

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Fisiología y Farmacología



**INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN DE LOS
REPRODUCTORES EN LA CALIDAD DE LA PUESTA
Y EL CULTIVO LARVARIO DE LA DORADA
(*Sparus aurata* L.)**

Alicia García Alcázar
Murcia 1998



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
Y FARMACOLOGÍA

*Unidad Docente de Fisiología Animal
Facultad de Biología*

SALVADOR ZAMORA NAVARRO, Catedrático de Fisiología del
Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Influencia de la alimentación de los reproductores en la calidad de la puesta y el cultivo larvario de la dorada (*Sparus aurata* L.)” ha sido realizada bajo su dirección por **D^a Alicia García Alcázar**, como trabajo para optar al grado de Doctor, hallándose concluida y reuniendo, a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor científico que autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente. La mayor parte de este trabajo experimental se ha realizado en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Murcia del Instituto Español de Oceanografía.

Y para que así conste, expide y firma el presente en Murcia a ocho de junio de mil novecientos noventa y ocho



EMILIA ABELLÁN MARTÍNEZ, Experta I+D del Instituto Español de Oceanografía

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Influencia de la alimentación de los reproductores en la calidad de la puesta y el cultivo larvario de la dorada (*Sparus aurata* L.)” ha sido realizada bajo su dirección por **D^a Alicia Garcia Alcázar**, como trabajo para optar al grado de Doctor, hallándose concluida y reuniendo, a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor científico que autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente. La mayor parte de este trabajo experimental se ha realizado en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Murcia del Instituto Español de Oceanografía.

Y para que así conste, expide y firma el presente en Puerto de Mazarrón a ocho de junio de mil novecientos noventa y ocho

E. Abellán



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
Y FARMACOLOGÍA

LUIS F. CARBONELL MESEGUER, Director del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Murcia,

INFORMA:

Que de acuerdo con la normativa vigente para estudios de tercer ciclo, la memoria titulada “Influencia de la alimentación de los reproductores en la calidad de la puesta y el cultivo larvario de la dorada (*Sparus aurata* L.)”, realizada por **D^a Alicia García Alcázar** en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Murcia y en el Instituto Español de Oceanografía, y dirigida por **D. Salvador Zamora Navarro** y **D^a Emilia Abellán Martínez**, reúne las condiciones necesarias para ser presentada y defendida.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Murcia a ocho de Junio de mil novecientos noventa y ocho.


DPTO. DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Y la tierra estaba desordenada y vacía, y las tinieblas estaban sobre la faz del abismo, y el Espíritu de Dios se movía sobre la faz de las aguas (Gn 1, 2)

Tomó, pues, el Señor Dios al hombre, y lo puso en el jardín de Edén, para que lo cuidara y lo cultivara (Gn 2,15)

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores de Tesis, Salvador Zamora Navarro y Emilia Abellán Martínez, por sus orientaciones y apoyo constantes durante el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto Español de Oceanografía, sin cuyas instalaciones y medios, puestos a mi disposición con total confianza y libertad, no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

A todos mis compañeros de trabajo, en primer lugar a los de los ya lejanos tiempos del Mar Menor, José López Bermudez (†), Jose Antonio López Durá, José Antonio Martínez Madrid, Ignacio Arnal, Eladio Santaella, Mercedes Olmedo y Tito Peleteiro, por su amistad y cariño y por los buenos ratos que pasamos mientras aprendíamos juntos lo que era la Acuicultura.

A mis compañeros de Mazarrón. A Lola y M^aJosé, Pepe, Manolo, Tomás y Pedro, que cada día "se mojan" en el sentido más exacto de la palabra, para mantener a los protagonistas de esta Tesis -los peces- limpios, sanos y bien alimentados. A Marta, Pilar, Javier, Fernando y Santi, por su ayuda en el trabajo diario y muchas veces rutinario de los cultivos. A María, por el toque artístico, y a M^a Luisa, por los años compartidos en Mazarrón y porque ahora, en la distancia, se sigue interesando por nuestras cosas.

A Víctor Diaz del Río, Director del COMU durante 1995 y 1996, por su esforzada y total dedicación a la gestión del Centro, y por contagiarnos -a veces casi a la fuerza- su entusiasmo y actuosidad (ver diccionario).

A Aurelio Ortega, jefe y maestro durante tantos años, por haber sido, sobretodo, compañero y amigo.

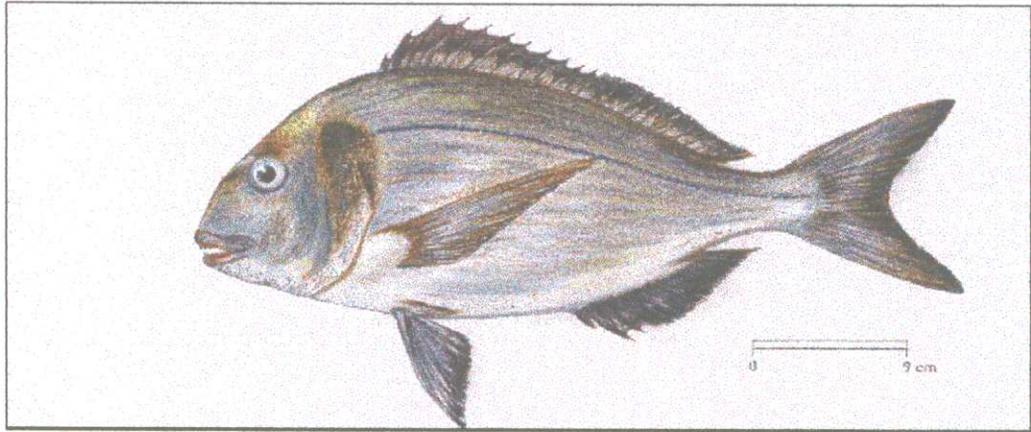
A Emilia porque, además de codirectora de esta tesis, ha sido siempre compañía, amistad y ayuda.

ÍNDICE

1. OBJETIVO	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. REPRODUCCIÓN EN CULTIVO DE PECES	3
2.2 LA DORADA	7
2.2.1. Biología	8
2.2.2. Cultivo	9
2.2.2. Tecnología de la producción	14
2.2.2.1. Puesta e incubación	14
2.2.2.2. Cría larvaria y "destete"	14
2.2.2.3. Preengorde	15
2.2.2.4. Engorde	15
2.2.2.5. Reproductores	16
2.2.3. Reproducción	16
2.3. ALIMENTACION DE REPRODUCTORES: INFLUENCIA EN LA PUESTA Y CULTIVO LARVARIO.	19
2.3.1. Desarrollo del ovario. Reservas nutricionales: vitelo y gota de grasa.	20
2.3.2. Desarrollo embrionario y larvario	24
2.3.3. Influencia de la alimentación en la puesta y cultivo larvario	25
2.3.4. Principales requerimientos en las dietas de reproductores	26
2.3.4.1. Energía y proteína	26
2.3.4.2. Lípidos.	28
2.3.4.3. Vitaminas	28
2.3.4.4. Pigmentos	31
2.3.4.5. Minerales y elementos traza	32
2.4. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LOS LÍPIDOS	32
2.4.1. Formación de la gónada	34
2.4.1.1. Acidos grasos monoinsaturados como fuente de energía	35
2.4.2. Lípidos y vitelogénesis	38
2.4.3. Metabolismo lipídico en las primeras etapas del desarrollo en peces	42
2.4.3.1. Composición lipídica de los huevos	42

2.4.3.2. Utilización de los lípidos en los huevos fecundados	44
2.4.4. Ácidos grasos esenciales en el desarrollo embrionario y larvario	47
2.4.4.1. Conversión de los ácidos grasos poliinsaturados C18 a C20 y C22	47
2.4.4.2. Función de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas.	52
2.4.4.3. Ácidos grasos poliinsaturados como precursores de eicosanoides	54
2.4.5. Resumen	57
2.5. REPRODUCCIÓN-NUTRICIÓN EN DORADA	58
2.5.1. Recomendaciones en el manejo de reproductores de dorada	60
3. MATERIAL Y MÉTODOS	62
3.1. REPRODUCTORES	62
3.2. ALIMENTACIÓN	68
3.3. PUESTAS	70
3.4. CULTIVO LARVARIO	72
3.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS	74
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	75
4. RESULTADOS	76
4.1. EXPERIMENTO 1. 1992	76
4.1.1. Puestas	76
4.1.2. Cultivo larvario	80
4.1.3. Composición en ácidos grasos	80
4.1.4. Composición en ácidos grasos de diferentes órganos	84
4.2. EXPERIMENTO 2. 1993	94
4.2.1. Puestas	94
4.2.2. Cultivo larvario	98
4.2.3. Composición en ácidos grasos ...	98
4.3. EXPERIMENTO 3. 1994	100
4.3.1. Puestas	100

4.3.2. Composición en ácidos grasos de las dietas	103
4.3.3. Composición corporal de los reproductores	104
5. DISCUSIÓN	105
5.1. ALIMENTACIÓN DE LOS REPRODUCTORES	105
5.2. PUESTAS	107
5.3. CULTIVO LARVARIO	112
5.4. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LAS DIETAS Y LAS PUESTAS	114
5.5. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE DIFERENTES ÓRGANOS	118
5.6. COMPOSICIÓN CORPORAL DE LOS REPRODUCTORES ...	120
6. CONCLUSIONES	122
7. BIBLIOGRAFÍA	125



Sparus aurata (Linnaeus, 1758)

1. OBJETIVO

El rendimiento económico de la producción en acuicultura depende en gran parte del suministro de grandes cantidades de huevos de buena calidad que permitan conseguir altas tasas de supervivencia y crecimiento en el cultivo larvario.

Para conseguir este objetivo es necesario disponer de un stock de reproductores suficiente en número de individuos y mantenido en las condiciones óptimas de alimentación y de control de los factores ambientales.

La nutrición de los reproductores se está revelando, gracias a los estudios realizados en salmónidos, carpa, y dorada japonesa, como un factor muy importante que afecta al desarrollo gonadal y a la fecundidad. Aunque falta información precisa sobre los requerimientos nutritivos para la maduración gonadal de los reproductores, se ha comprobado, en general, que la cantidad, calidad y régimen alimentarios influyen en la cantidad y calidad de las puestas.

Los estudios realizados en este campo relacionan los niveles de nutrientes en la alimentación de los reproductores con las tasas de fecundidad y fertilidad del huevo, porcentajes de eclosión, tasas de supervivencia y crecimiento de larvas, y tasas de incorporación al huevo de sustancias principalmente liposolubles.

Se ha estudiado el efecto del tipo de fuente proteica y las interferencias de las proteínas con otros componentes de la dieta como minerales, micronutrientes, ácidos grasos, vitaminas y carotinoides. En los últimos años la máxima atención se ha centrado en las sustancias liposolubles; los resultados indican que los requerimientos en estas sustancias son sensiblemente diferentes en los reproductores y en las distintas etapas del cultivo.

En esta línea de investigación que pretende mejorar los rendimientos de las puestas y el cultivo larvario en dorada, se llevaron a cabo en la Planta de Cultivos de Mazarrón en 1992, 1993 y 1994 tres experimentos de alimentación de reproductores centrados en la influencia de los lípidos, y especialmente los ácidos grasos, en la reproducción.

Se puede concretar por tanto el objetivo de este trabajo como:

"Establecimiento de las características idóneas de la dieta de reproductores de dorada (*Sparus aurata* L.) en cuanto a lípidos, especialmente ácidos grasos poliinsaturados, para mejorar los resultados de la reproducción en cantidad y calidad de las puestas".

2. INTRODUCCIÓN

2.1. REPRODUCCIÓN EN CULTIVO DE PECES

El desarrollo de la acuicultura de peces requiere, según Zanuy & Carrillo (1992), un mayor conocimiento de los complejos procesos de la reproducción en los siguientes campos:

El primer objetivo es conseguir la reproducción en cautividad de las especies de que se trate controlando y sincronizando la época de puesta. En la actualidad se aplican técnicas en este sentido en dorada, lubina y rodaballo, aunque no con un control completo del proceso por ser técnicas adaptadas de especies de agua dulce que tienen pautas de reproducción similares. La investigación sobre la influencia de los factores ambientales y su regulación neuroendocrina, mejoraría en gran manera los resultados de la producción.

Otro campo importante de trabajos en especies marinas todavía por desarrollar, son las técnicas de control de sexo, fisiológicas o genéticas, utilizadas para obtener machos o hembras. Se aplican a nivel industrial en salmónidos, cíclidos, y ciprínidos. El estudio de los factores endocrinos o ambientales que determinan la edad de la primera maduración sexual es de gran interés por el posible ahorro de gastos de mantenimiento de reproductores en especies que tardan varios años en llegar a la madurez.

También son prioritarios en el momento actual los estudios de selección genética de líneas de reproductores idóneas para el cultivo y la producción de híbridos con la consiguiente mejora de las técnicas de conservación de gametos.

El segundo objetivo es la obtención de huevos y larvas con altas tasas de supervivencia, buena calidad y uniformidad, y crecimiento rápido. Entre los factores a tener en cuenta, y lo que constituye el tema de esta tesis, estaría la definición de los requerimientos nutricionales de los reproductores a lo largo de su ciclo anual y metabólico. En las especies actualmente cultivadas en nuestro país se desconocen casi completamente los mecanismos responsables de la incorporación del vitelo y en que medida los factores ambientales, nutricionales, endocrinos y sociales pueden afectar tanto a la síntesis de vitelogenina como al mecanismo y tasa de incorporación de la misma en el ovocito, a las características del vitelo y de otras sustancias que servirán de alimento a las larvas.

La base de la reproducción en los peces es su gran fecundidad ya que se pueden obtener varios centenares de miles de huevos por kg de hembra. Una vez obtenidos los reproductores procedentes del medio natural o del cultivo, el siguiente paso sería conseguir la reproducción en cautividad. Este objetivo está conseguido desde los años 30 para los peces de agua dulce

y los salmónidos, y a partir de 1971 en peces marinos. En general el desarrollo de las gónadas llega normalmente hasta los momentos finales de la maduración de los gametos y, justo antes de la liberación de los mismos, se produce una interrupción (Harvey & Hoar, 1980) que hace necesario el uso de la inducción a la puesta.

El carácter periódico anual de la reproducción, al menos en especies de aguas templadas, presenta inconvenientes en el desarrollo de las siguientes fases de cultivo y en el rendimiento económico de la actividad, por lo que se han desarrollado también técnicas de sincronización y ampliación de los periodos de puesta con objeto de obtener huevos durante la mayor parte del año.

La maduración de la gónada en los peces y su comportamiento reproductor están muy relacionados con los factores ambientales como la temperatura y el fotoperiodo. Los peces son poiquilotermos y desarrollan por tanto una mayor actividad en verano; en esta época del año se acumulan las reservas alrededor del tubo digestivo en los pescados magros mientras que en los grasos se depositan en el músculo.

El desarrollo de la reproducción se detecta principalmente por dos índices, el gonado-somático que relaciona el peso de la gónada con el peso total del pez, y el hepato-somático, que se refiere al peso del hígado. El primero presenta unos valores máximos en la época de puesta, y el segundo refleja las variaciones ponderales del hígado cuando crece o disminuye el ovario. El hígado es el órgano de paso de materias metabolizadas por el organismo. Hay una correlación entre la disminución de reservas grasas en el tubo digestivo, el peso del hígado, y el diámetro de los ovocitos en el proceso de maduración.

La alimentación de los reproductores es pues muy importante, no sólo para el crecimiento de los individuos, sino porque va a determinar la naturaleza de las reservas que se movilizan y reabsorben en el proceso de la vitelogénesis. El estado nutricional de los reproductores y la naturaleza de las reservas acumuladas en los mismos pueden considerarse los principales factores internos que van a influir en la reproducción.

Además hay que tener en cuenta otros factores externos que van a jugar también un papel importante en todo el proceso reproductivo junto con las complejas relaciones neuro-endocrinas entre todos los factores entre sí. Los principales son:

- Alimentación: la reproducción es un proceso que requiere la energía procedente de la alimentación y las reservas que se movilizan hacia las gónadas; los peces mal alimentados no se reproducen. Dependiendo de las especies, la alimentación puede interrumpirse antes de la puesta o continuar a lo largo de la misma.

- Temperatura: influye en la actividad general del pez y sobre todo en la alimentaria que puede cesar por completo cuando llega a valores extremadamente bajos. Cuando las reservas grasas se consumen, las gónadas se reabsorben para suministrar la energía necesaria para la supervivencia. Además la temperatura tiene un efecto directo sobre la reproducción y cada especie realiza la gametogénesis en un rango determinado de temperatura; la temperatura actúa sobre la actividad gonadotropa del eje hipotálamo-hipofisario que produce la gonadotropina.

- Fotoperiodo: su acción se ejerce a partir de los órganos fotoreceptores, ojo y epífisis, y a través del sistema nervioso sobre el eje hipotálamo-hipófisis. Mediante la aplicación de ciclos de fotoperiodo comprimidos (variación

fotoperiódica anual aplicada en seis o nueve meses) o expandidos (variación anual aplicada en catorce o quince meses), se ha conseguido adelantar o retrasar la puesta en especies como el rodaballo, la dorada, la lubina y la trucha.

- Otros: se ha comprobado experimentalmente la acción de otros factores, como la salinidad, en la reproducción; bajas salinidades inhiben la maduración en especies como la lubina. La densidad tiene también su influencia; valores demasiado bajos de carga en los tanques, y proporciones inadecuadas %/&, reducen la fecundidad de las hembras. Otros factores, como el estrés y la selección no apropiada de los reproductores, provocan importantes alteraciones endocrinas que tienen una profunda influencia sobre el proceso reproductor, la supervivencia larvaria, y las características de la progenie.

2.2 LA DORADA

La dorada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), es una de las especies más importantes de peces marinos que se cultivan en la actualidad. En España su producción cultivada ha pasado de 127 tm en 1985 a 2 094 tm en 1994 y se prevén para 1999 alrededor de 8 500 tm; nuestro país ocupa el primer lugar en producción de alevines con 17 millones en 1994 (ICES, 1995, datos sin publicar).

En el Mediterráneo se pesca con anzuelo y redes fijas de enmalle, arrastre y cerco y las capturas alcanzaron las 5 300 tm en 1991 (FAO, 1993). En Japón la dorada japonesa (*Pagrus major*) ha alcanzado el segundo lugar en peces cultivados, después de la seriola, con 45 200 tm en 1989.

Su área de distribución abarca todo el mediterráneo y el atlántico desde

Inglaterra hasta las Islas Canarias (Fischer *et al.*, 1987).

2.2.1. Biología

La dorada es un pez típicamente litoral excepto en invierno -coincidiendo con la época de puesta- cuando se traslada a profundidades mayores; los juveniles ocupan las zonas de hasta 30 m de profundidad y los adultos pueden llegar a los 150 m. Es una especie eurihalina que soporta variaciones de salinidad entre 5 y 44 ‰, euriterma, con un margen de tolerancia a las variaciones de temperatura entre 10 y 33°C, y sedentaria, cuyos individuos viven solitarios o en pequeños grupos muy cerca de la costa, incluso dentro de ensenadas y lagunas litorales, en fondos arenosos o de praderas de *Posidonia*. Son carnívoros y se alimentan principalmente de moluscos, crustáceos y peces, pudiendo cambiar accesoriamente a un régimen herbívoro (Arias, 1976b, 1980).

En primavera los alevines realizan migraciones tróficas hacia las lagunas y zonas litorales (Ben-Tuvia, 1979; Arias & Drake, 1990) donde permanecen todo el verano; en otoño, al aproximarse la época de puesta, vuelven al mar buscando temperaturas más estables a mayores profundidades. La reproducción es invernal y las puestas tienen lugar a profundidades entre 5 y 25 m a temperaturas entre 14 y 19°C. La época de puesta tiene lugar según las zonas, en noviembre-enero (costas nordeste y noroeste de la península ibérica) (Suau & López, 1976; Ramos & Pereira, 1990), en octubre-enero en Cádiz (Arias, 1980), en diciembre-enero en el Mar Menor de Murcia (Ortega *et al.*, 1983), y en noviembre-febrero en las Islas Canarias (Rivas *et al.*, 1987).

La dorada es hermafrodita proterándrica: la mayoría de los individuos son machos a la edad de 1-2 años (20-30 cm) pasando un determinado

porcentaje a convertirse en hembras a los 2-3 años (33-40 cm); a partir del cuarto año la mayoría de los individuos son hembras. Este esquema puede sufrir variaciones y la proporción de sexos es distinta según se trate de poblaciones de lagunas litorales o de mar abierto.

El crecimiento de la dorada es rápido, sobre todo en zonas semicerradas como los esteros de Cádiz en los que las medias de longitud en mm encontradas son de 240.8 (1er año), 312.2 (2º año), 379.6 (3er año), 438 (4º año), 488.9 (5º año), 528.6 (6º año) y 568.5 (7º año) (Arias, 1980).

2.2.2. Cultivo

Aunque la dorada había sido criada en las lagunas atlánticas junto con otras especies eurihalinas ya en el siglo XIX, la primera referencia completa de su biología se encuentra en 1954 en los "valli" de Italia (D'Ancona, 1954). Anteriormente, d'Ancona (1941) y Pasquali (1941) habían estudiado el ciclo sexual de la dorada describiendo todo el proceso de inversión sexual. Audouin (1962a y b) estudió la biología de esta especie en l'Etang de Thau sobre todo en los referente a edad, crecimiento, migraciones, y resistencia a variaciones de temperatura y salinidad. Lasserre & Labourg (1974) estudiaron el crecimiento de la dorada en las regiones de Arcachon y Sète.

En España, y concretamente en el Mar Menor (Murcia), Lozano Cabo (1954) recoge datos biométricos y de edad de la dorada: encuentra tallas máximas de 180 mm para la clase de edad 0; la clase I tendría tallas mínimas de 176 mm y máximas de 210 mm, y las tallas de la clase II oscilarían entre una mínima de 131 mm y una máxima de 285 mm. El 75% de los ejemplares capturados en agosto y septiembre eran de clase 0.

En 1920 Navarro había realizado un estudio sobre las encañizadas del Mar

Menor donde hablaba de la posibilidad de "instalación de una piscifactoría". En aquella época la dorada representaba el 80% de la pesca del Mar Menor con 100.000 kg anuales. El peso de los ejemplares nacidos en noviembre llegaba a los 10 g a los 6 meses (mayo), a los 60 g a los 9 meses (agosto), y a los 80 g a los 11 meses (octubre) (Navarro, 1927).

En 1967 las encañizadas fueron cedidas al Instituto Español de Oceanografía para su gestión y explotación, y en 1972 se realizaron los primeros experimentos de engorde de dorada (Ortega & Ros, 1973); los peces fueron llevados desde los 3 g a los 93 g en 7 meses en corrales acondicionados en la encañizada con una alimentación a base de pienso húmedo hecho con boga y pienso para anguilas o harina de pescado.

Arnal & Ortega (1975) prosiguieron los experimentos de engorde durante 1973 y 1974 con doradas que llevaban 1 y 2 años alimentándose con una mezcla de pescado y diferentes harinas vegetales (soja, maíz y trigo), leche en polvo, aminoácidos, minerales y vitaminas. En 1975, y como paso previo a la planificación de su cultivo, se llevó a cabo el estudio sobre el crecimiento de la dorada en el Mar Menor (Arnal *et al.*, 1976).

A partir de 1970 se iniciaron los experimentos para la producción masiva de larvas y alevines por fecundación artificial previa inducción a la puesta por medio de hormonas. En Italia Lumare & Villani (1971a y b; 1973), Alessio & Bronzi (1974a y b), Alessio *et al.* (1975), y en Francia Barnabé & René (1973), obtuvieron buenos resultados utilizando gonadotropina coriónica. Arias (1976a) en Cádiz, después de realizar un estudio de 3 años sobre la biología de la dorada en los esteros, llevó a cabo en 1975 las primeras pruebas de puesta inducida; obtuvo puestas por medio de inyección hormonal y de fecundación artificial pero las larvas no sobrevivieron. Sin embargo, contribuyó con este trabajo a establecer la metodología de la

captura, transporte, mantenimiento y alimentación de los reproductores, así como la evaluación del estado de madurez, las dosis de anestesia y hormona a administrar en cada caso, y las técnicas de inducción.

El cultivo de la dorada fue progresando muy lentamente y al final de la década de los 70 aún no se habían conseguido resultados de supervivencia suficientemente buenos para asegurar la rentabilidad del cultivo comercial. En la revisión de Quillet & Camaret (1982) se da como la supervivencia más alta la de 16% conseguida por Alessio a los 2-3 meses (Girin, 1976). Los problemas de la cría larvaria en dorada residían principalmente en el pequeño tamaño de la larva y en la ausencia de vejiga natatoria.

Las dificultades del cultivo larvario fueron solucionadas mediante la investigación de los factores ambientales y de alimentación que influían en el desarrollo de las larvas; el fotoperiodo, la intensidad lumínica, la salinidad, y la alimentación viva a base de rotífero de diferentes tamaños, fueron objeto de atención prioritaria a fin de establecer la tecnología del cultivo larvario. Koven *et al.* (1989, 1990, 1992) mejoraron considerablemente las técnicas de cultivo mediante el enriquecimiento de las presas vivas para cubrir las necesidades nutritivas de las larvas. Por otra parte, la investigación sobre tecnología ha conseguido porcentajes de formación de vejiga natatoria superiores al 90% (Chatain, 1986; 1987; Chatain & Ounais-Guschemann, 1990) y valores de supervivencia larvaria mucho más altos.

En la actualidad, y como consecuencia de todos estos años de investigación, la supervivencia larvaria a los 30 días (15 mg de peso seco) se sitúa por encima del 30%, y la de las larvas de 1 g alrededor del 20%.

Por otra parte, y en lo referente al engorde, a mediados de los 70 y con alevines producidos en criadero o capturados en el medio natural,

comienzan los ensayos a nivel industrial de cultivo en jaulas y en tanques (René 1974a y b; Pitt *et al.*, 1977; Ravagnan, 1978; Porter, 1980, 1981; René, 1984; Dosdat, 1984; Krom *et al.*, 1985a y b; Porter *et al.*, 1986; Bermúdez *et al.*, 1987; García García *et al.*, 1987; Rivas *et al.*, 1987).

Al principio de los 80 las iniciativas empresariales se vieron frenadas por la falta de alevines que no se producían en número suficiente para la explotación a nivel industrial (Ravagnan, 1984), eran de poca calidad con elevados porcentajes de deformaciones y ausencia de vejiga natatoria (Paperna *et al.*, 1977; Paperna, 1984), y alcanzaban precios demasiado altos. A partir de 1985, sin embargo, y gracias a a la mejora de las técnicas de reproducción y cultivo larvario, se incrementa de forma exponencial la producción de alevines con el consiguiente aumento de la rentabilidad de los criaderos y disminución de precios. En España las cifras de los últimos años son de 2.51 millones en 1988, 9.19 en 1989, 12.4 en 1990, 16.2 en 1991 (Santaella, 1993), 13 en 1993 , y 17 en 1994 (ICES, 1995, datos sin publicar).

