-Aquaculture[®]. Giménez et al. (2006) y Munro et al. (1999) también obtuvieron una reducción en la carga bacteriana de los rotíferos tratados con este mismo producto (peróxido de hidrógeno) o después de 2 minutos de exposición a la radiación UV, respectivamente. También se han aplicado otras estrategias como el uso de huevos de rotíferos desinfectados para la producción de cultivos axénicos (Dhert et al. 2001), aunque la solución más fácil para resolver el problema de la colonización bacteriana en las presas vivas es el uso de antibióticos (Perez Benavente y Gatesoupe, 1988). Sin embargo, el uso de antibióticos induce la aparición de resistencias (Dhert et al. 2001), que pueden ser transferidos a otras bacterias, incluyendo las bacterias patógenas para los peces, y a los impactos ambientales adversos (Minkoff y Broadhurst, 1994). Por lo tanto, el uso de antibióticos debe mantenerse al mínimo.

La reducción de la carga bacteriana en la *Artemia* obtenida en este experimento fue similar a los resultados encontrados por Haamed y Balasubramanian (2000) y Giménez et al (2006). Se han utilizado diferentes técnicas para reducir el número de bacterias asociadas a la *Artemia*, como la incubación con *Tetraselmis* (Olsen et al.2000) una microalga conocida por su capacidad de producción de sustancias antibacterianas, el uso de baños de agua dulce después de la recolección de los nauplios (Rodríguez et al. 1991), el tratamiento con UV del agua de incubación (Munro et al. 1999) y el uso de antibióticos o desinfectantes químicos (Gomez-Gil et al. 1994; Haamed y Balasubramanian, 2000; Giménez et al. 2006). Gomez-Gil et al (1994) usó como producto de desinfección el hipoclorito de sodio mientras que Haamed y Balasubramanian (2000) recomiendan el uso de formaldehído. Ninguno de ellos recomienda el uso de antibióticos ya que Haamed y Balasubramanian (2000) observaron que más del 60% de los aislamientos bacterianos fueron resistentes a los antibióticos. El

uso de estos dos productos químicos puede causar la formación de subproductos o compuestos tóxicos con consecuencias negativas sobre el medio ambiente. Por el contrario el peróxido de hidrógeno es un metabolito natural que es naturalmente degradado en oxígeno y agua mediante reducción química o descomposición enzimática, por muchos organismos y por la acción directa del sol sobre el agua, sin producir ningún contaminante no deseado. El tratamiento con cualquiera de estos productos podría tener efectos sobre la composición de ácidos grasos de las presas vivas, especialmente cuando se aplica después del enriquecimiento. Una de las ventajas del peróxido de hidrógeno es que no provoca ningún cambio en el perfil de ácidos grasos de la *Artemia* (Giménez et al. 2006) ni de los rotíferos (este estudio, ver tabla 2) enriquecidos por lo que se asegura la calidad nutricional de las presas vivas que se usan para el cultivo larvario después de su desinfección. Otra ventaja de este desinfectante es que la supervivencia de las presas vivas no se ve afectada por el peróxido de hidrógeno como también observaron Giménez et al. (2006).

Los resultados de este experimento indican que el uso del Ox-aquaculture[®] como un desinfectante de presas vivas y larvas de corvina en las primeras etapas de cultivo contribuye a una mejora en la tasa de supervivencia sin afectar al crecimiento de las larvas. Además, la desinfección de las presas vivas (rotíferos y *Artemia*) antes de la introducción en los tanques de cultivo reduce el número de bacterias heterotróficas totales y *Vibrionaceae* con el fin de prevenir y/o reducir las enfermedades de las larvas causadas por bacterias oportunistas. Por lo tanto, el Ox-aquaculture[®] puede considerarse un buen desinfectante para la acuicultura.

Bibliografía

- Austin, B. y Allen, B.W. 1981. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture* 26, 369-383.
- Avedaño-Herrera, R., Magariños, B., Irgang, R. y Toranzo, A.E. 2006. Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 257, 104-110.
- Bruno, D.W. y Raynard, R.S. 1994. Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice in Atlantic salmon. *Aquaculture International* 2, 10-18.
- Davis, D.A. y Arnold, C.R. 1997. Tolerance of the rotifer *Brachionus plicatilis* to ozone and total oxidative residuals. *Ozone: Science & Engineering* 19, 457-469.
- Derksen, J.A., Ostland, V.E. y Ferguson, H.W. 1999. Effects of hydrogen peroxide on clearance of formaline killed *Flavobacterium brachyphilum* from the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 22, 59-67.

Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G. y Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200, 129-146.

Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Vallés, R. y Mylonas, C.C. 2012. Reproductive development, GnRH-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatized to captivity. *Fish Physiology Biochemistry* 38, 1273-1286.

Gaikowski, M.P., Rach, J.J. y Ramsay, R.T. 1999. Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool, and warmwater fish. *Aquaculture* 178, 191-207.

Giménez, G., Padrós, F., Roque, A., Estévez, A. y Furones, D. 2006. Bacterial load reduction of live prey for fish larval feeding using Ox-Aquaculture[®]. *Aquaculture Research* 37, 1130-1139.

Giménez, G., Padrós, F., Roque, A., Estévez, A. y Furones, D. 2009. Effects of a peroxide-based commercial on bacterial load of larval rearing water and on larval survival of two species of Sparidae under intensive culture: preliminary study. *Aquaculture Research* 40, 504-508.

Gomez-Gil, B., Abreu-Grobois, F.A., Romero-Jarero, J. y Herrera-Vega, M. 1994. Chemical disinfection of *Artemia* nauplii. *Journal of the World Aquaculture Society* 25, 579-583.

Haamed, A.S. y Balasubramanian, G. 2000. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture* 183, 195-205.

Lumsden, J.S., Ostland, V.E. y Ferguson, H.W. 1998. Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout. *Journal Aquatic Animal Health* 10, 230-240.

Martinez-Diaz, S.F., Álvarez-González, C.A., Moreno Legorreta, M., Vázquez-Juárez, R. y Barrios González, J. 2003. Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture International* 11, 95-108.

Minkoff, G. y Broadhurst, A.P. 1994. Intensive production of turbot *Scophthalmus maximus* fry. En: *Turbot Culture: Problems and Prospects*, vol. 22 (ed. P. Lavens y R.A.M. Remmerswaal), pp. 14-31. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent, Belgium.

Munro, P.D., Barbour, A. y Birkbeck, T.H. 1994. Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 560-566.

Munro, P.D., Henderson, R.J., Barbour, A. y Birkbeck, T.H. 1999. Partial decontamination of rotifers with ultraviolet radiation: the effect of changes in the bacterial load and flora of rotifers on mortalities in start-feeding larval turbot. *Aquaculture* 170, 229-244.

Nicolas, J.L., Robic, E. y Ansquer, D. 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83, 237-248.

Olafsen, J.A. 2001. Interaction between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223-257.

Olsen, A.I., Olsen, Y., Attramadal, Y., Christie, K., Birkbeck, T.H., Skjermo, J. y Vadstein, O. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190, 11-25.

Perez Benavente, G. y Gatesoupe, F.J. 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquacultural Engineering* 7, 289-293.

Rach, J.J., Schreier, T.M., Schleis, S.M. y Gaikowski, M.P. 2005. Efficacy of formalin and hydrogen peroxide to increase survival of channel catfish infected with saprolegniosis. *North American Journal of Aquaculture* 67, 312-318.

Rodríguez, J.L., Planas, M. y Otero, J.J. 1991. Microflora and antibacterial treatments of rotifers and *Artemia*. En: Larvi '91, (ed. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier), European Aquaculture Society, Special Publication, Vol. 15, Gent, Belgium, 403-405

Schmidt, L.J., Gaikowski, M.P. y Gingerich, W.H. 2006. Environmental assessment for the use of hydrogen peroxide in aquaculture for treating external fungal and bacterial diseases of cultured fish and fish eggs. USGS Report, 180 pp.

Skjermo, J. y Vadstein, O. 1993. Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 255/256, 185-191.

Thomas-Jinu, S. y Goodwin, A.E. 2004. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. *Journal Fish Disease* 27, 23-28.

Vadstein, O., Oie, G., Olsen, Y., Salvesen, I. y Skjermo, J. 1993. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. En: Fish Farming Technology (ed. H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jorgensen y K. Tvinnereim), Balkema Rotterdam, pp 69-75.

Verschuere, L., Dhont, J., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. 1997. Monitoring Biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *Journal Applied Microbiology* 83, 603-612.

4. Uso de microesferas fluorescentes para determinar la selección de las larvas de corvina por diferentes tipos de *Artemia* enriquecida.

Introducción

El análisis del contenido estomacal de las larvas de peces es una herramienta muy importante en estudios nutricionales ya que nos permite obtener información del tipo y tamaño de presas que capturan las larvas de peces marinos con el fin de determinar el tipo de presa más adecuado para las distintas fases del cultivo. Se han realizado numerosos estudios para determinar el contenido estomacal en larvas de peces marinos sin problemas a la hora de distinguir las presas cuando éstas son de diferente morfología y tamaño (Pryor y Epifanio, 1993), pero cuando la digestión provoca cambios en la morfología de la presa o cuando se utiliza sólo un tipo de presa, cuantificar la ingesta no resulta una tarea fácil. Algunos de los métodos más empleados para estudiar la selección o ingesta de presas es el uso de óxidos metálicos (Cook et al. 2008), tinta china (Planas y Cunha, 1999) o microesferas fluorescentes (Lessard et al. 1996; Domínguez et al. 2005) marcando directamente las presas vivas y ofrecérselas a las larvas o bien marcando microalgas usadas a su vez para alimentar rotíferos (Ruble et al. 1989), ciliados (Sherr et al. 1987) o directamente a larvas (Tytler et al. 1997). Según Lessard et al. (1996) la técnica de marcaje debe cumplir tres requisitos: 1) que no afecte al comportamiento ni a las señales químicas de la presa, 2) que permita una buena detección de la presa marcada después de la digestión y 3) que se pueda distinguir entre las presas marcadas y las no marcadas.

La corvina es una especie muy voraz y carnívora (Vallés y Estévez, 2013) de la que se desconocen sus requerimientos nutricionales y/o su capacidad de ingesta o selección de presas. El objetivo principal de este estudio fue determinar si las larvas de corvina pueden seleccionar entre diferentes tipos de *Artemia* enriquecida como una herramienta para el estudio de requerimientos nutricionales, al menos en cuanto a ácidos grasos. Para poder discriminar entre los distintos tipos de presa (metanauplios de *Artemia*) se probaron microesferas fluorescentes de diferentes colores. El tamaño de las microesferas se seleccionó en función de lo estimado por Gelabert (2001), que determinó que los nauplios de *Artemia* seleccionan las partículas que ingieren en función del tamaño, siendo el óptimo de 16 μm con un rango que varía entre 6.8 y 27.5 μm . Los metanauplios de *Artemia* se enriquecieron con diferentes productos (fitoplancton, Easy DHA Selco+aceite de oliva y Easy DHA Selco) que les proporcionaron un perfil en ácidos grasos muy distinto.

Materiales y métodos

Los huevos fertilizados se obtuvieron de reproductores de corvina de origen salvaje estabulados en el IRTA mediante una inyección de GnRHa (Duncan et al. 2012). Los huevos se incubaron en cubiletes de 35 L inmersos en tanques de 2000 L, a una temperatura de 18°C y en oscuridad hasta su eclosión a las 48 horas. Las larvas se contaron volumétricamente y se trasladaron a tanques de 500 L a una densidad de 50 larvas L⁻¹. Los tanques (tres en total) fueron conectados a una unidad de recirculación de agua (IRTAMAR[®]) y la temperatura del agua se mantuvo a 18.0±1.0°C. Los

parámetros del agua fueron comprobados y registrados diariamente mientras que los nitritos y el amoníaco se registraron una vez a la semana (valores siempre inferiores a 0.4 mg L^{-1}). El fotoperiodo utilizado fue de 16hL:8hO y la intensidad de luz de 500 lux (Vallés y Estévez, 2013). Las larvas de 2 a 14 días fueron alimentadas con rotífero (*Brachionus sp*) enriquecido con Algamac (Aquafauna, USA) dos veces al día a una densidad de 10 rotíferos mL^{-1} utilizando la técnica del agua verde (*Nannochloropsis sp.*). Del día 13 al 17 fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos con *Nannochloropsis* y del día 18 al final del experimento (día 37) se añadió a cada tanque un tipo de *Artemia* diferente: *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis*, Easy DHA Selco y Easy DHA Selco mezclado con aceite de oliva.

Cuando las larvas alcanzaron los 30 días, 150 larvas de cada tanque se repartieron entre vasos de precipitados (triplicados) de 1 L (densidad de 50 larvas L^{-1}) y se aclimataron a las nuevas condiciones durante una hora, en ausencia de luz. Por otro lado, se recogieron 25000 nauplios de *Artemia* enriquecidos de cada uno de los tratamientos (microalgas, Easy DHA Selco y Easy DHA Selco+aceite de oliva) y se dejaron en vasos de precipitados de 100 mL. A cada vaso (tres en total) se añadieron 150 μL de microesferas fluorescentes (FluoSpheres® Fluorescent Microspheres 10 μm , Molecular Probes, USA) durante una hora. Las microesferas se dispersaron por sonicación antes de coger la cantidad necesaria. Los nauplios enriquecidos con *Nannochloropsis* se marcaron con microesferas de color azul-verde; los enriquecidos con Easy DHA Selco mezclado con aceite de oliva se marcaron con microesferas de color azul; y los enriquecidos con Easy DHA Selco se marcaron con microesferas de color amarillo-verde. Al cabo de una hora los tres tipos de *Artemia* se filtraron, se lavaron y se resuspendieron en un volumen de 500 mL. Se repartieron 6.66 mL de cada tipo de *Artemia* (aprox. 333 metanauplios) a cada vaso de precipitado con las larvas y se dejaron con aireación durante una hora.

A día 31 y a fin de evitar una posible preferencia de las larvas por parte de los colores de las microesferas fluorescentes (y no por la calidad nutricional de la presa), se procedió a realizar el mismo protocolo pero cambiando los colores de las microesferas: la *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis* se marcó con microesferas de color amarillo-verde, la *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco mezclado con aceite de oliva se marcó con microesferas de color azul-verde y la *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco se marcó con microesferas de color azul.

Procesado de las muestras:

Se tomaron 6 muestras de 1 mL de cada tipo de *Artemia* enriquecida marcada con las microesferas fluorescentes y se contó el número exacto de *Artemias* para realizar los análisis de espectrofotometría y citometría de flujo. Paralelamente se tomó otra muestra de la *Artemia* enriquecida y marcada para su observación en el microscopio de fluorescencia. Las larvas se anestesiaron con MS-222, se filtraron y se lavaron con agua destilada.

Tanto las muestras de *Artemia* como de las larvas de corvina se incubaron con 4 mL de KOH al 4% durante 48 h, a 37°C y en oscuridad para digerir los tejidos y así permitir la liberación de las microsferas fluorescentes. Tras centrifugar a 2000g durante 20 min se extrajo el sobrenadante dejando un volumen menor a 1 mL. El pellet (que contiene las microsferas) se lavó con 9 mL 0.25% Tween 80 precalentado a 60°C, y se volvió a centrifugar a 2000g durante 20 min. El sobrenadante se extrajo dejando el menor volumen posible, se añadió 1 mL de NaCl+Tween 20 y se conservó a 4°C hasta su lectura. Cada muestra se fraccionó en dos submuestras, (1) para estimar el número de microsferas mediante espectrofotometría y (2) para la estimación por citometría de flujo.

Espectrofotometría

Las muestras (1) se centrifugaron a 2000g durante 20 min, se extrajo el sobrenadante y se añadió 1.5 mL de 2-acetato etoxietil (Cellosolve® acetate) al pellet. Se mezcló bien y se dejó en oscuridad durante 4 h para disolver la pared de las microsferas fluorescentes y liberar la fluorescencia. Tras una nueva centrifugación a 2000g durante 10 min, se determinó la fluorescencia del sobrenadante en un espectrofotómetro (Tecan Infinite M200, Tecan Ibérica, España) usando longitudes de onda de excitación-emisión 360-424 nm para el azul, 430-468 nm para el azul-verde y 470-505 nm para el amarillo-verde.

Citometría de flujo

Las muestras (2) se resuspendieron mediante un agitador y posteriormente se filtraron por una malla de 50 µm para eliminar los restos de materia orgánica y evitar la obturación de la cámara de flujo. El número de microsferas fluorescentes se determinó mediante un citómetro de flujo (Navios, Izasa Coulter, Izasa, España) equipado con tres láseres y diez fotodetectores.

Microscopio de fluorescencia

Se utilizó una muestra de 100 *Artemias* para el recuento del número de microsferas fluorescentes en el digestivo mediante un microscopio de fluorescencia (Leica DMLB, Laeica, España) para poder estimar el número medio de microsferas fluorescentes por *Artemia* y el porcentaje de nauplios de *Artemia* con microsferas fluorescentes en el digestivo.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statgraphics Plus 5.1. Las diferencias significativas entre distintos tratamientos se analizaron mediante un ANOVA con un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$) mientras que cuando se comparaban dos tratamientos se utilizó una t-Student con el mismo nivel de confianza ($P < 0.05$).

Resultados

Crecimiento de las larvas

El crecimiento en peso y talla y la supervivencia de las larvas a día 38 se muestran en la tabla 1. Las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco mezclado con aceite de oliva mostraron un crecimiento, tanto en talla como en peso, significativamente mayor que las alimentadas con *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis* y Easy DHA Selco. En cambio, la supervivencia fue significativamente mayor en las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco.

Tabla 1. Crecimiento en peso seco (PS, mg, media±SD) y talla (mm, media±SD) y supervivencia (Superv, %, media±SD) de las larvas de corvina a día 38 en los tres tratamientos.

Tratamiento	PS (mg)	Talla (mm)	Superv. (%)
<i>Nannochloropsis</i>	3.66±0.26 ^a	10.47±1.23 ^a	5.95±1.25 ^a
Easy DHA Selco+aceite oliva	5.21±0.08 ^b	11.64±0.82 ^b	5.95±0.76 ^a
Easy DHA Selco	4.08±0.30 ^a	10.97±1.21 ^a	9.52±2.34 ^b

*Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$)

Selección de la *Artemia* por parte de las larvas mediante espectrofotometría

La figura 1 muestra los resultados en cuanto a cantidad (%) de *Artemia* larva⁻¹. Los resultados parecen indicar que en el primer día (día 30) (Fig. 1a) existe una preferencia de las larvas hacia la *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco+aceite de oliva en los tratamientos en los cuales las larvas habían sido alimentadas previamente con *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis* y en las que habían sido alimentadas con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco+aceite de oliva. Al día siguiente (día 31) (Fig. 1b) la tendencia cambia y las larvas que habían sido alimentadas con *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis* prefieren la *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco, mientras las que habían sido alimentadas con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco+aceite de oliva y con Easy DHA Selco prefieren la *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis*.

Sin embargo, si los resultados se evalúan en función del color de las microsferas se observa que el día 30 (Fig. 1c) las larvas previamente enriquecidas con Easy DHA Selco+aceite de oliva prefirieron la *Artemia* con las microsferas de color azul, en cambio las alimentadas previamente con *Nannochloropsis* no distinguen entre el color verde-azul y azul. A día 31 (Fig. 1d) existe una preferencia de las larvas por la *Artemia* que ingiere las microsferas de color amarillo (Fig. 2) en los tratamientos en los que las larvas habían sido alimentadas con *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco+aceite de oliva y Easy DHA Selco. En cambio, las larvas que se alimentaban con *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis* prefieren la *Artemia* marcada con las microsferas de color azul.

Figura 1. Porcentaje de *Artemia* larva⁻¹ (% , media±SD) en cada tratamiento a día 30 y 31 en función del tipo de enriquecimiento (a) y (b) y en función del color de la microesfera ingerida por la *Artemia* (c) y (d) obtenido mediante espectrofotometría. Letras distintas indican diferencias significativas entre el tipo de *Artemia* ingerida (P<0.05). BG=azul-verde, B=azul, YG=amarillo-verde.

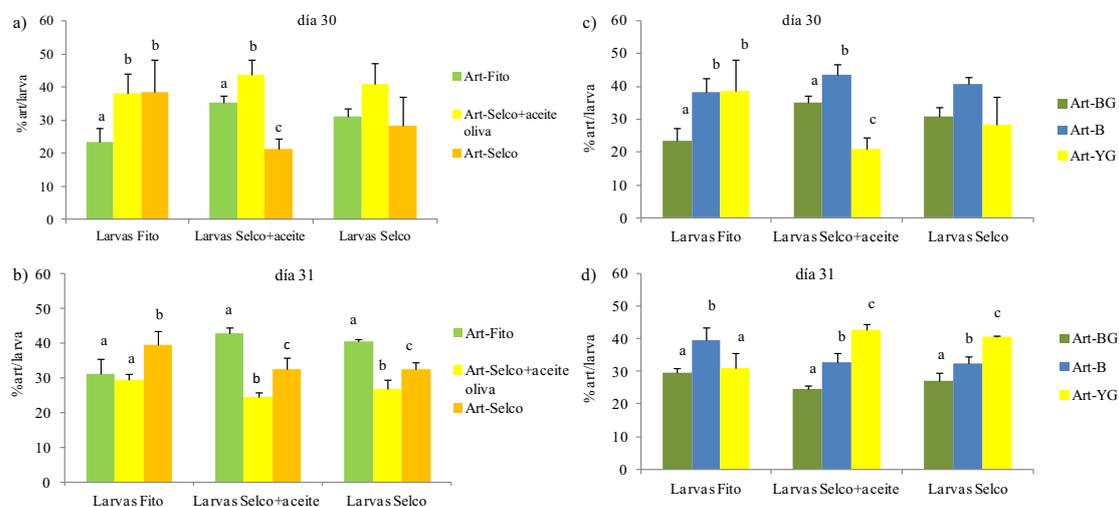
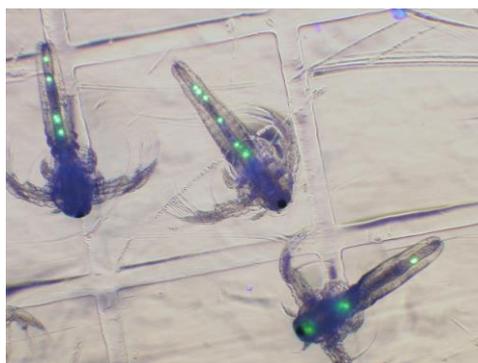


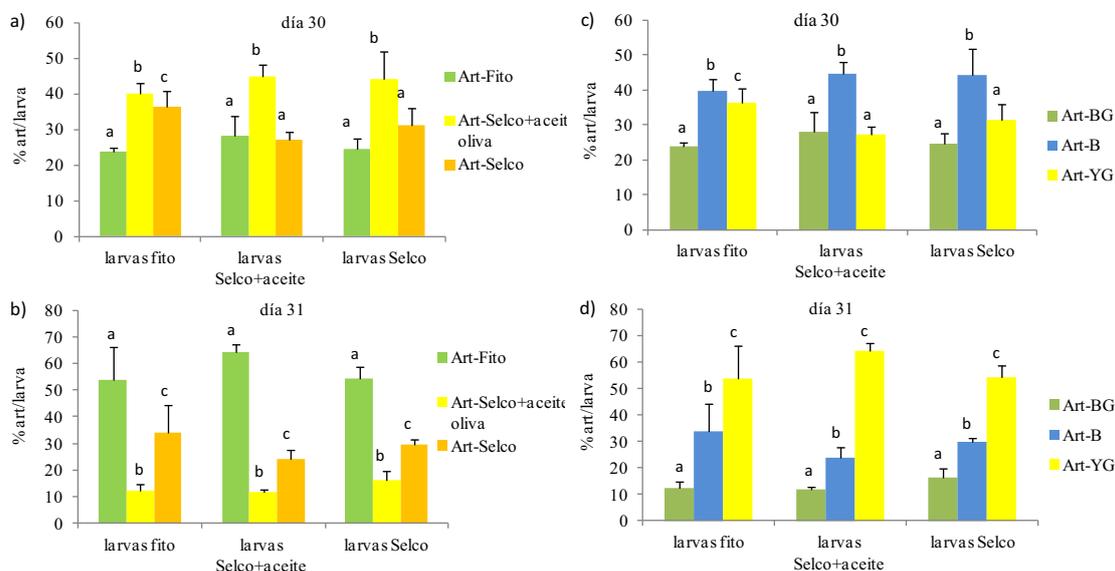
Figura 2. *Artemias* marcadas con microesferas fluorescentes de color amarillo-verde.



Selección de presas por parte de las larvas mediante citometría de flujo

La figura 2 muestra los resultados obtenidos en el análisis por citometría de flujo. Así, los resultados en cuanto al porcentaje de *Artemia* larva⁻¹ en función del tipo de enriquecimiento muestran que en el día 30 (Fig. 2a) existe una preferencia por parte de las larvas hacia la *Artemia* enriquecida con Easy DHA Selco+aceite de oliva, marcada con microesferas de color azul (Fig. 2c), en los tres tratamientos. En cambio, a día 31 (Fig. 2b) las larvas de los tres tratamientos prefieren la *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis*, marcada con las microesferas de color amarillo-verde.

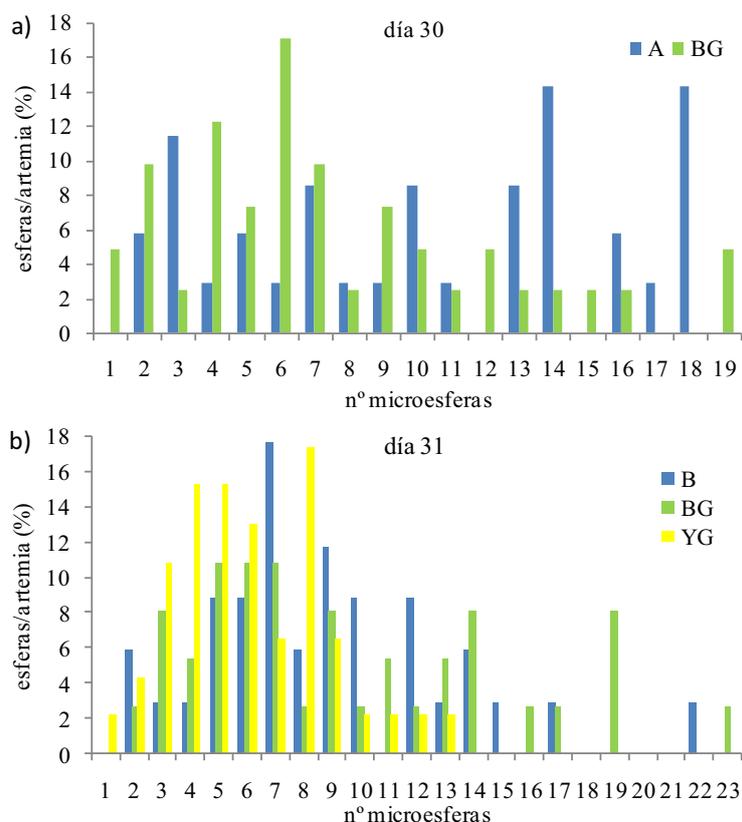
Figura 2. Porcentaje de *Artemia* larva⁻¹ (% , media±SD) en cada tratamiento a día 30 y 31 en función del tipo de enriquecimiento (a) y (b) y en función del color de la microesfera ingerida por la *Artemia* (c) y (d) obtenido mediante citometría de flujo. Letras distintas indican diferencias significativas entre el tipo de *Artemia* ingerida (P<0.05). BG=azul-verde, B=azul, YG=amarillo-verde.



Número de microesferas fluorescentes por *Artemia* mediante el microscopio de fluorescencia

Con la estimación directa (recuento) del número de microesferas fluorescentes por *Artemia* mediante microscopía de fluorescencia se obtuvo un histograma de frecuencias de microesferas en el digestivo de la *Artemia* que se muestra en la figura 3. En el día 30 (Fig. 3a) no se obtuvieron valores para la *Artemia* marcada con las microesferas amarillas-verdes y los valores obtenidos de los otros dos colores no muestran un patrón comparable a lo obtenido el día 31. Si observamos los resultados del día 31 (Fig. 3b) los tres colores siguen una distribución normal con un pico máximo en 7 microesferas *Artemia*⁻¹ para las azules, 8 microesferas *Artemia*⁻¹ para el amarillo y 6 microesferas *Artemia*⁻¹ para el azul-verde, aunque existe una gran variabilidad ya que para los colores azul y azul-verde la *Artemia* puede contener desde 0 a 22-23 microesferas fluorescentes en su digestivo.

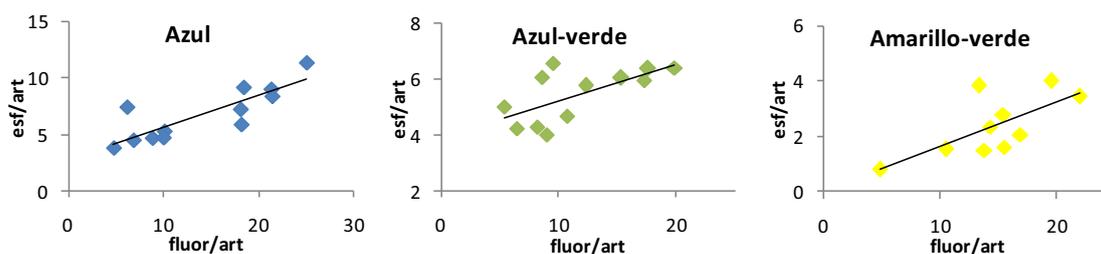
Figura 3. Porcentaje de microesferas *Artemia*⁻¹ obtenido mediante el microscopio de fluorescencia a (a) día 30 y (b) día 31 de las larvas. B=azul, BG=azul-verde, YG=amarillo-verde.



Validación del método y correlación entre las tres técnicas: espectrofotometría, citometría de flujo y microscopio de fluorescencia

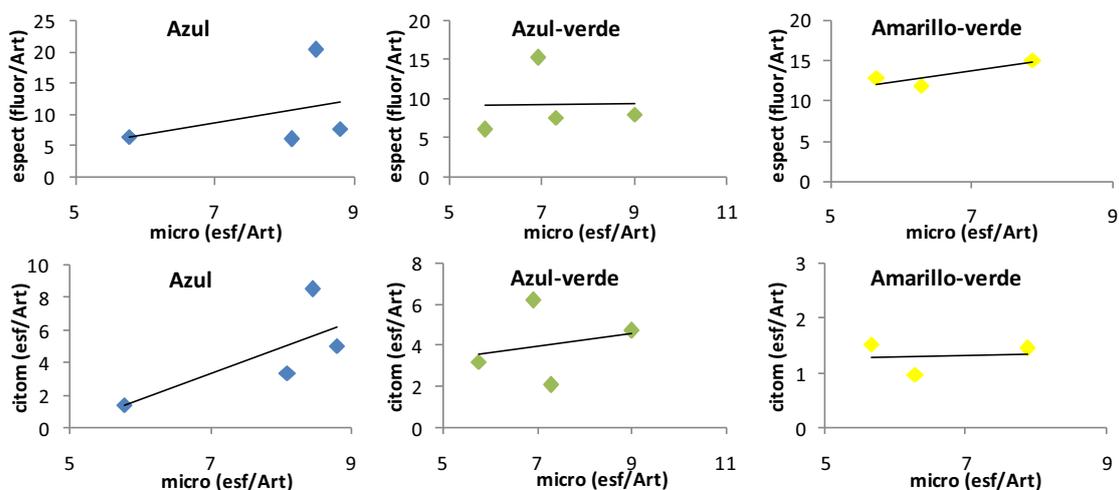
Para demostrar la validez del método y poder relacionar las tres técnicas, se realizó en primer lugar, un análisis de correlación entre la variable n° de *Artemia* larva⁻¹ que obtenemos a partir de los resultados de fluorescencia *Artemia*⁻¹ y fluorescencia larva⁻¹, en el caso de la espectrofotometría, y el número de microesferas *Artemia*⁻¹ y número de microesferas larva⁻¹ en la citometría de flujo (Fig. 4). Existe una relación estadísticamente significativa entre la espectrofotometría y la citometría en los tres colores: azul (P=0.0128, R²=0.4779), azul-verde (P=0.0296, R²=0.3914) y amarillo-verde (P=0.0126, R²=0.5170).

Figura 4. Correlación entre el valor de n° de *Artemia* larva⁻¹ obtenido mediante espectrofotometría (fluorescencia/*Artemia*) y citometría de flujo (n° esferas/*Artemia*). Azul (p=0.0128, R²=0.4779), azul-verde (p=0.0296, R²=0.3914) y amarillo-verde (p=0.0126, R²=0.5170).



Sin embargo a la hora de correlacionar los resultados obtenidos mediante la espectrofotometría (fluorescencia *Artemia*⁻¹) y la citometría de flujo (nº microesferas *Artemia*⁻¹) con los obtenidos por microscopía de fluorescencia (nº microesferas *Artemia*⁻¹), no se obtuvo ninguna relación estadísticamente significativa entre ellos ($P > 0.05$), en ninguno de los tres colores utilizados, debido a la alta variabilidad de los resultados obtenidos con el microscopio de fluorescencia y a los escasos puntos de muestreo que se realizaron (Fig. 5).

Figura 5. Correlación entre el valor de *Artemia* larva⁻¹ obtenido mediante espectrofotometría (fluorescencia/*Artemia*) y citometría de flujo (nº esferas/*Artemia*) con el del microscopio de fluorescencia (nº esferas/*Artemia*) en los tres colores.



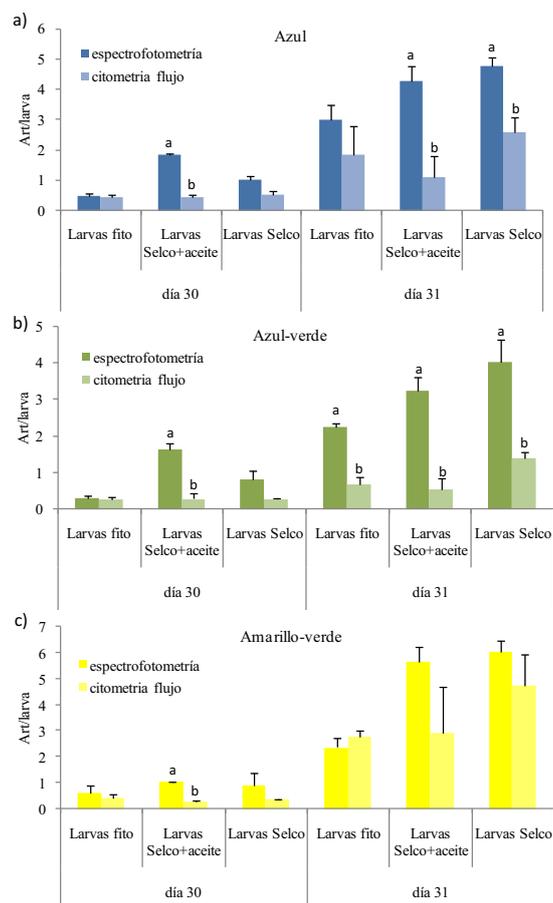
Comparación entre la espectrofotometría y la citometría de flujo como técnicas de evaluación del contenido digestivo de las larvas

Los resultados obtenidos del número de *Artemia* larva⁻¹ tanto con la espectrofotometría como con la citometría de flujo se compararon entre sí (t-Student, $p < 0.05$) en función del tratamiento (tipo de enriquecedor de la *Artemia* y color de las microesferas fluorescentes) y el día de ensayo (día 30 y 31) (Fig. 6). En todos los casos los resultados obtenidos mediante el análisis por espectrofotometría fueron mayores, debido en parte a que el recuento por citometría de flujo no es completo ya que se limita en función de un número máximo de fluorescencia del analizador (hasta 300000) fijado por el usuario y también no se cuantifica el volumen total de la muestra sino solamente una parte de la misma.

Separando los recuentos en función del color de las microesferas fluorescentes observamos que en el caso del color azul (Fig. 6a) se obtienen diferencias significativas entre las dos técnicas y los resultados obtenidos en tres de los seis tratamientos no son comparables. Algo similar ocurre en el caso de las microesferas azul-verde (Fig. 6.b) ya que solo dos de los tratamientos pueden compararse. En el caso de las microesferas amarillas-verde (Fig. 6c) los resultados del recuento de microesferas mediante espectrofotometría y citometría de flujo son muy similares y todos los resultados obtenidos son comparables excepto en uno de los tratamientos. Dado que estas últimas

microesferas muestran una mayor intensidad de emisión de fluorescencia los resultados obtenidos mediante espectrofotometría y citometría de flujo fueron mayores y más fiables.

Figura 6. Número de *Artemia* larva⁻¹ (media±SD) obtenido por espectrofotometría y citometría de flujo en función del tratamiento (tipo de enriquecedor de la *Artemia* y color de las microesferas fluorescentes) y día de ensayo (30 y 31). Letras distintas indican diferencias significativas entre las dos técnicas utilizadas (P<0.05).



Discusión

Con los resultados de la selección de las larvas obtenidos mediante las técnicas de espectrofotometría y citometría de flujo se puede concluir que las larvas de corvina no seleccionan el tipo de *Artemia* enriquecida, dado que la ingesta de las larvas es diferente en días consecutivos. El color de la presa tampoco parece influir en la selección dado que la ingesta también es diferente de un día a otro. En las larvas de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), gracias al uso de microesferas fluorescentes de látex, se observó que éstas discriminan entre el tamaño de las partículas ya que el 80% de las larvas de 72 h de vida contenían en su digestivo microesferas de 5 µm y el 100% de las larvas de 80 h contenían las microesferas de 10 µm (McCarter y James, 1993). Stoecker y Govoni (1984) encontraron que las larvas de lacha escamuda (*Brevoortia patronus*) seleccionaban el alimento en función de la capturabilidad de la presa y de la maduración y el aprendizaje de las larvas en el tiempo. Las larvas de rodaballo no discriminan entre

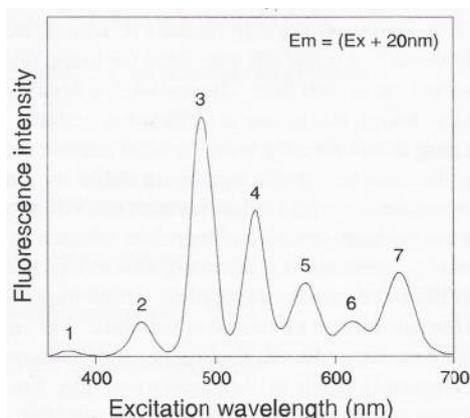
los rotíferos marcados con tinta china y los que no lo están (Planas y Cunha, 1999) mientras que las larvas de lenguado (*Solea solea*) mejoran su alimentación cuando se utiliza *Artemia* teñida de color negro (Dendrinós et al. 1984).

El resultado del número de *Artemias* contenidas en el tubo digestivo de las larvas mediante espectrofotometría o citometría de flujo puede considerarse adecuado cuando se quiere obtener un resultado relativo en cuanto a porcentaje de “llenado del digestivo” y tipo de *Artemia* utilizada, pero no para cuando se quiere obtener un recuento exacto del número de presas. Los resultados obtenidos en este experimento en cuanto al número de microesferas *Artemia*⁻¹ muestran que no existe correlación entre los resultados obtenidos mediante espectrofotometría y citometría de flujo con la observación directa en el microscopio de fluorescencia, sobre todo debido a la alta variabilidad de los resultados de recuento obtenidos con el microscopio y a la falta de réplicas.

La corvina es una especie que se estresa con mucha facilidad (uso de un fotoperiodo de 24 h de luz y densidad larvaria, densidad de presas y flujo de agua inadecuados) y una consecuencia que se observa rápidamente es la sobreinflación de la vejiga natatoria (Roo et al. 2010; Vallés y Estévez, 2013) y la posterior muerte de la larva. En este experimento, el traslado de las larvas desde el tanque de cultivo (500 L) a los vasos de precipitados de 1 L antes de introducir la *Artemia* teñida con las microesferas fluorescentes podría haber inducido un estrés a las larvas, que podría haber afectado los resultados. De ahí que en el momento de añadir la *Artemia* teñida, las larvas pudieron haber ingerido los nauplios en menor número o sin ningún tipo de selección debido a un estrés por manipulación. Una posible solución para evitar este estrés sería dejar las larvas en los recipientes del ensayo durante todo el experimento evitando el traslado y/o cambio de volumen de agua utilizando p.ej. acuarios.

En este estudio se ha observado que las microesferas fluorescentes de color azul tienen una intensidad de fluorescencia muy baja que se mezcla con el “ruido de fondo” (la digestión de las larvas produce la liberación de partículas -células pigmentarias y otras- que emiten luz que puede captarse con el espectrofotómetro lo que da lugar a mucho ruido) de las muestras, por lo que los resultados que se obtienen no son muy fiables. Con las microesferas amarillas-verde se obtienen buenos resultados, comparables entre los dos métodos de cuantificación, pero al tener una alta intensidad de fluorescencia (Fig. 7) podría existir una sobrevaloración cuando la lectura se realiza mediante espectrofotometría.

Figura 7. Espectro de fluorescencia de los colorantes que forman parte de las microesferas fluorescentes “FluoSpheres Blood Determination Fluorescent Color Kit #2 (F-8891)”. La muestra fue preparada disolviendo cada tipo de microesfera: 1) azul, 2) azul-verde, 3) amarillo-verde, 4) naranja, 5) rojo, 6) carmesí y 7) púrpura en 2-acetato de etoxietilo (Cellosolve[®] acetate). La excitación y la emisión fueron analizadas sincrónicamente cada 20nm.



Según el manual de uso de las microesferas fluorescentes, en una muestra debería haber más de 200 microesferas fluorescentes para que el error de cuantificación fuera el menor posible. En este experimento, y teniendo en cuenta los resultados de citometría de flujo, sabemos que en las muestras de *Artemia* sólo en dos de ellas se superaban las 200 microesferas, mientras que en las muestras de larvas no todas tenían más de 200. En experimentos futuros se deberán obtener muestras con un mayor número de *Artemias* y larvas.

El marcaje de la *Artemia* mediante microesferas fluorescentes es una herramienta eficaz para determinar la selección de las larvas de corvina. A partir de los resultados obtenidos en este experimento podemos concluir que las larvas de corvina no parecen seleccionar entre distintos tipos de *Artemia* enriquecida ya que la selección observada en un día (día 30) difiere totalmente de la selección del día siguiente (día 31). Estas diferencias entre los distintos días no pueden atribuirse al color de las microesferas fluorescentes (y/o de los nauplios de *Artemia* en el agua) ya que la selección por color también cambia de un día a otro. No podemos afirmar totalmente que las larvas no seleccionan el tipo de presa porque las diferentes técnicas aplicadas no se pueden correlacionar entre sí. De ahí que planteemos la necesidad de continuar con este tipo de ensayos (con larvas de corvina u otra especie) y mejorar algunos puntos del diseño experimental.

Bibliografía

Cook, M.A., Johnson, R.B., Nicklason, P., Barnett, H. y Rust, M.B. 2008. Marking live feeds with inert metal oxides for fish larvae feeding and nutrition studies. *Aquaculture Research* 39, 347-353.

Dendrinós, P., Dewan, S. y Thorpe, J.P. 1984. Improvement in the feeding efficiency of larval, post larval and juvenile Dover sole (*Solea solea* L.) by the use of staining to improve the visibility of *Artemia* used as food. *Aquaculture* 38, 137-144.

