

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA



**“APLICACIÓN DE FOTO-TERMOPERIODO EN LA MADURACION
SEXUAL Y EL DESOVE DE LA CABRILLA (*Paralabrax humeralis*)”**

Presentada por:

EDUARDO SILVA BECK

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN ACUICULTURA**

Lima – Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN ACUICULTURA**

**“APLICACIÓN DE FOTO-TERMOPERIODO EN LA
MADURACION SEXUAL Y EL DESOVE DE LA CABRILLA
(*Paralabrax humeralis*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:
EDUARDO SILVA BECK**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Martha Williams León de Castro
PRESIDENTE

Mg.Sc. Beatriz Angeles Escobar
PATROCINADOR

Mg.Sc. Jessie Vargas Cárdenas
MIEMBRO

Mg.Sc. Fernando Galecio Regalado
MIEMBRO

AGRADECIMIENTO

Al Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por brindarme la oportunidad de llevar a cabo la presente investigación.

A la Directora Ejecutivo Científico del IMARPE Mg. Sc. Carla Aguilar Samanamud y a la Directora de Investigaciones en Acuicultura Ing. Lili Carrera, por brindar todo el apoyo necesario para la realización de la tesis. Al igual que los laboratorios que hicieron posible llevar a cabo el experimento.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) por brindarme la oportunidad de llevar a cabo la Maestría en Acuicultura.

A mi asesora y maestra Mg. Sc. Beatriz Angeles Escobar, por la dedicación y apoyo brindado a lo largo de la Maestría en Acuicultura.

A los maestros de la Maestría en Acuicultura, por la contribución en mi formación académica y profesional.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos generales de la cabrilla (<i>Paralabrax humeralis</i>)	3
2.1.1. Antecedentes	3
2.1.2. Aspectos biológicos y reproductivos de la cabrilla.....	4
2.2. Fisiología de la reproducción en peces marinos.....	5
2.2.1. El cerebro neuroendocrino.....	9
2.2.2. Las gonadotrofinas	10
2.2.3. La vitelogénesis y su control endocrino	12
2.2.4. Alimentación	14
2.3. Evaluación de la madurez gonadal	15
2.4. Reproducción inducida	18
2.5. Métodos de evaluación de la calidad del desove	21
2.6. Sistemas de recirculación acuícola (SRA) de agua de mar	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Lugar y período de ejecución	24
3.2. Etapas	24
3.2.1. Etapa pre-experimental	24
3.2.2. Etapa experimental.....	29
3.3. Diseño y análisis estadístico.....	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
4.1. Análisis de los parámetros físico-químicos de la calidad de agua.	42
4.1.1. Temperatura (°C).....	42
4.1.2. Oxígeno disuelto (mg.l ⁻¹)	45
4.1.3. pH.....	47
4.1.4. Compuestos nitrogenados disueltos	47
4.2. Análisis del desarrollo ovocitario de <i>Paralabrax humeralis</i>	50
4.3. Análisis de la calidad espermática de <i>Paralabrax humeralis</i>	56
4.4. Análisis de la concentración de esteroides sexuales en plasma de <i>Paralabrax humeralis</i>	59
4.4.1. Concentración de vitelogenina (ng.ml ⁻¹) en plasma de <i>Paralabrax humeralis</i>	61

4.4.2. Concentración de 11ketotestosterona (pg.ml ⁻¹) en plasma de <i>Paralabrax humeralis</i>	62
4.5. Análisis de la inducción hormonal en la calidad del desove de <i>Paralabrax humeralis</i>	64
V. CONCLUSIONES.....	70
VI. RECOMENDACIONES.....	72
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
VIII. ANEXOS.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ciclos de fotoperiodo en el cultivo de peces marinos para alterar la época de puesta.....	7
Tabla 2: Valores de 11ketotestosterona (11KT) y Estradiol (E ₂) en plasma sanguíneo de peces marinos en época reproductiva.....	12
Tabla 3: Niveles de intervención externa en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que pueden ser utilizados para inducir la maduración y ovulación en teleosteos.....	18
Tabla 4: Tratamiento con hormonas para inducir la maduración gonadal y ovulación en los géneros <i>Epinephelus</i> y <i>Paralabrax</i>	20
Tabla 5: Evaluación de la calidad del desove inducido de peces marinos mediante la tasa de fecundación, flotabilidad y eclosión.....	22
Tabla 6: Ventajas y desventajas de los sistemas de recirculación de agua (SRA) en el cultivo de peces marinos.....	23
Tabla 7: Parámetros físico-químicos en sistemas de recirculación de peces.....	23
Tabla 8: Horas luz y Temperatura (°C) promedio superficial del mar mensual de La Punta, Callao (Tratamiento 1) y propuesta de manejo de horas luz y temperatura (Tratamiento 2).....	29
Tabla 9: Composición de suplemento nutricional para dieta de reproductores basado en el suplemento Nutra brood de lenguado de California.....	32
Tabla 10: Promedio y desviación estándar de los parámetros físico-químicos de la calidad de agua de reproductores de <i>Paralabrax humeralis</i> cultivados en sistemas SRA a dos diferentes foto-termoperiodo, durante nueve meses de experimentación.....	43
Tabla 11: Promedios y desviación estándar del diámetro ovocitario de peces reproductores de <i>Paralabrax humeralis</i> cultivados bajo un foto-termoperiodo artificial (tratamiento 1) y otro artificial comprimido (tratamiento 2), durante 9 meses de experimentación.....	52
Tabla 12: Valores máximos y mínimos de la concentración (esp.ml ⁻¹ E-10) espermática de los reproductores de <i>Paralabrax humeralis</i>	57
Tabla 13: Valores máximos y mínimos de la motilidad (%) espermática de los reproductores de <i>Paralabrax humeralis</i>	58
Tabla 14: Concentración de esteroides sexuales en plasma sanguíneo de <i>P. humeralis</i> durante seis meses de experimentación.....	60

Tabla 15: Tabla con información sobre prueba de hormonas en cabrilla para ambos tratamientos.....	66
Tabla 16: Tabla con información sobre pruebas de concentración de la hormona GnRH α aplicadas a las cabrillas para ambos foto-termoperiodo.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista lateral de ejemplar adulto de “cabrilla” <i>Paralabrax humeralis</i>	5
Figura 2: Eje. Hipotálamo - hipófisis - gónada.....	10
Figura 3: Control hormonal de la vitelogénesis.....	14
Figura 4: Laboratorio de cultivo de peces marinos del C.I.A. Von Humboldt en el Instituto del Mar del Perú.....	25
Figura 5: Esquema de los componentes del sistemas de recirculación de agua de mar empleado.....	30
Figura 6: Unidad de cultivo con peces reproductores acondicionados de <i>P. humeralis</i> . Componentes: a) Cobertor de geomembrana; b) Ingreso del agua (RAS); c) Unidad de cultivo; d) Aireación; e) Desague con tubo cribado; f) Soporte de cobertor.....	31
Figura 7: Mesa de muestreo para biometrías, biopsia ovárica, colecta de esperma, extracción de sangre e inducción hormonal.....	34
Figura 8: Pocillos para las diluciones de concentración y motilidad espermática. AMFE: agua de mar microfiltrada y esterilizada.....	36
Figura 9: Extracción de sangre y cuantificación de VTG y 11KT en plasma de <i>P. humeralis</i>	37
Figura 10: Temperatura del agua (°C) de los tratamientos 1 y 2, durante 9 meses de experimentación.....	44
Figura 11: Oxígeno disuelto del agua (mg.l ⁻¹) de los tratamientos 1 y 2, durante 9 meses de experimentación.....	46
Figura 12: Porcentaje del diámetro ovocitario de <i>Paralabrax humeralis</i> bajo (a) un foto-termoperiodo artificial y (b) artificial comprimido, durante nueve meses de experimentación.....	53
Figura 13: Desarrollo morfológico de ovocitos en <i>Paralabrax humeralis</i> . a) Estadio inmaduro (Estadio I), b) Estadio pre-vitelogénico (Estadio II), c) Estadio vitelogénico (Estadio III), d) Estadio maduro (Estadio IV), e) Estadio hidratado (Estadio V) y f) Atresia ovocitaria. La escala de las fotografías es de 1000µm.....	55
Figura 14: Concentración de vitelogenina en plasma de dos hembras de <i>P. humeralis</i> de abril a setiembre bajo un foto-termoperiodo artificial y artificial comprimido.....	62
Figura 15: Concentración de 11ketotestosterona en plasma de cuatro machos de <i>P. humeralis</i> de abril a setiembre bajo un foto-termoperiodo artificial y artificial comprimido.....	63
Figura 16: Patologías encontradas en el cultivo de <i>P. humeralis</i> , <i>Vibrio sp.</i>	96

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Tipos de ovocitos en relación al estadio ovocitario de <i>P. humeralis</i> con característica macroscópica y microscópica.....	88
Anexo 2: Material y reactivos del kit de vitelogenina comercial marca CUSABIO “Grouper Vitellogenin (VTG) ELISA Kit-CSB14116Fh.....	90
Anexo 3: Material y reactivos del kit de 11ketotestosterona comercial marca CUSABIO “Fish 11-keto Testosterone (11-KT) ELISA-MBS269932”	91
Anexo 4: Curva de calibración obtenida en el ELISA de vitelogenina y 11KT. En ella se muestra la ecuación de la recta y el R ²	92
Anexo 5: Metodología para calcular la cantidad de conceptase y domperidona a una dosis de 5 µg GnRH _a /kg + 2,5 mg domperidona/kg.....	93

RESUMEN

La presente investigación evaluó el efecto del foto-termoperiodo artificial (Tratamiento 1) y artificial comprimido (Tratamiento 2) sobre la maduración sexual y el desove de cabrillas (*Paralabrax humeralis*), mantenida en dos sistemas de recirculación con dos réplicas durante un periodo experimental de nueve meses. Diaria y semanalmente se evaluaron los parámetros físico-químicos del agua, mensualmente y por un periodo de seis meses se evaluó el desarrollo ovocitario, la calidad espermática, la concentración de vitelogenina (VTG), 11Ketotestosterona (11KT) en plasma, y la calidad del desove. La calidad del agua de los sistemas de recirculación no presentó diferencias significativas entre tratamientos a excepción de la temperatura ($p < 0,05$) la cual fue programada para estar desfasada entre los tratamientos. La maduración sexual se vió regulada por el foto-termoperiodo, pudiendo obtener hembras en estadio III de maduración por un periodo más prolongado en el tratamiento artificial comprimido. La calidad espermática se mantuvo similar a lo largo del experimento, mostrando que los machos pueden estar listos para liberar esperma todo el año. La concentración de VTG y 11KT en plasma sanguíneo se vió regulada por el foto-termoperiodo, mostrando un incremento en concentración en los meses más cálidos y una baja concentración en los meses más fríos. La concentración apropiada para inducir el desove en hembras en estadio III de madurez fue de $5\mu\text{g.kg}^{-1}$ de GnRHa + $2,5\text{mg.kg}^{-1}$ de domperidona. En conclusión, se observó que el proceso de maduración sexual de la cabrilla *Paralabrax humeralis* es influenciada por la temperatura y el fotoperiodo, encontrando que al incrementar la temperatura de los 17 a 20°C con un fotoperiodo de 10 a 12 horas de luz, es posible inducir el proceso de maduración sexual.

Palabras claves: *Paralabrax humeralis*, foto-termoperiodo, maduración sexual, esteroides sexuales en plasma, calidad del desove.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of the artificial photo-thermoperiod (Treatment 1) and compressed artificial photo-thermoperiod (Treatment 2) on sexual maturation and spawning of the peruvian rock sea bass *Paralabrax humeralis*, maintained under recirculation systems during nine months of experimentation. Daily and weekly physico-chemical parameters of water were evaluated, and for a period of six months oocyte development, the sperm quality, the concentration of vitellogenin (VTG), 11 Ketotestosterone (11KT) in plasma, and the spawning quality. Water quality of both recirculation systems did not show significant differences between treatments except for temperature ($p < 0.05$) which was programmed to be out of phase between treatments. Sexual maturation was regulated by the photo-thermoperiod, being able to obtain females in stage III of maturation for a longer period of time with the artificial compressed treatment. Sperm quality remained similar throughout the experiment, showing that males can be ready to release sperm throughout the year. The concentration of VTG and 11KT in blood plasma was regulated by the photo-thermoperiod, showing an increase in concentration during warmer months and a low concentration during colder months. The appropriate concentration to induce spawning in mature stage III females was $5\mu\text{g.kg}^{-1}$ of GnRH α + 2.5mg.kg^{-1} of domperidone. In conclusion, it was observed that the sexual maturation process of *Paralabrax humeralis* is influenced by temperature and photoperiod, finding that by increasing the temperature from 17 to 20 °C with a photoperiod of 10 to 12 hours of light, it is possible to induce the process of sexual maturation.

Key words: *Paralabrax humeralis*, photo-thermoperiod, sexual maturation, plasma sex steroids, spawning quality.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los retos más grandes para la acuicultura de peces marinos es la reproducción controlada de nuevas especies de interés comercial (PRODUCE, 2012). Las especies de peces marinos presentan mayor complejidad en el cultivo que las especies dulceacuícolas, esto se debe al alto grado de sensibilidad que presentan los peces bajo sistemas de cultivo controlado (Benetti *et al.*, 2008). Los peces, para poder ubicarse en tiempo y espacio hacen una integración de la información ambiental, la cual modula el sistema endocrino a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, diciéndole al pez cuando es la mejor época del año para reproducirse y obtener la mayor supervivencia de su progenie (Carrillo y Zanuy, 1993).

Es por esto que en los cultivos controlados las dificultades presentadas son, en gran medida, consecuencia de variaciones de los parámetros fisicoquímicos como los ciclos de luz y temperatura bajo los cuales se encuentran los organismos, donde difieren de las condiciones ambientales (Benetti *et al.*, 2008). Por otro lado, se suman problemas asociados al manejo como es el estrés y las patologías, malformaciones durante el desarrollo y deficiencias en la alimentación, la cual no cubre los requerimientos nutricionales especie específicos (Fernández-Palacios *et al.*, 2005).

Para poder obtener un paquete o tecnología de producción en ciclo cerrado de cultivo, es necesario contar con una línea base y manejar la reproducción en cautiverio de los organismos de interés. Sin embargo, a la fecha en nuestro país no se ha podido inducir de forma natural controlada, la maduración sexual y el desove en diversas especies potenciales como es el caso de la cabrilla (*Paralabrax humeralis*), el róbalo (*Centropomus robalito*), el pargo (*Lutjanus peru*), la chita (*Anisotremus scapularis*), el lenguado (*Paralichthys adspersus*) y la corvina (*Cynoscion phoxocephalus*), entre otros, por lo que se hace necesario desarrollar técnicas que permitan controlar dicho proceso en cautiverio (PRODUCE, 2016).

Entre las técnicas de cultivo utilizadas para lograr la maduración sexual se ha podido determinar que a través de tratamientos no invasivos como son el control del fotoperiodo y el termoperiodo, se obtiene mayor cantidad y calidad de huevos y larvas (Bromage y Roberts, 1995). Esto se debe a que los métodos invasivos (las inyecciones de hormonas) pueden interrumpir el proceso de biosíntesis de esteroides sexuales dejando de lado la formación de subproductos generados en la fase inicial del proceso reproductivo produciendo gametos de menor calidad (Zohar, 1989). Asimismo se ha determinado que el control de los ciclos de luz y de temperatura generan cambios hormonales y fisiológicos relacionados a la maduración sexual y el desove en peces sometidos a condiciones de cultivo controlado (Carrillo y Zanuy, 1993).

Se conoce que la aplicación del foto-termoperiodo es una herramienta útil para controlar la reproducción y el desove en especies del género *Paralabrax* (Álvarez-Gonzalez *et al.* 2001 y Avilés, 2006). Sin embargo en *Paralabrax humeralis*, al igual que otras especies de peces marinos del Perú, no se ha demostrado aún el efecto del foto-termoperiodo en la maduración sexual y el desove. Esta información es esencial para poder empezar a obtener una producción programada de huevos y larvas que permita un desarrollo acuícola de las especies de peces marinos de interés. Este trabajo busca demostrar bajo una serie de indicadores que si se puede obtener la maduración sexual y el desove de *Paralabrax humeralis*. Los indicadores utilizados en esta investigación pueden ser aplicados en otras especies de peces marinos. La información obtenida aplicando estos indicadores va a permitir reducir el estrés ocasionado en los reproductores, evitando la manipulación innecesaria de estos. Como consecuencia, se obtendrá un mayor porcentaje de maduración sexual en hembras y se obtendrán desoves de mejor calidad.

La presente investigación tiene como objetivo principal, evaluar el efecto del foto-termoperiodo en la maduración sexual y el desove de la “cabrilla” *Paralabrax humeralis*. Los indicadores para la maduración sexual son: a) la evaluación de gametos, en hembras se evalúa el desarrollo ovocitario y en machos la concentración y motilidad espermática. b) la cuantificación de esteroides sexuales en plasma sanguíneo, en hembras se evalúa la concentración de vitelogenina y en machos la concentración de 11KT. Los indicadores para evaluar la calidad del desove son el porcentaje de: a) flotabilidad, b) fecundidad, c) eclosión y d) el índice de Actividad de Supervivencia (SAI).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales de la cabrilla (*Paralabrax humeralis*)

La posición taxonómica de la cabrilla es la siguiente:

- Filo: Chordata
- Subfilo: Vertebrata
- Superclase: Osteichthyes
- Clase: Actinopterygii
- Subclase: Neopterygii
- Infraclasse: Teleostei
- Superorden: Acanthopterygii
- Orden: Perciformes
- Suborden: Percoidei
- Familia: Serranidae
- Subfamilia: Serraninae
- Género: *Paralabrax*
- Especie: *Paralabrax humeralis*

2.1.1. Antecedentes

La cabrilla *Paralabrax humeralis* pertenece al orden Perciforme, la familia Serranidae y engloba principalmente los géneros *Paralabrax*, *Acanthistius* y *Serranus* (Chirichigno y Vélez, 1998). Es una especie bentopelágica cuyo hábitat se asocia a fondos someroroccosos, siendo extraída principalmente por la pesquería artesanal pintera y arrastrera como especie acompañante de la merluza (PRODUCE, 2012). El rango de tallas de captura

oscila entre los 14 y 67cm con una media entre 25 y 35cm. La captura de ejemplares de esta especie se encuentra principalmente por debajo de la talla mínima establecida recomendada por el Instituto del Mar del Perú (32 cm).

IMARPE (2010) presenta registros en Ecuador, Perú y Chile, y aunque ha sido considerada abundante en algunas partes de su área de distribución, los desembarcos de capturas notificados en Perú se han reducido en más del 60% entre 1996 al 2006. Se estima que la población puede haber disminuido al menos un 30% en los últimos 10 años, sin embargo se necesita más información sobre los desembarques, la captura y la población.

Según la unión internacional para la conservación de la naturaleza (IUCN) esta especie puede justificar una categoría de amenaza, sin embargo esta listada como datos insuficientes y se continua extrayendo de forma desmesurada para el consumo humano directo, siendo comercializada en estado fresco, congelado y salado.

2.1.2. Aspectos biológicos y reproductivos de la cabrilla

Chirichigno (1974) describe a la cabrilla como un pez de cuerpo alargado y comprimido con un perfil dorsal anterior levemente convexo, presentando la boca grande y oblicua, la mandíbula inferior se proyecta por delante de la superior con dientes mandibulares en bandas. La aleta dorsal se inicia sobre la base de las aletas pectorales, siendo la tercera espina la más larga.

Esta especie se caracteriza por presentar manchas doradas sobre la cabeza, aletas y cuerpo. Los bordes de la cavidad branquial presentan color naranja; la aleta pectoral es amarilla pálido transparente y la aleta caudal truncada o suavemente cóncava. Los ejemplares reproductores poseen manchas longitudinales café oscuro (Figura 1).



Figura 1: Vista lateral de ejemplar adulto de “cabrilla” *Paralabrax humeralis*.

Esta especie se distribuye desde Puerto Pizarro (Perú) hasta el extremo austral de Chile, además de las Islas Galápagos y Juan Fernández (Chirichigno, 1974). Es posible encontrarla desde aguas someras hasta profundidades que bordean los 200m, pero con mayores concentraciones en aguas costeras a profundidades de 50 a 100 m; en el área comprendida entre los 04° - 06° S (Espino *et al.*, 1989). Esta especie se distribuye en zonas con temperaturas de 13,6 a 17,2 °C y bajo contenido de oxígeno disuelto con valores entre 0,34 y 2,77 ml/l, en tanto periodos correspondientes al evento El Niño se le encuentra a temperaturas entre 14,3 y 25,1°C y con valores de 0,48 a 5,01 ml/l de oxígeno disuelto (Espino *et al.*, 1989). La cabrilla es un pez carnívoro que se alimenta principalmente de crustáceos bentónicos como camarones, cangrejos, pulpos, calamares y peces óseos (Heemstra, 1995). Espino *et al.* (1989) indican que se alimenta principalmente de pequeños crustáceos como eufáusidos y larvas de langostino. La reproducción de la cabrilla es costera y los huevos y larvas son pelágicos; la mayor actividad reproductiva se presenta en los meses de verano y primavera, con un pico principal de desove en verano (Samamé, 1974; Minaño y Castillo, 1971).

2.2. Fisiología de la reproducción en peces marinos

La reproducción en peces teleósteos es un proceso cíclico definido, que se regula en base a factores ambientales diarios y estacionales como el fotoperiodo y la temperatura (Carrillo y

Zanuy, 1993). En el medio natural los organismos son expuestos a ciclos de luz y oscuridad, presentándose días más largos en verano, días más cortos en invierno y días de intensidades medias en primavera y otoño (Carrillo, 2009). Los cambios térmicos del agua son progresivos, presentándose aguas más cálidas en verano, aguas más frías en invierno y temperaturas intermedias en primavera y otoño (Carrillo y Zanuy, 1993).

Estas variaciones foto-térmicas puede decirse que son repetitivas entre años, siendo un buen indicador para coordinar el proceso reproductivo de los peces (Avilés, 2006). Debido a esto, los peces se han adaptado para coordinar en base al ambiente, las condiciones para dar lugar al proceso de la reproducción y la supervivencia de su progenie (Carrillo y Zanuy, 1993). En el caso de la dorada y la lubina, estas especies se han sincronizado con el medio ambiente para reproducirse en invierno, mientras que el lenguado se reproduce en primavera y en menor cantidad en otoño (Ramos, 1985).

Según Carrillo y Zanuy (1993) los peces son capaces de medir el tiempo mediante su reloj biológico, conocido como la glándula pineal. Esta glándula, ubicada en el diencéfalo, se activa y produce la hormona melatonina en ausencia de luz. La melatonina es un indicador para el pez a la hora de ubicarse en qué momento del día se encuentra. Los peces producen melatonina durante la noche y su secreción va desapareciendo con la llegada del día. Adicionalmente, la temperatura regula la cantidad de melatonina que se produce de noche, liberándose más melatonina en los meses cálidos que en los meses fríos.

El control ambiental más usado en la reproducción de los peces mantenidos en cautiverio se basa en simulaciones de las condiciones naturales de la manera más precisa. Para esto, se utilizan relojes temporizadores para el control del fotoperiodo y de la temperatura. Los acuicultores que utilizan esta metodología disponen de un grupo de reproductores de referencia o controles que están expuestos a temperatura y fotoperiodos naturales simulados, siendo este, el que proporciona los desoves en calidad y cantidades esperadas en el momento propio de la especie (Carrillo, 2009).

En general, el stock de reproductores debe estar mantenido en condiciones óptimas para poder evaluar los efectos de una manipulación ambiental sobre los parámetros

reproductivos. Este stock de reproductores, previa identificación del sexo, debe estar formado por animales en edad óptima para reproducirse, a bajas densidades (10Kg x m³) y con la proporción de sexos adecuada (generalmente 1:1) (Carrillo y Zanuy, 1993).

La estrategia utilizada por los acuicultores para obtener desplazamientos significativos de la época natural de puesta es la de administrar, a diferentes grupos de reproductores, regímenes de fotoperiodo y temperatura desfasados en uno o varios meses, pero siempre manteniendo amplitudes rítmicas similares a la presentadas por el grupo control (Carrillo, 2009).

El proceso y control de la reproducción en peces es de interés aplicativo para la acuicultura y temas filogenéticos. Carrillo y Zanuy (1993) observaron que la exposición de truchas a ciclos comprimidos de luz (más cortos de un año) producía como consecuencia un adelanto de 3 a 4 meses en los tiempos de desove en comparación con truchas mantenidas bajo un fotoperiodo artificial (Tabla 1).

Tabla 1: Ciclos de fotoperiodo en el cultivo de peces marinos para alterar la época de puesta.

CICLO FOTOPERIODO	ESPECIE	HORAS LUZ/OSCURIDAD	TEMPERATURA (°C)	FUENTE
Natural comprimido	Dorada	16 : 8	16 – 18°C	Zohar <i>et al.</i> (1995)
	Lubina	15 : 9	16 – 20°C	Carrillo <i>et al.</i> (1993), Carrillo <i>et al.</i> (1995), Zanuy <i>et al.</i> (1995)
	Lenguado	11 : 13	14 °C	Devauchelle <i>et al.</i> (1987), Ramos (1985)
Natural desfasado	Trucha	6 : 18	10 °C	Bromage <i>et al.</i> (2001)

Generalmente existe una correlación entre la magnitud del desfase del fotoperiodo y la desviación del tiempo de puesta de los grupos experimentales con respecto al grupo control. Mientras mayor es el desfase existente entre los ciclos foto-térmicos, mayor será el retraso o adelanto que experimentan los desoves de los reproductores y a la inversa, cuanto menor sea este desfase ambiental, el período de desoves de los grupos experimentales tenderá a

coincidir con las del grupo control (Girin y Devauchelle, 1978; Bromage y Duston, 1986). El número de grupos experimentales puede ser cuantos desfases se quiera obtener y teóricamente sería ilimitado. Sin embargo, la duración del período de puesta de la especie en estudio es la que indica el número de grupos experimentales que se deben organizar para obtener puestas todos los meses del año (Bromage y Roberts, 1995).