En España la producción de dorada ha experimentado un crecimiento espectacular con valores del 100% de incremento anual que han pasado de 127 tm en 1985 a 2.094 en 1994. Las producción estimada para 1996 es de 7.500 tm (38% de la producción de la CEE) y a partir de esta fecha se produciría una estabilización en torno a las 10.000 tm hasta el año 2.000 (Santaella, 1993) (Figs. 1 y 2).

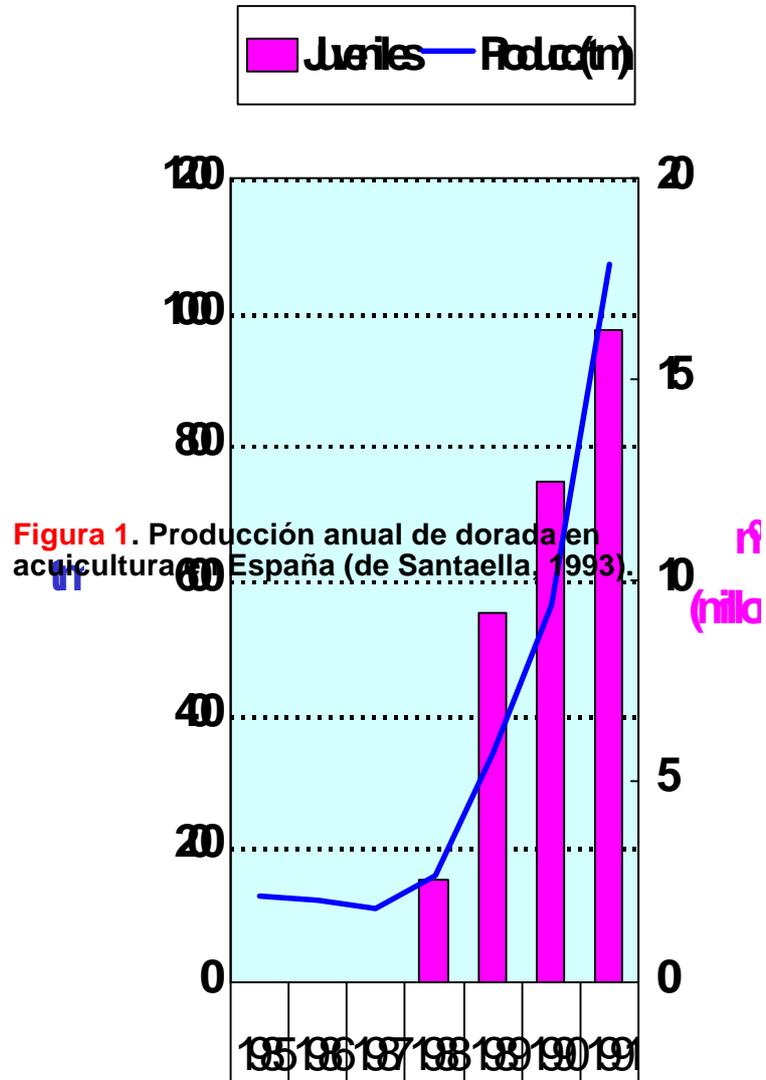


Figura 1. Producción anual de dorada en acuicultura en España (de Santaella, 1993).

Juveniles				25	9	12	16
-----------	--	--	--	----	---	----	----

Figura 2. Producción de dorada en acuicultura en España y la CEE. Previsiones hasta el año 2000 (de Santaella, 1993).

Producción	12	21	19	10	34	35	03
------------	----	----	----	----	----	----	----

2.2.2. Tecnología de la producción

El crecimiento de la dorada y por tanto la duración del cultivo hasta tamaño comercial depende sobre todo de la temperatura del agua. En temperaturas superiores a 18°C la dorada crece muy rápidamente pudiéndose obtener en el Mediterráneo alevines de 1 g a los 70 días de vida y ejemplares de 350 g a los 15-16 meses.

2.2.2.1. Puesta e incubación

Mediante técnicas de manipulación de la temperatura y el fotoperiodo se puede adelantar o retrasar la época de puesta y modificar su duración obteniéndose de esta manera huevos durante gran parte del año. Los huevos viables que flotan en la superficie del agua son recogidos en un rebosadero a la salida de los tanques en una malla de 500 μ y colocados en un incubador o directamente en los tanques de cultivo larvario. La eclosión tiene lugar 2-3 días después de la puesta y las tasas de eclosión son del orden del 80%.

2.2.2.2. Cría larvaria y "destete"

Se hace en tanques cilindrocónicos de 2-4 m³ con un control estricto de los parámetros físico-químicos: oxígeno disuelto: 7.5 mg/l; pH: entre 7.5-8.5; temperatura: 17-23°C; salinidad: 30-37 ‰ ; nitritos: menos de 0.3 mg/l. La carga inicial puede estar alrededor de 80 larvas/l y se aconseja una carga media a lo largo del cultivo larvario de 10 larvas/l. La primera alimentación está formada por presas vivas, rotífero y Artemia; alrededor de los 50 días de vida de las larvas se empieza la alimentación con dietas inertes, del 5-10% del peso vivo diario. Al final de la etapa de "destete", que dura unas 2 semanas, el porcentaje de supervivencia varía entre 75 y 100%.

2.2.2.3. Preengorde

Comienza cuando los alevines alcanzan 1 g de peso y tiene lugar en estanques o en jaulas en cargas de 20-25 kg/m³. En esta fase es muy importante clasificar frecuentemente los peces para obtener un crecimiento homogéneo y evitar el canibalismo.

2.2.2.4. Engorde

Se puede realizar en sistema intensivo, jaulas o estanques, estos últimos con gran renovación de agua (50-100% a la hora) o extensivo (esteros, medio lagunar). La supervivencia en esta fase sobrepasa generalmente el 80% ya que no suelen presentarse enfermedades y la dorada es bastante resistente al manejo. Las cargas en esta fase están alrededor de 15 kg/m³ y pueden llegar a 40 kg/m³ si se hace un aporte suplementario de oxígeno puro. La alimentación es a base de piensos comerciales que contienen entre 40-45% de proteína y 15-20% de grasa. La tasa diaria de alimentación para doradas de 350 g puede variar de 0.2% a 13°C hasta 1.1% a 25°C. Los índices de conversión del pienso están entre 2 y 2.5.

2.2.2.5. Reproductores

Las doradas, salvajes o procedentes de cultivo, se mantienen en los tanques de reproducción en cargas de 2.5-4.5 kg/m³ y son alimentadas con pienso y con alimento natural (pescado, calamar, cangrejo). Debido al hermafroditismo y también para evitar la pérdida de variabilidad genética, se recomienda una renovación anual del stock cultivado con un 20-25% de individuos jóvenes (de 1-2 años) y, a ser posible, procedentes del medio natural.

2.2.3. Reproducción

La reproducción de la dorada se caracteriza por un hermafroditismo proterándrico y un desarrollo ovárico totalmente asincrónico con puestas múltiples de huevos pelágicos. El proceso de inversión sexual y de maduración en poblaciones de dorada cultivada en el Mediterráneo ha sido descrito por Zohar *et al.* (1978, 1984) y García Alcázar & Abellán (1989).

La reproducción en cautividad de esta especie está favorecida por la elevada fecundidad de las hembras cuyas puestas se producen con una periodicidad diaria durante 4 meses aproximadamente y llegan hasta 2-3 millones de huevos por kg de peso corporal a razón de 20 000-30 000 huevos /kg de hembra/día (Gordin & Zohar, 1978; Zohar & Gordin, 1979; Devauchelle, 1984; Zohar *et al.*, 1989a). Otras ventajas que presenta la dorada son la capacidad de producción de puestas naturales en cautividad, la efectividad de los tratamientos hormonales (GCH y LH-RH) en la sincronización de la época de puesta (Zohar *et al.*, 1989b), y la buena respuesta a la manipulación de las condiciones ambientales para el desplazamiento del periodo reproductivo (Devauchelle, 1984).

Sin embargo, en la práctica, el control de la reproducción en la dorada se complica por un fenómeno frecuente de atresia folicular que ocurre antes del final de la vitelogénesis (Zohar y Gordin, 1979), la escasa fiabilidad de las puestas obtenidas de reproductores salvajes, irregularidades en la ovulación que resultan en una baja calidad de los huevos (Zohar *et al.*, 1989b), e interrupciones prematuras de los ciclos de puesta (Zohar, 1988).

Estos problemas están probablemente relacionados con el hecho de que, en el ovario asincrónico de la dorada, como en otros espáridos (Matsuyama *et al.*, 1988), los folículos pasan por las fases de vitelogénesis, maduración

meiótica del ovocito, hidratación y ovulación, no de un modo simultáneo y masivo, como en los teleósteos monoovulatorios, sino en pequeños grupos con una estricta jerarquía temporal (Zohar *et al.*, 1988). Además, la producción diaria de huevos parece variar a pulsos según un complejo esquema (Colombo *et al.*, 1989). Esto implica que la regulación endocrina en esta especie estará mas finamente ajustada si la comparamos con las especies monoovulatorias, y por tanto será mas facilmente alterable por las condiciones ambientales y por el suministro exógeno de hormonas. De hecho, se ha constatado que un exceso de hormona puede causar un efecto negativo sobre las puestas (Zohar y Gordin, 1979; Colombo *et al.*, 1989).

Por estas razones, en los primeros ensayos de inducción a la puesta en dorada (Alessio *et al.*, 1975; Arias, 1976a; Barnabé, 1976; Villani, 1976) no se consiguió obtener grandes cantidades de huevos durante periodos prolongados de tiempo. En estos trabajos las hembras eran inyectadas con altas dosis de gonadotropina coriónica humana (GCH en dosis de 800-15.000 U.I./kg de peso) y sometidas después a masaje abdominal. La posterior disminución de las dosis de GCH a 100-200 U.I./kg de peso dio como resultado la obtención de puestas naturales (sin masaje) diarias durante periodos de 4-100 días (Gordin & Zohar, 1978; Zohar & Gordin, 1979; Zohar *et al.*, 1984).

El uso reciente de técnicas de radioinmunoensayo ha permitido descubrir la causa de la ausencia de puesta que presentan algunas doradas en cautividad; la GtH se acumula en la hipófisis pero no llega a liberarse al torrente circulatorio (Zohar, 1988), por lo que la investigación sobre la inducción a la puesta se ha centrado sobre las hormonas liberadoras de la gonadotropina (GnRH).

Además de estimular la liberación de la propia GtH, las hormonas

liberadores GnRH tienen la ventaja de ser moléculas más pequeñas que no producen inmunidad y que son fáciles de sintetizar. Los análogos de las GnRH pueden ser seleccionados específicamente para cada especie. Una única inyección del análogo de GnRH de mamífero (GnRHa) es tan efectiva como una inyección de GCH en la inducción de la puesta en dorada (Zohar *et al.*, 1989a). Sin embargo, una inyección de GCH o de GnRHa indujo puestas diarias en periodos largos de tiempo únicamente en el 25-35% de las hembras tratadas (Zohar *et al.*, 1989a); las demás hembras pusieron durante 1-6 días y sus ovocitos entraron en fase de atresia.

La mejora de las técnicas de inducción en dorada se está estudiando en tres campos: 1) estudio de la relación estructura-actividad de las GnRH y sus análogos, 2) uso de antidopaminérgicos, y 3) métodos de administración de los análogos de las GnRH.

2.3. ALIMENTACION DE REPRODUCTORES: INFLUENCIA EN LA PUESTA Y CULTIVO LARVARIO.

La alimentación de los reproductores juega un papel importante en el cultivo de peces y tiene un efecto profundo sobre el desarrollo gonadal y la fecundidad que constituyen el punto de partida del proceso productivo y, por consiguiente, sobre la calidad de los huevos y la supervivencia y uniformidad de las larvas (Fig. 3).

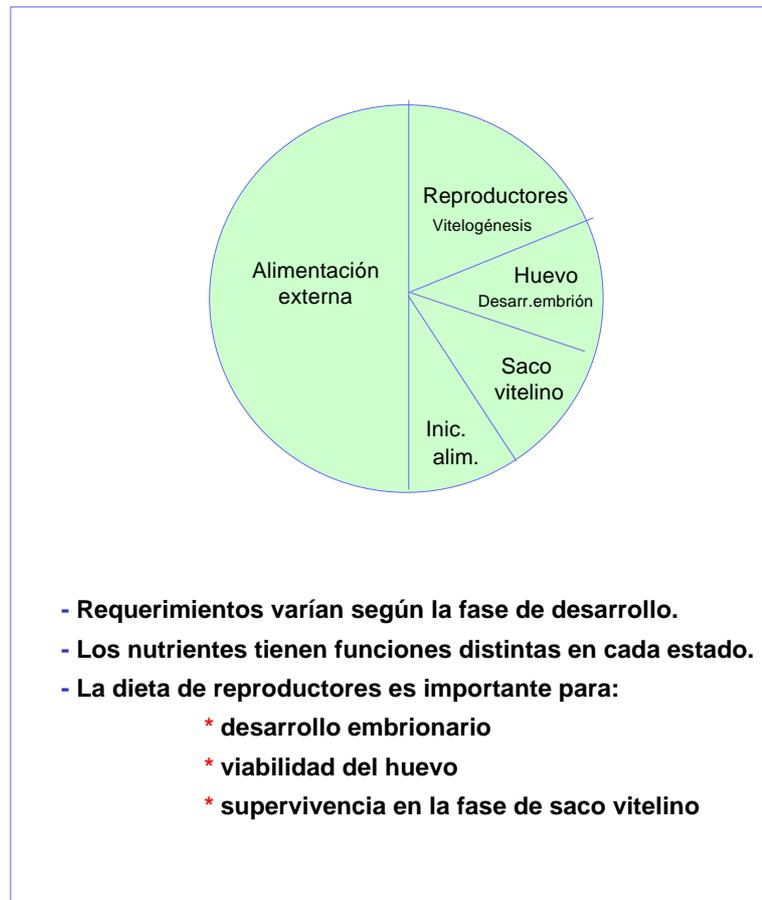


Figura 3. Fases de desarrollo en teleósteos ovíparos desde el punto de vista de la nutrición.

Los trabajos en este campo son relativamente recientes ya que la nutrición en peces se ha desarrollado principalmente en las fases de larvicultura y engorde. Estos estudios incluyen por un lado los de los procesos metabólicos de los reproductores y su control endocrino, y por otro los del desarrollo gonadal y la maduración; ambos presentan un cierto grado de complicación por estar relacionados entre sí y con otros factores (ambientales, sociales, etc.).

2.3.1. Reservas nutricionales: vitelo y gota de grasa

Las reservas nutricionales se acumulan en el huevo (vitelo y gota de grasa) durante la maduración del ovocito en el ovario de las hembras y van a tener una doble función: formación de estructuras en el desarrollo del embrión y mantenimiento del metabolismo energético.

La composición del vitelo es la siguiente:

Agua	90%
Proteína	50-85% (P.seco)
Lípidos	12-50% (")
Hidratos de carbono	<1% (")

Las principales clases de lípidos son:

VITelo: fosfolípidos, triglicéridos, ácidos grasos, colesterol.

GOTA DE GRASA: ceras, triglicéridos.

La fase de maduración del ovario en las hembras se inicia por la acción de los factores ambientales (principalmente temperatura y fotoperiodo) sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Las células foliculares del ovocito sintetizan y

mandan al sistema circulatorio hormonas esteroideas que van a dirigir diferentes procesos metabólicos (Fig. 4).

Uno de los primeros órganos objetivo de estas hormonas es el hígado en donde el 17- β -estradiol va a originar la síntesis de vitelogenina, proteína de alto peso molecular que es portadora de grandes cantidades de lípidos, carbohidratos, grupos fosfato y sales minerales que se van a acumular en el ovocito como constituyentes específicos del vitelo. Los lípidos del vitelo se encuentran pues en forma de:

- lipoproteínas (gran variedad de HUFA n3)
- vitelogenina: lipovitelina y fosvitina

Tanto en el vitelo como en la gota de grasa hay un alto contenido de n3 HUFA (20:5n3 y 22:6n3). Las deficiencias que pudieran producirse en estos ácidos grasos explicarían las altas mortalidades registradas en las larvas en el momento de la reabsorción del vitelo y de la gota de grasa, punto considerado crítico en el desarrollo de la etapa larvaria.

Las sustancias liposolubles han sido particularmente estudiadas porque sus requerimientos son muy distintos en la reproducción y en otras etapas de la vida del pez.

Durante los primeros estados de vitelogénesis (cuando el índice gonado-somático es menor de 0.5) el tejido ovárico sintetiza lípidos a partir de acetato; estos lípidos se incorporan en su mayor a la fracción polar. En etapas posteriores (vitelogénesis exógena) los lípidos sintetizados en el ovario se incorporan en forma de triglicéridos. En este momento del desarrollo del ovario la mayoría de los lípidos depositados en el vitelo está en forma de lipoproteínas y vitelogenina. Léger *et al.* (1981a) observaron en la trucha que las lipoproteínas y la vitelogenina se incorporaban en lugares específicos; las lipoproteínas se dirigen al vitelo que incluye lipovitelina y fosvitina, mientras que la vitelogenina entra a formar parte de la gota de

grasa compuesta principalmente por triglicéridos. Durante el último mes de la ovogénesis los lípidos de la dieta son acumulados directamente en el huevo lo que indica que en esta fase las reservas de tejido adiposo juegan un papel menos importante y no podrían compensar una deficiencia en ácidos grasos esenciales en la dieta. Por el contrario las lipoproteínas con más alto contenido en n3-HUFA que la vitelogenina, y que mantienen altos niveles durante todas las fases de maduración, tendrían más importancia durante el inicio de la ovogénesis. Los ácidos grasos, por tanto, son imprescindibles en cada etapa de la ovogénesis.

2.3.2. Desarrollo embrionario y larvario

En estas etapas de la vida de los peces las reservas energéticas, proteínas y lípidos, se encuentran en el vitelo y en la gota de grasa y tienen dos funciones principales: formación de estructuras y mantenimiento del metabolismo energético.

Las proteínas son utilizadas fundamentalmente en la síntesis de proteínas tisulares y de enzimas, hormonas y vitaminas. Además contribuyen a la formación de energía ya que se ha comprobado que los aminoácidos libres constituyen la principal fuente de energía por vía aeróbica durante la embriogénesis de peces marinos.

Los lípidos desempeñan también una doble función: cubrir los requerimientos energéticos del metabolismo (síntesis de ATP por la β -oxidación de los ácidos grasos y servir de precursores en numerosos procesos de biosíntesis como la biogénesis de las membranas por ejemplo). Un 70-80% de los lípidos son destinados a la producción de energía en las larvas de peces.

Los huevos de los peces se pueden clasificar en diferentes categorías según su contenido lipídico. La presencia o ausencia de gotas de grasa se corresponde con huevos de alto contenido en lípidos (>15% de su peso seco) o con bajo contenido el lípidos (<15% de su peso seco). El primer tipo se caracteriza por poseer grandes cantidades de lípidos neutros, principalmente triglicéridos y ésteres de esteroides y ceras, y pocos lípidos polares, mientras que el segundo tipo presenta altas cantidades de lípidos polares, especialmente fosfatidilcolina, y bajas cantidades de lípidos neutros (Mourente & Vazquez, 1996).

2.3.3. Influencia en la puesta y cultivo larvario

Los primeros estudios, realizados en los años 80 en Japón con dorada japonesa, carpa y salmónidos, demostraron que la calidad, cantidad, y régimen en la alimentación de los reproductores influía sobre el desarrollo gonadal (índice gonado-somático), fecundidad, calidad de huevos, y supervivencia y uniformidad de las larvas.

En la trucha, dietas cuantitativamente escasas producen: a) en peces jóvenes, retraso de la primera maduración sexual, b) en la etapa de diferenciación de los ovocitos, reducción del número de huevos, y c) en la etapa final de la ovogénesis, pequeñas diferencias en el tamaño, composición del huevo, y porcentaje de eclosión.

El efecto de la cantidad de alimento en la reproducción ha sido estudiado en varias especies de peces y revisado en la trucha por Bromage *et al.* (1992). Aunque está comprobado que las dietas cuantitativamente escasas generalmente reducen la fecundidad y pueden afectar al tamaño de los huevos y retrasar la maduración, no se ha podido establecer de una manera clara la forma en que la falta de alimento afecta al desarrollo gonadal y a la

fecundidad; la evidencia es que se producen deficiencias en el desarrollo de los ovocitos y procesos de inducción a la atresia. Un ejemplo de la influencia de la ración alimentaria en la reproducción de lubina se ve en un experimento realizado en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Castellón) por Cerdá *et al.* (1994). El stock de reproductores sometido a una reducción del 50% de la ración seis meses antes de la puesta, sufrió una reducción significativa del crecimiento de los individuos y de los niveles de 17 β -estradiol en el plasma. Sin embargo, ni la viabilidad de los huevos ni la supervivencia de las larvas a los 46 días de vida, se vieron afectadas.

Por el contrario, los resultados de estudios sobre los efectos de la composición de la dieta son contradictorios. Takeuchi *et al.* (1981) encontró altas tasas de eclosión en los huevos de trucha mantenidos con una dieta baja en proteína (36%), mientras que Roley (1983) obtuvo mejores tasas de supervivencia en huevos producidos por reproductores alimentados con un 47% de proteína que en los procedentes de reproductores alimentados con 27% o 37% de proteína.

Trabajos más recientes con lubina han demostrado que las deficiencias en proteína y en ácidos grasos n3 influyen decisivamente en el proceso reproductor de las hembras (Cerdá *et al.*, 1995) y de los machos (Cerdá *et al.*, 1997) afectando a los niveles de esteroides sexuales.

La calidad de la dieta de los reproductores afecta a la composición del vitelo y de la gota de grasa donde se acumulan las reservas nutricionales que servirán de alimento a las larvas.

2.3.4. Principales requerimientos en las dietas de reproductores

Luquet & Watanabe (1986) revisaron estos requerimientos en las principales

especies de peces cultivadas.

2.3.4.1. Energía y proteína

Dada su limitada capacidad para digerir y metabolizar hidratos de carbono, los peces presentan altos requerimientos de proteína. En experimentos realizadas con trucha (Watanabe *et al.*, 1984e), los reproductores alimentados con baja proteína (28%) y lípidos altos (21%) produjeron puestas con buenas cantidades de huevos y altas eclosiones lo que da idea de la importancia de la relación proteína/energía.

Los reproductores de dorada japonesa requieren porcentajes de proteína en su dieta del 45%. Una disminución al 33-36% produjo puestas con un 30% menos en la cantidad de huevos, baja calidad (mayor número de gotas, menor flotabilidad, baja eclosión, y alto porcentaje de larvas anormales). Las dietas que contenían carne de sepia como fuente de proteína, comparadas con las dietas a base de pescado, dieron mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de huevos y características de las larvas (Watanabe *et al.*, 1984a,b,c).

Estudios recientes en dorada (Fernández-Palacios *et al.*, 1997) demuestran mejoras considerables en la calidad y cantidad de las puestas obtenidas al incluir proteína de harina de calamar en la dieta. Esta mejora no fue debida al perfil de aminoácidos de la dieta sino al alto coeficiente de digestibilidad de esta proteína para la dorada. La proteína es el componente principal de los huevos de muchas especies de peces (Watanabe & Kiron, 1994); además de su importante papel como componente estructural, funcional y energético de los tejidos y órganos de los peces, la proteína interviene en la fertilización - es - y en el desarrollo normal del embrión.

Los requerimientos en aminoácidos de los reproductores se han calculado en dorada a partir del patrón encontrado en su composición corporal (Fernández-Palacios *et al.*, 1997).

2.3.4.2. Lípidos.

Los peces marinos tienen requerimientos específicos de n3 HUFA de 20 y 22 átomos de carbono ya que son incapaces de realizar la bioconversión a partir del ácido linolénico (18:3n3) como los peces de agua dulce. Este alto requerimiento se manifiesta en el hecho de que los huevos y larvas de especies marinas son muy ricos en n3 HUFA (Tocher & Sargent, 1984).

Las necesidades de ácidos grasos esenciales varían entre especies y entre las diferentes etapas de desarrollo (Gatesoupe & Le Milinaire, 1985). Los juveniles requieren 1-2% de la dieta en peso seco mientras que en los primeros estados de desarrollo esta cantidad se multiplica por cinco (Sargent *et al.*, 1989). Las especies de aguas cálidas (pez gato, carpa) presentan requerimientos menores en ácidos grasos esenciales que las de aguas frías.

Tienen especial importancia en la fracción neutra los triglicéridos como reservas de lípidos, y, en la fracción polar, los fosfolípidos como componentes de las membranas (aumentan durante el desarrollo embrionario).

El papel de los lípidos se describe con detalle más adelante.

2.3.4.3. Vitaminas

En el grupo de las vitaminas liposolubles hay pocos datos sobre el efecto de

las vitaminas A y D en la alimentación de los reproductores. Cuando crece la cantidad en la dieta se ha observado un aumento en la transferencia de estas vitaminas a los huevos (Sugii & Kinumaki, 1968) pero no se han evaluado todavía sus efectos sobre la fecundidad y la calidad de las puestas.

La vitamina E (á-tocoferol) ha sido más estudiada por su relación con el metabolismo de las grasas. En la dorada japonesa un aumento de la vitamina E mejora las tasas de fecundación del huevo y el porcentaje de larvas normales (Watanabe *et al.*, 1985). En carpa la deficiencia en vitamina E produce un retraso en el desarrollo de los ovocitos y cambios en el patrón de ácidos grasos en el ovario (Watanabe & Takashima, 1977).

Dentro de las vitaminas hidrosolubles la vitamina C juega un papel importante en la dieta de reproductores de peces. Se encuentra en altas concentraciones en el ovario (Sandnes, 1984) y actúa principalmente sobre los procesos bioquímicos:

- influye en los niveles en sangre de las hormonas hipofisarias (17-â-estradiol) y por tanto en la síntesis de vitelogenina (Hilton *et al.*, 1979; Waagbø & Sandnes, 1988). Sandnes & Braekkan (1981) observaron también un aumento de la concentración de ácido ascórbico en el ovario del bacalao en la etapa de formación del vitelo.

- es un factor importante en la hidroxilación de la prolina y consiguientemente en la síntesis de colágeno mejorando los porcentajes de eclosión de los huevos y la viabilidad de las larvas (Sandnes *et al.*, 1984a).