Domínguez-Pérez, R., Miah, M.I. y Le Vay, L. 2005. Fluorescent markers to measure ingestion in fish and shellfish larvae. European Aquaculture Society, Special Publication, 36.

Duncan, N.J., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairín, I., Bucci, F., Vallés, R. y Mylonas, C.C. 2012. Reproductive development, GnRH-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1273-1286.

Gelabert, R. 2001. *Artemia* bioencapsulation I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *Journal of crustacean biology* 21 (2), 435-442.

Lessard, E.J., Martin, M.P. y Montagnes, D.J.S. 1996. A new method for live-staining protists with DAPI and its application as a tracer of ingestion by walleye Pollock (*Theragra chalcogramma* (Pallas)) larvae. *J. Experimental Marine Biology and Ecology* 204, 43-57.

McCarter, N.H. y James, M.R. 1993. A Method to Observe Particle Ingestion by Fish Larvae. *Transaction of the American Fisheries Society* 122, 642-644.

Planas, M. y Cunha, I. 1999. Simple techniques for labelling prey and gut content analysis in short-term feeding experiments with fish larvae. *Aquatic Living Resources* 12 (2), 145-149.

Pryor V.K. y Epifanio, C.E. 1993. Prey selection by larval weakfish (*Cynoscion regalis*): the effects of prey size, speed and abundance. *Marine Biology* 116, 31-37.

Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D. y Fernández-Palacios, H. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82-88.

Rublee, P.A. y Gallegos, C.L. 1989. Use of fluorescently labelled algae (FLA) to estimate microzooplankton grazing. *Marine Ecology Progress Series* 51, 221-227.

Sherr, B.F., Sherr, E.B. y Fallon, R.D. 1987. Use of Monodispersed, Fluorescently Labeled Bacteria to Estimate In Situ Protozoan Bacterivory. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (5), 958-965.

Stoecker, D.K. y Govoni, J.J. 1984. Food selection by young larval gulf menhaden (*Brevoortia patronus*). *Marine Biology* 80, 299-306.

Tytler, P., Ireland, J. y Murray, L. 1997. A study of the assimilation of fluorescent pigments of microalgae *Isochrysis galbana* by the early larval stages of turbot and herring. *Journal of Fish Biology* 50, 999-1009.

Vallés, R. y Estévez, A. 2013. Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). Aquaculture 376-379, 15-19.

5. Efecto de diferentes niveles de ácido docosahexanoico (DHA) en el enriquecimiento de presas vivas sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de corvina (*Argyrosomus regius*).

Introducción

La corvina es una nueva especie para la acuicultura por su rápido crecimiento durante el engorde y la calidad de su carne (Poli et al. 2003). En los últimos años el esfuerzo investigador se ha concentrado en identificar las mejores condiciones para el cultivo larvario tales como la densidad larvaria (Estévez et al. 2007, Roo et al. 2010), la secuencia de alimentación con presas vivas (Roo et al. 2010) y las condiciones de luz (Vallés y Estévez, 2013), a fin de estandarizar los protocolos de cultivo y acometer luego los estudios de requerimientos nutricionales de la larva. Dadas las características de la larva de corvina (alta voracidad, alimentación visual en condiciones de relativamente alta luminosidad y canibalismo) sus requerimientos nutricionales, sean en forma de proteína o de grasa serán, probablemente, muy distintos a los de otras especies de peces marinos en cultivo.

Los ácidos grasos son los nutrientes más importantes para el desarrollo temprano de las larvas de peces marinos ya sea como fuente de energía o como componentes estructurales de la membrana celular (Civera-Cerecedo et al. 2004). Entre ellos los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la serie n-3, como el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6n-3), se consideran ácidos grasos esenciales (Sargent et al. 2002) dado que la larva es incapaz de sintetizarlos “de novo” a partir de sus precursores y precisa tomarlos en el alimento, siendo el DHA el más requerido en la mayoría de las especies de peces debido a su importante papel en la formación y composición del tejido nervioso y de la retina (Mourente y Tocher, 1992; Bell et al. 1996). En el medio natural, las larvas obtienen los ácidos grasos esenciales a través de la dieta, fundamentalmente zooplancton y fitoplancton, mientras que cuando se cultivan comercialmente en condiciones intensivas, las presas vivas que se utilizan para alimentar a las larvas (rotífero y *Artemia*) carecen de los niveles necesarios de estos ácidos grasos esenciales para poder obtener un buen crecimiento y supervivencia larvaria, por lo que es necesario un enriquecimiento previo con emulsiones lipídicas o productos derivados de las microalgas (por ejemplo Algamac™ derivado de *Schyzochytrium*) ricos en PUFA y disponibles en el mercado.

En estudios previos realizados con corvina se ha observado que es un depredador visual, carnívoro y con una elevada tasa de canibalismo durante el cultivo larvario (observación personal), por lo que se presupone que esta especie debe tener un alto requerimiento en DHA, componente esencial del tejido nervioso y la retina. Los huevos de corvina, como los de otras especies de peces marinos, contienen altos niveles de DHA (Duncan et al. 2012) que se consumen mayoritariamente durante el desarrollo embrionario y en los primeros estadios de desarrollo de la larva (larva lecitotrófica). Antes de que el vitelo se reabsorba por completo la larva ha de comenzar su alimentación exógena con presas ricas en DHA (Masuda 2003) a fin de continuar la acumulación de éste y otros ácidos grasos esenciales en sus tejidos.

El objetivo del presente trabajo fue, dada la escasez de estudios de requerimientos nutricionales de la larva de corvina y otros esciénidos, evaluar el efecto de diferentes

emulsiones de enriquecimiento formuladas con distinta concentración de DHA y usadas para enriquecer rotíferos y metanauplios de *Artemia*, sobre el crecimiento, supervivencia y composición lipídica de las larvas de corvina.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Los huevos fertilizados se obtuvieron de reproductores de corvina de origen salvaje estabulados en el IRTA mediante una inyección de GnRHa (Duncan et al. 2012). Los huevos se incubaron en cubiletes de 35 L inmersos en tanques de 2000 L, a una temperatura de 18°C y en oscuridad hasta su eclosión a las 48 horas. Las larvas se contaron volumétricamente y se trasladaron a tanques de 100 L usando una densidad de 50 larvas L⁻¹. Los tanques (tres tanques por tratamiento) fueron conectados a una unidad de recirculación de agua (IRTAMAR[®]) y la temperatura del agua se mantuvo a 19.3±0.4°C, la salinidad a 34.9±0.4‰ y el pH a 8.0±0.2. Los parámetros del agua fueron comprobados y registrados diariamente mientras que los nitritos y el amoníaco se registraron una vez a la semana (valores siempre inferiores a 0.3 mg L⁻¹). El fotoperiodo fue de 16hL:8hO y la intensidad de luz de 500 lux. Las larvas de 2 a 15 días fueron alimentadas con rotífero (*Brachionus* sp.) enriquecido (2 h, 26°C, 250 ind mL⁻¹, 0.15 g L⁻¹ Easy Selco, INVE, Bélgica) dos veces al día para mantener una densidad de 10 rotíferos mL⁻¹ utilizando la técnica del agua verde (*Nannochloropsis* sp.). Los nauplios de *Artemia* enriquecidos (18 h, 28°C, 300 ind mL⁻¹, 0.6 g L⁻¹ Easy Selco, INVE, Bélgica) se añadieron a partir del día 14 a una densidad creciente de 1 a 5 ind mL⁻¹. Se ensayaron 4 enriquecedores comerciales tanto en rotífero como en *Artemia*: Easy Selco (INVE, Bélgica), Easy Selco reducido a la mitad con aceite de oliva, Algamac-3050 (Aquafauna, USA) y Multigain (BioMar, España).

Para conseguir diferentes concentraciones de DHA en las presas vivas se utilizaron distintos tiempos de enriquecimiento. Así, el rotífero se enriqueció con Easy Selco (ES) durante 6 horas, con Easy Selco reducido a la mitad con aceite de oliva (ES/2) durante 2 horas, con Algamac-3050 (AG) durante 2 horas, y con Multigain (MG) durante 2 horas. En todos los casos la densidad de rotíferos se mantuvo en 250 rotíferos mL⁻¹ y se usaron distintas cantidades de enriquecedores 0.15 g L⁻¹ en el caso de ES y ES/2 (emulsiones líquidas) y 0.6 g y 0.2 g x10⁶ rotíferos para AG y MG (productos en polvo), respectivamente. Los metanauplios de *Artemia* se enriquecieron con ES, ES/2 y AG durante 16 horas, a una concentración de 300 nauplios mL⁻¹ y 0.6 g L⁻¹ de los distintos productos mientras que con MG se enriquecieron también durante 16 horas y a una concentración de 300 nauplios mL⁻¹ pero con 1.5 g L⁻¹.

30 larvas de cada tanque se muestrearon los días 1, 5, 12, 17, 21, 25 y 31 y se anestesiaron con MS-222 para estimar el crecimiento en peso y talla. La longitud estándar se determinó mediante observación en un lupa binocular Nikon SMZ800 (Nikon, Tokyo, Japón) conectada a una cámara digital Olympus DP25 (Olympus,

Alemania) y a un analizador de imagen (AnalySIS, SIS GmbH, Alemania). Las mismas larvas se usaron para estimar el peso húmedo y peso seco, situándolas en cubreobjetos previamente pesados y tras secado a 60°C durante 24 h en una estufa Memmert y posteriormente pesadas con una microbalanza Mettler Toledo MX5. Los días 1, 12 y 31 de las larvas, se tomaron muestras de 300 larvas de cada uno de los tanques, se anestesiaron con MS-222, se concentraron en un tamiz de malla y se lavaron con agua destilada antes de congelarlas a -20°C para posteriormente realizar un análisis de lípidos y ácidos grasos. Los días 13 y 14 y 20 y 26 se tomaron además muestras en duplicado de los rotíferos y *Artemia* enriquecidos, respectivamente, para evaluar su contenido en ácidos grasos. El último día (día 31) se determinó la supervivencia contando las larvas restantes de cada uno de los tanques.

El contenido de lípidos totales de las presas vivas y larvas se evaluó tras extracción con cloroformo (C) y metanol (M) (2:1, v:v) mediante el método de Folch et al. (1957). Tras evaporación de los solventes orgánicos y secado (16 h en oscuridad) se cuantificaron los lípidos totales mediante gravimetría. Los lípidos totales se conservaron en C:M y 0.01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante a una concentración de 10 mg de lípidos mL⁻¹ de solvente y gas nitrógeno, a -20°C hasta el análisis de ácidos grasos.

La transmetilación de los ácidos grasos se realizó mediante el uso de ácido sulfúrico en metanol -catalización ácida- (Christie 1982), seguida de una purificación mediante cromatografía en capa fina (TLC). La identificación y cuantificación de cada ácido graso se realizó mediante cromatografía gas-líquido usando un cromatógrafo Thermo Trace GC (Thermo Finnigan, Milan, Italia) equipado con una columna capilar de 30 m x 0.25 mm id. (BPX 70, SGE Europe Ltd., UK), inyección en columna y detección por ionización de llama, utilizando helio como gas portador, en flujo constante (1.2 mL min⁻¹). Los ácidos grasos fueron identificados por comparación con estándares comerciales (Supelco Inc., Madrid) y un aceite de pescado bien caracterizado (Marinol C38, Stepan, USA) y cuantificados en relación a un estándar interno (ácido henecosanoico, 21:0) añadido antes de la transmetilación.

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc., USA). Las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA, P<0.05) seguido de una comparación por pares mediante los tests de Tukey o de Dunn (P<0.05).

Resultados

Los resultados de crecimiento en peso seco y supervivencia larvaria tras 31 días de cultivo se muestran en la figura 1. Todas las larvas crecieron de forma exponencial a lo largo del cultivo ($R^2 > 0.991$), observándose diferencias significativas entre los grupos a partir del día 21, siendo las larvas alimentadas con ES y ES/2 las que experimentaron un crecimiento menor y las alimentadas con AG y MG un crecimiento mayor. Al final del experimento (día 31), el crecimiento en peso seco fue significativamente mayor

($P=0.0001$) para el tratamiento en el que las presas vivas se enriquecieron con AG. La supervivencia fue significativamente mayor ($P=0.0001$) en el grupo alimentado con presas enriquecidas con MG. La tasa de crecimiento específica de las larvas entre los días 1 y 12 después de la eclosión, $SGR_{(1-12)}$, (Fig. 2) fue similar y sin diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($2.18 - 4.37\% \text{ día}^{-1}$), mientras que la tasa de crecimiento entre los días 13 y 31, $SGR_{(13-31)}$, fue significativamente mayor ($P<0.05$) en los tratamientos con AG y MG (13.32 ± 0.38 y $12.53\pm 0.88\% \text{ día}^{-1}$, respectivamente) y menor en ES y ES/2 (9.69 ± 0.21 y $6.51\pm 1.19\% \text{ día}^{-1}$, respectivamente).

Figura 1. Resultados de (a) crecimiento en peso seco (mg, media \pm SD) durante el cultivo y (b) supervivencia (% , media \pm SD) larvaria a día 31. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P<0.05$) entre los tratamientos.

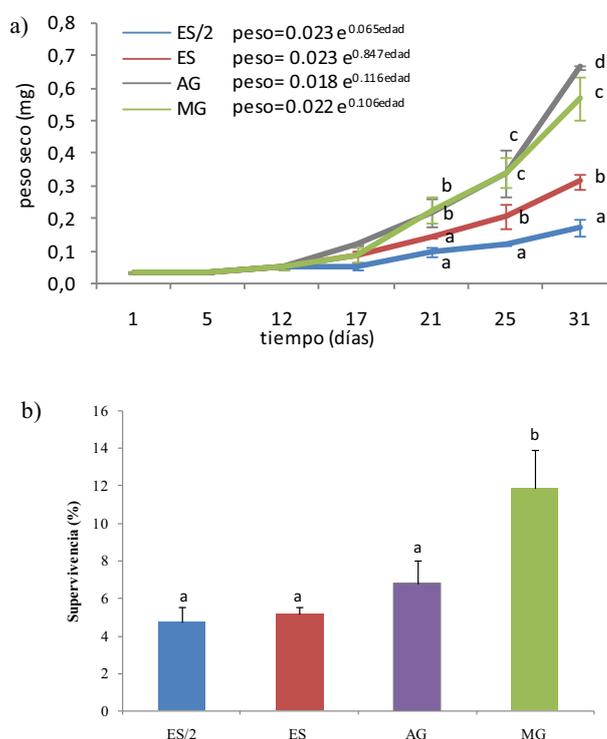
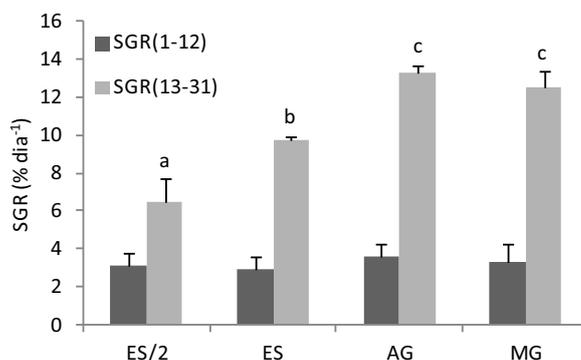


Figura 2. Tasa de crecimiento específico ($\% \text{ día}^{-1}$, media \pm SD) de las larvas de los diferentes tratamientos entre los días 1 y 12 (SGR_{1-12}) y los días 13 y 31 (SGR_{13-31}). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P<0.05$) entre tratamientos.



La tabla 1 muestra el perfil de ácidos grasos de los rotíferos enriquecidos con las distintas dietas comerciales. El contenido total de lípidos no mostró diferencias significativas ($P=0.116$) entre los tratamientos, mientras que en el caso del total de ácidos grasos, los rotíferos enriquecidos con Algamac (grupo AG) mostraron un nivel significativamente menor ($P=0.012$). El perfil de ácidos grasos muestra diferencias significativas entre los tratamientos, así el total de ácidos grasos saturados fue significativamente mayor en los rotíferos enriquecidos con AG y MG debido a un mayor contenido de 16:0, mientras que el de monoinsaturados fue significativamente mayor en los enriquecidos con ES y ES/2 especialmente en cuanto se refiere a los niveles de oleico (18:1n-9), derivado de la adición de este ácido graso en la emulsión ES/2. Por otro lado los niveles de n-6 PUFA fueron mayores para el rotífero enriquecido con AG, mientras que los n-3 PUFA fueron mayores para los rotíferos AG y MG. El contenido de DHA (22:6n-3) presenta una tendencia en aumento en función del enriquecedor (3.5, 8.4, 24.9 y 30.2 %) y fue significativamente mayor en los rotíferos enriquecidos con MG y AG ($24.9 \pm 8.6\%$ y $30.2 \pm 7.0\%$, respectivamente) mientras que el contenido de EPA (20:5n-3) fue significativamente mayor en el rotífero enriquecido con ES ($7.37 \pm 1.69\%$), y el de ARA (20:4n-6) fue mayor en los tratamientos con ES y AG ($0.74 \pm 0.10\%$ y $0.81 \pm 0.08\%$, respectivamente). El ratio DHA/EPA fue significativamente mayor en los rotíferos enriquecidos con AG y MG mientras que el ratio EPA/ARA lo fue en los rotíferos enriquecidos con Easy Selco (ES y ES/2).

Tabla 1. Total de lípidos (mg g^{-1} peso seco, media \pm SD) y de ácidos grasos (mg g^{-1} lípidos, media \pm SD) y perfil de ácidos grasos (% , media \pm SD) del rotífero enriquecido con las diferentes dietas experimentales. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos.

	ES/2	ES	AG	MG
Total lípidos (mg g^{-1} peso seco)	155.36 \pm 51.03	125.73 \pm 41.22	83.22 \pm 28.34	79.27 \pm 11.99
Total ác. grasos (mg g^{-1} lípidos)	626.4 \pm 41.3 ^b	543.9 \pm 35.4 ^{ab}	533.9 \pm 51.7 ^{ab}	420.8 \pm 42.4 ^a
16:0	10.10 \pm 1.28 ^a	10.89 \pm 0.75 ^a	22.88 \pm 4.22 ^{ab}	26.53 \pm 5.94 ^b
18:0	4.56 \pm 1.37	4.56 \pm 0.58	3.34 \pm 0.99	4.21 \pm 1.66
Σ saturados	15.72 \pm 3.11 ^a	17.32 \pm 2.47 ^a	29.53 \pm 5.61 ^b	32.84 \pm 7.03 ^b
16:1	4.00 \pm 1.39	5.59 \pm 1.15	4.45 \pm 0.49	5.58 \pm 2.77
18:1n-9	57.30 \pm 7.64 ^c	32.27 \pm 0.67 ^b	13.14 \pm 3.79 ^a	15.68 \pm 6.54 ^{ab}
Σ monoinsaturados	64.42 \pm 5.55 ^c	43.67 \pm 0.08 ^c	19.39 \pm 3.54 ^a	23.29 \pm 9.54 ^{ab}
18:2n-6	7.78 \pm 1.01 ^b	11.71 \pm 0.82 ^b	1.67 \pm 1.26 ^a	3.97 \pm 1.31 ^a
20:4n-6	0.36 \pm 0.13 ^a	0.74 \pm 0.10 ^b	0.81 \pm 0.08 ^b	0.61 \pm 0.09 ^{ab}
Σ n-6 PUFA	8.55 \pm 1.04 ^a	13.19 \pm 0.79 ^{ab}	14.78 \pm 0.20 ^b	12.73 \pm 3.00 ^{ab}
18:3n-3	1.88 \pm 0.76	3.85 \pm 1.56	1.16 \pm 0.84	1.58 \pm 1.29
20:5n-3	3.20 \pm 0.37 ^a	7.37 \pm 1.69 ^b	2.19 \pm 0.06 ^a	1.91 \pm 0.31 ^a
22:5n-3	1.05 \pm 0.15 ^a	2.42 \pm 0.57 ^b	0.93 \pm 0.22 ^a	0.61 \pm 0.23 ^a
22:6n-3	3.50 \pm 0.14 ^a	8.39 \pm 2.49 ^{ab}	30.19 \pm 7.00 ^c	24.85 \pm 8.61 ^{bc}
Σ n-3 PUFA	10.98 \pm 1.86 ^a	25.09 \pm 2.98 ^{ab}	36.14 \pm 5.79 ^b	30.58 \pm 8.11 ^b
Σ PUFA	19.53 \pm 2.89 ^a	38.28 \pm 2.19 ^{ab}	50.92 \pm 5.62 ^b	43.31 \pm 9.29 ^b
n-3/n-6	1.28 \pm 0.06	1.91 \pm 0.34	2.45 \pm 0.42	2.46 \pm 0.67
DHA/EPA	1.10 \pm 0.08 ^a	1.13 \pm 0.08 ^a	13.87 \pm 3.62 ^b	12.92 \pm 3.35 ^b
EPA/ARA	9.26 \pm 2.37 ^b	10.25 \pm 3.64 ^b	2.71 \pm 0.20 ^a	3.21 \pm 0.99 ^a

El contenido en lípidos y el perfil de ácidos grasos de los metanauplios de *Artemia* enriquecidos con las dietas experimentales se muestran en la tabla 2. En este caso, y al igual que en el rotífero, no hay diferencias significativas en el total de lípidos ($P=0.054$) y de ácidos grasos ($P=0.338$) de los distintos tipos de *Artemia*. El total de n-6 y n-3 PUFA fue significativamente mayor en la *Artemia* enriquecida con AG y MG, especialmente en lo que se refiere al contenido de ARA (2.58 y 2.15% respectivamente) y DHA (15.63 y 22.71% respectivamente) mientras que no se encontraron diferencias significativas de los niveles de EPA entre los tratamientos con ES, AG y MG ($7.46\pm 0.15\%$, $6.17\pm 0.40\%$, $5.73\pm 1.25\%$ respectivamente) pero sí que fueron mayores comparados con los de la *Artemia* enriquecida con ES/2 ($2.82\pm 0.49\%$). Como consecuencia de estos perfiles, los ratios n-3/n-6 y EPA/ARA fueron mayores para la *Artemia* enriquecida con Easy Selco, mientras que el ratio DHA/EPA fue mayor para los enriquecimientos AG y MG.

Tabla 2. Total de lípidos (mg g^{-1} peso seco, media \pm SD) y de ácidos grasos (mg g^{-1} lípidos, media \pm SD) y perfil de ácidos grasos (% , media \pm SD) de los metanauplios de *Artemia* enriquecidos con las dietas experimentales. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre tratamientos.

	ES/2	ES	AG	MG
Total lípidos (mg g^{-1} peso seco)	100.28 \pm 11.76	163.96 \pm 21.66	133.59 \pm 13.39	118.16 \pm 11.92
Total ác. grasos (mg g^{-1} lípidos)	651.5 \pm 50.9	631.9 \pm 103.6	580.5 \pm 168.0	848.9 \pm 176.7
16:0	10.15 \pm 0.80	9.39 \pm 0.98	12.38 \pm 2.93	14.83 \pm 2.76
18:0	7.26 \pm 0.32	6.50 \pm 0.24	7.23 \pm 2.31	4.90 \pm 0.41
Σ saturados	18.85 \pm 2.03	16.58 \pm 1.04	20.44 \pm 5.36	21.06 \pm 2.40
16:1	0.89 \pm 0.08	1.31 \pm 0.03	0.97 \pm 0.44	0.89 \pm 0.55
18:1n-9	38.33 \pm 4.78 ^a	28.49 \pm 2.29 ^b	13.70 \pm 1.25 ^c	11.39 \pm 2.33 ^c
Σ monoinsaturados	46.65 \pm 4.81 ^a	38.04 \pm 0.69 ^b	20.27 \pm 0.33 ^c	15.85 \pm 2.66 ^c
18:2n-6	5.22 \pm 0.45 ^a	7.71 \pm 0.35 ^b	3.29 \pm 0.75 ^c	4.43 \pm 0.89 ^{ac}
20:4n-6	0.51 \pm 0.16 ^a	0.79 \pm 0.20 ^a	2.58 \pm 0.11 ^b	2.15 \pm 0.35 ^b
Σ n-6 PUFA	5.73 \pm 0.29 ^a	8.62 \pm 0.73 ^b	12.48 \pm 1.61 ^c	14.82 \pm 0.50 ^c
20:5n-3	2.82 \pm 0.49 ^a	7.46 \pm 0.15 ^b	6.17 \pm 0.40 ^b	5.73 \pm 1.25 ^b
22:5n-3	0.16 \pm 0.23 ^b	1.44 \pm 0.09 ^a	0.43 \pm 0.07 ^b	0.36 \pm 0.07 ^b
22:6n-3	1.21 \pm 1.72 ^a	4.46 \pm 0.64 ^a	15.63 \pm 3.70 ^b	22.71 \pm 2.80 ^c
Σ n-3 PUFA	28.78 \pm 2.50 ^a	36.44 \pm 0.54 ^a	46.71 \pm 3.27 ^b	48.27 \pm 5.55 ^b
Σ PUFA	34.50 \pm 2.79 ^a	45.06 \pm 1.27 ^a	59.20 \pm 4.88 ^b	63.09 \pm 5.05 ^b
n-3/n-6	5.02 \pm 0.18 ^a	4.24 \pm 0.29 ^{ab}	3.76 \pm 0.22 ^{bc}	3.27 \pm 0.48 ^c
DHA/EPA	0.38 \pm 0.54 ^a	0.60 \pm 0.10 ^a	2.52 \pm 0.43 ^b	4.01 \pm 0.39 ^c
EPA/ARA	6.00 \pm 2.87 ^{ab}	9.81 \pm 2.68 ^a	2.40 \pm 0.26 ^b	2.65 \pm 0.15 ^b

El perfil de ácidos grasos de las larvas de 12 días (alimentadas únicamente con rotífero) y 31 días de edad se muestra en la tabla 3. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al total de lípidos ($P=0.086$) y de ácidos grasos ($P=0.553$), sin embargo, y como era de esperar, el perfil de ácidos grasos de las larvas se asemeja al de las presas usadas en su alimentación. Así el contenido en ácidos grasos monoinsaturados y ácido oleico de las larvas de 12 días fue mayor para las alimentadas con rotífero enriquecido con ES y ES/2, el de ARA mayor en las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con

AG y MG, y en este caso también con las alimentadas con rotífero enriquecido con ES, y el de DHA fue significativamente mayor cuando las larvas se alimentaron con rotífero enriquecido con AG (38.08±9.60%) y menor con rotífero enriquecido con ES/2 (12.49±2.66%). No hay diferencias significativas en la cantidad de EPA entre los tratamientos. Al final del experimento (día 31) la supervivencia larvaria de los tratamientos ES y ES/2 fue muy baja por lo que no se pudo obtener suficiente cantidad de muestra para analizar el contenido en ácidos grasos. En el caso de los tratamientos MG y AG las larvas de 31 días de edad mostraron un perfil de ácidos grasos muy semejante y sólo el contenido en DHA mostró diferencias significativas, siendo mayor en las larvas del grupo MG.

Tabla 3. Total de lípidos (mg g⁻¹ peso seco, media±SD) y de ácidos grasos (mg g⁻¹ lípidos, media±SD) y perfil de ácidos grasos (% , media±SD) de larvas de corvina de 12 y 31 días de edad. Los totales incluyen componentes minoritarios que no se muestran. Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos de la misma edad.

	12 días				31 días	
	ES/2	ES	AG	MG	AG	MG
Total lípidos (mg g ⁻¹ peso seco)	68.00 ± 22.14	57.00 ± 24.00	81.33 ± 30.01	66.67 ± 14.05	93.00 ± 11.24	82.71 ± 3.53
Total ác. grasos (mg g ⁻¹ lípidos)	345.2 ± 68.1	456.1 ± 255.4	286.3 ± 92.1	366.7 ± 35.4	371.2 ± 36.1	596.9 ± 128.1
16:00	15.33 ± 2.63	11.60 ± 3.86	13.77 ± 5.23	16.43 ± 6.45	16.19 ± 0.86	17.18 ± 2.20
18:00	13.23 ± 3.41	10.21 ± 3.94	13.94 ± 2.57	16.04 ± 5.19	14.50 ± 1.74	11.95 ± 2.43
Σsaturados	28.77 ± 6.20	22.54 ± 8.19	28.30 ± 6.98	32.62 ± 11.87	31.90 ± 1.73	30.55 ± 3.65
16:01	2.50 ± 1.23 ^a	11.60 ± 3.86 ^{ab}	13.77 ± 5.23 ^b	16.43 ± 6.45 ^{ab}	0.92 ± 0.46	0.81 ± 0.54
18:1n-9	34.56 ± 11.56 ^a	10.21 ± 3.94 ^b	13.94 ± 2.57 ^b	16.04 ± 5.19 ^b	14.34 ± 1.33	14.50 ± 1.79
Σmonosaturados	40.45 ± 8.66 ^a	21.12 ± 3.40 ^b	11.00 ± 2.80 ^b	18.08 ± 6.96 ^b	21.38 ± 1.28	20.24 ± 1.48
18:2n-6	4.30 ± 1.89 ^a	7.76 ± 1.34 ^b	1.60 ± 0.40 ^c	2.23 ± 1.29 ^{ac}	2.61 ± 0.14	3.18 ± 0.49
20:4n-6	2.36 ± 0.79 ^a	3.55 ± 0.20 ^b	3.33 ± 0.80 ^{ab}	3.19 ± 0.06 ^{ab}	3.85 ± 0.39	3.68 ± 0.70
Σn-6 PUFA	9.47 ± 0.26 ^a	13.79 ± 1.19 ^b	13.28 ± 2.06 ^{bc}	10.27 ± 1.69 ^{ac}	11.80 ± 1.03	12.78 ± 1.52
20:5n-3	4.95 ± 1.56	7.69 ± 2.49	4.39 ± 0.77	3.87 ± 1.91	5.88 ± 0.82	4.33 ± 0.96
22:5n-3	1.99 ± 0.50 ^{ab}	4.50 ± 1.18 ^a	2.13 ± 2.24 ^{ab}	1.47 ± 0.60 ^b	0.82 ± 0.26	0.64 ± 0.23
22:6n-3	12.49 ± 2.66 ^a	27.21 ± 6.00 ^{ab}	38.08 ± 9.60 ^b	32.13 ± 18.22 ^{ab}	17.68 ± 0.97 ^a	23.14 ± 2.23 ^b
Σn-3 PUFA	21.31 ± 5.07 ^a	42.22 ± 9.65 ^b	47.38 ± 8.34 ^b	38.96 ± 20.60 ^{ab}	34.91 ± 1.96	36.43 ± 3.26
ΣPUFA	30.78 ± 5.23 ^a	56.01 ± 9.80 ^b	60.66 ± 9.66 ^b	49.23 ± 18.91 ^{ab}	46.71 ± 1.83	49.21 ± 3.52
n-3/n-6	2.25 ± 0.51	3.07 ± 0.75	3.59 ± 0.58	4.01 ± 2.67	2.98 ± 0.35	2.88 ± 0.47
DHA/EPA	2.60 ± 0.41 ^a	3.62 ± 0.58 ^{ab}	9.09 ± 3.86 ^{bc}	8.14 ± 0.69 ^c	3.06 ± 0.59 ^a	5.53 ± 1.31 ^b
EPA/ARA	2.12 ± 0.14	2.16 ± 0.62	1.39 ± 0.48	1.21 ± 0.57	1.54 ± 0.27	1.18 ± 0.21

Discusión

Aunque la nutrición de los juveniles y el engorde de esciéndidos, incluyendo la corvina, así como aspectos relacionados con los métodos de cultivo larvario y/o el desarrollo morfológico e histológico de la larva han sido objeto de numerosos estudios (Zaiss et al. 2006; Collett et al. 2008; Ballagh et al. 2008; Papadakis et al. 2009; Cárdenas 2010; Roo et al. 2010; Fielder y Heasman, 2011) este es el primer trabajo en el que se estudian los requerimientos en ácidos grasos de las larvas de esta especie. Con el fin de hacer una mejor aproximación al cultivo en criaderos comerciales, todos los productos utilizados

en este estudio para el enriquecimiento de las presas vivas son comerciales y ampliamente utilizados. Por otro lado, para conseguir niveles crecientes tanto en DHA, objeto del estudio, como del total de ácidos grasos n-3, se diluyeron algunos de los productos con aceite de oliva o se modificaron los tiempos de enriquecimiento de las presas. Así, en el caso del rotífero se consiguieron niveles que van del 3.5% al 30.2% de DHA y del 19.5 al 50.9% de n-3 PUFA, mientras que en los nauplios de *Artemia* estos niveles estuvieron comprendidos entre el 1.2% y el 22.7% de DHA y el 28.8% y el 48.3% de n-3 PUFA, mostrando siempre unos niveles de DHA inferiores a los contenidos en el enriquecedor utilizado o en el rotífero, dada la retroconversión de DHA a EPA y posteriormente a 18:3n-3 que realiza este tipo de presas (Evjemo et al. 1997; Navarro et al. 1999).

El efecto de la alimentación con las presas vivas enriquecidas es evidente, así las larvas alimentadas con presas vivas enriquecidas con AG mostraron un crecimiento significativamente mayor al resto de los grupos al final del cultivo larvario, mientras que las larvas alimentadas con presas enriquecidas con MG presentaron una mayor supervivencia. Teniendo en cuenta que los niveles de DHA en las larvas alimentadas con presas enriquecidas con MG fueron significativamente mayor que en las alimentadas con presas enriquecidas con AG se podría pensar que los niveles de DHA influyen en la supervivencia final, algo ya observado en otras especies de peces marinos como la dorada del Japón (Takeuchi et al. 1991) o el falso halibut del Japón (Furuita et al. 1999). En otras especies como el bacalao del Atlántico (García et al. 2008a), el eglefino (García et al. 2008b) y el sargo sobaito (Tawfiq Abu-Rezq et al, 2002) no parece existir esta relación entre el contenido de DHA en presas y larvas y la supervivencia final.

La composición en ácidos grasos de los rotíferos enriquecidos y las larvas de 12 días muestran valores muy semejantes. Así, el contenido en ARA de las larvas del tratamiento ES/2 es significativamente menor que en las del grupo ES, mientras que los niveles de DHA en las larvas del tratamiento ES/2 son menores que en las del grupo AG coincidiendo con los valores encontrados en el rotífero en ambos casos. En cuanto al contenido en EPA de las larvas, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aunque se observa un contenido ligeramente superior en las larvas del tratamiento ES, igual que en el rotífero. Lo mismo ocurre si se compara la composición en ácidos grasos de los metanauplios de *Artemia* con el de las larvas de 31 días. Así, los niveles de DHA en las larvas y en la *Artemia* del tratamiento MG son mayores que los observados en el grupo AG mientras que los de ARA y EPA en larvas y en la *Artemia* no presenta diferencias significativas. A día 31 la supervivencia de las larvas de los grupos ES y ES/2 fue demasiado baja para poder hacer análisis de ácidos grasos de sus tejidos, ambas dietas y las presas vivas enriquecidas mostraron niveles de DHA inferiores a los otros dos tratamientos. Teniendo en cuenta ambos resultados, la baja supervivencia larvaria y el bajo contenido de DHA de las presas vivas enriquecidas con ES y ES/2 podemos estimar que el requerimiento en DHA de las larvas de corvina podría estar comprendido en torno al 15-20% del total de ácidos grasos.

Uno de los principales papeles del DHA es la formación de los tejidos nervioso y visual de las larvas (Mourente y Tocher, 1992; Bell et al. 1996; Sargent et al. 1999) que juegan un importante papel en los primeros estadios del cultivo larvario y son esenciales a la hora de capturar presas vivas. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, las larvas que crecieron mejor y mostraron una mayor supervivencia presentaron unos niveles de DHA por encima del 15% y un ratio DHA/EPA entre 3 y 5. Así, cuando los niveles de DHA se encuentran por debajo del 15% en la *Artemia* o el ratio DHA/EPA es inferior a 2, la supervivencia y el crecimiento larvario se ven afectados (véase los resultados obtenidos usando ES o ES/2). La mayoría de los huevos de peces marinos presenta una relación DHA/EPA en torno a 2 (Tocher y Sargent, 1984; Parrish et al. 1994) lo que ha llevado a estos autores a indicar la necesidad de suministrar presas vivas con este mismo ratio a las larvas. Sin embargo, en algunas especies los requerimientos son mayores, como por ejemplo, las larvas de limanda crecen más rápido y muestran una supervivencia mayor cuando el ratio DHA/EPA en los rotíferos es 8.9 que cuando es 1.9 (Copeman et al. 2002) mientras que en otras como el lenguado senegalés el ratio DHA/EPA no parece tener influencia sobre el crecimiento o la supervivencia (Villalta et al. 2005).

Durante el periodo de alimentación con rotífero (hasta día 15) no se observaron diferencias de crecimiento larvario entre los distintos tratamientos, lo que nos lleva a pensar que o bien en este periodo inicial de vida larvaria el requerimiento en DHA y n-3 PUFA no es tan alto como en fases posteriores, o bien el contenido de DHA del rotífero (entre 3.5 y 30.2% de DHA), o los restos de vitelo y de la gota de grasa que aun portaba la larva, fueron suficientes para cubrir sus requerimientos. A partir del día 21 de la eclosión las larvas empezaron a mostrar diferencias significativas en el crecimiento, siendo las larvas alimentadas con presas enriquecidas con AG y MG, es decir con los mayores niveles de DHA y n-3 PUFA, las más grandes. Estos resultados parecen indicar que es a partir del día 15 (cuando se introduce la *Artemia*) cuando las larvas necesitan un mayor aporte de DHA que ha de satisfacerse por medio de las presas vivas por lo que es necesario utilizar aquellos enriquecedores comerciales que proporcionen los niveles adecuados. Así, en el caso de las larvas de corvina durante los primeros 15 días de cultivo cualquiera de los enriquecedores comerciales (Easy Selco, Algamac o Multigain) puede satisfacer los requerimientos en ácidos grasos, pero a partir de ese día ha de seleccionarse alguno de los productos (Algamac o Multigain, ambos en formato polvo y con un alto contenido en DHA) que proporcionan mayores niveles de DHA (superior al 15% del contenido total de ácidos grasos equivalente a 12.1 mg g⁻¹ de peso seco) en los metanauplios de *Artemia* a fin de conseguir un crecimiento y una supervivencia óptimos.

Bibliografía

Ballagh, D.A., Pankhurst, P.M. y Fielder, D.S. 2008. Photoperiod and feeding interval requirements of juvenile mullet, *Argyrosomus japonicus*. *Aquaculture* 277, 52-57.

Bell, M.V., McEvoy, L.A. y Navarro, J.R. 1996. Deficit of docosahexanoyl phospholipid in eyes of larval sea bass fed an essential fatty acid deficient diet. *Journal of Fish Biology*, 49: 941-952.

Cárdenas, S. 2010. Crianza de la corvina (*Argyrosomus regius*). Cuadernos de Acuicultura nº 3. Fundación OESA (Ed.), p. 96

Christie, W.W. 1982. *Lipid Analysis*. Pergamon, Oxford, UK, p. 207.

Civera-Cerecedo, R., Álvarez-González, C.A. y Moyano-López, F.J. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marino. En: Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Collett, P.D., Vine, N.G. y Kaiser, H. 2008. The effect of light intensity on growth of juvenile dusky kob *Argyrosomus japonicus* (Temminck & Schlegel 1843). *Aquaculture Research* 39, 526-531.

Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A. y Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285-304.

Duncan, N.J., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairín, I., Bucci, F., Vallés, R. y Mylonas, C.C. 2012. Reproductive development, GnRH-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1273-1286.

Estévez, A., Treviño, L. y Gisbert, E. 2007. La densidad larvaria inicial afecta al crecimiento pero no a la supervivencia de las larvas de corvina (*Argyrosomus regius*) en cultivo. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, España.

Evjemo, J.O., Coutteau, P., Olsen, Y. y Sorgeloos, P. 1997. The stability of docosahexaenoic acid in two *Artemia* species following enrichment and subsequent starvation. *Aquaculture* 155, 35-148.

Fielder, D.S. y Heasman, M.P. 2011. *Hatchery Manual for the production of Australian Bass, Mulloway and Yellowtail Kingfish*. Industry & Investment NSW, ISBN 98 1 74256 058 8. 176 pp.

Folch, J.M., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.

Furuita, H., Konishi, K. y 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 Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 170, 59-69.

- Garcia, A.S., Parrish, C.C. y Brown, J.A. 2008a. A comparison among differently enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*) and their effect on Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae early growth, survival and lipid composition. *Aquaculture Nutrition* 14, 14-30.
- Garcia, A.S., Parrish, C.C., Brown, J.A., Johnson, S.C. y Leadbeater, S. 2008b. Use of differently enriched rotifers, *Brachionus plicatilis*, during larviculture of haddock, *Melanogrammus aeglefinus*: effects on early growth, survival and body lipid composition. *Aquaculture Nutrition* 14, 431-444.
- Masuda, R. 2003. The critical role of docosahexaenoic acid in marine and terrestrial ecosystems: from bacteria to human behavior. En: *The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference* (ed: I. Howard, Browman y A.B. Skiftesvik) Institute of Marine Research, Bergen, Norway.
- Mourente, G. y Tocher, D.R. 1992. Effect of weaning onto a pelleted diet on docosahexaenoic acid (22:6n-3) levels in brain of developing rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 105, 363-377.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V. y Amat, F. 1999. Lipid conversions during enrichment of Artemia. *Aquaculture* 174, 156-166.
- Papadakis, I.E., Zaiss, M.M., Kyriakou, Y., Georgiou, G., Divanach, P. y Mylonas, C.C. 2009. Histological evaluation of the elimination of *Artemia* nauplii from larval rearing protocols on the digestive system ontogeny of shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Aquaculture* 286, 45-52.
- Parrish, C.C., Castell, J.D., Brown, J.A., Boston, L., Strickland, J.S., y Somerton, D.C. 1994. Fatty acid composition of Atlantic halibut eggs in relation to fertilization. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 94, 36-38.
- Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M. Lupi, P. y A. Bonelli. 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International* 11, 301-311.
- Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D. y Fernández-Palacios, H. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82-88.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. y Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191-199.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. y Bell, J.G. 2002. The lipids. En: *Fish Nutrition* (ed. J.E. Halver), 3rd edn. pp. 181-257, Academic Press, San Diego.

Takeuchi, T., Toyota, M. y Watanabe, T. 1991. Dietary value to larval red seabream of *Artemia* nauplii enriched with EPA and DHA. En: Abstracts of the annual meeting of Japanese Society of Scientific Fisheries. April 1991. Tokyo, Japan.

Tawfiq Abu-Rezq, Al-Abdul-Elah, K., Duremdez, R., Al-Marzouk, A., James, C.M., Al-Gharabally, H. y Al-Shimmari, J. 2002. Studies on the effect of using the rotifer, *Brachionus plicatilis*, treated with different nutritional enrichment media and antibiotics on the growth and survival of blue-fin sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes), larvae. Aquaculture Research 33, 117-128.

Tocher, D.R. y Sargent, J.R. 1984. Analysis of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. Lipids 19, 492-499.

Vallés, R. y Estévez, A. 2013. Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). Aquaculture 376-379, 15-19.

Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P. y Bell, J.G. 2005. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. Aquaculture 249, 353-365.

Zaiss, M.M., Papadakis, I.E., Maingot, E., Divanach, P. y Mylonas, C.C. 2006. Ontogeny of the digestive tract in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) reared using the mesocosm larval rearing system. Aquaculture 260, 357-368.