La manipulación ambiental que emplea ciclos naturales de luz y/o temperatura desfasados, expandidos o comprimidos, aunque efectiva en alterar la época de puesta de los reproductores, necesita una programación un tanto compleja de los relojes temporizadores para regular, de forma precisa, las variaciones térmicas o fotoperiódicas del medio ambiente, especialmente en aquellas especies de peces que presentan ciclos de maduración dilatados (Bromage y Roberts, 1995).

Esta manipulación se puede simplificar en gran medida mediante la aplicación de ciclos foto-térmicos constantes sin que se pierda efectividad en la regulación de los ciclos reproductores (Bromage *et al.*, 2001). Se ha comprobado que los incrementos o disminuciones progresivas de luz y temperatura, característicos de las diferentes estaciones del año y que producen alteraciones profundas en la época de desove, pueden ser reemplazados por ciclos foto-térmicos de longitud constante o por una combinación de ellos (Bromage, 1995; Carrillo *et al.*, 1993; Zanuy *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2004).

Generalmente, se adoptan los valores máximos o mínimos de fotoperiodo alcanzados en los solsticios de verano o invierno, se asumen como fotoperíodos largos o cortos, respectivamente y se aplican a un supuesto experimental concreto para alterar la época de puesta de los peces (Bromage y Roberts, 1995). Por otro lado, también se han utilizado fotoperíodos constantes de 24 horas de luz en instalaciones acuícolas de latitudes extremas (Carrillo y Zanuy, 1993). Estos regímenes de iluminación se han usado, en principio, para compensar los crecimientos reducidos de los peces debido a la escasa iluminación reinante durante el otoño e invierno (Taylor *et al.*, 2005), aunque también se han observado efectos sobre la maduración sexual (Oppedal *et al.*, 1997; Schultz *et al.*, 2006).

Los fotoperíodos, sean largos o cortos, se suelen administrar de forma ininterrumpida a lo largo de un período determinado (Carrillo y Zanuy, 1993). La administración de fotoperíodos cortos constantes a lo largo de todo el ciclo sexual, indujo un adelanto del período de desove y de su regulación hormonal, de alrededor de dos meses en la lubina y en el salmón (Planas y Swanson, 1995). Por el contrario, la administración de fotoperíodos largos constantes indujo un retraso de los ciclos madurativos, en estas mismas especies, también de alrededor de dos meses (Prat *et al.*, 1999).

Si el cambio de fotoperíodo largo a corto se produce en épocas más tempranas del año, las puestas se adelantan y a la inversa, cuanto más tarde se aplica en el año, las puestas se atrasan (Carrillo y Zanuy, 1993). Los estudios realizados en la trucha por Bromage y Duston (1986) demostraron que la administración de fotoperíodo largo constante de 18HL:6HO, hasta el mes de Octubre, seguido en los meses subsiguientes por fotoperíodo corto de 6HL:18HO de duración, determinó que las puestas sólo se adelantasen en quince días respecto a los controles. Sin embargo, cuando el cambio del fotoperíodo se hizo en Mayo las puestas se adelantaron cuatro meses con respecto al grupo control. La combinación de luz continua (en lugar de fotoperíodos largos) con fotoperíodo corto constante también fue efectiva en el adelanto de las puestas.

2.2.1. El cerebro neuroendocrino

El cerebro de los peces posee una serie de sistemas intermediarios que integran la información neural (glándula pineal y retina) y neuroendocrina (melatonina) del fotoperíodo y lo transmite de forma directa o indirecta a sistemas efectores que responden con la liberación de neurohormonas (González-Martínez *et al.*, 2004). En peces teleósteos no se da un contacto vascular entre el hipotálamo y la hipófisis como en organismos superiores.

Debido a esto, las neurohormonas actúan de forma directa en las células del lóbulo anterior adenohipofisario (Kah *et al.*, 1993). Kah *et al.* (1993) y Trudeau (1997) mencionan que las neurohormonas (FSH y LH) regulan la actividad de la hipófisis y desencadenan una cascada endocrina que es parte del proceso reproductivo (Figura 2). Es por esto, que las neurohormonas estimulan o inhiben la síntesis y secreción de las gonadotrofinas

hipofisarias, regulando los procesos de gametogénesis y esteroidogénesis gonadal (Carrillo y Zanuy, 1993).

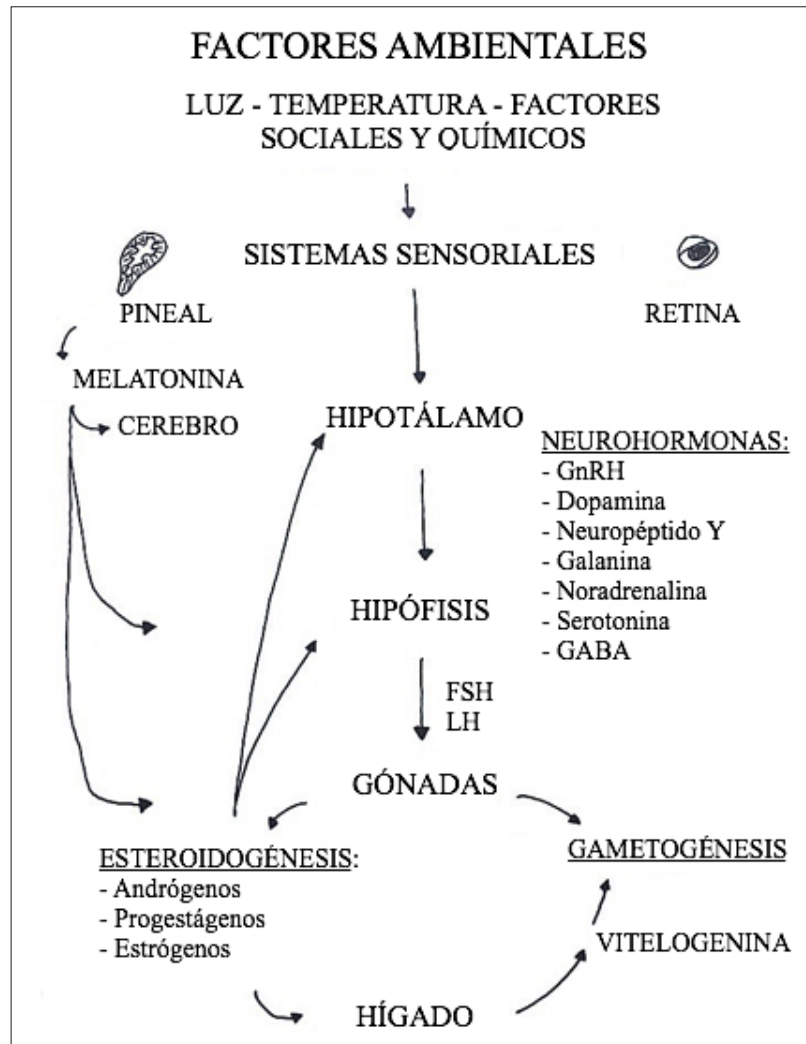


Figura 2: Eje. Hipotálamo - hipófisis - gónada.

Fuente: Modificado de Carrillo y Zanuy (1993).

2.2.2. Las gonadotropinas

Las gonadotropinas son las hormonas encargadas de regular los procesos de gametogénesis y esteroidogénesis gonadal. En peces, todavía no está bien definida la actividad y función de la FSH y de la LH. Se ha visto en salmónidos machos, durante la espermatogénesis, que ambas gonadotropinas estimulan la producción testicular de 11Ketotestosterona (11KT) (Planas y Swanson, 1995). Ohta *et al.* (2007) indican que la 11KT, regulada por la FSH, es

un factor endocrino clave para la iniciación de la multiplicación del esperma, en el caso de la trucha se ha observado un comportamiento similar (Loir, 1999). En el salmón del atlántico, la LH estimula la producción de 11KT y $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) y esta va aumentando a medida que avanza la espermatogénesis.

El aumento de la LH en plasma sanguíneo coincide con la espermiación, la aparición de células germinales post-meióticas y de la actividad receptora de LH en los testículos. En la lubina, se ha observado que la LH activa la espermiación y aumenta significativamente el volumen de esperma (Mazón *et al.*, 2008).

En cuanto a las hembras, se ha observado que ambas gonadotrofinas estimulan la síntesis de 17β -estradiol (E2) en ovarios durante la vitelogénesis (Van Der Kraak *et al.*, 1992). Antes de la ovulación, durante el cambio de E2 a DHP y la rotura de la vesícula germinal, la acción de la LH excede a la acción de la FSH (Planas *et al.*, 2000; Kagawa *et al.*, 2003).

El proceso de vitelogénesis esta regulado por la acción del E2 (Nagahama, 1994), mientras que la FSH estimula la conversión de testosterona a E2, incrementando la actividad aromatasa y la expresión del gen P-450arom en el ovario (Montserrat *et al.*, 2004). Molés *et al.* (2008) observan una alta actividad esteroideogénica de la FSH durante estadios iniciales de la maduración testicular y ovarios en vitelogénesis. Esto sugiere que la FSH presenta mayor actividad durante el crecimiento del testículo y ovario, mientras que la LH presenta mayor actividad durante la maduración final ovocitaria. La función más descrita para la FSH es la incorporación de vitelogenina en ovocitos de trucha arcoiris (Tyler y Sumpter, 1996).

Los niveles plasmáticos de esteroides sexuales como la 11KT y el Estradiol (E2) van cambiando a lo largo del año, presentando valores máximos en la época reproductiva y valores mínimos en la época de latencia reproductiva. En la Tabla 2 se observan los valores de 11KT y Estradiol (E2) en plasma sanguíneo de peces en época reproductiva.

Tabla 2: Valores de 11ketotestosterona (11KT) y Estradiol (E₂) en plasma sanguíneo de peces marinos en época reproductiva.

ESPECIE	11KT (pg.ml ⁻¹)	E ₂ (ng.ml ⁻¹)	AUTOR
<i>Lutjanus analis</i>	620	0,10	Castaño-Rivera y Botero-Arango (2005)
<i>Salmo salar</i>	710	0,08	Schultz <i>et al.</i> (2006)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	-	0,14	Zanuy <i>et al.</i> (1995)
<i>Onchorynchus mykiss</i>	930	0,21	Loir (1999)

2.2.3. La vitelogénesis y su control endocrino

La vitelogénesis es el proceso por el cual se da la acumulación de vitelo dentro del ovocito. Este proceso es necesario para el mantenimiento y desarrollo embrionario y larvario. En peces la vitelogénesis es un proceso sumamente importante para lograr una reproducción exitosa que conlleve a un desarrollo completo y a la supervivencia de la progenie. Este proceso se caracteriza por un crecimiento notable de los ovocitos, consecuencia de la incorporación, desde el plasma, de las proteínas precursoras del vitelo (vitelogenina) y en menor cantidad de lipoproteínas de baja densidad (Babin *et al.*, 2007).

En la Figura 3 se muestra un diagrama que resume, de forma esquemática, el control hormonal de la vitelogénesis para una mejor comprensión de este proceso. La FSH hipofisaria actúa sobre sus receptores específicos en las células foliculares provocando la secreción de 17β estradiol. Este, a su vez, actúa sobre el hígado induciendo la síntesis de vitelogenina que es transportada, por la sangre, hacia el folículo e incorporada por el oocito mediante receptores específicos situados en la superficie del mismo. La FSH actúa sobre las dos capas foliculares estimulando la producción de testosterona (T) por parte de la teca y su difusión y aromatización a 17β estradiol en la granulosa. La formación del corion (zona radiata o envoltura vitelina) tiene lugar durante la vitelogénesis y también esta regulada por el 17β estradiol (Carrillo y Zanuy, 1993).

La vitelogenina es una fosfoglicoproteína muy grande y compleja que liga calcio y que se sintetiza en el hígado bajo la estimulación del E₂. A su vez, la producción de este por parte del folículo es inducida por niveles crecientes de FSH plasmático (Patiño y Sullivan, 2002).

En peces teleósteos se ha demostrado que la FSH estimula la liberación de E2 por fragmentos del ovario. Además, esta estimulación es más elevada en hembras que se encuentran en vitelogenesis temprana y media (Molés *et al.*, 2008) y coincide con niveles altos de expresión de receptores de FSH en los folículos ováricos (Rocha *et al.*, 2009). También se ha demostrado que este papel es específico puesto que la FSH estimula la actividad aromataasa (citocromo P450, responsable de la conversión de la T en E2) de folículos ováricos de la trucha común (Montserrat *et al.*, 2004). Además, la FSH parece estimular la incorporación de vitelogenina dentro de los ovocitos de la trucha arcoiris (Jalabert, 2005).

La FSH actúa principalmente durante la vitelogénesis en peces que poseen un tipo de desarrollo ovárico sincrónico (una sola puesta). Sin embargo, en especies que ponen varias veces (asincrónico) el papel de la FSH es menos claro y también se le ha atribuido una posible función a la LH (Rosenfeld *et al.*, 2007).

La vitelogenina es captada de la circulación sanguínea por los oocitos a través de receptores específicos de vitelogenina mediante pinocitosis. Luego, es agrupada en pequeñas vesículas recubiertas de clatrina quienes luego, al fusionarse, darán lugar a vesículas más grandes que se mueven desde la periferia hacia el oolema periférico. Las vesículas se fusionan con lisosomas dando lugar a la formación de los cuerpos multivesiculares (MVB), de mayor tamaño, que gradualmente se transforman en gránulos de vitelo quienes, a su vez, dan lugar a los grandes glóbulos de vitelo (Le Menn *et al.*, 2007).

Los MVB contienen enzimas lisosomales, como la catepsina D que rompe la vitelogenina en diferentes polipéptidos derivados del vitelo. La participación de esta enzima y hasta cierto punto otra proteasa, la catepsina B, en el procesado de la vitelogenina se ha observado tanto en peces marinos como dulceacuícolas (Cerdá *et al.*, 2007).

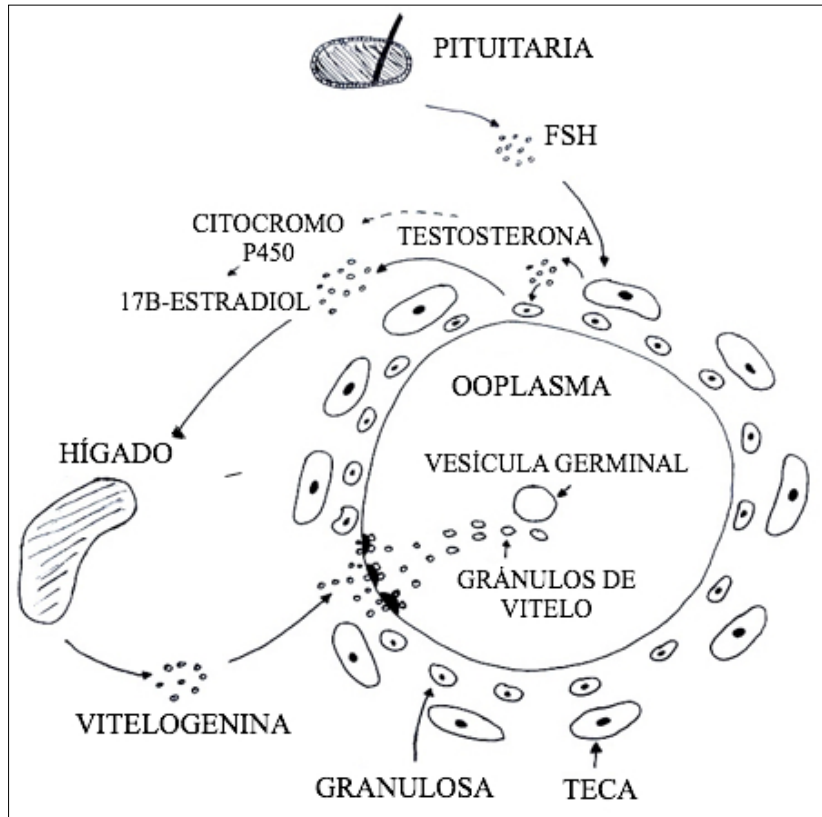


Figura 3: Control hormonal de la vitelogenesis.

Fuente: Modificado de Carrillo y Zanuy (1993).

El proceso de maduración tiene lugar como consecuencia de un cambio hormonal propiciado por la LH. El folículo sintetiza y secreta la hormona inductora de la maduración (MIH) que en los salmónidos y algunas especies de agua dulce es una progestina, el $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17, 20\beta\text{P}$; DHP). En varias especies marinas se ha identificado otra progestina, derivada de la DHP, como el MIH, $17\alpha, 20\beta, 21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one ($20\beta\text{S}$) (Jalabert, 2005; Suwa y Yamashita, 2007).

2.2.4. Alimentación

Las proteínas constituyen el componente más abundante de los nutrientes contenidos en los huevos de peces (Watanabe y Kiron, 1994). Además, son la principal fuente de energía durante el desarrollo embrionario de muchas especies de teleósteos (Sivaloganathan *et al.*, 1998). Las proteínas tienen un papel particularmente importante en la fecundación y desarrollo normal del embrión (Srivastava *et al.*, 1995). Por ejemplo, las proteínas que

envuelven el vítelo desempeñan un papel muy importante durante la fecundación (Hart, 1990). La vitelogenina es la principal proteína precursora del vitelo en teleósteos y su composición en aminoácidos se caracteriza por altos contenidos en alanina, ácido glutámico y leucina y bajos contenidos en serina.

Los lípidos constituyen el componente dietético mejor estudiado en nutrición de reproductores. Trabajos como los de Furuita *et al.* (2003), Mazorra *et al.* (2003) y Aijun *et al.* (2005) muestran que el contenido dietético en lípidos totales ó el de ácidos grasos esenciales constituye el factor nutricional que más influye en la calidad de los desoves, especialmente en aquellas especies de desoves continuos que presentan periodos vitelogenéticos cortos y que son capaces de incorporar estos componentes dietéticos en los huevos incluso durante el periodo de desove (Fernández-Palacios *et al.*, 2005).

La maduración ovárica en los peces implica cambios bioquímicos considerables que resultan en una masiva incorporación de lípidos y proteínas en los oocitos (Frémont *et al.*, 1984) durante la vitelogénesis. En la dorada, que desova continuamente durante 3-4 meses, estos componentes bioquímicos deben proporcionarse continuamente a través de dietas de alta calidad nutritiva (Carrillo, 2009).

Se reconocen 15 vitaminas establecidas como esenciales para los peces al igual que lo son para vertebrados terrestres (Woodward, 1994). Los requerimientos de vitamina A (retinol), vitamina D (colecalfiferol), vitamina E (tocoferol), vitamina K (menadiona) y vitamina C (ácido ascórbico), han sido determinados sólo para algunas especies de teleósteos y su efecto sobre la reproducción y la calidad de los desoves ha sido poco estudiado (Srivastava *et al.*, 1995).

2.3. Evaluación de la madurez gonadal

Muchas especies mantenidas en sistemas de cultivo controlado sufren disfunciones reproductivas importantes. Las hembras inician el desarrollo gonadal en forma normal, pero no alcanzan la maduración final del oocito, la ovulación y/o la puesta (Zohar, 1989). Los machos, por su parte, aunque mucho más resistentes a las condiciones ambientales del

cultivo y al estrés producido por éste, producen un menor volumen de semen, o bien éste es de mala calidad (Billard, 1986).

El éxito de la reproducción se inicia con un adecuado manejo de los peces reproductores, el objetivo es tener la cantidad adecuada de hembras y machos sexualmente maduros. El resultado de la evaluación de la madurez gonadal es reflejo de la incidencia de las condiciones de cultivo sobre el desarrollo gonadal de los organismos cultivados. Los métodos de evaluación de la maduración gonadal más utilizados en acuicultura se pueden dividir en dos:

- a) Método empírico: A través de este método, se efectúa un diagnóstico presuntivo basado en la observación de las características fenotípicas externas. Este método es considerado muy subjetivo ya que la exactitud se basa en la experiencia y pericia del observador (Bromage y Roberts, 1995).
- b) Métodos directos: Los métodos científicos son diagnósticos confirmativos. Los más comunes son la biopsia ovárica (hembras), presión abdominal (machos), y el análisis de los niveles de esteroides sexuales en plasma sanguíneo (ambos sexos) (Carrillo y Zanuy, 1993).
 - La biopsia ovárica ó canulación intraovárica, consiste en la extracción de óvulos mediante el uso de una cánula, esta técnica permite observar el estado de maduración de los ovocitos utilizando un microscopio. La desventaja de este método invasivo es que puede producir hemorragias internas ó acelerar el proceso de reabsorción a través del estrés producido (Hunter y Macewicz, 1985).
 - La presión abdominal se realiza en los machos para colectar una muestra de espermatozoides, una vez colectado el semen se analiza la calidad espermática; para esto, se utiliza una cámara de Neubauer, donde se puede analizar la concentración y motilidad espermática (Hart, 1990).

- El análisis de esteroides sexuales en sangre, consiste principalmente en analizar los niveles plasmáticos de vitelogenina (hembras) y 11ketotestosterona (machos). La desventaja del método ELISA es que los resultados no son instantáneos, la evaluación es costosa, genera estrés y consecuentemente una disminución en las defensas de los organismos (Cerdá *et al.*, 1994).

Medición hormonal por medio del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

El Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Hartling *et al.*, 1997).

Una de las técnicas más eficientes para medir los niveles de VTG en plasma sanguíneo de teleósteos es el ensayo inmuno-enzimático (ELISA), donde se emplean anticuerpos específicos anti-vitelina de la especie y se lleva a cabo una reacción antígeno-anticuerpo lo cual permite evaluar los niveles de concentración de VTG (Mañanos *et al.*, 1994; Lomax *et al.*, 1998).

La medición de los niveles plasmáticos de VTG y 11KT ha sido empleado en diferentes áreas de estudio, tales como: para la determinación del sexo, indicador en la diferenciación sexual y de la capacidad reproductiva, y en relación con hormonas sexuales (Heppell y Sullivan, 1999).

2.4. Reproducción inducida

En el medio natural los peces se reproducen espontáneamente; sin embargo, en ambientes confinados algunos peces se caracterizan por presentar una inhibición en la reproducción. Donaldson y Hunter (1982) señalan que hay dos razones fundamentales para que ciertas especies de peces de importancia alimenticia y económica, al ser mantenidos en cautiverio, no se reproduzcan, como son:

- a) Las especies cultivadas se encuentran fuera de su rango natural bajo condiciones no favorables para completar la maduración sexual.
- b) Las condiciones ambientales en las unidades de cultivo son distintas a las del medio natural. Los factores ambientales que actúan en contra del desove normal podrían influir sobre las respuestas fisiológicas específicas.

En algunas circunstancias, es posible alterar el ambiente en las unidades de cultivo de los reproductores para permitir completar el desarrollo sexual y el desove normal. En otras situaciones es común la práctica para inducir la maduración final, ovulación y espermiación mediante el tratamiento de hormonas (Tabla 3).

Tabla 3: Niveles de intervención externa en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que pueden ser utilizados para inducir la maduración y ovulación en teleosteos.

NIVEL DE INTERVENCIÓN	ETAPA	AGENTE
Hipotálamo	Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	Intervención exógena Dopamina Antagonística
Glándula pituitaria	Gonadotropina (GtH)	GnRH y GnRH (análogos)
Ovario		Extractos pituitarios Preparaciones GtH
Oocisto	Maduración final Ovulación	Corticoesteroides Prostaglandinas Catecolaminas

Fuente: Modificado de Vinatea *et al.*, (1993).

Se conoce que la inducción hormonal es mayormente aplicada en especies en cultivo, que al ser confinadas, precisan de elementos estimulantes para desovar y producir la cantidad suficiente para acuicultura (Bromage y Roberts, 1995). Sin embargo, por razones de orden logístico, de disponibilidad de alevines para atender la producción programada de peces en las granjas en cantidad y calidad de acuerdo a la demanda de consumidor, también se aplica la inducción de reproducción aun en las especies que desovan fácilmente en cautiverio (Carrillo y Zanuy, 1993).

La reproducción de tales especies cultivadas comúnmente, están restringidas a un período y estación determinados cuando las condiciones ambientales son óptimas. El tratamiento con hormonas puede ser utilizado para:

- a) Obtener gametos variables fuera de la estación de desove, ya sea para extender el periodo de puesta o permitir la hibridación (Sower *et al.*, 1982).
- b) Sincronizar la puesta (Hunter *et al.*, 1981).
- c) Mejorar las condiciones de manejo para incrementar la sobrevivencia larval en ambientes controlados (Donaldson y Hunter, 1983; Refstie *et al.*, 1982).

En la tabla 4 se mencionan algunas hormonas empleadas para la inducción a la madurez gonadal en peces marinos.

Tabla 4: Tratamiento con hormonas para inducir la maduración gonadal y ovulación en los géneros *Epinephelus* y *Paralabrax*.

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	HORMONA	DOSIS	INTERVALO	DESOLVE	FUENTE
<i>Epinephelus akaara</i>	Redspotted grouper	HCG	1 ^{ra} . 500 IU.petz ⁻¹ 2 ^{da} . 1000 IU.petz ⁻¹	1 ^{ra} . 0h 2 ^{da} . 24h	38h	Tseng y Ho (1979)
<i>Epinephelus fario</i>	Grouper	HCG	1 ^{ra} . 1000 IU.kg ⁻¹ 2 ^{da} . 1000 IU.kg ⁻¹ 3 ^{ra} . 1000 IU.kg ⁻¹	1 ^{ra} . 0h 2 ^{da} . 24h 3 ^{ra} . 48h	72h	Kuo <i>et al.</i> (1986)
			1 ^{ra} . 1000 IU.kg ⁻¹ 2 ^{da} . 2000 IU.kg ⁻¹	1 ^{ra} . 0h 2 ^{da} . 24h	48h	
<i>Epinephelus tauvina</i>	Grouper	HCG + SPE	1 ^{ra} . 500 IU.kg ⁻¹ 2 ^{da} . 500 IU.kg ⁻¹ 3 ^{ra} . 500 IU.kg ⁻¹ + 9 mg.kg ⁻¹	1 ^{ra} . 0h 2 ^{da} . 24h 3 ^{ra} . 48h	61h	Chen <i>et al.</i> (1977)
			1 ^{ra} . 500 IU.kg ⁻¹ + 3mg 2 ^{da} . 700 IU.kg ⁻¹ + 3mg.kg ⁻¹	1 ^{ra} . 0h 2 ^{da} . 24h	36h	
<i>Paralabrax clathratus</i>	Kelp bass	LHRHa	50µg.kg ⁻¹	1 ^{ra} . 0h	≤50h	Oda <i>et al.</i> (1993)
<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	Spotted sand bass	LHRHa	50µg.kg ⁻¹	1 ^{ra} . 0h	≤52h	
<i>Paralabrax nebulifer</i>	Barred sand bass	LHRHa	50µg.kg ⁻¹	1 ^{ra} . 0h	≤53h	

2.5. Métodos de evaluación de la calidad del desove

Los criterios biológicos empleados con mayor frecuencia para estimar la calidad de los huevos son la tasa de fecundación (%), flotabilidad (%) y la tasa de eclosión (%) (Cerdá *et al.*, 1994). Estos indicadores miden la cantidad de huevos fecundados, flotantes y eclosionados en relación al total producido por desove. Estos varían en función a la carga genética de los reproductores, condiciones físicas y químicas en el cultivo y la manipulación de los huevos durante las mediciones.