- una disminución de vitamina C afecta al metabolismo de los lípidos aumentando la grasa en el hígado y disminuyéndola en el ovario (Waagbø *et al.*, 1989). Además hay una relación de la vitamina C con los

micronutrientes como el Fe (el contenido en Fe en los huevos de trucha es proporcional a las tasas de eclosión) y el Zn (Sandnes *et al.*, 1984b).

- la vitamina C influye en los procesos de resistencia a enfermedades, y tiene un efecto anti-estrés y anti-tóxico. Las dietas de reproductores deficientes en vitamina C causan porcentajes altos de larvas deformes, aparición de lordosis y escoliosis, retraso del crecimiento y cuadros de hemorragias y anemia (Soliman *et al.*, 1986).

La vitamina C en las dietas de reproductores desempeña una función importante en el crecimiento de la gónada y en la maduración, y es transferida del ovario a los huevos constituyendo una reserva para la larva recién eclosionada (momento crítico del desarrollo).

Más recientemente (Dabrowski *et al.*, 1995) se ha constatado el efecto de la vitamina C sobre la fecundidad de las hembras: es un estudio con trucha arco-iris, peces alimentados con dietas deficientes en ascorbato presentaron menos producción de huevos y una reducción en la deposición de materiales del vitelo; la mortalidad en la fase de huevo aumentó también. Estos estados carenciales ocasionaron situaciones prolongadas de estrés en las hembras y, consiguientemente, una reducción del tamaño de los huevos.

En los machos, el número de espermatozoides y su motilidad se redujeron en peces alimentados con dietas deficientes en vitamina C.

También la mortalidad de la progenie de reproductores con estados carenciales en vitamina C se ha relacionado significativamente con la presencia de anomalías cromosómicas.

2.3.4.4. Pigmentos

Los pigmentos carotinoides, principalmente la astaxantina, se acumulan en gónadas, óvulos y huevos de salmónidos para lo que se produce una movilización de los pigmentos del músculo y una utilización a partir de la dieta (Steven, 1949; Crozier, 1970). Sin embargo su papel en la reproducción no está claro.

En salmónidos hay resultados sin confirmar sobre el efecto de la cantaxantina en la primera maduración sexual y la fecundidad (Deufel, 1965). Se apunta también una influencia de los carotinoides en la fertilización del huevo por un efecto positivo sobre la movilidad de los espermatozoides (Hartmann *et al.*, 1947). Otro aspecto es el papel de los pigmentos en la función respiratoria durante el desarrollo de los huevos en condiciones pobres de oxígeno (Mikulín & Soin, 1975).

En dorada hay resultados más consistentes sobre el efecto de los pigmentos en la reproducción (Watanabe *et al.*, 1985; 1984 d,f; Watanabe & Kiron, 1995). El suministro de krill, aceite de krill y pigmentos carotinoides en la dieta de los reproductores tiene un efecto positivo sobre el porcentaje de huevos fecundados. Además se ha observado una disminución de huevos y larvas anormales. Se supone que estos pigmentos tienen un efecto anti-oxidante parecido al de la vitamina E (Watanabe, 1984).

Los procesos de movilización, transferencia y almacenamiento de carotinoides en los huevos de peces hacen pensar en una influencia de estos elementos sobre la reproducción, pero a excepción de la dorada japonesa, no se han obtenido resultados concluyentes con las principales especies cultivadas y la función fisiológica de estos pigmentos está todavía por estudiar (Tacon, 1981).

2.3.4.5. Minerales y elementos traza

Los peces tienen capacidad de captar del medio ciertos minerales a través de las branquias. La dieta a base de carne de pescado cubre las necesidades de estas sustancias que se supone tienen un efecto importante en la reproducción.

En dorada se comprobó que una disminución de fósforo tenía un efecto negativo sobre el número de huevos, la fecundidad, la eclosión, y la presencia de anomalías (Watanabe *et al.*, 1984a,b). El mecanismo de esta influencia no se conoce ya que no se observan diferencias en la composición de los huevos.

En el salmón coho (*O. kisutch*) no se han encontrado mejoras en las puestas cuando se suplementa la dieta con cobalto, cobre, hierro, manganeso y zinc (Hardy *et al.*, 1984); Ketola (1983) obtuvo resultados similares en el salmón atlántico (*Salmo salar*) con suplementos de sodio, magnesio, zinc, manganeso, hierro y cobre. Sin embargo, Takeuchi *et al.* (1981) observaron disminución en la supervivencia larvaria y en las tasas de eclosión en la trucha, que eran debidas probablemente a falta de manganeso. Lall & Hines (1985) confirmaron estos resultados en el salmón atlántico y en la trucha. Por lo tanto, y como medida de seguridad, se recomienda suplementar con manganeso las dietas de reproductores.

2.4. PAPEL NUTRICIONAL DE LOS LÍPIDOS

Los lípidos juegan un papel importante como componentes de las membranas celulares y como constituyentes de las reservas energéticas en el desarrollo embrionario de los peces (Tocher y Sargent 1984; Falk-

Petersen *et al.* 1986). En las dietas de los reproductores los lípidos son los que más influyen en la composición de los huevos (Watanabe *et al.* 1984d; Watanabe 1985); el patrón de ácidos grasos se corresponde bastante exactamente con el de la dieta (Lasker y Theilacker 1962; Ando 1962, 1968; Shimma *et al.* 1977; Watanabe *et al.* 1984a,b,c,d, 1985a,b; Watanabe 1985; Mourente *et al.*, 1989; Mourente y Odriozola 1990a y b, 1990a), y sus deficiencias producen puestas de menor cantidad y calidad y deficiencias en las larvas.

Durante la formación de la gónada, los ácidos grasos son movilizados desde las reservas de lípidos neutros del tejido adiposo, y son llevados por la sangre hasta el hígado, donde van a formar la vitelogenina, lipoproteína específica del huevo. De los ácidos grasos libres movilizados, principalmente saturados y monoinsaturados, hasta un 60% pueden ser catabolizados para suministrar la energía metabólica para la síntesis de la lipoproteína del huevo. Los restantes, principalmente HUFA n3 y especialmente 22:6n3, se incorporan en la vitelogenina rica en fosfolípidos, que es llevada por la sangre a los huevos en desarrollo. El principal fosfolípido del huevo es la fosfatidilcolina, y los niveles de triglicéridos aumentan con la duración del periodo de incubación.

Los fosfolípidos y los triglicéridos en los huevos tienen niveles de HUFA n3 de 50 y 30% respectivamente, y están compuestos principalmente de 22:6n3 y 20:5n3 en una proporción 2:1. Los ácidos grasos de los fosfolípidos y triglicéridos, incluyendo los HUFA n3, son catabolizados para suministrar la energía metabólica necesaria al desarrollo del huevo y a la larva recién nacida, pero el principal papel de los HUFA n3 es la formación de las membranas celulares. El 22:6n3 tiene un papel crítico en la formación del cerebro y los ojos que constituyen una parte importante en el volumen del embrión y el cuerpo de la larva. Las pequeñas cantidades de 20:4n6 en los

huevos de peces se localizan casi exclusivamente en el fosfatidilinositol, y tienen un papel específico en la formación de eicosanoides. De los estudios realizados en larvas y de los análisis de huevos se concluye que las dietas de los reproductores y los huevos deben tener unos niveles óptimos de HUFA n3/n6 de 5:1-10:1. En la nutrición de reproductores es muy importante el uso de aceite de pescado de alta calidad para conseguir embriones normales y larvas con un desarrollo adecuado.

2.4.1. Formación de la gónada

En los peces los lípidos constituyen la principal fuente de energía metabólica; son generalmente mucho más ricos en ácidos grasos poliinsaturados (HUFA) de la serie n3 (20:5n3 y 22:6n3) que los lípidos de otros animales.

Las variaciones estacionales de los niveles de lípidos en peces están relacionadas fundamentalmente con el ciclo reproductivo: los peces acumulan grandes reservas de grasa durante la primavera y principios del verano cuando hay más abundancia de alimento, para luego desarrollar las gónadas a finales de invierno-principios de primavera. La mayoría de los peces desovan en primavera de manera que las larvas empiecen a comer coincidiendo con la aparición de los "blooms" de plancton. De acuerdo con esto, los peces marinos tienen los niveles más altos de lípidos a principios de invierno y los más bajos a principios de primavera. Normalmente la disponibilidad de alimento durante el invierno es baja, por lo que los lípidos acumulados en primavera-verano se usarán como fuente de energía metabólica para el mantenimiento durante el invierno.

Sin embargo, los costes de energía para mantenimiento son bajos si los comparamos con el gasto metabólico en el crecimiento. Una excepción a

esta regla es la aparición de grandes desplazamientos asociados a la reproducción con el consiguiente gasto metabólico de la natación. Con todo, el crecimiento requiere un gran gasto de energía metabólica en la formación de la gónada y de los gametos, proceso que se desarrolla en la naturaleza generalmente en ausencia de alimentación externa. Por tanto, es normal que los peces marinos maduros inicien el invierno con reservas ricas en lípidos y se encuentren en la época de postpuesta, la siguiente primavera, con esas reservas prácticamente agotadas.

Esta norma general se demuestra en estudios realizados con el capelán (*Mallotus villosus*) y el arenque (*Clupea harengus*) en la naturaleza. El capelán puede acumular normalmente entre el 10 y el 20% de su peso como lípidos, que se depositan en el tejido adiposo perivisceral y subcutáneo en forma de triglicéridos. Más del 70% de los lípidos del músculo de la hembra del capelán, se movilizan durante el desarrollo gonadal; de éstos, el 40% se deposita en la gónada (Henderson *et al.* 1984). Por tanto el 60% de los lípidos metabolizados del músculo de la hembra son catabolizados para suministrar energía metabólica, lo que indica el alto coste energético que supone la formación de la gónada femenina. El macho de capelán moviliza la misma proporción de lípidos del músculo, pero sólo una pequeña cantidad va a parar a la gónada; esto indica un mayor gasto de energía en la actividad física del macho comparado con la hembra.

2.4.1.1. Ácidos grasos monoinsaturados como fuente de energía

La importancia de los lípidos en la formación de la gónada en las hembras se ve claramente cuando se consideran los ácidos grasos individualmente. Los peces de latitudes septentrionales que se alimentan de zooplancton (por ej. arenque y capelán) forman depósitos corporales de triglicéridos de una manera importante desde los grandes depósitos de ceras de su dieta, ya

que los triglicéridos de los peces son ricos en 20:1n9 y 22:1n11 derivados de los correspondientes 20:1n9 y 22:1n11 alcoholes grasos de la dieta (Sargent *et al.*, 1979; Sargent y Henderson, 1986). La abundancia de 20:1n9 y 22:1n11 es una característica de casi todos los aceites comerciales procedentes de las pesquerías del Atlántico Norte, que están siendo progresivamente utilizados en acuicultura. Por tanto, los peces cultivados alimentados con esos lípidos y los peces procedentes de esas pesquerías son también ricos en esos ácidos grasos.

Sin embargo, a causa de sus cadenas relativamente largas, el 20:1n9 y el 22:1n11 no se pueden acumular fácilmente en los fosfolípidos de los tejidos, y son almacenados casi exclusivamente como triglicéridos. En los huevos de arenque y capelán, compuestos principalmente de fosfolípidos, se pueden encontrar cantidades insignificantes de 20:1 y 22:1 lo que quiere decir que han sido catabolizados principalmente para suministrar la energía metabólica necesaria para la formación de las gónadas y los huevos.

Con los HUFA n3 de cadena larga sucede lo contrario. Como los fosfolípidos, que constituyen la principal clase de lípidos en los huevos, son más ricos en HUFA n3 que los triglicéridos que son virtualmente los únicos lípidos en las reservas del tejido adiposo, hay una mayor transferencia de HUFA n3 de las reservas del tejido adiposo corporal hacia los huevos (Henderson *et al.*, 1984; Henderson y Almatar, 1989). Como consecuencia, los lípidos movilizados del músculo, tanto en machos como en hembras, son reemplazados por agua. Esto resulta directamente de la estequiometría del catabolismo de los ácidos grasos:



256 g de ácido graso (palmítico 16:0) generan 288 g de agua, ó un volumen

de grasa con un peso específico aproximado de 0.90 genera aprox. 1 volumen de agua. Esta relación inversa entre la grasa y el agua en la carne del pez asegura que el cambio de volumen total del pez se minimice durante la puesta, y justifica la pobre condición de los peces que ya han realizado la puesta. De aquí la importancia de la demanda de energía en la reproducción en peces, y hasta que punto depende del catabolismo de los lípidos.

Por tanto, el primer requisito para una buena nutrición de reproductores es el suministro de los lípidos suficientes en la dieta para responder a los requerimientos de energía de la reproducción. La composición en ácidos grasos de los lípidos requeridos para la producción de energía durante la formación de la gónada no es demasiado importante. Sin embargo, en peces de agua fría, incluyendo los salmónidos, depende en gran medida de una mezcla de ácidos grasos saturados de cadena media, y monoinsaturados de cadena larga, principalmente 16:0, 18:1n9, 20:1n9, y 22:1n11. Esta composición se encuentra en los aceites comerciales disponibles en el noroeste de Europa. La determinación de la cantidad de lípidos en la dieta para cubrir las necesidades de la reproducción es más difícil ya que depende de las especies y, en concreto, de la cantidad de lípidos presentes en los huevos. Una estimación teórica podría ser sobre 2-3 veces la cantidad de lípidos presentes en los huevos producidos en condiciones óptimas. Esto puede traducirse a la práctica alimentando a los reproductores con dietas que contengan aceite de pescado en un 10-20% de su peso seco.

2.4.2. Lípidos y vitelogénesis

La inyección de la hormona estradiol en peces inmaduros, machos o hembras, induce la aparición en la sangre de la vitelogenina, lipoproteína específica del huevo (Plack *et al.*, 1971). El mecanismo de este proceso es

el siguiente (Fig.5):

- 1) activación por el estradiol de una lipasa de lipoproteína en el tejido adiposo.
- 2) hidrólisis de los triglicéridos dentro de los adipocitos por la lipasa de la lipoproteína para generar ácidos grasos libres.
- 3) paso de los ácidos grasos libres desde los adipocitos a la sangre, donde son transportados absorbidos en la albúmina, hasta el hígado.
- 4) llegada de los ácidos grasos al hígado donde son incorporados principalmente como fosfolípidos y en menor medida como triglicéridos.
- 5) asociación de los lípidos sintetizados de nuevo con las "apoproteínas" (proteína en una cadena polipeptídica que está separada del grupo prostético) específicas del huevo, sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso del hígado a partir de los aminoácidos movilizados en gran cantidad desde la proteína del músculo, para formar la vitelogenina que es llevada a los huevos por la sangre.

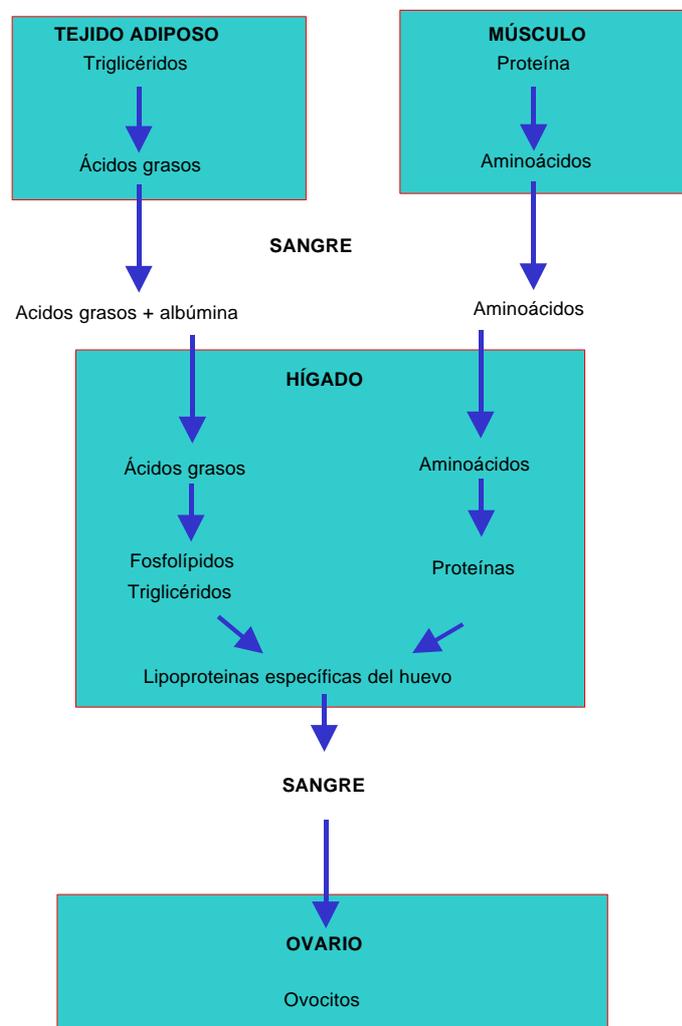


Figura 5. Biosíntesis de las lipoproteínas del huevo.

La importancia cuantitativa de esta transformación de aminoácidos y ácidos grasos, derivados principalmente de las reservas del tejido adiposo y del músculo, en lípidos y proteínas del huevo, se comprueba por el marcado aumento de tamaño del hígado (3-5 veces en el capelán) que ocurre en los primeros estados de la ovogénesis en peces (Henderson *et al.*, 1984) (Fig.6).

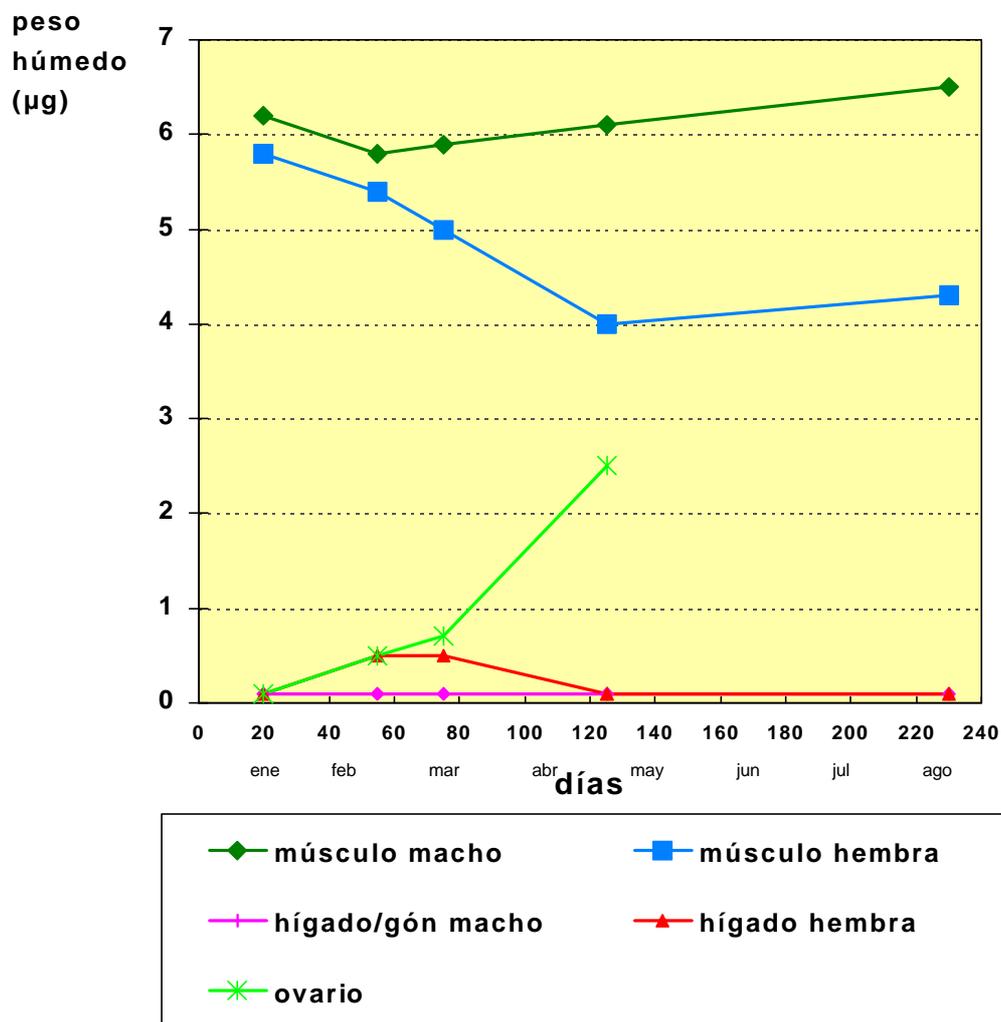


Figura 6. Cambios en el peso del músculo, hígado y gónada del capelán durante el desarrollo gonadal y la puesta. (de Henderson *et al.*, 1984)

El desarrollo de la gónada comienza en enero y la puesta tiene lugar a principios de mayo. Los cambios en el hígado y gónada del macho son insignificantes si se comparan con los de la hembra.

Esto refleja una marcada proliferación del retículo endoplásmico del hígado donde tiene lugar la biosíntesis de vitelogenina. Son necesarias grandes cantidades de energía metabólica para la formación del propio retículo endoplásmico expandido y para las reacciones biosintéticas que tienen lugar.

La vitelogenina se ha detectado en la sangre de numerosos peces teleósteos. Es una lipoproteína especializada de muy alta densidad (VHDL) con aproximadamente el 80% de proteína y el 20% de lípidos. Los fosfolípidos y los triglicéridos representan aprox. 2/3 y 1/3 de los lípidos respectivamente, y a causa de su alto contenido en fosfolípidos, la vitelogenina es rica en HUFA n3 especialmente 22:6n3. Durante la formación del huevo la vitelogenina es absorbida por los ovocitos en desarrollo por un proceso de pinocitosis y es incorporada al huevo para generar las proteínas del vitelo, lipovitelina y fosvitina. Por tanto, la mayor parte de los fosfolípidos ricos en HUFA n3 de los huevos se localiza en la lipovitelina. Además, es probable que los huevos ricos en triglicéridos y fosfolípidos incorporen lipoproteínas ricas en lípidos de la sangre, por ejemplo lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) cuyo alto contenido en lípidos se debe principalmente a los triglicéridos.

Este proceso ha sido confirmado en un gran número de especies de peces. Se han hecho estudios recientes en la trucha (Copeland & Thomas, 1988), pez gato (Smith *et al.*, 1988), platija (Nagler & Idler, 1990), anguila (Petersen & Korsgaard, 1989), carpa (Carnevali & Belvedere, 1991), lubina (Covens

et al., 1987), y trucha arco-iris (Babin, 1987). Una revisión general sobre el metabolismo lipídico en peces teleósteos ha sido hecha por Henderson & Tocher (1987). Babin & Vernier (1989) realizaron una revisión de las lipoproteínas del plasma incluyendo la vitelogenina.

2.4.3. Metabolismo lipídico en las primeras etapas del desarrollo en peces

2.4.3.1. Composición lipídica de los huevos

Los lípidos son la principal fuente de energía metabólica a lo largo del desarrollo embrionario de los peces por lo que las cantidades en que se encuentran en los huevos están en relación con el tiempo que transcurre entre la puesta y la eclosión o la primera alimentación de las larvas. Así, los peces de agua dulce como los salmónidos, ponen huevos relativamente grandes con grandes reservas de lípidos que contienen cantidades importantes de triglicéridos y fosfolípidos, y con largos periodos de incubación de hasta 20 semanas. Se producen larvas de gran tamaño que son fáciles de alimentar con dietas establecidas.

Por ejemplo, los huevos de salmón atlántico, *Salmo salar*, contienen aproximadamente el 30% de su peso seco en lípidos, de los cuales el 48% son triglicéridos, y el 44% fosfolípidos (Cowey *et al.*, 1985). Los huevos del bacalao, *Gadus morhua*, contienen un 13% de su peso seco en lípidos, de los cuales un 13% son triglicéridos y un 72% fosfolípidos.

Los principales ácidos grasos saturados y monoinsaturados en los triglicéridos de los huevos fecundados de salmón son 16:0 (11.4%) y 18:1n9 (31%). Lo mismo sucede con los huevos fecundados de bacalao donde el 16:0 y el 18:1n9 representan el 7.5% y el 18% respectivamente del total de

ácidos grasos en los triglicéridos. Estas diferencias reflejan el alto contenido de HUFA n3 en los triglicéridos de los huevos de bacalao, donde el 22:6n3 y el 20:5n3 representan el 16% y el 11% respectivamente del total de los ácidos grasos. En huevos de salmón las cifras correspondientes para el 22:6n3 y el 20:5n3 en los triglicéridos son el 11.4% y el 6.0% respectivamente. Los ácidos grasos de los fosfolípidos de los huevos de salmón y bacalao contienen el 42% y el 46% respectivamente de HUFA n3 y en ambos casos la proporción 22:6n3/20:5n3 es aprox. 2/1. Un resumen de la composición en ácidos grasos de los lípidos de los huevos de peces marinos se da en la Tabla I (Sargent, 1995).

Tabla I. Composición en lípidos y ácidos grasos de los huevos de algunas especies de

peces. (De Sargent, 1995).

	Bacalao	Eglefino	Arenque	Capelán
Diámetro del huevo (mm)	1.35	1.30	1.35	1.1
Humedad (%)	74.0	86.0	74.0	70.0
Lípidos (% peso seco)	13.2	10.7	14.6	26.3
Lípidos polares (% lípidos totales)	71.7	71.3	69.0	50.7
Lípidos neutros (% lípidos totales)	28.3	28.7	31.0	49.3
Fosfatidilcolina (% lípidos totales)	45.6	45.8	57.6	37.7
Triglicéridos (% lípidos totales)	12.5	8.3	14.8	30.4
Colesterol (% lípidos totales)	6.1	9.5	8.3	3.1
Ácidos grasos en lípidos polares (% total)				
saturados	28.1	25.5	32.7	27.4
monoinsaturados	20.3	20.4	14.5	18.1
20:4n6	1.9	3.7	1.0	1.1
20:5n3	15.3	12.6	13.7	19.0
22:6n3	28.6	27.6	31.4	24.6
Ácidos grasos en triglicéridos (% total)				
saturados	21.3	20.4	30.6	24.9
monoinsaturados	41.5	32.9	33.5	35.9
20:4n6	1.2	2.8	0.6	0.5
20:5n3	10.9	14.0	9.7	13.1
22:6n3	16.0	14.5	17.1	14.1

2.4.3.2. Utilización de los lípidos en los huevos fecundados

Los datos anteriores dan una idea de la importancia cuantitativa de los HUFA n3, especialmente el 22:6n3, y de los triglicéridos y fosfolípidos en el desarrollo embrionario y posteriormente en los primeros días de vida de las larvas. A priori, podría esperarse que los triglicéridos fueran consumidos principalmente como fuente de energía metabólica en el desarrollo inicial, y que los fosfolípidos, con sus altas concentraciones de HUFA n3 esenciales,

fueran reservados para la formación de nuevos tejidos en el desarrollo del embrión y de la larva.