Discusión general

Reproducción en cautividad

La corvina es una especie en la que encontramos que las hembras son más grandes (en peso) que los machos. La tasa de crecimiento de los reproductores cultivados es de 1 kg año^{-1} , mientras que la de los reproductores salvajes es de 3 kg año^{-1} . La diferencia entre los dos tipos de reproductores puede deberse al tipo de tanque (los cultivados estaban estabulados en tanques rectangulares de 18 m^2 y 80 cm de profundidad y los salvajes en un tanque tipo “raceway” de 50 m^2 y 1 m de profundidad), a la alimentación suministrada (los peces cultivados se alimentaban exclusivamente con pienso mientras que los salvajes se les administraba alimento fresco un día a la semana) y a los diferentes protocolos de muestreo (los cultivados fueron muestreados mensualmente durante todo el año, en cambio los salvajes sólo se muestrearon durante la época de puesta, en primavera).

El periodo de gametogénesis en la corvina empieza en noviembre-diciembre indicado por el aumento de la concentración en sangre de la 11-ketotestosterona en machos y de la testosterona y estradiol en hembras. El nivel máximo de 11-KT en machos se encuentra en febrero y en marzo se observan los primeros machos fluyentes hasta junio donde los valores de esta hormona son mínimos. Por otro lado, el nivel máximo de estradiol se detecta en abril coincidiendo con la aparición de las hembras con ovocitos en estado de vitelogenesis y no es hasta junio cuando los ovocitos entran en estado de atresia cuando la concentración de estradiol en sangre es mínima. Los niveles de esteroides así como la presencia de esperma y ovocitos en vitelogenesis se mantienen durante todo el periodo de puesta por lo que la corvina es capaz de producir varias puestas fertilizadas durante un mismo periodo reproductivo.

En esta tesis se ha descrito el protocolo de reproducción en cautividad de la corvina tanto de origen salvaje como de cultivo, mediante la inducción hormonal con inyección o implante de GnRH α . Se ha determinado que los machos deben ser fluyentes y con una buena movilidad del esperma y que las hembras deben tener los ovocitos en estado de vitelogenesis (tamaño mayor a 0.5 mm) y que presenten una distribución de frecuencias del tamaño de los ovocitos bimodal, para que la inducción sea eficaz y sean capaces de liberar los gametos. Los machos pueden ser inducidos semanalmente mientras sean fluyentes, en cambio, las hembras no recuperan el estado de maduración ideal (con un tamaño de los ovocitos mayor a 0.5 mm y una distribución de frecuencias del tamaño de los ovocitos bimodal) para realizar la puesta hasta al cabo de un mes, aunque en el caso de las hembras salvajes en el año 2011 recuperan el estado de los ovocitos en dos semanas.

En esta tesis se han determinado los parámetros ideales para la reproducción de la corvina. De manera que la maduración gonadal se produce a una temperatura de $16.5 \pm 1.4^\circ\text{C}$. Los reproductores consiguen liberar los gametos mediante inducción hormonal que se realiza durante la noche al cabo de 36 h de la inducción a una temperatura media de $17.2 \pm 0.8^\circ\text{C}$. Y la eclosión de los huevos se produce a las 48 h de la fecundación a una temperatura de 19°C .

Mediante el uso de ciertos parámetros de calidad de puesta se ha podido determinar que las puestas de los reproductores salvajes fueron de mayor calidad que las de los reproductores cultivados por su mayor tasa de fecundación ($95.9\pm 4.9\%$) y de eclosión ($91.8\pm 6.7\%$), por el mayor tiempo de supervivencia de las larvas en ayuno (10.4 ± 1.2 días) y por el mayor contenido en PUFA de los huevos ($43.09\pm 1.37\%$). Estos ácidos grasos poliinsaturados son los responsables de proporcionar a los huevos y a las larvas la energía necesaria para la eclosión, el desarrollo lecitotrófico y sobrevivir más días en ayuno. La mayor calidad de las puestas de los reproductores salvajes puede ser debida a (1) la diferencia de peso al inicio del estudio (11 kg las salvajes y 6.1 ± 1.2 kg las cultivadas) lo que hace más probable que los reproductores salvajes hubieran desovado anteriormente en el mar, mientras que para los cultivados era su primera maduración, (2) a la diferente alimentación, siendo la de las salvajes más rica en PUFA por el aporte de alimento fresco (sardina o calamar) una vez a la semana, (3) a la mala condición física de los ejemplares cultivados, debido al estrés causado por los muestreos mensuales a los que fueron sometidos durante todo el estudio y (4) a los diferentes tipos de tanque donde estaban estabulados. Finalmente, se ha observado que los huevos de la corvina (tanto de origen salvaje como de cultivo) poseen una o más gotas de grasa sin que ello afecte a la tasa de fecundación y eclosión (parámetros considerados como indicadores de la calidad de la puesta).

Cultivo larvario

Las deformaciones, que generalmente aparecen en las primeras etapas del cultivo larvario, son un problema para la acuicultura porque deterioran el estado físico de los peces y su rentabilidad en el mercado. El conocimiento sobre la formación del esqueleto es esencial para evaluar con precisión las deformaciones de los peces de cultivo. En esta tesis se describe la osteología del esqueleto axial (columna vertebral) y apendicular (aletas dorsal, anal y caudal) de la corvina. También se ha comparado el desarrollo osteológico de las larvas de corvina cultivadas en IPIMAR y en IRTA-SCR, bajo diferentes condiciones de cultivo. La columna vertebral de la corvina está compuesta por 25 vértebras distribuidas en 5 cefálicas, 5 pre-hemales, 11 hemales y 3 caudales incluyendo el urostilo. La aleta dorsal está compuesta por 11 espinas duras anteriores y 27 radios suaves posteriores que se sustentan en los elementos intracartilaginosos llamados pterigióforos. La aleta anal está compuesta por 2 espinas duras y 8 radios suaves sustentados también por pterigióforos. Y finalmente, la aleta caudal está formada por 5 radios suaves dorsales y 6 ventrales (dermatotrichia) que se articulan con los epurales y un arco neural modificado y con dos arcos hemales modificados, respectivamente, y de radios suaves centrales (lepidotrichia) articulados con los hipurales y el parhipural. El desarrollo esquelético y la aparición de las estructuras esqueléticas fueron más tempranos en las larvas cultivadas en IPIMAR que en las del IRTA-SCR debido a que la temperatura del agua, la intensidad de luz y el fotoperiodo eran diferentes siendo menores en el IRTA-SCR. De esta manera, en IPIMAR se obtuvo un esqueleto totalmente formado a día 30, mientras que en el IRTA-SCR no fue hasta el

día 50. Estas diferencias sugieren que las condiciones ambientales de cultivo de la larva afectan al desarrollo esquelético de la corvina.

Para determinar las condiciones óptimas de luz en el cultivo larvario se diseñaron dos experimentos. El primero para determinar el fotoperiodo y el segundo la intensidad de la luz adecuada para maximizar la tasa de crecimiento específica (SGR) y la supervivencia larvaria. En general la intensidad de luz (de 50 a 1000 lux) no afectó a la supervivencia larvaria que osciló entre el 10% y el 15%. En cambio, al disminuir el fotoperiodo (bajo una intensidad de luz de 500 lux) aumentó la supervivencia del 6% (cuando las larvas se encontraban con 24 h de luz) al 48% (con 8 h de luz). La SGR_{1-15} no se vio afectada por los diferentes tratamientos tanto de intensidad de luz como del fotoperiodo que fueron probados. Sin embargo, la SGR_{16-30} fue mayor en el tratamiento de 500 lux con 16 h y 24 h de luz. Una alta intensidad de luz y un fotoperiodo largo provocaron una alta mortalidad debido a la aparición de canibalismo y a la hiperinflación de la vejiga natatoria. Según los resultados de los experimentos llevados a cabo en esta tesis se aconseja que durante el periodo de la alimentación de las larvas con rotífero (del día 1 al 15) se utilice una intensidad de luz media (500 lux) o alta (1000 lux) y un fotoperiodo largo (de 16 a 24 h luz), mientras que cuando las larvas se alimentan con *Artemia* (a partir del día 16) el fotoperiodo debe ser de 16hL:8hO (manteniendo la misma intensidad de luz) para maximizar la tasa de alimentación y el crecimiento y evitar la hiperinflación de la vejiga natatoria y el canibalismo con el fin de mejorar la tasa de supervivencia.

Las presas vivas (rotíferos y *Artemia*) utilizadas en el cultivo larvario de peces marinos son susceptibles a la proliferación de bacterias que pueden ser la causa de un escaso crecimiento de las larvas y de una baja supervivencia larvaria. El peróxido de hidrógeno es un metabolito natural que se degrada a oxígeno y agua mediante reducción química o descomposición enzimática por muchos organismos y la acción directa del sol sobre el agua sin producir ningún contaminante. Recientemente se ha demostrado que es un buen desinfectante en la acuicultura, para huevos, larvas y presas vivas. En esta tesis se han estudiado los efectos del Ox-Aquaculture[®], un producto a base de peróxido de hidrógeno, sobre la carga bacteriana de las presas vivas (rotíferos y *Artemia*) y de las larvas de corvina. Cuando los rotíferos fueron expuestos durante 15 min a 40 mg L⁻¹ del producto se obtuvo una reducción del 34.6% del total de bacterias heterotróficas totales y del 59.7% de las *Vibrionaceae*. Cuando la *Artemia* fue expuesta durante 5 min a 8000 mg L⁻¹ del producto se obtuvo una reducción de 34.3% de bacterias heterotróficas totales y del 37.7% de *Vibrionaceae*. Cuando las larvas de corvina estuvieron expuestas durante 1 h a 20 mg L⁻¹ del producto se obtuvo una reducción de más del 95% de las bacterias heterotróficas totales y del 75% de *Vibrionaceae*. Además, la desinfección con Ox-Aquaculture[®] no cambió la composición de ácidos grasos ni la supervivencia de las presas vivas enriquecidas y mejoró la supervivencia larvaria. Por lo tanto, el Ox-Aquaculture[®] puede considerarse como un buen desinfectante para la acuicultura.

El análisis del contenido estomacal de las larvas de peces nos permite obtener información sobre el tipo y el tamaño de la presa que ingieren. En esta tesis se ha

querido determinar si las larvas de corvina seleccionan entre diferentes tipos de *Artemia* enriquecida mediante el marcaje de éstas con microesferas fluorescentes de diferentes colores. Se han usado tres técnicas diferentes para cuantificar el número de *Artemias* por larva: la espectrofotometría, la citometría de flujo y el microscopio de fluorescencia para así poder correlacionarlas y validar el método. Mediante los resultados de espectrofotometría y citometría de flujo se obtiene que las larvas de corvina no seleccionan entre los diferentes tipos de *Artemia* ni entre los diferentes colores y que son buenos métodos si sólo se quiere obtener un resultado relativo en cuanto a porcentaje de “llenado del digestivo”. Los resultados obtenidos con el microscopio de fluorescencia muestran una alta variabilidad y no son comparables con los otros dos métodos. El marcaje de la *Artemia* con microesferas fluorescentes es una técnica eficaz para determinar la selectividad de las larvas de corvina aunque es necesario realizar más ensayos (con larvas de corvina u otra especie) con el fin de mejorar algunos puntos del diseño experimental.

Los requerimientos nutricionales de la corvina son diferentes a los de otras especies de peces marinos estudiados debido a su alta voracidad, a su alimentación visual y al canibalismo. Los ácidos grasos son los nutrientes más importantes para el desarrollo de las larvas de peces marinos, entre ellos los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3 que son considerados como ácidos grasos esenciales. Las presas vivas (rotífero y *Artemia*) utilizadas en acuicultura para alimentar a las larvas de peces marinos carecen de los niveles necesarios de n-3 PUFA por lo que es necesario un enriquecimiento previo con emulsiones lipídicas o productos ricos en estos ácidos grasos esenciales. En esta tesis, se ha estudiado el efecto de diferentes productos de enriquecimiento (con diferentes concentraciones de DHA) usados para enriquecer los rotíferos y la *Artemia* sobre el crecimiento, la supervivencia y la composición lipídica de las larvas de corvina. Las larvas alimentadas con presas vivas enriquecidas con Algamac 3050 (AG) mostraron un crecimiento significativamente más elevado que el resto de los tratamientos al final del experimento, mientras que las larvas alimentadas con presas vivas enriquecidas con Multigain (MG) obtuvieron una tasa de supervivencia mayor. Los niveles de DHA en las larvas alimentadas con presas vivas enriquecidas con MG fueron significativamente mayores que en aquellas alimentadas con presas vivas enriquecidas con AG. Las larvas que fueron alimentadas con presas vivas enriquecidas con Easy Selco (ES) y Easy Selco reducido a la mitad con aceite de oliva (ES/2) tuvieron una tasa de supervivencia muy baja. Por los resultados obtenidos en este trabajo, podemos estimar que el requerimiento en DHA de las larvas de corvina podría estar en torno al 15-20% del total de ácidos grasos.

Bibliografía general

APROMAR. 2012. La acuicultura Marina de Peces en España. Informe Anual de la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. Cádiz.

Arnold, C.R., Bailey, W.H., Williams, T.D., Johnson, A. y Lasswell, J.L. 1977. Laboratory spawning and larval rearing of red drum and Southern flounder. Proceedings of the Annual Conference of the Southeastern Association of Game and Fish Commissioners 31, 437-440.

Barbaro, A., Francescon, A., Bertotto, D., Bozzato, G., Di Maria, I., Patarnello, P., Furlan, F. y Colombo, L. 2002. More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonista in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture. Journal of Applied Ichthyology 18, 192-199.

Basaran, F., Muhtaroglu, CG., Özden, O. y Özkizilcik, S. 2009. Spawning behaviour of shi drum (*Umbrina cirrosa*) after hormone administration. Journal of Fisheries Science 32, 124-133.

Battaglione, S.C. y Talbot, R.B. 1994. Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces. Sciaenidae). Aquaculture 126, 73-81.

Cárdenas, S. 2010. Crianza de la Corvina (*Argyrosomus regius*). Cuadernos de Acuicultura nº3. Fundación Observatorio Español de Acuicultura.

Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Vallés, R. y Mylonas, C.C. 2012. Reproductive development, GnRH-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. Fish Physiology and Biochemistry 38, 1273-1286.

Duncan, N.J., Estévez, A., Fernández-Palacios, H., Gairin, I., Hernández-Cruz, C.M., Roo, J., Schuchardt, D. y Vallés, R. 2013. Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market. En: Advances in aquaculture hatchery technology (ed: G. Allan y G. Burnell). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, No. 242.

FAO 2011. FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. FISHSTAT Plus: Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. 2000. Data sets: Aquaculture production: quantities and values 1950-2009; Capture production 1950-2009.

FAO 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma 2012.

Fielder, DS. y Heasman, MP. 2011. Hatchery Manual for the Production of Australian Bass, Mullet and Yellowtail Kingfish. Industry & Investment NSW, ISBN 978 1 74256 058 8. 176pp.

González-Quirós, R., Árbol, J., García-Pacheco, M.M., Silva-García, A.J., Naranjo, J.M. y Morales-Nin, B. 2011. Life-history of meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research* 109, 140-149.

Grau, A., Rodríguez-Rúa, A., Massuti-Pascual, E., Jiménez, M.T., Durán, J., Jiménez-Cantizano, R.M., Pastor, E. y Cárdenas, S., 2007. Spawning of meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) using GnRH α . *Aquaculture Europe 2007*. European Aquaculture Society. Estambul, Turquía.

Jiménez, M.T., Pastor, E., Grau, A., Alconchel, I. y Cárdenas, S. 2005. Revisión sobre el cultivo de esciénidos en el mundo, con especial atención a la corvina (*Argyrosomus regius*): Boletín. Instituto Español de Oceanografía 21, 169-176.

Lagardère, JP y Mariani A. 2006. Spawning sounds in meagre *Argyrosomus regius* recorded in the Gironde estuary, France. *Journal of Fish Biology* 69, 1697-1708.

Mylonas, CC., Kyriakou, Y., Sigelaki, I., Georgiou, G., Stephanou, D. y Divanach, P. 2004. Reproductive biology of the of shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRH α . *The Israeli Journal of Aquaculture* 56, 75-92.

PLANACOR 2009. Plan Nacional de Cría de Corvina, *Argyrosomus regius*. Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos.

Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., Lupi, P. y Bonelli, A. 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial size fish. *Aquaculture International* 11, 301-311

Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D. y Fernández-Palacios, H. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82-88.

Schiavone, R., Zilli, L., Storelli, C. y Vilella, S. 2012. Changes in hormonal profile, gonads and sperm quality of *Argyrosomus regius* (Pisces, Sciaenidae) during the first sexual differentiation and maturation. *Theriogenology* 77, 888-898.

Thomas, P., Arnold, C.R. y Holt, G.J. 1995. Red drum and other sciaenids. En: *Broodstock management and egg and larval quality* (ed: N.R. Bromage y R.J. Roberts). Blackwell Science Ltd, Cambridge UK, 118-137.

Zaiss, M.M., Papadakis, I.E., Maingot, E., Divanach, P. y Mylonas, C.C. 2006. Ontogeny of the digestive tract in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) reared using the mesocosm larval rearing System. *Aquaculture* 260, 357-368.

Conclusiones generales

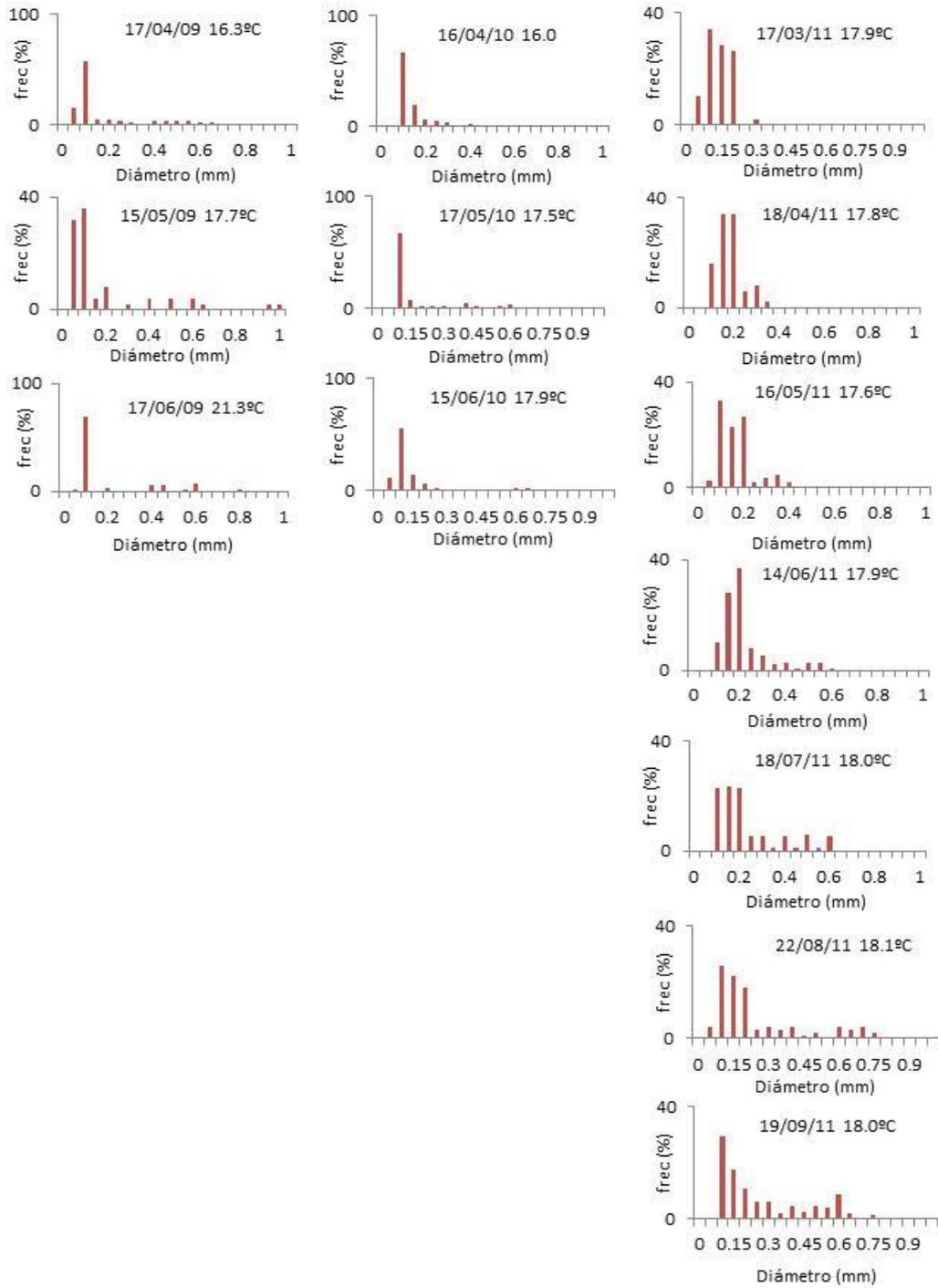
- La corvina se reproduce en cautividad mediante la inducción a la puesta con una inyección o un implante intramuscular de GnRH α . La gametogénesis empieza en diciembre y termina en marzo, y la maduración y la puesta se produce desde abril hasta junio. El cambio de un fotoperiodo natural (15hL:9hO en verano y 9hL:15hO en invierno) a constante (14hL:8hO) provoca un retraso de dos meses en la maduración y la puesta de la corvina. El mejor indicador de la maduración de la hembra es el tamaño de los ovocitos (mayor de 0.5 mm) y la distribución del tamaño de los ovocitos bimodal. Después de cada inducción hormonal, el tamaño y la distribución bimodal de los ovocitos se recupera en un mes (año 2010) o incluso en dos semanas (año 2011).
- La calidad de las puestas de la corvina de origen salvaje fue mejor que las de la corvina cultivada debido a la mayor tasa de fecundación y eclosión de los huevos y al mayor número de días que sobrevivieron las larvas en ayuno. Además, los huevos de las corvinas salvajes mostraron una mayor composición en n-3 PUFA y lípidos polares que los de las cultivadas. Los huevos de corvina contienen una o más de una gota de grasa sin afectar a la calidad de la puesta.
- En esta tesis se ha descrito por primera vez la osteología temprana del esqueleto axial y apendicular (aleta dorsal, anal y caudal) de las larvas de corvina cultivadas con el fin de determinar la calidad de los individuos mediante las deformaciones esqueléticas producidas durante el cultivo de la corvina. También se destaca la importancia de optimizar los protocolos de cultivo ya que las condiciones ambientales afectan al desarrollo del esqueleto.
- El cultivo larvario de la corvina requiere una intensidad de luz y un fotoperiodo adecuados para asegurar una correcta inflación de la vejiga natatoria, un buen crecimiento y una mayor supervivencia. Según los resultados de los experimentos actuales se aconseja que durante el periodo de la alimentación de las larvas con rotífero (del día 1 al 15) se utilice una intensidad de luz media (500 lux) o alta (1000 lux) y un fotoperiodo largo (de 16 a 24 h luz), mientras que cuando las larvas se alimentan con *Artemia* (a partir del día 16) el fotoperiodo debe ser de 16hL:8hO para maximizar la tasa de alimentación y el crecimiento y evitar la hiperinflación de la vejiga natatoria y el canibalismo con el fin de mejorar la tasa de supervivencia.
- El uso del Ox-aquaculture[®] (50% peróxido de hidrógeno) como desinfectante de presas vivas y larvas de corvina en las primeras etapas de cultivo contribuye a mejorar la tasa de supervivencia sin afectar al crecimiento de las larvas. Además, la desinfección de las presas vivas (rotíferos y *Artemia*) antes de la introducción en los tanques de cultivo reduce el número de bacterias heterotróficas totales y *Vibrionaceae* con el fin de prevenir y/o reducir las enfermedades de las larvas causadas por bacterias oportunistas.

- El marcaje de la *Artemia* mediante microesferas fluorescentes es una herramienta eficaz para determinar la selección de las larvas de corvina. Mediante este método de marcaje se ha podido observar que las larvas de corvina no parecen seleccionar entre distintos tipos de *Artemia* enriquecida ya que la selección observada en un día difiere totalmente de la selección del día siguiente. Estas diferencias entre los distintos días no pueden atribuirse al color de las microesferas fluorescentes ya que la selección por color también cambia de un día a otro.
- El requerimiento en DHA de las larvas de corvina durante los primeros 15 días de cultivo (alimentación con rotífero) o es muy bajo o los restos del vitelo y de la gota de grasa son suficientes para cubrir las necesidades nutricionales, ya que no se encontraron diferencias significativas de crecimiento entre las larvas de los diferentes tratamientos. A partir del día 21 y hasta el final del experimento, las larvas alimentadas con Algamac y Multigain (con mayores niveles en DHA) fueron más grandes y otuvieron una supervivencia mayor. Con los resultados obtenidos en este estudio, podemos afirmar que a partir del día 15 después de la eclosión, la *Artemia* se debe enriquecer con productos que contengan altos niveles de DHA (superior al 15% del contenido total de ácidos grasos) para proporcionar a las larvas un mayor crecimiento y supervivencia larvaria.

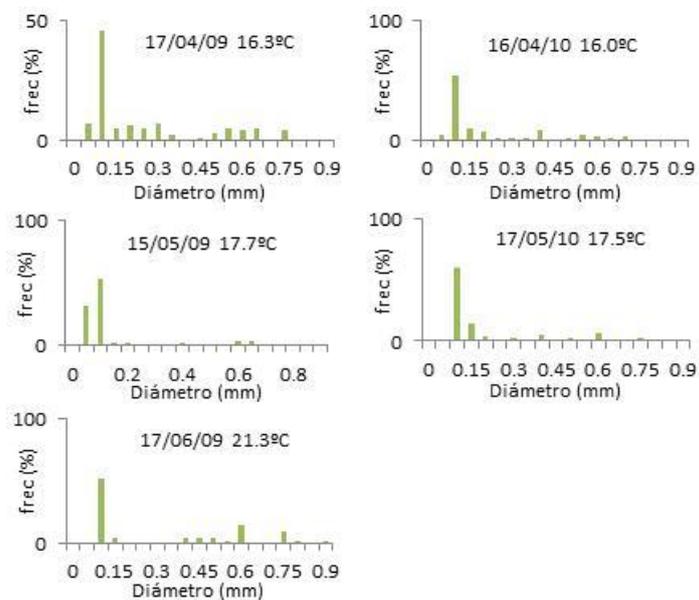
Anexos

Anexo 1. Frecuencias del tamaño de los ovocitos (N=150) de cada hembra en 2009, 2010 y 2011.

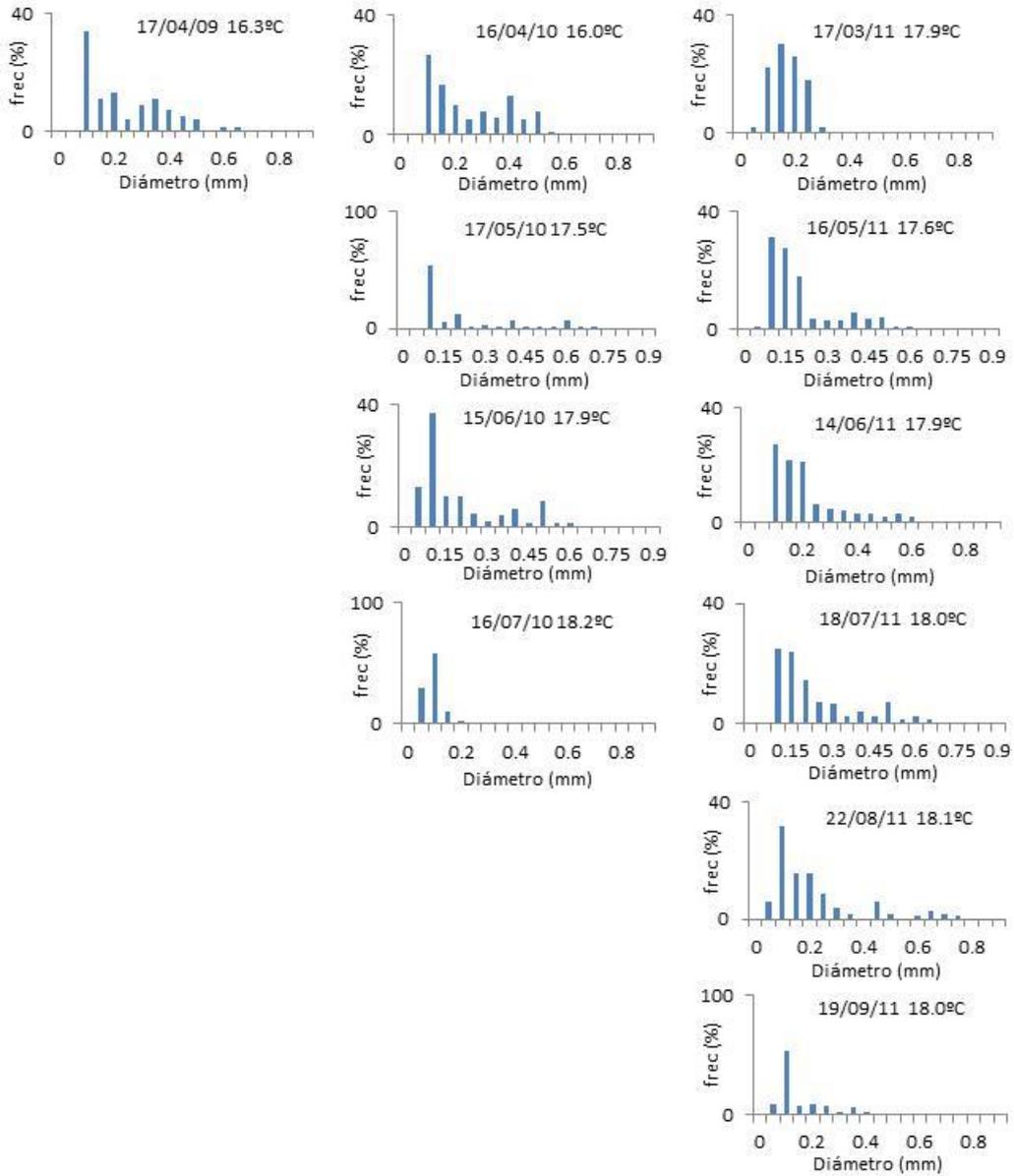
a) Hembra n° 7 con un peso medio en la época de maduración de 7.0 ± 0.2 kg en 2009, 8.2 ± 0.1 kg en 2010 y 9.3 ± 0.5 kg en 2011.



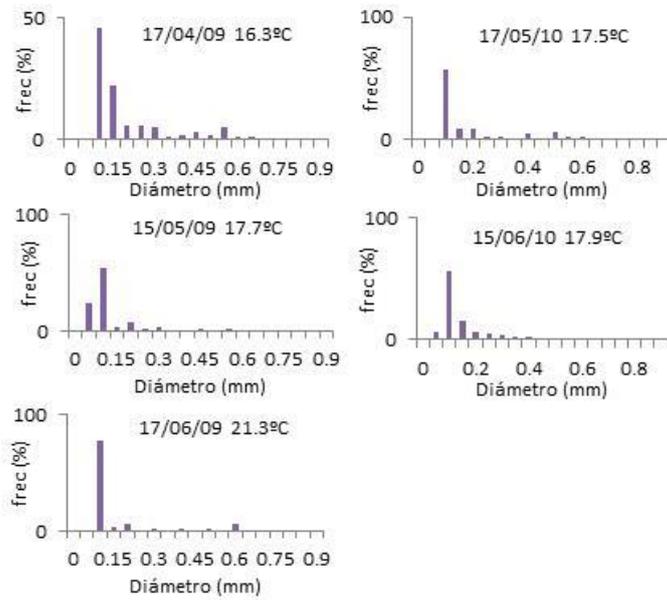
b) Hembra nº 8 con un peso medio en la época de maduración de 8.9 ± 0.1 kg en 2009 y 10.3 ± 0.1 kg en 2010.



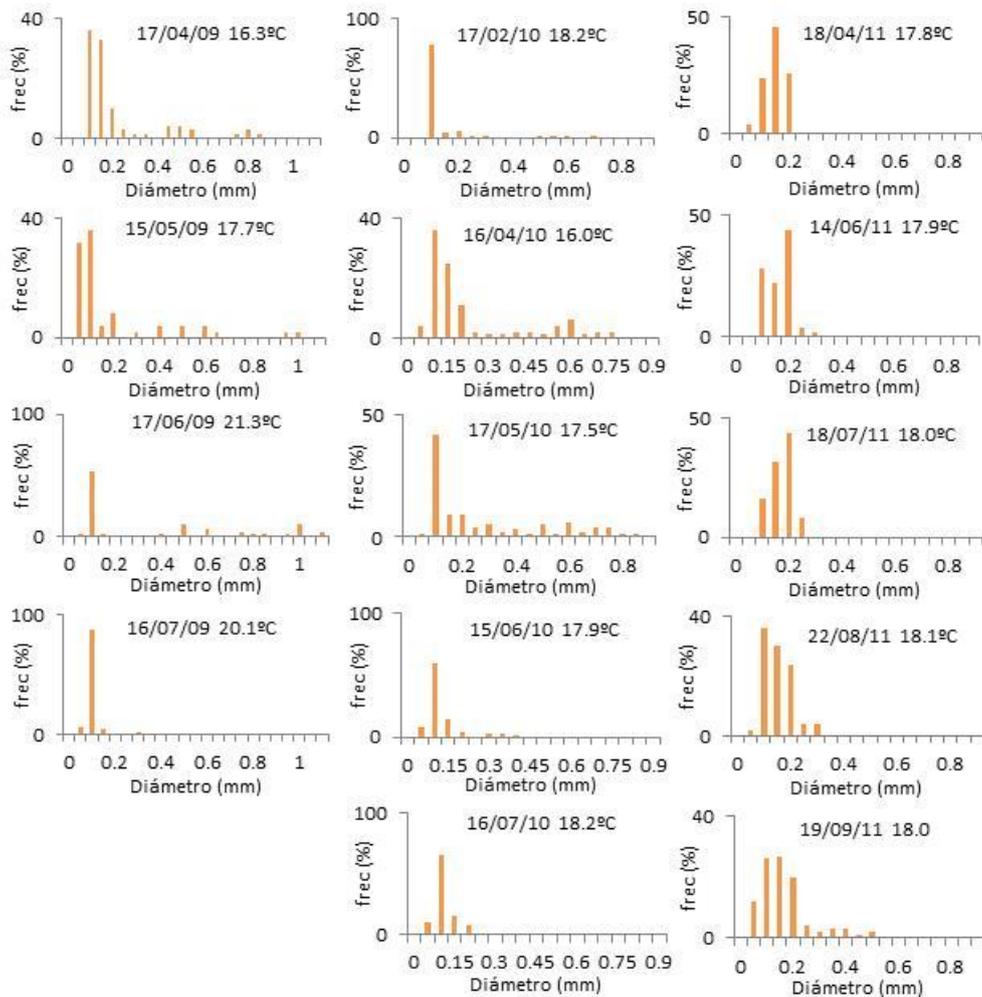
c) Hembra nº 9 con un peso medio en la época de maduración de 8.3 kg en 2009, 10.8±0.2 kg en 2010 y 11.5±0.2 kg en 2011.



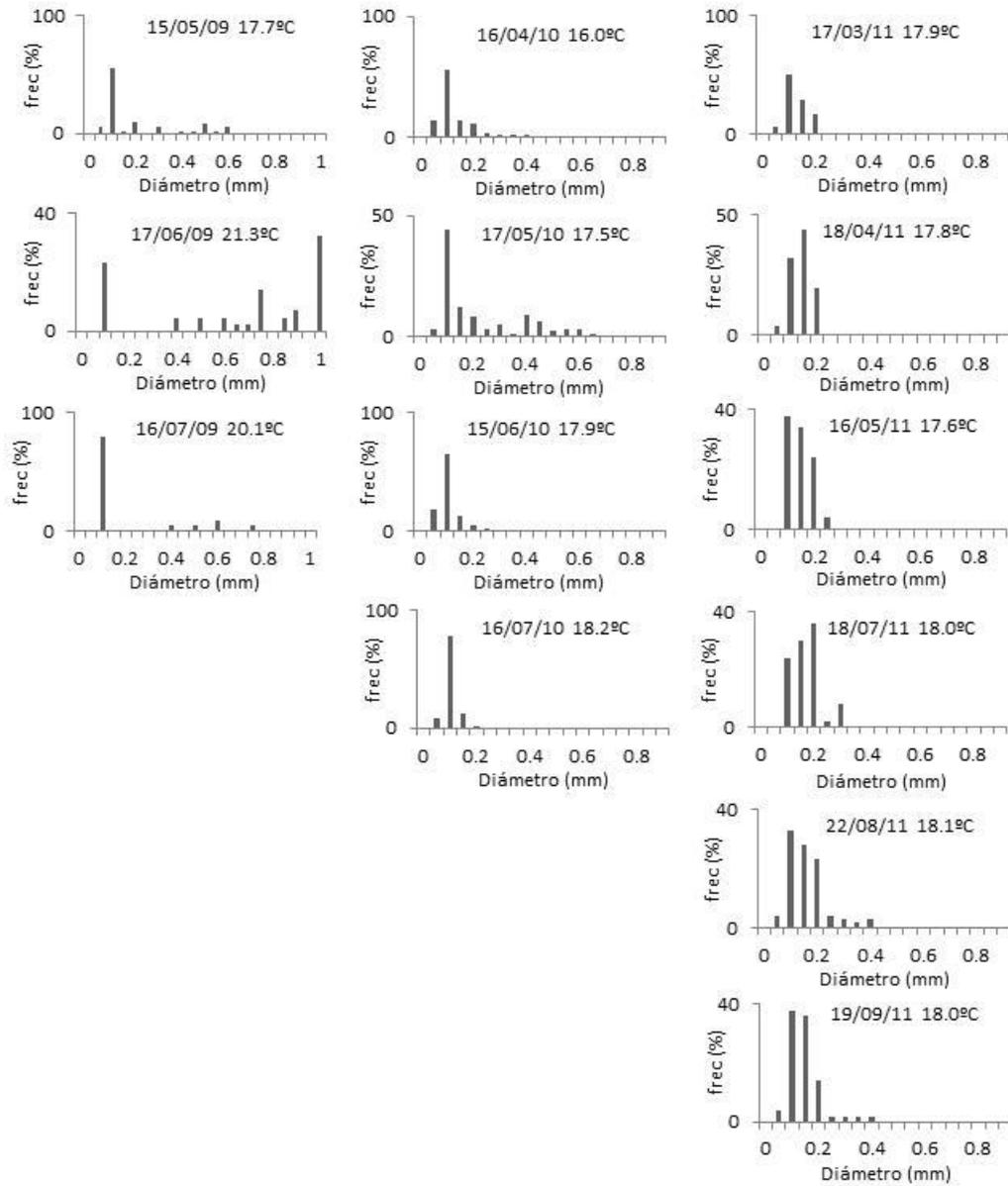
d) Hembra nº 10 con un peso medio en la época de maduración de 6.7 ± 0.3 kg en 2009 y 8.2 ± 0.4 kg en 2010.



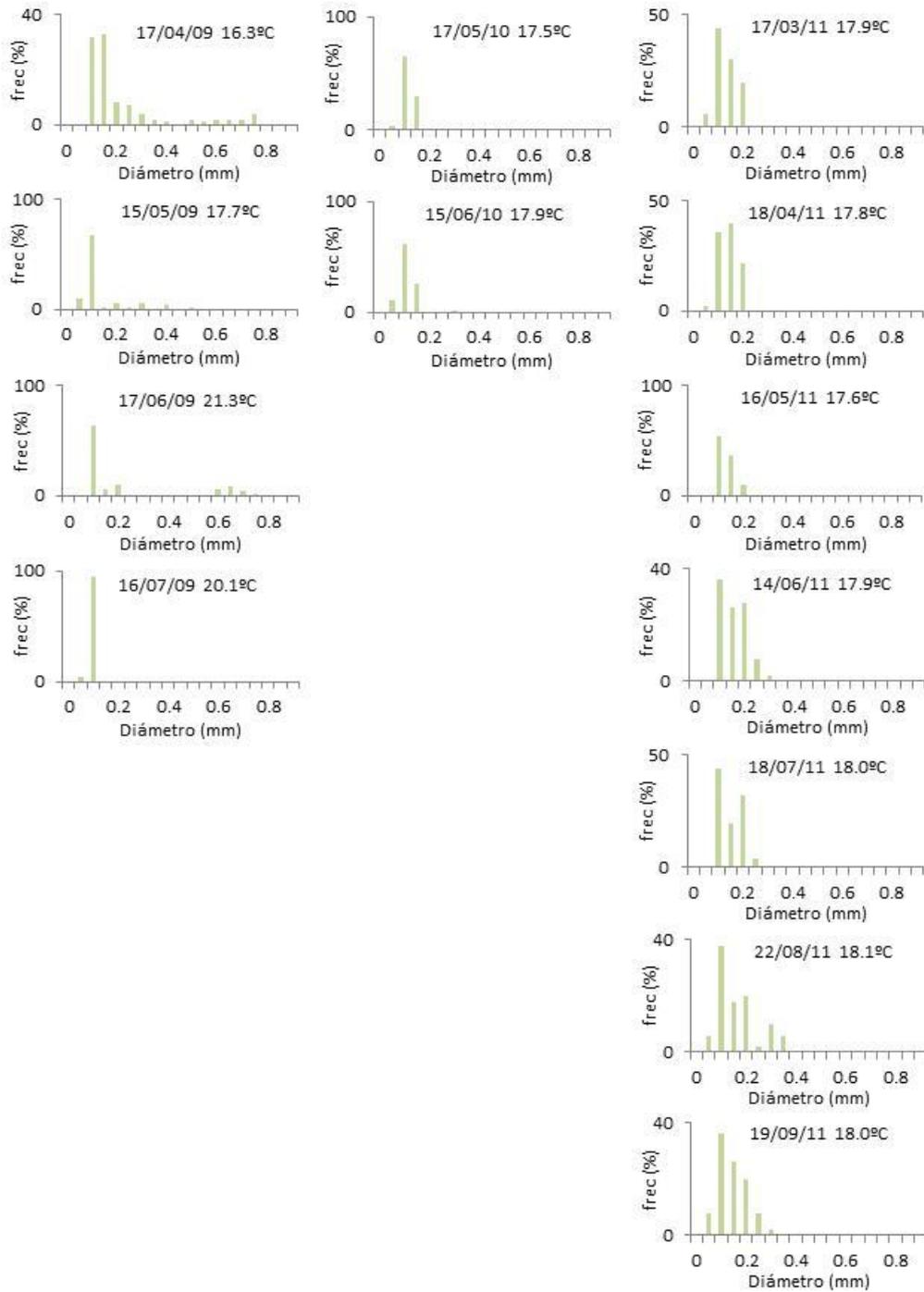
e) Hembra nº 11 con un peso medio en la época de maduración de 5.4 ± 0.2 kg en 2009, 6.4 ± 0.4 kg en 2010 y 7.2 ± 0.1 kg en 2011.