La tasa de fecundación es una medida en porcentaje utilizada para conocer la cantidad de ovocitos fecundados por los espermatozoides y permite saber si se continúa con la incubación de los huevos.

La tasa de flotabilidad es una medida en porcentaje que refleja la hidratación de los ovocitos en agua de mar, la cual, en el océano, es necesaria para su supervivencia y dispersión. Los huevos flotantes muestran un mejor desarrollo ovocitario y tasas de supervivencia más altas que los huevos no flotantes (Carrillo y Zanuy, 1993).

La tasa de eclosión es una medida en porcentaje utilizada para conocer la cantidad de huevos eclosionados y permite evaluar si realiza el cultivo larval.

Para calcular la tasa de fecundación se divide el número de huevos fecundados por el número de huevos totales; la flotabilidad se mide usando una probeta de 1000 ml dependiendo de la cantidad del desove y se mide los huevos flotantes de los no flotantes. Para evaluar la tasa de eclosión, se incuban por triplicado 50 huevos en un vaso de precipitado de vidrio de 1000 ml de capacidad a la temperatura de puesta, luego se divide el número de larvas eclosionadas normales por el número de huevos incubados. En la tabla 5 se puede observar criterios biológicos utilizados para estimar la calidad de los huevos de peces. Por otro lado, también se puede evaluar la calidad del desove mediante un análisis bioquímico de ovocitos no fecundados (Avilés, 2006), principalmente se observa la composición de ácidos grasos esenciales: ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y

ácido docosahexaenoico. Estos ácidos grasos están directamente relacionados con los procesos de pigmentación, producción de prostaglandinas, respuesta inmunológica, desarrollo retinal, entre otras, afectando el desarrollo embrionario y la supervivencia larval.

Tabla 5: Evaluación de la calidad del desove inducido de peces marinos mediante la

ESPECIE	FECUN. (%)	FLOTA. (%)	ECLOS. (%)	FUENTE
<i>Dicentrarchus labrax</i>	35	70	20	Zanuy <i>et al.</i> (1995)
<i>Paralichthys adspersus</i>	80	90	70	Silva y Oliva (2010)
<i>Epinephelus marginatus</i>	44	-	40	Marino <i>et al.</i> (2003)
<i>Anguilla anguilla</i>	72	90	15	Vílchez (2013)
<i>Lutjanus argentiventris</i>	23	-	20	Esquer (2012)

tasa de fecundación, flotabilidad y eclosión.

2.6. Sistemas de recirculación acuícola (SRA) de agua de mar

Actualmente, la acuicultura a nivel mundial se encuentra en pleno crecimiento. Cada vez se va diversificando e incorporando mayor cantidad de organismos a los cultivos, desarrollando esta actividad en lugares en los cuales antes no se pensaba que se podía hacer. Uno de los cambios más significativos para la producción de peces, es la intensificación de los cultivos, utilizando tecnología como los sistemas de recirculación de agua (SRA) para optimizar el uso y la calidad de la misma (Zohar, 1989). Otro de los cambios más significativos para la producción de peces, es el manejo de los reproductores, teniendo mayor control de los peces en SRA. El tratamiento del agua bajo los SRA se enfoca en: la remoción de sustancias tóxicas e inertes para las especies dentro del cultivo, y la eliminación de agentes patógenos y de gases como el CO₂ que generan alteraciones fisiológicas en las especies en cultivo (Benetti *et al.*, 2008). En la Tabla 6 se presentan las ventajas y desventajas respecto a la utilización de tecnología en el tratamiento del agua.

Un sistema de recirculación consiste en los siguientes componentes: tanques de agua para los peces, unidad de tratamiento del agua (biofiltro, UV, filtros mecánicos, degasificador, *skimmer* de proteínas), bombas de succión y descarga del agua, y tuberías para el suministro y retorno la misma (Timmons *et al.*, 2002).

Tabla 6: Ventajas y desventajas de los sistemas de recirculación de agua (SRA) en el cultivo de peces marinos.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Monitoreo y control constante de parámetros físico-químicos y sanitarios del agua	Necesidad de mano de obra calificada
Reutilización del agua	Poco accesible por el alto costo
Mayor densidad de cultivo	Mayor riesgo de producción

En los SRA el agua permanece contenida circulando a través del sistema generando un ambiente controlado, y solo un pequeño porcentaje de agua es recambiado diariamente. Dentro de los parámetros físico-químicos monitoreados y controlados, se encuentra: la temperatura (°C), salinidad (ppt), pH, alcalinidad (CaCO₃ mg.l⁻¹), composición química y oxígeno disuelto (mg.l⁻¹); los residuos sólidos como el alimento y las heces son filtrados y removidos. En cuanto a los compuestos nitrogenados, el biofiltro se utiliza para la conversión biológica del nitrógeno amoniacal a nitrato, el cual se acumula y tiene que ser removido del sistema (Timmons *et al.*, 2002). En la Tabla 7 se observan los parámetros físico-químicos presentados dentro del cultivo experimental en sistemas de recirculación de agua.

Tabla 7: Parámetros físico-químicos en sistemas de recirculación de peces.

PARÁMETROS	ESPECIE		
	<i>Salvelinus alpinus</i>	<i>Sparus aurata</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Temperatura (°C)	11,00	19,00	22,00
pH	8,01	7,97	7,89
Salinidad (ppt)	22,00	33,00	33,00
DO (%)	11,02	6,52	7,03
NAT	0,20	0,30	0,30
NH ₃ -N (mg L ⁻¹)	0,008	0,100	0,100
NO ₂ -N (mg L ⁻¹)	0,00	0,00	0,00
NO ₃ -N (mg L ⁻¹)	0,00	0,01	0,01
Flujo (L min ⁻¹)	3,00	4,00	4,00
Recambio (% día ⁻¹)	5,00	15,00	15,00
Autor	Isla, 2007	Isla <i>et al.</i> , 2006	Isla <i>et al.</i> , 2006

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y período de ejecución

La fase pre experimental, la fase experimental, los análisis de laboratorio y evaluación de los resultados se desarrollaron en el laboratorio de cultivo de peces marinos del Centro de Investigaciones Acuícolas (C.I.A.) Von Humboldt en el Instituto del Mar del Perú. Todas las muestras fueron obtenidas bajo la colaboración del Instituto del mar del Perú (IMARPE), entidad que pertenece al Ministerio de la Producción, durante los meses de Abril a Diciembre del año 2015.

3.2. Etapas

La presente investigación comprendió dos etapas: la pre-experimental (3 meses) y la experimental (9 meses).

3.2.1. Etapa pre-experimental

La fase pre-experimental (3 meses) se basó en la colecta, la selección y el acondicionamiento a los sistemas de cultivo de 60 organismos de *P. humeralis* con una talla mínima de 20 cm provenientes de La Punta (Callao) (12.0708° S, 77.1643° W).

a. Colecta y transporte de ejemplares

Para formar el plantel de reproductores se coordinó con pescadores artesanales de La Punta (Callao). Se verificó que las condiciones meteorológicas del clima y del mar (marea, viento y oleaje) sean las adecuadas, así como las condiciones atmosféricas (lluvias) *in situ* reportadas por los pescadores artesanales en la zona de captura. La logística correspondiente se planeó con dos días de anticipación.

Las condiciones del mar se verificaron diariamente en la zona de playa (litoral rocoso, de preferencia canto rodado) y con la asistencia de los pescadores artesanales se decidió el lugar e inicio de las capturas. Se necesitaron 15 días para la conformación del plantel de reproductores (60 peces).

El arte de pesca fue mediante el uso de la red “atarraya”, cada vez que un pez era extraído, inmediatamente se colocaba en un tanque de 100 l con un difusor de aire para mantener la aireación constante. Se utilizó un acondicionador de agua “AQUASAFE” (5 ml/40 l) y 0,33 g.l⁻¹ de piedras zeolita para disminuir el estrés en los peces.

Colectados los peces, se procedió al traslado de los ejemplares hasta las instalaciones de IMARPE. Durante el trayecto, se realizaron recambios del 50% del agua para reducir el estrés generado por la captura y el transporte. El oxígeno se mantuvo por encima de 5 mg.l⁻¹. Este proceso realizó durante el mes de enero del año 2015 (20 días) hasta alcanzar 60 peces reproductores de cabrilla.

En el laboratorio de cultivo de peces marinos del C.I.A. Von Humboldt en el Instituto del Mar del Perú, los peces se colocaron en tanques de 2,5 m³ de capacidad, cubiertos con geomembrana de color negro a una biomasa de 2 kg.m⁻³ (Figura 4).



Figura 4: Laboratorio de cultivo de peces marinos del C.I.A. Von Humboldt en el Instituto del Mar del Perú.

b. Selección y desparasitación

En la etapa pre experimental del proyecto se seleccionaron 60 peces con una talla mínima de 20 cm y un peso mínimo de 150 gr. La selección de los peces se realizó en base al peso, la talla y condiciones sanitarias como ausencia de parásitos externos visibles, lesiones por la pesca ó manchas de *Vibrio sp.* Una vez realizado el proceso de selección se procedió a la desparasitación de los organismos reproductores, evitando patologías que pudiesen generar estrés durante el proceso de maduración sexual en la etapa experimental del proyecto.

- **Selección**

Se llenó una batea de 80L con 40L de agua de mar, luego se colocó 3,2 ml de una solución anestésica (50 % aceite de clavo: 50 % alcohol al 96 %). Se colocaron a los peces con un máximo de 6 individuos por vez, y luego de tres minutos, cuando los organismos perdían la capacidad natatoria, se empezaba la selección. Los peces fueron pesados en una balanza de 5kg marca Mettler Toledo con 5g de precisión y medidos con un ictiómetro, registrandose la información en cm. Se seleccionaron los peces que presentaron escamas completas, aletas en buen estado, capacidad natatoria normal y ninguna laceración en el cuerpo, por otro lado se separaron a los peces que no cumplían con estas características. Los peces fueron colocados en los tanques de cultivo de dos metros cúbicos de capacidad.

- **Profilaxis preventiva y Desparasitación**

Baño profiláctico:

A los tanques de cultivo se les bajó el nivel de agua hasta dejarlos con 40 cm de columna de agua. Luego se procedió a realizar un flujo continuo del agua dentro de los tanques con agua dulce, manteniendo el nivel del agua a 40 cm durante 15 minutos. En todo momento los peces fueron observados y se aseguró que los tanques queden aislados del sistema de recirculación (SRA). Luego de 15 minutos se permitió un flujo abierto del agua por 10 minutos con agua de mar y se procedió a llenar los tanques hasta los 90 cm para incorporarlos de nuevo al sistema de recirculación. Este procedimiento se programó mensualmente y se empleó en baños profilácticos de desparasitación.

Baño con formol:

Se aplicaron baños con formol dentro de los tanques de cultivo a una concentración de 100 ppm de formol durante una hora por tres días consecutivos sin dar alimento. Primero se aislaron del sistema de recirculación los tanques de cultivo para no matar las bacterias del biofiltro. Luego, se bajó el nivel de agua de los tanques hasta quedar con 40 cm de columna de agua para aplicar la concentración de formol correspondiente al agua. Durante este proceso se mantuvo la aireación constante. Terminando el periodo y para eliminar los rastros de formol se mantuvo un flujo abierto de la entrada de agua y desagüe abierto por 10 minutos utilizando agua de mar filtrada a 100 μm ; luego se procedió a llenar los tanques hasta los 90 cm para incorporarlos de nuevo al sistema de recirculación.

c. Acondicionamiento de peces reproductores al cautiverio

El proceso de acondicionamiento demoró tres meses y se basó principalmente en la aclimatación foto-térmica de los peces a los sistemas de cultivo (SRA) y la aceptación del alimento suministrado (anchoveta). Las cabrillas fueron colocadas a la misma temperatura de la que provinieron (17°C) y el sistema de iluminación se programó 12L : 12O con diferentes intensidades de luz: a las 6:00am (800 lux), de 10:00am a 2:00pm (2400 lux) y a las 6:00 pm (800 lux).

La alimentación durante el acondicionamiento se basó en anchoveta descongelada y eviscerada, sin la cabeza y cola en trozos de aproximadamente dos cm a una ración del 0,5% correspondiente a la biomasa de cada tanque de cultivo. Antes de suministrar los trozos de anchoveta a los tanques, éstos fueron enjuagados con agua dulce para evitar deteriorar la calidad del agua. Los trozos no consumidos fueron retirados mediante un sifón 2 horas después de haber alimentado y fueron pesados. Este proceso se realizó por 3 meses hasta lograr la aceptación constante del alimento por todos los peces.

d. Marcaje con identificador electrónico

Se anestesiaron a los peces con una solución de 50 % aceite de clavo: 50 % alcohol al 96 % a una concentración de 3,2 ml/40 l. Una vez anestesiados los peces se limpió con un algodón con yodo la zona lateral izquierdo a la altura de la espina

dorsal para realizar un corte de 1 cm con la ayuda de una hoja bisturí entre las aletas dorsal y la línea lateral. Realizado el corte se introdujo lentamente una aguja embonada en ángulo de 45° con el identificador debajo de la piel del pez empujando el émbolo completamente, seguidamente se retiró la aguja la cual se desinfectó nuevamente con yodo para el siguiente organismo.

e. Régimen de temperatura y horas de luz

La temperatura del agua que se utilizó para estimular el desarrollo gonadal se basó en simular las condiciones naturales térmicas del mar a lo largo de un año, aplicando un ciclo de temperatura artificial (Tratamiento 1) y otro artificial comprimido (Tratamiento 2) (Tabla 8). La temperatura se controló con ayuda de una bomba de calor marca AQUA LOGIC. Este régimen de temperatura está basado en las temperaturas promedio registradas estacionalmente de la zona de captura. El fotoperiodo que se aplicó para estimular el desarrollo gonadal se basó en simular las condiciones naturales de la intensidad y horas luz a lo largo de un año, aplicando un ciclo de luz artificial (Tratamiento 1) y otro artificial comprimido (Tratamiento 2) (Tabla 8). El fotoperiodo se basó en las horas luz y de oscuridad registradas estacionalmente en la costa central del Perú.

Tabla 8: Horas luz y Temperatura (°C) promedio superficial del mar mensual de La Punta, Callao (Tratamiento 1) y propuesta de manejo de horas luz y temperatura (Tratamiento 2).

Foto-termoperiodo	Meses año 2015											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Artificial (Tratamiento 1)												
Horas luz: Horas oscuridad	13:11	13:11	12:12	12:12	11:13	11:13	11:13	12:12	12:12	12:12	13:11	13:11
Temperatura	22	23	22	21	20	19	18	17	18	19	20	21
Artificial comprimido (Tratamiento 2)												
Horas luz: Horas oscuridad	13:11	12:12	11:13	11:13	11:13	12:12	13:11	12:12	11:13	11:13	11:13	12:12
Temperatura	23	21	19	17	19	21	23	21	19	17	19	21

Fuente: SENAMHI, 2015 (2005-2014).

3.2.2. Etapa experimental

Los sistemas de recirculación de agua de mar (SRA) empleados fueron similares para ambos tratamientos (régimenes de foto-termoperiodo) (Figura 5). Los tanques de cultivo eran de forma cilíndrico vertical, lisos, revestidos con resina polimérica reforzada con fibras (FRP), resistente a corrosión y agua de mar (Figura 6).

El fondo presentaba una ligera pendiente hacia el centro donde se ubicaba el desagüe. El color era celeste en el interior y blanco exterior. Las dimensiones eran: 1,74 m diámetro interno, 1,80 m diámetro externo, 1,00 m altura de cuerpo. Poseían un volumen total aproximado de 2,5 m³ y una capacidad efectiva de 1,96 m³. En la parte interna, en el centro, se encontraba un tubo cribado de 3,5” cubierto con malla mosquitera, para así evitar el paso de sólidos al SRA. Los tanques contaban con una entrada de agua de 2” y un desagüe de 4”.

Cada tanque tenía una piedra difusora de 18 cm de longitud con manguera de aire de silicona de 3/16”.

a. Sistema de recirculación acuícola (SRA) de agua de mar

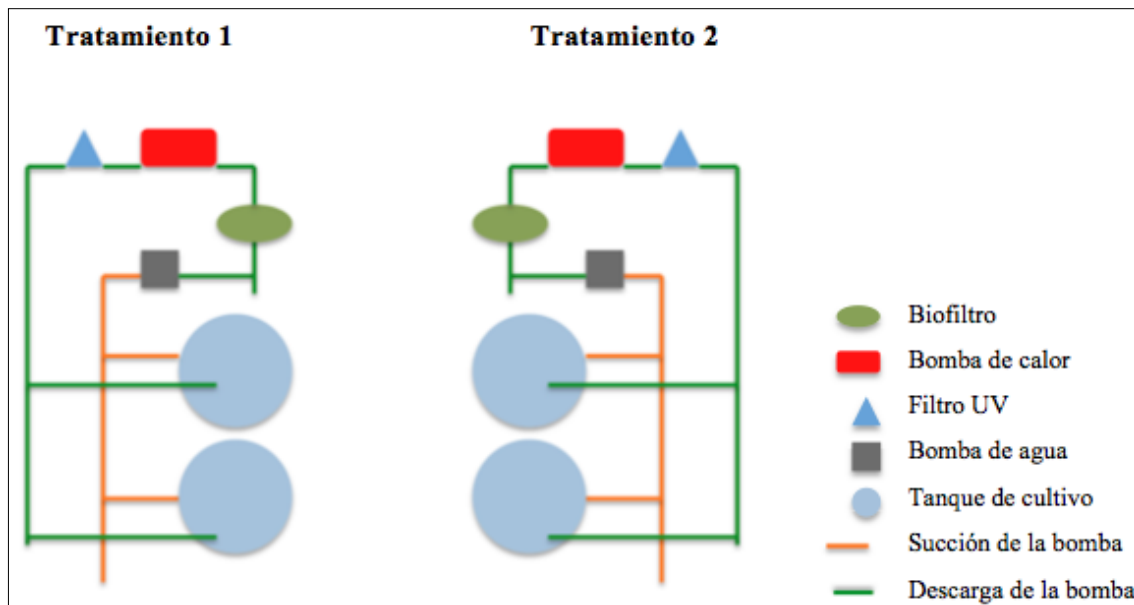


Figura 5: Esquema de los componentes del sistemas de recirculación de agua de mar empleado.

Otro componente eran los cobertores de los tanques y la estructura de soporte. Este es un armazón de acero inoxidable de 1,2 m de altura, se fija en las paredes internas del tanque para dar la forma cónica o piramidal deseada con anclajes o soportes tipo uña apoyados sobre el borde superior del tanque. Presentaba una cobertura de geomembrana de polietileno de alta densidad (HDPE) de color negro de 0,5 mm de espesor para tanques de fibra de vidrio de 1,0 m Ø, sobre una estructura cónica de acero inoxidable sin elementos que generen oxidación, el largo del cobertor es de 2 m. En la parte lateral se presentaba una abertura con un traslape de 30 cm para acceder al interior. La estructura contaba con un sistema de iluminación dispuesto en la parte interna con un temporizador que permitía el encendido y apagado automático con regulación de intensidades, las luces se encontraban ancladas al soporte de acero inoxidable del cobertor mediante cables de acero inoxidable. Los cables, la caja de control, las conexiones, la programación y el anclaje se dieron según el modelo dado.

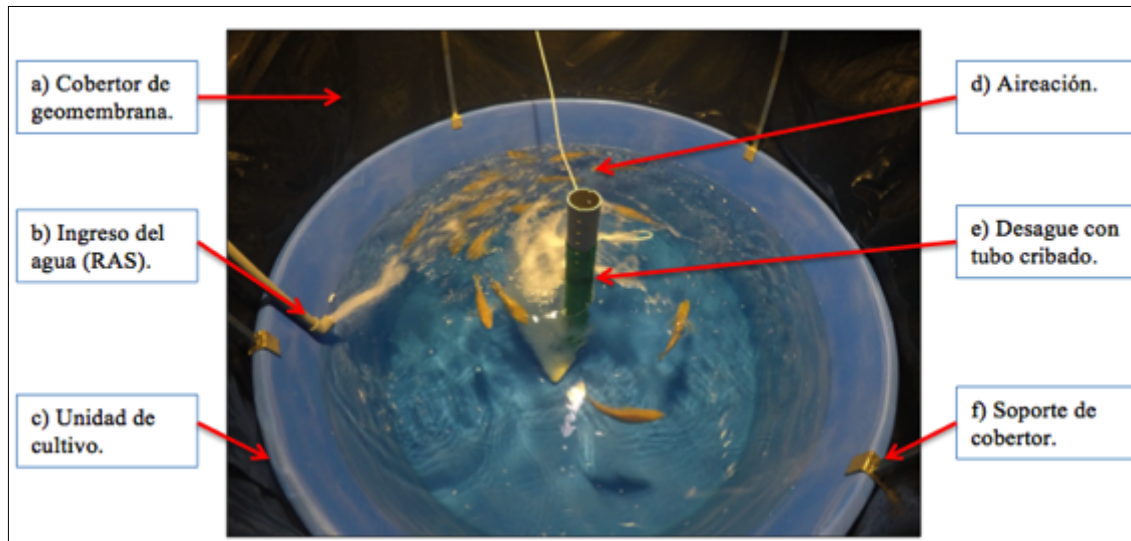


Figura 6: Unidad de cultivo con peces reproductores acondicionados de *P. humeralis*. Componentes: a) Cobertor de geomembrana; b) Ingreso del agua (RAS); c) Unidad de cultivo; d) Aireación; e) Desague con tubo cribado; f) Soporte de cobertor.

El agua del SRA era impulsada por una bomba de agua de mar PM26/MD55RLT marca IWAKI de 1/2 Hp a través de una tubería de 2" a 1" hacia un biofiltro marca AQUACULTURE para transformar el nitrógeno amoniacal total (NAT) producido por los organismos cultivados en nitrato, ya que éste es el componente menos tóxico. Desde el biofiltro el agua circulaba a través de una bomba de calor marca AQUA LOGIC que permitía mantener estable la temperatura. Finalmente, el agua pasaba a través de un esterilizador ultravioleta marca EMPEROR AQUATICS para mantener un control del crecimiento microbiano dentro de los sistemas de cultivo.

b. Evaluación de parámetros fisicoquímicos

Se registró diariamente la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), el oxígeno disuelto ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y el pH de los tanques de cultivo utilizando un Multiparámetro marca YSI 650 MDS. Este procedimiento se realizó a las 2:30pm. También se registró semanalmente utilizando kits comerciales el nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos ($-\text{NO}_2$) y nitratos ($-\text{NO}_3$), con la finalidad de mantener la calidad del agua y realizar los recambios de agua correspondientes (10 a 15%).

c. Manejo, evaluación y alimentación de los peces

La alimentación durante la etapa experimental se basó en anchoveta descongelada y eviscerada, sin cabeza y cola en trozos de aproximadamente dos cm a una ración *ad libitum*, dependiendo del consumo del alimento por los organismos. Antes de suministrar los trozos de anchoveta a los tanques, estos fueron enjuagados con agua dulce para evitar el ingreso de partículas chicas de alimento que no puedan ser consumidas.

Una vez enjuagado el alimento se adicionó un suplemento nutricional previamente encapsulado dentro de los trozos de la anchoveta. La administración de estas se basó en el suplemento comercial Nutrabrood® para reproductores de lenguado de california; se proporciona 1-4 ml x kg de alimento a una ración de tres veces a la semana, tres meses antes del periodo reproductivo (Tabla 9). La aplicación de las cápsulas fue incrementando hacia el periodo reproductivo de 1 a 3 veces por semana. La composición del suplemento para formular 96 cápsulas se detalla a continuación:

Tabla 9: Composición de suplemento nutricional para dieta de reproductores basado en el suplemento *Nutra brood* de lenguado de California.

INSUMO	CANTIDAD
Aceite de pescado SGS ®	4 ml
Cápsulas de Gerioox ®	4
Vitamina E	4 gr
Vitamina C	4 gr
Premix vitamínico	13 gr

SGS= Empresa General de Vigilancia (Société Générale de Surveillance).

Gerioox= Geriatrico Destinado a Caninos y Felinos.

d. Evaluación del estadio ovocitario y la calidad espermática

- **Muestreo Biométrico**

Se bajó el nivel de agua de las unidades de cultivo y luego se procedió a capturar a los peces con un carcal. Estos se colocaron en tanques de agua de 300 l con la misma agua de las unidades de cultivo y aireación a una proporción de 15 cabrillas por tanque. Después de retirar a las cabrillas, se realizó la limpieza de las unidades de cultivo con la ayuda de una esponja embebida con hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración de 10 % para poder limpiar la suciedad de las paredes. Se lavaron los tanques, los tubos cribados y la entrada de agua. También se cambiaron las piedras difusoras por unas limpias y se limpiaron las mangueras de aire. Al final los tanques se enjuagaron con agua de mar por 10 minutos para eliminar trazas del desinfectante y proceder a llenarlos nuevamente con agua del reservorio.