Sin embargo esto no sucede así en la práctica. Los triglicéridos son realmente consumidos como fuente de energía metabólica durante el desarrollo embrionario, como se ve claramente en el estudio realizado por Cowey *et al.* (1985) que demuestra la disminución de los triglicéridos en huevos de salmón desde 3.4 mg en la fertilización hasta 1.4 mg en las larvas. Sin embargo, la fosfatidilcolina, el principal fosfolípido en los huevos de salmón, va descendiendo también desde 2.9 mg en los huevos fecundados hasta 1.1 mg en las larvas. El consumo neto es el mismo en los triglicéridos (2.0 mg) que en los fosfolípidos (1.8 mg).

Los resultados son aún más sorprendentes en el desarrollo de los huevos de arenque, donde la utilización marcadamente preferente de fosfatidilcolina, el principal componente con diferencia de los huevos, se refleja en su descenso desde el 62% en los recién puestos y fecundados, al 40% en la eclosión, y al 34% a los 15 días de la puesta (Tocher *et al.*, 1985a). Durante el mismo periodo, el porcentaje de triglicéridos en los lípidos del huevo sube desde el 14% en el momento de la fecundación hasta el 23% en la eclosión, y luego cae al 13% 15 días después de la eclosión. Una situación parecida, es decir, la utilización preferente de la fosfatidilcolina del huevo sobre los triglicéridos, ocurre durante el desarrollo de los huevos del bacalao (Fig. 7) (Fraser *et al.*, 1988), y en el halibut (*Hipoglossus hipoglossus*), donde la fosfatidilcolina es también el principal lípido de los huevos (Falk-Petersen *et al.*, 1986, 1989).

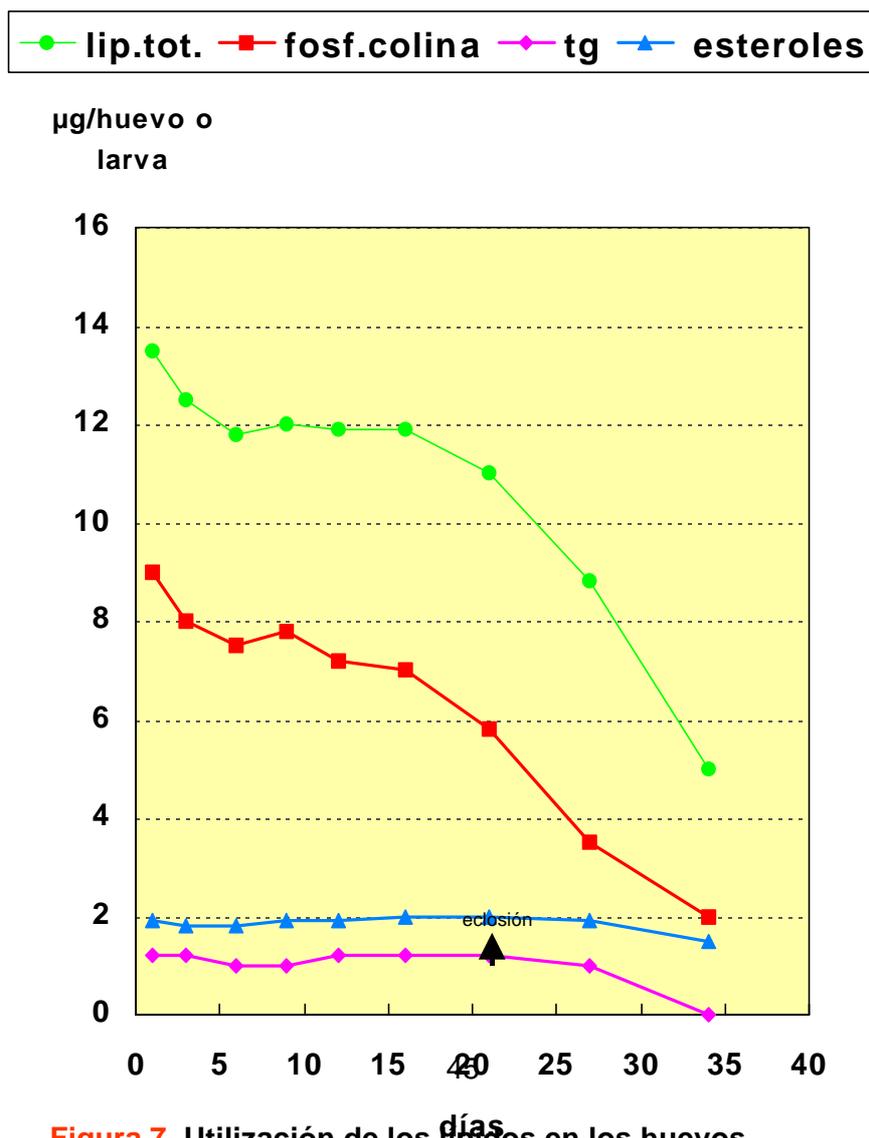


Figura 7. Utilización de los lípidos en los huevos fecundados y en las larvas de bacalao, *Gadus morhua*. (Sargent, 1995)

De estos resultados se puede deducir lo siguiente:

1º. La utilización preferente de la fosfatidilcolina en el desarrollo del huevo, especialmente en especies marinas, implica un catabolismo de HUFA n3 relativamente grande. Los análisis realizados por Tocher *et al.* (1985b) establecieron que en el arenque las pequeñas cantidades de triglicéridos en los huevos fueron progresivamente aumentando a medida que avanzaba la embriogénesis, gracias a una retención en los triglicéridos de los HUFA n3 movilizados desde la fosfatidilcolina. Sin embargo, este mecanismo de ahorro es incapaz de conservar la totalidad de HUFA n3 movilizados desde la fosfatidilcolina durante todo el desarrollo del huevo, por lo que hay que deducir que son necesarias grandes cantidades adicionales de HUFA n3 para suministrar energía metabólica durante la embriogénesis. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son cuantitativamente más importantes que los HUFA n3, en el suministro de energía metabólica para el desarrollo del huevo.

2º. Dado que el desarrollo del huevo tiene lugar en un sistema cerrado, la movilización de fosfatidilcolina generará altos niveles internos de fosfato y colina inorgánicos. El fosfato inorgánico se añade a las reservas de fosfato del huevo localizadas entre otras en la fosvitina; la fosfatidilcolina, por tanto, puede ser considerada, hasta cierto punto, como contribuidora de las reservas de fosfato en los huevos. El destino de la colina movilizada desde la fosfatidilcolina está menos claro, especialmente dadas las relativamente grandes cantidades implicadas. Se ha especulado (Falk-Petersen *et al.*, 1989) que la colina puede ser metabólicamente oxidada a glicina betaína que serviría a la osmoregulación del agua producida en la oxidación de los ácidos grasos para generar energía metabólica durante la embriogénesis. Sin embargo no hay evidencia experimental para esta suposición y el destino de la colina permanece desconocido.

Este tema tiene considerable importancia en la nutrición de reproductores porque subraya el papel de la fosfatidilcolina y de la biosíntesis de la colina en particular en los reproductores durante la ovogénesis. Este proceso puede estar ligado al metabolismo de la metionina, por la importancia de este aminoácido como fuente de grupos metilo para la biosíntesis de la colina, y subraya el papel central que juega la vitelogenina en la unión de lípidos y proteínas en la nutrición de reproductores.

2.4.4. Ácidos grasos esenciales en el desarrollo embrionario y larvario

La transferencia preferente de los HUFA n3 desde las reservas grasas de los reproductores hasta los lípidos del huevo, particularmente la fosfatidilcolina, ya ha sido descrita. Este proceso subraya la importancia de estos ácidos grasos como componentes esenciales de los fosfolípidos de las membranas, y el requisito imprescindible de que el huevo contenga cantidades suficientes de estos nutrientes esenciales para permitir el crecimiento y el desarrollo del embrión y de la larva hasta la primera alimentación. Cualquier deficiencia en el contenido en ácidos grasos del huevo tendrá luego profundas repercusiones en el desarrollo embrionario y larvario.

2.4.4.1. Conversión de los ácidos grasos poliinsaturados C18 a C20 y C22

Los ácidos grasos de los peces proceden de la dieta y de la síntesis *de novo* de los tejidos. Además, los ácidos grasos ingeridos pueden ser modificados por los peces por desaturación y elongación de la cadena. La elongación se hace por incorporación de dos átomos de carbono, a la vez, en el extremo carboxílico, mientras que la oxidación se realiza quitando átomos de carbono, de dos en dos, a partir del mismo grupo terminal. Las cantidades relativas de los distintos ácidos grasos en los depósitos grasos

de los peces varía considerablemente con la especie, edad, sexo, temperatura, salinidad, y especialmente con la dieta.

Los peces carecen de las desaturasas necesarias para la formación de 18:2n6 y 18:3n3 a partir de 18:1n9. Cada uno de estos tres elementos se convierte así en la cabeza de una serie de ácidos grasos dentro de las cuales se pueden producir las interconversiones (Fig. 8). La capacidad de elongar y desaturar el ácido linoléico (18:3n3) hasta 20:5n3 y 22:6n3 o de convertir estos dos últimos, depende de la especie; así la trucha posee esta capacidad en mucho mayor grado que otros peces de agua dulce, mientras que los peces marinos no la tienen en absoluto.

Las especies de agua dulce parecen no presentar signos de deficiencia de ácidos grasos esenciales cuando su dieta contiene al menos un 1% de ácido linoléico (18:3n3) (Watanabe, 1987). Son capaces de convertir este ácido graso en otros altamente insaturados como el eicosapentanoico

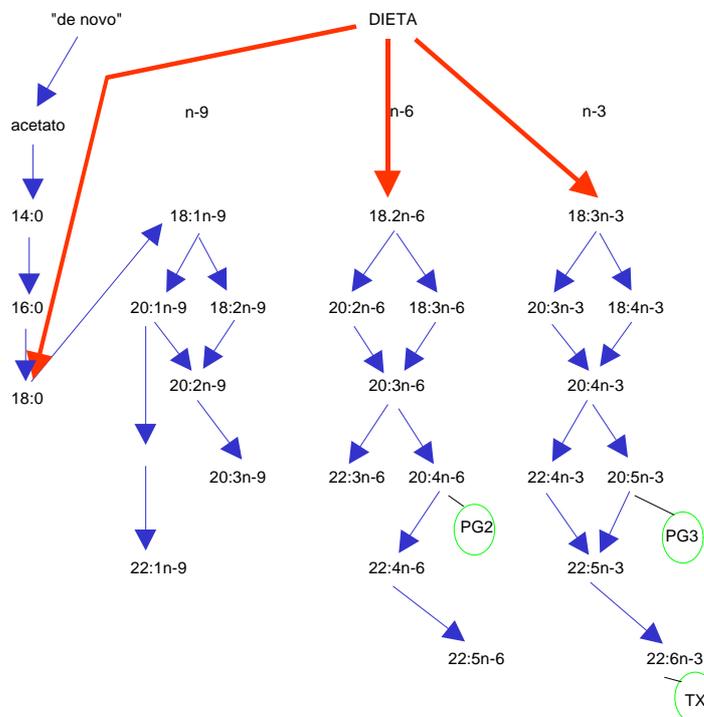


Figura 8. Diagrama de las rutas de bioconversión de ácidos grasos de las series más importantes en peces.

(20:5n3) y el docosaexanoico (22:6n3).

La situación en los peces marinos es diferente, habiéndose demostrado que si el 20:5n3 y el 22:6n3 no son suministrados en la dieta, se presentan síntomas de deficiencias nutricionales (Bell *et al.*, 1984). Esto no significa necesariamente que los peces marinos sean incapaces de convertir el 18:3n3 en ácidos grasos altamente insaturados. La conversión ha sido demostrada para la dorada japonesa, *Crysophrys major*, (Yone & Fujii, 1975), y el salmón atlántico, *Salmo salar* (Hardy *et al.*, 1987). Sin embargo, la conversión puede llevarse a cabo a una velocidad que es insuficiente para prevenir la deficiencia en ácidos grasos esenciales (Kanazawa *et al.*, 1977; Bell *et al.*, 1986). La conversión del 18:3n3 en HUFA n3 en la dorada es muy baja según demuestran los recientes estudios de Mourente & Tocher (1993).

Se ha demostrado que los HUFA n3 tienen un efecto inhibitorio sobre la conversión de los n6 en la trucha (Yu & Sinnhuber, 1972) y en la carpa (Takeuchi & Watanabe, 1977a). La desaturasa Δ^6 es la enzima clave en la bioconversión de los precursores de las dos series, ácidos linoleico y linolénico (Léger *et al.*, 1981b). Además, el efecto inhibitorio inverso, de los n6 sobre la conversión de los n3, se ha observado también en la trucha (Yu & Sinnhuber, 1972; Watanabe *et al.*, 1978). Cuando el 18:2n6 está en exceso se presenta una inhibición competitiva entre los n6 y los n3 por el uso de la desaturasa Δ^6 , a pesar de la mayor afinidad de la enzima por el ácido graso más insaturado (Léger *et al.*, 1981b). Este efecto se observó en reproductores de dorada alimentados con altos niveles de 18:2n6 que se almacenó en el hígado y que, por la inhibición de los n3 de la dieta, produjo huevos con un patrón de ácidos grasos con altos niveles de 18:2n6 y bajos niveles de n3HUFA (Watanabe *et al.*, 1984b). Los altas cantidades de ácido linoleico producen también disminución de la calidad de los huevos

(Watanabe *et al.*, 1984a) debida a la incorporación de este ácido grado en los huevos donde no se utiliza adecuadamente (Watanabe *et al.*, 1984d); las larvas obtenidas de estos reproductores (alimentados con altos niveles de 18:2n6 y deficiencia de ácidos grasos esenciales) presentan también deformaciones y retrasos en la formación de la vejiga natatoria (Watanabe *et al.*, 1984a,c).

Las altas cantidades de n3HUFA, particularmente el 22:6n3, tienden a disminuir la bioconversión del 18:2n6 (desaturasa $\Delta 6$) (Dato & Brenner, 1970) y de los n3 y n6. La disminución de la bioconversión de los n3 puede también ser debida a la presencia de grandes cantidades de 18:2n6 que aumenta la bioconversión de la serie n6 en detrimento de la n3 (Brenner, 1974; Léger *et al.*, 1981). Los resultados de Mourente & Odriozola (1990b) confirman estas tesis en la dorada; los huevos y larvas procedentes de reproductores alimentados con altos niveles de 18:2n6 presentaron actividad de desaturación únicamente en los ácidos grasos n6. Por otra parte, las dietas con alto contenido de n3HUFA indujeron una inhibición de la bioconversión de n3 y n6 tanto en huevos como en larvas.

De la revisión de Sargent *et al.* (1990, 1993) sobre requerimientos de ácidos grasos esenciales en peces se puede concluir:

(1) los peces necesitan HUFA n3 y de HUFA n6.

(2) los peces de agua dulce son capaces de convertir los HUFA de 18 átomos de carbono, 18:3n3 y 18:2n6, en sus homólogos 22:6n3 y 20:4n6 respectivamente.

(3) los peces marinos son incapaces de realizar esa conversión y requieren disponer de 20:4n6 y 22:6n3.

Sin embargo las diferencias entre peces marinos y de agua dulce en su capacidad de convertir HUFA C18 en C20 y C22, es más aparente que real, y las diferencias pueden ser debidas a la alimentación natural de los peces. Así, los datos disponibles para peces marinos se basan en los estudios con rodaballo, *Scophthalmus maximus*, especie estrictamente carnívora, mientras que la mayoría de las especies de agua dulce estudiadas son omnívoras (insectívoras y herbívoras). En general la dieta natural de peces marinos consiste en peces más pequeños que siempre contienen grandes cantidades de 22:6n3, mientras que las dietas a base de insectos o plantas de los peces de agua dulce contienen predominantemente 18:3n3 (Sargent *et al.*, 1989).

En ésta línea, se ha comprobado que el lucio, *Esox lucius*, un carnívoro de agua dulce, no puede convertir 18:3n3 en 22:6n3 en tasas significativas para cubrir sus requerimientos. Las diferencias entre los hábitos alimentarios son el principal determinante de los requerimientos en ácidos grasos, más que la salinidad del medio, y por lo tanto hay que saber hasta que punto las dietas naturales, y por tanto la incorporación de HUFA, pueden cambiar cuantitativa y cualitativamente durante el desarrollo desde la larva hasta los individuos maduros. Por ejemplo, la larva de salmón que tiene un crecimiento rápido en agua dulce, requerirá grandes cantidades de HUFA n3 para el crecimiento de los tejidos y convertirá rápidamente el 18:3n3 ingerido de los insectos en 22:6n3, al mismo tiempo que utiliza 22:6n3 de otros componentes de la dieta. En una etapa posterior, el juvenil, en agua de mar y con una menor tasa de crecimiento, necesitará menores cantidades de n3; como ya dispone de una fuente de 22:6n3 en su dieta, no tendrá necesidad de convertir el 18:3n3 en 22:6n3.

Por tanto, los requerimientos en ácidos grasos esenciales determinados experimentalmente en juveniles y adultos no pueden ser extrapolados a las

etapas larvarias, sobre todo en lo que se refiere a los requerimientos cuantitativos. Desde este punto de vista, llama la atención que la mayoría de HUFA n3 de todos los huevos de peces sean 22:6n3 y 20:5n3 en una proporción aprox. de 2:1 para que no haya problemas de conversión de HUFA C18 en C20 y C22 en el huevo. Sin embargo, en huevos de peces todavía se desconocen los niveles óptimos de 22:6n3 y 20:5n3 y mucho menos de 20:4n6, y mientras no haya pruebas experimentales se pueden hacer suposiciones sólo sobre la base de considerar las cantidades y las funciones de los ácidos grasos esenciales en el embrión en desarrollo y en la larva hasta la primera alimentación.

2.4.4.2. Función de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas.

En los vertebrados superiores el papel de mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las membranas celulares es desempeñado por los HUFA n6, principalmente el 20:4n6; en los peces esta función es desarrollada por los HUFA n3, principalmente el 22:6n3. Además, éste ácido graso juega un papel importante y específico en las membranas de las células nerviosas, cerebro y ojos, de todos los vertebrados incluidos los peces. Alrededor del 40% de la materia seca del cerebro de los peces son lípidos, de los que el 10% es fosfatidiletanolamina (cefalina) (Mourente *et al.*, 1991). A su vez, el 22:6n3 constituye casi el 40% de los ácidos grasos totales en la fosfatidiletanolamina del cerebro de los peces.

En la lubina el 22:6n3 es retenido en cantidades importantes en los lípidos del cerebro incluso en individuos alimentados con dietas carentes de HUFA n3 (Pagliarini *et al.*, 1986). Los peces, al igual que los mamíferos, tienen niveles de 22:6n3 en el cerebro y la retina muy por encima de los encontrados en los tejidos no nerviosos; este hecho ha sido constatado en el bacalao, *Gadus morhua* (Tocher & Harvie, 1988), en la trucha arco-iris,

Salmo gairdneri (Tocher & Harvie, 1988; Bell & Tocher, 1989), y en el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Mourente *et al.*, 1991).

Las deficiencias en 22:6n3 influyen en la formación de los sistemas nervioso y óptico de las larvas y en el comportamiento predatorio de manera que están relacionadas con las altas mortalidades que pueden aparecer en la etapa de alimentación viva de los primeros estados larvarios (Mourente & Tocher, 1992).

Todavía no hay evidencias claras de que una nutrición deficiente de los reproductores pueda alterar los niveles de 22:6n3 en los huevos hasta el punto de influir en el comportamiento depredador de las larvas. Sin embargo, en un estudio reciente (Navarro & Sargent, 1992), se demuestra que aparecen diferentes pautas de comportamiento en un mismo lote de larvas de arenque sometidas a escasez de alimento. Mientras dos grupos presentan natación anormal o permanecen en el fondo del tanque, un tercero presentó un comportamiento normal. Esta distinta respuesta y la menor resistencia a condiciones de ayuno es característica de deficiencias en ácidos grasos de las larvas (Watanabe *et al.*, 1980; Navarro *et al.*, 1988). En este caso las diferencias en el mismo lote se explicarían por la procedencia de los huevos de distintos machos y hembras.

2.4.4.3. Ácidos grasos poliinsaturados como precursores de eicosanoides.

La segunda función importante de los ácidos grasos esenciales es su papel como precursores de eicosanoides. En mamíferos se sabe que el ácido araquidónico, 20:4n6, es el principal precursor de eicosanoides y que estas moléculas, de corta vida y gran actividad biológica, se producen solamente en cantidades traza. También en mamíferos los HUFA n3, principalmente el

20:5n3, juega un papel regulador compitiendo con los sistemas enzimáticos e inhibiendo la formación de eicosanoides a partir del 20:4n6 (Fig. 9).

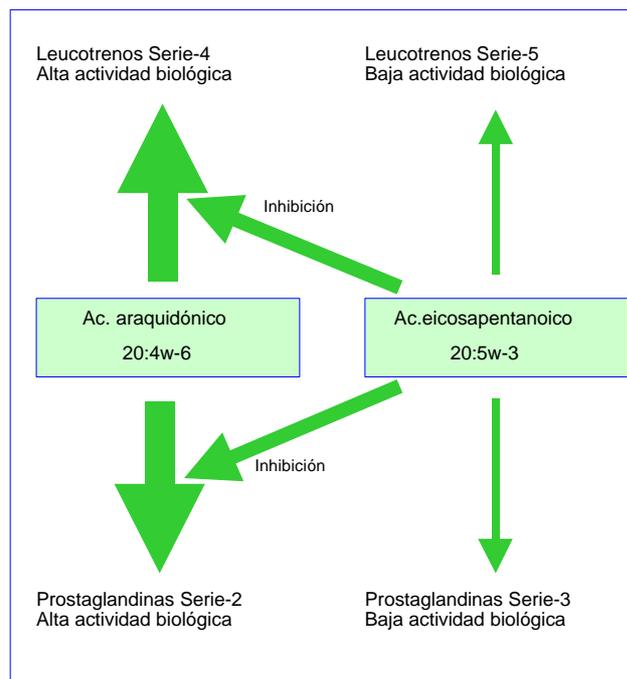


Figura 9. Relación entre los ácidos araquidónico y eicosapentanoico en la producción de eicosanoides (prostaglandinas y leucotrenos).

Los eicosanoides biológicamente activos en peces están formados principalmente por 20:4n6, y este hecho hace que los HUFA n6 sean esenciales para los peces.

Esta afirmación se confirma al comprobar la localización preferente de las pequeñas cantidades de 20:4n6 en los fosfolípidos de los peces en el fosfatidilinositol, una clase de lípido especializada en la transducción de señales a través de las membranas celulares.

En la fosfatidilcolina, que llega al 46% de los lípidos totales en los huevos de bacalao, las principales especies moleculares (%mol) son 16:0/22:6 (31%), 18:1/22:6 (15%) y 16:0/20:5 (15%); lo mismo ocurre aproximadamente con la fosfatidiletanolamina que llega al 20% de los lípidos totales del huevo.

En cambio, en el fosfatidilinositol, que alcanza solo el 3% de los lípidos en el huevo, las principales especies moleculares son 18:0/20:4 (37%), y 18:1/20:4 (17%). Estos datos indican claramente el carácter esencial del 20:4n6 para el desarrollo embrionario y larvario, con un papel específico en la producción de eicosanoides.

Los HUFA n3 tienen un efecto regulador de la producción de eicosanoides a partir del 20:4n6. Por ello es importante establecer la relación óptima en la dieta de n6/n3 para evitar también enfermedades producidas en peces alimentados con aceites vegetales. Bell *et al.* (1990) encontraron en salmón que una alta suplementación de las dietas con aceites vegetales ricos en HUFA n6, aún con suficiente cantidad de n3, producía graves desórdenes cardiacos en los peces (necrosis del músculo). Estos problemas estaban relacionados con situaciones de estrés y con el aumento de la producción de eicosanoides a partir de 20:4n6. Las dietas con una relación de HUFA n6/n3 más alta de lo normal producen unas respuestas exageradas al estrés.

No es aconsejable, por tanto, la suplementación de las dietas de peces más de lo estrictamente necesario con aceites vegetales ricos en 18:2n6; esto es válido particularmente para los reproductores ya que además la prostaglandina E3 es un inductor fisiológico de la puesta en peces maduros.

Aunque no hay estudios experimentales en este campo, se puede suponer que un exceso de HUFA n6 en los reproductores se transferirá rápidamente a los huevos resultando una elevada producción de eicosanoides durante la embriogénesis y el desarrollo larvario y aumentando la susceptibilidad de las larvas a las condiciones de estrés.

Para establecer la relación idónea entre n3/n6 en los reproductores y en las larvas de especies marinas, en ausencia de datos experimentales, se puede tomar la comprendida entre 5:1-10:1 que se encuentra en la naturaleza.

Se recomienda también el uso de los productos finales de la biosíntesis de los HUFA, 22:6n3, 20:5n3, y 20:4n6, evitando en lo posible sus precursores, 18:2n6 y 18:3n3, independientemente de que las especies en cuestión sean capaces de convertir los HUFA C18 en sus homólogos C20 y C22. Esto se justifica por la complejidad de las vías de elongación y desaturación de los ácidos grasos que hace casi imposible saber con seguridad que productos finales C20 y C22 se originarán de una combinación inicial dada de C18.

Un aspecto importante a la hora de suministrar HUFA C20 y C22 es la recomendación del uso de 22:6n3 y 20:5n3 en la proporción aproximada de 2:1 encontrada en la mayoría de los huevos de peces. Esto es así por no saberse hasta que punto el 20:5n3 puede convertirse en 22:6n3, y porque un exceso de 20:5n3 puede inducir una mayor producción de eicosanoides a partir de 20:4n6.

2.4.5. Resumen

A pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos de los lípidos en la nutrición de peces, no tienen por qué aparecer problemas nutricionales importantes en la alimentación práctica de los reproductores. Es importante establecer la doble e inseparable función de los lípidos como fuente de energía metabólica y como componentes esenciales de las membranas celulares.

La nutrición lipídica es fundamentalmente cuestión de equilibrio entre los ácidos grasos. Esta revisión ha puesto de manifiesto la importancia de la relación n3/n6 que es un aspecto de la relación más amplia entre los ácidos grasos saturados/monoinsaturados (n6/n3). La complejidad de la nutrición lipídica reside en el hecho de que los cambios en las cantidades de los ácidos grasos de una serie, alteran las cantidades de los otros. Por eso, una dieta muy rica en ácidos grasos saturados corre el riesgo de ser parcialmente deficiente en ácidos grasos esenciales, mientras que una dieta que contenga la cantidad justa de ácidos grasos esenciales, es probable que sea deficiente en energía.