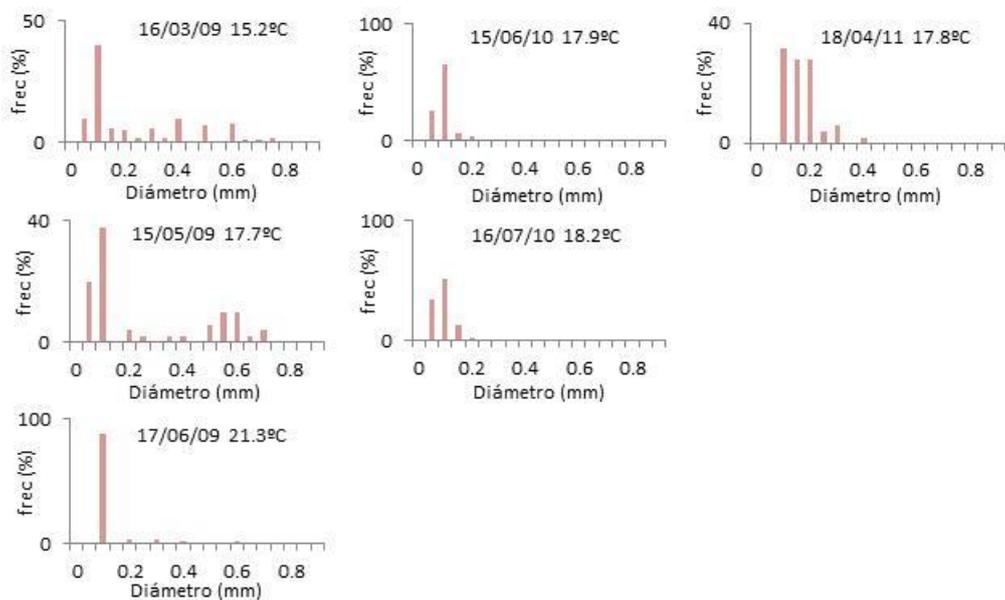
f) Hembra nº 12 con un peso medio en la época de maduración de 7.3 ± 0.1 kg en 2009, 7.9 ± 0.2 kg en 2010 y 8.5 ± 0.5 kg en 2011.



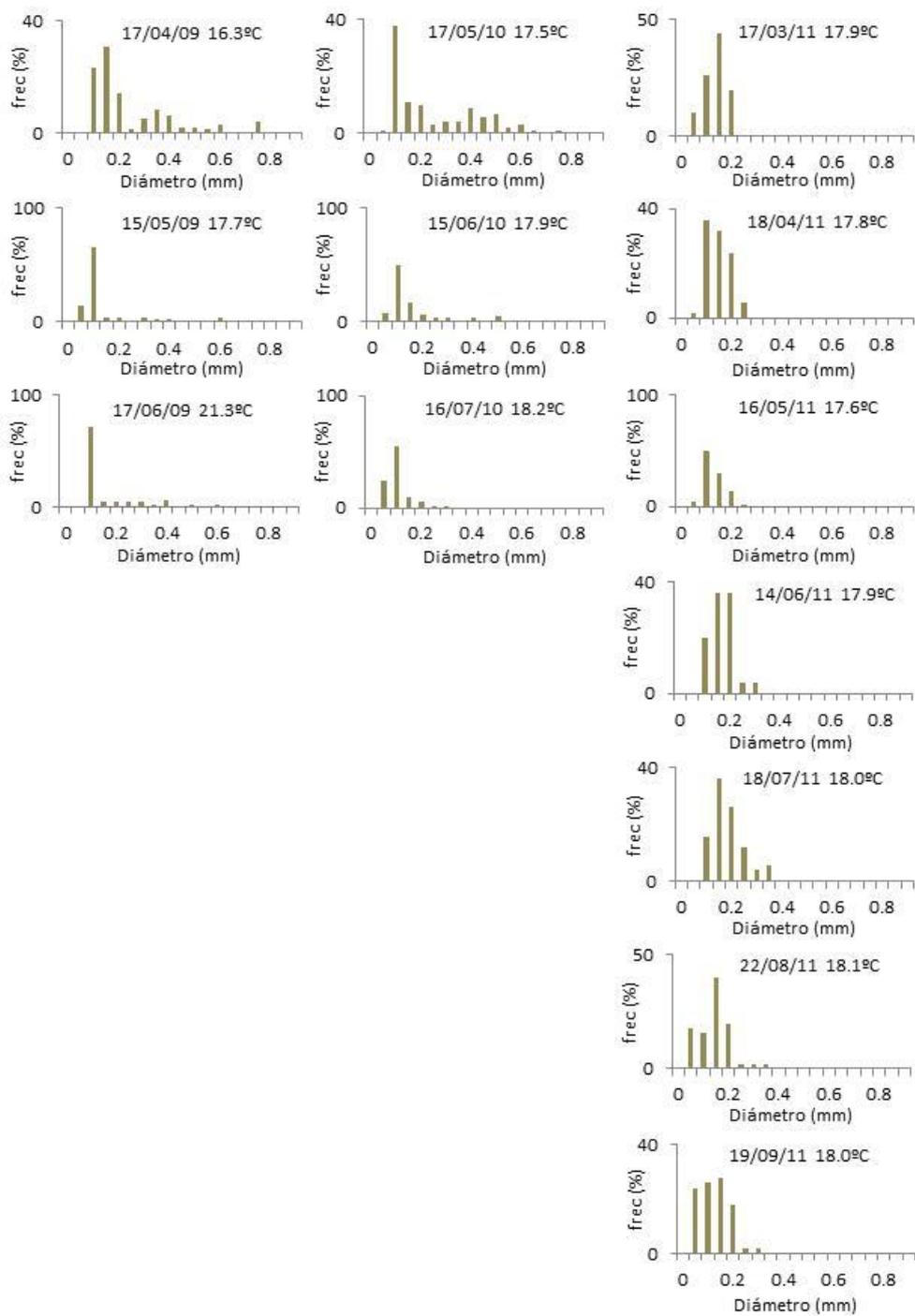
g) Hembra n° 13 con un peso medio en la época de maduración de 8.3 ± 0.7 kg en 2009, 8.2 ± 0.1 kg en 2010 y 9.8 ± 0.4 kg en 2011.



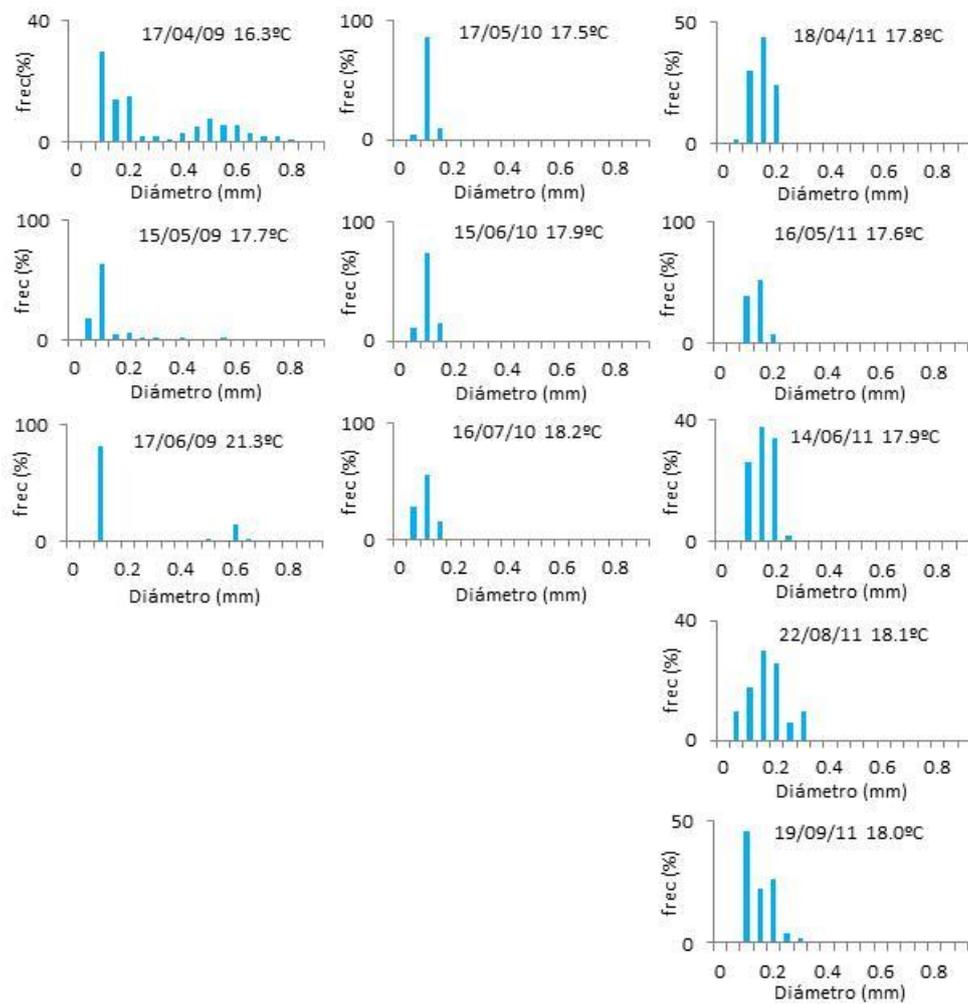
h) Hembra nº 14 con un peso medio en la época de maduración de 7.7 ± 0.1 kg en 2009, 8.3 ± 0.3 kg en 2010 y 9.1 kg en 2011.



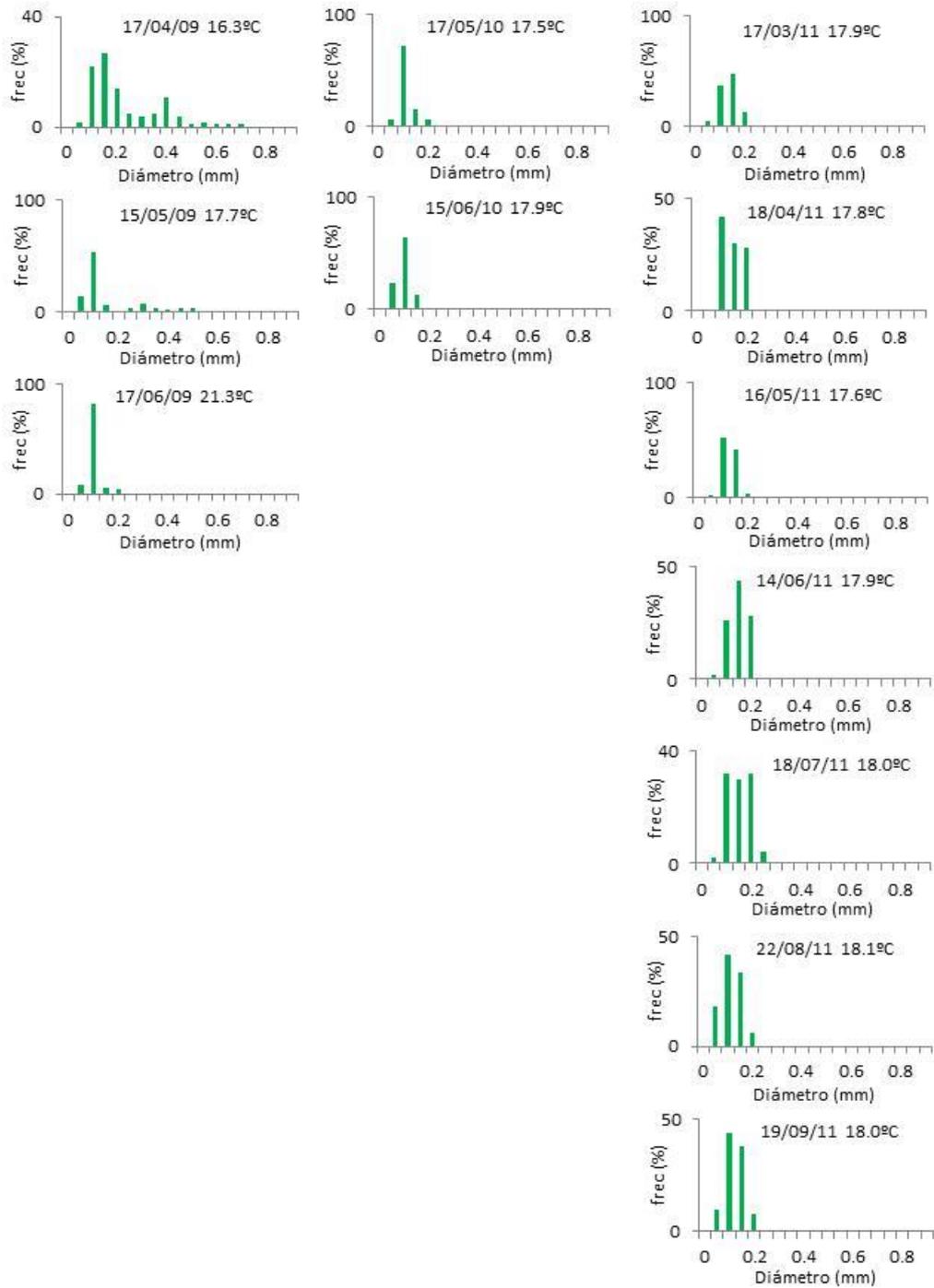
i) Hembra nº 16 con un peso medio en la época de maduración de 7.1 ± 0.1 kg en 2009, 8.8 ± 0.3 kg en 2010 y 10.8 ± 0.5 kg en 2011.



j) Hembra nº 17 con un peso medio en la época de maduración de 6.5 ± 0.1 kg en 2009, 6.2 ± 0.1 kg en 2010 y 6.7 ± 0.2 kg en 2011.



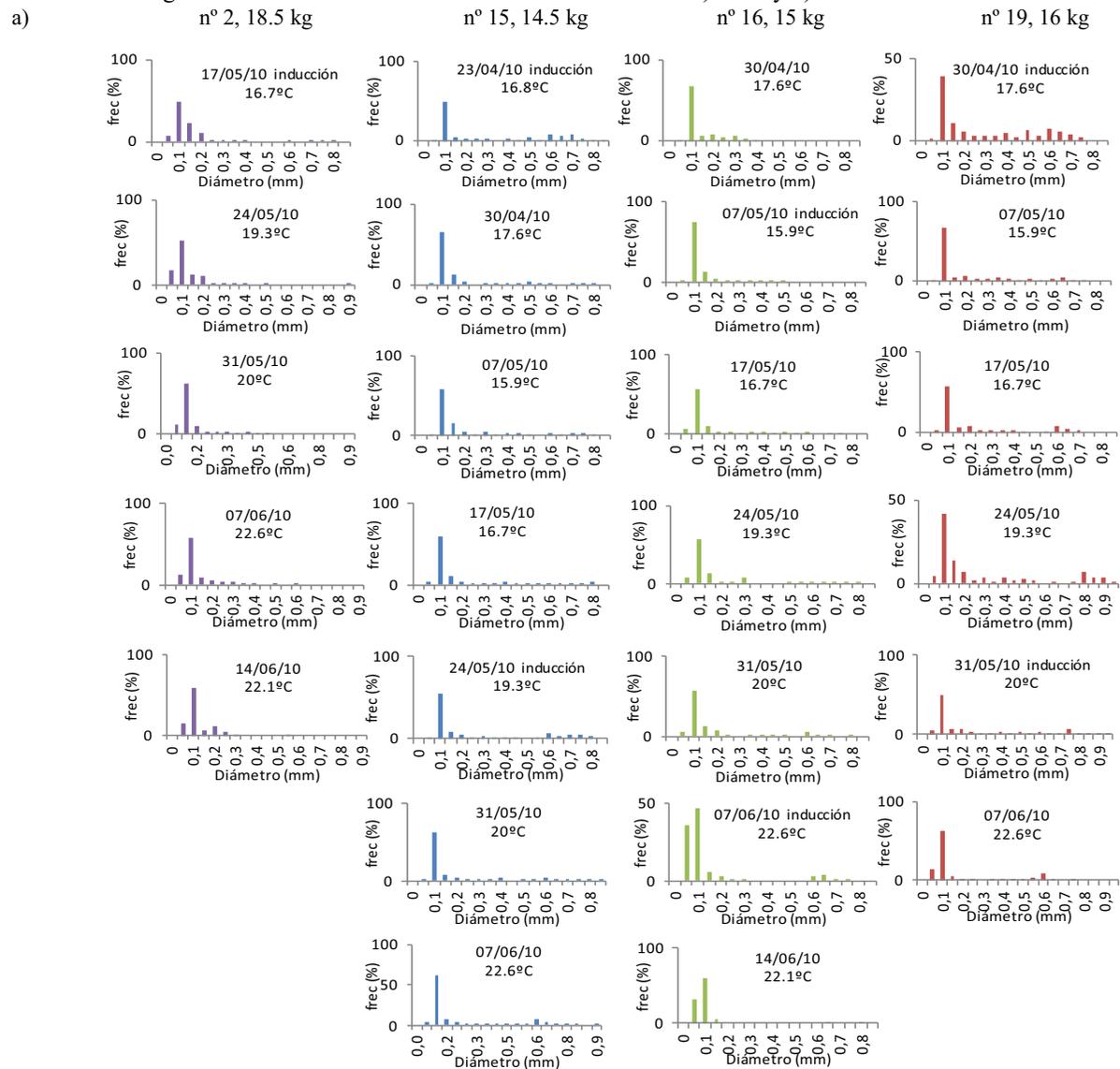
k) Hembra nº 18 con un peso medio en la época de maduración de 6.9 ± 0.1 kg en 2009, 8.2 ± 0.1 kg en 2010 y 9.0 ± 0.2 kg en 2011.



Anexo 2. Parámetros de calidad de las puestas obtenidas en 2009, 2010 y 2011 en los tanques C1 y C2. Los valores de diámetro, eclosión, supervivencia a día 3 y día 5 están representados como media \pm SD.

		n	peso (kg)	día	horas desde la inducción	T(°C)	inyección implante	vol HF (ml)	vol HNF (ml)	fecund (%)	diámetro (μ m)	peso seco (μ g)	eclosión (%)	superv día 3 (%)	superv día 5 (%)	último día vida	
abril 2009	C1	3 ♂	6.6 \pm 0.6	19	48	16.5	impl	210	35	100.0	1034.5 \pm 3.0	60.4 \pm 0.7	37.0 \pm 6.6	70.6 \pm 13.2	68.1 \pm 9.7	11.5	
				21	96	16.7	impl	200	200	87.1	1003.0 \pm 2.0	49.2 \pm 9.8	33.9 \pm 15.5	78.1 \pm 5.2	75.8 \pm 8.5	10.5	
		6 ♀	7.3 \pm 1.3	23	144	17.4	impl	40	150	58.2	999.0 \pm 4.0	52.8 \pm 0.3	0.0				
				24	168	17.7	impl	12	35	0.0	1005.0 \pm 6.0		0.0				
	C2	3 ♂	7.1 \pm 1.4	20	72	16.5	iny	40	100	0.0		54.5 \pm 2.3	0.0				
				22	120	17.0	iny	0	270								
mayo-junio 2009	C1	3 ♂	6.7 \pm 0.6	23	144	17.4	impl	40	150	58.2	999.0 \pm 4.0	52.8 \pm 0.3	0.0				
				25	192	18.2	impl	5	45	0.0	1014.0 \pm 2.0	54.3 \pm 0.2	0.0				
				18	72	17.3	impl	620	100	91.0	997.0 \pm 7.3	55.1 \pm 0.7	0.0				
				19	96	17.3	impl	100	200	65.0	975.4 \pm 2.0	48.7 \pm 0.0	17.6 \pm 6.5	64.7 \pm 37.1	55.6 \pm 24.2	7.0	
				20	120	17.2	impl	140	60	90.0	971.9 \pm 3.3	51.5 \pm 1.8	0.0				
		6 ♀	7.4 \pm 1.3	22	168	17.9	impl	60	240	86.0	994.3 \pm 2.8	62.3 \pm 2.2	3.1 \pm 1.5	37.5 \pm 53.0	12.5 \pm 17.7	4.0	
				23	192	17.4	impl	180	20	97.1	986.8 \pm 4.3	52.8 \pm 1.0	78.9 \pm 5.1	37.4 \pm 24.6	37.6 \pm 8.7	6.5	
				25	240	16.9	impl	180	110	93.9	1004.2 \pm 3.0	53.7 \pm 1.1	20.5 \pm 1.3	37.0 \pm 7.3	34.7 \pm 10.5	6.0	
				28	312	17.3	impl	120	60	82.9	1048.8 \pm 9.8	57.6 \pm 0.1	74.0 \pm 2.9	95.9 \pm 3.8	92.4 \pm 6.7	7.0	
				30	360	17.8	impl	0	50								
	C2	3 ♂	7.2 \pm 1.5	1	408	17.6	impl	130	130	61.5	1002.9 \pm 3.5	57.6 \pm 0.3	1.1 \pm 1.5	25.0 \pm 35.4	25.0 \pm 35.4	6.0	
				2	432	17.7	impl	0	50								
3				456	17.7	impl	0	20									
mayo 2010	C1	6 ♀	7.4 \pm 0.9	19	96	17.3	impl	20	320	77.0	956.3 \pm 3.6	47.0 \pm 1.2	99.0 \pm 1.4	71.4 \pm 1.9	5.5 \pm 0.7	6.0	
				20	120	17.1	impl	500	20	97.0	982.7 \pm 3.5	54.9 \pm 4.0	74.4 \pm 5.2	50.6 \pm 9.3	9.8 \pm 6.3	6.0	
julio 2011	C1	2 ♀	10.9 \pm 1.6	19	48	18.4	iny	700	220	32.0	1028.0 \pm 22.5	61.8 \pm 0.2	7.8 \pm 5.2	81.8 \pm 25.7	81.8 \pm 25.7	9.0	
				20	72	17.2	iny	260	120	90.0	941.8 \pm 19.3	47.1 \pm 0.5	24.1 \pm 3.1	59.8 \pm 17.2	55.4 \pm 17.8	7.5	
agosto 2011	C1	3 ♀	10.6 \pm 1.4	1	8.9	17.8	iny	200	110	16.0	942.5 \pm 23.4	46.2 \pm 4.8	0.0	0.0	0.0	0.0	
				24	48	18.5	iny	480	20	4.0	957.4 \pm 33.7	48.9 \pm 2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	

Anexo 3. Histogramas de frecuencias del tamaño de los ovocitos de a) 2010 y b) 2011.



b) n° 1, 18 kg

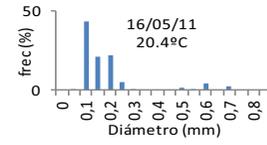
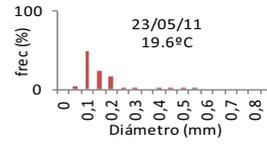
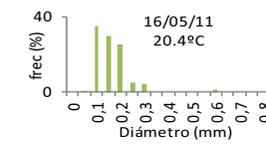
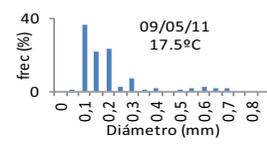
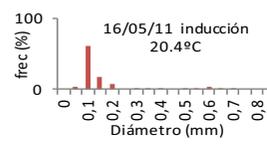
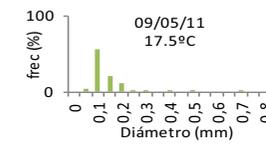
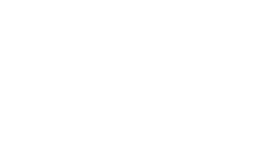
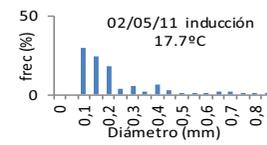
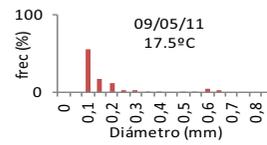
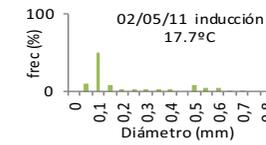
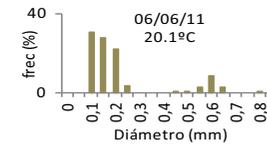
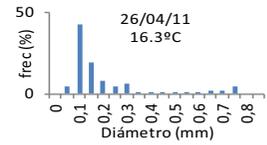
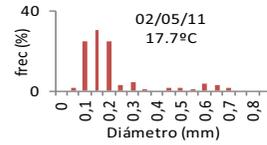
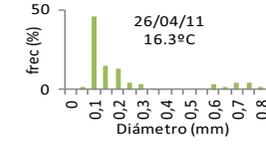
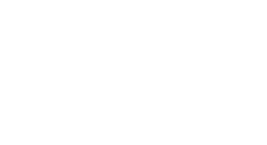
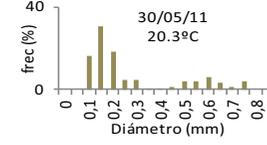
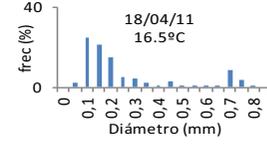
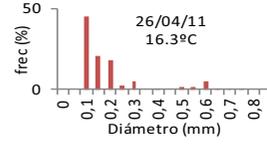
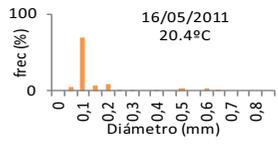
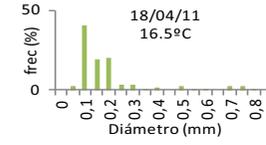
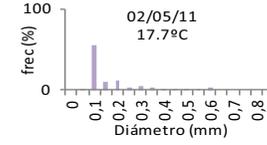
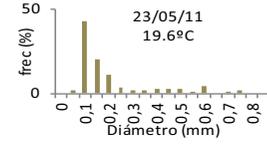
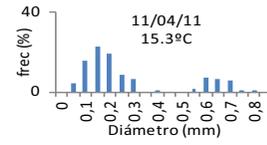
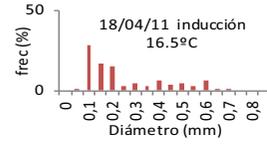
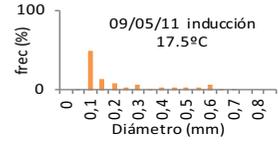
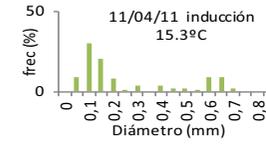
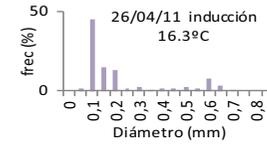
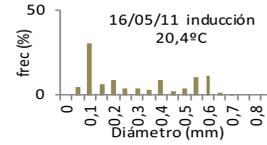
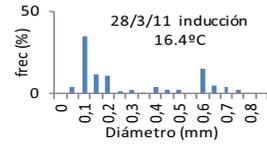
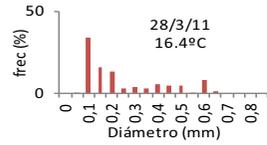
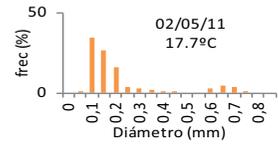
n° 2, 24.5 kg

n° 12, 15 kg

n° 15, 18 kg

n° 16, 19.5 kg

n° 18, 20 kg



Anexo 4. Parámetros de calidad de las puestas obtenidas en 2010 y 2011. Los valores de diámetro, eclosión, supervivencia a 3 días y 5 días están representados como media±SD.

	Fecha	T (°C)	código ♀	peso (kg)	tiempo desde inducción (h)	vol HF (ml)	vol HNF (ml)	fecundación (%)	% 1 gota	% + de 1 gota	diámetro (µm)	peso (µg)	eclosión (%)	superv día 3 (%)	superv día 5 (%)	último día vida
2010	25 abr	16.8			48	1195	110	98.8	37.9	58.7	952.6 ± 18.5	48.9 ± 1.1	82.8 ± 2.2	84.2 ± 3.1	82.3 ± 4.0	10.5
	26 abr	17.3	15	14.5	72	1280	10	98.8	67.4	31.5	930.6 ± 15.2	46.3 ± 0.7	97.4 ± 2.2	96.2 ± 0.9	94.6 ± 0.2	10.50
	28 abr	18.2			120	355	160	90.6	68.8	33.1	919.8 ± 19.5	47.1 ± 0.2	87.0 ± 8.1	78.7 ± 4.8	64.6 ± 12.0	10.0
	2 may	17.5	19	16.0	48	2055	45	94.0	85.5	12.3	908.4 ± 83.5	45.4 ± 0.2	89.6 ± 3.0	94.2 ± 1.5	94.2 ± 1.5	9.50
	3 may	17.4			72	855	115	100.0	78.9	22.6	874.3 ± 17.2	43.2 ± 0.6	94.3 ± 2.2	80.8 ± 8.3	77.6 ± 9.8	9.5
	19 may	17.8	2	18.5	48	420	50	85.7	39.5	55.4	911.9 ± 26.3	45.3 ± 0.8	82.1 ± 1.5	17.9 ± 3.3	17.9 ± 3.3	8.5
	26 may	19.9	15	15.0	48	1310	20	97.3	62.4	33.9	930.4 ± 23.7	59.2 ± 0.7	99.5 ± 0.7	97.4 ± 2.2	97.4 ± 2.2	11.50
	27 may	20.0			72	780	10	100.0	83.0	15.3	887.8 ± 17.4	44.9 ± 0.8	99.5 ± 0.7	72.3 ± 7.0	49.0 ± 3.7	12.0
	1 jun	21.2	19	15.5	48	1630	290	98.1	8.3	92.2	948.3 ± 20.3	52.7 ± 1.3	94.3 ± 5.2	91.2 ± 0.5	91.2 ± 0.5	12.0
2011	31 mar	14.3			72	460	100	91.2	0.0	100.0	961.5 ± 16.3	54.1 ± 0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
	1 abr	14.7	12	15.0	96	480	360	75.9	27.6	75.3	944.4 ± 17.6	52.7 ± 2.7	0.0	0.0	0.0	0.0
	4 abr	15.0			168	0	140									
	13 abr	18.0	18	20.0	48	820	220	99.1	13.0	87.9	972.7 ± 19.5	54.3 ± 0.8	86.0 ± 11.1	89.2 ± 2.0	87.3 ± 0.9	10.5
	15 abr	18.5			96	980	710	91.7	20.0	79.2	937.7 ± 19.0	46.2 ± 0.8	40.3 ± 42.2	63.5 ± 23.3	63.5 ± 23.3	9.5
	21 abr	19.0	2	24.5	72	490	420	98.0	88.0	12.0	865.1 ± 20.6	44.3 ± 1.1	95.0 ± 0.1	92.0 ± 2.1	89.9 ± 3.61	10.0
	4 may	19.5	12 y 18	15.0	48	1160	120	100.0	0.0	100.0	945.9 ± 23.1	54.2 ± 0.2	96.4 ± 2.2	76.6 ± 12.0	66.3 ± 16.1	10.0
	5 may	20.0		20.0	72	600	100	100.0	34.5	69.4	901.6 ± 23.7	47.6 ± 1.1	96.4 ± 0.7	94.6 ± 3.1	89.7 ± 2.4	9.0
	18 may	21.2	2 y 15	22.5	48	1100	300	93.9	17.2	81.7	892.6 ± 25.6	45.0 ± 0.8	99.5 ± 0.7	93.7 ± 0.1	34.5 ± 5.7	10.0
19 may	21.0		18.0	72	1000	300	100.0	49.5	52.6	902.6 ± 18.1	40.2 ± 0.6	99.0 ± 1.5	85.3 ± 5.7	73.3 ± 13.7	10.0	



CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CORVINA (*Argyrosomus regius*) EN CAUTIVIDAD

La corvina (*Argyrosomus regius*) tiene un alto potencial para la acuicultura, según APROMAR, España es el mayor productor de Europa, con una producción de 2.880 t en 2011, el 76.4% del total. Las características de la corvina son atractivas para el mercado y el consumidor: buen rendimiento de procesamiento, bajo contenido de grasa, buen sabor y textura firme. Esta especie, tiene unas características biológicas, que la hacen apta para la producción a gran escala en acuicultura, crecimiento rápido (1 kg por año), buenos índices de conversión de alimento (0,9 a 1,2), cultivo larvario relativamente fácil y reproducción controlada en cautividad. Los puntos críticos para el control de la reproducción y obtención de huevos de buena calidad son: selección de los reproductores, condiciones de estabulación, nutrición, condiciones ambientales para la gametogénesis y control de la puesta.

SELECCIÓN DE LOS REPRODUCTORES

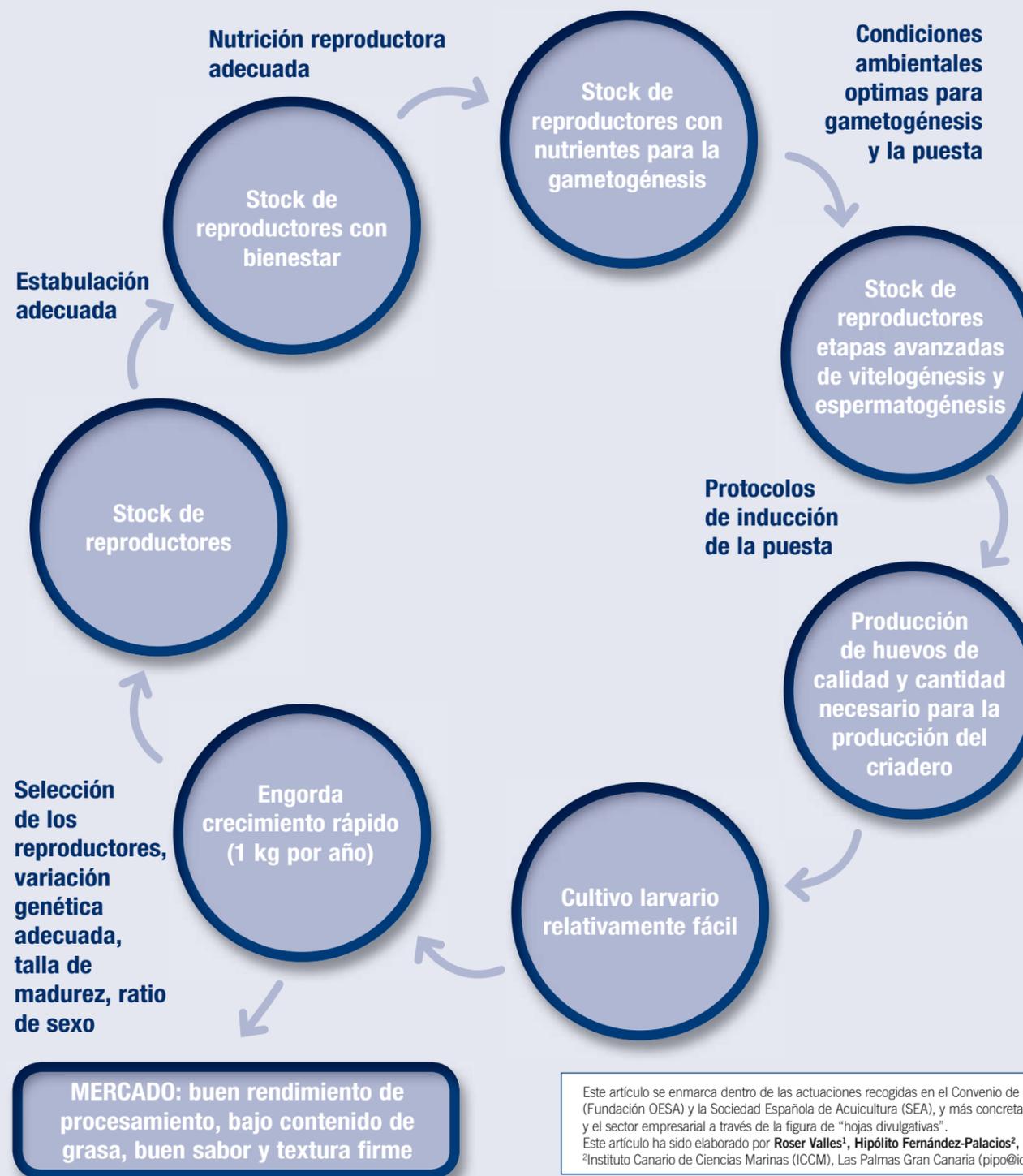
La talla de la primera madurez de las hembras, en la costa sur de la península Ibérica se produce cuando estas alcanzan un peso mínimo de 8 kg. Sin embargo, las corvinas (nacidas en cautividad) estabuladas en el ICCM, presentaron la primera madurez a los 3 años de edad, con un peso superior a 5.4 kg las hembras y 4.2 kg los machos. Así, se recomienda formar el stock de reproductores con ejemplares nacidos en cautividad > 6 kg, y con ejemplares capturados en la naturaleza > 8 kg. En acuicultura, es primordial formar el stock de reproductores con individuos de diferentes orígenes genéticos. Existen herramientas desarrolladas para la caracterización de reproductores de la corvina (contacto, Dr. Javier Porta, <http://www.aquasolutions-biotech.es/>). Las animales salvajes presentan una alta variabilidad genética, adecuada para un programa de mejora genética. Sin embargo, las animales procedentes de la acuicultura presentan una variabilidad genética baja, pero con buena heterogeneidad (como hermanos o medio hermanos) y es necesario añadir individuos de diferentes orígenes genéticos para aumentar la variabilidad genética y evitar futuros problemas de endogamia.

ESTABULACIÓN, NUTRICIÓN Y BIENESTAR

La estabulación de ejemplares nacidos en cautividad no causa, por lo general, ningún problema. Así, el ICCM obtuvo maduración hasta la vitelogénesis y espermiación de reproductores (6-10 kg) estabulados en tanques rectangulares de 10 m³ (1.5 m de profundidad), manteniendo la biomasa alrededor de 8 kg m⁻³. Sin embargo, la aclimatación de peces silvestres es más compleja. En el IRTA, se obtuvo maduración hasta la vitelogénesis y espermiación con animales salvajes estabulados a una densidad de <6 kg m⁻³, en una tanque tipo "D-ended raceway" de 50 m³ (1 m de profundidad), y utilizando el siguiente protocolo de aclimatación: la primera semana los peces se mantuvieron sin alimentación y aislados. Durante las siguientes tres semanas se les aplicó un baño semanal (lunes) de formol (1 hora, 100 ppm) y un baño semanal (martes) de H₂O₂ (1 hora, 200 ppm), se les alimento con sardina y calamar (miércoles a viernes). A los 21 días todos los peces se alimentaban. Se observó que la temperatura es un factor importante durante la aclimatación, porque con temperaturas por debajo de 14°C (invierno) y por encima de 25°C (verano) los peces dejaron de alimentarse. Es importante vigilar y mantener los reproductores libres de parásitos, se controla infestaciones de gusanos monogéneos y copépodos con tratamientos de formol (100 ppm), y praziquantel (5 mg kg⁻¹) y de Amyloodinium con H₂O₂ (200 ppm). En el ICCM y el IRTA, se obtuvieron huevos de buena calidad, de reproductores alimentados tres veces de la semana (lunes, miércoles y viernes), a saciedad con una dieta a base de los piensos Vitalis Repro Cal o Vitalis Repro (Skretting, Burgos), y alimento fresco (descongelado) calamar y sardina o calamar y mejillón.

CONDICIONES AMBIENTALES PARA LA REPRODUCCIÓN

El aumento de los niveles de esteroides entre diciembre y enero, indicó el comienzo de la gametogénesis. Los dos stocks (IRTA y el ICCM) se encontraban en etapas avanzadas de vitelogénesis y espermatogénesis a mediados de marzo, obteniéndose las primeras puestas el 29 de marzo en el IRTA y el 16 de marzo en el ICCM, mientras que



Los puntos críticos para el control de la reproducción son: selección de los reproductores, condiciones de estabulación, nutrición, condiciones ambientales para la gametogénesis, y la puesta e inducción de la misma, cuando es necesario.

la última puesta fue el 1 de junio en el IRTA y el 27 de septiembre en el ICCM. El fotoperíodo fue natural y la temperatura varió desde 18°C (ICCM) y 16°C (IRTA) en invierno hasta 24°C (ICCM) y 25°C (IRTA) en verano. Es importante, para que se produzca la gametogénesis, que la temperatura de invierno esté por encima de 14-16°C. Se ha observado en el IRTA, como consecuencia de la disminución de la temperatura en invierno (dos meses a 12°C), que en marzo, cuando llegó la época de reproducción los individuos no maduraron. En el ICCM, las puestas mediante inducción hormonal se obtuvieron con temperaturas entre 19 y 23°C mientras que en el IRTA lo fueron con 16-21°C. Parece que una temperatura encima de 24°C provoca el final del período de puesta.

INDUCCIÓN DE LA PUESTA

De los reproductores estabulados en el IRTA y en el ICCM no se han obtenido hasta ahora puestas espontáneas, por lo tanto ha sido necesario el uso de la inducción hormonal. Se utilizaron la hormona GnRH_a (des-Gly10, [D-Ala6]-gonadotropin releasing hormone, Sigma, España, comercializada como LHRHa), previamente disuelta en una solución salina al 9%. En el ICCM, con reproductores nacidos en cautividad de 8-10 kg, en el que tanto a machos fluyentes como a hembras con oocitos mayores de 500 µm se les suministró una inyección intermuscular de GnRH_a de dosis en el rango de 0 a 50 µg kg⁻¹. De las puestas obtenidas se determinó la calidad de los huevos, observándose los mejores resultados con la dosis de 15 µg kg⁻¹. Con esta dosis se obtuvo una media de dos puestas por inducción, 127.571±58.848 huevos kg⁻¹, 95,1±3,6% de eclosión y 92,3±6,3% de supervivencia larvaria. En el IRTA, un grupo de reproductores salvajes de 10-30 kg fue inducido a la puesta mediante una inyección intermuscular de 20 µg kg⁻¹ de GnRH_a, a las

hembras con oocitos mayores de 580 µm. El 90% de las hembras (n=18) pusieron huevos de buena calidad, con una eclosión media del 84±25%. La tiempo de lactancia desde inyección a colección de la puesta fue de 48 horas (15-18°C) a 72 horas (12-15°C). Una sola hembra puede llegar a realizar de una a tres puestas. La fecundidad media fue de 130.900±94.200 huevos kg⁻¹. En el ICCM, los reproductores fueron tratados hormonalmente cada 3, 4, 5, 6 y 7 días respondiendo con múltiples puestas durante más de seis meses. Los mejores valores de fecundidad y calidad de puesta se obtuvieron con los reproductores que fueron tratados cada 5-7 días.

CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS

Los huevos pelágicos tienen un diámetro de 0,99±0,02 mm y son transparentes y generalmente con una sola gota de grasa aunque es común la presencia de más de una gota de grasa. A 17-18°C, los huevos eclosiona a las 48 horas. Los huevos se pueden incubar en tanques cónicos de 100-250L a una densidad de 10.000-15.000 huevos L⁻¹ con aireación y renovación de agua. ■

Este informe ha sido elaborado con los resultados de dos Proyectos de Investigación: Proyecto RTA2008-00107, financiado por el INIA-FEDER y Plan Nacional de Cría de Corvina, financiado por el MAGRAMA-JACUMAR.

BIBLIOGRAFÍA

- Duncan, N.J., Estévez, A., Fernández-Palacios, H., Gairin, I., Hernández-Cruz, C.M., Roo, J., Schuchardt, D., Vallés, R., 2013. Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market. In: Advances in aquaculture hatchery technology. Allan, G., Burnell, G. (Eds). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

Este artículo se enmarca dentro de las actuaciones recogidas en el Convenio de Colaboración firmado en diciembre de 2009 entre la Fundación Observatorio Español de Acuicultura (Fundación OESA) y la Sociedad Española de Acuicultura (SEA), y más concretamente en el ámbito de actuación relativo al estrechamiento de las relaciones entre la comunidad científica y el sector empresarial a través de la figura de "hojas divulgativas". Este artículo ha sido elaborado por Roser Valles¹, Hipólito Fernández-Palacios², Dominique Schuchardt² y Neil Duncan¹, ¹IRTA Sant Carles de la Ràpita, Tarragona (neil.duncan@irta.cat). ²Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), Las Palmas Gran Canaria (pipo@iccm.rcanaria.es).

Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market

N. J. Duncan and A. Estévez, IRTA, Spain, H. Fernández-Palacios, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Spain, I. Gairin, IRTA, Spain, C. M. Hernández-Cruz, J. Roo and D. Schuchardt, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Spain and R. Vallés, IRTA, Spain

DOI: ••

Abstract: Meagre (*Argyrosomus regius*) have good potential for aquaculture. Culture characteristics include controlled spawning in captivity, relatively easy larval rearing, fast growth, good feed conversion ratios and no maturation during ongrowing. Whilst characteristics of the final product include good processing yield, low fat content, good taste and firm texture. This chapter details the present knowledge on the biology of the species, the culture protocols being used through the entire production cycle (broodstock management, larval rearing, pre-ongrowing and ongrowing), product quality, market and economics of production. Finally future prospects and challenges to achieve mass production are examined.

Key words: meagre, *Argyrosomus regius*, aquaculture, broodstock management, larval rearing, ongrowing, market, economics.

17.1 Introduction

The family *Sciaenidae* includes 70 genus and 270 species (Nelson, 1994) which are distributed in the Atlantic, Indian and Pacific oceans. Sciaenids are commonly referred to as drums or croakers for their ability to produce drumming sounds during the spawning period (Lagardère and Mariani, 2006) with a special sonic muscle in close association with the swimbladder. Two sciaenid species can be considered to have an established aquaculture production, the red drum (*Sciaenops ocellatus*) (FAO, 2005–2011a) and the yellow croaker (*Larimichthys crocea*) (Chen *et al.*, 2003). In 2009, production of red drum was 51 476 t and yellow croaker was 66 021 t (FAO, 2011).

1 Several sciaenids are new to aquaculture and have good aquaculture potential:
 2 *Argyrosomus japonicus* in Australia, southern Africa and Taiwan,
 3 *Sciaena umbra* in Greece and Turkey, *S. ocellatus* in China, USA, Israel,
 4 Mexico and Taiwan, *Umbrina cirrosa* in Cyprus, Spain, Greece, Italy and
 5 Turkey and *A. regius* in Spain, Egypt, France, Italy, Morocco and Turkey.
 6 Characteristics that give meagre high aquaculture potential and which have
 7 made other Sciaenids such as red drum successful aquaculture specie are:
 8 relatively easy broodstock management to obtain good quality eggs; relatively
 9 easy larvae rearing with standard industry live feeds and formulated
 10 diets; and juveniles that do not present reproductive maturation during
 11 ongrowing, grow fast and that can achieve good feed conversion ratios
 12 (Mañanós *et al.*, 2009).

13 The meagre, *A. regius* (Fig. 17.1), is a sciaenid distributed in the Mediter-
 14 ranean and Black Sea and along the Atlantic coasts of Europe and Africa
 15 (Poli *et al.*, 2003). The fish can grow up to 2 m and reach 50 kg in the wild
 16 (FAO, 2005–2010b). In spring, coincident with periods of freshwater discharge
 17 (Hall, 1984), meagre enter the mouths of estuaries in groups for
 18 spawning, which takes place until late summer. Areas that remain important
 19 for spawning are the estuary of the river Gironde, Bay of Biscay, France
 20 (Quéméner *et al.*, 2002), river Tagus, Portugal and river Guadiana, Southern
 21 Spain and Portugal (Gonzalez-Quiros *et al.*, 2011). During winter, meagre
 22 return to deeper waters possibly of the west coast of Africa to feed
 23 (Quéméner *et al.*, 2002). Juveniles leave estuaries at the end of summer
 24 and spend two to three years in coastal waters before migrating to
 25 offshore feeding areas. Water temperature seems to be the most important
 26 factor determining the migrations and reproduction of meagre (FAO,
 27 2005–2010b).

28 Global fisheries production for all *Sciaenidae* species ranges from 5000
 29 to 10000 t per annum. In Europe, meagre fisheries production is lower,
 30 ranging from a few hundreds to 1500 t (FAO, 2011). The combination of
 31



45 **Fig. 17.1** Meagre (*Argyrosomus regius*). (Photo by Neil Duncan).

low catches principally in the areas of spawning has resulted in lucrative niche markets in Portugal, Southern Spain and parts of France and Italy. Aquaculture of meagre began in the late 1990s in France with an annual production of 30 t in 1997. In 2009, production reached 2200 t in Egypt, 1348 t in Spain, 418 t in France, 102 t in Italy and 44 t in Portugal (FAO, 2011). Ongrowing techniques are similar to those used for bass (European seabass, *Dicentrarchus labrax*) and bream (gilthead seabream, *Sparus aurata*), principally large circular (25 m diameter) sea surface cages. Meagre is a promising aquaculture species for its high growth rate (around 1 kg per year) and good feed conversion ratio (Jiménez *et al.*, 2005). Meagre flesh quality is very well considered by the consumer due to its low muscle fat content (Poli *et al.*, 2003; Piccolo *et al.*, 2008; Monfort 2010; Grigorakis *et al.*, 2011). The meagre is also interesting for recreational purposes (aquariums), considering its high adaptation to captivity and the wide range of temperatures and salinities tolerated.

Until recently, all juvenile production of meagre was from a few hatcheries (FAO, 2005–2010b); the hatchery techniques were not generally available with little published information. This situation has at times restricted the availability of juveniles to the industry and, therefore, potentially restricted the growth of aquaculture of meagre. This chapter aims to summarise and provide the available information on the culture methods used for meagre.

17.2 Broodstock management

The basis of a spawning protocol is an understanding of the species reproductive strategies and maturational cycle, i.e. information on sexual differentiation, size at first maturity, reproductive dietary requirements, maturational development in relation to environmental changes, reproductive endocrinology, spawning behaviour and egg parameters that enable the holding of broodstock in conditions that allow maturation to advance to late stages of gametogenesis or spawning. Critical points, selection of the broodstock, holding conditions, broodstock nutrition and the captive environment during gametogenesis and spawning must be addressed to ensure the spawning of good quality eggs.

The *Sciaenidae* are gonochoristic with fixed sex after sexual differentiation. The period of sexual differentiation has been described in meagre to be completed by 10–12 months (Schiavone *et al.*, 2012). First maturation or puberty is generally at a large size in *Sciaenidea* and minimum size of wild meagre females in vitellogenesis was 8 kg in the fishery of the coast of the Algarve, Portugal (Dr Nuno Prista, University of Lisboa, Faculty of Sciences, Instituto de Oceanografia) or 70–110 cm in southern Spain (González-Quirós *et al.*, 2011). However, meagre reared from the egg in captivity were observed to mature at 5.4+ kg. A stock of 140 meagre that were reared in

1 seacages off the coast of the Canary Islands were transferred to 10 m³
2 flowthrough tanks at 1.5 kg and ongrown to 9.8 ± 1.3 kg using a diet of
3 Vitalis REPRO (Skretting) and under natural conditions of photoperiod
4 and temperature that ranged from summer highs of 24 °C to winter lows of
5 18 °C (Schuchardt *et al.*, 2007). At the age of three years, all females over
6 the size of 5.4 kg and all males over the size of 4.2 kg had either oocytes in
7 advanced stages of vitellogenesis or flowing sperm. Schiavone *et al.* (2012)
8 reported a considerably lower size at first maturity, two years old and 0.92
9 ± 0.08 kg in males and three years old and 1.61 ± 0.09 kg in females. The
10 males at this size had flowing sperm and histology showed that the females
11 had post-ovulatory follicles. However, neither the quality nor collection of
12 eggs was reported from these small broodstock.

13 Therefore, broodstock should be formed from fish over 6 kg (captivity-
14 reared fish) or over 8 kg (wild fish) and larger fish 8+ kg gave improved
15 fecundities. Andree *et al.* (2010) have described microsatellites that have
16 been used to characterise both wild-caught and captivity-reared brood-
17 stock. When forming a broodstock, the genetic variability should be exam-
18 ined to have a starting point from which the genetic variability can be
19 maintained while selecting for desired traits such as growth and flesh quality.
20 The genetic variability of three broodstock were tested (unpublished results
21 Duncan *et al.*): two broodstock of 12 and 32 wild fish caught on the Algarve
22 coast, Portugal that were set up on different dates in IRTA, Sant Carles de
23 la Rapita, Tarragona, Spain and a third broodstock that was set up in ICCM,
24 Las Palmas, Canaries, Spain with 140 fish that were hatched and reared in
25 captivity (see above). The two wild broodstock exhibited a heterogeneous
26 genetic variability as would be expected from a wild population and the
27 captive broodstock (tested n = 19) that were originally obtained from a
28 single hatchery in France and ongrown in the Canaries exhibited a reduced
29 genetic variability compared to the wild fish, suggesting that the group
30 originated from a small broodstock pool. This situation may be unavoidable
31 in a captivity-reared broodstock as all the initial production (previous to
32 2008) of meagre juveniles originated from few hatcheries in France (FAO,
33 2005–2011b). It is, therefore, important to ensure that the genetic variability
34 is not further eroded by crossing within one family and plans should be
35 made to add fish to the stock from different genetic origins to increase the
36 genetic variability.

37 Once the origin of the broodstock has been selected, the holding condi-
38 tions and nutrition are two critical factors that must be optimal to ensure
39 that the broodstock reach late stages of maturity from which spawns can
40 be obtained. Holding tanks for fish of 6+ kg need to give sufficient space
41 for the migratory swimming behaviour and spawning behaviour. Wild
42 broodstock with an average weight of 11 kg that were grown to 15 kg (20
43 fish, i.e. biomass of 220→300 kg) were successfully acclimatised and matured
44 to advanced stages of vitellogenesis and spermiation during each spawning
45 season in a 50 m³ D-ended raceway with a 1 m depth. Captivity-reared

broodstock were grown from an average weight of 1.5 kg to 10 kg in rectangular 10 m³ tanks (3 m × 3 m × 1.5 m depth) maintaining the biomass below 80 kg per tank and the fish matured to late stages of vitellogenesis and spermiation during each spawning season and no stock holding problems were encountered. Meagre, particularly wild meagre, will jump from a tank or within a tank resulting in impact damage, such as bruising, loss of scales, wounds and often eye damage, i.e. exophthalmia. Therefore, tanks should be covered with a strong top net (multi-monofilament knotless nylon netting with 30 mm mesh suitable for seine fishing, Badinotti, Milan, Italy). Problems were encountered holding both wild and captive broodstock in an 18 m³ rectangular tank (3 × 6 m) with a depth of 80 cm. The wild fish (two groups of six fish with a mean of 20 kg) presented a significant mortality in these holding conditions. The wild fish were successfully acclimatised to the 18 m³ tanks, but during the spawning season husbandry procedures associated with maturity sampling and/or a change in the behaviour of the fish resulted in the eventual mortality of all the fish, three fish died due to jumping from the tank during husbandry procedures and six from over-inflation of the swimbladder. No parasitic or bacterial infection was found in relation to the swimbladder problem and it was concluded that the holding conditions, husbandry procedures and behavioural changes associated with spawning caused increased stress and activity which resulted in impact damage and over-inflation of the swimbladder. Ideally, an adequate holding tank should have densities below 5 kg.m⁻³ with sufficient space and depth for the fish to avoid each other during spawning activity.

The newly acquired broodstock need to be treated for parasites and to be encouraged to feed. The only parasites that were found to cause problems and mortality during acclimatisation were monogenean worms and skin copepods (sea lice) that infect the skin and gills. These parasites have killed meagre due to infestation of the gills and excess of mucus. The feeding of newly caught wild broodstock can also be problematic. The following protocol was used to acclimatise wild broodstock caught in October: The temperature and photoperiod decreased naturally, but temperature was maintained above a minimum of 16 °C. During the first week in captivity, the fish were left with no disturbance and no feed was offered. During the following three weeks, the broodstock were given a weekly (Monday) 1 h bath of 100 ppm of formalin and offered sardines and squid Tuesday–Friday. After 13 days in captivity, the first feeding response was obtained when a fish ate squid and by day 21 all the fish appeared to be feeding. Once the fish were feeding well, praziquantel was fed (placed inside pieces of squid) at approximately 50 mg kg⁻¹. Observations of feeding behaviour have identified that temperature and parasitic load influence the appetite of the meagre both during acclimation and after the fish have been acclimatised to captivity. Temperature has been observed to be an important factor and, if winter temperatures pass below 14 °C or summer temperatures above 25 °C, the broodstock have been observed not to eat food that is offered. A

1 wild broodstock ($n = 32$) that was caught in November and held at tem-
2 peratures below 12.3 °C during December, January and February did not
3 feed during the period December–March and consequently did not mature
4 during March–May. Re-occurrences of monogenean worms and sea lice
5 have resulted in respiratory stress where the meagre did not feed and
6 repeatedly raised the head out of the water. Treatments of formalin (100 ppm
7 at weekly intervals) and praziquantel have controlled the monogenean
8 worms and sea lice. When the broodstock were not feeding, praziquantel
9 was administered suspended in saline solution (9 %) with a canula directly
10 into the stomach of anaesthetised fish (50 mg/kg). Meagre were anaesthe-
11 tised with 0.3 mL L⁻¹ of 2-phenoxyethanol or 67.5 mg L⁻¹ of MS222 (Tric-
12 aine methanesulfonate) (Serezli *et al.*, 2012; personal observation). An
13 amyloodinium infection resulted in mortalities and the meagre became
14 sedentary, resting on the bottom of the tank and not feeding. The infection
15 was controlled with two baths of 200 ppm H₂O₂ (1 h duration) applied a
16 week apart.

17 When meagre broodstock have been set up with heterogeneous genetic
18 variability, in adequate holding conditions and are feeding well, reproduc-
19 tive dietary requirements must be supplied to ensure that the broodstock
20 have the nutritional components for gametogenesis. The wild broodstock
21 have successfully matured and spawned with a diet of sardine, squid and
22 Vitalis REPRO CAL (Skretting, Burgos, Spain). The broodstock were fed
23 close to satiation so that feed was not left uneaten. Maximum appetite was
24 observed during spring and autumn when the broodstock were fed Monday
25 to Friday, the percentage fed per week of the total biomass was 1.6 %
26 REPRO Cal Vitalis, 1 % squid and 0.5 % sardine. As temperatures increased
27 and decreased feeding was reduced in relation to the appetite, feeding was
28 reduced by feeding fewer days per week rather than many days with small
29 amounts of feed. The cultured broodstock (ICCM) have successfully
30 matured and spawned with a diet of Vitalis REPRO (Skretting) two times
31 a week and fresh diet, mussels and cuttlefish, once a week.

32 Gametogenesis appears to begin in December / January and the spawn-
33 ing period started during March–April and finished during the period June–
34 September. Gametogenesis was indicated to have started as levels of
35 oestradiol (females) and testosterone (males) have been observed to rise
36 in studies on the two captivity-reared broodstock held in ICCM, Canaries
37 and IRTA, Sant Carles de la Rapita, Tarragona (Vallés *et al.*, 2011). Both
38 stock were in advanced stages of vitellogenesis and spermiating in late
39 March and the earliest spawns were obtained on the 29th March in IRTA,
40 Sant Carles de la Rapita and 16th March in the ICCM, Canarias. The last
41 spawns of the spawning season were obtained on the 1st June in IRTA, Sant
42 Carles de la Rapita and 27th September in the ICCM, Canarias. Both stocks
43 were held under natural conditions with a natural photoperiod and tem-
44 perature profile. In the Canaries, photoperiod ranges from the longest day
45 in summer of 13:55 hours to 10:22 hours in the winter (from official sunset

to sunrise, i.e. not including twilight periods) and temperatures range from winter low of 18°C to summer highs of 24°C. In the IRTA, Sant Carles de Rapita photoperiod ranges from the longest day in summer of 15 h to 9 h in the winter (official sunset to sunrise) and temperatures were controlled to give a winter low of 16°C and summer highs of 25°C. In the ICCM, Canarias the temperature range of the spawning period within which spawns were successfully induced ranged from 19 to 23°C and in IRTA, Sant Carles de la Rapita from 16 to 21°C. Sampling in June that coincided with temperatures of 23.5°C found that females were in gonadal regression with either atretic oocytes or immature oocytes and males had no sperm or poor quality sperm, indicating that the photoperiod and temperature profile had entrained the end of the spawning period.

The development of the oocytes appeared to be group-synchronous as females with vitellogenic oocytes ready for induction (> 580 µm) exhibited a modal distribution of oocyte size. Ovarian biopsies were taken from 10 broodstock and 1468 oocytes (118–150 oocytes per fish) were randomly selected in wet mounts and the diameter measured. Two modes in the frequency distribution were observed (Fig. 17.2). A bimodal distribution of oocytes is typical of group-synchronous oocyte development (Wallace and Selman, 1981; Tyler and Sumpter, 1996). At maximum oocyte sizes of less than 400 µm, the distribution of oocyte size was skewed to larger oocytes.

To date, broodstock held in IRTA or ICCM have not spawned spontaneously without hormone induction. Hormone therapies have been developed for both wild and cultured stocks using a single intramuscular injection of GnRHa (des-Gly10, [D-Ala6]-gonadotropin releasing hormone ethylamide, Sigma, Spain, which sold the hormone as LHRHa, des-Gly10, [D-Ala6]-Lutienizing hormone releasing hormone with product code L4513). The

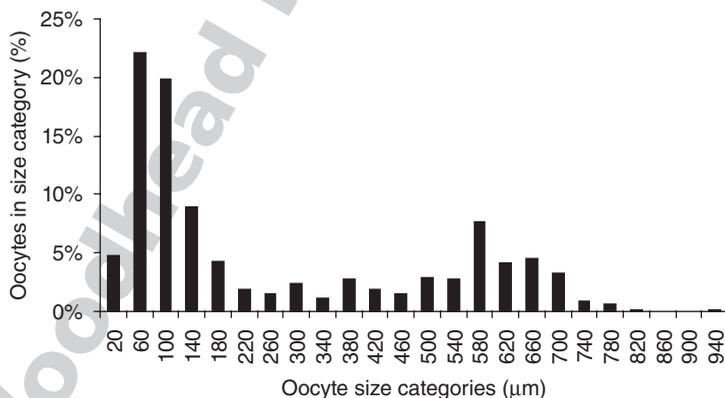


Fig. 17.2 Percentage of oocytes in each category of oocyte diameter for ovarian samples taken from 10 female meagre (*Argyrosomus regius*) before hormonally inducing spawning, 118–150 oocytes were measured from each fish, total oocyte $n = 1468$.

dose of the injection and stage of ovarian development, i.e. oocyte size, are the bases of a hormone therapy to induce spawning (Ibarra-Castro and Duncan, 2007; Mañanós *et al.*, 2009). Studies in the ICCM with the stock of 8–10 kg cultured broodstock have identified that a single injection of a dose of $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ applied to females with an oocyte size $> 500 \mu\text{m}$ successfully induced spawning (Fernández-Palacios *et al.*, 2009a,b, unpublished results). During two spawning seasons (May–June 2009 and 2010) at weekly intervals for each of the following doses, 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 and $50 \mu\text{g/kg}$, a female (oocytes $> 500 \mu\text{m}$) and a male meagre were given a single injection GnRH α (Sigma, Spain). Each dose was tested on a minimum of three females and three times per female. The GnRH α was dissolved in 9% saline solution. The spawning variables of fecundity (number of eggs per kg) and egg quality (percentage fertilisation, hatching and larvae with fully absorbed yolk) were determined and all the variables including number of larvae with fully absorbed yolk (Fig. 17.3) indicated that a dose of $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ was optimal. The optimal dose of $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ gave an average of 2 ± 0 spawns per hormone administration, a total number of eggs per spawn of $127571 \pm 58848 \text{ eggs kg}^{-1}$ and respective average percentage of fertilisation, hatching and larvae with yolk sac of $99.3 \pm 1.0\%$, $95.1 \pm 3.6\%$ and $92.3 \pm 6.3\%$.

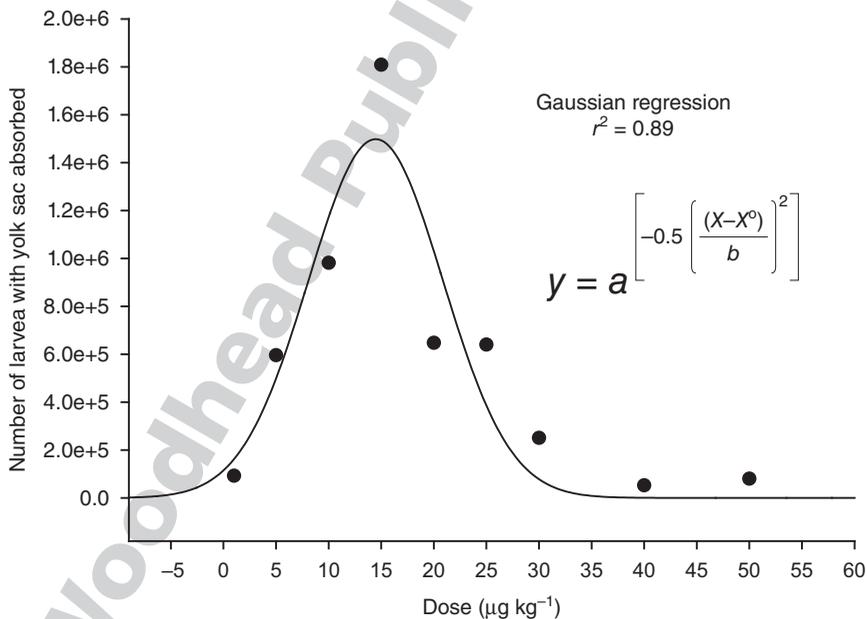


Fig. 17.3 Gaussian regression analysis for the dependent variable total number of larvae with yolk sac against the independent variable GnRH α dose ($\mu\text{g kg}^{-1}$ BW) used to induce spawning of meagre (*Argyrosomus regius*).

In IRTA, the wild broodstock of 10–30 kg have been induced to spawn successfully with an injected dose of 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ applied to females with vitellogenic oocytes larger than 580 μm . Males were treated with a half dose of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Of females ($n = 18$) with oocytes $> 580 \mu\text{m}$ 89 % spawned and egg quality was good with an average hatching success of $84 \pm 25\%$. The first spawn was obtained 30–72 h after GnRHa was applied. At temperatures of 11.9–14.9 °C, recently spawned egg were collected 72 h after treatment and at temperatures from 15–18.1 °C eggs in blastula to gastrula were collected 48 h after treatment. A female spawned from one to three times during the week after treatment and the second spawn was obtained the day after the first spawn. Generally, higher temperatures resulted in fewer spawns of higher fecundity. No further spawning was obtained from injected broodstock after the initial week of spawning. The average (\pm SD) relative fecundity per hormone induction for the wild broodstock was 130900 ± 94200 eggs kg^{-1} . Implants were also applied to six (three females and three males) wild broodstock and a dose of 50 $\mu\text{g/kg}$ (Evac implants) applied to females with oocytes greater than 550 μm and males implanted with a half dose of 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ spawned successfully (Duncan *et al.*, 2007, 2008, 2012). The implants induced similar quality and quantity as the injected broodstock during the week after hormone application. After the initial week of spawning, implanted broodstock continued to spawn small (>1000000 eggs per spawn) amounts of eggs as late as 20 days after hormone application and this gave the implanted treatment a higher quantity of eggs per hormone treatment. Mylonas *et al.* (2011) obtained daily spawning for periods for 5–19 days from meagre implanted with 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Evac implants) with 70 % of the eggs being spawned during the first four spawns after hormone application. Both in IRTA and the ICCM, broodstock have been hormonally induced to spawn more than once during the spawning season. In IRTA, six broodstock were induced (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) to spawn a second time after three to four weeks, resulting in an average (\pm SD) relative fecundity per female for the spawning season of 359000 ± 108500 eggs kg^{-1} . In ICCM, individual broodstock were hormonally treated (15 $\mu\text{g kg}^{-1}$) every three, four, five, six and seven days. All broodstock responded with multiple spawns during the trial. The highest fecundities and egg quality were obtained from fish treated every five to seven days (Fernández-Palacios *et al.*, 2011).

Eggs are pelagic and can be collected in egg collectors that receive the spawning tanks surface water in a mess basket. Egg diameter was 0.99 ± 0.02 mm from wild broodstock and the initial morphology was transparent, with a single large yolk cell, a smaller group of dividing cells and usually a single oil droplet, but it was also common to observe more than one oil droplet. The embryo was formed during the first 12 h and at 17–18 °C the eggs would hatch after 48 h. Eggs can be incubated in separate incubation tanks in the same way as bream and bass eggs, conical bottomed tanks of 100–250 L, stocked with 10000–15000 eggs/L with gentle aeration and water exchange (Moretti *et al.*, 1999). Water exchange is increased before

1 and during hatching. Debris from the hatching is purged before the larvae
2 are transferred by gravity and water flow to the larval rearing tanks.
3
4

5 **17.3 Larviculture**

6
7 The most important features of meagre larvae ontogeny have been reported
8 in detail by Jiménez *et al.* (2007) and Pastor and Cárdenas (2007). In addition,
9 a complete morphometric approach from hatching to 30 days after
10 hatching (dah) was reported by Fernández-Palacios *et al.* (2007). These
11 studies were also complemented with the histological description performed
12 by Hernandez-Cruz *et al.* (2007) and Abreu *et al.* (2009), whereas the development
13 of skeletal structures has been recently described by Cardeira
14 *et al.*, 2012. Thus, at hatching, meagre larvae has an average standard length
15 (SL) of 2.82 ± 0.37 mm presenting a very simple structure and development.
16 At rearing temperatures of 20 ± 1 °C, mouth and anus were open at 3 dah
17 (SL = 3.25 mm); at this time, yolk sac was completely depleted, the digestive
18 system merely composed of midgut, hindgut and foregut, and the oil droplet
19 was maintained until 7 dah. From 3 dah, eosinophilic affinity was detected
20 in the hepatocytes suggesting glycogen accumulation; moreover, zymogen
21 granules and endocrine pancreas were observed at the same time as an
22 indication of initial digestive capacity and exogenous feeding. Similarly, a
23 pigmented retina and the presence of precursor cells of the swimbladder
24 were observed. Swimbladder inflation starts in part of the larval population
25 at 4 dah, and by day 8 all the larvae show a functional swimbladder. Growth
26 in total and standard length was very similar until 19 dah when notochord
27 flexion and urostile formation begins. First gastric glands were described at
28 around 6.00 mm SL while glandular stomach was identified when larvae
29 reach 8.50 mm SL. Meagre larval growth can reach 16–19 mm total length
30 by day 30 after hatching at 20–21 °C; however, this parameter is clearly
31 influenced by rearing conditions and temperature. Thus, Rodríguez-Rúa
32 *et al.* (2007) cited 15.1 and 11.66 mm SL of larvae at 30 dah reared at
33 20–23 °C or 20.5–24.8 °C, respectively. Fernández-Palacios *et al.* (2007),
34 Vallés and Estévez (2009) and Cardeira *et al.* (2012) reported a range
35 between 6–8 mm SL at 20–21 °C and 6.06–8.45 mm at 19–20 °C for the same
36 age, respectively (Fig. 17.4).

37 Culture conditions and protocols for meagre larval rearing differ amongst
38 different research stations and private companies, although all of them
39 generally include the use of filtered and UV sterilised sea water and natural
40 salinity of 32–40 ppt (Cárdenas, 2010), with dissolved oxygen of $5.61 \pm$
41 0.14 mg/L, and temperature of 18–25 °C (Cárdenas, 2010). Green water
42 technique is usually applied adding live and/or dry or frozen phytoplankton
43 (*Nannochloropsis* sp., *Isochrysis galbana*) to maintain a concentration of
44 250 000 cells ml⁻¹ in the rearing tanks. Larval culture is generally conducted
45 under 12/12 (dark/light) photoperiod by means of artificial light or mixed

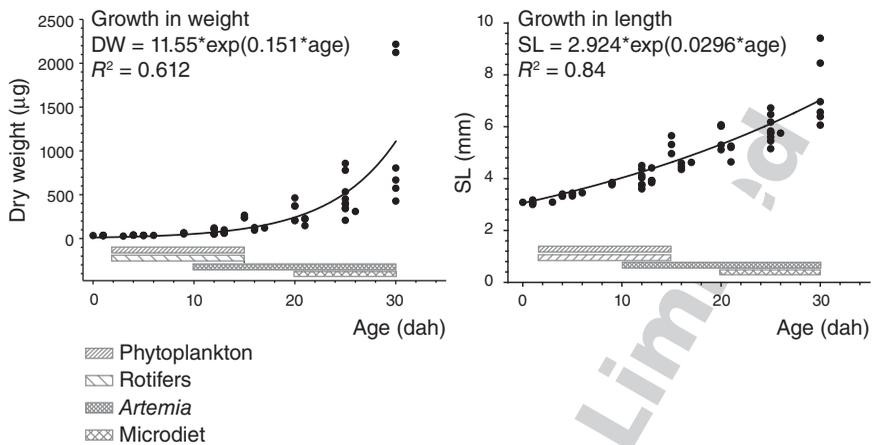


Fig. 17.4 Growth in dry weight and standard length and feeding sequence used for meagre (*Argyrosomus regius*) larval rearing in IRTA.

with natural light, reaching a light intensity at water surface ranging between 1000 and 3500 lux (Estévez *et al.*, 2007; Rodríguez-Rúa *et al.*, 2007; Roo *et al.*, 2007, 2009, 2010; Cárdenas, 2010). However, both photoperiod and light intensity have a clear effect on larval growth and survival, affecting behavior (24hL:0hD increases cannibalism) and larval quality (24hL:0hD and 1000 lux induced hyperinflation of the swimbladder – Vallés and Estévez, 2009; Cardeira *et al.*, 2012). A photoperiod of 12hL:12hD and 500 lux light intensity is highly recommended.

Limited detailed information about feeding schedules for *A. regius* is available. In general, rotifers (*Brachionus* sp.) are used at 5–10 rotifers ml⁻¹, either enriched with commercial products or with microalgae and fed twice a day from first feeding (2 dah) to 15–20 days after hatching (Fig. 17.4). Similarly, *Artemia* introduction may vary according to larval rearing protocols. Roo *et al.* (2007, 2010) have shown that early introduction of *Artemia* was reflected in a lower survival rate and higher larval length as big larvae quickly adapt to *Artemia* feeding, whereas small and weaker larvae were unable to feed on *Artemia*, dying shortly after rotifer removal. Similarly, the delay in *Artemia* introduction until day 15 was reported to reduce larval length and survival, probably as a consequence of a high energy cost/benefit related to the small size of the prey. Thus, a protocol including *Artemia* metanaupli from day 12 might be considered the most suitable for meagre larval rearing. Other authors (Duran *et al.*, 2008) have also found very good results of growth and survival using only rotifers (days 2 to 20) and artificial diets (day 18 onwards). A positive correlation between larval survival and early *Artemia* replacement with microdiets has also been found by Hernández-Cruz *et al.* (2007). Thus, microdiets can be introduced as early as from 15 dah, with a complete weaning at 20 dah and 40–45 % survival rate. A co-feeding period of *Artemia* and microdiets of 10, 15 and 20 days

produced a significantly higher larval growth than shorter periods of zero and five days (Fernandez-Palacios *et al.*, 2009b) without affecting larval survival after an air resistance activity test or the biochemical composition of the larvae. From these studies, it is possible to conclude that meagre larvae can be directly weaned from rotifer to an inert feed from 15 dah with a modest survival rate (7.7–13.1 %). However, a co-feeding period with *Artemia* implies higher survival rate, higher growth of the larvae and better resistance to activity tests.

One factor that highly affected the results in growth and survival was larval density. Several studies carried out by different authors (Estévez *et al.*, 2007; Roo *et al.* 2007, 2009, 2010) indicate that meagre larvae grow (four times higher dry weight at 25 than at 100 larvae L⁻¹) and resist the activity test better if reared using less than 50 larvae L⁻¹. Even larval survival rate was better in low than in high larval densities being as high as 53.2 ± 12.0 % (Roo *et al.*, 2007, 2010).

In a study comparing two different rearing systems, intensive (75 larvae L⁻¹, 2 m³ tanks) and semi-extensive (7.5 larvae L⁻¹, 40 m³ tanks), Roo *et al.* (2009) showed that at low densities growth in length (16.0 ± 1.5 mm vs 19.1 ± 2.3 mm) and weight (6.5 ± 0.5 mg vs 13.1 ± 2.4 mg), as well as survival after an activity test at 30 dah, were higher when semi-extensive conditions were used. Production cost is relatively lower (0.015 vs 0.02 €) under intensive culture vs semi-extensive, considering the cost of microalgae, rotifer, *Artemia* and microdiet used for weaning (Roo *et al.*, 2009, Table 17.1). Under these conditions, the survival rate under intensive conditions was similar to that reported previously (Estévez *et al.*, 2007; Rodriguez-Rua *et al.*, 2007) and higher when semi-extensive culture was used (25.7 %). However, survival rate can be improved if the cannibalistic behaviour observed in 20 dah larvae is minimised either by an early grading of the fish or taking care that the metamorphosing juveniles are fed to satiation.

First attempts to evaluate meagre larval quality in terms of skeletal deformities were reported by Estévez *et al.* (2007) and Roo *et al.* (2009). These authors showed that there was no significant interaction between the

Table 17.1 Comparison of feed quantities (per fry produced) and feeding costs according to the rearing system after weaning (35 dah) for meagre (*Argyrosomus regius*)

Treatment	Microalgae (ml)	Rotifers (millions)	<i>Artemia</i> (millions)	Dry feed (g)	Cost (Euro)
Intensive	26.28 ^b	21.4	8.2 ^b	0.025 ^b	0.015 ^b
Semi-extensive	37.07 ^a	18.2	5.1 ^a	0.051 ^a	0.020 ^a

Note: Different letters in superscript in the same column indicate a significant difference ($p < 0.05$).

larval density or the rearing system used and the number of deformed fish ($\chi^2 = 1.970$; $p = 0.160$) and only 4.3 % of fry produced showed some skeletal deformities, with fusion affecting vertebrae 10 to 15 the most frequent anomaly that was observed.

17.4 Ongrowing and harvest

Generally the technologies and practices used for ongrowing meagre are the same as those used for bream and bass, but the meagre presents superior growth rates and can achieve superior feed conversion ratios (FCR). In Europe, Spain has the highest production of meagre, producing 1348 t in 2009 (FAO, 2011). Over 95 % of the Spanish production was produced from seacages on the Mediterranean coast. The production cycle is pre-ongrowing, juvenile transport, stocking, feeding and harvest.

Pre-ongrowing is practised principally in land-based facilities and consists of growing the weaned meagre to 3–15 g. The pre-ongrowing period is approximately two to four months, depending on temperature and desired juvenile size for transfer. At rearing temperatures of 20 °C, the juveniles will approximately double in weight every two weeks in the size range of 3–15 g. The principal problem during pre-ongrowing is cannibalism, and frequent feeding and approximately bi-monthly size grading is required to maintain populations with a low variation in the size frequency distribution to avoid cannibalism of smaller fish by larger members of the cohort. Flexi-bacteria and, to a lesser extent, vibrios can be problematic during pre-ongrowing, particularly attacking fin edges, and should be controlled with formalin, H₂O₂ baths and antibiotics. It is particularly important that juveniles close to sea transfer are free from flexi-bacteria as in the seacages the flexi-bacteria can cause mortalities and the treatment of flexi-bacteria in the cages is more complicated than in land-based tanks.

Transport from the hatchery of 10 g meagre is identical to bream and bass in trucks fitted with 1–2 m³ cubic tanks supplied with air and oxygen and with a large discharge valve to discharge by gravity through a 15 cm diameter flexible pipe. The transport density used is maximum 30 kg m⁻³ and oxygen is maintained between 120 and 160 % saturation – higher saturation can stress the meagre juveniles. On arrival at the site, the water in the transport tanks is changed with water from the site. The site water should have 100 % oxygen saturation and be free from suspended material and contaminants such as heavy metals, pesticides and hydrocarbons. Once acclimatised, the juveniles are passed to a boat fitted with transport tanks and taken to be stocked into the cages. The meagre juveniles are more sensitive to handling and particularly scale loss compared to bream. Counting or handling the juveniles more than is necessary during the stocking procedure is not recommended. The cages most commonly used are 25 m diameter (depth 15 m) and each cage is stocked with 100 000 juveniles

(approx. 14 juveniles per m³). The stock is maintained in the cage until harvest with net changes made when necessary.

Commercial diets are available for meagre and bream diets have been successfully used. Meagre, like bream and bass, are carnivorous fish and initially diets were recommended with 45–48 % protein and 20–24 % lipid (FAO, 2005–2011b). Chatzifotis *et al.* (2012) confirmed that highest growth rates were obtained with 40–50 % protein. However, meagre appear to have lower lipid requirements than used in the initial diets and higher growth rates were obtained with a dietary lipid level of 17 % compared to levels of 21 % and 13 % (Chatzifotis *et al.*, 2010, 2012). A commercial diet used by Estévez *et al.* (2010) had a crude fat content of 11.5 %. Plant protein is being used in commercial diets and up to 315 g kg⁻¹ of plant protein (or 76.2 % of total protein content) was included without any reduction in growth rates (Estévez *et al.*, 2011). During the initial period after transfer, cannibalism can be a problem (up to 15 g) and feeding frequently, two to four times a day, to excess is recommended to aid the transfer and avoid cannibalism and feeding problems. As the meagre grow, feeding frequency can be reduced to once a day. The meagre feed low in the water column and take time to rise to the surface to feed. Meagre require approximately double the ration used for bream and can be fed 1–2 % body weight in agreement with manufacture's feeding tables. FCR of 1:1 has been achieved, but can be variable between different juvenile batches, environments and producers. For ongrowing, FCRs of 1.7 (FAO, 2005–2011b), 0.9–1.2 (Monfort, 2010) and 1.8 (personal communication) have been reported. On the Southern Mediterranean coast of Spain, growth from 5–1100 g was achieved in the first 12 months and to 2500 g in 24 months (Fig. 17.5), with seawater temperatures in the range of 14–26 °C.

There are few reports of disease problems during ongrowing, leading to the suggestion that meagre are resistant to diseases compared to other

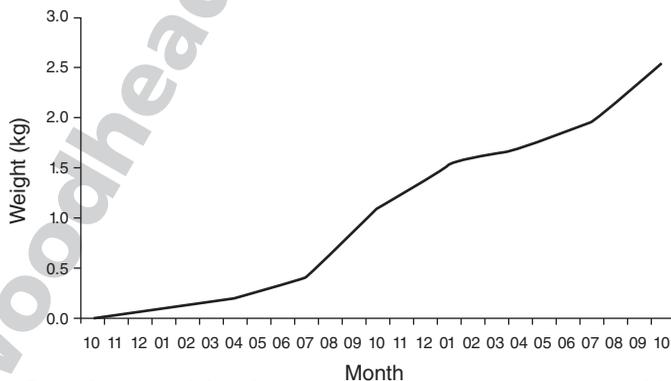


Fig. 17.5 Growth, wet weight of meagre (*Argyrosomus regius*) reared in cages on the Mediterranean coast of Spain with sea water temperatures in the range of 14–26 °C.

marine fish species (FAO, 2005–2011b). However, species new to aquaculture often do not present disease problems because the transfer of pathogens amongst the small population is limited. Problems with potential to seriously affect production have been bacterial, particularly flexi-bacteria when transferred with the fish from the hatchery, and parasite infections similar to those reported above for wild-caught broodstock. Infections of monogenean parasites, *Benedenia sciaenae* (Toksen *et al.*, 2007) and *Sciaenacotyle panceri* (Merella *et al.*, 2009; Ternengo *et al.*, 2010), have been reported for meagre ongrown in cages. *B. sciaenae* caused skin lesions and loss of scales (Toksen *et al.*, 2007) and *S. panceri* that appeared to originate from contact with wild fish populations infected the gills and caused mortalities (Merella *et al.*, 2009; Ternengo *et al.*, 2010). Merella *et al.* (2009) reported mortality levels of 5–10 % in large fish (780–1500 g) and no significant mortality (<2 %) in smaller fish (170–457 g). The infection in large fish was reduced and mortality controlled by reducing stocking density through harvesting. It is probable that a feed-based parasite control and/or careful management reducing contact with wild fish and separation of year classes will be required to avoid monogenea infections. However, to date these problems have been relatively isolated cases and when 10 g juveniles were stocked, survival during ongrowing has commonly been 90 %.

Harvesting is similar to bass and care must be taken not to damage the meagre during crowding, which can cause scale loss. Fish damaged during crowding and not harvested develop lesions and a proportion die in the following days and weeks. Meagre has been slaughtered with cold shock and suffocation in harvest bins with an iced slurry of sea water. EFSA (2009) scientific opinion for the European Parliament was that slaughter on ice was not recommended. Electrical stunning was a recommended alternative for European seabass (Lambooj *et al.*, 2008) that is being used for commercial slaughter and should be considered for the slaughter of meagre. For large (2+ kg) meagre percussion methods (mechanical blow to the head) commercially used for the slaughter of salmon (RSPCA, 2007) should also be considered.

17.5 Product, market and economic aspects

17.5.1 Product and market

The fishery production and the market of the meagre has historically been quite small with a mean annual catch 3183 ± 1448 t (\pm SD) during the period 1950–2008 (maximum of 7228 t in 1978 and minimum of 800 t in 1970) (FAO, 2011). It would appear that the combination of small catches landed close to the spawning areas and the good marketing qualities such as attractive fish shape, good processing yield, good nutritional values, low fat content, excellent taste and firm texture have given rise to good niche markets in the areas that meagre were traditionally landed, such as

1 Portugal, Southern, Spain and parts of France and Italy (Monfort 2010). The
2 European meagre fishery has declined to low levels (less than 500 t per year
3 during 1984–2002) and the catch has been sustained from the fishery in
4 north and western Africa (FAO, 2011) and more recently from aquaculture.
5 The decline of the European fishery has contributed to creating lucrative
6 European niche markets in which meagre commands prices in the middle
7 range of 6–12 €/kg, which can be compared to the market for cod, salmon,
8 haddock and hake (Monfort, 2010). Aquaculture of meagre started in 1997
9 and European production in 2009 was 1912 t. Monfort (2010) reviewed the
10 European markets where cultured meagre is being sold. Farmed meagre is
11 mainly sold fresh, whole or as fillets into the niche European markets. Over
12 50 % of the fish are sold at 1–2 kg, 30 % above 2 kg, and the rest below 1 kg.
13 Only small volumes are sold frozen. Meagre has many good marketing
14 qualities and is appreciated within the niche markets. However, meagre is
15 not known outside of the niche markets. The niche markets do not have the
16 capacity to absorb a high aquaculture production of meagre. Monfort (2010)
17 predicts a production of meagre of approximately 10000 in 2010 based on
18 juveniles stocked during 2008. However, the global financial crisis has con-
19 tributed to a reduced demand and stocking of juveniles in 2009 and 2010.
20 It is unclear if the market price can be sustained with the predicted produc-
21 tions for 2010–2012, but Monfort (2010) concludes that marketing is
22 required to expand the meagre market and maintain the medium price
23 level. If production rises without a constructive marketing policy, the over-
24 supply of meagre will drive the market price down possibly to a low price
25 market (<€5/kg), where pangasius and Nile perch can be found (Monfort,
26 2010).