Previo a los muestreos se llenó una batea de 80 l con 40 l de agua de mar y se colocó 3,2 ml de una solución anestésica (50 % aceite de clavo: 50 % alcohol al 96 %). Una vez listo el anestésico se colocaron un máximo de 6 individuos por vez dentro de la batea y se esperó a que los peces pierdan la capacidad natatoria para dar inicio a la biometría. Una vez anesteciados (5 min) se pesaron con una balanza digital marca Mettler Toledo de 5 kg y fueron medidos con un ictiómetro (cm); asimismo se realizaron las biopsias ovárica (con cánulas) y la extracción seminal (con una micropipetas de 100 a 200 μ l) y la extracción de la sangre de los organismos seleccionados, con una jeringa de tuberculina conteniendo una gota de EDTA (Figura 7). Inmediatamente después los peces fueron regresados a los tanques de cultivo ya llenos con agua de mar del reservorio, para su recuperación.

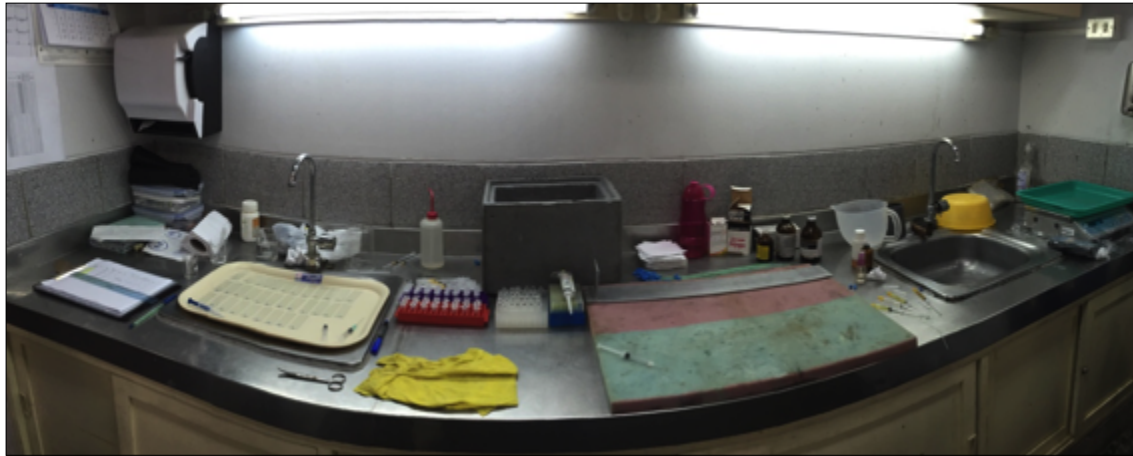


Figura 7: Mesa de muestreo para biometrías, biopsia ovárica, colecta de esperma, extracción de sangre e inducción hormonal.

- **Biopsia ovárica**

Para realizar la biopsia ovárica, previamente al proceso, a cada hembra se le limpió con algodón seco el área alrededor del poro urogenital para así, introducir aproximadamente 10 cm de una cánula de 40 cm de largo con un diámetro interno de 0,86 mm y externo de 1,20 mm. Al otro extremo de la cánula se colocó una jeringa sin aguja de 3 ml para succionar una muestra de los ovocitos. Cuando se observaron huevos dentro de la cánula, se retiró la jeringa para parar la succión y poder sacar la cánula del pez sin maltratarlos. Luego se colocaron los ovocitos en una lámina portaobjeto previamente rotulada con el código correspondiente al pez. Se agregó una gota de solución salina para observar de forma preliminar la calidad ovocitaria. Los ovocitos colectados fueron analizados mediante el siguiente procedimiento:

Las láminas fueron observadas en un microscopio trinocular marca LEYCA con cámara (modelo DFC-290 HD) a un aumento de 100x, utilizando el contraste de fase (PH1, PH2) y un contómetro donde se cuantificó el número de ovocitos, basándose en la descripción de Hunter y Macewicz (1985). De acuerdo a la presencia y proporción de los diferentes tipos de ovocitos, inmaduro, pre-vitelogénico, vitelogénico, maduro, hidratado u ovocitos en degradación celular (denominados atrésicos), se identificó el estadio de madurez ovocitario (Anexo 1). Luego se registraron las observaciones en la ficha correspondiente. También se obtuvieron las imágenes de las muestras utilizando el programa de imágenes

NIKON NIS ELEMENT con el cual se pudo obtener el promedio del tamaño de los ovocitos. Para esto se realizaron mediciones del diámetro de 50 ovocitos ($> 0,10$ mm) elegidos aleatoriamente de cada muestra, de las cuales se obtuvo un promedio.

- **Extracción seminal**

Para la extracción seminal se limpió con algodón el área alrededor del poro urogenital de cada ejemplar. Luego realizó un masaje abdominal de la cabeza hacia la cola para lograr la expulsión del semen. Se colectaron $10 \mu\text{L}$ de semen con una micropipeta. Las muestras fueron colectadas en tubos Eppendorf de $1,5$ ml conteniendo $90 \mu\text{l}$ de solución salina al $0,9\%$, formando así la solución espermática. Las muestras fueron almacenadas progresivamente en una cámara de frío a 5°C . Luego se extrajo $10 \mu\text{L}$ de la solución espermática y se colocó en un pocillo de la placa de cultivo conteniendo $190 \mu\text{L}$ de solución salina para obtener la dilución 1 (Figura 8).

La concentración espermática fue evaluada mediante la metodología propuesta por Linhart *et al.* (1995). Se extrajo $10 \mu\text{L}$ de la primera dilución (D1) y se colocó en un pocillo de la placa de cultivo conteniendo $90 \mu\text{L}$ de solución salina para obtener la dilución 2 (D2). De aquí se tomó una alícuota de la D2 con una micropipeta y se colocó en una cámara de Neubauer para observar el número de espermatozoides al microscopio a un aumento de $400\times$. El conteo de los espermatozoides se realizó utilizando un contómetro donde se evaluaron 3 campos diferentes. Cada conteo se realizó por triplicado, una vez obtenidos los promedios se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración espermática (esp.ml}^{-1}\text{)} = N \times 5 \times 10^8$$

Donde:

N = promedio del número de espermatozoides

La motilidad espermática se observó utilizando la metodología propuesta por Linhart *et al.* (1995). Se extrajo por muestra $10 \mu\text{L}$ de D1 y se colocó en un pocillo de la placa de cultivo conteniendo $90 \mu\text{L}$ de agua de mar microfiltrada y

esterilizada (AMFE) (Figura 8). La motilidad se midió utilizando una cámara de Neubauer observada al microscopio a un aumento de 400X. Se contaron los espermatozoides móviles y no móviles y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Motilidad} = (\text{espermatozoides móviles} / \text{espermatozoides totales}) \times 100$$

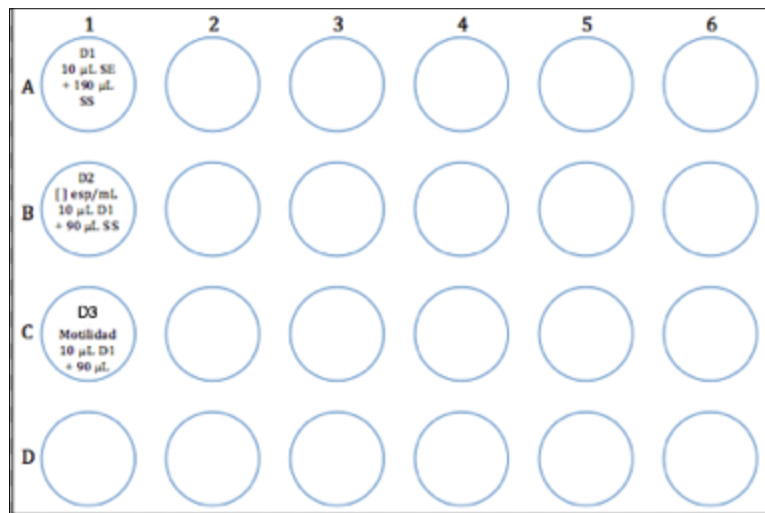


Figura 8: Pocillos para las diluciones de concentración y motilidad espermática. AMFE: agua de mar microfiltrada y esterilizada.

e. Cuantificación de vitelogenina y 11ketotestosterona en plasma

- **Cuantificación de vitelogenina (VTG) mediante ELISA**

Según el método propuesto por Prat *et al.* (1999) se extrajo mensualmente 1 ml de sangre de la vena caudal de tres ejemplares hembra por tanque, totalizando seis organismos por tratamiento durante seis meses (abril a septiembre 2015) con una jeringa de 1ml de tuberculina heparinizada (5,000 UI.ml⁻¹) (Figura 9). La sangre fue colectada en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante diez minutos a 4°C para separar el plasma de la sangre. El sobrenadante (plasma) fue transferido a un tubo limpio Eppendorf de 1,5 ml y almacenado en un ultra congelador a -80°C marca LabTech modelo LDF-8517 hasta la determinación de vitelogenina sérica.

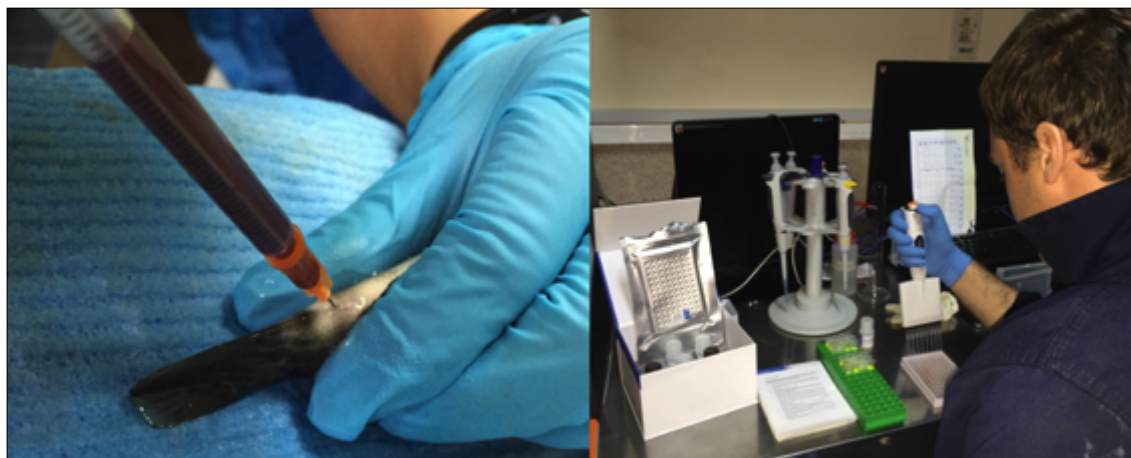


Figura 9: Extracción de sangre y cuantificación de VTG y 11KT en plasma de *P. humeralis*.

La concentración de vitelogenina sérica se determinó mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando un kit de vitelogenina comercial marca CUSABIO “Grouper Vitellogenin (VTG) ELISA Kit-CSB14116Fh” (Anexo 2).

La lectura de la reacción ELISA se realizó con un lector de microplacas marca Varian ajustado a 450 nm. Con los resultados se construyó la curva de calibración a partir de las absorbancias obtenidas y concentraciones de vitelogenina estándar utilizadas. Se calculó el coeficiente de correlación (R^2) y la ecuación de la recta (Anexo 4). Como resultado de la absorbancia de las muestras y la ecuación de la recta obtenida se obtuvieron las concentraciones de VTG existentes en el plasma analizado expresado en $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

- **Cuantificación de 11ketotestosterona mediante ELISA**

De acuerdo a la metodología de Prat *et al.* (1999) se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre mediante una jeringa de 1ml de tuberculina heparinizada (5,000 UI/ml) de la vena caudal de tres ejemplares macho por tanque, siendo seis organismos por tratamiento durante seis meses (abril a septiembre 2015). La sangre fue colectada en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante diez minutos a 4°C para separar el plasma de la sangre. El sobrenadante (plasma)

fue transferido a un tubo limpio Eppendorf de 1,5 ml y almacenado en un ultra congelador marca LabTech modelo LDF-8517 a -80°C hasta su posterior uso.

La concentración de 11KT se determinó mediante pruebas inmunoenzimáticas en placas de microtitulación (sándwich de doble anticuerpo ELISA) utilizando un kit de testosterona comercial marca CUSABIO “Fish 11-keto-testosterone (11-KT) ELISA-MBS269932” (Anexo 3).

La lectura de la reacción ELISA se realizó con un lector de microplacas ajustado a 450 nm. Con esto se construyó la curva de calibración a partir de las absorbancias obtenidas y concentraciones de 11KT estándar utilizadas. Se calculó el coeficiente de correlación (R^2) y la ecuación de la recta (Anexo 4). Como resultado de la absorbancia de las muestras y la ecuación de la recta obtenida se obtuvieron las concentraciones de 11KT existentes en el plasma analizado expresado en $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

f. Inducción al desove

- **Prueba de hormonas**

La reproducción en las hembras de teleósteos está controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Donaldson, 1973 en Carrillo *et al.*, 1995). Este mecanismo secuencial permite la intervención en varios niveles para promover o interferir en el proceso de maduración. En tal sentido, haciendo referencia a la bibliografía del género *Paralabrax* se hizo una prueba previa, donde se probaron tres hormonas: GnRH α (Szabó *et al.*, 2002), LHRH α (Oda *et al.*, 1993) y HCG (Chen *et al.*, 1977) a concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 1500UI/kg respectivamente, para así, observar la hormona con mejor incidencia en la maduración y el desove de la cabrilla *Paralabrax humeralis*.

Durante el muestreo biométrico mensual se seleccionaron tres hembras con un diámetro de ovocitos entre 450 a 550 μm y seis machos con motilidad espermática mayor al 90%. Se colocaron los machos y las hembras a una relación 2:1 respectivamente en tanques estáticos de 200L a una temperatura de 23°C.

Para la inducción hormonal, se procedió a anestesiar a los peces como se describe en puntos anteriores, una vez anestesiados se pesaron en una balanza marca Mettler Toledo de 5 kg y se aplicó la concentración de hormona correspondiente de forma intramuscular en la zona lateral izquierdo a la altura de la espina dorsal. Durante las siguientes 48 horas se observó cada 2 a 6 horas el crecimiento del vientre en las hembras seleccionadas, si habían ovocitos fecundados o no fecundados en los tanques de cultivo y se efectuó la fecundación artificial colectando los huevos y esperma por el método de *stripping*.

- **Dosis de hormona empleada**

En base a las características mencionadas en el punto anterior, la hormona que presentó mejor incidencia en la maduración y el desove de la cabrilla *Paralabrax humeralis* fue considerado el análogo de la Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH_a). En tal sentido se probó de menor a mayor concentración la hormona seleccionada (1, 2, 2,5, 3, 5 y 7 μg/kg) con la finalidad de establecer la dosis adecuada. A esto, se agregó la mitad de la concentración de GnRH_a empleada con domperidona para evitar la acción de la dopamina en la cascada hormonal (Anexo 5) (Suwa y Yamashita, 2007).

g. Evaluación de la calidad del desove

- **Desove y porcentaje de flotabilidad:**

Los huevos fueron colectados de las unidades de cultivo utilizando una malla de 500 μm y colocados en baldes de 20 L. También se colectaron ovocitos por el método de *stripping* utilizando un vaso precipitado de 500 ml seco y estéril. En ambos casos, se utilizó una probeta de 1 L para separar mediante flotabilidad los huevos viables (superficie) de los no viables (fondo) (Cerdá *et al.* 1994).

Una vez colectados los ovocitos viables se procedió a la limpieza de los mismos. Para esto, los huevos colectados fueron colocados por 10 minutos en un balde de 10 L agua de mar filtrada y esterilizada con 100 ppm de yodo. Luego, fueron enjuagados con agua de mar filtrada a 1 μm y esterilizada. En todo momento los

ovocitos se mantuvieron en contacto con el agua de mar. Una vez limpios, los ovocitos fueron sembrados en tanques de 300 l a una densidad de 3,000 huevos/l¹.

- **Fecundación:**

La fecundación se registró contando por triplicado los huevos fecundados y no fecundados de una muestra de 50 huevos extraídos de las hembras muestreadas utilizando un microscopio trinocular marca LEYCA. El porcentaje de fecundación se calculó mediante una regla de tres simple. El porcentaje de fecundación se clasificó como bueno cuando fue mayor al 80% (Cerdá *et al.*, 1994).

- **Porcentaje de eclosión:**

Para evaluar la eclosión se utilizaron tres vasos precipitado de 500 L, donde se colocaron 50 ovocitos fecundados por unidad con aireación. Después de 48 horas se contaron los ovocitos eclosionados y los no eclosionados. El porcentaje de eclosión se calculó utilizando el promedio de los conteos de ovocitos viables y no viables de los tres vasos precipitado mediante una regla de tres simple. El porcentaje de eclosión se clasificó como bueno cuando fue mayor al 50% (Cerdá *et al.*, 1994).

- **Índice de Actividad de Supervivencia (SAI):**

Para evaluar la calidad larval se midió el SAI, este índice expresa la actividad larval y la tolerancia a la inanición. Se colocaron por triplicado 30 larvas en un vaso de precipitado de 1 L y se registró la mortalidad acumulada. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$SAI = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^k (N - h_i) * i$$

Dónde N es el número total de larvas, hi es la mortalidad acumulada y k es el número de días transcurridos hasta la mortalidad total en inanición. (Carrillo *et al.*, 1995).

3.3. Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental se basó en comparar dos tratamientos, al Tratamiento 1 se aplicó un foto-termoperiodo artificial y al Tratamiento 2 un foto-termoperiodo artificial comprimido. Se colocaron 15 peces por unidad de cultivo, siendo 30 peces por tratamiento (repeticiones). El experimento tuvo una duración de nueve meses entre abril y diciembre del año 2015. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico RStudio. Los parámetros físicoquímicos del agua que cumplieron con la prueba de normalidad Anderson-Darling ($p < 0,05$) se compararon con la prueba de t de Student (OD, pH, NAT, NO_2 , NO_3), la temperatura se evaluó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El desarrollo ovocitario, la concentración y la motilidad espermática y la concentración de vitelogenina y 11KT en plasma se analizaron mediante el análisis de Kolmogorov-Smirnov. Los indicadores para evaluar la calidad del desove como el porcentaje de flotabilidad, de fecundidad, de eclosión y el índice de Actividad de Supervivencia (SAI) se compararon utilizando la prueba t de student.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Análisis de los parámetros físico-químicos de la calidad de agua.

En la tabla 10 se muestran los parámetros físico-químicos obtenidos durante 9 meses de la parte experimental. Los parámetros OD, pH, NAT, NO₂ y NO₃ cumplieron con la prueba de normalidad Anderson-Darling ($p < 0,05$) y se compararon con la prueba de t de Student ($p < 0,05$). La temperatura, fue evaluada empleando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

4.1.1. Temperatura (°C)

La presente investigación contó con dos tratamientos, uno presentando un fotoperiodo artificial (T1) y otro artificial comprimido (T2). La temperatura del agua se reguló mensualmente en similitud con el régimen foto-térmico establecido (Tabla 8), hubieron diferencias significativas mensualmente entre los tratamientos ($p < 0,05$).

La temperatura del agua fue influenciada por: la programación del sistema SRA, recambios de agua y la temperatura del ambiente, cumpliendo con el rango de la temperatura establecido (Timmons *et al.*, 2002). El T1 (artificial) presentó un valor promedio mínimo de $17,61 \pm 0,51$ °C y máximo de $20,41 \pm 0,51$ °C, mientras que el T2 (comprimido) presentó un valor promedio mínimo de $17,71 \pm 1,08$ °C y máximo de $21,94 \pm 1,04$ °C (Tabla 10). La similitud en los datos en el mes de diciembre se debe a que las unidades de cultivo del tratamiento dos se unieron con el tratamiento uno en el SRA del tratamiento uno, considerando que los parámetros foto-térmicos eran iguales.

Tabla 10: Promedio y desviación estándar de los parámetros físico-químicos de la calidad de agua de reproductores de *Paralabrax humeralis* cultivados en sistemas SRA a dos diferentes foto-termoperiodo, durante nueve meses de experimentación.

MES	TEMPERATURA (°C)*		OXÍGENO DISUELTO (mg.l ⁻¹)		pH		NAT (mg.l ⁻¹)		NO ₂ (mg.l ⁻¹)		NO ₃ (mg.l ⁻¹)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Abril	20,41 ± 0,51 ^a	17,71 ± 1,08 ^b	7,07 ± 0,47 ^a	7,45 ± 0,34 ^a	7,26 ± 0,50 ^a	7,42 ± 0,45 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,08 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,02 ^a	0,15 ^a	0,15 ^a
Mayo	19,79 ± 0,36 ^a	19,25 ± 0,65 ^a	6,73 ± 0,54 ^a	6,76 ± 0,39 ^a	7,86 ± 0,13 ^a	7,79 ± 0,16 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,02 ^a	0,03 ± 0,02 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
Junio	19,54 ± 0,30 ^b	20,64 ± 0,21 ^a	7,22 ± 1,14 ^a	6,76 ± 0,72 ^a	7,60 ± 0,53 ^a	7,68 ± 0,37 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	0,02 ± 0,51 ^a	0,02 ± 0,53 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
Julio	18,57 ± 0,55 ^b	21,94 ± 1,04 ^a	6,84 ± 0,28 ^a	6,54 ± 0,30 ^a	7,60 ± 0,51 ^a	7,60 ± 0,58 ^a	0,15 ± 0,04 ^a	0,15 ± 0,04 ^a	0,02 ± 0,61 ^a	0,02 ± 0,56 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
Agosto	17,61 ± 0,51 ^b	21,37 ± 0,92 ^a	6,94 ± 0,63 ^a	6,50 ± 0,51 ^a	7,39 ± 0,68 ^a	7,55 ± 0,57 ^a	0,13 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,71 ^a	0,02 ± 0,47 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
Setiembre	18,04 ± 0,37 ^b	19,53 ± 0,48 ^a	7 ± 0,53 ^a	7,14 ± 0,36 ^a	7,35 ± 0,69 ^a	7,32 ± 0,75 ^a	0,13 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,81 ^a	0,02 ± 0,60 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
Octubre	18,78 ± 0,36 ^a	18,01 ± 0,85 ^a	6,66 ± 0,57 ^a	7,09 v 0,66 ^a	6,97 ± 0,90 ^a	7,21 ± 0,62 ^a	0,13 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,03 ^a	0,02 ± 0,91 ^a	0,02 ± 0,56 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
Noviembre	19,83 ± 0,11 ^a	19,22 ± 0,23 ^b	6,67 ± 0,16 ^a	6,75 ± 0,39 ^a	7,08 v 0,79 ^a	7,25 ± 0,56 ^a	0,01 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,03 ^a	0,02 ± 0,04 ^a	0,02 ± 0,13 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
Diciembre	20,13 ± 0,59 ^a	20,13 ± 0,59 ^a	5,91 ± 0,43 ^a	5,91 ± 0,43 ^a	7,75 ± 0,43 ^a	7,75 ± 0,43 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,04 ^a	0,02 ± 0,11 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a

Los tratamientos son: T1 (Foto-termoperiodo artificial) y T2 (Foto-termoperiodo artificial comprimido). Los datos corresponden al promedio (9 meses) ± desviación estándar. Los parámetros de OD, pH, NAT+, NO₂ y NO₃ cumplieron con la prueba de normalidad Anderson-Darling (p<0,05) y se evaluaron con la prueba de t de Student. La temperatura se evaluó empleando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis*.

La figura 10 muestra dos curvas (tratamiento 1 y tratamiento 2), en ambas se observan ligeras variaciones térmicas, esto se debe principalmente a los recambios de agua, en menor medida a la temperatura del ambiente y al sistema SRA (Timmons *et al.*, 2002). En el tratamiento 1 se observa un termoperiodo que empieza con un promedio de $20,41 \pm 0,51^{\circ}\text{C}$ y va descendiendo mensualmente una unidad térmica hasta el mes de agosto, alcanzando un valor promedio de $17,61 \pm 0,51^{\circ}\text{C}$, luego la temperatura vuelve a incrementarse de la misma manera hasta el mes de diciembre terminando con un valor promedio de $20,13 \pm 0,59^{\circ}\text{C}$. La temperatura del tratamiento 1 refleja una variación térmica similar a la ambiental (foto-termoperiodo artificial). Por otro lado las fluctuaciones térmicas de poca amplitud son reflejo del recambio de agua y el funcionamiento del sistema como se muestra en la Figura 10.

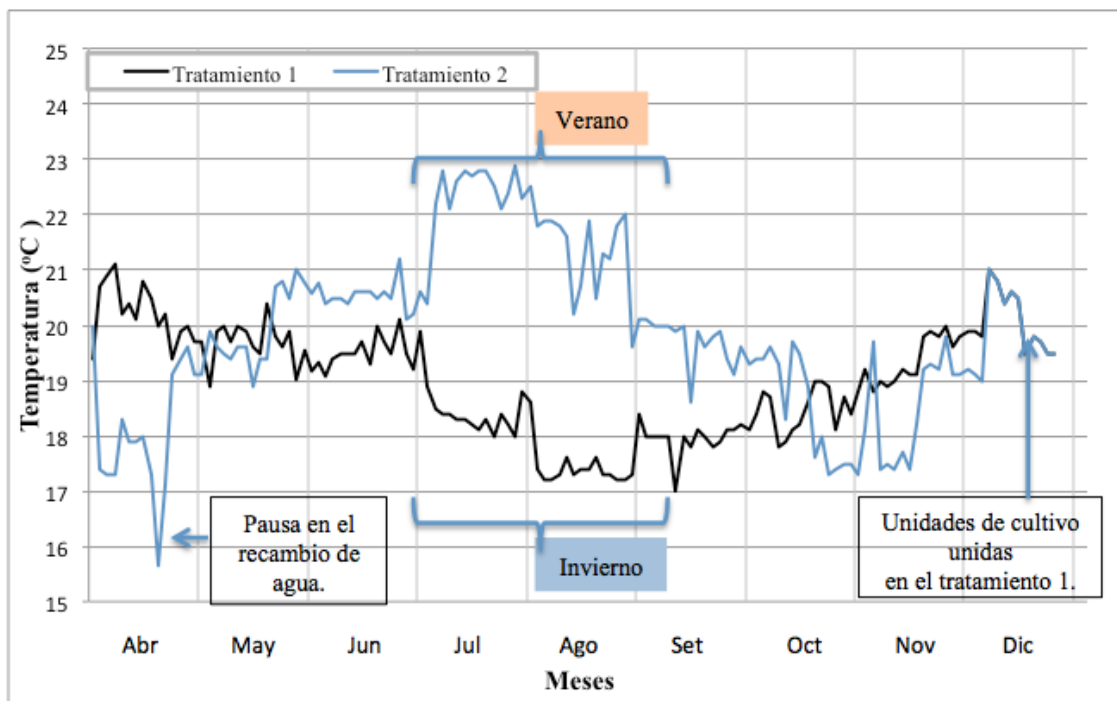


Figura 10: Temperatura del agua (°C) de los tratamientos 1 y 2, durante 9 meses de experimentación.