Además puede haber interacciones metabólicas entre las 4 series de ácidos grasos, particularmente en el caso de las reacciones de elongación y desaturación, en las que existe una competencia por el mismo número limitado de enzimas entre monoinsaturados, HUFA n6 y HUFA n3, y posiblemente también entre los saturados. Por eso, en la práctica, se recomienda el uso, cuando sea posible, de los productos finales de la biosíntesis.

Todos estos problemas teóricos no son luego tan importantes en la práctica ya que los aceites de pescado normalmente utilizados en la fabricación de

piensos tienen una composición equilibrada de las cuatro familias de ácidos grasos debido a la época del año en que se realizan las capturas en las pesquerías.

Por lo tanto, la nutrición de reproductores no debe ser, por sí sola, causa de mala calidad en huevos y larvas. Sin embargo, los aspectos de calidad de nutrición de reproductores suelen estar interrelacionados con otros factores como enfermedades, contaminación ambiental, y variación genética, éste último muy importante. Los problemas de calidad de huevos y larvas permanecen todavía sin solucionar hasta que se llegue a un conocimiento más completo de la biología del desarrollo de los peces.

2.5. REPRODUCCIÓN-NUTRICIÓN EN DORADA

El desarrollo final del ovario en los peces lleva consigo una serie de cambios importantes bioquímicos y fisiológicos que conducen a una incorporación masiva de lípidos y proteínas en el ovocito. En un periodo de tiempo relativamente corto, los ovocitos crecen rápidamente hasta constituir del 20 al 40% del peso de la hembra. Los nutrientes y la energía necesarios para el crecimiento del ovario y los demás procesos deben por tanto mobilizarse desde los depósitos corporales de reserva. En el salmón atlántico, por ejemplo, la ovogénesis va acompañada por una depleción en las proteínas y lípidos del músculo y por un aumento de su contenido en agua (Aksnes *et al.*, 1986). En la trucha arco-iris el desarrollo del ovario se asocia con una movilización drástica de lípidos viscerales y de la carcasa (Nassour & Léger, 1989).

La dorada tiene un desarrollo ovárico asincrónico y produce puestas diarias durante 3-4 meses al año. Durante la época de puesta, en un momento determinado pueden encontrarse ovocitos que están completando la

vitelogénesis mientras otros están iniciando el proceso. Por esto, las sustancias constituyentes del vitelo se depositan continuamente en el ovario durante muchos meses a lo largo del año. Además, durante los 3-4 meses de puesta, una hembra de dorada puede poner un total de 0.5-2 kg de huevos por kg de peso, lo que equivale a 0.5-2 veces su peso corporal. Esta producción de huevos se sustenta en los nutrientes y en la energía procedentes de la dieta de los reproductores. La dorada continúa alimentándose a lo largo de su época de reproducción.

La gran influencia de la alimentación de los reproductores sobre la calidad de huevos y larvas fué comprobada por Watanabe *et al.* (1984a,b,c,d, 1985a,b) en la dorada japonesa, *Pagrus major*, especie muy parecida a la dorada europea y con una reproducción similar. Estos autores demostraron que la fecundidad y la calidad de los huevos medidas en número de huevos viables, número de gotas de grasa, porcentajes de eclosión, y porcentaje de larvas normales, mejoraban considerablemente al añadir krill o carne de sepia a la dieta de los reproductores.

De los experimentos de Zohar *et al.* (1995) se concluía que , además de las vitaminas C y E y los HUFA n3 , tanto las fracción lipídica como la proteica, contenían componentes esenciales para la calidad de huevos y larvas. Además, y a pesar de que las hembras de dorada se sigan alimentando durante el periodo de puesta, se constató una pérdida del 52% de los lípidos musculares y del 45% de los del tejido adiposo. De estos lípidos movilizados la mayoría eran ácidos grasos saturados o monoinsaturados, los que demuestra que los ácidos grasos altamente poliinsaturados deben ser aportados en la dieta. Se vió también una alta correlación entre los niveles de ácidos grasos esenciales n3 y n6 en la dieta y en los huevos.

Estos mismos autores establecieron los periodos de tiempo en los que se

comprueba la influencia de la dieta de los reproductores sobre la puesta. En lapsos muy cortos, de 10 días, se producían cambios importantes en la producción de huevos, al suprimir o añadir determinados componentes esenciales.

2.5.1.Recomendaciones en el manejo de reproductores de dorada

Las doradas utilizadas como reproductores suelen tener de 2 a 6 años de edad. Se estabulan en tanques de 10-40 m³ a densidades de 5-10 kg/m³ y a una proporción %/& de 2/1. Si se quiere obtener puestas fuera de la época natural los tanques deben estar equipados de un control de fotoperiodo.

La alimentación se suministra de 1-3 veces al día con una tasa diaria de 1-1.5% del peso de los peces. El pienso debe tener un 50-55% de proteína y un 10-15% de grasa. Los lípidos deben contener al menos un 5% de n3 HUFA, principalmente de 22:6n3 (DHA). La dieta debe ser suministrada a los reproductores por lo menos 15 días antes del inicio de la puesta. De manera alterna, y en épocas de descanso de reproducción, se suministra una dieta a base de pienso comercial suplementada con un 2-3% de calamar.

El stock de reproductores debe mantenerse en un rango de temperaturas de 16-21°C.

Las puestas pueden obtenerse de forma natural o mediante manipulación del fotoperiodo e inducción hormonal; este segundo método permite obtener puestas sincronizadas, normalmente cada 24 horas y alargar el periodo de puesta hasta la casi totalidad del año.

Los reproductores son muy sensibles al estrés por lo que deben ser

mantenidos en buenas condiciones para que no se produzcan interrupciones de la puestas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. REPRODUCTORES

* En el experimento de 1992 un total de 360 doradas criadas en la planta de cultivos de Mazarrón se pusieron en 4 tanques de hormigón de 45 m³ (Fig.10) después de haber sido anestesiadas, y haberse determinado el sexo y el peso. La distribución se da en la Tabla II :

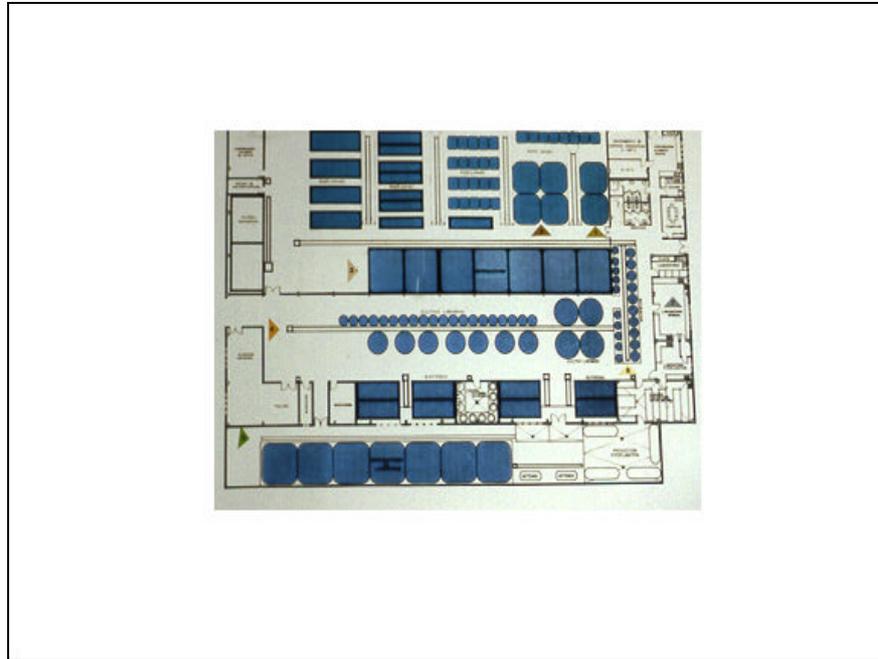


Figura 10. Tanques de reproductores de la Planta Experimental de Cultivos Marinos de Mazarrón (Centro Oceanográfico de Murcia)

Tabla II. Distribución de los reproductores en los 4 tanques experimentales.

1992

Tanque	nº& (peso medio g)	nº% (peso medio g.)	nºTotal (Kg.)	Alimentación
A2	36 (1328)	54 (892)	90 (101)	Pescado (boga)
A3	36 (1519)	54 (835)	90 (100)	Pienso
A4	36 (1436)	54 (948)	90 (103)	Pienso + Aceite coco
A5	36 (1375)	54 (904)	90 (103)	Pienso + EPA-DHA

La carga de los tanques se situó alrededor de 2,2 kg/m³. La temperatura a lo largo del periodo de puesta se mantuvo entre 18,5-20°C (Fig.11), la tasa de renovación del agua fue del 20% del volumen del tanque a la hora, los valores de O₂ disuelto oscilaron alrededor del 80% de los de saturación, la salinidad fue del 37‰, y los valores del pH estuvieron entre 7,5-8,5. El fotoperiodo fue el natural.

* El segundo año, 1993, 332 doradas del stock de reproductores de la planta de cultivos de Mazarrón se repartieron al azar en 4 tanques de hormigón de 45 m³ después de haber sido anestesiadas, y haberse determinado el sexo y el peso. Previamente se habían eliminado las de más edad del año anterior siendo sustituidas por un 15% de individuos salvajes y un 30% de individuos cultivados de menos de 2 años.

La distribución fué como sigue:

Tabla III. Distribución de los reproductores en los 4 tanques experimentales.

1993

Tanque	Nº& (peso medio g)	Nº% (peso medio g.)	NºTotal (Kg.)	Alimentación
A1	33 (1490)	50 (900)	83 (94)	Pescado (boga)
A3	33 (1563)	50 (1031)	83 (103)	Pienso
A4	33 (1612)	50 (946)	83 (105)	Pienso + 0
A6	33 (1568)	50 (887)	83 (96)	Pienso + 80

La carga de los tanques y las condiciones del medio en cuanto a temperatura, renovación del agua, O₂ disuelto, salinidad, pH, y fotoperiodo fueron iguales que el año anterior.

* Con los resultados de los 2 años anteriores, y dentro del convenio de colaboración entre el IEO y la empresa EWOS, S.A., se diseñó otro experimento para probar un nuevo tipo de pienso de reproductores comparándolo con una dieta fresca a base de pescado y calamar.

230 doradas del stock de reproductores de la planta de cultivos de Mazarrón se repartieron al azar en 2 tanques de hormigón de 45 m³ después de haber sido anestesiadas, y haberse determinado el sexo y el peso. Previamente se habían eliminado las de más edad del año anterior siendo sustituidas por un 15% de individuos salvajes y un 30% de individuos cultivados de menos de 2 años.

La distribución fué como sigue:

Tabla IV. Distribución de los reproductores en los 2 tanques experimentales.

1994

Tanque	Nº& (peso medio g)	Nº% (peso medio g.)	NºTotal (Kg.)	Alimentación
A3	40 (1 516)	75 (977)	115 (130.4)	Pienso
A4	40 (1 429)	75 (986)	115 (134.6)	Pescado (50%) + Calamar (50%)

La carga de los tanques se situó alrededor de 3 kg/m³. La temperatura a lo largo del experimento se mantuvo entre 16,5-18,7°C, la tasa de renovación del agua fue del 20% del volumen del tanque a la hora, los valores de O₂ disuelto oscilaron alrededor del 80% de los de saturación, la salinidad fue del 37‰, y los valores del pH estuvieron entre 7,5-8,5. El fotoperiodo fue el natural.

En el mes de julio, una vez terminada la época de puesta, 5 ejemplares de reproductores de cada tanque fueron muestreados para determinar talla, peso, peso eviscerado, peso del hígado, y cantidad de proteína y grasa en

músculo e hígado.

3.2. ALIMENTACIÓN

* En el primer año los peces fueron alimentados un vez al día "ad libitum" con cuatro dietas distintas: pescado fresco (boga), pienso comercial, pienso comercial enriquecido con una emulsión de aceite de coco, y pienso comercial enriquecido con una emulsión rica en HUFA 20:5 n3 y 22:5 n3 (ácidos eicosapentanoico y docosahexanoico respectivamente). Las emulsiones enriquecedoras llevaban además 500 ppm de vitamina C y 80 ppm de astaxantina.

El pienso comercial utilizado fue granulado de 7 mm de tamaño con la siguiente composición aproximada:

	%
Proteína bruta	49
Grasa	12
Fibra bruta	13
Cenizas	15
Humedad	11

El enriquecimiento del pienso comercial se llevó a cabo de la siguiente manera: se utilizaron 4 tipos de emulsiones, 2 al principio del experimento, 1A a base de aceite de coco (sin HUFAs), y 1B (muy rica en DHA y EPA). A los 2 meses del inicio de la alimentación experimental, se incorporó a las emulsiones 500 ppm de vitamina C y 80 ppm de astaxantina (en peso seco del pienso).

El enriquecimiento se hizo cada 3-4 días con pequeñas cantidades de pienso para evitar largos periodos de almacenamiento y la posible

oxidación. Se pesó la cantidad de emulsión necesaria (5% del peso del pienso) y se mezcló bien con el gránulo. Después se extendió el pienso en una capa fina sobre una malla de plástico y se secó a la estufa a 50-55°C con ventilación durante 3 horas. Después el pienso enriquecido se guardaba en recipientes pequeños, en atmósfera inerte de nitrógeno, y se almacenaba en refrigerador (6°C) hasta su uso. El pienso no enriquecido se almacenaba de la misma manera.

La alimentación experimental comenzó dos meses antes de la puesta y las tasas diarias oscilaron entre 0.08 y 1.08 en porcentaje de peso vivo.

* En 1993 los peces fueron alimentados dos veces al día, a las 10:00 y a las 16:00, "ad libitum" con cuatro dietas distintas: pescado fresco (boga), pienso comercial, pienso comercial enriquecido con una emulsión de aceite de coco, y pienso comercial enriquecido con una emulsión rica en HUFA 20:5 n3 y 22:5 n3 (ácidos eicosapentanoico y docosahexanoico respectivamente).

El pienso comercial utilizado fue granulado de 7 mm de tamaño con idéntica composición y características que el del año anterior.

El enriquecimiento del pienso comercial se llevó a cabo de la siguiente manera: se utilizaron 2 tipos de emulsiones a lo largo de toda la experimento, "0" a base de aceite de coco (sin HUFAs), y "80" (muy rica en DHA y EPA).

El enriquecimiento se hizo siguiendo la misma metodología que el año anterior.

La alimentación experimental comenzó dos meses antes de la puesta y las

tasas diarias oscilaron entre 0.05 y 1.25 en porcentaje de peso vivo.

* En 1994 los peces fueron alimentados dos veces al día, a las 10:00 y a las 16:00, "ad libitum" con dos tipos de dieta: pescado fresco (boga) y calamar al 50%, y pienso comercial granulado de 7 mm de tamaño. El pienso tenía más contenido en proteína y un 3% más de harina de pescado; su composición aproximada fue la siguiente:

	%
Proteína bruta	52
Grasa	15
Fibra bruta	6
Cenizas	15
Humedad	12

La alimentación experimental comenzó dos meses antes de la puesta y las tasas diarias oscilaron entre 0.3 y 1 en porcentaje de peso vivo.

3.3. PUESTAS

En los tres años las puestas tuvieron lugar en todos los tanques en condiciones de fotoperiodo natural y a una temperatura de $19 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Los huevos se recogían en una malla de 300 μ colocada a la salida de los tanques y se ponían en un vaso de 5 l durante 1 hora; los fecundados (flotantes) eran separados de los no viables y puestos en incubadores experimentales (Fig.12) para determinar el índice de eclosión.

Se controlaron los siguientes parámetros:

- duración de las puestas
- n° total de huevos
- % de huevos viables
- % de eclosión
- diámetro de los huevos
- n° de gotas de grasa

El número de huevos viables e inviables se determinó por conteo de

submuestras de 5 ml tomadas del vaso de decantación. La suma de las dos fracciones dio el número total de huevos de cada puesta. El porcentaje de eclosión se determinó por conteo de las larvas nacidas en los incubadores experimentales. De cada puesta se tomaron 50 huevos para la medida del diámetro y la determinación del número de gotas de grasa.

El índice de fecundidad relativa (nº de huevos/kg de hembra) se determinó sumando los huevos de todas las puestas y dividiéndolo por el peso total de las hembras de cada tanque que se había determinado individualmente al inicio del experimento.

Se tomaron submuestras de las distintas puestas que fueron lavadas con agua destilada, congeladas a -30°C y liofilizadas para su posterior análisis.

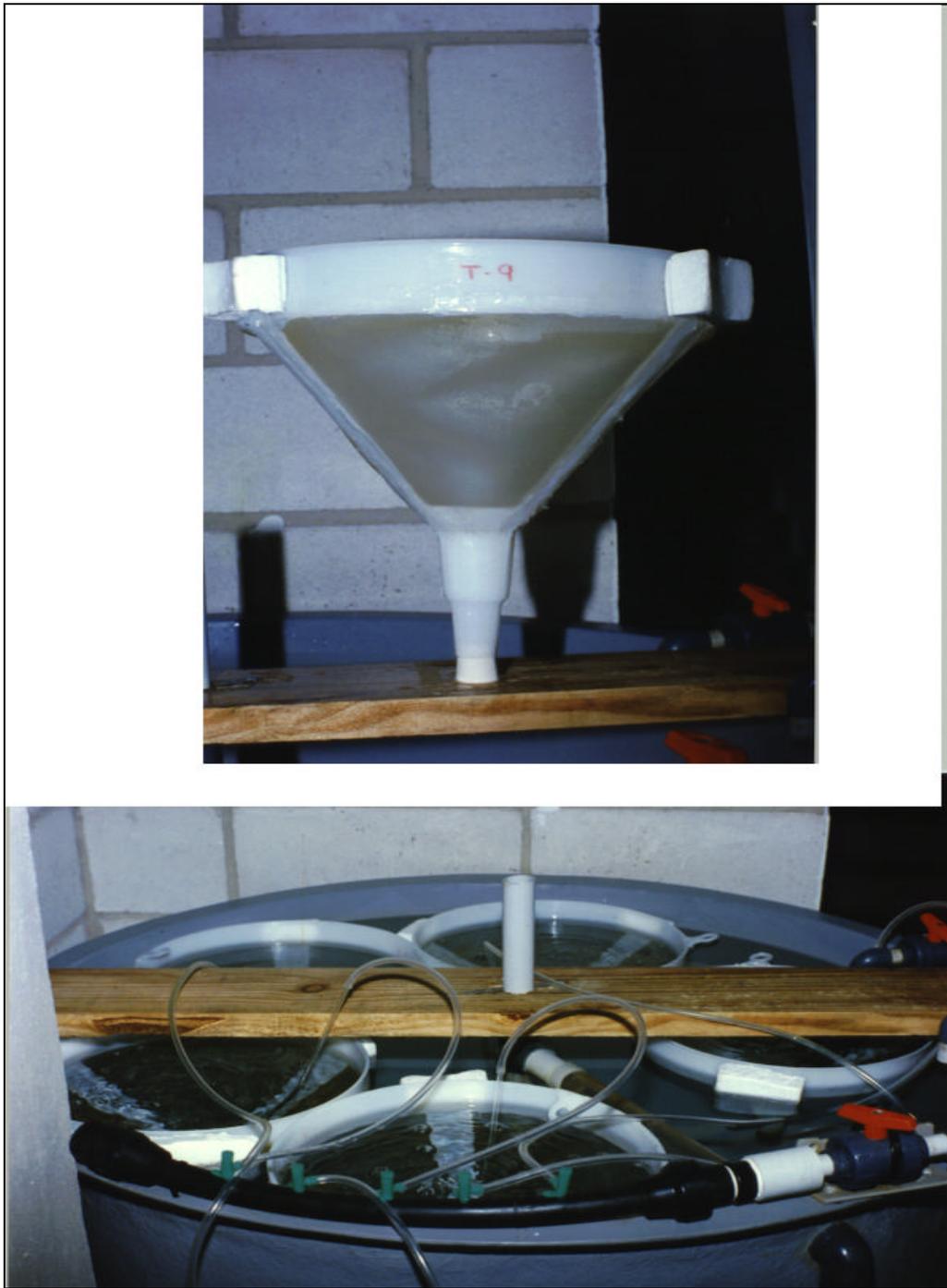


Figura 12. Incubadores experimentales

3.4. CULTIVO LARVARIO

* El primer año se realizó en recipientes de plástico de 30 l de capacidad (Fig.13) con tres réplicas por cada tanque de reproductores. La densidad inicial fue de 100 larvas/l. El agua fue filtrada por 1 μ y se mantuvo a $20\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, y el oxígeno disuelto osciló alrededor de 6.5 mg/l. La alimentación fue a base de rotífero enriquecido a razón de 5-10/ml; diariamente se añadió fitoplancton al tanque.

Cada 5 días se tomó la talla de las larvas y a los 30 días se dió por terminado el cultivo larvario y se determinó el peso final y la supervivencia.

* El segundo año el cultivo larvario se llevó a cabo en tanques cilíndricos de fibra de vidrio de 1 m³ (Fig.14) a una densidad inicial de 100 larvas/l. El agua fue filtrada por 1 μ y se mantuvo a $20\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, el oxígeno disuelto osciló alrededor de 6.5 mg/l., y la salinidad fue de 36‰. El agua se renovó a razón de 1/3 del volumen del tanque desde al día 4^o al 35^o. La alimentación fue a base de rotífero enriquecido a razón de 5-10/ml; diariamente se añadió fitoplancton al tanque.

Cada 5 días se midió la talla de las larvas y a los 35 días se dio por terminado el cultivo larvario determinándose el peso final y la supervivencia.



Figura 13. Tanques de 30 l para cultivo larvario

Figura 14. Tanques de 1 m³ para cultivo larvario

3.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Los análisis del contenido en ácidos grasos de los huevos y larvas procedentes de los cuatro lotes de reproductores fueron realizados por el Artemia Reference Center (ARC) de la Universidad de Gante en Bélgica.

La extracción de los lípidos totales se llevó a cabo según el método de Folch (Christie, 1982) usando una mezcla de cloroformo/metanol (2/1, v/v). La composición de ácidos grasos en los lípidos totales se determinó siguiendo la siguiente metodología: los ácidos grasos se transesterificaron usando una mezcla de cloruro de acetilo y metanol (1/20, v/v). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes (FAME) se determinaron por cromatografía de gases (mod. Carlo Erba Mega 5160 equipado con columna capilar de 25 m de longitud y 0.32 mm d.i y detector de ionización de llama). La columna (BPX 70, muy polar, SGE Australia) contenía como fase estacionaria cianopropil siloxano 70%. Como gas portador se empleó nitrógeno (30 kPa) con un flujo de 2 ml. min⁻¹. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: de 110°C a 150°C a 10°C min⁻¹, de 150°C a 168°C a 3°C min⁻¹, y de 168°C a 178°C a 0.5°C min⁻¹. Para la cuantificación se utilizó un integrador-plotter calibrado (Spectra Physics SP 4290) y los picos fueron identificados usando patrones de referencia de los ésteres de metilo de los ácidos grasos más comunes (Nu-Check-Prep. MN-USA).

Al terminar la época de puesta en el experimento de 1992 se tomaron muestras de hígado, gónada y músculo de 4 hembras de cada lote que fueron igualmente liofilizadas y analizadas para determinar el contenido en ácidos grasos.

Las muestras de músculo e hígado de los reproductores fueron congeladas

a -30°C y liofilizadas.

Los análisis de los contenidos en proteína y grasa fueron realizados en el Centro Oceanográfico de Murcia por el método Kjeldahl y por el de extracción con éter etílico Soxtec System respectivamente.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

La variabilidad de los datos se expresó como la desviación estándar (SD) de la media, indicando el número de muestras.

Se compararon estadísticamente las características de las puestas (tasas de fecundación y eclosión de los huevos), la composición en ácidos grasos de las puestas obtenidas de los distintos lotes, la composición en ácidos grasos del hígado, músculo y gónada de los reproductores de los distintos lotes, y los datos sobre composición corporal de los reproductores una vez realizada la puesta.

Para comprobar la parametricidad de las variables se estudió la normalidad de la distribución de frecuencias mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos paramétricos se compararon con el análisis de la varianza ANOVA y el test de rangos múltiples. Parar comparar los datos no paramétricos se utilizó el test de rangos de Kruskall-Wallis. Las diferencias estadísticas fueron comprobadas para una $p < 0.05$.

Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS, Versión 3.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1. 1992

4.1.1. Puestas

Las puestas comenzaron en todos los tanques en Diciembre y Enero, dos meses después del inicio de la alimentación experimental. En la Fig.15 se puede ver el alimento consumido por cada lote de reproductores expresado como medias mensuales de la tasa diaria de alimentación en porcentaje de peso vivo.

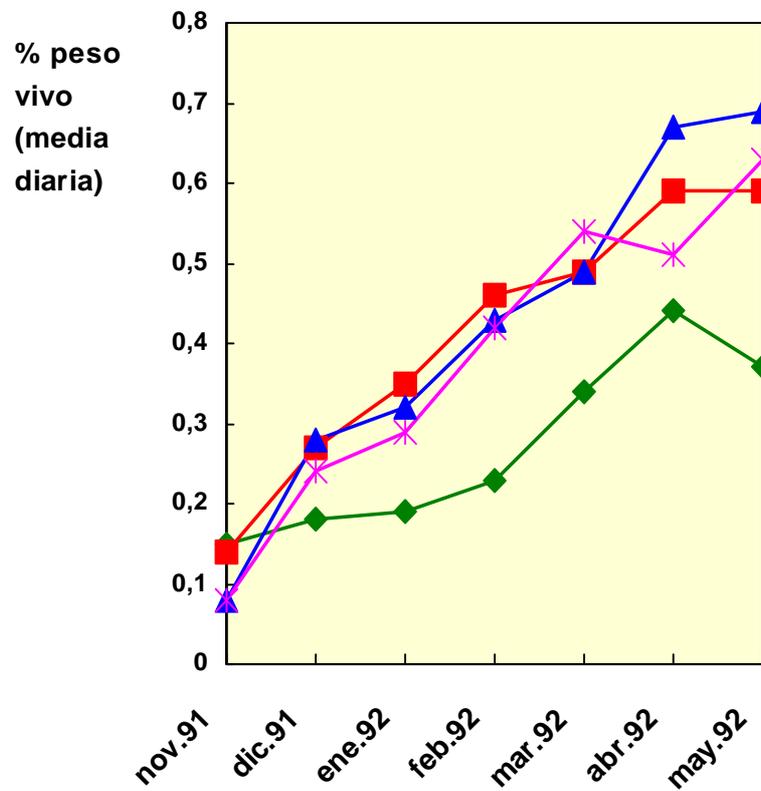


Figura 15. Alimento consumido por cada lote de reproductores.