27 28 29 **17.5.2 Economics**

30 At present, contacts in the industry report a cost of production for meagre
31 that is similar to the cost of production of bream and bass. The cost of
32 production was estimated to be approximately 3.9 € kg⁻¹ (Table 17.2).
33 However, the production cost was reported to be variable with different
34 batches of meagre juveniles presenting very different costs, principally due
35 to variations in feeding, feed conversion ratios and growth. In comparison,
36 production costs of bream are more stable and predictable with profitable
37 companies producing for 3.5–3.8 € kg⁻¹, similar to values reported in 2005
38 (Merinero *et al.*, 2005; FAO, 2005–2011c). In addition to the similarity of
39 total production cost, the breakdown of production cost of meagre and
40 bream are also similar (Table 17.2). Monfort (2010) reports a market price
41 for cultured meagre of 6 € kg⁻¹ making meagre production economically
42 attractive. However, as mentioned above, the niche market for meagre is
43 small, the product is unknown in other markets and without marketing
44 increased aquaculture production is expected to reduce the meagre market
45 price. There would appear to be room to reduce meagre production costs

Table 17.2 Comparison of production costs per kilo broken down into different concepts, juvenile cost, feed, personnel, processing and other costs, for the on-growing of meagre (*Argyrosomus regius*) and gilthead seabream (*Sparus auratus*)

Concept	Meagre ^a		Bream ^b	
	Cost kg ⁻¹	% of cost	Cost kg ⁻¹	% of cost
Juvenile	0.8 €	21 %	0.83 €	21 %
Feed	1.6 € (FCR 1.8)	41 %	1.51 €	39 %
Personnel	0.5 €	13 %	0.87 €	22 %
Processing	0.7 €	18 %	0.36 €	9 %
Others (medication etc)	0.3 €	8 %	0.34 €	9 %
Total	3.9 €	100 %	3.91 €	100 %

^a Costs estimated with the help of the authors' contacts within the industry

^b Merinero *et al.*, 2005.

and sustain a profitable production with a lower market price. Monfort (2010) gives a production cost of 3 € kg⁻¹ and suggests this could be reduced to 2.5 € kg⁻¹. In particular, juvenile cost (21 % of cost) and feed costs (41 % of cost) could be reduced. Meagre juveniles cost approximately 1 € per juvenile with all production pre 2008 coming from few producers (FAO, 2005–2011b; Monfort, 2010). The entrance into the market of new meagre juvenile producers and fully horizontally integrated producers (controlling the whole life-cycle, broodstock, larval rearing and on-growing) should reduce the cost of juveniles. Meagre larval rearing is similar to bream, which cost 0.1–0.28 € each depending on size (2–5 g) and rearing system (FAO, 2005–2011c). Monfort (2010) suggests meagre juvenile price could drop to 0.3 € per juvenile. Feed costs can be lower than the figure used here, meagre grow faster than bream and can have FCR of 0.9–1.2 (Monfort, 2010). However, technologies, feed formulation and juvenile quality need to be improved to consistently obtain FCRs close to these values.

17.6 Future trends

The principal and immediate problem for meagre culture is the marketing. Monfort (2010) indicates that meagre are presently positioned as a medium-priced product in a small niche market. Outside of the niche market (Portugal and parts of Spain, France and Italy) the product is not known. For the success of meagre culture, this market needs to be expanded safeguarding a profitable market price. Rapid expansion of the market without adequate marketing may cause the price of meagre to fall into low-priced market and, thereby, threaten the profitability of the production. Production in 2010 onwards is expected to pass the niche market size and the future market and potential profitability of the production will be

1 determined in the coming years (Monfort, 2010). The situation is such that
2 a larger production is required to enable consumers to know the product,
3 but a larger production supplied to a public that do not know the product
4 will probably lower the market price. If cyclic variations in market price are
5 to be avoided, a marketing strategy that informs consumers as production
6 increases is required (Monfort, 2010).

7 The marketing situation can be aided by improving production technolo-
8 gies to reduce the cost of production. Meagre is a species new for aquacul-
9 ture in south Atlantic and Mediterranean countries and, as the producers,
10 knowledge of the species increases, improved production can be expected.
11 Genetic selection for organisms adapted to culture and for traits such as
12 growth and product quality will reduce variability between growth and FCR
13 of batches of juveniles. The newly established producers of juveniles are
14 often using captive-bred broodstock from a small genetic pool (possibly one
15 family) and these companies need use genetic tools (Andree *et al.*, 2010) to
16 evaluate stocks, program the introduction of new genetic material and set
17 up genetic improvement programs. Future studies are needed on the nutri-
18 tional requirements and possible implications of nutrition on cannibalism
19 and variable FCRs. Hatchery and juvenile production techniques need to
20 be improved to optimise culture productivity and larval quality, especially
21 to avoid dispersion in larval growth that has severe consequences in the
22 cannibalistic behaviour of 20 dah larvae (6 mm, Roo *et al.*, 2009) and in the
23 hyperinflation of the swimbladder. Swimbladder hyperinflation has been
24 observed in meagre larvae in absence of gas super-saturation of the rearing
25 water and as a consequence of early *Artemia* feeding and high light intensity
26 or long photoperiods. Several causes have been pointed out for this abnor-
27 mality: bacterial load of the nauplii and stress related to larval density and
28 light conditions (Roo *et al.*, 2007; Cardeira *et al.*, 2012). Broodstock manage-
29 ment needs to be improved to define the environment required to achieve
30 spontaneous spawning. Out-of-season egg production methods should be
31 applied to ensure a continuous market supply of juveniles and processed
32 meagre. Studies in IRTA and the ease of use of photoperiod controlled
33 out-of-season egg production in red drum and other Sciaenids (Thomas
34 *et al.*, 1995) would suggest that this can be achieved without difficulty. The
35 emergence of disease problems in ongrowing can be expected, and initially
36 the provision of in-feed products to control skin and gill parasites should
37 be developed. Lastly, harvesting and processing should be improved. Alter-
38 natives to harvesting on ice will be needed in the future and Monfort (2010)
39 suggests that marketing in packaged fillets can be attractive to consumers.

40 In conclusion, as an aquaculture species the meagre appears to be an
41 excellent candidate with many of the attributes that both producers and
42 consumers look for in a cultured species. It has been stated that meagre can
43 be the salmon of southern Europe. The principal hurdle to this metaphor
44 is that consumers do not know the product and experience shows that
45 selling an unknown product in the competitive fish market is at best

difficult. At the lower end of the market, pangasius has been introduced very successfully. It remains to be seen if meagre can achieve a similar success, while maintaining a profitable market price.

17.7 Acknowledgements

Thank you to the many people that have helped with information and the research that has made this chapter possible, especially industry contacts and technicians in IRTA Sant Carles de la Rapita and ICCM, Canary Islands. Most of the research reported here for meagre culture protocols was funded by 1) Spanish Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Secretaria General del Mar, JACUMAR, project Spanish national plan for meagre culture, coordinated nationally by Salvador Cardenas, in Catalonia by Alicia Estévez and in Las Canaries by Hipólito Fernández-Palacios and 2) INIA-FEDER project RTA2008-00107 coordinated by Neil Duncan.

17.8 References

- ABREU N, SOCORRO J A, BETANCOR M, CABALLERO M J, FERNÁNDEZ-PALACIOS H, HERNÁNDEZ-CRUZ C M *et al.* (2009) Nuevas aportaciones al estudio de la organogénesis en larvas de corvina (*Argyrosomus regius*, Asso 1801), in Beaz Paleo, D, Villarroel Robinson, M and Cardénas Rojas S (eds), *Libro de Resúmenes, XII Congreso Nacional de Acuicultura*, 24-26 Noviembre, Madrid. Madrid: CICEGRAF Artes Graficas, 510-511 (in Spanish, abstract in English).
- ANDREE K, AXTNER J, BAGLEY M J, BARLOW E J, BEEBEE T J C *et al.* (2010) Permanent Genetic Resources Note. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology. Resources Database 1 April 2010 – 31 May 2010. *Molecular Ecology Resources* 10: 1098-1105.
- CARDEIRA J, VALLÉS R, DIONISIO G, ESTÉVEZ A, GISBERT E, POUSSAO-FERREIRA J, CANCELA M L and GAVAIA J P (2012) Osteology of the axial and appendicular skeletons of the meagre *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) and early skeletal development at two rearing facilities. *Journal of Applied Ichthyology*, 28 (3): 464-470.
- CÁRDENAS S (2010) *Crianza de la corvina (Argyrosomus regius)*, Cuadernos de Acuicultura n° 3, Madrid: Fundación OESA.
- CHATZIFOTIS S, PANAGIOTIDOU M, PAPAIOANNOU N, PAVLIDIS M, NENGAS I and MYLONAS C C (2010) Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture* 307: 65-70.
- CHATZIFOTIS S, PANAGIOTIDOU M and DIVANACH P (2012) Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture International* 20: 91-98.
- CHEN X H, LIN K B and WANG X W (2003) Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China. *Journal of Fish Diseases* 26: 615-619.
- DUNCAN N J, ESTÉVEZ A and MYLONAS C C (2007) Efecto de la inducción hormonal mediante implante o inyección de GnRH α en la cantidad y calidad de puestas de corvina (*Argyrosomus regius*), in Cerviño A, Guerra A and Pérez C (eds), *Libro*

- 1 *de Actas Toma II XI Congreso Nacional de Acuicultura*, 24–28 Septiembre, Vigo.
 2 Pontevedra: Graficas Salnes SL, 731–734 (in Spanish, abstract in English).
- 3 DUNCAN N, ESTÉVEZ A, PADROS F, AGUILERA C, MONTERO F E, NORAMBUENA F *et al.* (2008)
 4 Acclimation to captivity and GnRHa-induced-spawning of meagre (*Argyrosomus*
 5 *regius*). *CYBIUM International Journal of Ichthyology* 32: 332–333.
- 6 DUNCAN N, ESTÉVEZ A, PORTA J, CARAZO I, NORAMBUENA F, AGUILERA C, GAIRIN I, BUCCI
 7 F, VALLES R and MYLONAS C C (2012) Reproductive development, GnRHa-induced
 8 spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to
 9 captivity. *Fish Physiology and Biochemistry*, DOI 10.1007/s10695-012-9615-3
- 10 DURAN J, PASTOR E, GRAU A, MASSUTI-PASCUAL E, VALENCIA J M and GIL M M (2009) Total
 11 replacing of *Artemia* by an artificial diet in larval rearing feeding protocol of
 12 meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture Europe 2009*, European
 13 Aquaculture Society, 14–17 August, Trondheim.
- 14 EFSA (2009) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a
 15 request from the European Commission on welfare aspect of the main systems
 16 of stunning and killing of farmed seabass and seabream. *The EFSA Journal* 1010:
 17 1–52.
- 18 ESTÉVEZ A, TREVIÑO L and GISBERT E (2007) La densidad larvaria inicial afecta al
 19 crecimiento pero no a la supervivencia de las larvas de corvina (*Argyrosomus*
 20 *regius*) en cultivo, in Cerviño A, Guerra A and Pérez C (eds), *Actas XI Congreso*
 21 *Nacional de Acuicultura*, 24–28 Septiembre, Vigo. Pontevedra: Graficas Salnes SL,
 22 747–750.
- 23 ESTÉVEZ A, TREVINO L, KOTZAMANIS Y, KARACOSTAS I, TORT L and GISBERT E (2011)
 24 Effects of different levels of plant proteins on the ongrowing of meagre (*Argy-*
 25 *rosomus regius*) juveniles at low temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 17:
 26 e572–e582.
- 27 FAO (2011) FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics
 28 Unit. FISHSTAT Plus: Universal software for fishery statistical time series.
 29 Version 2.3. 2000. Data sets: Aquaculture production: quantities and values 1950–
 30 2009; Capture production 1950–2009.
- 31 FAO © 2005–2011a, Cultured Aquatic Species Information Programme. *Sciaenops*
 32 *ocellatus*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Cynthia K
 33 Faulk, A In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated
 34 9 February 2005. [Cited 20 September 2012]. [http://www.fao.org/fishery/
 35 culturedspecies/Sciaenops_ocellatus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sciaenops_ocellatus/en).
- 36 FAO © 2005–2011b, Cultured Aquatic Species Information Programme. *Argyroso-*
 37 *mus regius*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Stipa, P;
 38 Angelini, M In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.
 39 Updated 10 February 2005. [Cited 20 September 2012]. [http://www.fao.org/fishery/
 40 culturedspecies/Argyrosomus_regius/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en).
- 41 FAO © 2005–2011c, Cultured Aquatic Species Information Programme. *Sparus*
 42 *aurata*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Colloca, F;
 43 Cerasi, S In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated
 44 8 February 2005. [Cited 20 September 2012]. [http://www.fao.org/fishery/
 45 culturedspecies/Sparus_aurata/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en).
- FERNÁNDEZ-PALACIOS H, SCHUCHARDT D, ROO J, BORRERO C, HERNÁNDEZ-CRUZ C M and
 SOCORRO J (2007) Estudio morfológico de la corvina (*Argyrosomus regius*, Asso
 1801) durante el primer mes de vida, in Cerviño A, Guerra A and Pérez C (eds),
Actas XI Congreso Nacional de Acuicultura, 24–28 Septiembre, Vigo. Pontevedra:
 Graficas Salnes SL, 755–758.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS H, SCHUCHARDT D, ROO J, HERNÁNDEZ-CRUZ C M and DUNCAN N
 (2009a) Efecto de distintas dosis de GnRHa sobre la calidad de la puesta de
 corvina (*Argyrosomus regius*), in Beaz Paleo D, Villarroel Robinson M and Car-
 dénas Rojas S (eds), *Libro de Resúmenes, XII Congreso Nacional de Acuicultura*,

- 24–26 Noviembre, Madrid. Madrid: CICEGRAF Artes Graficas, 554–555 (in Spanish, abstract in English). 1
- FERNÁNDEZ-PALACIOS H, SCHUCHARDT D, ROO J, HERNÁNDEZ-CRUZ C M and DUNCAN N 2
(2009b) Eficacia de la inducción hormonal con distintas dosis de GnRH α en 3
corvina (*Argyrosomus regius*), in Beaz Paleo D, Villarroel Robinson M and Car- 4
dénas Rojas S (eds), *Libro de Resúmenes, XII Congreso Nacional de Acuicultura*, 5
24–26 Noviembre, Madrid. Madrid: CICEGRAF Artes Graficas, 556–557 (in 6
Spanish, abstract in English). 7
- FERNÁNDEZ-PALACIOS H, SCHUCHARDT D, ROO J, HERNÁNDEZ-CRUZ C M, SABATER C and 8
DUNCAN N (2011) Efecto de diferentes intervalos de tiempo entre inyecciones con 9
GnRH α , sobre las puestas de reproductores de corvina (*Argyrosomus regius*), 10
Libro de Resúmenes, XIII Congreso Nacional Acuicultura, 21–24 de Noviembre, 11
Barcelona (in Spanish, abstract in English). 12
- GONZÁLEZ-QUIRÓS R, DEL ÁRBOLA J, GARCÍA-PACHECOA M M, SILVA-GARCÍA A J, NARANJOA 13
J M and MORALES-NINC B (2011) Life-history of the meagre *Argyrosomus regius* in 14
the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research* 109: 140–149. 15
- GRIGORAKIS K, FOUNTOULAKI E, VASILAKI A, MITTAKOS I and NATHANAILIDES C (2011) 16
Lipid quality and filleting yield of reared meagre (*Argyrosomus regius*). *Internation- 17
al Journal of Food Science and Technology* 46: 711–716. 18
- HALL D A (1984) The Coorong: Biology of the major fish species and fluctuations in 19
catch rates 1976–1983. *SAFIC* 8: 3–17. 20
- HERNÁNDEZ-CRUZ C M, SCHUCHARDT D, ROO J, BORRERO C and FERNÁNDEZ-PALACIOS H 21
(2007) Optimización del protocolo de destete de corvina (*Argyrosomus regius* 22
Asso, 1801), in Cerviño A, Guerra A and Pérez C (eds), *Actas XI Congreso 23
Nacional de Acuicultura*, 24–28 Septiembre, Vigo. Pontevedra: Graficas Salnes SL, 24
751–754. 25
- IBARRA-CASTRO L and DUNCAN N J (2007) GnRH α -induced spawning of wild-caught 26
spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 272: 737–746. 27
- JIMÉNEZ MT, PASTOR E, GRAU A, ALCONCHEL JI and CÁRDENAS S (2005) Revisión sobre 28
el cultivo de esciéndidos en el mundo y presentación del Plan nacional de Cría de 29
corvina (*Argyrosomus regius*), in *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura*, 30
17–21 Octubre, Valencia, 396–397. 31
- JIMÉNEZ M T, RODRÍGUEZ DE LA RÚA A, SÁNCHEZ R, CÁRDENAS S (2007) Atlas de desar- 32
rollo de la corvina *Argyrosomus regius* (Pisces: Sciaenidae) durante su primer 33
mes de vida. *REDVET Revista electrónica de Veterinaria* (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>) Vol. VIII, n $^{\circ}$ 1. 34
- LAGARDERE J P and MARIANI A (2006) Spawning sounds in meagre *Argyrosomus 35
regius* recorded in the Gironde estuary, France. *Journal of Fish Biology* 69: 36
1697–1708. 37
- LAMBOOIJ B, GERRITZEN M A, REIMERT H, BURGGRAAF D, ANDRE G and VAN DE VIS H (2008) 38
Evaluation of electrical stunning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in seawater 39
and killing by chilling: welfare aspects, product quality and possibilities for imple- 40
mentation. *Aquaculture Research*, 39: 50–58. 41
- MAÑANÓS E, DUNCAN N and MYLONAS C C (2009) Reproduction and control of ovula- 42
tion, spermiation and spawning in cultured fish, in Cabrita E, Robles V and 43
Harraez P (eds), *Methods in Reproductive Aquaculture*. Boca Raton, FL: CRC 44
Press Taylor and Francis Group, 3–80. 45
- MERELLA P, CHERCHI S, GARIPPA G, FIORAVANTI M L, GUSTINELLI A, SALATI F (2009) Out- 46
break of *Sciaenacotyle panceri* (Monogenea) on cage-reared meagre *Argyroso- 47
mus regius* (Osteichthyes) from the western Mediterranean Sea. *Diseases of 48
Aquatic Organisms* 86: 169–173. 49
- MERINERO S, MARTÍNEZ S, TOMÁS A and JOVER M (2005) Análisis económico de alter- 50
nativas de producción de Dorada en jaulas marinas en el litoral Mediterráneo 51
español. *Revista AQUATIC* 23: 1–19 (in Spanish). 52

- 1 MONFORT M C (2010) *Present market situation and prospects of meagre (Argyrosomus*
 2 *regius), as an emerging species in mediterranean aquaculture*. Studies and Reviews,
 3 General Fisheries Commission for the Mediterranean No. 89. Roma: FAO.
- 4 MORETTI A, PEDINI FERNANDEZ-CRIADO M, CITTOLIN G and GUIDASTRI R (1999) Manual
 5 on hatchery production of seabass and gilthead seabream, Volume 1. Rome, FAO.
- 6 MYLONAS C C, MITRIZAKIS N, SIGELAKI I, and PAPADAKI M (2011) Spawning kinetics of
 7 individual female meagre (*argyrosomus regius*) after treatment with GnRH
 8 implants. *Indian Journal of Science and Technology*, 9th ISRPF Issue, 4: No. S8 p.
 9 232–233.
- 10 NELSON J S (1994) *Fishes of the world* (3rd edi). New York: Wiley.
- 11 PASTOR E and CÁRDENAS S (2007) Cultivo larvario de la corvina *Argyrosomus regius*
 12 (Asso, 1801), in Cerviño A, Guerra A and Pérez C (eds), *Actas XI Congreso*
 13 *Nacional de Acuicultura*, 24–28 Septiembre, Vigo. Pontevedra: Graficas Salnes SL,
 14 739–742.
- 15 PICCOLO G, BOVERA F, DE RIU N, MARONO S, SALATI F, CAPPUCINELLI R and MONIELLO G
 16 (2008) Effect of two different protein/fat ratios of the diet on meagre (*Argyroso-*
 17 *mus regius*) traits. *Italian Journal of Animal Science*, 7: 363–371.
- 18 POLI B M, PARISI G, ZAMPACAVALLO G, IURZAN F, MECATTI M, LUPI P and BONELLI A (2003)
 19 Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyroso-*
 20 *mus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-
 21 size fish. *Aquaculture International*, 11: 301–311
- 22 QUÉMÉNER L, SUQUET M, MERO D and GAIGNON J-L (2002) Selection method of new
 23 candidates for finfish aquaculture: the case of the French Atlantic, the Channel
 24 and the North Sea coasts. *Aquatic Living Resources*, 15: 293–302.
- 25 RODRÍGUEZ-RÚA A, GRAU A, JIMÉNEZ M T, VALENCIA J M, ROSANO M, DURÁN J *et al.* (2007)
 26 Cultivo larvario de la corvina *Argyrosomus regius* (Asso, 1801), in Cerviño A,
 27 Guerra A and Pérez C (eds), *Actas XI Congreso Nacional de Acuicultura*, 24–28
 28 Septiembre, Vigo. Pontevedra: Graficas Salnes SL, 739–742.
- 29 ROO J, HERNÁNDEZ-CRUZ C M, BORRERO C, FERNÁNDEZ-PALACIOS H, SHUCHARDT D (2007)
 30 Efecto de la densidad larvaria y secuencia alimentaria en el cultivo larvario de
 31 corvina (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) durante el primer mes de vida, in
 32 Cerviño A, Guerra A and Pérez C (eds), *Actas XI Congreso Nacional de Acu-*
 33 *cultura*, 24–28 Septiembre, Vigo. Pontevedra: Graficas Salnes SL, 743–746.
- 34 ROO F J, HERNÁNDEZ-CRUZ C M, FERNÁNDEZ-PALACIOS H, SCHUCHARDT D and IZQUIERDO
 35 M S (2009) Effect of rearing system intensiveness on biological features, culture
 36 performance and larval quality of meagre (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) larvae,
 37 in Hendry C I, Van Stappen G, Wille M and Sorgeloos P (eds), *LARVI' 09 – 5th*
 38 *Fish & Shellfish Larviculture Symposium*. Europ. Aquacul. Soc. Spec. Publ 38,
 39 p. 371–374.
- 40 ROO J, HERNÁNDEZ-CRUZ C M, BORRERO C, SCHUCHARDT D, FERNÁNDEZ-PALACIOS H
 41 (2010) Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus*
 42 *regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture*, 302, 82–88.
- 43 RSPCA (2007) *RSPCA Welfare standards for farmed Atlantic salmon*.
- 44 SCHUCHARDT D, FERNÁNDEZ-PALACIOS H, ROO J, HERNÁNDEZ-CRUZ C M (2007) Estabu-
 45 lación y mantenimiento de un stock de reproductores de corvina (*Argyrosomus*
regius, Asso, 1801), en Canarias, in *Libro de Actas Toma II XI Congreso Nacional*
de Acuicultura, 24–28 Septiembre, Vigo. Pontevedra: Graficas Salnes SL, 727–730
 (in Spanish, abstract in English).
- SCHIAVONE R, ZILLI L, STORELLI C and VILELLA S (2012) Changes in hormonal profile,
 gonads and sperm quality of *Argyrosomus regius* (Pisces, Scianidae) during the
 first sexual differentiation and maturation. *Theriogenology*, 77: 888–898.
- SEREZLI R, BASARAN F, GUNGOR MUHTAROGLU C and KAYMAKCI BASARAN A (2012) Effects
 of 2-phenoxyethanol anaesthesia on juvenile meagre (*Argyrosomus regius*).
Journal of Applied Ichthyology, 28: 87–90.

- TERNENGO S, AGOSTINI S, QUILICHINI Y, EUZET L and MARCHAND B (2010) Intensive infestations of *Sciaenocotyle pancerii* (Monogenea, Microcotylidae) on *Argyrosomus regius* (Asso) under fish-farming conditions. *Journal of Fish Diseases* 33: 89–92. 1
2
3
- THOMAS P, ARNOLD C R and HOLT G J (1995) Red drum and other sciaenids, in Bromage NR and Roberts RJ (eds), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford: Blackwell Science, 118–137. 4
5
6
- TOKSEN E, BUCHMANN K and BRESCIANI J (2007) Occurrence of *Benedenia sciaenae* van Beneden, 1856 (Monogenea: Capsalidae) in cultured meagre (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) (Teleost: Sciaenidae) from western Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 27(6): 250. 7
8
9
- TYLER C R and SUMPTER J P (1996) Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287–318. 10
11
- VALLÉS R and ESTÉVEZ A (2009) Efecto del fotoperiodo en el crecimiento y supervivencia de larvas de corvina (*Argyrosomus regius*) en cultivo intensivo, in Beaz Paleo D, Villarroel Robinson M and Cardénas Rojas S (eds), *Libro de Resúmenes, XII Congreso Nacional de Acuicultura*, 24–26 Noviembre, Madrid. Madrid: Madrid: CICEGRAF Artes Graficas , 614–615 (in Spanish, abstract in English). 12
13
14
15
- VALLÉS R and ESTÉVEZ A (2011) Light conditions during larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture International* (submitted) 16
17
- VALLÉS R, BAYARRI M J, MAÑANÓS E and DUNCAN N (2011) Plasma sex steroid profiles in meagre (*Argyrosomus regius*). *Indian Journal of Science and Technology*, 9th ISRPF Issue, Vol. 4 No. S8 p. 108 18
19
- VALLÉS R, CARDEIRA J, DIONISIO G, ESTÉVEZ A, POUSSAO-FERREIRA J, CANCELA M L and GAVAIÁ J P (2011b) Early axial and appendicular skeletal development of the meagre (*Argyrosomus regius*). Comparison between two rearing facilities. *Journal of Applied Ichthyology* (submitted). 20
21
22
23
- WALLACE R A and SELMAN K (1981) Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist* 21: 325–343. 24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45



Osteology of the axial and appendicular skeletons of the meagre *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) and early skeletal development at two rearing facilities

By J. Cardeira^{1*}, R. Vallés^{2*}, G. Dionísio^{1†}, A. Estévez², E. Gisbert², P. Pousão-Ferreira³, M. L. Cancela^{1,4} and P. J. Gavaia¹

¹Centre of Marine Sciences, University of Algarve, Campus de Gambelas, Faro, Portugal; ²IRTA-SCR – Sant Carles de la Ràpita, Ctra. Poble Nou, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain; ³INRB I.P. – IPIMAR, Av. 5 Outubro s/n, Olhão, Portugal; ⁴Department of Biomedical Sciences and Medicine, University of Algarve, Campus de Gambelas, Faro, Portugal

Summary

The meagre (*Argyrosomus regius*) is a new species for aquaculture diversification, presenting a high economic value and a high growth rate, reaching 1 kg year⁻¹. The occurrence of deformities, which generally appear in cultured larvae at early stages, is problematic for aquaculture since they reduce fish fitness and profitability. Knowledge about the stages of skeletal formation is essential to accurately assess deformities in hatchery produced fish. Here, we describe the osteology of the axial skeleton and unpaired fins of the meagre. Based on this data, the osteological development of meagre larvae reared at the IPIMAR and IRTA-SCR, under different rearing conditions, was compared. Although little literature is available on the osteology of teleosts from the same taxonomic group, the skeletal composition of the meagre is comparable to that of other Sciaenidae. All skeletal structures considered appeared at earlier stages in larvae reared at IPIMAR, which presented a more advanced skeletal development in comparison to larvae of comparable length reared at IRTA-SCR that were submitted to lower temperature and light intensity, and reduced photoperiod regimes.

Introduction

The meagre, *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) is a species recently adapted to commercial aquaculture, and it presents a high economic value, in particular in the Mediterranean and Southern parts of European Atlantic coasts. This species displays high growth rates (~1 kg year⁻¹) and rapid larval development (Estévez et al., 2007; Roo et al., 2010). A preliminary description of the early stages of development of *A. regius* has already been conducted by Cárdenas (2011). However, the early ontogenic events of the osteological development are still poorly understood in larvae and juveniles of this species, and in other Sciaenidae. These osteological features have been used as tools not only for describing the phenotypical characteristics that allow species identification and phylogeny (Feltham and Marquiss, 1989), but also as standards for evaluating the quality of numerous species of hatchery-produced teleosts (Boglione et al., 2003; Fraser et al.,

2004). The osteological development of teleost larvae has been described for species as diverse as clupeids like the sardine (Matsuoka, 1997), sparids like gilthead seabream (*Sparus aurata*), red seabream (*Pagrus major*), common dentex (*Dentex dentex*) or white seabream (*Diplodus sargus*) (Matsuoka, 1985, 1987; Koumoundouros et al., 1997a, 2001a; Sfakianakis et al., 2003), groupers like *Epinephelus marginatus* or *E. septemfasciatus* (Nagano et al., 2007; Boglione et al., 2009) or European seabass (*Dicentrarchus labrax*) (Koumoundouros et al., 2001b), among others.

Skeletal deformities have long been identified as a major constraint for the production of high quality juveniles for aquaculture, but also for stock enhancement programs (Hickey, 1972; Le Vay et al., 2007). In larviculture, skeletal deformities are undesirable in terms of fish welfare, reducing fitness and market value. Ultimately, deformed fish are graded out and manually discarded (Divanach et al., 1997; Koumoundouros et al., 1997a,b, 1999), which represents a significant financial loss for farmers. Skeletal deformities can occur in a number of typologies ranging from the cranial to the tail regions of larvae and juveniles. A large number of nutritional, genetic and environmental factors have been shown to influence bone development (Cahu et al., 2003), affecting not only external morphology but also growth and survival. A comprehensive literature collection focusing on these causative factors has been recently made by Lall and Lewis-McCrea (2007) and Koumoundouros (2010), who reviewed the multifactorial causes for the occurrence of skeletal abnormalities in aquaculture reared teleosts. The assessment of deformities at early larval stages is a vital evaluation tool of quality for hatchery management. However, little information is available regarding the osteological development of the vertebral column and fins of *A. regius* larvae.

The present study describes in detail the osteology of the vertebral column and fins of meagre larvae. In addition, it also compares the development of those structures in larvae produced at two different locations, IPIMAR Aquaculture Research Center in Olhão (Portugal) and IRTA-SCR in Sant Carles de la Ràpita (Spain), where fish were produced under intensive culture conditions but with different rearing protocols such as light and temperature regimes.

Materials and methods

Argyrosomus regius eggs were obtained from wild broodstocks adapted to captivity at both IPIMAR and IRTA-SCR by

†Present address: Department of Biology and CESAM – Centre for Environmental and Marine Studies, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

*Both authors contributed equally.

induced spawning using GnRH α injections (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in females and 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in males) as previously described (Duncan et al., 2008). Eggs and larvae from both locations were incubated and reared under the conditions depicted in Table 1. Monitoring of temperature and salinity was performed on a daily basis, while nitrites and ammonia were checked once a week with all values being below the accepted limits throughout the experiment. From 2 to 15 days post hatching (dph) larvae from both locations were fed enriched rotifers (250 individuals mL^{-1} ; 2 h, 0.15 g L^{-1} of Easy Selco $^{\circledR}$; INVE, Belgium) at a density of 10 rotifers mL^{-1} . From 14 to 50 dph, larvae were fed enriched *Artemia* metanauplii (300 individuals mL^{-1} , 18 h, 0.6 g L^{-1} ; Easy Selco $^{\circledR}$) at a density of 1 individuals mL^{-1} . Weaning with artificial diet (Gemma Micro 300; Skretting, Norway) started at 17 dph in IPIMAR and at 20 dph in IRTA-SCR. Every day, from 0 to 20 dph, and every 2 days until 50 dph, a pool of 20 larvae was sampled from rearing tanks, euthanized with an overdose of MS-222 (Sigma-Aldrich, Saint Louis) and fixed overnight in 4% buffered paraformaldehyde. Larvae were washed for 30 min with phosphate buffer saline 0.1 M, pH 7.4 and stored in 70% ethanol at 4°C. Fish from both locations were stained in parallel for the detection of bone and cartilage using an adaptation of a previously described method for acid free staining with alizarin red S and alcian blue 8GX (Walker and Kimmel, 2007). Photographs and measurements (total length) of stained specimens were performed with a stereomicroscope (Leica MZ9.0) equipped with a F-View camera (and analysis system CellF $^{\circledR}$; Olympus, Hamburg, Germany) for the specimens from IPIMAR and a binocular microscope (Nikon SMZ800; Nikon, Tokyo, Japan) and an image analyser (AnalySIS; SIS GmbH, Germany) for the specimens from IRTA-SCR. We have used specimens reared at IPIMAR to describe and illustrate the osteology of the fully developed skeleton, and specimens from both IPIMAR and IRTA-SCR to describe, illustrate and compare the early skeletal developmental stages. Meristic analyses of the fins and vertebral column were performed at the end of the experimental period using a group of 20 randomly selected specimens from IPIMAR, displaying a fully developed skeleton. Schematic representations of the skeletal structures featured during development were drawn from photographs of stained larvae using Adobe $^{\circledR}$ Illustrator $^{\circledR}$ CS4 (14.0.0). The terminology followed Matsuoka (1985, 1987) and Boglione et al. (2001), with some adaptations to meagre.

Results

Vertebral column

The axial skeleton of the oldest and largest individuals analyzed from IPIMAR (Fig. 1a) was composed of (i) 25 vertebrae distributed into five cephalic (without parapophysis),

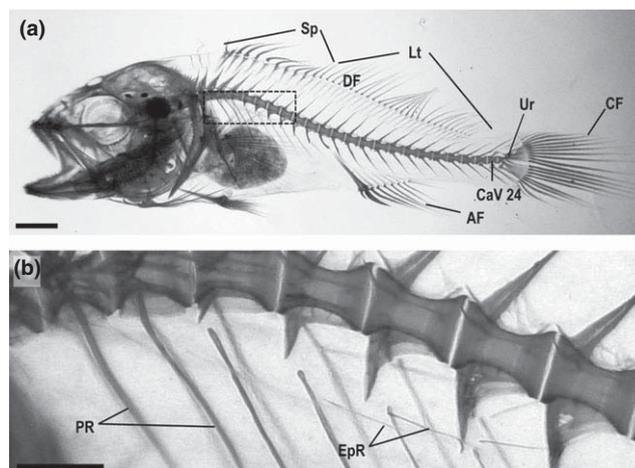


Fig. 1. (a) *A. regius* juvenile specimen (35 dph) stained for the detection of bone and cartilage, displaying a fully developed axial, cranial and appendicular skeletons; (b) high magnification of the abdominal area, clearly showing the pleural and epipleural ribs. The rectangle in (a) represents the area magnified in (b). AF, anal fin; CaV, caudal vertebra; CF, caudal fin; DF, dorsal fin; EPR, epipleural ribs; Lt, lepidotrichia; PR, pleural ribs; Sp, spines; Ur, urostyle. Scale bars: (a) = 1.5 mm; (b) = 0.5 mm

five pre-haemal (with parapophysis), 11 haemal (with haemal arches and spines) and three caudal vertebrae (bearing modified haemal or neural arches and spines to support caudal fin) including the urostyle (an upward oriented modified vertebral body); and (ii) nine pairs of pleural and epipleural ribs (Fig. 2; Table 2). These are modal values, which explains why the sum of the different morphological types of vertebrae does not add up to the total number of vertebrae.

Fins

The appendicular skeleton is composed of the paired pectoral and pelvic fins and the unpaired dorsal, anal and caudal fins. In the present work we will only describe the ontogeny and skeletal anatomy of unpaired fins. The oldest and largest individuals analyzed from IPIMAR displayed a dorsal fin composed of 11 anterior hard spines and 27 posterior soft rays or lepidotrichia. Additionally, the dorsal fin possessed internal intracartilaginous support elements formed by 35 proximal pterygiophores (plus the stay), three pre-dorsals, 35 intermediate and 36 distal pterygiophores (Fig. 3a,d; Table 2). The first two hard spines and the two last lepidotrichia articulated with only one pterygiophore and the remaining hard spines and lepidotrichia articulated with one pterygiophore each (Fig. 3a). The first pterygiophore intercalated between neural spines 2–3. The anal fin was composed of an intracartilaginous internal skeleton, formed by seven proximal pterygiophores

Table 1
Larval rearing conditions used at the IPIMAR and IRTA-SCR hatcheries for *A. regius*

Location	Temperature (°C)	Photoperiod and light	O ₂ (mg L ⁻¹)	Salinity (ppt)	Density (specimens L ⁻¹)	Hatching (%)
Eggs						
IRTA-SCR	18.7 (±0.43)	0 hL:24 hD	6.7 (±0.36)	36.3 (±0.06)	2600	97 (±2)
IPIMAR	20.0 (±0.5)	14 hL:10hD	5.4 (±1)	37.1 (±1)	2600	95 (±2)
Larvae						
IRTA-SCR	18.3 (±0.54)	18 hL:6 hD (500 lux)	6.96 (±0.62)	36.3 (±0.94)	50	–
IPIMAR	19.8 (±1)	14 hL:10 hD (1500 lux)	5.4 (±0.94)	37.1 (±1)	50	–

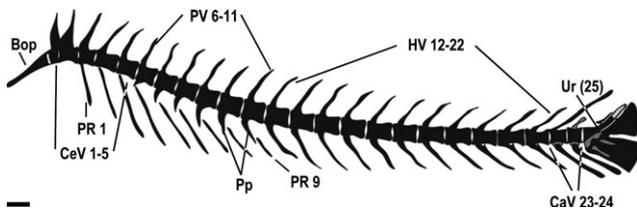


Fig. 2. Schematic representation of the axial skeleton of a 25 dph *A. regius* specimen (IPIMAR), displaying an almost completely formed skeleton. The scheme shows both the vertebral bodies and arcocentra (neural arches on top of vertebral centra and haemal arches on the bottom). Dark grey areas represent cartilage, black areas represent mineralized structures and light grey represents the notochord. Bop, basioccipital process; CeV, cephalic vertebra; CaV, caudal vertebra; HV, haemal vertebra; Pp, parapophysis; PR, pleural rib; PV, pre-haemal vertebra; Ur, urostyle. Scale bar = 0.5 mm

Table 2
Meristic characters of *A. regius* reared at IPIMAR

Skeleton	Structures	Mode	Range	
Axial	Vertebrae	Cephalic	5	4–5
		Pre-haemal	5	5–6
		Haemal	11	10–12
		Caudal	3	3
		Total	25	23–26 ^a
Appendicular	Epipleural ribs		9	8–10
		Pleural ribs	9	7–9
	Dorsal fin	Spines	11	10–11
		Lepidotrichia	27	25–30
	Anal fin	Spines	2	2
		Lepidotrichia	8	7–8
	Caudal fin	Dermatotrichia	11	10–12
Lepidotrichia		20	19–22	

^aUrostyle included.

(plus the stay), seven intermediate and seven distal pterygiophores, and a dermal external skeleton formed by two hard spines and eight lepidotrichia (Fig. 3b,c; Table 2). The two hard spines articulated with the same pterygiophore, lepidotrichia seven and eight also articulated with the same distal pterygiophore and the remaining lepidotrichia articulated with one pterygiophore each. The first anal proximal pterygiophore articulated with the haemal spine from vertebra 12 (Fig. 4f). The caudal fin complex was composed of five dorsal and six ventral dermatotrichia, articulating dorsally with the epurals and the modified neural spine and ventrally with the two modified haemal spines, respectively (Fig. 3e). Most lepidotrichia articulated with the five hypurals and parhypural. An intramembranously formed uroneural was observed dorsally, over the urostyle. Two accessory cartilages were present between the two modified haemal spines, and between modified haemal spine 24 and the parhypural.

Vertebral column development at IPIMAR and IRTA-SCR

The vertebral column development was assessed in specimens from both IPIMAR and IRTA-SCR. No differences were detected in embryonic and early larval stages between fish reared under different environmental conditions from both facilities. No cartilaginous or bony elements were formed or forming in the axial skeleton at these stages. We chose to divide the early osteological development into six distinct developmental stages (DS) ranging from (a) to (f) (Fig. 4). Age and length information can be consulted in Fig. 4, in which

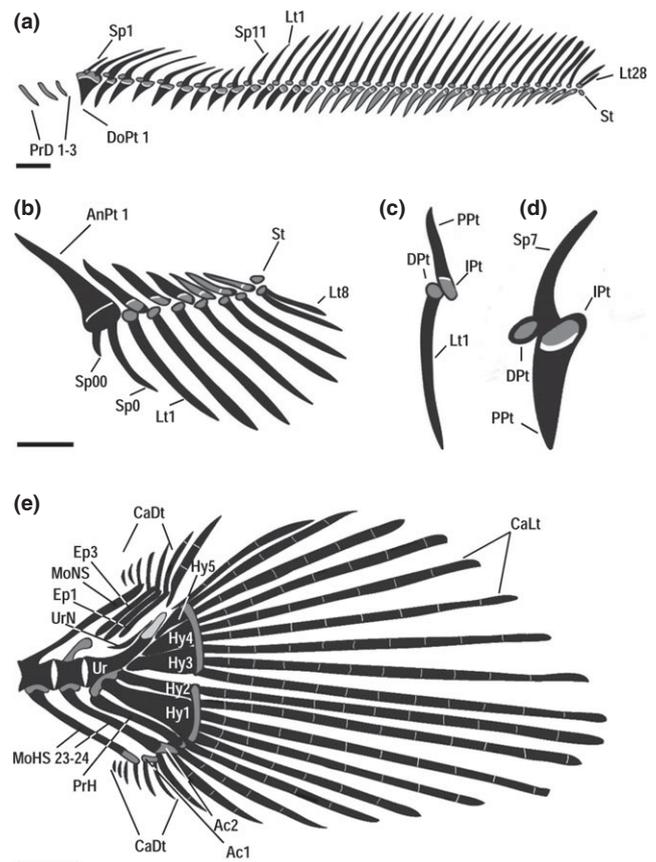


Fig. 3. Schematic representation of the unpaired fins of a 25 dph *A. regius* specimen (IPIMAR), displaying an almost completely formed skeleton. (a) dorsal fin, (b) anal fin, (c) magnification of the second pterygiophore and corresponding lepidotrichia of the anal fin, (d) magnification of the seventh pterygiophore and corresponding lepidotrichia of the dorsal fin, (e) caudal fin. Dark grey areas represent cartilage, black areas represent mineralized structures and light grey represents the notochord. Ac, accessory cartilage; AnPt, anal pterygiophores; CaDt, caudal dermatotrichia; CaLt, caudal lepidotrichia; DPt, distal pterygiophore; DoPt, dorsal pterygiophores; Ep, epural; Hy, hypural; IPT, intermediate pterygiophore; Lt, lepidotrichium; MoHS, modified haemal spine; MoNS, modified neural spine; PPT, proximal pterygiophore; PrD, predorsal; PrH, parhypural; Sp, spine; St, stay; Ur, urostyle; UrN, uroneural. Scale bars = 0.5 mm

each letter corresponds to a developmental stage (DS). As shown in Fig. 4a, the only support structure present at DS (a) was the notochord, as observed in larvae at 6 dph 3.5 mm total length (TL) from IPIMAR and 19 dph, 3.99 mm TL from IRTA-SCR. Neural arches 2–3 were the first elements of the axial skeleton to be formed, followed by neural arches 1 and 4 at DS (b) (Fig. 4b). All arches displayed a cartilaginous template throughout the vertebral column (Fig. 4). The two-first neural arches (2–3) started to calcify at 28 dph in 5.47 mm TL larvae from IRTA-SCR, while at IPIMAR, the same neural arches 2–3 were already developing in smaller larvae (14 dph with 4.85 mm TL), displaying cartilaginous neural arch 1 and 4 and neural arches 13–24 (Fig. 4c). The initial mineralization of the neural arches and vertebral primordia was only detected at 16 dph in 5.42 mm TL larvae (Fig. 4d), when all the remaining cartilaginous anlagen of the neural arches were already present. At DS (d), the upward bending of the posterior portion of the notochord started to take place and formed the urostyle. The cartilage of neural arches 1–4 was undergoing perichondral ossification and mineral deposition was detected over the fibrous notochord sheath, surrounding

the neural arch and extending bilaterally in a dorsal-ventral direction by perichordal mineralization, forming the vertebral centra (Fig. 4d). This process was only observed for these four vertebral centra, while the remaining vertebrae formed with mineral deposition at neural and haemal mineralization centers (attachment sites to the notochord), at the base of the arches, which extended both ventrad and dorsad, forming the chordacentra. These vertebrae were formed in an antero-posterior direction, giving rise to a complete vertebral column. Due to high developmental variability at 28 dph at IRTA-SCR, specimens with the same age were used as models to represent both DS (c,d). As shown, larvae at DS (e) displayed a widely mineralized vertebral skeleton. At this stage, only haemal vertebra 22, caudal vertebra 23–24 and corresponding arches did not present signs of mineralization. Moreover, at the same stage, the urostyle started to calcify dorsally.