En el caso del tratamiento 2 se observa un termoperiodo en el mes de abril con un promedio de $17,71 \pm 1,08^{\circ}\text{C}$, la baja de temperatura en el mes de abril se debe a que la bomba de calor presentó un grado centígrado de variación dentro de las unidades de cultivo, la temperatura descendió debido a una pausa en los recambios de agua. En el mes de julio la temperatura promedio tuvo un valor máximo de $21,94 \pm 1,04^{\circ}\text{C}$. En este punto

se obtuvo la simulación térmica de la fase de verano. Luego en octubre, la temperatura promedio desciende hasta $18,01 \pm 0,85^{\circ}\text{C}$ y se vuelve a incrementar para diciembre hasta alcanzar los $20,13 \pm 0,59^{\circ}\text{C}$. El incremento térmico en el mes de noviembre se produjo debido a que las unidades de cultivo se aislaron del sistema SRA por mantenimiento, seguidamente el agua utilizada en los recambios interdiarios ingresaba a mayor temperatura.

El aumento y disminución de temperatura dentro de sistemas SRA afecta a los peces a nivel fisiológico y patológico (Aida, 1988). Al haber un aumento en la temperatura los mecanismos fisiológicos tienden a acelerarse y los eventos patológicos a aparecer o ponerse en estado agudo (Munro, 1990). Por el contrario, al disminuir la temperatura hay una disminución de la respuesta fisiológica y de las patologías (Anexo 9). En este experimento la metodología utilizada para controlar, reducir y eliminar las patologías consistió en: recambios parciales o totales, uso del formol para eliminación de parásitos externos, control constante de la calidad del agua y limpieza del tanque y del sistema SRA; con la finalidad de prevenir, controlar y desinfectar patologías como nemátodos, petequias y *Vibrio* en las cabrillas. La temperatura afecta directamente la maduración sexual de las cabrillas, en el punto 4.2 se evalúa la maduración gonadal observado en *P. humeralis* en relación al termoperiodo.

4.1.2. Oxígeno disuelto (mg.l^{-1})

Los resultados de la concentración de oxígeno disuelto del agua durante la fase experimental se muestran en la tabla 10 y en la figura 11. El oxígeno disuelto del agua se registró diariamente, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 ($p > 0,05$) en todo el periodo experimental.

El oxígeno disuelto del agua fue influenciado por: la respiración biológica dentro de las unidades de cultivo, la alimentación, la temperatura del agua, los procesos de nitrificación y aireación mecánica del sistema SRA (Timmons *et al.*, 2002). El tratamiento 1 al igual que el tratamiento 2 presentaron un valor promedio mínimo de $5,91 \pm 0,43$ (mg.l^{-1}) (Tabla 10), debido a la constante aireación producida con tres piedras difusoras por unidad de

cultivo. El valor mínimo de OD se encuentra por encima del valor mínimo requerido para el cultivo de peces ($>4 \text{ mg.l}^{-1}$) (Timmons *et al.*, 2002). Por otro lado el tratamiento 1 presentó un valor promedio máximo de $7,22 \pm 1,14 \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$, mientras que el tratamiento 2 de $7,45 \pm 0,34 \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$. El valor máximo se encuentra por debajo del valor máximo considerado como tóxico para el cultivo de peces ($>9 \text{ mg.l}^{-1}$) (Timmons *et al.*, 2002).

En la figura 11 se pueden observar las variaciones en la concentración de O_2 del tratamiento 1 y tratamiento 2, ambos tratamientos presentaron valores similares de oxígeno disuelto. Esto se debe a que los SRA mantuvieron la calidad del agua estable y sobre los requerimientos biológicos. Mallya (2007) menciona que valores mayores a 5 mg.l^{-1} y con un 75 por ciento de saturación son valores óptimos para cultivo de peces marinos. En la presente investigación se obtuvo un valor promedio mínimo de $5,91 \pm 0,43 \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$, estando por encima del valor mínimo requerido para cubrir las necesidades reproductivas de peces marinos. Por otro lado las fluctuaciones presentadas son propias del manejo y funcionamiento del sistema como se indica en la Figura 11. El caudal del agua se corrigió periódicamente para mantenerse entre $0,5 \text{ l.seg}^{-1}$ y 1 l.seg^{-1} .

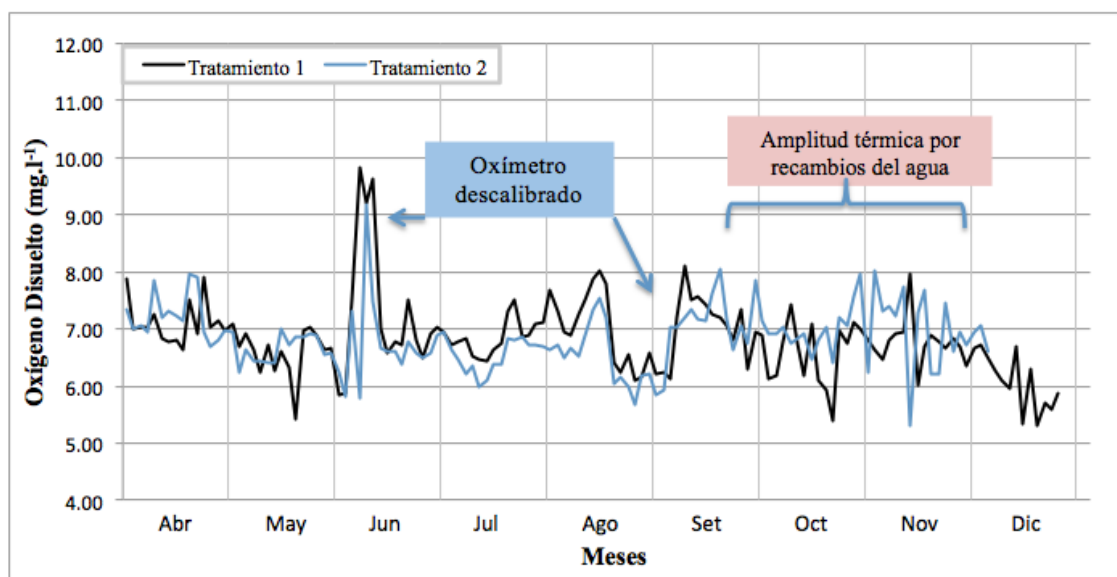


Figura 11: Oxígeno disuelto del agua (mg.l^{-1}) de los tratamientos 1 y 2, durante 9 meses de experimentación.

4.1.3. pH

Los resultados del pH durante la fase experimental se muestran en la tabla 10. El pH del agua se registró diariamente, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 ($p > 0,05$). Los valores mínimos de pH se registraron en el mes de octubre, en el tratamiento 1 se observó un valor mínimo de $6,97 \pm 0,90$ y para el tratamiento 2 de $7,21 \pm 0,62$. Los valores máximos para el tratamiento 1 y 2 fueron respectivamente de $7,86 \pm 0,13$ y de $7,79 \pm 0,16$ en el mes de mayo. Según lo reportado por Benetti *et al.* (2008), los resultados se encuentran dentro del rango de tolerancia para peces marinos que abarca de 6,5 a 8,5.

4.1.4. Compuestos nitrogenados disueltos

Los valores de estos compuestos durante la fase experimental se muestran en la tabla 10. Dentro de los compuestos nitrogenados disueltos en cultivos de peces marinos en sistemas SRA, se encuentran el nitrógeno amoniacal total (NAT), nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-). Si bien la reproducción de peces marinos es compleja bajo sistemas SRA, lo adecuado para el cultivo de serránidos debe encontrarse en valores de NAT menores a $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$, NO_3^- menores a 3 mg.l^{-1} y NO_2^- menores a $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Philminaq, 2008).

a. Nitrógeno amoniacal total (NAT, mg.l^{-1})

Los valores de NAT encontrados no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 ($p > 0,05$) (Tabla 10). Sin embargo, se observa que el tratamiento 2 presenta mayor tendencia a disminuir que el tratamiento 1. Estas ligeras diferencias se deben al manejo técnico y la eficiencia propia de cada sistemas SRA (Verástegui *et al.*, 2001).

El nitrógeno amoniacal total (NAT) esta conformado por amonio no-ionizado, conocido como amoniaco (NH_3) el cual es tóxico para los peces; y amonio ionizado, conocido como amonio (NH_4) el cual no genera toxicidad (Elsayed *et al.*, 2006). Philminaq (2008) determina que para el cultivo de peces marinos el límite crítico de NAT es de 1 mg.l^{-1} , mientras que Colt y Armstrong (1981) determinan

que el límite crítico de $\text{NH}_3\text{-N}$ mg.l^{-1} es de $0,0125 \text{ mg.l}^{-1}$. Los valores de NAT en la presente investigación van de $0,01$ a $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Tabla 10). Los tratamientos 1 y 2 presentaron valores similares de NAT, esto se debe principalmente al manejo de los sistemas SRA; en ambos tratamientos se realizaron recambios de agua iguales y se dió alimento en cantidades similares a excepción de los días de tratamiento en determinada unidad de cultivo.

Tetzlaff y Heideinger (1992) en Elsayed *et al.* (2006) mencionan que el porcentaje de $\text{NH}_3\text{-N}$ en el NAT aumenta logarítmicamente al aumentar el pH y la temperatura del agua. Los valores NAT de $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ fueron registrados sólo en diciembre, lo cual coincide con el aumento de la temperatura del agua de mar y los reservorios ($24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

b. Nitrito y nitrato (NO_2 y NO_3 , mg.l^{-1})

Los valores de nitrito y nitrato no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 ($p > 0,05$) (Tabla 10). Se observa que el nitrito tiende a disminuir mientras que el nitrato tiende a aumentar. Esto se debe a que el nitrito es descompuesto por bacterias nitrificantes dentro del biofiltro (Elsayed *et al.*, 2006; Kubitza, 1998), mientras que el nitrato se acumula en los sistemas SRA y tiene que ser removido mediante recambios parciales del agua.

Los nitritos al igual que el amoníaco son considerados tóxicos en el cultivo de peces (Philminaq, 2008). Los valores obtenidos fueron similares entre tratamientos, el mes de abril presentó $0,08 \pm 0,02 \text{ mg.l}^{-1}$, luego en mayo $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$ hasta diciembre. El incremento de nitrito presentado en el mes de abril se puede explicar por el incremento en el alimento consumido a >90 por ciento para ambos tratamientos. Garrido-Pereira *et al.* (2014) estudiaron la reproducción y larvicultura de la cobia (*Rachycentron canadum*) en sistemas SRA reportando valores máximos de nitrito de $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$.

El nitrato no es considerado dañino para los peces cuando se encuentra en altas concentraciones, sin embargo este afecta el sistema inmune y puede inducir

indirectamente a la muerte de los peces (Plumb, 1997 citado en Elsayed *et al.*, 2006). Este compuesto tiende a acumularse en las unidades de cultivo hasta concentraciones $>10 \text{ mg.l}^{-1}$ y tiene que ser removido mediante recambios de agua (Timmons *et al.*, 2002). Los valores obtenidos fueron similares entre tratamientos. En el mes de abril se observó una concentración de $0,15 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, luego en mayo de 2 mg.l^{-1} hasta diciembre. La baja concentración de nitrato presentada en el mes de abril se puede explicar por el incremento en los recambios de agua para ambos tratamientos, consecuencia del incremento en la ración alimenticia (Crab *et al.*, 2009).

Según Timmons *et al.* (2002) un sistema SRA para peces marinos requiere de un porcentaje de recambio de agua diario. En la presente investigación debido a la materia orgánica producida en el agua por el alimento y las heces, tratamientos por patologías, muestreos y purgas del sistema se hicieron recambios del agua diarios del 10 al 15 por ciento.

Los procesos fisiológicos en peces durante la maduración sexual son influenciados directamente por la calidad del agua. La temperatura afecta directamente el proceso reproductivo de los peces. En la presente investigación la temperatura del agua estuvo en relación al fotoperiodo establecido, al incrementar se observó una mayor cantidad de ovocitos maduros y al disminuir una mayor cantidad de ovocitos inmaduros. El oxígeno disuelto a una concentración menor a los 4 mg.l^{-1} disminuye el índice gonadosomático, el tamaño de los ovocitos y la fecundidad absoluta, los valores de oxígeno en ambos tratamientos fueron mayores a 5 mg.l^{-1} , dando condiciones adecuadas para el desarrollo ovocitario. El pH cuando se encuentra fuera del rango de 6,5 a 8,5 puede limitar el éxito de la maduración ovocitaria final, la ovulación y el desove, los valores de pH en ambos tratamientos estuvieron dentro de este rango, dando condiciones adecuadas para el desarrollo ovocitario. De los compuestos nitrogenados, el amoníaco es tóxico para los peces y se ve afectado por el pH. El nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) tiene una forma más tóxica a mayor temperatura y pH, y una forma menos tóxica con un pH bajo en forma de amoníaco no ionizado (NH_3) y amoníaco ionizado (NH_4^+). Estos compuestos se mantuvieron por debajo de los límites máximos probados en otras

especies de seránidos en los SRA. Álvarez- Gonzalez *et al.* (2001) obtuvieron ovocitos de buena calidad de la cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus* cultivadas en los SRA, presentando valores de NAT de $0,30 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$, NO₂ de $0,30 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ y NO₃ de 3 mg.l^{-1} .

4.2. Análisis del desarrollo ovocitario de *Paralabrax humeralis*.

En la tabla 11 se muestran los diámetros de los ovocitos de toda la población de cabrillas en ambos tratamientos. Los valores obtenidos en ambos tratamientos fueron clasificados en cinco estadios: inmaduro (I), pre-vitelogénico (II), vitelogénico (III), maduro (IV) e hidratado (V).

El diámetro de los ovocitos suele ser usado como referencia para clasificar el estado de desarrollo ovocitario (Tseng y Ho, 1979) sumado a otras características de desarrollo. De esta manera los ovocitos que presentaron un diámetro entre $50 \text{ y } 166,48 \pm 46,30 \mu\text{m}$ se clasificaron como inmaduros. Los ovocitos con un diámetro entre $205,35 \pm 45,11 \text{ a } 307,12 \mu\text{m}$ se clasificaron como pre-vitelogenados (Estadio II). Los ovocitos con un diámetro entre $312,37 \text{ a } 496,12 \pm 52,05 \mu\text{m}$ se clasificaron como vitelogenados (Estadio III). Los ovocitos con un diámetro entre $525,10 \text{ a } 698,71 \pm 161,71 \mu\text{m}$ se clasificaron como maduros (Estadio IV) y los ovocitos con un diámetro $>700 \mu\text{m}$ se clasificaron como hidratados (Estadio V).

En la figura 12 se muestran los porcentajes del diámetro de los ovocitos de toda la población de cabrillas en ambos tratamientos. Los porcentajes observados de ovocitos clasificados en estadio I son mayores en el tratamiento 1 que el tratamiento 2 en los meses de junio a agosto. En todos los meses se presentaron ovocitos inmaduros, esta es una característica de peces teleósteos con reproducción asincrónica (Carrillo y Zanuy, 1993). Los porcentajes de ovocitos en estadio II indican mayor presencia en el tratamiento 2 que el tratamiento 1, en ambos tratamientos se ve un aumento hacia la maduración. El porcentaje de hembras en estadio III en el tratamiento 1 presentó un incremento en octubre y otro empezando el verano, como reporta la literatura (Canal, 1993), mientras que en el tratamiento 2 se ve un incremento en abril, Julio, Octubre y Diciembre. Los porcentajes de

ovocitos en estadio IV en el tratamiento 1 se relaciona con los meses de mayor porcentaje de ovocitos en Estadio III, mientras que en el tratamiento 2 se presentan a lo largo de la experimentación. Los porcentajes de ovocitos en estadio V se presentaron en junio y julio para el tratamiento 1 y en julio y agosto para el tratamiento 2.

Tabla 11: Promedios y desviación estándar del diámetro ovocitario de peces reproductores de *Paralabrax humeralis* cultivados bajo un foto-termoperiodo artificial (tratamiento 1) y otro artificial comprimido (tratamiento 2), durante 9 meses de experimentación.

MESES	ESTADIOS DE MADUREZ GONADAL									
	I		II		III		IV		V	
	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Abril	79,89	<50	295,62	-	495,82 ± 98,58	439,36 ± 69,93	684,84 ± 52,61	635,16	-	-
n	1	2	1	-	12	14	3	1	-	-
Mayo	81,73 ± 30,88	67,44 ± 18,24	-	208,09 ± 59,56	492,80 ± 38,28	353,85 ± 47,33	698,71 ± 161,71	640,74	-	-
n	4	6	-	7	6	5	4	1	-	-
Junio	65,44 ± 10,75	53,50 ± 7,42	-	205,35 ± 45,11	334,94	434,12 ± 76,36	-	-	>700,00	-
n	9	7	-	4	1	3	-	-	3	-
Julio	82,36 ± 11,79	80,64 ± 10,13	295,66	231,54	312,37	391,52 ± 87,69	-	618,32	>700,00	>700,00
n	11	2	1	1	1	11	-	1	1	1
Agosto	119,80 ± 40,48	<50,00	248,67 ± 33,74	-	403,82 ± 10,88	441,77 ± 58,06	-	669,60 ± 96,64	-	>700,00
n	8	2	3	-	2	7	-	4	-	4
Setiembre	88,23 ± 16,27	118,23 ± 44,75	255,03 ± 20,41	230,41 ± 61,13	366,57 ± 76,28	359,45 ± 37,41	-	525,10	-	-
n	2	3	6	5	5	6	-	1	-	-
Octubre	-	166,48 ± 46,30	307,12	<50,00	487,32 ± 47,67	458,03 ± 94,63	604,12 ± 4,05	697,67	-	-
n	-	2	1	1	8	12	2	1	-	-
Noviembre	<50,00	<50,00	-	286,55 ± 11,16	496,12 ± 52,05	430,39 ± 71,16	-	-	-	-
n	3	5	-	2	7	7	-	-	-	-
Diciembre	<50,00	-	232,22 ± 94,02	-	458,78 ± 86,33	430,75 ± 87,82	692,52 ± 161,52	-	-	-
n	1	-	4	-	11	13	2	-	-	-

Los tratamientos son: T1 (Foto-termoperiodo artificial) y T2 (Foto-termoperiodo artificial comprimido). Los datos corresponden al promedio (9 meses) ± desviación estándar. Los distribución de los datos de estadios de madurez gonadal fueron comparados empleando la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov.

En la figura 13 se observan las características físicas de los ovocitos para ser clasificados en los cinco estadios. La figura 13a se muestran ovocitos inmaduros translúcidos formando racimos. En la figura 13b y 13c se observa el incremento de tamaño, los gránulos de vitelo dentro del ovocito y una circunferencia definida del ovocito (Nagahama *et al.*, 1993). Mylonas y Zohar (2001) indican que el vitelo es parcialmente sintetizado en el citoplasma y el resto transportado por el torrente sanguíneo ingresando al ovocito por micropinocitosis.

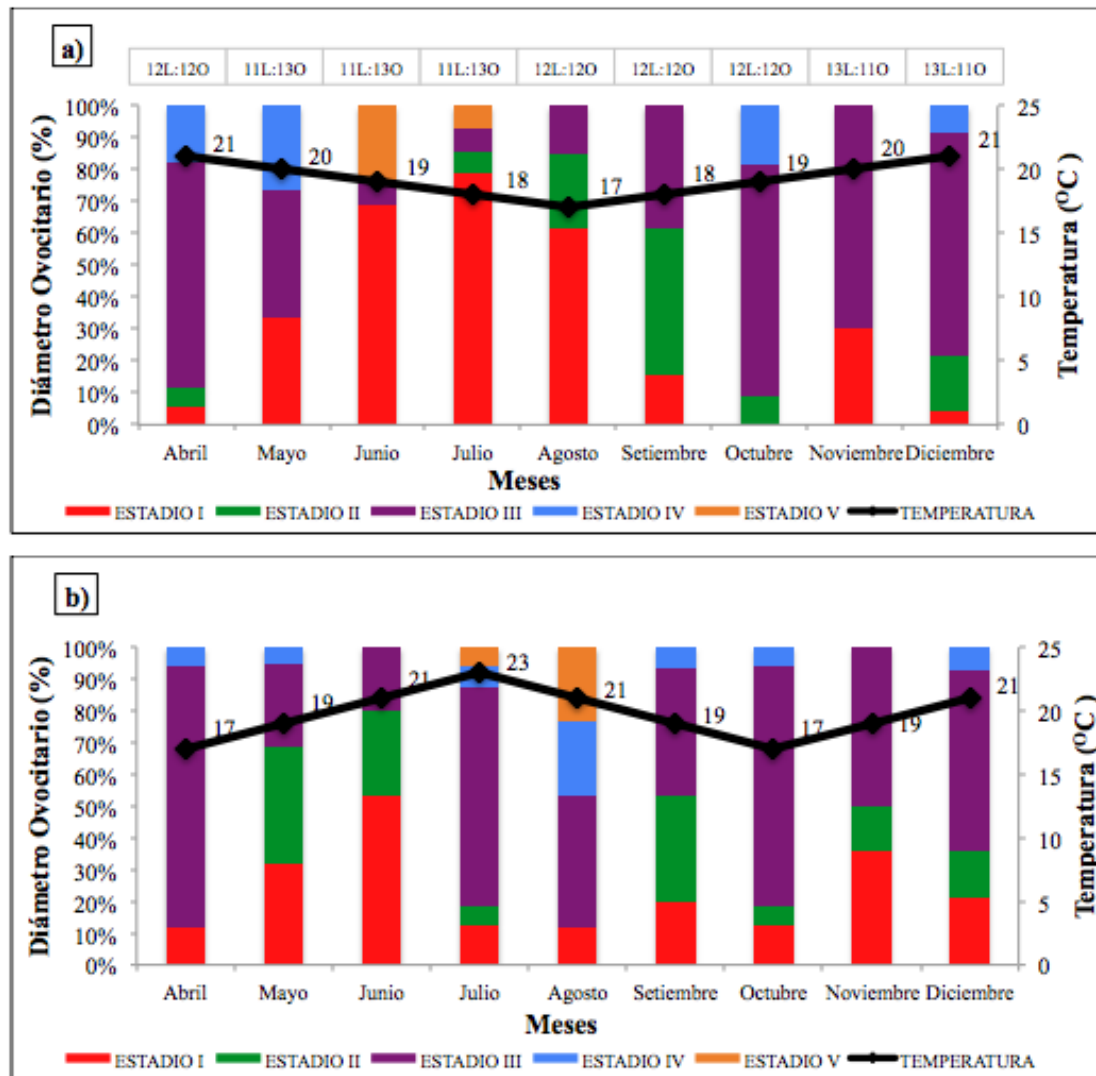


Figura 12: Porcentaje del diámetro ovocitario de *Paralabrax humeralis* bajo (a) un foto-termoperiodo artificial y (b) artificial comprimido, durante nueve meses de experimentación.

Los ovocitos maduros (estadio IV) se observaron oscuros por el vitelo y la membrana externa delgada y definida. En la figura 13d se muestran ovocitos en estado maduro, en

este punto empiezan a aumentar los niveles de sodio intracelular en la membrana del ovocito y es un punto de referencia para inducir hormonalmente la maduración sexual en peces marinos (Oshiro y Hibiya, 1982). En *Paralabrax humeralis* se observa en el estadio I que los gránulos de vitelo y las gotas de aceite aparecen por primera vez en la periferia de los ovocitos, un proceso similar al de la lubina *Morone saxatilis* (Mylonas *et al.*, 1998), sin embargo en otras especies de peces los gránulos de vitelo y las gotas de aceite aparecen primero en el centro del ooplasma (Mylonas *et al.*, 1997). Durante la maduración el fenotipo de las hembras de cabrilla cambia, la coloración amarillenta de las aletas y las manchas naranja del opérculo se intensifican. En ambos tratamientos se observaron meses con >60 por ciento de hembras maduras, donde hubieron desoves espontáneos sin fecundar. Futema (2004) observa un efecto similar en la “cabrilla arenera” *Paralabrax maculatofasciatus*, presentando meses con un bajo porcentaje de hembras maduras pero con desoves espontáneos que fueron fecundados. Avilés (2006) de forma similar a este experimento, obtiene bajo condiciones controladas de foto-termoperiodo un periodo prolongado (Enero a Junio) de maduración en *Paralabrax maculatofasciatus*. Se observó que al incrementar la temperatura de los 17 a 20 grados centígrados, con un fotoperiodo de 10 a 12 horas de luz, se logró inducir el proceso de maduración sexual.

El proceso de hidratación causa el aumento del diámetro de los ovocitos, esto es provocado por un incremento en la presión osmótica (Oshiro y Hibiya, 1982). Martínez (2007) reporta que en *Paralabrax maculatofasciatus* el aumento del diámetro de los ovocitos es influenciado por inclusión de ácidos grasos esenciales y proteína en el alimento de los reproductores. Las características de ovocitos hidratados es el aumento en diámetro, un núcleo central definido y una membrana celular delgada (Figura 13e).

La atresia ovocitaria se observó en todos los estadios de madurez gonadal (Figura 13f). Tovar (2002) y Avilés (2006) reportan al igual que este experimento, peces reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* cultivados bajo sistemas controlados con atresia ovocitaria en todos los estadios de madurez gonadal.