La duración de las puestas, la cantidad de huevos e índice de fecundidad (n° de huevos/Kg. de &), y los índices de fecundación y eclosión se dan en la Fig.16 y en la Tabla V. Aparecen diferencias altamente significativas en los cuatro lotes de reproductores en cuanto a periodo de duración de las puestas, cantidad total de huevos obtenidos e índices de fecundidad.

Tabla V. Puestas de los 4 lotes de reproductores (valores medios \pm S.D.)

	Nºtotal de huevos x 1 000	Indice de fecundidad (n° huevos/kg.&) x 1 000	Tasa de fecundación (% huevos flotantes)	Eclosión (%)
A2	11 930	249.6	60.29 \pm 25.56 ^a	58.74 \pm 30.37 ^a
A3	3 424	62.6	72.51 \pm 24.68 ^b	48.07 \pm 23.82 ^{ab}
A4	9 078	175.6	49.67 \pm 30.50 ^c	38.12 \pm 25.56 ^{bc}
A5	11 324	228.8	58.09 \pm 31.09 ^{ac}	24.61 \pm 21.11 ^c

En cuanto a características de los puestas (Tabla VI), se determinaron los porcentajes de huevos con más de una gota de grasa lo que indica algún tipo de deficiencia: el menor porcentaje correspondió al lote A2 con un 9.3% seguido del A5 con 13.6%, A3 con 17.2% y A4 con 18%. Los diámetros de los huevos fueron similares en todos los lotes oscilando desde 987 μ en el A5 hasta 1 016 μ en el A2.

4.1.2. Cultivo larvario

Tabla VI. Características de las puestas y larvas de los 4 lotes de reproductores.

	% de huevos + de 1 gota de grasa	Supervivencia larvaria (%) (día 35º)	Talla de las larvas (mm) (día 35º)	Peso de las larvas (mg) (día 35º)
A2	9.3	9.5	7.6	2.5
A3	17.2	2.2	8.6	4.2
A4	18	9.8	7.6	2.6
A5	13.6	3.8	8.5	4.3

Los mejores valores de supervivencia aparecen en el lote de pescado fresco y en el pienso suplementado con aceite de coco; estos lotes presentan los peores resultados de crecimiento tanto en peso como en talla.

4.1.3. Composición en ácidos grasos

La composición en ácidos grasos de las 4 dietas y de las puestas correspondientes se dan en las Tablas VII y VIII.

Tabla VII. Composición en ácidos grasos de las 4 dietas experimentales (mg/g de peso seco).

Acido graso	Pescado	Pienso	Pienso + Ac.coco	Pienso + EPA-DHA
14:0	8.3	5.9	9.9	5.8
14:1	0.6	0.3	0.2	0.2
15:0	1.8	0.7	0.6	0.6
15:1	0.6	0.3	0.2	0.2
14:2	0.2	-	-	0.1
				16:0
29.8	23.0	22.1	20.7	
16:1n7	8.4	7.0	6.3	6.8
17:0	2.7	0.8	0.7	0.9
16:2	0.1	-	0.1	0.2
16:3	2.7	2.1	1.5	1.7
17:1	0.4	0.4	-	0.1
18:0	8.9	8.5	6.9	6.4
18:1n7				
18:1n9 A	21.2	21.2	21.2	20.1
19:0	0.5	0.3	0.3	0.3
18:2n6	2.9	6.7	7.4	7.2
19:4	0.3	0.2	0.3	0.3
18:3n6	1.5	1.5	0.9	0.9
20:0	1.2	0.4	0.1	0.2
18:3n3	1.8	1.3	1.5	1.3
20:1n9	1.5	2.2	2.2	2.4
18:4n3	3.2	2.0	2.1	2.4
20:3n6	-	-	0.1	0.1
20:4n6	1.7	0.8	0.8	0.9
22:1	0.4	1.3	1.5	1.6
21:5	1.1	0.6	0.7	0.8
20:5n3	10.7	11.6	10.7	14.3
22:4n6	0.3	0.4	0.4	1.2
24:0	-	-	-	-
24:1n9	1.9	0.7	0.5	0.9
22:5n3	2.6	1.9	1.6	3.3
22:6n3	24.7	11.8	8.1	21.8
3HUFA n3				
\$20:3n3	38.0	25.3	20.3	39.4

Tabla VII (cont.). Entre paréntesis se dan los porcentajes del total de ácidos grasos.

Saturados	53.2 (39.7)	39.6 (35.7)	40.6 (38.2)	34.9 (28.9)
Monoinsaturados	35.0 (25.4)	33.4 (30.1)	32.1 (30.2)	32.3 (26.8)
n-3	43.0 (31.3)	28.6 (25.8)	24 (22.6)	43.1 (35.7)
n-6	6.4 (4.7)	9.4 (8.5)	9.6 (9.0)	10.3 (8.5)
n-9	22.7	23.4	23.4	22.5
n-3/n-6	6.7	3.0	2.5	4.2
DHA/EPA	2.30	1.02	0.76	1.52
Sat/Insat	0.62	0.59	0.59	0.39
3HUFA n3	38.0	25.3	20.3	39.4

Los lípidos totales presentan un valor mínimo de 12.62% en el pienso y un máximo de 30.58% en la boga.

El componente principal de los ácidos grasos en los 4 lotes fue el ácido palmítico (16:0) con valores de 29.8 mg/g de peso seco en la boga, 23.0 en el pienso, 22.9 en el pienso + aceite de coco, y 21.0 en el pienso + EPA-DHA. Los ácidos grasos monoinsaturados, 16:1n7, 18:1n9, y 18:1n7, presentaron concentraciones similares en los 4 tipos de alimentación.

El ácido linoleico, 18:2n6, presentó un valor mínimo, aproximadamente la mitad de los otros tres que fueron similares, en la dieta a base de boga. El araquidónico, 20:4n6, apareció sin embargo en cantidad el doble mayor en la boga que en los otros tipos que fueron similares.

Estas diferencias hacen que sobre todo los valores de las relaciones n3/n6 y DHA/EPA varíen sustancialmente de unas dietas a otras. Los valores de n3/n6 están, en las dietas artificiales, por debajo del aconsejado para alimentación de reproductores que es 5. El valor óptimo para la relación DHA/EPA, que es 2, solo se consigue en la dieta a base de pescado fresco.

Tabla VIII. Composición en ácidos grasos de los huevos obtenidos de los 4 lotes de reproductores (mg/g de peso seco) (medias±SD de 2 muestras).

Acido graso	Pescado	Pienso	Pienso +Ac.coco	Pienso +EPA-DHA
14:0	3.90±0.28	3.60±0.42	5.30±0.85	4.10±0.00
14:1	0.30±0.00	0.20± 0.00	0.20±0.00	0.20±0.00
15:0	0.75±0.07	0.70± 0.00	0.8±0.14	0.60±0.14
15:1	0.30±0.00	0.30± 0.14	0.30±0.00	0.40±0.14
14:2	0.75±0.49	1.00± 0.85	1.10±0.99	0.80±0.42
16:0	26.75±0.35	28.70±2.69	32.00±1.41	28.40±0.99
16:1n7	9.60±2.55	10.10±1.84	11.10±3.39	10.40±2.83
17:0	0.90±0.14	0.70±0.14	0.85±0.14	0.70±0.14
16:2	0.15±0.07	0.10±0.14	0.20±0.00	0.20±0.00
16:3	1.35±0.07	1.30±0.00	1.35±0.42	1.10±0.14
17:1	3.25±4.31	3.90±5.37	3.90±5.37	3.20±5.66
18:0	5.35±0.35	7.80±1.56	8.50±2.12	7.10±1.56
18:1n7				
18:1n9 A	27.95±1.48	32.00±0.71	34.65±3.68	30.20±0.14
19:0	0.45±0.35	0.40±0.42	0.30±0.28	0.40±0.14
18:2n6	5.30±0.28	6.90±0.42	9.20±0.28	8.30±0.42
19:4	-	0.10±0.00	-	0.10±0.14
18:3n6	1.85±1.77	2.70±3.39	2.40±3.11	1.90±2.40
20:0	0.20±0.00	-	0.20±0.00	0.10±0.00
18:3n3	1.65±1.06	1.80±0.99	2.60±2.26	2.50±1.56
20:1n9	0.70±0.00	0.50±0.14	0.80±0.28	1.00±0.57
18:4n3	1.05±0.49	0.90±0.57	1.00±0.00	0.90±0.14
20:3n6	0.45±0.21	0.30±0.00	0.60±0.14	0.40±0.14
20:4n6	1.55±0.07	1.30±0.28	1.40±0.00	1.20±0.00
22:1	-	-	0.10±0.28	0.10±0.28
21:5	0.65±0.07	0.70±0.14	0.90±0.00	0.80±0.14
20:5n3	7.15±0.07	7.10±1.84	8.90±0.14	8.90±0.42
22:4n6	0.20±0.00	0.40±1.14	0.30±0.00	0.40±0.14
24:0	-	-	-	-
24:1n9	0.80±0.00	0.70±1.14	0.40±0.42	0.70±0.00
22:5n3	2.50±0.28	2.60±0.42	3.10±0.42	3.00±0.42
22:6n3	35.85±0.35	36.90±4.10	36.70±2.40	33.00±0.00
3HUFA n3				
\$20:3n3	45.50±0.71	46.60±6.22	48.90±1.98	47.40±4.53
Lípidos totales %	30.17±1.75	26.14±1.09	29.25±0.21	24.18±1.03

Tabla VIII (cont.). Entre paréntesis se dan los porcentajes del total de ácidos grasos.

Saturados	38.3 ^a (27.6)	41.9 (27.8)	47.9 ^b (28.9)	41.4 (28.0)
Monoinsaturados	42.9 ^a (30.9)	47.7 (31.7)	51.4 ^b (31.1)	46.2 (31.2)
n-3	48.2 (34.7)	49.3 (32.8)	52.3 (31.6)	48.3 (32.6)
n-6	9.4 (6.8)	11.6 (7.7)	13.9 (8.4)	12.2 (8.2)
n-9	29.5 ^a	33.2	35.8 ^b	31.9
n-3/n-6	5.16	4.25	3.76	3.96
DHA/EPA	5.01	5.20	4.12	3.70
Sat/Insat	0.37	0.36	0.40	0.38
3HUFA n3	45.50	46.60	48.90	47.40

Los ácidos grasos mayoritarios en los huevos son el 16:0, 18:1n9, y 22:6n3, seguidos del 16:1n7, independientemente de la dieta utilizada.

La presencia de grandes cantidades de 22:6n3 en los huevos indica el importante papel de este ácido graso en la formación de las membranas durante la organogénesis de embriones y larvas. Las cantidades se igualan en los 4 lotes.

Las cantidades totales de HUFA n3 y los lípidos totales también aumentan en relación a las de la dieta y se igualan en los 4 lotes. Según se puede apreciar en la Tabla VIII las diferencias significativas aparecen únicamente entre las puestas procedentes de reproductores alimentados con pescado fresco y con pienso enriquecido con aceite de coco. Como cabe esperar tratándose de aceites vegetales, esta dieta produce huevos con mayores cantidades de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y de la serie n9.

4.1.4. Composición en ácidos grasos de diferentes órganos

La composición en ácidos grasos del hígado, músculo y gónada de los reproductores de los distintos lotes se da en la Tabla IX.

Tabla IXa. Composición de ácidos grasos del hígado, músculo y gónada de los reproductores alimentados con pescado (mg/g de peso seco) (media±SD de cuatro muestras).

Acido graso	A2		
	H	M	G
14:0	13.3±6.3	9.8±2.4	12.2±5.6
14:1	0.8±0.3	0.7±0.1	0.9±0.2
15:0	2.1±0.8	1.4±0.4	2.6±0.3
15:1	0.6±0.4	0.5±0.3	1.2±0.6
14:2	0.1±0.1	0.3±0.3	0.7±0.6
16:0	56.5±22.6	38.9±7.2	57.7±15.6
16:1n7	25.7±12.0	19.3±2.1	25.0±9.2
17:0	3.7±1.7	1.7±0.6	3.3±1.6
16:2	0.4±0.1	0.8±0.6	0.4±0.2
16:3	2.6±0.8	2.2±0.6	3.1±0.8
17:1	-	-	-
18:0	13.4±4.6	8.3±2.0	12.0±3.0
18:1n9	58.2±25.5	45.9±5.8	46.7±15.2
18:1n7	9.8±4.6	6.4±1.7	9.1±3.7
19:0	0.5±0.1	0.6±0.2	0.4±0.1
18:2n6	11.9±10.7	9.5±2.0	5.5±2.2
19:4	0.6±0.2	0.8±0.4	0.7±0.3
18:3n6	0.4±0.1	0.2±0.2	1.8±0.6
18:3n3	3.7±1.7	2.3±0.9	3.2±1.3
20:0	0.07±0.1	-	-
20:1n9	2.6±1.9	3.3±0.4	2.2±1.1
18:4n3	3.2±1.7	2.5±1.0	3.3±2.2
20:3n6	0.3±0.3	0.3±0.2	0.1±0.1
20:4n6	3.4±1.3	2.0±0.8	4.0±1.8
22:1	0.5±0.5	1.4±1.2	0.4±0.1
21:5	2.8±1.5	1.7±0.5	2.5±1.6
20:5n3	14.0±5.7	11.3±3.6	17.1±7.8
22:4n6	1.3±0.7	1.0±0.4	1.3±1.5
24:0	-	-	-
24:1n9	1.9±0.2	2.0±0.6	2.6±1.1
22:5n3	9.1±4.4	6.2±1.5	8.3±5.2
22:6n3	48.7±13.5	27.6±12.5	64.6±41.0
3HUFA n3			
\$20:3n3		71.8±23.6	45.2±17.6
			90.0±50.9
Lípidos			

Tabla IXa (cont.). Entre paréntesis se dan los porcentajes del total de ácidos grasos.

Saturados	89.6 (31.4)	60.7 (29.9)	88.2 (30.9)
Monoinsaturados	100.1(35.0)	79.5 (39.1)	88.1 (30.8)
n-3	78.7 (27.5)	49.9 (24.6)	96.5 (33.8)
n-6	17.3 (6.05)	13 (6.4)	12.7 (4.4)
n-9	62.7	51.2	51.5
n-3/n-6	4.56	3.84	7.6
DHA/EPA	3.48	2.44	3.78
Sat/Insat	0.44	0.41	0.43
3HUFA n3	71.8	45.2	90.0

Tabla IXb. Composición de ácidos grasos del hígado, músculo y gónada de los reproductores alimentados con pienso (mg/g de peso seco) (media±SD de cuatro muestras).

Acido graso	A3		
	H	M	G
14:0	14.3±2.2	9.3±1.3	4.8±0.9
14:1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.2±0
15:0	0.9±0.3	0.9±0.2	0.6±0.2
15:1	0.5±0.1	0.2±0.1	0.4±0.2
14:2	-	0.1±0.1	0.3±0.1
16:0	70.9±8.8	42.6±10.7	20.6±9.1
16:1n7	29.0±2.4	20.5±3.2	9.1±2.0
17:0	1.7±0.1	1.2±0.1	0.7±0
16:2	0.4±0.3	0.2±0.1	0.2±0
16:3	2.3±0.4	1.9±0.2	0.8±0.1
17:1	-	-	-
18:0	21.6±3.0	10.4±2.1	7.2±1.6
18:1n9	63.0±11.8	31.5±9.9	
18:1n7	143.8±30.0	6.9±1.7	3.7±0.8
19:0	1.7±0.4	0.6±0.4	0.4±0.1
18:2n6	19.9±2.3	12.4±0.9	7.0±1.8
19:4	1.6±0.3	0.4±0.3	0.2±0.1
18:3n6	0.5±0	0.3±0.1	0.4±0.2
18:3n3	2.7±0.3	1.9±0.4	1.0±0.2
20:0	0.4±0.3	0.1±0.2	-
20:1n9	5.5±1.4	3.9±0.3	1.5±0.5
18:4n3	2.3±0.6	2.1±0.2	1.0±0.3
20:3n6	0.6±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1
20:4n6	2.7±0.6	1.7±0.3	1.6±0.1
22:1	1.8±0.2	1.7±0.3	0.7±0.2
21:5	2.6±0.2	1.5±0.2	0.8±0.2
20:5n3	17.4±2.1	10.7±2.3	7.7±1.0
22:4n6	1.3±0.1	0.9±0.1	0.4±0.1
24:0	-	-	-
24:1n9	2.9±0.5	1.7±0.3	1.1±0.3
22:5n3	8.6±1.0	5.5±0.3	2.8±0.5
22:6n3	30.1±7.3	19.5±1.8	11.8±1.9
3HUFA n3			
\$20:3n3	56.0±10.3	35.7±3.8	22.3±0.5
Lípidos			

Tabla IXb (cont.). Entre paréntesis se dan los porcentajes del total de ácidos grasos.

Saturados	111.5 (29.2)	64.8 (29.7)	34.3 (29.5)
Monoinsaturados	183.9 (48.2)	98.4 (45)	48.2 (41.4)
n-3	61.1 (16)	39.7 (18.2)	24.3 (20.9)
n-6	25 (6.6)	15.6 (7.1)	9.6 (8.2)
n-9	8.4	68.6	34.1
n-3/n-6	2.44	2.54	2.53
DHA/EPA	1.73	1.82	1.53
Sat/Insat	0.40	0.41	0.41
3HUFA n3	56.0	35.7	22.3

Tabla IXc. Composición de ácidos grasos del hígado, músculo y gónada de los reproductores alimentados con pienso + aceite de coco (mg/g de peso seco) (media±SD de cuatro muestras).

Acido graso	A4		
	H	M	G
14:0	22.5±7.4	8.6±3.9	9.1±5.1
14:1	0.5±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1
15:0	1.0±0.3	0.8±0.4	0.8±0.4
15:1	0.5±0.1	0.3±0.1	0.5±0.1
14:2	0.4±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1
16:0	91.4±18.1	34.7±15.0	36.3±18.0
16:1n7	34.8±11.2	15.6±6.7	14.1±8.7
17:0	1.4±0.8	0.9±0.4	0.8±.5
16:2	0.5±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1
16:3	2.6±1.0	1.3±0.7	1.3±0.8
17:1	0.1±0.1	0.2±0.1	-
18:0	28.0±5.5	7.8±2.8	9.2±4
18:1n9			
18:1n7	172.9±53.8	52.4±21.1	52.3±28.6
19:0	0.4±0.1	0.6±0.2	0.9±0.5
18:2n6	21.0±7.1	10.9±4.8	10.9±6.2
19:4	1.1±0.4	0.5±0.2	0.6±0.3
18:3n6	0.3±0.0	0.2±0.1	0.2±0.2
18:3n3	3.0±1.1	1.5±0.8	1.6±0.9
20:0	0.7±0.4	0.3±0.2	0.2±0.2
20:1n9	6.0±2.0	2.9±1.2	2.3±1.8
18:4n3	2.0±1.3	1.5±1.1	1.8±1.2
20:3n6	0.5±0.3	0.3±0.1	0.3±0.2
20:4n6	3.0±0.8	1.6±0.7	1.8±0.3
22:1	1.9±0.7	1.4±0.7	1.2±0.8
21:5	2.8±1.2	1.4±0.7	1.3±0.8
20:5n3	17.5±4.5	9.3±4.4	9.9±4.9
22:4n6	1.4±0.5	0.8±0.4	0.8±0.4
24:0	-	-	-
24:1n9	2.7±1.2	0.9±0.4	0.8±0.4
22:5n3	9.4±3.5	5.1±2.3	4.8±2.9
22:6n3	30.6±5.3	18.6±7.9	18.2±9.3
3HUFA n3			
\$20:3n3	57.5±13.3	33.0±14.6	33.0±17.1
Lípidos totales %	55.20±12.57	28.34±4.99	31.95±19.30

Tabla IXc (cont.). Entre paréntesis se dan los porcentajes del total de ácidos grasos.

Saturados	145.4 (32.1)	53.7 (30.3)	57.3 (32)
Monoinsaturados	219.4 (48.4)	74 (41.7)	71.5 (40)
n-3	62.5 (13.8)	36 (20.3)	36.3 (20.3)
n-6	26.2 (5.8)	13.8 (7.8)	14 (7.8)
n-9	8.7	3.8	3.1
n-3/n-6	2.39	2.61	2.59
DHA/EPA	1.75	2	1.84
Sat/Insat	0.46	0.42	0.46
3HUFA n3	57.5	33.0	33.0

Tabla IXd. Composición de ácidos grasos del hígado, músculo y gónada de los reproductores alimentados con pienso + EPA-DHA (mg/g de peso seco) (media±SD de cuatro muestras).

Acido graso	A5		
	H	M	G
14:0	15.2±6.1	9.1±0.5	9.0±2.9
14:1	0.5±0.2	0.4±0.1	0.3±0.1
15:0	0.9±0.2	0.8±0.1	0.8±0.2
15:1	0.3±0.2	0.2±0	0.5±0.1
14:2	0.6±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1
16:0	81.9±31.6	43.4±2.7	47.4±10.7
16:1n7	27.9±10.5	19.2±0.8	17.0±3.8
17:0	1.6±0.4	1.0±0.1	1.1±0.3
16:2	0.5±0.2	0.3±0.1	0.3±0.2
16:3	2.0±0.3	1.6±0.2	1.8±0.3
17:1	0.2±0.2	0.1±0.1	0.1±0.1
18:0	28.3±12.5	10.8±1.1	12.9±4.0
18:1n9	64.1±3.9		
18:1n7	149.9±72.0	7.3±0.6	67.1±19.2
19:0	1.1±0.5	1.0±0.2	1.1±0.4
18:2n6	18.2±6.2	15.1±0.5	13.7±3.9
19:4	1.1±0.6	0.5±0.2	0.4±0.3
18:3n6	0.4±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1
18:3n3	2.3±0.9	2.1±0.3	2.6±1.0
20:0	0.4±0.1	0.3±0.1	0.3±0.0
20:1n9	6.6±2.1	3.4±1.5	3.4±1.6
18:4n3	1.8±0.6	1.9±0.7	1.9±0.5
20:3n6	0.4±0.2	0.3±0.1	0.3±0.1
20:4n6	2.8±0.8	1.6±0.1	2.1±0.9
22:1	2.4±0.4	2.0±0.1	1.8±1.0
21:5	1.9±0.7	1.5±0.3	1.6±0.5
20:5n3	15.1±4.8	12.2±1.9	14.9±3.4
22:4n6	1.3±0.6	1.0±0.1	1.1±0.3
24:0	-	-	-
24:1n9	2.8±0.5	1.3±0.5	1.8±0.8
22:5n3	9.7±3.6	6.8±0.8	7.4±2.1
22:6n3	36.5±8.7	25.1±3.4	36.5±12.7
3HUFA n3			
\$20:3n3	61.4±17.0	44.2±6.1	58.8±15.7

Tabla IXd (cont.). Entre paréntesis se dan los porcentajes del total de ácidos grasos.

Saturados	129.4 (31.7)	66.4 (28.8)	63.6 (26.9)
Monoinsaturados	190.6 (46.7)	98 (42.5)	92 (38.9)
n-3	65.4 (16)	48.1 (20.8)	63.3 (26.8)
n-6	23.1 (5.7)	18.3 (7.9)	17.5 (7.4)
n-9	9.4	68.8	5.2
n-3/n-6	2.83	2.63	3.62
DHA/EPA	2.42	2.06	2.45
Sat/Insat	0.45	0.39	0.36
3HUFA n3	61.4	44.2	58.8

Los lípidos totales se acumulan mayoritariamente en el hígado y son independientes del tipo de dieta. Sin embargo los n3 HUFA, y en especial el 22:6n3, se acumula dependiendo significativamente del tipo de dieta. La Tabla X da los valores de los lípidos totales en el hígado, músculo, gónada y huevos muestreados de los 4 lotes de reproductores, así como el análisis de la varianza y el de rango múltiple.

Tabla X. Contenido en lípidos totales (%) en hígado, músculo y gónada de las hembras de cada lote de reproductores (medias±SD de 4 muestras) comparado con el de los huevos.

Lip. Totales	A2	A3	A4	A5
Hígado	48.18±17.70	56.87±5.83	55.20±12.57	59.68±10.65
Músculo	29.58±2.99	26.00±1.08	28.34±4.99	32.18±9.40
Gónada	42.00±19.10	19.35±2.99	31.95±19.30	38.25±7.97
Huevos	30.17±1.75	26.14±1.09	29.25±0.21	24.18±1.03

Análisis de la varianza

FUENTE DE VARIACIÓN	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
ENTRE DIETAS	448.3424	3	149.4475	0.993	0.4082
ENTRE ORGANOS	5100.1722	2	2550.0861	16.994	0.0000
RESIDUAL	4966.5092	33	150.50028		

Análisis de rango múltiple

Dieta	Nº	Media	Grupos homogéneos
A3	9	34.0744	*
A4	9	38.5000	*
A2	9	39.9278	*
A5	9	43.3133	*

Organo	Nº	Media	Grupos homogéneos
músculo	13	29.2662	*
gónada	13	33.3092	*
hígado	13	55.2923	*

La Tabla XI da los valores de la suma de HUFA n3 en el hígado, músculo, gónada y huevos muestreados de los 4 lotes de reproductores, así como el análisis de la varianza y el de rango múltiple.

Tabla XI. Contenido en 3HUFA n3 (mg/g) en hígado, músculo y gónada de las hembras de cada lote de reproductores (medias±SD de 4 muestras) comparado con el de los huevos.

3HUFA n3	A2	A3	A4	A5
Hígado	71.8±23.6	56.0±10.3	57.5±13.3	61.4±17.0
Músculo	45.2±17.6	35.7±3.8	33.0±14.6	44.2±6.1
Gónada	90.0±50.9	22.3±0.5	33.0±17.1	58.8±15.7
Huevos	45.50±0.71	46.60±6.22	48.90±1.98	47.40±4.53

Análisis de la varianza

FUENTE DE VARIACIÓN	S.C.	g.l.	C.M.	F	p
ENTRE DIETAS	5464.4231	3	1821.4744	3.976	0.0160
ENTRE ORGANOS	3080.4251	2	1540.2160	3.362	0.0469
RESIDUAL	15117.522	33	458.10671		

Análisis de rango múltiple

Dieta	Nº	Media	Grupos homogéneos
A3	9	38.0444	*
A4	9	41.1778	*
A2	9	54.8000	**
A5	9	68.9889	*
Organo			
músculo	13	39.5887	*
gónada	13	51.3348	**
hígado	13	61.3348	*

4.2. EXPERIMENTO 2. 1993**4.2.1. Puestas**

Las puestas comenzaron en todos los tanques en Diciembre y Enero, dos meses después del inicio de la alimentación experimental. En la Fig.17 se puede ver el alimento consumido por cada lote de reproductores expresado como medias mensuales de la tasa diaria de alimentación en porcentaje de peso vivo.