The first cartilaginous anlagen from haemal arches to be formed were those from arches 12 and 13, shortly after the appearance of neural arches 2–3 (not shown). At DS (c), haemal arches 11–24 were already present (Fig. 4c). Parapophysis in pre-haemal vertebra were only visible at DS (d), immediately prior to the formation of the haemal mineralization centre of vertebrae (Fig. 4d). In fish at DS (f) (Fig. 4f), all the vertebral centra and arches were widely mineralized, showing a complete count of vertebral elements (Fig. 4f). In later stages, structures will mainly grow in size and trabecular complexity, with an increase in bone volume (Fig. 1a).

Fin development at IPIMAR and IRTA-SCR

The fin development was assessed in specimens from both IPIMAR and IRTA-SCR. The first elements to be formed in the dorsal fin were the proximal pterygiophores from the median portion of the fin at DS (d) (Fig. 4d). The pterygiophores continued to develop towards anterior and posterior directions (Fig. 4e) followed by the three pre-dorsals. At DS (f), the spiny rays and the lepidotrichia were already formed and mineralized. At this stage, nearly all dorsal fin elements were formed. However, the pre-dorsals and the posterior pterygiophores were still cartilaginous or under mineralization. All distal pterygiophores remained cartilaginous at this stage (Fig. 4f).

The development of the anal fin followed a pattern similar to that of the dorsal fin, with the first three anal proximal pterygiophores being formed at DS (d) in the median portion of the fin. At DS (e), six proximal pterygiophores were formed and the first three mineralized lepidotrichia were already present (Fig. 4e). At DS (f), all spiny rays and lepidotrichia were formed and mineralized, but the last three proximal pterygiophores and the stay remained cartilaginous (Figs 3b and 4f).

The first elements to be formed in the caudal fin complex were the hypurals 1–2 as seen at DS (b) (Fig. 4b). At DS (c) (Fig. 4c) the hypurals 3–4 and the parhypural were already developed, and the first mineralized lepidotrichia were present. The three epurals were formed dorsally and accompanied the initial flexion of the urostyle (Fig. 4d) in larvae at DS (d). At DS (e), hypural 5 was already present and the remaining started to calcify by perichondral ossification (Fig. 4e). At DS (f) (Fig. 4f), most dermatotrichia were present and the remaining elements of the caudal fin were almost completely formed and mineralized, except for the urostyle and the epurals, that were still undergoing ossification.

Discussion

Meagre larvae showed a fast growth under the hatchery conditions in both locations. A higher growth rate was detected under stronger light intensity and temperature around 20°C, reaching a developmental stage at which a complete skeletal composition was present at 30 dph. The formation pattern of skeletal elements in *A. regius* seems to be similar to what has been reported for other teleosts, like sparids such as common pandora (*Pagellus erythrinus*) and sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*), in which neural processes 1–4 and 11–21 and 2–3 and 15–18, respectively, were the first to be observed in the vertebral column (Sfakianakis et al., 2004, 2005). During *A. regius* development, vertebral ossification also seems to follow what has been observed for other species, in which, during formation of the centra, perichordal ossification is preceded by mineralization of the fibrous notochord sheath (Schaeffer, 1967). This process has been described in Atlantic salmon (*Salmo salar*), a cellular boned species, in which it was suggested that the chordacentra form in a segmented pattern by notochord mineralization. This results in mineralized rings within the dorsal or ventral sides of the notochord (probably due to chordoblast contribution) and spreads around the notochord sheath, followed by osteoblastic mobilization and perichordal bone formation (Grotmol et al., 2003, 2005; Nordvik et al., 2005). Similarly, during the early formation of the centrum in zebrafish (*Danio rerio*) larvae, which is also a cellular boned teleost, an apparently acellular osteoid matrix produced by the notochord is deposited in a periodic striped pattern (Fleming et al., 2001). In the acellular boned Japanese medaka (*Oryzias latipes*), it has been demonstrated that centra arise from acellular bone deposited around the notochord (Ekanayake and Hall, 1988). However, a more recent study shows that perichordal bone deposition occurs after notochord sheath mineralization (Inohaya et al., 2007). Unlike salmonids (*S. salar*) and cyprinids (*D. rerio*), and like adriaticichthyids (*O. latipes*), sciaenids (acanthopterygians) including *A. regius* also display acellular bone. These findings in teleost species with distinct bone types (cellular vs acellular) and separated by large phylogenetic distances, indicate that the ontogenic pattern of development of the vertebral elements has been established in early teleost fish lineages (Arratia et al., 2001).

Meristic characters characterize a given species (Lewis and Lall, 2006). In gilthead sea bream, it has been observed that farmed larvae displayed higher variability on the number of skeletal elements than wild captured specimens (Bogliione et al., 2001). This kind of variation, together with the presence of skeletal abnormalities, has been proposed as an early indicator of non-optimal rearing conditions (Lewis and Lall, 2006). In the present study, the specimens reared at IPIMAR, which were used for meristic analysis, displayed skeletal counts similar to those described for *A. regius* in the literature (Whitehead et al., 1986; Fischer et al., 1987; Griffiths and Heemstra, 1995; Dulčić et al., 2009), indicating that the produced individuals did not differ significantly from wild specimens.

Considering the vertebral column final composition, *A. regius* displayed a number of vertebral bodies (25 vertebrae) similar to what has been described for another species from the same family, *Sciaenops ocellata* (Topp and Cole, 1968), indicating that this might be a conserved feature among Sciaenidae. As compiled by Fahay (2007), most Sciaenidae described exhibited 25 vertebrae along the vertebral column

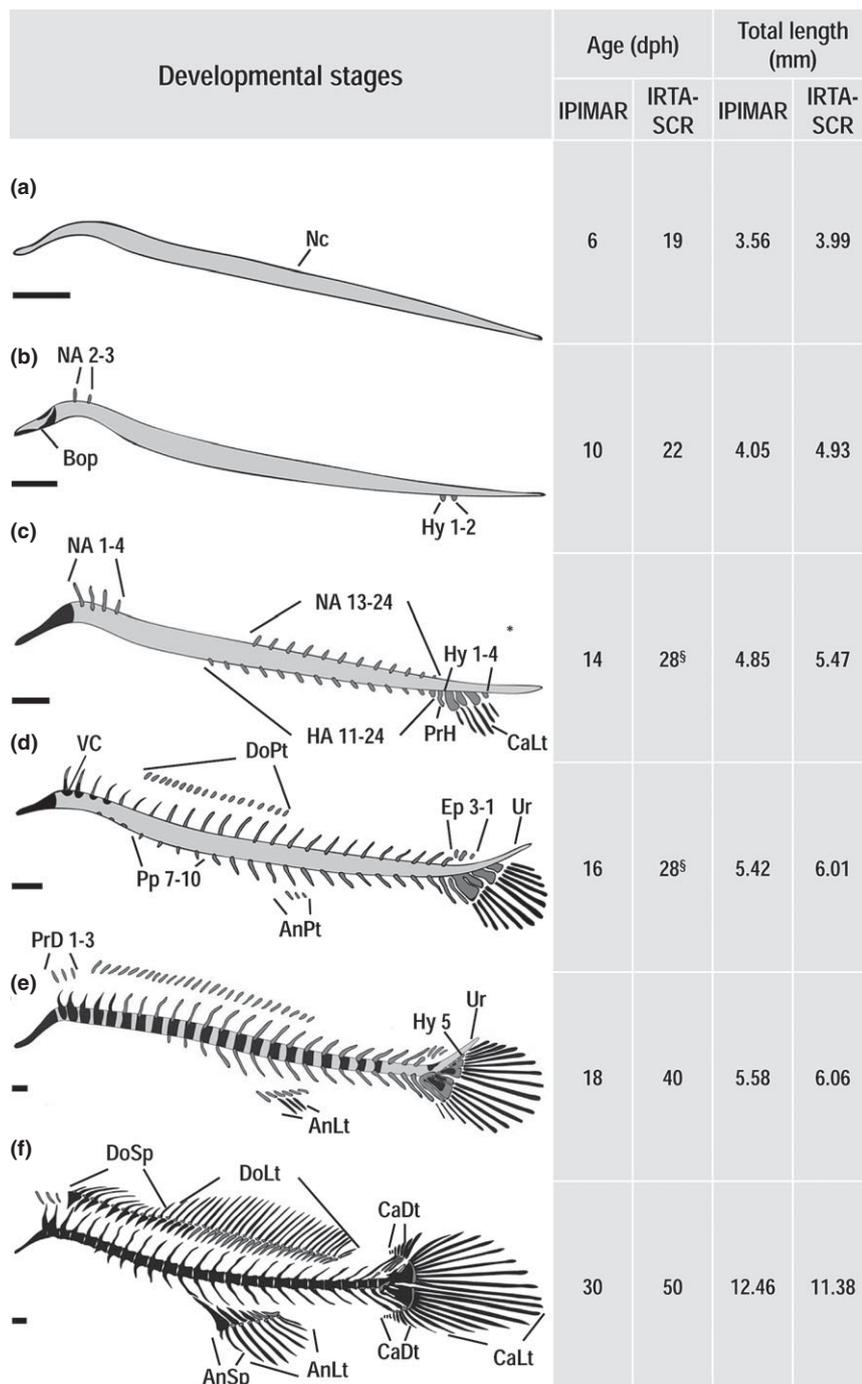


Fig. 4. Schematic representation of the axial and appendicular skeletal development of *A. regius* larvae reared at IPIMAR and IRTA-SCR, at six distinct developmental stages (a–f). The age and length at which each developmental stage occurs in both locations, are represented at the right side columns. The illustrations detail the formation and mineralization of skeletal structures, from the notochord (light gray), to cartilage (dark gray) and mineralizing or bony structures (black). AnLt, anal lepidotrichia; AnPt, anal pterygiophores; AnSp, anal hard spines; Bop, basioccipital process; CaDt, caudal dermatotrichia; CaLt, caudal lepidotrichia; DoLt, dorsal lepidotrichia; DoPt, dorsal pterygiophores; DoSp, dorsal hard spines; Ep, epural; HA, haemal arch; Hy, hypural; NA, neural arch; Nc, notochord; Pp, parapophysis; PrH, parhypural; Ur, urostyle. At DS (c), although is not represented, at IRTA-SCR neural arches 2–3 already presented signs of mineralization (asterisk). At IRTA-SCR, two 28 dph fish are illustrated at different DSs, due to high variability within the same age (§). Scale bars = 0.5 mm

reinforcing the fact that vertebral counts are likely to be highly conserved among species from this group, since the species within this group have a comparable lifestyle, which might favour the conservation of vertebral numbers. However, this count can go up to 29 in *Pseudosciaena polyactis* (Taniguchi, 1969) indicating that some differences still persist within sciaenids. On the other hand, it is known that the number of vertebral bodies can be highly variable among teleost taxa, ranging from 19 vertebra in pufferfish (Abe, 1952) to 33 in zebrafish (Sanger and McCune, 2002) and going up to 51 in Japanese and European sardines (*Sardinops melanostictus* and *Sardina pilchardus*, respectively) (Garcia and Moyano, 1990; Matsuoka, 1997), 57–60 in salmon (Kacem et al., 1998; Witten et al., 2006), 76 in *Belone belone* or 115 in European eel (*Anguilla anguilla*) (Garcia and Moyano, 1990).

The final composition of the caudal fin also seems to be conserved among Sciaenidae. Nevertheless, the number of accessory cartilages is considerably variable. In terms of numerical composition, the unpaired fins of the meagre are dissimilar to those of *S. ocellata* (Topp and Cole, 1968). Other taxa also share the same caudal fin element composition, such as described for the long-finned pike (*Dinolestes lewini*) (Fraser, 1971), as well as for sparids like *S. aurata* (Koumoundouros et al., 1997a), *P. erythrinus* (Sfakianakis et al., 2004) or *D. puntazzo* (Sfakianakis et al., 2005).

At both rearing locations, the sequence of osteological development in larvae was similar although marked differences in growth were observed, leading to an earlier formation of skeletal elements in individuals reared at IPIMAR compared to larvae reared at IRTA-SCR, likely

due to different culture conditions. Accordingly, at IPIMAR, 35 dph larvae displayed all skeletal structures and a completely mineralized skeleton, whereas at IRTA-SCR, the same only occurred in larvae after 50 dph. In addition, when comparing larvae with similar lengths, we could observe that those reared at IPIMAR presented a more developed skeleton than those reared at IRTA-SCR. Despite the fact that this study did not aim to test any particular hypothesis regarding specific rearing parameters, it shows that the skeletal development of meagre larvae is highly dependent on the environmental conditions, such as light and temperature. For numerous species it has been shown that non-optimal temperature regimes during larval rearing greatly influence fish performance by reducing growth and delaying skeletal development and subsequently increasing the incidence of deformities (Hart et al., 1996; Sfakianakis et al., 2004; Wargelius et al., 2005; Georgakopoulou et al., 2010). Other Sciaenidae species exposed to higher temperatures present higher RNA:DNA ratios, indicating a higher growth potential (Rooper et al., 1997). Accordingly, light intensity, wave length and photoperiod have previously been shown to affect significantly growth, vertebrae mineral deposition and skeletal quality, with fish exposed to longer photoperiods showing higher weight and length values (Moustakas et al., 2004; Fjellidal et al., 2005; Blanco-Vives et al., 2010; Villamizar et al., 2011). Our present results are in agreement with those studies since specimens with higher lengths resulted from higher photoperiod and temperature regimes. Moreover, light intensity might also have enhanced fish ability to detect prey, allowing them to feed more efficiently (Boeuf and Le Bail, 1999). Our results suggest that changes in temperature, light intensity and photoperiod or a combination of these, have a marked effect on the rate of early skeletal development of meagre. In that sense, further research should be carried in order to understand the optimal conditions to maximize the growth rates, without compromising osteogenesis and the overall quality of produced fry.

This study describes for the first time the early osteology of reared *A. regius* axial and appendicular skeletons and highlights the importance of optimizing the rearing protocols to enhance larval productivity and quality. Using the standardized skeletal developmental patterns presented here, we are currently evaluating the quality of produced fish by the assessment of skeletal deformities in hatchery produced meagre. The osteological description of meagre larvae and early juveniles conducted here may serve as a reference for further studies evaluating the quality of larvae and the influence of rearing biotic and abiotic factors in the skeletogenesis of this species and the occurrence of skeletal deformities.

Acknowledgements

This work was supported in part by COST Action FA0801 – LARVANET (Short Term Scientific Mission for R. V.), by the European Commission project SEACASE (N° 044483; FP6-2005-SSP5A) and by Portuguese FCT project SPECIAL_K (PTDC-MAR-105152-2008). JC was the recipient of FCT fellowship CCMAR/BI/0029/2009. RV was the recipient of INIA predoctoral fellowship (Spanish Ministry of Science and Education) and GD was the recipient of FCT fellowship CCMAR//BI/0030/2009. The authors would like to thank Anabela Bensimon-Brito for critical revision of the manuscript.

References

- Abe, T., 1952: Taxonomic studies on the puffers (Tetraodontidae, Teleostei) from Japan and adjacent regions – VII. Concluding remarks, with the introduction of two new genera, Fugu and Boesemanichthys. *Jpn. J. Ichthyol.* **2**, 35–44.
- Arratia, G.; Schultze, H.-P.; Casciotta, J., 2001: Vertebral column and associated elements in Dipnoans and comparison with other fishes: development and homology. *J. Morphol.* **250**, 101–172.
- Blanco-Vives, B.; Villamizar, N.; Ramos, J.; Bayarri, M. J.; Chereguini, O.; Sánchez-Vázquez, F. J., 2010: Effect of daily thermo- and photo-cycles of diferente light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* **306**, 137–145.
- Boeuf, G.; Le Bail, P.-Y., 1999: Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* **177**, 129–152.
- Boglione, C.; Gagliardi, F.; Scardi, M.; Cataudella, S., 2001: Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture* **192**, 1–22.
- Boglione, C.; Costa, C.; Di Dato, P.; Ferzini, G.; Scardi, M.; Cataudella, S., 2003: Skeletal quality assessment of reared and wild sharpnose sea bream and pandora juveniles. *Aquaculture* **227**, 373–394.
- Boglione, C.; Marino, G.; Giganti, M.; Longobardi, A.; De Marzi, P.; Cataudella, S., 2009: Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture* **291**, 48–60.
- Cahu, C.; Infante, J. Z.; Takeuchi, T., 2003: Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* **227**, 245–258.
- Cárdenas, S., 2011: 3 Cuadernos de acuicultura. Cultivo de corvina (*Argyrosomus regius*). Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, Spain.
- Divanach, P.; Papandroulakis, N.; Anastasiadis, P.; Koumoundouros, G.; Kentouri, M., 1997: Effect of water currents during postlarval and nursery phase on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder. *Aquaculture* **156**, 145–155.
- Dulčić, J.; Bratulović, V.; Glamuzina, B., 2009: The meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801), in Croatian waters (Neretva channel, Southern Adriatic): recovery of the population or an escape from mariculture? *Ann. Ser. Hist. Nat.* **19**, 155–158.
- Duncan, N.; Estevez, A.; Padros, F.; Aguilera, C.; Montero, F. E.; Norambuena, F.; Carazo, I.; Carbo, R.; Mylonas, C. C., 2008: Acclimation to captivity and GnRHa-induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). *Cybio* **32**, 332–333.
- Ekanayake, S.; Hall, B. K., 1988: Ultrastructure of the osteogenesis of acellular vertebral bone in the Japanese medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Am. J. Anat.* **182**, 241–249.
- Estévez, A.; Treviño, L.; Gisbert, E., 2007: La densidad larvaria inicial afecta al crecimiento pero no a la supervivencia de las larvas de corvina (*Argyrosomus regius*) en cultivo. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, Spain.
- Fahay, M. P., 2007: Early stages of fishes in the western north Atlantic ocean, II. Northwest Atlantic Fisheries Organization, Dartmouth, NS, Canada.
- Feltham, M. J.; Marquiss, M., 1989: The use of first vertebrae in separating, and estimating the size of, trout (*Salmo trutta*) and salmon (*Salmo salar*) in bone remains. *J. Zool.* **219**, 113–122.
- Fischer, W.; Schneider, M.; Bauchot, M.-L., 1987: Méditerranée et Mer Noire. Zone de pêche 37, révision 1. FAO, Rome, Italy.
- Fjellidal, P. G.; Nordgarden, U.; Berg, A.; Grotmol, S.; Totland, G. K.; Wargelius, A.; Hansen, T., 2005: Vertebrae of the trunk and tail display different growth rates in response to photoperiod in Atlantic salmon *Salmo salar* L., post-smolts. *Aquaculture* **250**, 516–524.
- Fleming, A.; Keynes, R. J.; Tannahill, D., 2001: The role of the notochord in vertebral column formation. *J. Anat.* **199**, 177–180.
- Fraser, T. H., 1971: The fish *Dinolestes lewini* with comments on its osteology and relationships. *Jpn. J. Ichthyol.* **18**, 157–163.
- Fraser, M. R.; Anderson, T. A.; de Nys, R., 2004: Ontogenic development of the spine and spinal deformities in larval barramundi (*Lates calcarifer*) culture. *Aquaculture* **242**, 697–711.
- García, A. M. A.; Moyano, P. D., 1990: Estados juveniles de la ictiofauna en los canos de las salinas de da Bahía de Cadiz. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cadiz, Spain.

- Georgakopoulou, E.; Katharios, P.; Divanach, P.; Koumoundouros, G., 2010: Effect of temperature on the development of skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, **308**, 13–19.
- Griffiths, M. H.; Heemstra, P. C., 1995: A contribution to the taxonomy of the marine fish genus *Argyrosomus* (Perciformes: Sciaenidae), with descriptions of two new species from Southern Africa. *Ichthyol. Bull., J.L.B. Smith Inst. Ichthyol.* **65**, 1–40.
- Grotmol, S.; Kryvi, H.; Nordvik, K.; Totland, G. K., 2003: Notochord segmentation may lay down the pathway for the development of the vertebral bodies in the Atlantic salmon. *Anat. Embryol.* **207**, 263–272.
- Grotmol, S.; Nordvik, K.; Kryvi, H.; Totland, G. K., 2005: A segmental pattern of alkaline phosphatase activity within the notochord coincides with the initial formation of the vertebral bodies. *J. Anat.* **206**, 427–436.
- Hart, P. R.; Hutchinson, W. G.; Purser, G. J., 1996: Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery-reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther, 1862). *Aquaculture*, **144**, 303–311.
- Hickey, C. R., 1972: Common abnormalities in fishes: their causes and effects. NY Ocean Science Laboratory, NY, USA.
- Inohaya, K.; Takano, Y.; Kudo, A., 2007: The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: in vivo visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish. *Dev. Dyn.* **236**, 3031–3046.
- Kacem, A.; Meunier, F. J.; Baglinière, J. L., 1998: A quantitative study of morphological and histological changes in the skeleton of *Salmo salar* during its anadromous migration. *J. Fish Biol.* **53**, 1096–1109.
- Koumoundouros, G., 2010: Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. In: Recent advances in aquaculture research, G. Koumoundouros (Ed.), Transworld Research Network, Kerala, India, 125–148.
- Koumoundouros, G.; Gagliardi, F.; Divanach, P.; Boglione, C.; Cataudella, S.; Kentouri, M., 1997a: Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* **149**, 215–226.
- Koumoundouros, G.; Oran, G.; Divanach, P.; Stefanakis, S.; Kentouri, M., 1997b: The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture* **156**, 165–177.
- Koumoundouros, G.; Divanach, P.; Kentouri, M., 1999: Osteological development of the vertebral column and of the complex in *Dentex dentex*. *J. Fish Biol.* **54**, 424–436.
- Koumoundouros, G.; Divanach, P.; Kentouri, M., 2001a: The effects of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). *Aquaculture* **200**, 285–304.
- Koumoundouros, G.; Maingot, E.; Divanach, P.; Kentouri, M., 2001b: Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture* **209**, 49–58.
- Lall, S. P.; Lewis-McCrea, L. M., 2007: Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish – an overview. *Aquaculture* **267**, 3–19.
- Le Vay, L.; Carvalho, G. R.; Quintio, E. T.; Lebata, J. H.; Ut, V. N.; Fushimi, H., 2007: Quality of hatchery-reared juveniles for marine fisheries stock enhancement. *Aquaculture* **268**, 169–180.
- Lewis, L. M.; Lall, S. P., 2006: Development of the axial skeleton and skeletal abnormalities of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) from first feeding through metamorphosis. *Aquaculture* **257**, 124–135.
- Matsuoka, M., 1985: Osteological development in the red sea bream, *Pagrus major*. *Jpn. J. Ichthyol.* **32**, 35–51.
- Matsuoka, M., 1987: Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in the red sea bream. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.* **65**, 1–114.
- Matsuoka, M., 1997: Osteological development in the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*. *Ichthyol. Res.* **44**, 275–295.
- Moustakas, C. T.; Watanabe, W. O.; Copeland, K. A., 2004: Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival, and osmoregulatory ability of larval flounder *Paralichthys lethostigma*. *Aquaculture* **229**, 159–179.
- Nagano, N.; Hozawa, A.; Fujiki, W.; Yamada, T.; Miyaki, K.; Sakakura, Y.; Hagiwara, A., 2007: Skeletal development and deformities in cultured larval and juvenile seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Aquac. Res.* **38**, 121–130.
- Nordvik, K.; Kryvi, H.; Totland, G. K.; Grotmol, S., 2005: The salmon vertebral body develops through mineralization of two preformed tissues that are encompassed by two layers of bone. *J. Anat.* **206**, 103–114.
- Roo, J.; Hernández-Cruz, C. M.; Borrero, C.; Schuchardt, D.; Fernández-Palacios, H., 2010: Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* **302**, 82–88.
- Rooker, J. R.; Holt, G. J.; Holt, S. A., 1997: Condition of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) from estuarine nursery habitats. *Mar. Biol.* **127**, 387–394.
- Sanger, T. J.; McCune, A. R., 2002: Comparative osteology of the *Danio* (Cyprinidae: Ostariophysii) axial skeleton with comments on *Danio* relationships based on molecules and morphology. *Zool. J. Linn. Soc.* **135**, 529–546.
- Schaeffer, B., 1967: Osteichthyan vertebrae. *J. Linn. Soc. Lond. Zool.* **47**, 185–195.
- Sfakianakis, D. G.; Koumoundouros, G.; Anezaki, L.; Divanach, P.; Kentouri, M., 2003: Development of a saddleback-like syndrome in reared white seabream *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **217**, 673–676.
- Sfakianakis, D. G.; Koumoundouros, G.; Divanach, P.; Kentouri, M., 2004: Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture* **232**, 407–424.
- Sfakianakis, D. G.; Doxa, C. K.; Kouttoui, S.; Koumoundouros, G.; Maingot, E.; Divanach, P.; Kentouri, M., 2005: Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *Aquaculture*, **250**, 36–46.
- Taniguchi, N., 1969: Comparative osteology of the Sciaenid fishes from Japan and its adjacent waters – II. *Vertebrae. Jpn. J. Ichthyol.* **16**, 153–156.
- Topp, R. W.; Cole, C. F., 1968: An osteological study of the Sciaenid genus, *Sciaenops* gill (Teleostei, Sciaenidae). *Bull. Mar. Sci.* **18**, 902–945.
- Villamizar, N.; Blanco-Vives, B.; Migaud, H.; Davie, A.; Carboni, S.; Sánchez-Vázquez, F. J., 2011: Effects of light during early development of some aquacultured teleosts: a review. *Aquaculture* **315**, 86–94.
- Walker, M. B.; Kimmel, C. B., 2007: A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech. Histochem.* **82**, 23–28.
- Wargelius, A.; Fjellidal, P. G.; Hansen, T., 2005: Heat shock during early somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev. Genes Evol.* **215**, 350–357.
- Whitehead, P. J. P.; Bauchot, M.-L.; Hureau, J.-C.; Nielsen, J.; Tortonese, E., 1986: Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean, Vol. II. UNESCO, Paris, France.
- Witten, P. E.; Obach, A.; Huyseune, A.; Baeverfjord, G., 2006: Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): development, aggravation and pathways of containment. *Aquaculture* **258**, 164–172.

Author's address: Paulo J. Gavaia, Centre of Marine Sciences, University of Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal.
E-mail: pgavaia@ualg.pt



Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*)

Roser Vallés*, Alicia Estévez

IRTA-Sant Carles de la Ràpita, Ctra. Poble Nou, Km 6, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2012

Received in revised form 24 September 2012

Accepted 10 November 2012

Available online 17 November 2012

Keywords:

Argyrosomus regius

Larval rearing

Light intensity

Photoperiod

ABSTRACT

Meagre is a new candidate for Mediterranean aquaculture due to its fast growth in sea cages and good quality. Two experiments were designed in order to study the effect of photoperiod and light intensity on larval survival and specific growth rate (SGR) for days 1–15 (SGR1-15) and days 16–30 (SGR16-30). Overall larval survival was unaffected by light intensity (50 to 1000 lux) with rearing in 16 h light and ranged from 10% to 15%. Under a light intensity of 500 lux, decreasing photoperiod length significantly improved survival, increasing from 6% with rearing in 24 h light to 48% with 8 h light. SGR1-15 was unaffected by any of the light intensity and photoperiod regimes that were tested. However, SGR16-30 was highest for a light intensity of 500 lux with 16 h and 24 h light when compared with 12 h and 8 h light. High light intensity and induced a deleterious effect on larvae increasing mortality either due to cannibalism or swim bladder over-inflation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Meagre (*Argyrosomus regius*) is considered a potential new species for diversification of Mediterranean aquaculture due to the fast growth of juveniles in sea cages (El-Shebly et al., 2007; Jiménez et al., 2005) and the quality of the fillet (Poli et al., 2003). Control of reproduction, cannibalism and low survival after weaning, and differences in the growth of the juveniles have been identified as the main bottlenecks for its commercial production. In captive conditions meagre spawning is achieved by the use of either injections or implants of GnRH α (Duncan et al., 2012). Understanding the physical and biological constraints acting on larvae is necessary in order to create protocols that maximise growth and survival under culture conditions. In the case of meagre only larval density and live prey feeding sequences have been reported (Estévez et al., 2007; Roo et al., 2010) whereas no information is available about the optimal light conditions. Light influences all life stages of marine fish, from embryo development to sexual maturation (Mangor-Jensen and Waiwood, 1995). Studies carried out on the light requirements of different marine species have shown that larval response to a particular characteristic of light is species specific. In general, it has been observed that an increase in day length improves the growth rates in Atlantic cod (Puvanendran and Brown, 2002), sea bream (Chatain and Ounais-Guschemann, 1991) and snapper (Fielder et al., 2002) whereas in European sea bass (Barahona-Fernandes, 1979; Ronzani-Cerqueira and Chatain, 1991) increase in day length has a negative effect on larval development. Vision, pineal gland

and deep brain photoreceptors play important roles during larval development (Villamizar et al., 2011), thus light is not only used for vision, foraging and feeding (Boeuf and Le Bail, 1999) but also to synchronise hatching in some species like Atlantic halibut (Helvik and Bernt, 1993) or for faster growth (Chatain and Ounais-Guschemann, 1991; Fielder et al., 2002; Kiyono and Hirano, 1981; Puvanendran and Brown, 2002), and the development of larval structures like fins and teeth or swim bladder (Villamizar et al., 2011).

Considering the lack of information about the lighting conditions needed during larval rearing of meagre, the main objective of this study was to establish the most appropriate light intensity and photoperiod for growth and survival of the larvae during the first 30 days of intensive culture.

2. Materials and methods

Fertilised eggs were obtained from a wild broodstock of *Argyrosomus regius* kept at IRTA Sant Carles de la Ràpita by a GnRH α injection (Duncan et al., 2012). Eggs were incubated in 35 L cylindro-conical tanks at 18 °C, 34‰ salinity and high aeration until larvae hatched 48 h later. Hatching day was taken as 0 dph (days post hatch) of the experiments. Larvae were counted volumetrically and moved to 500 L cylindro-conical black tanks at a density of 50 larvae L⁻¹. The tanks (triplicate tanks per treatment) were connected to an IRTAMAR® water recirculation unit. The system was housed in a constant environment room that maintained 19.0 ± 0.5 °C water temperature, 34.8 ± 0.1‰ salinity and 8.1 ± 0.1 pH. Water parameters (oxygen, temperature, salinity and flow rate) were checked and registered daily whereas nitrites and ammonia were recorded once a week (values always lower than 0.4 mg L⁻¹). Gas total pressure was measured periodically to check the efficiency of the degassing columns using a 300E™

* Corresponding author at: IRTA-Sant Carles de la Ràpita, Ctra. Poble Nou, Km 6, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain. Tel.: +34 977745427; fax: +34 977744138.
E-mail address: roser.valles@irta.cat (R. Vallés).

tensiometer (In-Situ Inc., USA), gas total pressure was always kept between 95 and 100%. From 2 to 15 dph larvae were fed enriched *Brachionus* sp. (Easy Selco, INVE, Belgium) twice per day to keep a density of 10 rotifers mL⁻¹ using green water technique (*Tetraselmis chuii*). Enriched *Artemia nauplii* were added from 14 to 30 dph in increasing amounts and doses to keep a density of 1 to 5 ind mL⁻¹ in the rearing water, depending on the growth of the larvae in order to supply the larvae with enough food and to avoid any food shortage that could induce cannibalism. Weaning with Gemma Micro 300 (Skretting, Norway) started at 20 dph, dry food was administered by hand. The tanks were aerated to ensure a homogenous distribution of prey. Surface skimmers were used from 5 dph, when the larvae started to inflate the swim bladder, until the end of the experiments to remove surface films.

The first experiment was carried out to study the effect of three light intensities 50, 500 and 1000 lux (or 0.63, 6.27 and 12.53 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively). Light was provided by two neutral light fluorescent lamps (Philips Master TL-D 58 W/840) placed at 1 m from the water surface of the tanks, each tank isolated from the others by black opaque curtain. Light intensity was regulated with a manual potentiometer connected to each fluorescent lamp (Philips LPS100) and measured at the water surface in the middle of the tank with a luxometer (Lutron LX-101 LUX METER). For all the intensities examined we used the same 16hL:8hD photoperiod.

The second experiment examined the effects of four photoperiod regimes 24hL:0hD, 16hL:8hD, 12hL:12hD and 8hL:16hD keeping the light intensity at 500 lux ($6.27 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at the water surface and using the same system (tank colour and volume, neutral light fluorescent lamps and black curtain) as in experiment 1. Light intensity and photoperiods were selected considering previous work carried out with a similar species *Argyrosomus japonicus* (Ballagh et al., 2008).

The experiments were carried out with two different spawnings from the same broodstock.

2.1. Sampling larvae

Ten larvae from each tank (30 per treatment) were arbitrarily chosen at 1, 5, 8, 12, 16, 20, 26, 30 dph in the light intensity experiment and at 1, 4, 7, 9, 12, 15, 20, 26, 30 dph in the photoperiod experiment, and anaesthetised with Tricaine methanesulfonate (MS-222). Standard length was measured using a digital camera connected to a dissecting microscope (Nikon SMZ800, Nikon, Tokyo, Japan) and an image analyser (ANALYSIS, SIS GmbH, Germany). Photographs were also used to estimate gut fullness (presence or absence of food in the gut in proportion to gut volume) following the index used by Puvanendran and Brown (2002) and to examine swim bladder inflation. The same larvae were used to estimate dry weight. After washing the larvae with distilled water they were placed in pre-weighed cover glass, dried in an oven at 60 °C for 24 h and weighed to the nearest 10 μg .

Specific growth rate (SGR) was calculated for 0–15 and 16–30 dph intervals using the following relationship: $\text{SGR} = ((\ln(Wt) - \ln(Wo))/t) \times 100$.

Where Wt is the mean final dry weight (mg), Wo is the mean initial dry weight (mg), and t is the time (days) (Buckley et al., 1987).

Survival was obtained at the end of the experiment by counting the remaining larvae.

2.2. Statistical analysis

All the data were analysed using Sigma Stat 3.1 statistical package (Systat Software Inc., USA). Statistical differences were analysed by one-way ANOVA or Student's t test ($P \leq 0.05$) followed by a pairwise comparison using Tukey's or Dunn's tests ($P \leq 0.05$). Percentage data were previously arcsin transformed.

3. Results

3.1. Experiment 1. Light intensity

Light intensity showed a clear effect on larval growth both at early (1 to 15 dph) and late larval stages (until 30 dph). Thus, larvae reared at 50 lux grew slowly during the rotifer feeding phase (from 28.5 μg at 5 dph to 37.1 μg at 12 dph), showing a significantly lower (ANOVA, $P = 0.026$) dry weight than the larvae reared at 500 or 1000 lux (see Fig. 1 inset graph). At later developmental stages larvae reared at 500 and 1000 lux showed higher dry weight than those reared at 50 lux, although at 50 lux larvae showed a clear increase in dry weight (from 37.5 μg at 16 dph to 130.4 μg at 30 dph) (Fig. 1). SGR was not different among the three groups during the rotifer feeding period, but was significantly higher for the larvae reared at 500 and 1000 lux at later developmental stages (Fig. 2). No significant differences ($P > 0.05$) could be found between larvae reared at 500 and 1000 lux although both the dry weight and SGR values were slightly higher for 500 lux reared larvae (SGR $9.39 \pm 1.62\%$ for 500 lux and $7.67 \pm 0.52\%$ for 1000 lux). Rotifer ingestion could not be evaluated because all the larvae showed empty guts due to the sampling time early in the morning when no food was still available. On the other hand, swim bladder inflation was faster in 50 and 500 lux groups in which more than 95% of the larvae showed a full inflated swim bladder by 8 dph. All the larvae showed total inflation at 16 dph in all three treatments (Fig. 3).

Survival was not affected by any of the intensities used and no significant differences could be found among the treatments (Table 1).

3.2. Experiment 2. Photoperiod

Photoperiod had a significant effect on length, dry weight, SGR, survival and gut fullness. Larval growth was only different at late developmental stages. Thus, during the rotifer feeding phase no significant differences could be found among the treatments in dry weight (Fig. 4, ANOVA, $P = 0.07$) or SGR (Fig. 5, ANOVA, $P = 0.33$). Larvae reared using 24hL:0hD or 16hL:8hD photoperiod were significantly larger and heavier than those reared using 12hL:12hD or 8hL:16hD (Table 1). Contrarily, larvae reared in 24 h photoperiod had significantly (ANOVA, $P < 0.001$, Table 1) higher mortality rates at the end of the experimental period than those reared using 16, 12 or 8 h light photoperiod. Decreasing day length improved survival as a result of a reduction in cannibalism and swim bladder hyperinflation, which in contrast, were commonly observed, although difficult to estimate by counting, in the continuous light and 16hL:8hD groups

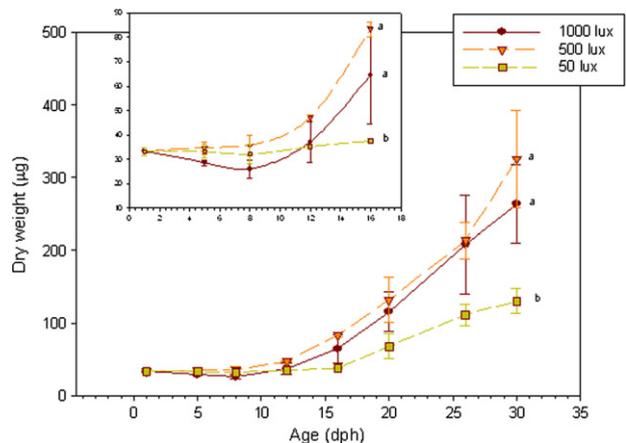


Fig. 1. Larval dry weight (μg , mean \pm SD) during the first 30 days of rearing using different light intensities. Inset graph shows in detail larval dry weight during the first 16 days of rearing. Letters indicate significant differences (ANOVA, $P = 0.026$ for 15 dph larvae and $P = 0.013$ for 30 dph larvae).

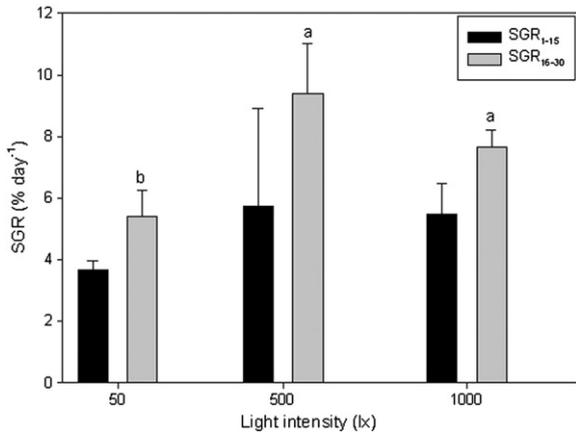


Fig. 2. Specific growth rate (mean ± SD) of larvae reared using different light intensities in the period 1 to 15 dph and 16 to 30 dph. Different letters indicate significant differences (ANOVA, $P=0.015$).

from 20 dph onwards (Fig. 6). Although we observed high variation in the ingestion of rotifers among replicates, larvae reared using short photoperiod showed significantly lower prey ingestion when compared to the continuous light group, where the fullness index was higher than 55% (Fig. 7).

4. Discussion

Under intensive larval rearing there is a tendency to extend daily light duration over that occurring in nature in order to get maximum food ingestion and growth. Thus, when developing protocols for rearing new larval species, producers tend to use high light intensities and long photoperiods without taking into account the conditions that the larvae encounter in the wild. In the case of meagre (*Argyrosomus regius*), the present study indicates that medium to high light intensities (500 to 1000 lux) and 12 to 16 hours of light are the most adequate to achieve good growth and survival, conditions that are quite similar to other temperate marine fish species like *Sparus aurata* (Tandler and Mason, 1983), *Pagrus auratus* (Fielder et al., 2002) or *Dentex dentex* (Giménez and Estévez, 2008). In the case of meagre, the use of low light intensity (50 lux) reduced foraging rate and growth of the larvae, especially during the first 15 days of rearing when only rotifers (a transparent prey) were used as live prey. Most of marine fish larvae at the start of exogenous feeding have a pure cone retina, thus larvae have reduced visual capacity at low light regimes (Peña et al., 2004) and cannot differentiate prey

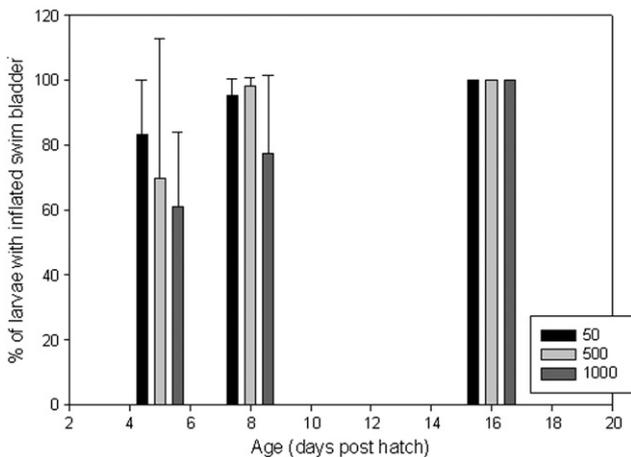


Fig. 3. Percentage (mean ± SD) of larvae with swim bladder totally inflated at 5, 8 and 16 dph reared at different light intensities.

Table 1

Standard length (SL, mm, mean ± SD), dry weight (DW, mg, mean ± SD) and survival (% mean ± SD) of 30 dph meagre larvae reared using different light intensities and photoperiods.