Al estar en una zona sub tropical entre los límites de distribución geográfica de la cabrilla (Chirichigno y Vélez, 1998), estos organismos presentan características reproductivas todo el año con picos de desove marcados. En ambos tratamientos se observó que la maduración sexual de la cabrilla *Paralabrax humeralis* está estrechamente relacionada con los parámetros de temperatura y fotoperiodo. Por el contrario, en especies de zonas templadas el fotoperiodo es el factor de mayor importancia en la maduración gonadal de algunas de las especies de cultivo y se utiliza para desplazar el desove según el interés del acuicultor (Billard, 1990).

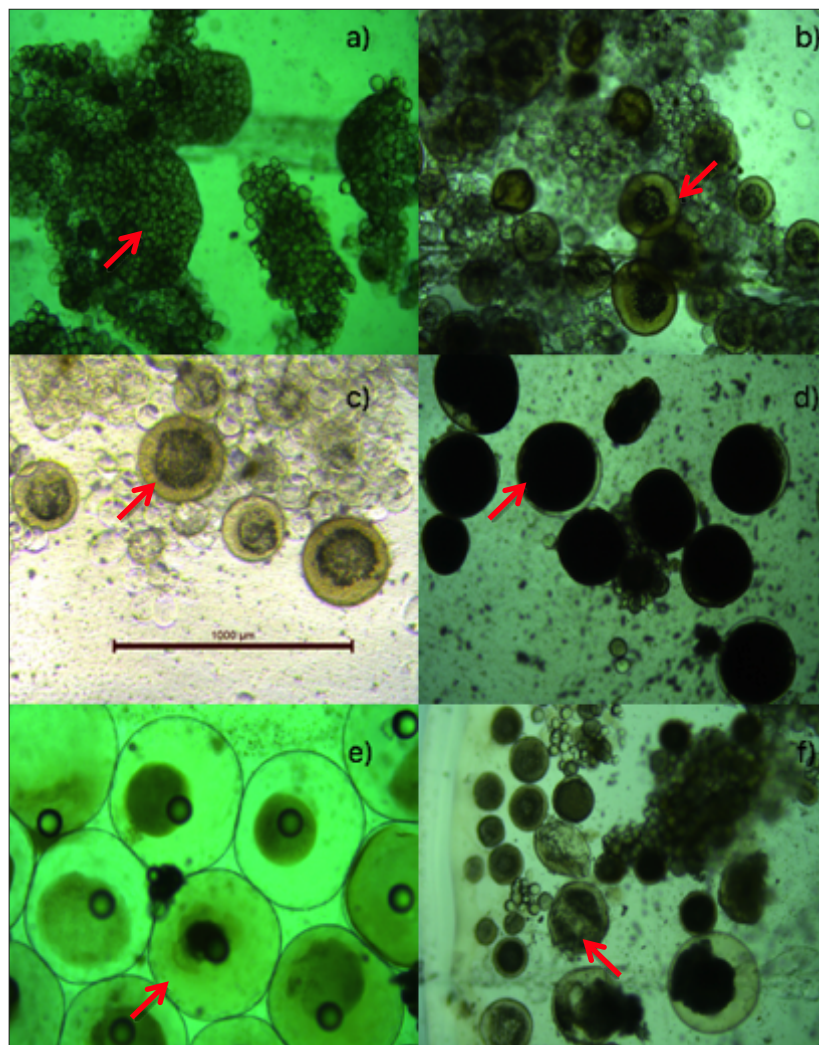


Figura 13: Desarrollo morfológico de ovocitos en *Paralabrax humeralis*. a) Estadio inmaduro (Estadio I), b) Estadio pre-vitelogénico (Estadio II), c) Estadio vitelogénico (Estadio III), d) Estadio maduro (Estadio IV), e) Estadio hidratado (Estadio V) y f) Atresia ovocitaria. La escala de las fotografías es de 1000µm.

El incremento del diámetro de los ovocitos de *Paralabrax humeralis* durante el desarrollo ovocitario es similar al de *Paralabrax maculatofasciatus* (Martínez, 2007). En especies de *P. maculatofasciatus* se ha observado bajo condiciones controladas de cultivo que peces más grandes producen huevos de mayor tamaño en mayor cantidad, mientras que peces mayores a los cuatro años producen huevos de menor calidad (Futema, 2004 y Avilés, 2006). La maduración sexual se presentó a temperaturas entre 17 a 23°C con fotoperiodo entre 11 y 13 horas luz/día. Para otras especies de distribución sub tropical como *Lates calcarifer* (MacKinnon, 1990) y *Lutjanus analis* (Bortone y Williams, 1986), se han descrito parámetros similares. Avilés (2006) observa que en *Paralabrax maculatofasciatus* la maduración sexual se presenta a temperaturas entre 20 a 23 °C con un fotoperiodo entre 12,25 a 14,25 horas luz/día.

Gálvez (2015) analiza ovarios y testículos de *Paralabrax humeralis* provenientes del seguimiento de la pesquería demersal y cruceros de investigación de recursos demersales en el 2005 del Instituto del Mar del Perú, demostrando mediante análisis histológicos que en el ambiente natural la maduración sexual de la cabrilla se da en todo momento con picos de desove marcados.

Los valores del diámetro ovocitario observados no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 ($p > 0,05$) (Tabla 12). Esto se explica por la alta desviación estándar presentada mensualmente en los valores obtenidos de la maduración gonadal de las hembras de cabrilla. Por otro lado el porcentaje de ovocitos en ambos tratamientos indica que al aumentar el fotoperiodo y la temperatura por encima de las 12 horas luz y 19°C respectivamente, aumenta el porcentaje de hembras en maduración (Estadio III).

4.3. Análisis de la calidad espermática de *Paralabrax humeralis*.

La concentración espermática mínima en el tratamiento 1 y 2 fue en el mes de noviembre, con valores de $0,87 \pm 0,23$ y $0,85 \pm 0,19$ (esp.ml⁻¹E-10), respectivamente. Los valores máximos en el tratamiento 1 y 2 fueron en octubre, con $6,19 \pm 1,51$ y $6,19 \pm 1,51$ (esp.ml⁻¹E-10), respectivamente. La determinación de la concentración espermática es un indicador de si los peces están maduros, esta indica indirectamente el estado de madurez gonadal

(Glogowsky *et al.*, 1999). En la presente investigación la concentración espermática es más estable respecto a la temperatura en el tratamiento 1 (Tabla 12).

Tabla 12: Valores máximos y mínimos de la concentración (esp.ml⁻¹E-10) espermática de los reproductores de *Paralabrax humeralis*.

MESES	T 1	n	T 2	n
Abril	1,10 a 3,60 ^a	10/14	1,51 a 3,89 ^a	9/19
Mayo	1,71 a 7,83 ^a	12/13	1,72 a 7,52 ^a	12/18
Junio	1,93 a 3,03 ^a	8/13	1,37 a 5,67 ^a	11/17
Julio	5,33 a 5,75 ^a	3/12	2,52 a 7,27 ^a	6/16
Agosto	2,09 a 5,38 ^a	4/12	1,45 a 7,85 ^a	12/16
Setiembre	0,71 a 6,11 ^a	11/12	0,60 a 3,26 ^a	12/15
Octubre	4,71 a 7,70 ^a	10/11	4,81 a 7,31 ^a	9/15
Noviembre	0,64 a 1,10 ^a	8/11	0,66 a 1,04 ^a	11/14
Diciembre	4,69 a 6,87 ^a	11/11	4,69 a 6,87 ^a	12/14

Los tratamientos son: T1 (Foto-termoperiodo artificial) y T2 (Foto-termoperiodo artificial comprimido). En (*) se muestran los meses que presentaron bajas de concentración y motilidad espermática. CC= concentración.

La motilidad espermática mínima en el tratamiento 1 fue en junio con $8,74 \pm 9,13$ (%) y en el tratamiento 2 fue en setiembre con $25,80 \pm 10,38$ (%). Los valores máximos en el tratamiento 1 fueron en octubre con $80,26 \pm 12,87$ (%) y en el tratamiento 2 fueron en agosto con $85,75 \pm 10,97$ (%). En ambos tratamientos la motilidad está más relacionada al foto-termoperiodo (Tabla 13).

Tabla 13: Valores máximos y mínimos de la motilidad (%) espermática de los reproductores de *Paralabrax humeralis*.

MESES	T 1	n	T 2	n
Abril	38,60 a 94,98 ^a	10/14	58,68 a 87,56 ^a	9/19
Mayo	36,69 a 67,41 ^a	12/13	61,62 a 96,36 ^a	12/18
Junio	79,61 a 97,87 ^a	8/13	36,83 a 79,65 ^a	11/17
Julio	31,84 a 39,26 ^a	3/12	42,90 a 89,82 ^a	6/16
Agosto	38,86 a 73,86 ^a	4/12	74,78 a 96,72 ^a	12/16
Setiembre	47,93 a 77,07 ^a	11/12	15,42 a 36,18 ^a	12/15
Octubre	67,39 a 93,13 ^a	10/11	34,04 a 92,70 ^a	9/15
Noviembre	48,88 a 90,24 ^a	8/11	48,79 a 99,98 ^a	11/14
Diciembre	45,01 a 96,07 ^a	11/11	45,01 a 96,07 ^a	12/14

Los tratamientos son: T1 (Foto-termoperiodo artificial) y T2 (Foto-termoperiodo artificial comprimido). En (*) se muestran los meses que presentaron bajas de concentración y motilidad espermática. CC= concentración.

Furuita *et al.* (2002) mencionan que la alimentación y la temperatura durante la espermatogénesis son los factores principales que afectan la composición de los espermatozoides de peces marinos. Por otro lado el fotoperiodo artificial utilizado para obtener desoves en una época desfasada a la maduración natural, resulta en espermatozoides de menor calidad (Glogowsky *et al.*, 1999).

La evaluación del estado de los espermatozoides (calidad espermática) se utiliza también para evaluar la inducción al desove. Kime *et al.* (2001) mencionan que el metabolismo y la motilidad de los espermatozoides dependen en gran medida de la integridad de la membrana plasmática para la fecundación, observando valores óptimos de motilidad cuando son mayores al 80 por ciento. En la presente investigación menos del 60 por ciento de la motilidad espermática se da a 17°C y más del 80 por ciento a 19°C (Tabla 8 y 13).

Los parámetros mensuales de calidad espermática no cumplieron con la prueba de normalidad Anderson-Darling ($p > 0,05$), la distribución de los datos se evaluó empleando

la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$) (Tabla 13). Carrillo y Zanuy (1993) mencionan un efecto silimar en varias especies de peces marinos, donde se ve que la concentración espermática no presenta diferencias significativas lo largo del año mientras que la motilidad espermática disminuye al disminuir la temperatura.

Las bajas de concentración y motilidad espermática presentadas en los meses de setiembre y noviembre podrían deberse al estrés producido por la extracción de sangre, la cual fue utilizada para cuantificar esteroides sexuales en plasma de *Paralabrax humeralis*. Esta técnica puede ocasionar laceraciones en la piel y resultar en una disminución del sistema inmune de los peces (Carrillo, 2009). En el mes de setiembre se presentaron los primeros casos de petequias en los machos, probablemente a raíz de la extracción de sangre, sin embargo éstos fueron solo dos machos los afectados. Se puede observar en el tratamiento dos una disminución de la concentración y motilidad espermática. En el mes de noviembre ambos tratamientos presentan una disminución de la concentración espermática. Benetti *et al.* (2008) menciona que las técnicas de extracción de sangre son utilizadas mayormente en investigación, afectando la reproducción de peces marinos cultivados.

4.4. Análisis de la concentración de esteroides sexuales en plasma de *Paralabrax humeralis*.

La distribución de los datos de vitelogenina (VTG) y 11ketotestosterona (11KT) en el plasma sanguíneo de hembras y machos de *P. humeralis*, se evaluaron empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$) (Tabla 14). La distribución de los datos de los valores observados se debe al estado sanitario de los organismos, estrés producido al tomar la muestra, alimentación, estado nutricional, estado de desarrollo gonadal, y al almacenamiento y procesamiento de las muestras. A pesar de no presentar diferencias significativas entre tratamientos, cabe mencionar que las medias de los datos presentados llevan relación con el fotoperíodo (Figuras 14 y 15).

En el tratamiento 1 se observa un cambio gradual de la concentración plasmática de VTG mientras que en el tratamiento 2 se dan cambios de mayor amplitud de 11KT. Carrillo y Zanuy (1993) mencionan un efecto similar en el salmón del atlántico cultivado en SRA, concluyendo que los niveles plasmáticos de VTG y 11KT son influenciados por el fotoperíodo y por condiciones propias del sistema. El análisis de los niveles de esteroides sexuales en plasma es utilizado para evaluar el desarrollo ovocitario en peces teleosteos (Trippel y Morgan, 1994) y puede ayudar a obtener ovocitos y larvas en mayor cantidad y calidad (Bromage y Roberts, 1995). En la presente investigación los valores mensuales de VTG y 11KT plasmáticos presentan un patrón similar a la maduración ovocitaria, en relación al foto-termoperíodo artificial y artificial comprimido.

Tabla 14: Concentración de esteroides sexuales en plasma sanguíneo de *P. humeralis* durante seis meses de experimentación.

TRATAMIENTO	n	CONCENTRACIÓN DE VITELOGENINA (ng.ml ⁻¹)					
		ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SETIEMBRE
Tratamiento 1	2	2,89 ^a	2,82 ^a	2,69 ^a	2,72 ^a	2,81 ^a	2,81 ^a
Tratamiento 2	3	3,02 ^b	2,71 ^a	2,45 ^b	2,82 ^b	2,72 ^a	2,60 ^b
TRATAMIENTO	n	CONCENTRACIÓN 11KETOTESTOSTERONA (pg.ml ⁻¹)					
		ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SETIEMBRE
Tratamiento 1	4	60,46 ^a	60,65 ^a	596,48 ^a	612,94 ^a	467,38 ^a	287,65 ^a
Tratamiento 2	2	49,17 ^a	107,29 ^a	504,42 ^a	0,00 ^b	445,88 ^a	241,59 ^a

(n) el número de muestra.

Durante la experimentación algunos peces evaluados fueron afectados por patologías como *Vibrio sp.* y *Entobdella sp.* produciendo en algunos casos la muerte del organismo. En la presente investigación para la cuantificación de VTG y 11KT se seleccionaron 6 cabrillas por tratamiento respectivamente, debido a que se hizo un seguimiento por 6 meses, solo de algunas cabrillas se obtuvo una muestra todos los meses. Al final, se obtuvieron dos hembras en el tratamiento 1 y tres en el tratamiento 2. Para la cuantificación de 11KT se obtuvieron cuatro y dos machos, respectivamente.

4.4.1. Concentración de vitelogenina (ng.ml⁻¹) en plasma de *Paralabrax humeralis*.

En la Figura 14 se muestran los valores de VTG obtenidos de las hembras del tratamiento 1 y 2. En el tratamiento 1 la concentración de vitelogenina plasmática empieza a descender desde un máximo de 2,90 ng.ml⁻¹ en el mes de abril hasta un mínimo de 2,66 ng.ml⁻¹ en los meses de junio y julio. En relación al foto-termoperiodo artificial, estas condiciones se relacionan al invierno presentando un mayor índice de ovocitos inmaduros (Tabla 16). En el mes de agosto el foto-termoperiodo empieza a aumentar hacia el ciclo de verano y de similar manera se incrementa la maduración gonadal, lo que se refleja en el incremento de la concentración de vitelogenina hasta los 2,89 ng.ml⁻¹. Los valores observados de VTG plasmática de *P. humeralis* se encuentran por debajo de otras especies reportadas como la trucha 9 ng.ml⁻¹ durante la época de maduración (Bon *et al.*, 1999), sin embargo en especies del género *Epinephelus sp.* se han reportado rangos entre 2 y 7 ng.ml⁻¹ durante la evaluación de la maduración gonadal (Chen *et al.*, 1977).

La aplicación de un foto-termoperiodo artificial para la maduración sexual y el desove de la cabrilla influencia la concentración de VTG plasmática, aumentando con el foto-termoperiodo. El cambio progresivo en la concentración es un indicador de la retroalimentación del foto-termoperiodo (Carrillo, 2009).

Los valores de VTG obtenidos de las hembras en el tratamiento 2 presenta un máximo de 3,05 y 3,02 ng.ml⁻¹ en los meses de abril y julio respectivamente, con un mínimo de 2,24 ng.ml⁻¹ en el mes de junio. En relación al foto-termoperiodo artificial comprimido, estas condiciones se relacionan a un verano artificial presentando un mayor índice de ovocitos maduros (Tabla 14). En los meses de abril y julio se obtuvieron los porcentajes más altos de ovocitos maduros, mientras que en el mes de junio se obtuvo el mayor porcentaje de ovocitos inmaduros (Figura 12). Los valores observados de VTG plasmática de *P. humeralis* se ven alterados por el foto-termoperiodo, teniendo mayor incidencia la temperatura sobre los valores observados de VTG durante la maduración ovocitaria. Carrillo (2009) menciona que el foto-termoperiodo constante altera el metabolismo de peces teleósteos cultivados, mientras que alterar las condiciones por periodos de tiempo definidos tiene mayor incidencia en la maduración sexual.

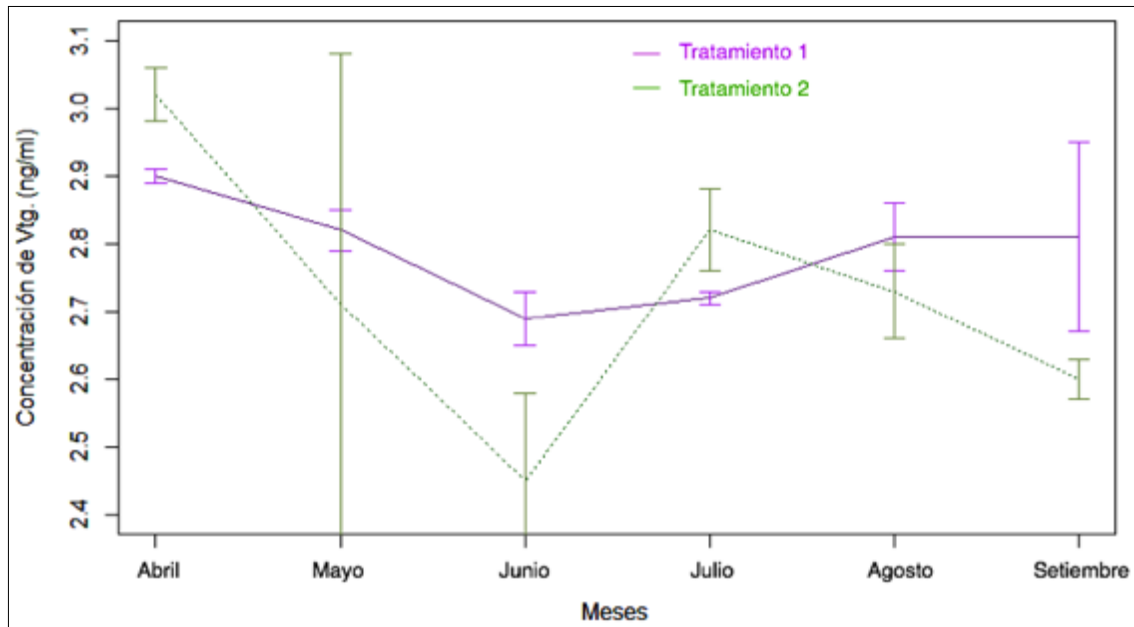


Figura 14: Concentración de vitelogenina en plasma de dos hembras de *P. humeralis* de abril a setiembre bajo un foto-termoperiodo artificial y artificial comprimido.

4.4.2. Concentración de 11ketotestosterona (pg.ml^{-1}) en plasma de *Paralabrax humeralis*.

En la Figura 15 se muestran los valores de 11KT obtenidos de cuatro machos en el tratamiento 1. La concentración de 11KT plasmática empieza a aumentar desde un mínimo de 0 pg.ml^{-1} en el mes mayo hasta un máximo de $972,17 \text{ pg.ml}^{-1}$ en el mes de agosto. En relación al foto-termoperiodo del tratamiento 1, estas condiciones se relacionan al invierno, presentando una fase exponencial media entre junio y agosto a 17 y 19°C con 11 y 12 horas de luz, respectivamente. Los valores observados de 11KT plasmática de *P. humeralis* son menores a las reportadas para especies como la trucha $2300\text{-}2800 \text{ pg.ml}^{-1}$ durante la época de maduración (Carrillo, 2009), sin embargo en especies del género *Epinephelus sp.* se han reportado rangos entre 800 y 1200 pg.ml^{-1} durante la evaluación de la maduración gonadal (Kuo *et al.*, 1988). Carrillo y Zanuy (1993) mencionan que factores como la luz y la temperatura del agua influyen en la variación en la concentración de 11KT.

En el tratamiento 2 la 11KT no presenta un patrón definido, sin embargo el valor máximo de 1008,83 pg.ml⁻¹ en el mes de junio coincide con el foto-termoperiodo (Tabla 8). Los niveles plasmáticos de 11KT suelen ser más altos en machos maduros, dado que esta hormona tiene diversos roles en el proceso de maduración gonadal (Trippel y Morgan, 1994). En los muestreos se observó que los machos estaban espermiantes a lo largo del experimento, sin embargo durante junio y agosto se observó mayor cantidad de machos maduros, esto se ve reflejado en los picos de 11KT plasmática. Fernández-Palacios *et al.* (2005) observan un efecto similar en la dorada, aplicando un foto-termoperiodo artificial comprimido obtienen concentraciones de 11KT entre 400 y 2800 pg.ml⁻¹.

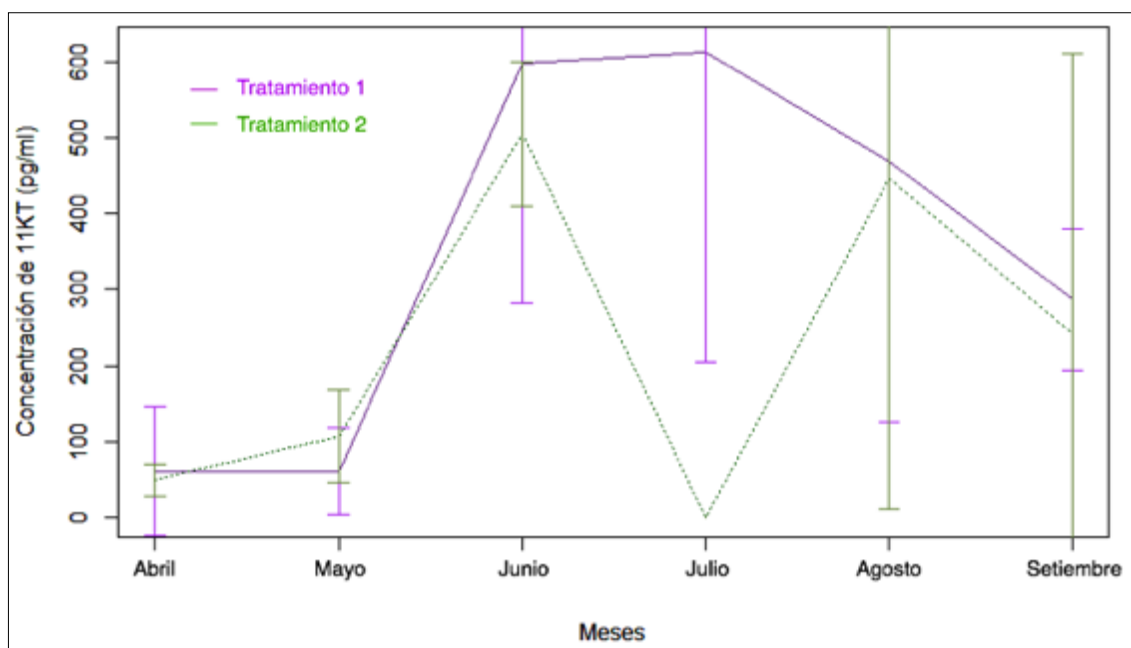


Figura 15: Concentración de 11ketotestosterona en plasma de cuatro machos de *P. humeralis* de abril a setiembre bajo un foto-termoperiodo artificial y artificial comprimido.

La aplicación de un foto-termoperiodo artificial comprimido para la maduración sexual y el desove de la cabrilla influencia la concentración de 11KT plasmática, mostrando un incremento en concentración en los meses más cálidos y una baja concentración en los meses más fríos.

4.5. Análisis de la inducción hormonal en la calidad del desove de *Paralabrax humeralis*.

En ambos tratamientos se observaron desoves naturales dentro de las unidades de cultivo al incrementar el foto-termoperiodo de 11 a 12 horas luz y de 17 a 20°C. La cantidad de ovocitos por desove natural estuvo entre 200 y 8.000 huevos por unidad de cultivo, la mayoría fueron huevos no fecundados. Carrillo y Zanuy (1993) mencionan que la sincronización reproductiva entre machos y hembras de peces marinos en sistemas SRA es compleja, siendo en algunos casos necesario recurrir al tratamiento hormonal para obtener huevos fecundados. Los ovocitos desovados y fecundados naturalmente son considerados de mejor calidad que los inducidos (Bromage, 1995). Marino *et al.* (2003) mencionan que las especies del género *Epinephelus* presentan desoves naturales en condiciones de cautiverio en menor cantidad y calidad que los obtenidos utilizando la hormona HCG. El rápido ascenso de los reproductores parece ser un requisito previo para la sincronización de la liberación de gametos y la fertilización del huevo en algunas especies de peces serránidos, como *Epinephelus akaara* cultivado en sistemas SRA (Ukawa *et al.*, 1966; Okumura *et al.*, 2002).

La cabrilla *Paralabrax humeralis* presentó un ligero comportamiento de ascenso y es probable que dicho comportamiento de desove estuviera limitado por la profundidad del tanque de cultivo (1 m) y por el espacio, como se presume también para otras especies de peces (Okumura *et al.*, 2002). Avilés (2006) menciona un comportamiento similar en la cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus*, recurriendo a la inducción hormonal para la sincronización y planificación de los desoves.