La duración de las puestas, la cantidad de huevos e índice de fecundidad (nº de huevos/Kg. de &), y los índices de fecundación y eclosión se dan en la Fig. 18 y en la Tabla XII. Aparecen diferencias altamente significativas en los cuatro lotes de reproductores en cuanto a periodo de duración de las puestas, cantidad total de huevos obtenidos, e índices de fecundidad.

Tabla XII. Puestas de los 4 lotes de reproductores (valores medios \pm S.D.). Los distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

	Nºtotal de huevos x 1 000	Indice de fecundidad (nºhuevos/kg.&) x 1 000	Tasa de fecundación (% huevos flotantes)	Eclosión (%)
A1	34 130	694.2	42.94 \pm 25.60 ^a	69.25 \pm 20.02 _a
A3	5 430	105.3	68.36 \pm 25.98 ^b	80.83 \pm 22.83 _a
A4	7 540	141.8	64.01 \pm 29.49 ^b	63.30 \pm 25.04 _a
A6	6 540	126.5	62.30 \pm 27.65 ^b	10.59 \pm 25.6 ^b

La tasa de fecundación, considerada como el porcentaje de huevos flotantes, presenta diferencias significativas entre los reproductores alimentados con pescado que dan los peores resultados y los otros 3 lotes. El porcentaje de eclosión da el valor más bajo, con diferencia con respecto a los demás, en el lote alimentado con pienso rico en DHA-EPA.

4.2.2. Cultivo larvario

Los resultados del cultivo larvario en cuanto a supervivencia, talla, y peso de las larvas a los 35 días de vida, presentaron grandes variaciones entre los lotes que, sin embargo no parecen estar relacionadas con las dietas de los reproductores.

Tabla XV. Resultados del cultivo larvario de los 4 lotes de reproductores.

	Supervivencia larvaria (%) (día 35º)	Talla de las larvas (mm) (día 35º)	Peso de las larvas (mg) (día 35º)
A1	2.1	8.7	5.4

A3	1.2	10.7	9.9
A4	1.2	8.6	4.8
A6	1.5	10.1	7.8

Aunque en este segundo año se aplicó la técnica estándar del cultivo larvario en tanques de 1 m³ de capacidad, los resultados presentaron también una gran variabilidad. Las supervivencias en todos los casos fueron demasiado bajas y no parece haber una relación con los distintos tratamientos de los reproductores.

4.2.3. Composición en ácidos grasos

La composición en ácidos grasos de las puestas correspondientes a los 4 lotes de reproductores se dan en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Composición en ácidos grasos de los huevos obtenidos de los 4 lotes de reproductores (mg/g de peso seco) (media±SD de 3 muestras).

Acido graso	A1	A3	A4	A6
14:0	5.90±0.53	3.83±0.33	4.27±1.00	3.73±0.26
14:1n-5	0.40±0.07	0.20±0.00	0.17±0.09	0.10±0.00
15:0	1.13±0.11	0.50±0.08	0.57±0.09	0.40±0.08
15:1n-5	0.23±0.05	0.29±0.16	0.33±0.05	0.27±0.05
14:2	-	-	-	-
16:0	31.53±6.61	28.23± 1.83	32.93±6.41	31.60±1.77
16:1n7	12.90±1.85	10.17±1.20	11.67±1.95	10.23±0.25
17:0	1.20±0.12	0.67±0.05	0.47±0.09	0.50±0.00
17:1n7	6.30±1.46	7.87±0.49	7.47±2.00	8.50±1.04
18:0	6.25±0.81	5.13±0.12	5.73±1.04	7.17±1.00
18:1n9	23.43±4.49	26.33±0.81	29.33±3.65	30.07±1.37
18:1n7	4.40±0.59	3.40±0.16	4.03±0.76	4.00±0.29
18:2n6	4.95±1.49	8.37±1.02	8.20±1.21	9.03±0.66
19:0	0.20±0.00	-	0.20±0.00	-
18:3n6	2.50±0.39	2.93±0.05	2.87±1.04	3.53±0.75
18:3n3	3.28±0.75	3.57±0.12	4.00±0.57	4.03±0.19
18:4n3	2.03±0.19	0.90±0.08	0.67±0.05	0.60±0.08
20:0	-	-	-	-
20:1n9	1.15±0.55	0.50±0.08	0.40±0.00	0.50±0.16
21:0	-	-	-	-
20:3n6	0.37±0.09	0.25±0.05	0.3±0.00	-
20:4n6	1.93±0.19	1.30±0.08	1.40±0.14	1.33±0.12
20:3n3	0.40±0.00	0.30±0.00	0.30±0.00	-
21:5	1.08±0.15	0.67±0.12	0.65±0.05	0.67±0.12
22:0	-	-	-	-
20:5n3	10.45±1.63	7.67±0.69	7.53±0.83	8.27±0.92
22:1	0.08±0.00	-	-	-
23:0	-	-	-	-
23:1	0.31±0.05	0.27±0.05	0.30±0.00	0.33±0.05
22:3n3	0.70±0.00	-	-	-
24:0	-	-	-	-
22:5n3	3.68±0.28	3.07±0.21	3.00±0.36	4.93±2.17
24:1n9	-	-	-	-
22:6n3	37.78±3.53	31.03±1.93	36.23±3.64	36.77±2.99

Tabla XIII (cont.). Entre paréntesis se dan los porcentajes del total de ácidos grasos.

Saturados	46.05 (28.4)	38.36 (26.1)	44.13 (27.2)	43.40 (26.1)
Monoinsaturados	49.10 (30.2)	49.13 (33.4)	53.47 (33.0)	53.93 (32.5)
n-3	57.58 ^a (35.4)	46.43 ^b (31.6)	51.53 (31.8)	54.60 (32.8)
n-6	9.70 ^a (6.0)	13.20 ^b (9.0)	13.03 (8.0)	14.27 ^b (8.6)
n-9	24.58	26.83	29.60	30.57
n-3/n-6	6.05 ^a	3.81 ^b	3.99 ^b	3.84 ^b
DHA/EPA	3.65 ^a	4.07	4.83 ^b	4.47 ^b
Sat/Insat	0.40	0.35	0.37	0.36
3HUFA n3	52.00 ^a	37.50 ^b	46.87	43.00

Los ácidos grasos más abundantes, igual que el año anterior, fueron el 16:0, 18:1n9 y el 22:6n3 seguidos del 16:1n7 independientemente de la dieta utilizada.

Este año ya aparecen más diferencias significativas relacionadas con la dieta de los reproductores entre las distintas series de ácidos grasos de las puestas. La dieta de pescado fresco produce puestas con los valores más altos de ácidos grasos n3 y los más bajos de n6, y por consiguiente valores mucho más altos del valor n3/n6 que los otros tres lotes. También se encuentran diferencias en la relación DHA/EPA y en el total de HUFAs n3.

4.3. EXPERIMENTO 3. 1994

4.3.1. Puestas

Las puestas comenzaron en los dos tanques a principios y mediados de

Diciembre, quince días y un mes después del inicio de la alimentación experimental. En la Fig.19 se puede ver el alimento consumido por cada lote de reproductores expresado como medias mensuales de la tasa diaria de alimentación en porcentaje de peso vivo.

La duración de las puestas, la cantidad de huevos e índice de fecundidad (n° de huevos/Kg. de &), y los índices de fecundación y eclosión se dan en la Fig. 20 y en la Tabla XIV. Aparecen diferencias altamente significativas en los dos lotes de reproductores en cuanto a cantidad de huevo total obtenido e índices de fecundidad; también el porcentaje de eclosión presentó diferencias significativas ($p=0.039$) entre los dos tanques. Sin embargo, el porcentaje de huevos viables (flotantes) fue similar en los dos lotes de reproductores.

Tabla XIV. Puestas de los 2 lotes de reproductores (valores medios \pm S.D.)

	N $^{\circ}$ total de huevos x 1 000	Índice de fecundidad (n $^{\circ}$ huevos/kg.&) x 1 000	Tasa de fecundación (% huevos flotantes)	Eclosión (%)
A3	69.8	1 152.5	63.5 \pm 22.3	80.3 \pm 13.8 ^a
A4	45.3	792.0	62.3 \pm 21.5	65.7 \pm 24.0 ^b

4.3.2. Composición en ácidos grasos de las dietas

En la Tabla XV se da la composición en ácidos grasos del pienso comercial mejorado utilizado en el experimento n $^{\circ}$ 3.

Tabla XV. Composición en ácidos grasos del pienso para reproductores (mg/g de peso seco) (media±SD de 4 muestras).

Acido graso	
C14	4.53±0.12
C15	0.51±0.01
C16	20.45±0.33
C16:1	0.50±0.26
C17	0.19±0.09
C18	3.19±0.09
C18:1	18.65±0.20
C18:2	4.53±0.10
C18:3	1.96±0.08
C20:1	7.48±0.03
C18:4	
C20:2	0.60±0.02
C20:4	0.65±0.05
C22:1	5.18±0.01
C20:5	10.64±0.14
C22:4	0.39±0.01
C24:1	
C22:5	0.84±0.10
C22:6	14.60±0.13
Saturados	28.87±0.31
Monoinsaturados	36.81±0.14
n-3	28.04±0.13
n-6	6.07±0.18
n-9	31.30±0.18
n-3/n-6	4.62
DHA/EPA	1.37
Sat/Insat	0.41
3HUFA n3	26.08±0.20

4.3.3. Composición corporal de los reproductores

Los resultados de los análisis de los reproductores después de la puesta se dan en la Tabla XVI.

Tabla XVI. Resultado del muestreo de 5 individuos de cada stock de reproductores una vez realizada la puesta. El distinto superíndice en la misma columna indica diferencias significativas ($p < 0.05$)

	Talla (cm)	Peso (g)	Peso evisc. (g)	Peso hígado (g)	IHS	Sexo	%Proteína		%Grasa	
							m	h	m	h
A3	33	684	630	7,25	1,06	&	63,4	30,7	26,2	51,8
	40	1 162	1 083	14,20	1,22	%	60,2	22,8	27,0	72,9
	33,5	727	678	8,41	1,16	&	66,2	23,8	27,7	70,7
	48	1 685	1 577	20,02	1,19	&	65,3	56,0	16,2	31,7
	35	844	782	10,45	1,24	&	70,3	27,9	11,2	57,4
\bar{x}	37,9	451,4	418,4	12,07	1,17 ^a		65,08 ^a	32,24	21,66	56,9
A4	35	712	678	5,1	0,72	&	74,4	50,5	16,4	34,7
	35	858	790	9,1	1,06	&	75,9	31,4	22,1	56,0
	32	853	796	8,7	1,02	&	66,3	35,3	27,7	52,7
	38	989	912	6,8	0,69	%&	74,1	27,7	20,2	60,0
	36	826	783	6,5	0,79	%	79,0	41,2	16,6	44,0
\bar{x}	35,2	847,6	791,8	7,24	0,86 ^b		73,94 ^b	37,22	20,6	49,48

Las únicas diferencias significativas aparecen entre el porcentaje de proteína del músculo ($p=0.011$) que es mayor en los reproductores alimentados con pienso, y en el índice hepatosomático que resulta también significativamente mayor ($p=0.005$) en las doradas alimentadas con pienso.

5. DISCUSIÓN

5.1. ALIMENTACIÓN DE LOS REPRODUCTORES

La alimentación experimental comenzó dos meses antes de la época natural de puesta para asegurar la formación de las reservas en el tejido adiposo de los reproductores desde donde van a mobilizarse los ácidos grasos durante la maduración de la gónada para formar las lipoproteínas específicas del huevo. Este tiempo se considera suficiente ya que en la dorada se han observado cambios importantes en la calidad de las puestas al suministrar diferentes tipos de dietas a los reproductores en periodos de tiempo muy cortos, de 15 días, (Zohar *et al.*, 1995). También hay que tener en cuenta que aunque los lípidos de la dieta influyen muy rápidamente en la estructura de las membranas de algunas células sanguíneas (p.ej. glóbulos rojos), necesitan más tiempo, meses, para reflejarse en el tejido muscular y en la grasa perivisceral.

En la dorada japonesa Watanabe *et al.* (1984d, 1985b) demostraron la influencia en la calidad de la puesta de cambios en la dieta de los reproductores incluso durante la época de reproducción; un lote de reproductores que fue alimentado alternativamente cada tres días con unas dietas de alto y bajo valor alimenticio, mostró una correlación entre la calidad de las puestas diarias y la composición de la alimentación.

En los tres experimentos los peces comieron mucho menos de lo esperado; las tasas diarias de alimentación empezaron siendo muy bajas, alrededor del 0.1% del peso vivo, fueron aumentando a lo largo del periodo de puesta, y llegaron a unos valores máximos de 0.7-1%. Estos resultados contrastan con las tasas diarias de 1-1.5% recomendadas para reproductores de dorada por Zohar *et al.* (1995) y con las de 3-5% utilizadas por Mourente & Odriozola (1990a). Hay que hacer constar, sin embargo, que los peces mantuvieron un comportamiento normal frente a la presentación de la comida, y no presentaban agitación ni estrés ni enfermedad alguna.

A pesar del hecho de que la dorada continúa alimentándose a lo largo del periodo de puesta, Zohar *et al.* (1995) comprobaron una pérdida del 52% de los lípidos musculares y del 45% de los lípidos del tejido adiposo. Sin embargo, la mayoría de los lípidos movilizados eran ácidos grasos saturados y monoinsaturados por lo que parece claro que los HUFA deben ser aportados por la dieta. El aumento de las tasas diarias de alimentación encontradas en este trabajo desde los valores muy bajos del 0.1% hasta el 1% al final del periodo de reproducción podría explicarse por la necesidad de cubrir los requerimientos energéticos durante la larga temporada -más de cuatro meses- de puesta.

La aceptación del pienso por parte de los peces fue en todos los casos buena y comparable con la de la dieta fresca. Además, el factor de condición

(relación entre el peso y la longitud) de los ejemplares muestreados en los distintos experimentos, se mantuvo alrededor de 2, valor considerado normal en la dorada y que indica un buen estado nutricional de los peces que aparentemente no sufrieron pérdidas de peso. Esta última afirmación no está constatada con seguridad al haberse evitado la excesiva manipulación que lleva consigo el muestreo de los reproductores y que alteraría el ritmo de la puesta y la consecución del objetivo de estos experimentos que era la obtención de puestas óptimas en cantidad y calidad. Al trabajar a escala industrial con lotes de alrededor de 100 individuos, fue difícil controlar totalmente si todos los reproductores se alimentaban y en qué niveles.

5.2. PUESTAS

Las puestas comenzaron en todos los tanques en diciembre y enero, dos meses después del inicio de la alimentación experimental y coincidiendo con la época de reproducción natural en el mediterráneo (Ortega *et al.*, 1983). En la Fig. ?? Se puede ver la representación gráfica de las puestas totales en los experimentos de los distintos años.

Aunque el periodo de puesta tuvo lugar prácticamente entre las mismas fechas en todos los lotes, en los dos primeros años se observó una diferencia clara en los alimentados con dieta fresca; las puestas de estos reproductores se produjeron prácticamente con periodicidad diaria a lo largo de los tres meses centrales de la época de puesta (febrero, marzo y abril) y, en un 20% de los días, se obtuvieron por la mañana y por la tarde (a las 6:00 y a las 18:00).

El comienzo del periodo de puesta varió de unos años a otros con diferencias de 15 días a 1 mes. Como la temperatura se mantuvo constante, estas diferencias podrían haber sido debidas a cambios en el fotoperiodo

natural debidos a días con más o menos luminosidad.

En 1994 el lote con pescado fresco adelantó la puesta a principios de diciembre. Sin embargo los reproductores alimentados con pienso superaron a la dieta fresca en días de puesta -164 días frente a 156- produciéndose éstas con periodicidad diaria de enero a abril en los primeros, y de diciembre a abril en los segundos.

Los máximos en cuanto a cantidad de huevos aparecieron en todos los casos durante el mes de febrero.

Todos los años aparecen diferencias altamente significativas, según el tipo de alimentación de los reproductores, entre el número total de huevos, la duración del periodo de puesta, y el índice de fecundidad de las hembras; éste último parámetro, sin embargo, varía mucho entre los experimentos de los distintos años oscilando entre 62.000 huevos/kg de hembra hasta 1.152.000, y resultando unas cantidades totales de huevos muy diferentes de un año a otro.

La fecundidad de las hembras en los peces varía considerablemente entre individuos, aún tratándose de ejemplares de la misma población, tamaño y edad. La causa de esta variabilidad no se conoce completamente pero parece que la fecundidad puede ser influida por factores como la disponibilidad de espacio o de alimento y puede formar parte de un mecanismo de control de la población dependiente de la densidad (número de individuos/volumen). Además la fecundidad se ve afectada también por otros factores relacionados sobre todo con la cantidad y calidad del alimento. Scott (1962) demostró que si se sometían varios lotes de truchas a diferentes regímenes alimentarios, la disminución de la ración causaba una reducción, tanto en el número de hembras que realizaban la puesta como en

su fecundidad. Bagenal (1969) encontró resultados parecidos con otra especie de trucha, *Salmo trutta*. En esta misma línea están los trabajos de Horwood *et al.* (1989) con la platija, de Hislop *et al.* (1978) con el eglefino, y los recogidos en la revisión de Bromage *et al.* (1992) sobre la trucha *Oncorhynchus mykiss*.

Con una especie mediterránea como la lubina, Cerdá *et al.* (1994a) encontraron que una disminución a la mitad (0.45% del peso vivo) de la tasa diaria de alimentación en los reproductores no produjo diferencias en la fecundidad absoluta (nº de huevos/hembra) pero sí en la relativa (nº de huevos/kg de hembra). En el lote sometido a la mitad de la ración la fecundidad relativa fue más alta pero apareció un retraso en la época de puesta acompañado de un número ligeramente más alto de puestas por hembra durante periodos más largos de tiempo. La calidad de los huevos, su composición bioquímica, la tasa de eclosión, y la supervivencia de las larvas a los 46 días no se vieron afectados por la cantidad de la ración.

Por otra parte, la calidad de la alimentación de los reproductores afecta de manera importante a la fecundidad. Algunos autores han encontrado una correlación positiva entre los niveles de proteína y la fecundidad de las hembras y el diámetro de los huevos en la trucha (Smith *et al.*, 1979; Roley, 1983). En peces marinos, Watanabe *et al.* (1984a, 1985a) encontraron bajos índices de fecundidad en dorada japonesa cuando los reproductores fueron alimentados con bajos niveles de proteína o con proteínas de distinto origen y calidad.

En los dos primeros experimentos aquí descritos los mejores índices de fecundidad corresponden a los reproductores alimentados con pescado fresco, seguidos del pienso enriquecido con EPA-DHA, y los peores al pienso sin enriquecer. El tercer año, al tratarse de un pienso mejorado en

base a los resultados de los dos anteriores, los resultados se invierten y el número total de huevos y la fecundidad alcanzan los mayores valores en la dieta a base de pienso con una alta cantidad de proteína (52%). Estos resultados coinciden con los de Cerdá *et al.* (1994b) en lubina; la dieta de reproductores que tenía como componente mayoritario carne de pescado con un alto nivel proteico (51.3%) produjo diferencias significativas en la fecundidad, absoluta y relativa, de las hembras.

Los valores del índice de fecundidad están en todos los casos por debajo de los estándar para dorada, entre 1-4 millones de huevos/kg de hembra (Zohar *et al.*, 1995), excepto en el último año en los reproductores alimentados con pienso. Esta variabilidad puede ser debida a la dificultad, al trabajar con stocks de reproductores con un gran número de individuos, para distinguir las hembras que han realizado la puesta de las que no lo han hecho; los índices de fecundidad se calculan sobre los kg totales de hembras estabulados en el tanque antes del comienzo del periodo de puesta. En nuestro caso, se puede suponer que en 1994 desovaron más hembras que los dos años anteriores.

La mayor duración de las puestas correspondió, en los tres experimentos, a los peces alimentados con pescado fresco, -156, 110 y 84 días-, y a los del pienso mejorado del último año -164 días-, llegando a triplicarse los valores con respecto a las otras dietas. Los piensos enriquecidos solo dieron buenos resultados el primer año, en que llegan a valores similares a los del pescado fresco, y muy por encima del pienso sin enriquecer. El segundo año todos los piensos, tanto enriquecidos como no, dieron valores similares y muy inferiores (aproximadamente la mitad) a los del pescado fresco. Estas diferencias entre los resultados de los dos primeros años hacen pensar en un efecto positivo sobre la duración de las puestas de la vitamina C y/o de la astaxantina que solo se usaron el primer año como

componentes de la emulsión enriquecedora del pienso, y que fueron incorporadas en la mejora de la formulación del pienso de 1994. Sandnes (1984) encontró grandes cantidades de vitamina C en el ovario de peces y demostró su influencia sobre el crecimiento de la gónada y la maduración.

Por el contrario, los índices de fecundación y eclosión en las puestas aparecen siempre significativamente diferentes entre todos los lotes de reproductores, pero sin relación con el tipo de dieta; así en los dos primeros años, la tasa de fecundación, considerada como el porcentaje de huevos flotantes, presenta los valores máximos en el pienso sin enriquecer, mientras que la tasa de eclosión óptima aparece en la dieta fresca el primer año, y en el pienso sin enriquecer el segundo. En el tercer experimento el porcentaje de eclosión da valores significativamente mejores en el pienso que en el pescado fresco.

Estos resultados coinciden con los encontrados en el rodaballo por Peleteiro *et al.* (1993) donde tampoco pudo establecerse una relación clara entre el patrón de ácidos grasos de las puestas y la calidad de las mismas, y pueden ser debidos a la falta de definición de los criterios usados comúnmente para establecer la calidad de las puestas. En este trabajo se ha tomado exclusivamente la flotabilidad de los huevos 2 horas después de la puesta como criterio de fertilización o fecundación; estudios posteriores han puesto en duda la exactitud de este método ya que se presentan grandes variaciones según el tipo de incubador y el tiempo de separación de los huevos (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Además este parámetro de la fecundación no siempre está relacionado con la supervivencia de los posteriores estados de desarrollo del embrión ni con la calidad de las larvas (Kjørsvik *et al.*, 1990)

En resumen, y en contra de lo que cabría esperar según lo encontrado en

dorada japonesa (Watanabe *et al.*, 1984a,b,c,d, 1985a,b), los niveles de ácidos grasos utilizados en la dieta de reproductores en este trabajo no producen diferencias ni en la tasa de fecundación de los huevos ni en el porcentaje de eclosión.

Si consideramos otro criterio de calidad de puestas como es la presencia de más de una gota de grasa, si que parece haber relación con el tipo de dieta; los porcentajes mínimos de larvas anormales aparecen en la dieta fresca y en el pienso con EPA-DHA, y los máximos en los piensos sin enriquecimiento.

5.3. CULTIVO LARVARIO

Los resultados del cultivo larvario en cuanto a supervivencia, talla, y peso de las larvas a los 35 días de vida, presentaron grandes variaciones entre los lotes que, sin embargo no parecen estar relacionadas con las dietas de los reproductores.

Así, el primer año, los dos lotes con mayor supervivencia larvaria , el de pescado fresco (9.5%) y el de pienso carente de HUFAs (9.8%), presentaron los peores resultados de crecimiento tanto en peso (2.5 g) como en talla (7.6 mm). El año siguiente los porcentajes de supervivencia fueron extraordinariamente bajos, entre 1-2% en todos los lotes, y el crecimiento fue mejor (entre 8.6-10.7 mm y entre 4.8-9.9 mg). Si calculamos las larvas obtenidas de los distintos lotes tomando el número total de huevos, los correspondientes porcentajes de fecundación y eclosión, y la supervivencia larvaria a los 35 días de vida, obtendríamos las cifras que se dan en la Tabla XVII:

Discusión

Tabla XVII. Larvas obtenidas de los distintos lotes de reproductores en los experimentos de los tres años.

		Larvas recién eclosionadas	Larvas 35 días
1992	A2	4.223.000	401.000
	A3	1.200.000	26.000
	A4	1.725.000	169.000
	A5	1.642.000	62.000
1993	A1	10.126.000	213.000
	A3	2.991.000	35.900
	A4	3.040.000	36.500
	A6	446.000	6.700
1994	A3	35.738.000	
	A4	18.537.000	

Se puede afirmar sin lugar a dudas la mayor eficiencia de la dieta fresca los dos primeros años y del pienso especial para reproductores el tercero. Más difícil de explicar son los malos resultados de los piensos enriquecidos con EPA-DHA debidos a los bajos porcentajes de fecundación y eclosión que hacen que ocupen los últimos lugares en cuanto a larvas obtenidas.

Las diferencias en la supervivencia, talla y peso de las larvas que se observaron entre los distintos lotes no se corresponden con la calidad de las dietas de los reproductores y pueden ser debidas a la tecnología del cultivo, al tamaño de los tanques, etc. En el experimento 1, para poder hacer tres réplicas por cada tratamiento y controlar mejor el cultivo larvario, éste se llevó a cabo en barreños de pequeño volumen y sin aplicar la metodología estándar que se utiliza habitualmente, por lo que probablemente los resultados de crecimiento larvario fueron malos. El cultivo larvario presenta de ordinario grandes variaciones debido a la multiplicidad de factores que influyen sobre él de manera que, aún dentro de lotes con el mismo origen aparecen diferencias sustanciales entre los replicados de los mismos tratamientos. Es muy difícil, por tanto, establecer una relación clara entre las

distintas dietas y la calidad del cultivo larvario.

Sin embargo es interesante tener en cuenta los resultados de Fernández-Palacios *et al.* (1995) en dorada que encontraron un efecto negativo de los n3 HUFA de las dietas de reproductores por encima de un nivel determinado, sobre la supervivencia larvaria. Un exceso de estos ácidos grasos produjo un alto porcentaje de larvas con hipertrofia en el saco vitelino que causó una reducción del 10% en la supervivencia a los tres días de vida. Según estos autores los niveles de HUFA n3 en las dietas de reproductores de dorada deben estar alrededor del 1.6% del peso seco, valor algo mayor del recomendado para salmónidos (1%), y parecido al determinado para la dorada japonesa.