Photoperiod (h)	Light intensity (lux)	SL (mm)	DW (mg)	Survival (%)
16L:8D	50	4.69 ± 0.11 ^b	0.13 ± 0.01 ^b	9.59 ± 5.82
	500	5.66 ± 0.17 ^a	0.33 ± 0.07 ^a	17.88 ± 5.32
	1000	5.07 ± 0.42 ^a	0.21 ± 0.09 ^a	15.27 ± 10.10
24L:0D	500	9.41 ± 0.10 ^a	2.22 ± 0.34 ^a	6.18 ± 1.85 ^a
16 L:8D	500	8.45 ± 1.74 ^a	2.12 ± 1.35 ^a	13.79 ± 5.01 ^{ab}
12 L:12D	500	6.96 ± 0.15 ^b	0.80 ± 0.11 ^b	27.26 ± 0.01 ^b
8 L:16D	500	6.53 ± 0.79 ^b	0.63 ± 0.17 ^b	47.74 ± 14.46 ^c

^aSuperscripts indicate significant differences ($P \leq 0.05$) among the treatments.

clearly. Rotifers and *Artemia* nauplii differ in size, swimming activity and transparency and these features had a clear influence on the detection by the larvae. Thus, larvae reared at 50 lux showed higher growth rate when nauplii were used from 15 dph onwards, although without reaching the growth of larvae reared at higher light intensities that seemed to be able to detect and feed better on rotifers. In high latitude species such as cod (*Gadus morhua*), light intensity has a positive significant effect on larval survival, as larvae reared at 2400 lux showed higher survival rates than those reared at 300 lux (Puvanendran and Brown, 2002). Under high light intensities, larval activity and swimming speed increased, resulting in the expansion of the foraging area which beneficiates feeding activity and as a consequence, growth and survival (Batty, 1987). However, for other species such as sea bass (*Dicentrarchus labrax*) light intensity has a positive effect on growth but negative on survival (Barahona-Fernandes, 1979). In the case of meagre, light intensity did not have a significant effect on survival, which agrees with the results of a previous work on *Argyrosomus japonicus*, as intensities of 10 and 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ did not affect survival or growth (Ballagh et al., 2008).

The highest growth of meagre larvae was obtained at 16 and 24 h photoperiods using a mid-light intensity (500 lux) although it was accompanied by the lowest survival rates. Larvae reared using these long photoperiods showed a higher feeding incidence than those reared with 12 or 8 h photoperiods. Long photoperiods could have produced an increase in larval activity, high encounter rate between larvae and prey and consequently higher prey consumption and larval growth. However, these long photoperiods could have also induced stress symptoms in the larvae as a consequence of swim bladder syndrome (Kiyono and Hirano, 1981; Ronzani-Cerqueira and Chatain, 1991) or an increase in the incidence of cannibalism (Baras et al., 2000). Meagre and sea bass larvae seem

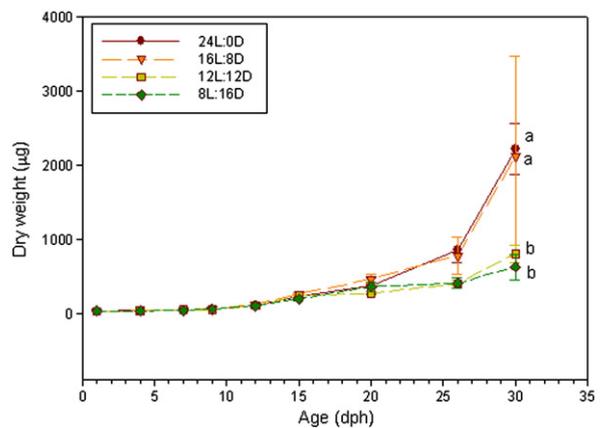


Fig. 4. Larval growth in dry weight (mean ± SD) during the first 30 days of rearing using different photoperiods. Letters indicate significant differences (ANOVA, $P=0.013$ for 25 dph larvae and $P=0.044$ for 30 dph larvae).

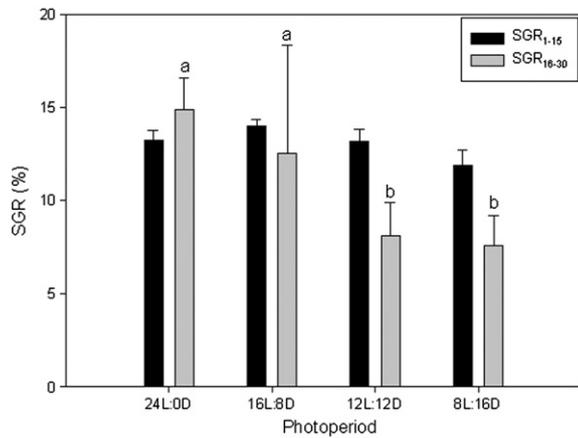


Fig. 5. Specific growth rate of larvae reared using different photoperiods from 1 to 15 and 16 to 30 dph. Results are given as mean \pm SD. Different letters indicate significant differences (ANOVA, $P=0.049$).

to grow better at long photoperiods, which might resemble the natural photoperiod that the larvae encounter when they start exogenous feeding. Meagre and sea bass larvae as well as sea bream larvae (Baras et al., 2000) are “destructive cannibals” (Brown et al., 2003) as they attack in groups and feed on portions of the weaker or smaller larvae. Cannibalism has also been reported in *A. hololepidotus* by Battaglione and Talbot (1994) and in *A. japonicus* by Ballagh et al. (2008) and can be reduced by keeping the larvae fed to satiation either by increasing the feeding frequency or its density or by reducing the number of hours of light considering that vision play an important role in cannibalistic capture (Ballagh et al., 2008).

Another cause of high mortality was swim bladder over-inflation (hypertrophy) usually caused by gas supersaturation or stress. Considering that in the present study all the tanks were provided with degassing columns in the water inlet and total gas pressure measured periodically, over-inflation of the swim bladder can only be a consequence of a light-derived stress. Similar light-derived stress have been found in sea bass cultured under long photoperiods (Villamizar et al., 2011) whereas Roo et al. (2010) found over-inflation in meagre when *Artemia* metanauplii were introduced at early stages. Shields et al. (2003) and Grotmol et al. (2005) observed that cod larvae seem to be vulnerable to over-inflation under intensive culture conditions. In all the cases cited, a particular stressful condition (long photoperiod, introduction of prey too early during larval rearing, intensive culture and high larval density) induced the larvae to gulp too much air in the water surface inducing the hypertrophy of the swim bladder. In all the previously mentioned cases, larvae were observed floating at the water surface and dying



Fig. 6. Twenty-six dph meagre larvae showing normally inflated (grey arrow) and over-inflated (black arrow) swim bladder.

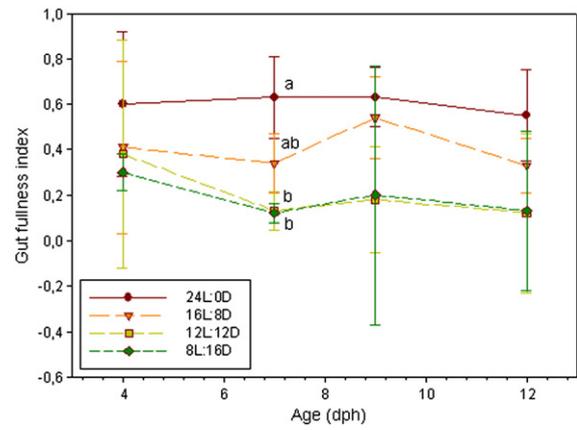


Fig. 7. Mean (\pm SD) gut fullness index of meagre larvae reared at different photoperiod. $N=12$ larvae per sample per treatment. Letters indicate significant differences (ANOVA, $P=0.002$).

within days as a consequence of impeded swimming and low feeding behaviour.

In summary, early larval meagre require adequate light intensity and photoperiod for successful swim bladder inflation, growth and survival. According to the results of the present experiments we suggest in the case of rotifer feeding larvae (1 to 15 dph), mid (500 lux) to high (1000 lux) intensities and long photoperiods (16 to 24 h light) as the most adequate for growth and survival. The light regime then can be fixed to a 16 h light to maximise feeding time and growth rates and to avoid swim bladder over-inflation and cannibalism, and consequently improve survival rates, especially considering that larvae at 16 dph and feeding on *Artemia* nauplii have more developed retina and are more effective hunters with a swim-bladder totally formed. Further investigations into the exact photoperiod regime need to be completed to gain a better understanding of meagre larval feeding behaviour.

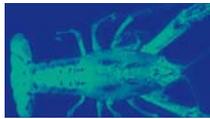
Acknowledgments

RV acknowledges the funding provided by the Spanish Ministry of Science and Education (INIA predoctoral fellowship). We would like to thank O. Bellot, N. Gras, M. Sastre, S. Molas, M. Matas and J. Canoura (IRTA Sant Carles de la Ràpita) for their help in larval rearing and sampling. The study was funded by INIA-FEDER project RTA2008-00107-00-00.

References

- Ballagh, D.A., Pankhurst, P.M., Fielder, D.S., 2008. Photoperiod and feeding interval requirements of juvenile mulloway, *Argyrosomus japonicus*. *Aquaculture* 277, 52–57.
- Barahona-Fernandes, M.H., 1979. Some effects of light intensity and photoperiod on the sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) reared at the Centre Océanologique de Bretagne. *Aquaculture* 17, 311–321.
- Baras, E., Maxi, M.Y.J., Ndao, M., Méléard, C., 2000. Sibling cannibalism in dorada under experimental conditions. II. Effect of initial size heterogeneity, diet and light regime on early cannibalism. *Journal of Fish Biology* 57, 1021–1036.
- Battaglione, S.C., Talbot, R.B., 1994. Hormone induction and larval rearing of mulloway, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces: Scianidae). *Aquaculture* 126, 73–81.
- Batty, R.S., 1987. Effect of light intensity on activity and food-searching of larval herring, *Clupea harengus*, a laboratory study. *Marine Biology* 94, 323–327.
- Boeuf, G., Le Bail, P., 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177, 129–152.
- Brown, J.A., Minkoff, G., Puvanendran, V., 2003. Larviculture of Atlantic cod (*Gadus morhua*): progress, protocols and problems. *Aquaculture* 227, 357–372.
- Buckley, L.J., Halavik, T.A., Smigielski, A.S., Laurence, G.C., 1987. Growth and survival of the larvae of three species of temperate marine fishes reared at discrete prey densities. In: Hoyt, R.D. (Ed.), 10th Annual Larval Fish Conference American Fisheries Society Symposium 2, 82–92 (Bethesda, USA).
- Chatain, B., Ounais-Guschemann, N., 1991. The Relationships Between Light and Larvae of *Sparus aurata*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi '91: Special Publ. Eur. Aquacult. Soc.*, 15, pp. 310–313.

- Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Vallés, R., Mylonas, C.C., 2012. Reproductive development, GnRH α -induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1273–1286.
- El-Shebly, A.A., El-Kady, M.A.H., Hussin, A.B., Hossain, M.Y., 2007. Preliminary observations on the pond culture of meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Sciaenidae) in Egypt. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 2 (5), 345–352.
- Estévez, A., Treviño, L., Gisbert, E., 2007. La densidad larvaria inicial afecta al crecimiento pero no a la supervivencia de las larvas de corvina (*Argyrosomus regius*) en cultivo. Paper presented at the XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, España, 24–28 September 2007.
- Fielder, D.S., Bardsley, W.J., Allan, G.L., Pankhurst, P.M., 2002. Effect of photoperiod on growth and survival of snapper *Pagrus auratus* larvae. *Aquaculture* 211, 135–150.
- Giménez, G., Estévez, A., 2008. Effect of larval and prey density, prey dose and light conditions on first feeding common dentex (*Dentex dentex* L.) larvae. *Aquaculture Research* 39, 77–84.
- Grotmol, S., Krivy, H., Totland, G.K., 2005. Deformation of notochord by pressure from the swim bladder may cause malformation of the vertebral column in cultured Atlantic cod *Gadus morhua* larvae: a case study. *Diseases of Aquatic Organisms* 65, 121–128.
- Helvik, J.V., Bernt, T.W., 1993. Development of hatchability in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) embryos. *International Journal of Developmental Biology* 37, 487–490.
- Jiménez, M.T., Pastro, E., Grau, A., Alconchel, J.I., Cárdenas, S., 2005. Revisión sobre el cultivo de esciéndidos en el mundo y presentación del Plan Nacional de Cría de corvina (*Argyrosomus regius*). Paper presented at X Congreso Nacional de Acuicultura. Valencia, España, 17–21 October 2005.
- Kiyono, M., Hirano, R., 1981. Effects of light on feeding and growth of Black porgy, *Mylio macrocephalus* (Basilewsky), postlarvae and juveniles. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions, Conseil International Pour L'exploration de la Mer* 178, 334–336.
- Mangor-Jensen, A., Waiwood, K.G., 1995. The effect of light exposure on buoyancy of halibut eggs. *Journal of Fish Biology* 47, 18–25.
- Peña, R., Dumas, S., Saldívar-Lucio, R., García, G., Trasviña, A., Hernández-Ceballos, D., 2004. The effect of light intensity on first feeding of the spotted sand bass *Paralabrax maculofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquaculture Research* 35, 345–359.
- Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., Lupi, P., Bonelli, A., 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International* 11, 301–311.
- Puvanendran, V., Brown, J., 2002. Foraging, growth and survival of Atlantic cod larvae reared in different light intensities and photoperiods. *Aquaculture* 214, 131–151.
- Ronzani-Cerqueira, V., Chatain, B., 1991. Photoperiodic effects on the growth and feeding rhythm of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae in intensive rearing. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi '91: Special Publ. Eur. Aquacult. Soc.*, 15, pp. 304–306.
- Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D., Fernández-Palacios, H., 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82–88.
- Shields, R.J., Irwin, S., Smith, P.L., McEvoy, L.A., 2003. Effects of diet transition regimen on survival, growth and lipid composition of intensively reared Atlantic cod, *Gadus morhua*, larvae. *Aquaculture International* 11, 119–130.
- Tandler, A., Mason, C., 1983. Light and food density effects on growth and survival of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus, Sparidae). *World Mariculture Society, Special Publication* 3, 103–116.
- Villamizar, N., Blanco-Vives, B., Migaud, H., Davie, A., Carboni, S., Sánchez-Bázquez, F.J., 2011. Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: a review. *Aquaculture* 315, 86–94.



Use of Ox-Aquaculture[®] for disinfection of live prey and meagre larvae, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801)

Roser Vallés¹, Ana Roque¹, Ana Caballero² & Alicia Estévez¹

¹IRTA – Sant Carles de la Ràpita, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

²Grupo Ox. Edificio Ox, Parque Tecnológico Walqa, Cuarte, Huesca, Spain

Correspondence: R Vallés, IRTA-Sant Carles de la Ràpita, Ctra. Poble Nou, Km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain. E-mail: roser.valles@irta.cat

Abstract

Live prey used for marine larval fish (rotifers and *Artemia*) as well as intensive larval rearing conditions are susceptible to the proliferation of bacteria that are the cause for reduced growth and larval mortality. Hydrogen peroxide has been recently proved a good disinfectant in aquaculture, either for eggs, larvae or live prey. In this study the effects of a hydrogen peroxide-based product, Ox-Aquaculture[®], on live prey (rotifers and *Artemia*) and meagre larvae bacterial load, composition and final status have been tested. A 34.6% reduction of total heterotrophic bacteria and 59.7% of *Vibrionaceae* were obtained when rotifers were exposed for 15 min to 40 mg L⁻¹ of the product. A 34.3% reduction of total heterotrophic bacteria and 37.7% of *Vibrionaceae* were obtained when *Artemia* were exposed for 5 min to 8000 mg L⁻¹ of the product. More than 95% reduction of total heterotrophic bacteria and 75% of *Vibrionaceae* were obtained when meagre larvae were exposed for 1 h to 20 mg L⁻¹ of the product. Furthermore, disinfection of enriched live prey with the product did not change the fatty acid composition and survival of the live prey and improved final larval survival.

Keywords: hydrogen peroxide, bacterial load, live prey, larval rearing, *Argyrosomus regius*

Introduction

Intensive fish larvae production is highly susceptible to the proliferation of bacteria, which may cause poor growth or mass mortality of the larvae. In most cases, mortality cannot be attributed to

specific pathogens, but to the proliferation of opportunistic bacteria (Olafsen 2001). The rearing environment, with high larval densities and high load of organic matter is highly susceptible to bacterial growth. Fish larvae at hatching are commonly colonized by very few bacteria, which may originate from the egg surface, or from the surrounding water. As soon as fish larvae start to capture and ingest live prey, the numbers of bacteria in the larvae increase exponentially. These bacteria are located mainly in the larval gut, being *Vibrio* species the main component of the gut microbiota mainly derived from bacteria associated with live prey (Skjermo & Vadstein 1993; Verschuere, Dhont, Sorgeloos & Verstraete 1997).

Live prey (rotifers and *Artemia*) carry a large diversity of associated microbiota that, although they are not pathogenic to live prey, can be transferred to their larval predators causing detrimental effects (Dhert, Rombaut, Suantika & Sorgeloos 2001; Giménez, Padrós, Roque, Estévez & Furones 2006). The dominant bacterial groups in rotifers are *Pseudomonas*, *Vibrio* and *Aeromonas* that account for 10⁷ CFU mL⁻¹ in the rearing water or 10⁴–10⁵ CFU rotifer⁻¹ (Nicolas, Robic & Ansquer 1989) with similar levels of bacteria in the case of *Artemia* (Austin & Allen 1981). Most of bacterial strains associated with rotifers are located on the external surface (Munro, Henderson, Barbour & Birkbeck 1999), thus several studies have been conducted to reduce the bacterial load in rotifers and *Artemia* prior to feeding the fish larvae, by the use of freshwater baths (Rodríguez, Planas & Otero 1991), antibiotics (Haamed & Balasubramanian 2000), chemical products (Gomez-Gil, Abreu-Grobois, Romero-Jarero & Herrera-Vega 1994; Martinez-Diaz, Álvarez-González, Moreno Legorreta,

Vázquez-Juárez & Barrios González 2003; Giménez *et al.* 2006), ultraviolet (UV) radiation (Munro *et al.* 1999) and ozone-treated seawater (Davis & Arnold 1997). However, the use of antibiotics to reduce the bacterial flora in live prey causes several secondary effects (interaction with gut microflora of the larvae, increase in strain resistance) and adverse environmental impacts (Minkoff & Broadhurst 1994) whereas the use of chemical products, such as formaldehyde, can cause the formation of by-products or toxic compounds (Haamed & Balasubramanian 2000).

Hydrogen peroxide is a natural metabolite produced by the oxidative metabolism of the cells, being easily degraded by chemical reaction and enzymatic decomposition into water and oxygen in the presence of organic matter (algae, zooplankton and heterotrophic bacteria), light and turbulence. Hydrogen peroxide has been shown to be very effective in the disinfection of live prey (Gomez-Gil *et al.* 1994; Martinez-Diaz *et al.* 2003; Giménez *et al.* 2006) and fish (Lumsden, Ostland & Ferguson 1998; Rach, Gaikowski, Howe & Schreier 1998; Derksen, Ostland & Ferguson 1999; Gaikowski, Rach & Ramsay 1999; Thomas-Jinu & Goodwin 2004; Avedaño-Herrera, Magariños, Irgang & Toranzo 2006; Giménez, Padrós, Roque, Estévez & Furones 2009). It is considered a low risk product by US Food and Drug Administration and it is commonly used for the control of mortalities associated with external fungal infections in freshwater fish (Rach, Schreier, Schleis & Gaikowski 2005) and their eggs, for the control mortalities associated with bacterial gill disease on freshwater salmonids, and for the control of mortalities associated with external columnaris disease in freshwater-reared coldwater finfish and channel catfish (Schmidt, Gaikowski & Gingerich 2006). In the case of salmon it is commonly used for the treatment of sea lice in Canada, Scotland, Ireland, Norway and Chile (Bruno & Raynard 1994).

The aim of this study was to test the disinfection capacity of Ox-Aquaculture[®], a commercial hydrogen peroxide-derived product (50% peroxide concentration), both in live prey, *Brachionus sp.* and *Artemia franciscana*, and in meagre larvae, to study its efficacy as a bacterial disinfectant and to evaluate its effects on live prey composition, and on larval growth and survival. Meagre was selected for the study not only because it is considered a new species for aquaculture diversification in Europe but also because it is prone to mortalities derived

from stress conditions (inappropriate light and feeding as well as handling).

Material and methods

Experimental design

Fertilized eggs were obtained by GnRH α induced spawning from a wild broodstock of *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) kept at the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA) at Sant Carles de la Ràpita (Duncan, Estévez, Porta, Carazo, Norambuena, Aguilera, Gairin, Bucci, Vallés & Mylonas 2012). Eggs were incubated in 35 L PVC cylinders (baskets) with air-lifts to provide enough water removal and aeration, which were immersed in a 2000 L holding tank at 18°C until larvae hatched 48 h later. Larvae were counted volumetrically and transferred to 100 L tanks, at a density of 50 larvae L⁻¹ and kept under recirculation at 18 ± 1°C with a photoperiod of 16 hL:8 hD. *Tetraselmis chuii* was added to the rearing water before larvae were stocked. From 2 to 15 days post hatching (dph) larvae were fed 10 individuals mL⁻¹ of enriched *Brachionus sp.* (2 h, 26°C UV seawater, 250 ind mL⁻¹, 0.15 g L⁻¹ Easy Selco, INVE, Belgium). Enriched (18 h, 28°C UV seawater, 300 ind mL⁻¹, 0.6 g L⁻¹ Easy Selco) *Artemia metanauplii* were added from 14 to 25 dph (1 ind mL⁻¹).

Four treatments with four replicates each were used for the study. In treatment A (control) no disinfection of prey or larvae was used, in treatment B only larvae were disinfected, in treatment C only live preys were disinfected and in treatment D both larvae and live prey were disinfected.

Disinfection procedures

Meagre larvae were disinfected in the rearing tank at 1 and 13 dph using 20 mg L⁻¹ of Ox-Aquaculture[®] for 1 h (Giménez *et al.* 2009). Rotifers were enriched, harvested, rinsed and disinfected using 40 mg L⁻¹ Ox-Aquaculture[®] dissolved in UV treated seawater for 15 min. A similar procedure was used for *Artemia*, thus after enrichment, harvested and rinsed, they were disinfected using 8000 mg L⁻¹ of Ox-Aquaculture[®] dissolved in UV treated seawater for 5 min. These conditions for live prey disinfection gave the best results in terms of live prey survival and bacterial reduction in a previous study by Giménez *et al.* (2006).

Data collection

Larvae were sampled ($N = 10$) at 1, 3, 6, 13, 16, 20 and 25 dph to measure standard length and dry weight. Larvae were anaesthetized with Tricaine methanesulfonate (MS-222) before measuring the standard length (SL) using a dissecting microscope (Nikon SMZ800, Nikon, Tokyo, Japan) connected to a digital camera (Olympus DP25) and an image analyser (Olympus analysis, Hamburg, Germany). The same larvae were collected in a 150 μm mesh sieve, rinsed with distilled water, dried in an oven at 60°C for 24 h and weighed to obtain the dry weight (DW). Survival was obtained at the end of experiment by counting the remaining larvae.

Larvae were sampled at 1 and 13 dph whereas enriched rotifers and *Artemia* metanauplii were sampled at several times during larval rearing process for bacterial identification and counting. All the samples were collected before and after exposure to the product to estimate the effect of the hydrogen peroxide in the reduction of bacterial load in the live preys and larvae. For bacterial load determination 10 larvae, 50 000 rotifers and 10 000 *Artemia* metanauplii were harvested, filtered and homogenized in sterile manual homogenizer with 5 mL sterile saline solution. Sequential dilutions of 1 mL of homogenized sample in 10 mL of sterile saline solution were done, and 100 μL of each dilution tube were plated in tryptic soy agar (TSA) and thiosulphate citrate bile salt (TCBS) media in triplicates. After 24 h incubation at room temperature bacterial colonies were estimated by direct counting (colony forming units, CFU).

To check the effect of hydrogen peroxide on the fatty acid composition of the live prey, samples of rotifers before and after disinfection were taken and analysed in duplicates as in Giménez *et al.* (2006).

The survival of live preys (rotifer and *Artemia*) after disinfection was estimated by direct counting of three subsamples of 1 mL.

Statistical analysis

All the data were analysed using SigmaStat 3.1 statistical package (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Statistical differences were analysed by one-way ANOVA ($P < 0.05$) followed by a pairwise comparison using Tukey's or Dunn's tests.

Results

Larval growth in standard length (SL) and dry weight (DW) is shown in table 1. Larvae from treatments A and D showed the highest and lowest growth in length and weight, respectively, with treatments B and C having intermediate results. At the end of the study, treatments D (live prey and larvae disinfected) and B (only larvae disinfected) had the highest survival rate ($36.0 \pm 10.6\%$ and $28.0 \pm 2.9\%$ respectively) whereas treatment A (control) had the lowest ($14.7 \pm 9.0\%$).

The results in total heterotrophic bacteria and *Vibrionaceae* found in 1 and 13 dph meagre larvae before and after disinfection with hydrogen peroxide are presented in figure 1. Before disinfection, total heterotrophic bacteria in 1 dph larvae were $2.71 \pm 2.79 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ and in 13 dph larvae were $8.34 \pm 4.51 \times 10^5$ CFU ind⁻¹ and $5.09 \pm 1.35 \times 10^5$ CFU ind⁻¹ in treatments B and D respectively. After exposure to Ox-Aquaculture[®], total heterotrophic bacteria in 1 dph were reduced to $1.90 \pm 1.13 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ and in 13 dph larvae were significantly reduced to $3.59 \pm 2.16 \times 10^4$ CFU ind⁻¹ and $2.18 \pm 0.77 \times 10^4$ CFU ind⁻¹ in treatments B and D respectively ($P < 0.05$). Before disinfection, *Vibrionaceae* accounted for $3.89 \pm 2.68 \times 10^1$ CFU ind⁻¹ in 1 dph larvae and $3.25 \pm 0.12 \times 10^3$ CFU ind⁻¹ and $6.25 \pm 1.77 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ in 13 dph larvae from treatments B and D. After disinfection, only in treatment B, *Vibrionaceae* were significantly reduced to $7.72 \pm 7.00 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ ($P = 0.018$), whereas in 1 dph larvae and 13 dph larvae of treatment D the reduction of *Vibrionaceae* (0 and $1.00 \pm 0.71 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ respectively) were not statistically significant ($P = 0.066$ and $P = 0.060$ respectively).

The results in total heterotrophic bacteria and *Vibrionaceae* counts (CFU ind⁻¹) in rotifer before and after the treatment with the product were found in figure 2. Before disinfection, total heterotrophic

Table 1 Standard length (SL, mean \pm SD), dry weight (DW, mean \pm SD) and survival (mean \pm SD) rate of 30 dph meagre larvae. Superscripts indicate significant differences ($P \leq 0.05$) among the treatments

Treatment	DW (mg)	SL (mm)	Survival (%)
A	0.53 ± 0.25^a	5.83 ± 0.47^a	14.67 ± 9.02^a
B	0.39 ± 0.09^{ab}	5.45 ± 0.20^{ab}	28.00 ± 2.94^b
C	0.40 ± 0.05^{ab}	5.60 ± 0.13^{ab}	25.67 ± 4.99^{ab}
D	0.32 ± 0.05^b	5.35 ± 0.23^b	36.00 ± 10.61^b

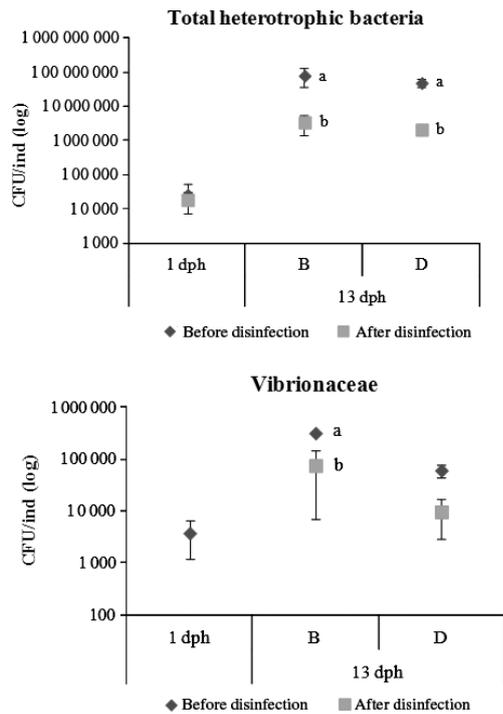


Figure 1 Bacterial load (CFU ind⁻¹) in meagre larvae (1 and 13 dph) before and after disinfection with H₂O₂ in treatment B and D. Results are given as mean ± SD. Superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$) between before and after disinfection.

bacteria in rotifers were $5.47 \pm 0.38 \times 10^3$ CFU ind⁻¹ being significantly reduced to $3.58 \pm 0.32 \times 10^3$ CFU ind⁻¹ after exposure to Ox-Aquaculture[®] ($P = 0.003$). *Vibrionaceae* were also significantly reduced after disinfection with Ox-Aquaculture, from $8.91 \pm 1.47 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ to $3.59 \pm 1.63 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ ($P = 0.014$).

No differences in total lipid and fatty acid content as well as in the fatty acid relative composition (Table 2) were observed between before and after disinfection of rotifers. The survival of rotifers after disinfection was $77.5 \pm 8.1\%$ along the experiment.

Figure 3 shows total heterotrophic bacteria and *Vibrionaceae* counts (CFU ind⁻¹) in *Artemia* metanauplii before and after the treatment with the product. A significant reduction in total heterotrophic bacteria from $1.38 \pm 0.20 \times 10^3$ to $9.07 \pm 1.02 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ was observed ($P = 0.022$). The same can be said in the case of *Vibrionaceae* that were significantly reduced from $8.40 \pm 0.30 \times 10^2$ to $5.23 \pm 0.41 \times 10^2$ CFU ind⁻¹ ($P = 0.000$). The survival of *Artemia* after

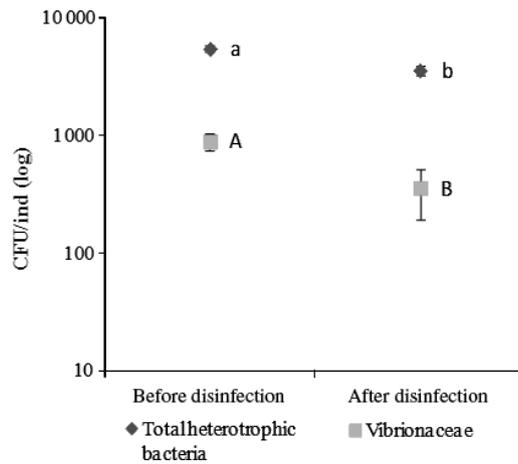


Figure 2 Bacterial load (CFU ind⁻¹) in rotifer before and after disinfection with H₂O₂. Results are given as mean ± SD of three replicates. a and b superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$) found in total heterotrophic bacteria whereas A and B superscripts are used for *Vibrionaceae*.

Table 2 Total lipid content (mg g⁻¹ DW) and fatty acid composition (%) of rotifer enriched disinfected and non-disinfected with hydrogen peroxide

	Disinfected	Non disinfected
Total lipids (mg g ⁻¹ DW)	72.7	80.1
Total fatty acid (mg g ⁻¹ lipid)	487.5	422.3
16:0	9.34	10.74
18:0	4.33	4.98
Total saturated	17.64	19.62
16:1n-7	14.04	14.81
18:1n-9	22.99	24.06
Total monounsaturated	46.95	48.22
18:2n-6	9.42	9.80
20:4n-6	1.30	1.49
Total n-6 PUFA	13.27	14.13
18:3n-3	3.44	3.02
20:5n-3	5.68	5.84
22:5n-3	2.12	1.67
22:6n-3	4.70	4.82
Total n-3 PUFA	20.65	16.65

disinfection was $95.6 \pm 6.7\%$ along the experiment.

Discussion

Treatments B and D had higher survival rates than those from control group (A) indicating the positive effect of Ox-Aquaculture[®] added to the rearing water at precise periods of larval development.

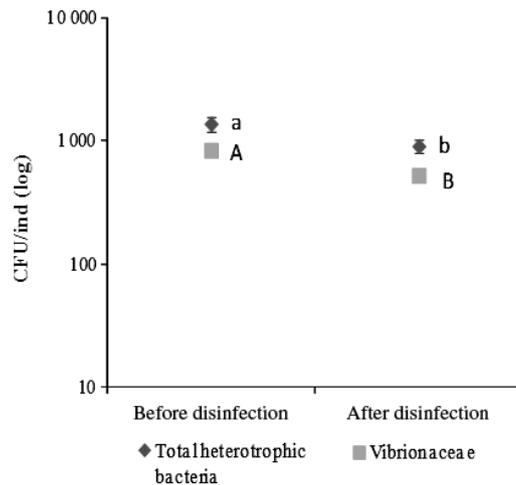


Figure 3 Bacterial load (CFU ind⁻¹) in *Artemia* before and after disinfection with H₂O₂. Results are given as mean ± SD of three replicates. a and b superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$) found in total heterotrophic bacteria whereas A and B superscripts are used for *Vibrionaceae*.

Higher survival was also obtained by Giménez *et al.* (2009) in a previous experiment using this same product for disinfection of sea bream and common dentex although at different concentrations. A reduction in larval bacterial load (total heterotrophic and *Vibrionaceae*) was recorded in both groups of larvae after treatment with the product. Not only the bacterial load in the water (Giménez *et al.* 2009) but also in the larval body (this experiment) showed a clear reduction in number after the treatment. In the case of group D both live prey and larvae were disinfected contributing to these better values of survival. Disinfecting only the live prey had no significant effects on larval survival being the results of group C not significantly different to those from control group (A). Nicolas *et al.* (1989) observed that larval feeding behaviour changes depending on the bacterial concentration of the live prey, as turbot larvae refused to ingest prey which contained a high number of bacteria. Munro, Barbour and Birkbeck (1994) also observed that only the slow colonization rate of the larval gut by bacteria correlates well with larval survival. Thus, rapid bacterial colonization of the gut in early larvae is deleterious due to the presence of fast-growing colonizers (Vadstein, Oie, Olsen, Salvesen & Skjermo 1993) and the only way to reduce colonization rate is rotifer disinfection, especially considering

that most of the bacteria associated to rotifers are found in the body surface. This might explain why meagre larvae of group D treated, as well as their live food, with hydrogen peroxide experienced a higher survival rate than the rest of the groups.

When meagre larvae were disinfected with Ox-Aquaculture[®] at 13 dph total heterotrophic bacteria were significantly reduced. *Vibrionaceae* were present in low amounts in the larvae, and after disinfection a reduction was observed although only in treatment B was statistically significant. Although hydrogen peroxide is a natural metabolite, Gaikowski *et al.* (1999) observed a reduction in the survival rate depending on the lifestage of different cold-, cool- and warmwater fish. The optimum concentration of hydrogen peroxide depends on the species, thus, the survival of *Sparus aurata* and *Dentex dentex* larvae decreased if concentrations higher than 50 mg L⁻¹ and 20 mg L⁻¹ were used respectively (Giménez *et al.* 2009). In the case of *Ictalurus punctatus*, the on-growing fish cannot tolerate concentrations greater than 75 mg L⁻¹ (Thomas-Jinu & Goodwin 2004), whereas *Scophthalmus maximus* had respiratory distress when 8–10 g fish were treated with 30 mg L⁻¹ of H₂O₂ (Avedaño-Herrera *et al.* 2006). Finally, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to H₂O₂ concentrations greater than 100 mg L⁻¹ had an increased ventilatory rate and appeared agitated (Derksen *et al.* 1999).

Total heterotrophic bacteria and *Vibrionaceae* were significantly reduced in rotifers treated with Ox-Aquaculture[®]. Giménez *et al.* (2006) and Munro *et al.* (1999) obtained a reduction in total bacterial counts in rotifer treated with this same product (hydrogen peroxide) or after 2 min exposure to UV radiation respectively. Other strategies such as the use of disinfected rotifer eggs for the production of axenic cultures (Dhert *et al.* 2001) have also been applied, although the easiest solution to solve the problem of bacterial colonization of live prey is the use of antibiotics (Perez Benavente & Gatesoupe 1988). However, the use of antibiotics induces the development of resistances (Dhert *et al.* 2001), which can be transferred to other bacteria, including pathogenic bacteria to fish, or adverse environmental impacts (Minkoff & Broadhurst 1994). Therefore, the use of antibiotics should be kept to a minimum.

The reduction in the bacterial load in *Artemia* metanauplii obtained in this experiment was

similar to the results found by Haamed and Balasubramanian (2000) and Giménez *et al.* (2006). Different techniques have been used to reduce numbers of associated bacteria in *Artemia*, i.e. incubation with *Tetraselmis* (Olsen, Olsen, Attramadal, Christie, Birkbeck, Skjeremo & Vadstein 2000) a microalgae well known for producing antibacterial substances, the use of freshwater baths after harvesting the nauplii (Rodríguez *et al.* 1991), UV treatment of incubation water (Munro *et al.* 1999) and the use of antibiotics or chemical disinfectants (Gomez-Gil *et al.* 1994; Haamed & Balasubramanian 2000; Giménez *et al.* 2006). Gomez-Gil *et al.* (1994) preferred sodium hypochlorite as an agent of disinfection while Haamed and Balasubramanian (2000) recommended the use of formaldehyde. None of them recommended the use of antibiotics as Haamed and Balasubramanian (2000) observed that more than 60% of bacterial isolates were resistant to antibiotics. The use of these two chemical products can cause the formation of by-products or toxic compounds with adverse consequences on the environment. On the contrary hydrogen peroxide is a natural metabolite that is naturally degraded into oxygen and water by chemical reduction or enzymatic decomposition, by many organisms and by the direct action of sunlight on water, without producing any undesired pollutant. Treatment with any of these products might have effects on the fatty acid composition of live prey, especially when applied after enrichment. One of the advantages of hydrogen peroxide is that it is not inducing any change in the fatty acid profile of enriched *Artemia* (Giménez *et al.* 2006) or rotifers (this study, see Table 2) being the nutritional quality of the live prey used for larval rearing assured even after disinfection. Another advantage of this disinfectant is that the survival of live preys is not affected by the addition of hydrogen peroxide as Giménez *et al.* (2006).

Conclusions

The results of this experiment indicate that the use of the product Ox-Aquaculture[®] as a disinfectant of live prey and meagre larvae at early rearing stages contributes to a better survival although not affecting larval growth. In addition, disinfection of live prey (rotifers and *Artemia* metanauplii) prior to the introduction into larval rearing tanks reduces the number of total heterotrophic bacteria and *Vibrionaceae* preventing and/or reducing larval

diseases caused by opportunistic bacteria. Thus, Ox-Aquaculture[®] can be considered a good disinfectant for aquaculture purposes.

Acknowledgments

This study was supported by CENIT-Acuicost “Hacia una Acuicultura Sostenible”. R.V. was the recipient of INIA predoctoral fellowship (Spanish Ministry of Science and Education). We thank O. Bellot, N. Gras, M. González, B. Lacuesta, S. Molas and G. Macià for their help in larval and live prey rearing and microbiological analysis.

References

- Austin B. & Allen B.W. (1981) Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture* **26**, 369–383.
- Avedaño-Herrera R., Magariños B., Irgang R. & Toranzo A.E. (2006) Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* **257**, 104–110.
- Bruno D.W. & Raynard R.S. (1994) Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice in Atlantic salmon. *Aquaculture International* **2**, 10–18.
- Davis D.A. & Arnold C.R. (1997) Tolerance of the rotifer *Brachionus plicatilis* to ozone and total oxidative residuals. *Ozone: Science & Engineering* **19**, 457–469.
- Derksen J.A., Ostland V.E. & Ferguson H.W. (1999) Effects of hydrogen peroxide on clearance of formaline-killed *Flavobacterium brachiophilum* from the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **22**, 59–67.
- Dhert P., Rombaut G., Suantika G. & Sorgeloos P. (2001) Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* **200**, 129–146.
- Duncan N., Estévez A., Porta J., Carazo I., Norambuena F., Aguilera C., Gairin I., Bucci F., Vallés R. & Mylonas C.C. (2012) Reproductive development, GnRH-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatized to captivity. *Fish Physiology Biochemistry* **38**, 1273–1286.
- Gaikowski M.P., Rach J.J. & Ramsay R.T. (1999) Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool, and warmwater fish. *Aquaculture* **178**, 191–207.
- Giménez G., Padrós F., Roque A., Estévez A. & Furones D. (2006) Bacterial load reduction of live prey for fish larval feeding using Ox-Aquaculture[®]. *Aquaculture Research* **37**, 1130–1139.
- Giménez G., Padrós F., Roque A., Estévez A. & Furones D. (2009) Effects of a peroxide-based commercial product

- on bacterial load of larval rearing water and on larval survival of two species of Sparidae under intensive culture: preliminary study. *Aquaculture Research* **40**, 504–508.
- Gomez-Gil B., Abreu-Grobois F.A., Romero-Jarero J. & Herrera-Vega M. (1994) Chemical disinfection of *Artemia* nauplii. *Journal of the World Aquaculture Society* **25**, 579–583.
- Haamed A.S. & Balasubramanian G. (2000) Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture* **183**, 195–205.
- Lumsden J.S., Ostland V.E. & Ferguson H.W. (1998) Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout. *Journal Aquatic Animal Health* **10**, 230–240.
- Martinez-Diaz S.F., Álvarez-González C.A., Moreno Legorreta M., Vázquez-Juárez R. & Barrios González J. (2003) Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture International* **11**, 95–108.
- Minkoff G. & Broadhurst A.P. (1994) Intensive production of turbot *Scophthalmus maximus* fry. In: *Turbot Culture: Problems and Prospects*, vol. **22** (ed. by P. Lavens & R.A.M. Remmerswaal), pp. 14–31. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent, Belgium.
- Munro P.D., Barbour A. & Birkbeck T.H. (1994) Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 560–566.
- Munro P.D., Henderson R.J., Barbour A. & Birkbeck T.H. (1999) Partial decontamination of rotifers with ultraviolet radiation: the effect of changes in the bacterial load and flora of rotifers on mortalities in start-feeding larval turbot. *Aquaculture* **170**, 229–244.
- Nicolas J.L., Robic E. & Ansquer D. (1989) Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* **83**, 237–248.
- Olafsen J.A. (2001) Interaction between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* **200**, 223–257.
- Olsen A.I., Olsen Y., Attramadal Y., Christie K., Birkbeck T.H., Skjermo J. & Vadstein O. (2000) Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* **190**, 11–25.
- Perez Benavente G. & Gatesoupe F.J. (1988) Bacteria associated with cultured rotifers and artemia are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquacultural Engineering* **7**, 289–293.
- Rach J.J., Gaikowski M.P., Howe G.E. & Schreier T.M. (1998) Evaluation of the toxicity and efficacy of hydrogen peroxide treatments on eggs of warm- and cool-water fishes. *Aquaculture* **165**, 11–25.
- Rach J.J., Schreier T.M., Schleis S.M. & Gaikowski M.P. (2005) Efficacy of formalin and hydrogen peroxide to increase survival of channel catfish infected with saprolegniosis. *North American Journal of Aquaculture* **67**, 312–318.
- Rodríguez J.L., Planas M. & Otero J.J. (1991) Microflora and antibacterial treatments of rotifers and *Artemia*. In: *Larvi '91*, Vol. **15** (ed. by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers & F. Ollevier), pp.403–405. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent, Belgium.
- Schmidt L.J., Gaikowski M.P. & Gingerich W.H. (2006) Environmental assessment for the use of hydrogen peroxide in aquaculture for treating external fungal and bacterial diseases of cultured fish and fish eggs. USGS Report, 180 pp.
- Skjermo J. & Vadstein O. (1993) Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* **255/256**, 185–191.
- Thomas-Jinu S. & Goodwin A.E. (2004) Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warm-water aquaculture ponds. *Journal Fish Disease* **27**, 23–28.
- Vadstein O., Oie G., Olsen Y., Salvesen I. & Skjermo J. (1993) A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: *Fish Farming Technology* (ed. by H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jorgensen, & K. Tvinnereim), pp 69–75. Balkema Rotterdam.
- Verschuere L., Dhont J., Sorgeloos P. & Verstraete W. (1997) Monitoring Biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *Journal Applied Microbiology* **83**, 603–612.