La mayoría de peces marinos cultivados en sistemas SRA presentan dificultades en la maduración final y ovulación durante la reproducción (Carrillo, 2009; Prat *et al.*, 1999; Montserrat *et al.*, 2004). Mylonas y Zohar (2001) señalan que la inducción hormonal es una alternativa para obtener ovocitos de forma programada. En la presente investigación se seleccionaron hembras de ambos tratamientos que presentaron ovocitos maduros con un diámetros entre 458,73 y 627,68µm y machos que presentaron una motilidad espermática mayor al 98 por ciento con la finalidad de estimular el desove. Primero se probaron tres hormonas, GnRH α (conceptase), LHRH α y HCG (choragon) (Oda *et al.*, 1993). La

hormona GnRHa presento el mejor resultado dando lugar al desove (Tabla 15). Sin embargo, la mayoría de los desoves resultaron en un bajo porcentaje de eclosión. Este efecto de la inducción hormonal se ha observado anteriormente en peces marinos (Mylonas y Zohar, 2001), presentando bajos niveles de GnRHa en el torrente sanguíneo debido al metabolismo acelerado y la eliminación después de la inyección (Marino *et al.*, 2003).

La inducción hormonal aplicando distintas dosis de la hormona GnRHa en la cabrilla se realizó utilizando una única inyección, dando como resultado un máximo de 24,000 huevos por hembra con una flotabilidad de 95 por ciento, fecundación de 85,5 por ciento y eclosión de 47 por ciento (Tabla 16). Sin embargo, la cantidad de huevos fue menor que las reportadas para otras especies de serránidos, que producen entre 50 y 800 mil huevos por hembra (Bromage y Roberts, 1995). Esto puede esperarse en peces que pesan más de 15kg como los meros, por el contrario en la presente investigación las cabrilla inducidas pesaron entre 245,7 y 514,2g. Según Carrillo *et al.* (1995) el tamaño del reproductor en relación a la edad influye directamente en la cantidad y calidad de ovocitos producidos por hembra, donde peces más grandes producen mayor cantidad de huevos viables.

El diámetro de los ovocitos esta relacionado con el desarrollo ovocitario, siendo este un indicador del estadio de madurez (Jalabert, 2005). Lam (1983) menciona que el diámetro ovocitario en la maduración de peces marinos se observa a más de 600 μ m, mientras que Carrillo (2009) menciona que el diámetro ovocitario en la maduración se encuentra relacionado a la especie. En la cabrilla se observaron ovocitos maduros con un diámetro entre 458,73 y 627,68 μ m antes de la inducción hormonal y ovocitos desovados entre 657,07 y 1040,21 μ m.

Una vez fertilizados los huevos de cabrilla mediante masaje abdominal (*stripping*), se observó que a mayor flotabilidad (%) mayor (%) de los huevos (Tabla 16). Cerdá *et al.* (2007) mencionan que la flotabilidad es una medida utilizada para la selección de ovocitos viables después de la fertilización artificial. La fecundidad fue variable entre cabrillas y desoves del mismo individuo, siendo más bajo en el primer y segundo desove (Tabla 16). Carrillo y Zanuy (1993) mencionan que esto podría deberse a la toma de decisión de inducir hormonalmente dependiendo del diámetro ovocitario del individuo, y estrés producido por el proceso mismo.

Tabla 15: Tabla con información sobre prueba de hormonas en cabrilla para ambos tratamientos.

HEMBRA / TRATAMIENTO -UNIDAD	PESO (g)	DIÁMETRO OVOCITARIO (INDUCCIÓNμm)	DIÁMETRO OVOCITARIO (DESOVE μm)	TRATAMIENTO	CC. DE LA HORMONA	DOSIS	DESOVE (hr)	HUEVOS	FLOTABILIDAD (%)	FECUNDIDAD (%)	ECLOSIÓN (%)
1427293 2-2	323.8	521.598	817,936	Conseptase + Domperidon a	20 μ g.kg- 1 + 10 mg.kg-1	0.7 ml + 0.30 mg	46	12,000	80	60	2
1427305 1-2	516.5	578.212	523,021	LHRHa	50 μ g.kg- 1	Sol madre: 100 μ g.ml-1 a 0,25 ml	-	-	-	-	-
1427252 2-2	242.6	458.737	754,311	HCG	1 ^{ra} 500 UI.kg-1	1 ^{ra} 0.24 ml	32-42	8,000	55	10	0
					2 ^{da} 1000 UI.kg-1	2 ^{da} 0,48 ml					

Se probaron tres hormonas, GnRH α (Conceptase), LHRHa y HCG (Choragon) en cabrillas maduras . CC= concentración.

Por otro lado el período después de la ovulación durante el cual se obtiene la viabilidad ovocitaria máxima varía mucho entre especies de peces marinos dependiendo del fotoperíodo y del método de inducción hormonal aplicado (Marino *et al.*, 2003). Springate *et al.* (1990) mencionan que en salmónidos este período puede durar de una a tres semanas, mientras que Bjornsson *et al.* (1998) mencionan que en el halibut del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) puede durar de 4-6 horas y Carrillo (2009) menciona que en algunas especies de peces marinos dura como máximo 30 minutos. En la presente investigación los desoves se obtuvieron entre 44 y 46 horas post inducción. Al igual que Tucker (2004) en el mero *Mycteroperca bonaci*, las cabrillas que fueron inducidas con un diámetro ovocitario menor, presentaron una menor flotabilidad (%) y fecundación (%). Cerdá *et al.* (1994) sugieren que en algunos peces marinos se da un evento de maduración después de la ovulación mientras los ovocitos están en la cavidad ovárica. Nagahama (1994) menciona que en algunos peces la segunda división meiótica de la maduración ovocitaria se completa después de la ovulación. Si esto ocurre también en *Paralabrax humeralis*, se puede esperar que la máxima viabilidad ovocitaria se produzca un tiempo después de la ovulación (Tucker 2004; Springate *et al.*, 1990).

Una vez fecundados los ovocitos de cabrilla se observó un máximo de 47 por ciento de eclosión a 20°C con un índice de actividad de supervivencia (SAI) de $24,3 \pm 2,2$ hasta el quinto día (Tabla 16). Carrillo (2009) menciona que la supervivencia larval depende en gran medida de factores exógenos a la calidad ovocitaria como la temperatura, la cual regula el tiempo de incubación de los huevos y el desarrollo embrionario. Cada especie posee un rango óptimo de temperatura para completar el desarrollo embrionario y larval, cuando los huevos son incubados a menor temperatura el desarrollo embrionario se suprime produciendo bajos porcentajes de eclosión y alta mortalidad de larvas eclosionadas, mientras que al subir la temperatura se da un consumo del vitelo acelerado produciendo embriones poco desarrollados y alta mortalidad de larvas eclosionadas (Benetti, 2008).

En la presente investigación se evaluó la calidad del desove de una maduración inducida hasta el porcentaje de eclosión. Es por esto que es necesario evaluar dichas condiciones para optimizar el periodo de incubación y supervivencia larval de la cabrilla.

Tabla 16: Tabla con información sobre pruebas de concentración de la hormona GnRH α aplicadas a las cabrillas para ambos foto-termoperiodo.

HEMERA / TRATAMIENTO -UNIDAD	PESO (g)	DIÁMETRO OVOCITARIO (INDUCCIÓN μm)	DIÁMETRO OVOCITARIO (DESOLVE μm)	CC. DE LA HORMONA	DOSIS	HUEVOS	FLOTABILIDAD (%)	FECUNDIDAD (%)	ECLOSIÓN (%)	ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE SUPERVIVENCIA (SAI)
1427298 1-2	246,4	525,102	-	1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ + 0,5 mg.kg^{-1}	30 μl + 12,3 μl	-	-	-	-	-
1427264 1-1	325,3	488,433	-	2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ + 0,5 mg.kg^{-1}	78 μl + 32,5 μl	-	-	-	-	-
1427305 1-2	507,3	583,432	928,283	2,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ + 1,25 mg.kg^{-1}	150 μl + 63,4 μl	-	-	-	-	-
1427305* 1-2	492,3	488,061	956,154	3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ + 1,25 mg.kg^{-1}	170 μl + 73,8 μl	11,500	40	35	-	-
1427305* 1-2	514,2	515,942	657,072	5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ + 2,25 mg.kg^{-1}	300 μl + 128,5 μl	24,000	95	85,5	47	24,3 \pm 2,2
1427316 1-1	245,7	627,683	1040,213	7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ + 3,5 mg.kg^{-1}	170 μl + 85,9 μl	18,500	80	80	5	12,6 \pm 1,5

CC= concentración. En (*) las hembras fueron inyectadas más de una vez.

A manera de síntesis se puede decir que el tipo de desarrollo ovárico de *Paralabrax humeralis* es asincrónico y los ovocitos se clasificaron en cinco estadios: inmaduro de 50 a $166,48 \pm 46,30\mu\text{m}$ (I), pre-vitelogénico de $205,35 \pm 45,11$ a $307,12\mu\text{m}$ (II), vitelogénico de $312,37$ a $496,12 \pm 52,05\mu\text{m}$ (III), maduro de $525,10$ a $698,71 \pm 161,71\mu\text{m}$ (IV) e hidratado de $>700\mu\text{m}$ (V). En los machos la concentración espermática varió entre $0,85 \pm 0,19$ y $6,19 \pm 1,51$ (esp.ml⁻¹E-10), siendo similar entre el foto-termoperiodo artificial y artificial comprimido. En ambos tratamientos se observó que hay una relación entre el porcentaje de motilidad y la temperatura, siendo que menos del 60 por ciento de la motilidad espermática se da a 17°C y más del 80 por ciento a 19°C. La evaluación de esteroides sexuales presentó mayor variación en la concentración plasmática de VTG y 11KT con un foto-termoperiodo artificial comprimido, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$).

Bajo las condiciones de cultivo controlado establecidas en este experimento, el foto-termoperiodo reguló la maduración sexual de las hembras reproductoras de *Paralabrax humeralis*, resultando en la obtención de picos de maduración y desoves naturales e inducidos. La calidad espermática se mantuvo similar a lo largo del experimento, mostrando que los machos pueden estar listos para liberar esperma todo el año. Esta información puede ser considerada como línea base para la reproducción de la cabrilla y es esencial para poder empezar a obtener una producción programada de huevos y larvas que permita un desarrollo acuícola. Este trabajo demostró bajo una serie de indicadores que si se puede obtener la maduración sexual y el desove de *Paralabrax humeralis*. Los indicadores utilizados en esta investigación pueden ser aplicados de la misma manera en otras especies de peces marinos para empezar la reproducción bajo condiciones controladas. La información obtenida aplicando estos indicadores permite en el tiempo, reducir el estrés ocasionado en los reproductores, evitando la manipulación innecesaria de estos. Como consecuencia, se obtendrá un mayor porcentaje de maduración sexual en hembras y machos, obteniéndose desoves de mejor calidad.

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones imperativas en este estudio, se concluyó lo siguiente a partir de lo observado.

1. El foto-termoperiodo en la maduración sexual de *Paralabrax humeralis* permite regular el desarrollo ovocitario; al incrementar la temperatura de los 17 a 20 grados centígrados, con un fotoperiodo de 10 a 12 horas de luz, se logró inducir el proceso de maduración sexual.
2. El tipo de desarrollo ovárico de *Paralabrax humeralis* es asincrónico y los ovocitos se clasificaron en cinco estadios: inmaduro <50 a $166,48 \pm 46,30\mu\text{m}$ (I), pre-vitelogénico $205,35 \pm 45,11$ a $307,12\mu\text{m}$ (II), vitelogénico $312,37$ a $496,12 \pm 52,05\mu\text{m}$ (III), maduro $525,10$ a $698,71 \pm 161,71\mu\text{m}$ (IV) e hidratado $>700\mu\text{m}$ (V).
3. La concentración espermática varió entre $0,85 \pm 0,19$ y $6,19 \pm 1,51$ (esp.ml⁻¹E-10), siendo similar entre tratamientos.
4. En ambos tratamientos se observó una relación entre el porcentaje de motilidad espermática y la temperatura, menos del 60 por ciento de la motilidad espermática se dio a 17°C y más del 80 por ciento a 19°C.
5. La concentración plasmática de vitelogenina y 11ketotestosterona en las cabrillas es regulada por el foto-termoperiodo artificial y artificial comprimido, presentandse concentraciones más altas en el foto-termoperiodo artificial comprimido.

6. El efecto del foto-termoperiodo en el desove de *Paralabrax humeralis*, bajo condiciones de cultivo controladas, permite obtener de forma natural huevos. Los machos se observaron espermiantes a lo largo de toda la experimentación.
7. La concentración hormonal que permitió inducir el desove en las cabrillas fue de $5\mu\text{g.kg}^{-1}$ de GnRH α + $2,5\text{mg.kg}^{-1}$ de domperidona aplicado a hembras en estadio III ($496,12 \pm 52,05\mu\text{m}$) de desarrollo ovocitario.

VI. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados en la presente investigación, se recomienda:

1. Optimizar el uso de los sistemas SRA en función a los requerimientos reproductivos de la cabrilla, determinando el diseño y la operación correcta para tener mayor disponibilidad de desoves durante el año.
2. Evaluar la inducción hormonal para determinar el tiempo de recuperación ovocitaria de los reproductores de cabrilla sobre la maduración sexual y la calidad de los desoves obtenidos para optimizar una producción programada de desoves en cautiverio.
3. Realizar estudios nutricionales para determinar los requerimientos de proteínas y ácidos grasos en el proceso de maduración sexual y los desoves obtenidos de cabrilla, evaluando posteriormente el desarrollo embrionario, la supervivencia y el desarrollo larval.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackman, R.; Kean-Howie, J. 1995. Fatty acids in aquaculture: Are w-3 fatty acids always important? *Nutrition and utilization technology in aquaculture* 58: 17-21.

Aida, K. 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture*, 74: 11-21.

Aijun, M.; Chao, C.; Jilin, L.; Siqing, C.; Zhimin, Z. 2005. The effect of protein and n-3HUFA on the reproduction of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine fisheries research (Haiyang Shuichan Yanjiu)*, 26 (1): 7-12.

Álvarez- Gonzalez, C.; Civera-Cerecedo, J.; Ortiz-Galindo, S.; Dumas, M.; Moreno-Legorreta, L.; Grayeb-Del Alamo, T. 2001. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. *Aquaculture*, 194: 151-159.

Avilés, M. 2006. Calidad de huevos y larvas según el manejo de reproductores de la cabrilla (*Paralabrax masculatofasciatus*, Pisces: Serranidae). Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona. 187 pp.

Babin, P.; Carnevali, O.; Lubzens, E.; Schneider, W. 2007. Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish, pp 39-76 en *The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications*, editado por: P. J.Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer.

Benetti, D.; Orhun, M.; Sardenberg, B.; O' Hanlon, B.; Welch, A.; Hoenig, R.; Zink, I.; Rivera, J. ; Denlinger, B.; Bacoat, D.; Palmer, K.; Cavalin, F. 2008. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Research*. 2008. Vol. 37 Issue 7. 701-711 pp.

Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 26(4): 877-920.

Billard, R. 1990. Culture of salmonids in fresh water. *Aquaculture Vol 2.* 35-42.

Bjornsson, B.; Halldorsson, O.; Haux, C.; Norberg, B.; Brown, C. 1998. Photoperiod control of sexual maturation of the Atlantic halibut (*Hypoglossus hippoglossus*): plasma thyroid hormone and calcium levels. *Aquaculture* 166: 117-140.

Bon, E.; Breton, B.; Govoroun, M.; Le Menn, F. 1999. Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: II-Seasonal variations of plasma gonadotropins (GTH I and GTH II) levels correlated with ovarian follicle growth and egg size. *Fish Physiol. Biol.* 20: 143-154.

Bortone, S.; Williams, J. 1986. Species profiles: life histories and environmental requirements of costal fishes and invertebrates. (South Florida). Grey, lane, mutton and yellowtail snapper. *Biological Report*, 82: 11-52

Bromage, N. 1995. Broodstock management and seed quality general considerations, 1-24. En: Bromage, N.R. y R.J. Robert (Eds.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell, Oxford, 424 p.

Bromage, N.; Duston, J. 1986. The control of spawning in the rainbow trout using photoperiodic techniques. *Rep. Inst. Fres. Res. Drott.* 63: 26-35.

Bromage, N.; Roberts, R. 1995. *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell science. 432 p.

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

Canal, L. 1993. Ciclo reproductivo de la cabrilla (*Paralabrax humeralis*) en el área de Paíta, Perú. En *Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar*, La Paz,

B.C.S., México. p. 24.

Carrillo, M. 2009. La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en Acuicultura.

Carrillo, M.; Zanuy, S. 1993. Fisiología de la reproducción de los teleosteos. In F. Castello-Orvay (Ed.). Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Universidad de Barcelona, España. pp. 125-142.

Carrillo, M.; Zanuy, S.; Prat, F.; Cedrá, J.; Ramos, J.; Mañanós, E.; Bromage, N. 1995. Sea bass, pp. 138-168 in Broodstock Management and Egg and Larval Quality, editado por N.R. Bromage and R.J. Roberts. Blackwell, Oxford.

Carrillo, M.; Zanuy, S.; Prat, F.; Serrano, R.; Bromage, N. 1993. Environmental induction of spawning in sea bass, Recent Advances in Aquaculture vol. 4, editado por R.J. Roberts and J. Muir. Blackwell, Oxford. pp. 72-93.

Castaño-Rivera, F.; Botero-Arango, J. 2005. Monitoreo de los niveles de testosterona y estradiol en plasma sanguíneo de hembras de pargo palmero *Lutjanus analis* mantenidas bajo dos termoperiodos de acondicionamiento diferentes. pp. 34-41.

Cerdá, J.; Carrillo, M.; Zanuy, S.; Ramos, J. 1994. Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: preliminar observations. Aquat. Living Resour., 7:225-266.

Cerdá, J.; Fabra, M.; Raldúa, D. 2007. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration, pp 349-396 en The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications, editado por: P. J.Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer. The Netherlands.

Chen, F.; Chow, M.; Chao, T.; Lim, R. 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauviva* (Forsk.) in Singapore. Singapore J. Pri. Ind. 5(1): 1-21.

Chirichigno, N. 1974. Clave para identificar los peces marinos del Perú. Inst. Mar Perú-Callao, 44: 347-402.

Chirichigno, N.; Vélez, J. 1998. Clave para identificar los peces marinos del Perú. Segunda edición. Publicación especial Inst Mar Perú. 500 pp.

Colt, J.E., Armstrong, D.A., 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, molluscs. Bioengineering Symposium for Fish Culture. Publication, vol. 1, pp. 34–47.

Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W., Avnimelech, Y., 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. Aquaculture Engineering 40, 105–112.

Devauchelle, N.; Alexandre, J.; Le Corre, N.; Letty, Y. 1987. Spawning of Sole (*Solea solea*) in captivity, Aquaculture 66: 125-147.

Donaldson, E.; Hunter, G. 1982. Sex control in fish with particular reference to salmonids. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 99–110.

Dubois, M.; Gilles, K. ; Hamilton, J.; Rebers, P.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.

Elsayed, A.; Elsayed, L.; Yau, C. 2006. Maintenance of continuously monitored degrading systems. pp. 3–7.

Espino, M.; Véliz, M.; Valdivia, M. 1989. Algunos aspectos sobre la biología y pesquería de los recursos que sustentan la actividad artesanal en el Perú, Revista de la Comisión Permanente del Pacífico Sur, 18: 49-68.

Esquer, J. 2012. Análisis del transcriptoma en embriones de *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869). pp. 14–21.

Fernández-Palacios, H.; Izquierdo, M.; Robaina, L. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. Inf. Tec. Inst. Canario Cienc. Mar. pp 12, 200.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry, 226: 497–509.

Frémont, L.; Léger, C.; Petridou, B.; Gozzelino, M. 1984. Effects of a polyunsaturated fatty acid deficient diet on profiles of serum vitellogenin and lipoprotein in vitellogenic trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 19 (7): 522-528.

Furuita, H.; Tanaka, H.; Yamamoto, T.; Susuki, N.; Takeuchi, T. 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 210 (1-4): 323-333.

Furuita, H.; Yamamoto, T.; Shima, N.; Takeuchi, T. 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220 (1-4): 725-735.

Futema, S. 2004. Efecto de la temperatura y salinidad durante el desarrollo embrionario y de la densidad de siembra en la crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis CICIMAR. pp. 64-72.

Gálvez, M. 2015. Escala de madurez gonadal de cabrilla *Paralabrax humeralis* (Valenciennes, 1828). Boletín IMARPE vol. 30 N° 1-2: p. 3-9.

Garrido-Pereira, A.; Schwarz, M.; Delbos, B.; Rodrigues, R.; Romano, L.; Sampaio, L. 2014. Probiotic effects on cobia *Rachycentron canadum* larvae reared in a recirculating aquaculture system. pp. 22-35.

Girin, M.; Devauchelle, N. 1978. Decalage de la periode de reproduction par raccourcissement des cycles photoperiodique et thermique chez poissons marines. *Ann.Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 18: 1059-1066.

Glogowski, J.; Abiak, I.; Ucharczyk, D.; Uczy, L.; Sky, N.; Iros, M. 1999. Some properties of bream *Abramis brama* sperm and its cryopreservation. *Aquacult. Res.*, 30: 765-772

González-Martínez, D.; Zmora, N.; Saligaut, D.; Zanuy, S.; Elizur, A.; Kah, O.; Muñoz-Cueto, J. 2004. New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 28: 1-15.

Heemstra, P. 1995. Serranidae. Meros, serranos, guasetas, enjambres, baquetas, indios, loros, gallinas, cabrillas, garropas. p. 1565-1613. In W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter and V. Niem (eds.) Guia FAO para Identificación de Especies para lo Fines de la Pesca. Pacífico Centro-Oriental. 3 Vols. FAO, Rome.

Hansen, T.; Karlsen, O.; Taranger, G.; Hemre, G.; Holm, J.; Kjesbu, O. 2001. Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. *Aquaculture* 203: 51-67.

Hargrove, M.; Wilkinson, A.; Olson, J. 1996. Structural factors governing heme dissociation from metmyoglobin. *Biochemistry* 35:11300 –11309.

Hart, N. 1990. Fertilization in teleost fishes: Mechanism of sperm-egg interactions. *Int. Rev. Cytol.*, 121: 1-66.

Hartling, R.; Pereira, J.; Kunkel, J. 1997. Characterization of a heat-stable fraction of lipovitellin and development of an immunoassay for vitellogenin and yolk protein in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *J. Exp. Zool.* 278:156-166.

Hartree-Lowry, E. F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48: 422-427.

Heppell, S.; Sullivan, C. 1999. *Mycteroperca microlepis* vitellogenin: purification, characterization and use for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper. *Fish Physiol. Biochem.* 20: 361-374.

Hoar, W.; Randall, D. 1969. The endocrine system. *Fish Physiology*. Academic Press. Nueva York. Vol.2.

Hoover, E. 1937. Experimental modification of the sexual cycle in trout by control of light. *Science* 86: 425-426.

Hunter, G.; Donaldson, E.; Dye, H. 1981. Induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). I. Further studies on the use of salmon pituitary preparations.

Aquaculture 26, 117–127.

Hunter, J.; Macewicz, B. 1985. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fish. In R. Lasker (Ed.). An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis mordax*.

NOAA Technical Report NMFS 36. pp. 79-94.

Ichihara, K.; Fukubayashi, Y. 2010. Preparation of fatty acid methyl esters for gas- liquid chromatography. J. Lipid Res., 51: 635-640.

Instituto del mar del Perú (IMARPE). 2010. Plan Estratégico para el Desarrollo del Sector Pesquero en el Perú. Componente: Acuicultura. Dirección de Investigaciones en Acuicultura, Gestión Costera y Aguas Continentales.

Isla, M. 2007. Water quality in recirculating aquaculture systems for arctic charr (*Salvelinus alpinus*) culture. pp. 27-36.

Isla, M.; Arencibia, G.; Delgado, G.; Tizol, R. 2006. Evaluation and develop of the introduction of Seabreams (*Sparus aurata*) and Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) culture in the coastal zones of Cuban shelf. pp. 85-94.

Jalabert, B. 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. Reprod. Nutrit. Develop. 45: 261-279.

Kagawa, H.; Okuzawa, K.; Tanaka, H. 2003. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. Biol. Reprod. 68: 1562–1568.

Kah, O.; Anglade, I.; Leprêtre, E.; Dubourg, P.; De Monbrison, D. 1993. The reproductive brain in fish. Fish Physiol Biochem 11:85-98.

Kasawa, A. 1993. Importance of dietary docosahexaenoic acid on growth and survival of

fish larvae. Proceedings of Finfish Hatcheries Asia. pp. 12-19.

Kime, D.; Van Look, K.; McAllister, B.; Huyskens, G.; Rurangwa, E.; Ollevier, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. pp. 59-74.

Kubitza, F. 1998. Técnicas de transporte de peixes vivos. Aqua & Imagem. Campo Grande MS. 44p.

Kuo, C; Ting, Y; Yeh, S. 1988. Induced sex-reversal and spawning of Blue-Spotted grouper, *Epinephelus fario*. Aquaculture, 74: 113-126.

Lam, T. 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish, 65-116. En: Hoar, W.S., D.J Randall y E.M. Donalson (Eds). Fish Physiology. Vol 9, Reproduction, Parte B, Behavior and Fertility Control. Academic Press, New York, 477 p.

Le Menn, F.; Cerdá, J.; Babin, P. 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles, pp: 1-37 en The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications, editado por: P. J.Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer. The Netherlands.

Linhart, O.; Mims, D.; Shelton, L. 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon and paddlefish. J Fish Biol 47, 902-909.

Loir, M. 1999. Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study on the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. Mol. Reprod. Dev. 53: 434-442.

Lomax, D.; Roubal, J.; Moore, D.; Johnson, L. 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. pp. 25-31.

MacKinnon, M. 1990. Status and potential of Australian *Lates calcarifer* culture. AQUACOP. pp. 16-25.

Mallya, Y. 2007. The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture. Fisheries Training Programme, Final Project. The United Nations University 30p.

Mañanós, E.; Núñez, J.; Zanuy, S.; Carrillo, M.; Le Menn, F. 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vitellogenin. II-Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(2): 217-223.

Marino, G.; Panini, E.; Longbardi, A.; Mandich, A.; Finoia, M.; Zohar, Y.; Mylonas, C. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture* 219. 120-123.

Martínez. 2007. Efecto del nivel de inclusión de ácidos grasos esenciales y proteína en el alimento de reproductores de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) sobre la calidad de las primeras fases de vida. Tesis B.I.C. Mexico.

Mazorra, C.; Bruce, M.; Bell, J.; Davie, A.; Alorend, E.; Jordan, N.; Rees, J.; Papanikos, N.; Portero, M.; Bromage, N. 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 227 (1-4): 21-33.

Mazón, M.; Gómez, A.; Carrillo, M.; Zanuy, S. 2008. Efecto in vivo de la LHsc o su gen codificante en los niveles plasmáticos de LH y espermiación de la lubina (*Dicentrarchus labrax*), pp. 99-102.

Miñano, J.; Castillo, J. 1971. Primeros resultados de la investigación biológica pesquera de la "caballa" *Scomber japonicus peruanus* (Chimbote). *Infmes Inst. Mar Peru*.

Molés, G.; Gómez, A.; Rocha, A.; Carrillo, M.; Zanuy, S. 2008. Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 158: 68-76.

Montserrat, N.; González, A.; Méndez, E.; Piferrer, F.; Planas, J. 2004. Effects of follicle stimulating hormone on estradiol-17 β production and P-450 aromatase (CYP19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137: 123-131.

Munro, A. 1990. Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences, 1-11. En: Munro, A., A. Scott y T.J. Lam (Eds.). Editorial CRC, Florida. 241 p.

Mylonas, C.; Woods, L.; Thomas, P.; Zohar, Y. 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled/release GnRH α -delivery systems. Gen. Comp. Endocrinol., 110: 276-289.

Mylonas, C.; Zohar, Y. 2001. Use of GnRH α -delivery systems for the control of reproduction in fish. Rev. Fish Biol. Fisheries., 10: 463-491.

Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol. 38: 217-229.

Nagahama, Y.; Michiyasu, Y.; Masakane, Y.; Noriyoshi, S; Minoru, T. 1993. Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. Fish Physiol. Biochem. 11: 3-14.

Nelson, J. 1994. Fishes of the World. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Tercera edición. 600pp.

Oda, D.; laVenBurg, J.; Rounds, J. 1993. Reproductive biology of three California species of *Paralabrax* (Pisces:Serranidae). California Cooperative Oceanic Fisheries Investigation Reports 34:122-132.

Ohta, T.; Miyake, H.; Miura, C.; Kamei, H.; Aida, K.; Miura, T. 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Biol. Reprod. 77: 970-977.

Okumura, S., Okamoto, K., Oomori, R., Nazakono, A., 2002. Spawning behavior and artificial fertilisation in captive reared spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Aquaculture 206, 165–173.

Oppedal, F.; Taranger, G.; Juell, J.; Fosseindengen, J.; Hansen, T. 1997. Light intensity affects growth and sexual maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts in sea cages. Aquat. Living Resour. 10: 351-357.

Oshiro T.; Hibiya, T. 1982. In vitro yolk globule fusion of the oocyte in the Plaice *Limanda yokohamae*. Bull. Jpn. 162-166.

Patiño, R.; Sullivan, C. 2002. Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleosts fish. Fish Physiol.

Philminaq (Mitigating Impact from Aquaculture in the Philippines). 2008. Water Quality Criteria and Standards for Freshwater and Marine Aquaculture. Biochem. 26: 57-70. Aquaculture Asia.

Planas, J.; Swanson, P. 1995. Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins, GTH I and GTH II, in vitro. Biol. Reprod. 52: 697-704.

Planas, J.; Athos, J.; Goetz, F.; Swanson, P. 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. Biol. Reprod. 62: 1262–1269.

Prat, F.; Zanuy, S.; Bromage, N.; 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. J. Fish Biol. 54: 125-137.

PRODUCE. 2012. Anuario estadístico pesquero y Acuícola. Ministerio de la Producción. 180 pp.

PRODUCE. 2016. Anuario estadístico pesquero y Acuícola. Ministerio de la Producción.

Ramos, J. 1985. Influencia del fotoperiodo en el ciclo reproductor del lenguado (*Solea solea L.*). Cuad Marisq Publ Téc, 9: 314.

Refstie, T.; Sotss, J.; Donaldson, E. 1982. Productions of all female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by diploide gynogenesis using irradiated sperm and cold shock. Aquaculture 29, 67–82.

Rodríguez, L.; Carrillo, M.; Sorbera, L.; Zohar, Y.; Zanuy, S. 2004. Effects of photoperiod on pituitary levels of three forms of GnRH and reproductive hormones in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during testicular differentiation and first testicular recrudescence. Gen. Comp. Endocrinol. 136: 37-48.

Rocha, A.; Zanuy, S.; Carrillo, M.; Gómez, A. 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. Gen. Comp. Endocrinol.

Rosenfeld, H.; Meiri, I.; Elizur, A. 2007. Gonadotropic regulation of oocyte development, pp 175-202 en *The fish oocyte: From basic studies to biotechnological Applications*, editado por: P. J.Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer. The Netherlands.

Samamé, M. 1974. Algunos aspectos sobre la biología y pesquería de *Paralabrax humeralis* (Valenciennes) del are de Paita (Peru). Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. UNMSM. 46 p.

Sargent, J.; Bell, J.; McEvoy, L.; Tocher, D.; Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177:191-199.

Schultz, R.; Andersson, E.; Taranger, G. 2006. Photoperiod manipulation can stimulate or inhibit pubertal testis maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Anim. Reprod.* 3: 121-126.

Servicio Nacional de Meteorología e hidrología del Perú (SENAMHI). 2015. Datos históricos del clima.

Silva, A.; Oliva, M. 2010. Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(3): 377-386, 2010.

Sivaloganathan, B.; Walford, J.; Lam, T. 1998. Free aminoacids and energy metabolism in eggs and larvae of sea bass, *Lates calcarifer*. *Mar. Biol.*, 131: 695-702.

Sorgeloos, P.; Sweetman, J. 1993. Aquaculture success stories. World Aquaculture. 123-131.

Sower, S.; Schreck, C.; Donaldson, E. 1982. Hormone induced ovulation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) held in sea water and fresh water. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 627-632.

Springate, J. 1990. Egg quality and fecundity in rainbow trout: The determining factors and mechanisms of control.

Srivastava, R.; Brown, J.; Shahidi, F. 1995. Changes in the amino acid pool during embryonic development of cultured and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 131: 115-124.

Suwa, K.; Yamashita, M. 2007. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. Pp. 323-347 en The fish oocyte. The Netherlands.

Szabó, T.; Medgyasszay, C.; Horvath, L. 2002. Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, Cyprinidae) Aquaculture, 203: 389-395.

Taylor, J.; Migaud, H.; Porter, M.; Bromage, N. 2005. Photoperiod influences growth rate and plasma insulin-like growth factor-1 levels in juvenile rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 142: 169-185.

Tetzlaff and Heidinger. 1992. Biofiltration principles. SIUC Fisheries and Illinois Aquaculture Center, Bulletin 9:17 pgs.

Timmons, M.; Ebeling, J.; Wheaton, F.; Summerfelt, S.; Vinci, B. 2002. Recirculating Aquaculture Systems, 2nd Edition. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY 14850, USA. 800 p.

Toledo, J. 1993. Successive spawning of grouper *Epinephelus suillus* (Vallenciennes), in a tank and floating net cages. Aquaculture. 115: 361-367.

Tovar, D. 2002. Potencial probiótico de levaduras productoras de poliaminas en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina Europea y la cabrilla arenera. *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis B.C.S Mexico.

Trippel, E.; Morgan, M. 1994. Sperm longevity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Copeia.

Trudeau, V. 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. Rev Reprod 2: 55-68.

Tseng, W; Ho, S. 1979. Induced breeding and early development of red grouper (*Epinephelus akaara*, Temminck and Schlegel). Hong Kong, Hong Kong. p. 1-16.

Tucker, J. 2004. Spawning by captive serranid fishes; a review. Journal of the World Aquaculture Society 25:345-359.

Tyler, C.; Sumpter, J. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. Fish Biol. Fish., 6: 287-318.

Ukawa, M.; Higuchi, M.; Mito, S. 1966. Spawning habits and early life history of a serranid fish, *Epinephelus akaara* (Temminck et Schlegel). Jpn.

Van Der Kraak, G.; Suzuki, K.; Peter, R.; Itohy, H. 1992. Properties of carp gonadotropin I and gonadotropin II. Gen. Comp. Endocrinol. 85: 217–229.

Verástegui, A.; Vega, E.; Lazo, O. 2001. Balance de amonio y oxígeno en un sistema de recirculación para acuicultura experimental. Anuales Científicos Universidad Nacional Agraria La Molina (p. 152).

Vílchez, C. 2013. Efecto del régimen térmico en la calidad de los huevos y desarrollo embrionario de la anguila europea (*Anguilla anguilla*).

Vinatea, L.; Olivera, A.; Andreatta, E.; Beltrame, E.; Petersen, R.; Derner, R. 1993. Producción comercial de larvas de *Penaeus paulensis* y *Penaeus schmitti* en el sur del Brasil. In: Symposium on Shrimp Culture, 4., João Pessoa. Anais. Brazil.

Wallace, R.; Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleost. *Amer. Zool.*

Watanabe, T. 1990. Nutrition and growth. In: *Intensive fish farming*. BSP Professional Books. pp. 154–197.

Watanabe, T.; Kiron, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, 124: 223-251.

Woodward, B. 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture*, 124 (1-4): 133-168.

Zanuy, S.; Prat, F.; Carrillo, M.; Bromage, N. 1995. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -oestradiol levels of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquat Liv Res* 8: 147-152.

Zohar, Y.; Elizur, A.; Sherwood, N.; Powell, J.; Rivier, J.; Zmora, N. 1995. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 97: 289-299.

Zohar, Y. 1989. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. En: SHILO, M. & Sarig, S. *Fish Culture in Warm wáter Systems: Problem and Trends*. Florida, p. 65-119.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Tipos de ovocitos en relación al estadio ovocitario de *P. humeralis* con característica macroscópica y microscópica.

Tipo de ovocito	Estadio	Característica macroscópica	Característica microscópica
virginal	estadio 0	Ovario pequeño y poco consistente de aspecto homogéneo y turgente. Presenta color desde anaranjado claro o poco translúcido, hasta anaranjado con algunas zonas rojizas. Se observa poco desarrollo vascular.	Se observan ovocitos inmaduros, pre-vitelogenados o ambos. Lamelas poco desarrolladas.
reposo	estadio I	El ovario es poco consistente, homogéneo y turgente. De color anaranjado, anaranjado rojizo o anaranjado claro con zonas rojizas. Puede o no observarse un desarrollo vascular. Al cortar transversalmente el ovario, se observa su pared gruesa.	Las características son similares al estadio virginal (0), diferenciándose de éste por la presencia de una pared gonadal más gruesa y la disposición de los ovocitos que se encuentran más desordenados.
maduración	estadio II	Ovario poco consistente de color amarillo intenso a anaranjado claro. Es poco homogéneo y turgente, se puede o no observar un marcado desarrollo vascular. Se observan ovocitos vitelogenados de color anaranjado claro.	Se observa el inicio de la maduración gonadal por presencia de ovocitos vitelogenados, también se observan ovocitos inmaduros y pre-vitelogenados.
maduro	estadio III	Son ovarios consistentes, homogéneos y turgentes. Su color varía desde amarillo hasta anaranjado. Se observa claramente ovocitos desarrollados, que corresponden a los ovocitos maduros, además del marcado desarrollo vascular.	Los tipos de ovocitos que predominan son maduros, existiendo también ovocitos inmaduros, pre-vitelogenados y vitelogenados en menor proporción.

desovante	estadio IV	El ovario puede ser muy consistente, debido a la presencia de gran cantidad de ovocitos hidratados previos al desove; poco consistente, por presencia de algunos ovocitos hidratados al estar en pleno desove o flácido por presencia de folículos post-ovulatorios. El color varía desde anaranjado claro hasta anaranjado intenso. Se observa marcado desarrollo vascular.	Se observan ovocitos hidratados y/o folículos post-ovulatorios, además de ovocitos en otros grados de desarrollo (inmaduro, pre vitelogenado, vitelogenado, maduro).
recuperación	estadio V	Los ovarios presentan cierta flacidez. Son de color anaranjado muy intenso, puede observarse puntos amarillos intensos de mayor o menor tamaño, que corresponden a ovocitos atrésicos. Presenta un desarrollo vascular evidente.	Se observan ovocitos atrésicos en porcentaje igual o mayor al 50% con respecto a los ovocitos de la última cohorte; además, de la presencia de ovocitos inmaduros, pre vitelogenados y/o vitelogenados.

Fuente: Tomado de Gálvez (2015).

**Anexo 2: Material y reactivos del kit de vitelogenina comercial marca CUSABIO
“Grouper Vitellogenin (VTG) ELISA Kit-CSB14116Fh.**

Reagents	Quantity
Assay plate	1(96 wells)
Standard	6 x 0,5 ml
Antibody	1 x 6 ml
HRP-conjugate	1 x 6 ml
Wash Buffer (20 x concentrate)	1 x 15 ml
Substrate A	1 x 7 ml
Substrate B	1 x 7 ml
Stop Solution	1 x 7 ml
Adhesive Strip (For 96 wells)	4
Instruction manual	1

1. Se prepararon todos los reactivos siguiendo las indicaciones del kit.
2. Se determinó el número de pozos a utilizar en función a la cantidad de muestras obtenidas.
3. Se estableció un pocillo como blanco sin ningún tipo de solución.
4. Se adicionó 50 µl de estándar y de muestra por pocillo. Se realizaron las pruebas por duplicado.
5. Se adicionó 50 µl de conjugado de HRP a cada pocillo (no al blanco), luego, 50 µl del anticuerpo a cada pocillo. Después se mezcló bien y se puso a incubar durante una hora a 37 ° C.
6. Se realizaron tres lavados utilizando 200µl del tampón de lavado con una pipeta multicanal marca BIOHIT, cada lavado se dejó reposar durante 10 segundos. La eliminación completa del líquido en cada paso fue esencial para un buen rendimiento. Después del último lavado, se eliminó cualquier resto de la solución tampón de lavado invirtiendo y golpeando ligeramente la placa de 96 pocillos contra toallas de papel limpias.
7. Luego, se adicionó 50 µl del sustrato A y 50 µl del sustrato B a cada pocillo y se puso a incubar durante 15 minutos a 37 ° C. Se mantuvo en oscuridad.
8. Finalmente se adicionó 50 µl de solución de parada a cada pocillo.

Anexo 3: Material y reactivos del kit de 11ketotestosterona comercial marca CUSABIO “Fish 11-keto Testosterone (11-KT) ELISA-MBS269932”.

Reagents	Quantity
Antibody precoated plate	8 x 12
Fish 11-KT Standards	2 vial
Enzyme conjugate (1:100)	1 vial
Enzyme diluent	1 vial
Antibody diluent	1 vial
Standard diluent	1 vial
Sample diluent	1 vial
Washing buffer (1:25)	1 vial
Colour Reagent A	1 vial
Colour Reagent B	1 vial
Colour Reagent C	1 vial
Instruction manual	1 set

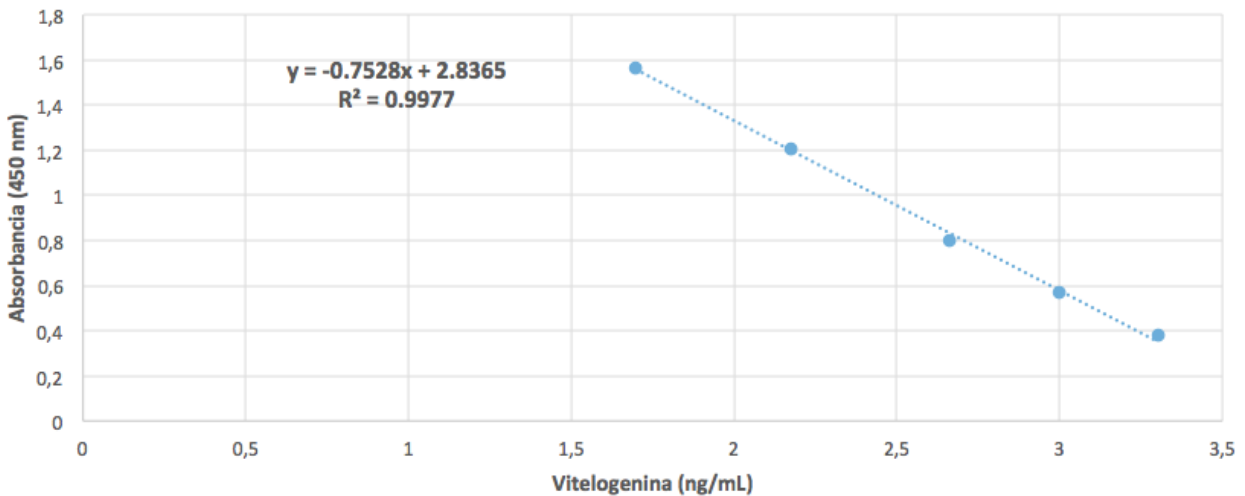
1. Se sacó la placa de 96 pozos y se dejó aclimatar a temperatura ambiente.
2. Se estableció un pocillo como blanco.
3. Se anidió las muestras y las diferentes concentraciones estándar de 11 KT a los pozos correspondientes (100 µl para cada pozo), el pocillo con 0 pg.ml⁻¹ (blanco) se llenó con el diluyente estándar. Luego, se sellaron los pocillos de reacción con cintas adhesivas y se incubó en a 37 ° C por 90 minutos.
4. Se preparó el anticuerpo biotinilado de pescado para 11-KT con 30 minutos previo uso.
5. Se realizaron tres lavados a la placa de ELISA.
6. Después, se añadió el anticuerpo biotinilado de pescado para 11-KT a cada pocillo (100 µl para cada uno). Terminado esto, se sellaron los pocillos de reacción con cintas adhesivas y se incubó a 37 ° C por 60 minutos.
7. Se preparó el líquido enzima-conjugado con 30 minutos previo uso.
8. Se realizaron tres lavados a la placa de ELISA.
9. Luego, se añadió el líquido de enzima conjugada a cada pocillo, excepto los pocillos del blanco (100 µl para cada uno). Se sellaron los pocillos de reacción con cintas adhesivas y se incubó a 37 ° C por 30 minutos.
10. Se realizaron cinco lavados a la placa de ELISA.

11. Seguidamente, se añadió 100 µl de reactivo del líquido de Color a cada pocillo (también en el pocillo en blanco) y se incubó en oscuridad a 37 ° C. Cuando el color para la concentración más alta de la curva estándar se tornó más oscuro y se vio la gradiente de color se detuvo la incubación. La reacción cromogénica fue controlada dentro de los 30 minutos.

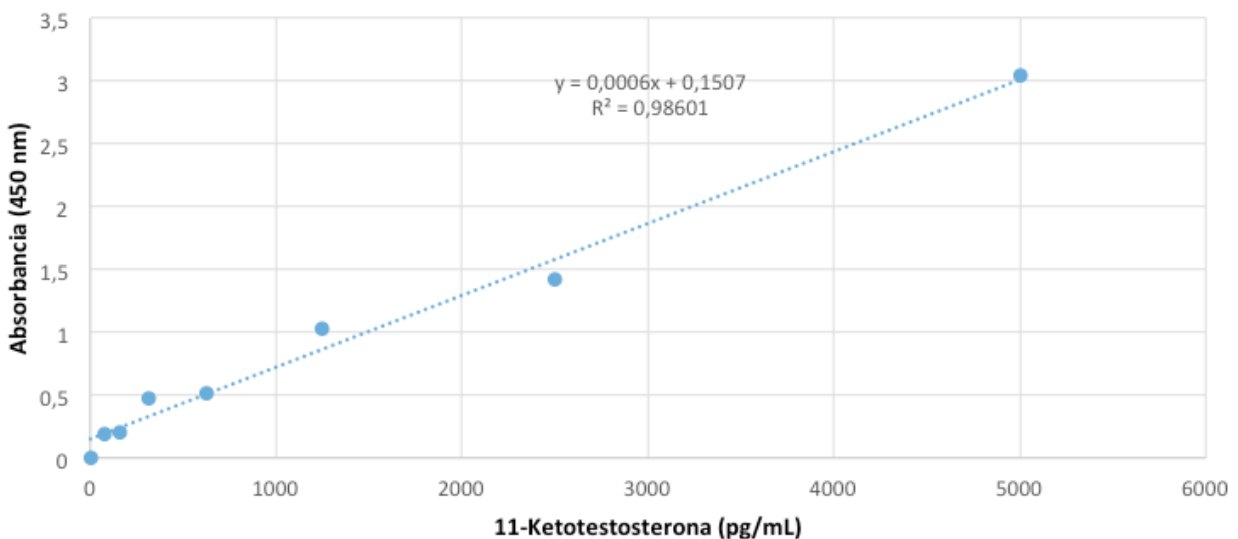
12. Finalmente, se agregó 100 µl del reactivo de color C a cada pocillo (también en el pocillo blanco).

Anexo 4: Curva de calibración obtenida en el ELISA de vitelogenina y 11KT. En ella se muestra la ecuación de la recta y el R².

Curva de calibración (ELISA) para Vitelogenina



Curva de calibración (ELISA) para 11-Ketotestosterona



Anexo 5: Metodología para calcular la cantidad de conceptase y domperidona a una dosis de 5 µg GnRHa/kg + 2,5 mg domperidona/kg.

Descripción	Conceptase	Domperidona
Cantidad de conceptase (ml) para 5 µg de acetato de buserelina por 1 kg de pez y cantidad de domperidona (ml) para 2,5 mg por 1 kg de pez.	0,84 µg → 0,10 ml 5 µg → 0,60 ml	1 mg → 0,10 ml 2,5 mg → 0,25 ml
Cantidad de conceptase y domperidona a inyectar por pez.	0,60 ml → 1kg X → peso del pez	0,25 ml → 1kg X → peso del pez

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

Conceptase (GnRHa):

0,0084 mg acetato de buserelina → 1ml

0,84 mg → 0,1 ml

Domperidona:

10 mg → 1ml

1 mg → 0,1 ml

Anexo 6: Patologías de la experimentación.



Figura 16: Patologías encontradas en el cultivo de *P. humeralis*, *Vibrio* sp.

Anexo 7: Análisis estadístico de la experimentación.

CALIDAD DEL AGUA

TEMPERATURA:

Prueba: Anderson-Darling normality test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Tratamiento 1: 0,074325; Tratamiento 2: 0,08922.

Prueba: Kruskal-Wallis Rank sum test

data: t1 and t2

chi-squared = 6,0988, df = 2, p-value = 0,02778.

OXÍGENO DISUELTO:

Prueba: Anderson-Darling normality test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Tratamiento 1: 0,04422; Tratamiento 2: 0,04835.

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Abril: 0,06133; Mayo: 0,06847; Junio: 0,06559; Julio: 0,07623; Agosto: 0,06377; Setiembre: 0,0613; Octubre: 0,06722; Noviembre: 0,06930; Diciembre: 0,08235.

pH:

Prueba: Anderson-Darling normality test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Tratamiento 1: 0,04503; Tratamiento 2: 0,04677.

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Abril: 0,07342; Mayo: 0,07741; Junio: 0,06995; Julio: 0,07123; Agosto: 0,07256; Setiembre: 0,07122; Octubre: 0,06803; Noviembre: 0,05539; Diciembre: 0,07036.

NAT:

Prueba: Anderson-Darling normality test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Tratamiento 1: 0,04226; Tratamiento 2: 0,04179.

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Abril: 0,05272; Mayo: 0,05546; Junio: 0,05612; Julio: 0,05518;
Agosto: 0,05684; Setiembre: 0,57059; Octubre: 0,05633; Noviembre: 0,05774;
Diciembre: 0,05631.

NO2:

Prueba: Anderson-Darling normality test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Tratamiento 1: 0,04732; Tratamiento 2: 0,04829.

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Abril: 0,06576; Mayo: 0,06654; Junio: 0,06577; Julio: 0,06648;
Agosto: 0,06590; Setiembre: 0,06735; Octubre: 0,06624; Noviembre: 0,06533;
Diciembre: 0,06613.

NO3:

Prueba: Anderson-Darling normality test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Tratamiento 1: 0,04655; Tratamiento 2: 0,04731.

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = Abril: 0,05891; Mayo: 0,05946; Junio: 0,05881; Julio: 0,05903;
Agosto: 0,05887; Setiembre: 0,05801; Octubre: 0,01912; Noviembre: 0,05773;
Diciembre: 0,05837.

MADUREZ OVOCITARIA

ESTADIO I:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,6$, p-value = 0,05422.

alternative hypothesis: two-sided

ESTADIO II:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,6$, p-value = 0,05164.

alternative hypothesis: two-sided

ESTADIO III:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,6$, p-value = 0,05245.

alternative hypothesis: two-sided

ESTADIO IV:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,6$, p-value = 0,05173.

alternative hypothesis: two-sided

ESTADIO V:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,6$, p-value = 0,05092.

alternative hypothesis: two-sided

CALIDAD ESPERMÁTICA

CONCENTRACIÓN:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,33333$, p-value = 0,6994.

alternative hypothesis: two-sided

MOTILIDAD:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,22222$, p-value = 0,9794.

alternative hypothesis: two-sided

ESTEROIDES SEXUALES

VITELOGENINA:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,33333$, p-value = 0,8928.

alternative hypothesis: two-sided

11KT:

Prueba: Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: t1 and t2

$D = 0,33333$, p-value = 0,9307.

alternative hypothesis: two-sided

CALIDAD DEL DESOVE

Nº HUEVOS:

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

$D = 0,3$, p-value = 0,5723.

FLOTABILIDAD (%):

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = 0,4831.

FECUNDACIÓN (%):

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = 0,5721.

ECLOSIÓN (%):

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = 0,6621.

ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE SUPERVIVENCIA (SAI):

Prueba: Two Sample t-test

data: t1 and t2

D = 0,3, p-value = 0,4721.