Los niveles de HUFA n3 en este trabajo estuvieron siempre por encima del 1.6% del peso seco de la dieta de los reproductores ya que oscilaron entre el valor mínimo de 2.03% del peso seco en el pienso enriquecido con aceite de coco, hasta el máximo de 3.9% en el pienso suplementado con EPA-DHA. La dieta a base de pescado fresco tuvo un 3.8% y el pienso 2.5%. La ausencia de una relación clara entre la composición de las dietas y las características de los huevos y larvas pudiera ser debida a que no hay una influencia de los n3 HUFA cuando estos se encuentran por encima del valor de 1.6%.

5.4. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LAS DIETAS Y LAS PUESTAS

Los análisis de las dietas demuestran la eficacia del método de enriquecimiento del pienso utilizado que realmente incorpora los n3 HUFA de las emulsiones llegando a superar los niveles de los del pescado fresco (39.4 frente a 38.0 mg/g de peso seco). Los niveles de DHA en la boga y el

pienso enriquecido están muy por encima de los de las otras dos dietas. La diferencia entre los 4 tipos de alimentación se refleja sobre todo en la cantidad de lípidos totales y en la de ácidos grasos n3. En éstos últimos se doblan las cantidades en la boga y en el pienso enriquecido con EPA-DHA con respecto a los otros dos, pienso, y pienso enriquecido con aceite de coco; estas diferencias son debidas a las diferentes cantidades de DHA ya que el EPA se encuentra en mayor concentración en el pienso enriquecido y con similares valores en los otros tres.

Tambien hay diferencias importantes en los lípidos totales de las distintas dietas, 30.6% en el pescado, 16% en los piensos enriquecidos, y 12.6% en el pienso, igualándose en las dietas enriquecidas y duplicándose en la dieta fresca. Los ácidos grasos saturados tambien presentan diferencias entre las dietas presentando los mayores niveles en la boga (53.2) seguido del pienso enriquecido con aceites vegetales (40.6), del pienso (39.6), y del pienso+EPA-DHA (34.9). Los ácidos grasos n6 tambien difieren en las cuatro dietas correspondiendo el valor mínimo a la boga por el menor contenido en ácido linoleico que las otras tres. Como consecuencia de estas diferencias el valor n3/n6 solo está por encima de 5, la proporción recomendada en dietas de reproductores, en el pescado fresco. La relación DHA/EPA, que debe estar alrededor de 2, solo supera este valor igualmente en el pescado fresco.

El pienso mejorado utilizado en el Experimento 3 no difiere sustancialmente, en su composición en ácidos grasos del utilizado los 2 primeros años. Únicamente, al tener menos cantidad de la serie n3 -6.07 mg/g frente a 9 mg/g- la relación n3/n6 aumenta hasta 4.62 y se acerca más al óptimo valor de 5 recomendado para reproductores.

En cuanto a las puestas, los ácidos grasos más abundantes son en los dos

años el 16:0, 18:1n9, 22.6n3, y 16:1n7 independientemente de la dieta usada. Estos datos coinciden con los encontrados en dorada por Mourente y Odriozola (1990), y en otras especies como la dorada japonesa (Kimata, 1983; Watanabe *et al.*, 1984a,b,c,d, 1985a,b), rodaballo (Barton, 1981), halibut (Falk-Petersen *et al.*, 1986), y otras especies europeas (Tocher & Sargent, 1984). Sin embargo no parece haber una relación significativa entre los niveles de HUFA de las dietas y los que se ven reflejados en las puestas; los niveles de ácidos grasos n3 en las puestas son altos, incluso los de las procedentes de reproductores alimentados con bajos porcentajes de los mismos. Estos resultados están en contradicción con los de Watanabe *et al.* (1978, 1984a,b,c,d, 1985a,b) y con los de Mourente y Odriozola (1990a); estos últimos, en experiencias similares con dorada, encuentran que las dietas diferentes no influyen significativamente en la composición por clases de lípidos de los huevos pero sí en los niveles de ácidos grasos, principalmente en los de la serie n3, 22:5 y 22:6. Los ácidos grasos de la serie n6 si parecen reflejar las diferencias de las dietas en la composición de los huevos.

Los niveles de ácidos grasos n3, n6 y n9 aumentan de las dietas a los huevos donde llegan a alcanzar valores mucho más altos que los encontrados en dorada (Hernández-Palacios *et al.*, 1995) y en el rodaballo (Peleteiro *et al.*, 1993).

La presencia de grandes cantidades de 22:6n3 en los huevos indica el importante papel de este ácido graso en la formación de las membranas durante la organogénesis de embriones y larvas.

5.5. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE DIFERENTES ÓRGANOS

La composición en ácidos grasos de los tejidos de los peces ha sido

ampliamente estudiada (Henderson & Tocher, 1987). Los peces marinos se caracterizan por tener niveles más altos de HUFA de 20 y 22 átomos de carbono y más bajos de 18 átomos de carbono que los peces de agua dulce. Las proporciones n3/n6 en peces marinos oscilan entre 7.5-15.8 y en peces de agua dulce entre 1.6-2.

La composición en ácidos grasos de los tejidos de los peces y su relación con el contenido en la dieta da una idea del modo de utilización de estos nutrientes y de sus requerimientos. Tanto el hígado, músculo, y gónada de los reproductores muestran altas cantidades de 16:0 y 18:1n9 lo que indica su doble función energética y constitutiva de los fosfolípidos de membrana.

Estos ácidos grasos se acumulan en cantidades mucho mayores en el hígado que en los otros órganos, al igual que sucede tanto en peces de agua dulce como la trucha arco-iris (Watanabe *et al.*, 1974; Takeuchi & Watanabe, 1977a, 1982), carpa (Takeuchi & Watanabe, 1977a), y anguila japonesa (Takeuchi *et al.*, 1980), como en peces marinos como la dorada japonesa (Takeuchi *et al.*, 1990) y la dorada europea (Ibeas ., 1994). El 18:1n9 y los HUFA n3 parecen jugar un papel fundamental en la modulación del índice de insaturación en los fosfolípidos de membrana de los tejidos estudiados, siendo la contribución del 18:2n6 y 20:4n6 relativamente pequeña (Ibeas *et al.*, 1995). El 18:1n9 es el principal producto de la síntesis endógena de ácidos grasos en peces (Henderson & Tocher, 1987). Kalogeropoulos *et al.* (1993) alimentando a doradas de 1 g con diferentes proporciones de aceite de soja y de aceite de hígado de bacalao encontraron que los ácidos grasos n9 son la única serie cuyas concentraciones no están relacionadas con el nivel en la dieta y que permanecen relativamente constantes en todos los tejidos; esto mismo sucedía con los saturados y los monoénicos. En este trabajo, como puede verse en la Tabla IX, en los reproductores alimentados con dieta natural el patrón de estos ácidos grasos aparece más o menos

constante en los tejidos examinados; sin embargo en los alimentados con pienso, tanto el 18:1n9 como los ácidos grasos saturados y monoénicos se acumulan principalmente en el hígado. Estos resultados apuntan a las grandes diferencias que aparecen en la utilización de las distintas series de ácidos grasos dependiendo del tamaño de los peces y de sus necesidades energéticas; los peces de 1 g están en la fase exponencial del crecimiento mientras que los reproductores experimentan los cambios más importantes en el hígado, órgano donde tiene lugar la síntesis de vitelogenina.

En este trabajo solamente los n3 HUFA y en especial el DHA se reflejan en los distintos tejidos dependiendo del tipo de dieta. Además el efecto de transferencia del DHA de la boga es más patente que el del DHA suministrado en el pienso.

Si comparamos la composición de huevos y gónadas, no aparecen diferencias significativas ni en los lípidos totales ni en los n3 HUFA ni, en ambos casos, interacción con el tipo de dieta. Estos resultados coinciden con los encontrados en lubina por Devauchelle & Coves (1988) que no encontraron diferencias en los lípidos de huevos y gónadas excepto en el caso de puestas obtenidas fuera de la época normal de reproducción.

La composición de los huevos, tanto en lípidos totales como en n3 HUFA, permanece bastante constante e independiente de las dietas; sin embargo las gónadas, cuya composición en lípidos no varía con las diferentes dietas, si presentan diferencias en los ácidos grasos n3 sobre todo entre la dieta de pescado y los dos piensos pobres en n3 HUFA. Estos resultados concuerdan con los de Takeuchi *et al.* (1981), Watanabe *et al.* (1984b), Springate *et al.* (1985), Knox *et al.* (1988) y Washburn *et al.* (1990), y confirman la prioridad que tiene la formación de huevos con la composición idónea para cubrir las necesidades de energía y formación de órganos en

el desarrollo embrionario y larvario.

5.6. COMPOSICIÓN CORPORAL DE LOS REPRODUCTORES

5.6. COMPOSICIÓN CORPORAL DE LOS REPRODUCTORES

La composición corporal de los peces varía en función de la edad, estado fisiológico y tipo de alimentación. En la dorada, al contrario que en la mayoría de las especies cultivadas, se ha comprobado que la composición corporal es muy estable e independiente del tipo de dieta (Sabaut & Luquet, 1973; Marais & Kissil, 1979). Este hecho se confirma también en este trabajo al aparecer las únicas diferencias de composición corporal entre dietas, pescado y pienso, en el porcentaje de proteína en el músculo que aparece más alto en los alimentados con pescado. Sería interesante comprobar la evolución de la composición corporal de peces grandes a lo largo del año y la incidencia del proceso reproductor ya que los estudios citados se han hecho con individuos pequeños -de 50 a 100 g- que no han llegado todavía a la madurez sexual.

El índice hepato-somático es mayor en los peces alimentados con pienso ya que las dietas artificiales suelen producir hígados de mayor tamaño que las dietas frescas. Por otro lado, tampoco hay diferencias en la relación peso eviscerado/peso total lo que indica o bien que la dieta no ha influido en la aparición de depósitos de grasa perivisceral, o que este material de reserva ha sido movilizado y utilizado durante la reproducción.

6. CONCLUSIONES

Conclusión 1ª. El tipo de dieta de los reproductores de dorada influye significativamente en el número total de huevos, la duración del periodo de puesta, y el índice de fecundidad de las hembras.

Conclusión 2ª. Las tasas diarias de alimentación en todos los experimentos fueron mucho más bajas que las utilizadas normalmente en reproductores de dorada, resultando sin embargo suficientes para mantener los peces en buen estado nutricional y permitir la reproducción con éxito.

Conclusión 3ª. Los mejores resultados de las puestas, correspondientes a las dietas frescas y al pienso especial para reproductores, se vieron reflejados también en la duración de las mismas que se produjeron con periodicidad casi diaria durante 100 a 160 días. Las mayores cantidades de huevos se recogieron, en todos los casos, durante el mes de febrero.

Conclusión 4ª. Los malos resultados en el cultivo larvario y la ausencia de correlación entre la calidad de las larvas y los diferentes tipos de alimentación de los reproductores, podrían ser debidos a la inadecuada tecnología de cultivo y/o al hecho de que los valores de HUFA n3 en las dietas superen, en todos los casos, las cantidades máximas recomendadas.

Conclusión 5ª. Las grandes diferencias encontradas en este trabajo entre los índices de fecundidad, la duración del periodo de puesta y la cantidad de huevos obtenidos, tienen que ser debidas a la presencia de

determinados micronutrientes -vitamina C, astaxantina, etc.- en el pienso, y a la mejora de la calidad de las materias primas utilizadas en su fabricación.

Conclusión 6ª. Con las cantidades de ácidos grasos utilizadas en este trabajo no se ha podido establecer una relación clara entre el patrón de ácidos grasos de las puestas y su calidad en cuanto a tasas de fecundación y eclosión. La explicación a este hecho puede estar en las cantidades de HUFA n3 de las dietas que, en todos los casos, estuvieron por encima del 1.6% del peso seco, valor recomendado para la alimentación de reproductores de dorada. Sin embargo, al considerar el número de gotas de grasa como criterio de calidad de los huevos, sí aparece una diferencia entre las puestas obtenidas de reproductores alimentados con EPA+DHA y con dietas no enriquecidas.

Conclusión 7ª. La composición en lípidos totales de las puestas es independiente de la composición en lípidos de las diferentes dietas. La dorada utiliza sus reservas lipídicas, independientemente de la dieta, para asegurar la calidad de las puestas y el buen desarrollo de las larvas.

Conclusión 8ª. Los ácidos grasos más abundantes en las puestas son el 16:0, 18:1n9, 22:6n3, y 16:1n7 independientemente de la dieta usada. Tampoco parece haber una relación significativa entre los HUFA n3 de las dietas y los de las puestas. Los ácidos grasos de la serie n6, y en particular el ácido araquidónico, si parecen reflejar las diferencias de las dietas y presentan una relación directa con las cantidades encontradas en los huevos de los distintos lotes.

Conclusión 9ª. En este trabajo solamente los HUFA n3 y en especial el DHA se reflejan en los distintos tejidos -hígado, músculo y gónada-

dependiendo del tipo de dieta. Además el efecto de transferencia del DHA de la boga es más patente que el del pienso. En la composición de huevos y gónada no aparecen diferencias significativas ni en los lípidos totales ni en los HUFA n3, ni interacción con el tipo de dieta.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AKSNES, A., GJERDE, B. & ROALD, S.O. 1986. Biological, chemical and organoleptic changes during maturation of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 53: 7-20.
- ALESSIO, G. & BRONZI, P. 1974a. Riproduzione artificiale di orata, *Sparus aurata* (L.) (Osteichthyes, Sparidae). 1. Reperimento, trasporto, stabulazione e trattamenti ormonali di riproduttori cresciuti nelle Valle Venete. *Ateneo Parm. (Acta Nat.)*, 10: 187-204.
- ALESSIO, G. & BRONZI, P. 1974b. Artificial reproduction of the gilt-head bream *Sparus aurata* (L.) (Osteichthys, Sparidae). The artificial insemination, incubation, and hatching of eggs obtained by hormone induced ovulation. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.* 29 (2): 123-132.
- ALESSIO, G., GANDOLFI, G. & SCHREIBER, B. 1975. Tecniche e metodiche generali di riproduzione artificiale dell'orata, *Sparus aurata* (L.) (Osteichthyes, Sparidae). *Invest. Pesqu.* 39 (2): 417-428.
- ANDO, K. 1962. Change of the lipids during development of rainbow trout eggs. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 28: 73-76.
- ANDO, K. 1968. Biochemical studies on the lipids of cultured fishes. *J. Tokkyo Univ. Fish.* 54: 61-98.
- ARIAS, A. 1976a. Reproduction artificielle de la daurade, *Sparus aurata* (L.). *Etud. Rev. Cons. Gén. Pêches Méditerr.* 55: 159-173.
- ARIAS, A. 1976b. Sobre la biología de la dorada, *Sparus aurata* (L.) de los esteros de la provincia de Cádiz. *Invest. Pesqu.* 40 (1): 201-222.
- ARIAS, A. 1980. Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata*, L.) y del róbalo (*Dicentrarchus labrax*, L.) en los esteros de Cádiz. *Inv. Pesqu.*, 44 (1): 59-83.

- ARIAS, A. & DRAKE, P. 1990. Estados juveniles en la ictiofauna en los caños de las salinas de la bahía de Cádiz. *Inst. Cien. Mar. Andalucía (Ed.)*. Cádiz, 168 pp.
- ARNAL, J.I. & ORTEGA, A. 1975. Aquaculture dans la Mer Menor (Murcia, Espagne): Premières expériences. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* 23 (3): 87-88.
- ARNAL, J.I., GARCÍA ALCÁZAR, A. & ORTEGA, A. 1976. Observaciones sobre el crecimiento de la dorada, *Sparus aurata* L., en el Mar Menor (Murcia). *Bol. Inst. Esp. Oceanog.*, 221: 1-17.
- AUDOUIN, J. 1962a. La daurade de l'étang de Thau, *Chrysophris aurata*, L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 26: 105-106.
- AUDOUIN, J. 1962b. Contribution à l'étude des migrations de la daurade, *Chrysophris aurata*, L., au moyen de marquages. *Rapp. Process. Verb. Réun.*, 15 (3): 139-140.
- BABIN, J. 1987. Apolipoproteins and the association of egg yolk proteins with plasma high density lipoproteins after ovulation and follicular atresia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Biological Chemistry*, 262: 4290-4296.
- BABIN, J. & VERNIER, J-M. 1989. Plasma lipoproteins in fish. *Journal of Lipid Research*, 30: 467-489.
- BAGENAL, T.B. 1969. The relationship between food supply and fecundity in brown trout *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.*, 1: 167-182.
- BARNABÉ, G. 1976. Rapport technique sur la ponte induite et l'élevage des larves du loup *Dicentrachus labrax* (L.) et de la daurade *Sparus aurata* (L.). *Rev. Cons. Gén. Pêches Méditerr.* 55: 63-116.
- BARNABÉ, G. & RENÉ, F. 1973. Reproduction contrôlée et production d'alevins chez la daurade *Sparus aurata* (LINNÉ 1758). *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser.D*, 276: 1621-1624.

- BELL, M.V. & TOCHER, D.R. 1989. Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem. J.*, 264: 909-915.
- BELL, M.V., HENDERSON, J.R. & SARGENT, J.R. 1984. Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 193-198.
- BELL, M.V., HENDERSON, J.R. & SARGENT, J.R. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B: 911-919.
- BELL, J.G., McVICAR, A.H., PARK, M.T. & SARGENT, J.R. 1990. Effects of high dietary linoleic acid on fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): association with a novel cardiac lesion. *Journal of Nutrition*, 121: 1163-1172.
- BEN-TUVIA, A. 1979. Studies of the population and fisheries of *Sparus aurata* in the Bardwil Lagoon, Eastern Mediterranean. *Inv. Pesqu.*, 43: 43-67.
- BERMÚDEZ, L., GARCÍA GARCÍA, B. & ORTEGA, A. 1987. Experiencias de engorde de dorada (*Sparus aurata* L.) en estanques. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.*, 8: 105-116.
- BRENNER, R.R. 1974. The oxidative desaturation of unsaturated fatty acids in animals. *Mol. Cell. Biochem.*, 3: 41-52.
- BROMAGE, N., JONES, J., RANDALL, C., THRUSH, M., DAVIES, B., SPRINGATE, J., DUSTON, J. & BARKER, G. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 141-166.
- CARNEVALI, O. & BELVEDERE, P. 1991. Comparative studies of fish, amphibian and reptilian vitellogenins. *Journal of Experimental Zoology*, 259: 18-25.

- 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*: preliminary observations. *Aquat. Living Resour.*, 7: 255-266.
- CHATAIN, B. 1986. La vessie natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*. I. Aspects morphologiques du développement. *Aquaculture*, 53: 303-311.
- CHATAIN, B. 1987. La vessie natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*. II. Influence des anomalies de développement sur la croissance de la larve. *Aquaculture*, 65: 175-181.
- CHATAIN, B. & OUNAI-GUSCHEMANN, N. 1990. Improved rate of initial swimbladder inflation in intensively reared *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 84: 345-353.
- CHRISTIE, W.W. 1982. *Lipid Analyses*, 2nd edition. Pergamon Press, Oxford, 207 pp.
- COLOMBO, L., FRANCESCON, A., BARBARO, A., BELVEDERE, P. & MELOTTI, P. 1989. Induction of spawning in the gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., by elevation of water temperature and salinity and by hCG and LH-RH analogue treatments. *Riv. Ital. Acquacol.* 24: 187-196.
- COPELAND, P.A. & THOMAS, P. 1988. The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B: 17-24.
- COVENS, M., COVENS, L., OLLEVIER, F. & DeLOOF, A. 1987. A comparative study of some properties of vitellogenin (Vg) and yolk proteins in a number of freshwater and marine teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88B: 75-80.
- COWEY, C.B., BELL, J.G., KNOX, D., FRASER, A. & YOUNGSON, A. 1985. Lipids and antioxidant systems in developing eggs of salmon (*Salmo salar*). *Lipids*, 20: 567-572.

- CROZIER, G.F. 1970. Tissue carotenoids in prespawning and spawning sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 27: 973-975.
- D'ANCONA, U. 1941. Uteriori osservazioni e considerazioni sull'ermafroditismo e il differenziamento sessuale dell'orata (*Sparus auratus*, L.). *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 18 (3).
- D'ANCONA, U. 1954. Fishing and fish culture in brackish water lagoons. *FAO Fish. Bull.* n°4.
- DATO, S.M. & BRENNER, R.R. 1970. Comparative effects of docosa-4, 7, 10, 16, 19-pentaenoic acid and docosa-4, 7, 10, 13, 16, 19-hexaenoic acid on the desaturation of linoleic acid and linolenic acid. *Lipids*, 5: 1013-1015.
- DEUFEL, J. 1965. Pigmentierungsversuche mit Canthaxanthin bei Regenbogenforellen. *Arch. Fischereiwiss.*, 16: 125-132.
- DEVAUCHELLE, N. 1984. Reproduction décalée du bar (*Dicentrarchus labrax*) et de la daurade (*Sparus aurata*). En: *L'Aquaculture de Bar et des Sparidés*. (eds. R. Billard & G. Barnabé), INRA, Paris, pp: 53-63.
- DOSDAT, A. 1984. Prégrossissement et consommation d'oxygène de loups et de daurades en élevages intensifs. En: *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*. (eds. R. Billard & G. Barnabé), INRA, Paris, pp: 351-359.
- FALK-PETERSEN, S., FALK-PETERSEN, I.-B., SARGENT, J.R. & HAUG, T. 1986. Lipid class and fatty acid composition of eggs from the Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*). *Aquaculture*, 52: 207-211.
- FALK-PETERSEN, S., SARGENT, J.R., FOX, C., FALK-PETERSEN, I.-B., HAUG, T. & KJORSVIK, E. 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*) eggs from planktonic samples in northern Norway. *Mar. Biol.*, 101: 553-556.
- FAO. 1993. *Statistical Bulletin for the General Fisheries Council for the Mediterranean (GFCM)* 9. Nominal Catches 1979-1991: 237 pp.

- FISCHER, W., BAUCHOT, M.-L. & M. SCHNEIDER. 1987. *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Méditerranée et mer Noire*. Zone de pêche 37. Volume II. Vertébrés. Rome, FAO: 761-1530.
- FRASER, A.J., GAMBLE, J.C., & SARGENT, J.R. 1988. Changes in lipid content, lipid class composition and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.*, 99: 307-313.
- GARCIA ALCÁZAR, A. & ABELLÁN, E. 1989. Contribution to the study of sex inversion of *Sparus aurata*. *EAS Spec. Publ.*, 10: 105-106.
- GARCÍA GARCÍA, B., BERMÚDEZ, L., GÓMEZ, O., ORTEGA, A. & MARTIN, P. 1987. El preengorde en cultivo intensivo de dorada (*Sparus aurata* L.): aportación de datos biotécnicos. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.*, 12: 131-136.
- GATESOUBE, F.J. & LE MILINAIRE, C. 1985. Adaptation de la qualité alimentaire des filtreurs-proies aux besoins nutritifs des larves de poissons marins. *Coll. fr.-japon. Océanogr.*, Marseille 16-21 Sept. 85. 8: 51-63.
- GIRIN, M. 1976. Information sheet for the CRC Handbook of mariculture. December 1976 n°2: gilthead seabream (*Sparus aurata*) Sparidae. Centre océanologique de Bretagne, B.P. 337 29273 BREST cedex.
- GORDIN, H. & ZOHAR, Y. 1978. Induced spawning of *Sparus aurata* (L.) by mean of hormonal treatments. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 18: 985-990.
- HARDY, R.W., SHEARER, K.D. & KING, I.B. 1984. Proximate and elemental composition of developing eggs and maternal soma of pen-reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed production and trace element fortified diet. *Aquaculture*, 43: 147-165.
- HARDY, R.W., SCOTT, T.M. & HARRELL, L.W. 1987. Replacement of herring oil with menhaden oil, soybean oil or tallow in the diets of Atlantic salmon raised in marine net-pens. *Aquaculture*, 65: 267-277.

- HARTMANN, M., MEDEM, F.G., KUHN, R. & BIELIG, H.J. 1947. Untersuchungen über die Befruchtungsstoffe der Regenbogenforelle. *Z. Naturforsch. (B)* 2: 330-349.
- HARVEY, B. & HOAR, W.S. 1980. La reproduction provoquée chez les poissons: Théorie et pratique. *IDCR*, Ottawa, Canada: 48 pp.
- HENDERSON, R.J. & TOCHER, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.*, 26: 281-347.
- HENDERSON, R.J. & ALMATAR, S.M. 1989. Seasonal changes in the lipid composition of herring (*Clupea herengus*) in relation to gonad maturation. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 69: 323-334.
- HENDERSON, R.J., SARGENT, J.R. & HOPKINS, C.C.E. 1984. Changes in the content and fatty acid composition of lipid in an isolated population of the capelin *Mallotus villosus* during sexual maturation and spawning. *Mar. Biol.*, 78: 255-263.
- HILTON, J.W., CHO, C.Y., BROWN, R.G. & SLINGER, S.J. 1979. The synthesis, half-life and distribution of ascorbic acid in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 63A: 447-453.
- HISLOP, J.R.G., ROBB, A.P. & GAULD, J.A. 1978. Observations on effects of feeding level on growth and reproduction in haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.) in captivity. *J. Fish Biol.*, 13: 85-98.
- KALOGEROPOULOS, N., ALEXIS, M.N. & HENDERSON, R.J. 1993. Effect of dietary lipids on tissue fatty acid composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz (France), June 24-27 1991. Ed. INRA, Paris (Les Colloques, n°61).
- KANAZAWA, A., TOKIWA, S., KAYAMA, M. & HIRATA, M. 1977. Essential fatty acids in the diet of prawn. I. Effect of linoleic and linolenic acids on growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 43: 1111-1114.

- KETOLA, H.G. 1983. Mineral supplementation of Atlantic salmon broodstock diets. *Abstr. Symp. Salmonid Reproduction*. p.20. Seattle, Washington.
- KNOX, D., BROMAGE, N., COWEY, C. & SPRINGATE, J.R.C. 1988. The effect of brood stock ration size on the composition of rainbow trout eggs. *Aquaculture*, 69: 93-104.
- KOVEN, W.M., KISSIL, G.Wm. & TANDLER, A. 1989. Lipid and n-3 HUFA requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture*, 79: 185-191.
- KOVEN, W.M., TANDLER, A., KISSIL, G.Wm., SKLAN, D., FRIEZLANDER, O. & HAREL, M. 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 91: 131-141.
- KOVEN, W.M., TANDLER, A., KISSIL, G.Wm. & SKLAN, D. 1992. The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture*, 104: 91-104.
- KROM, M.D., PORTER, C. & GORDIN, H. 1985a. Nutrient budget of a marine fish pond in Eilat, Israel. *Aquaculture*, 51: 65-80.
- KROM, M.D., PORTER, C. & GORDIN, H. 1985b. Causes of fish mortalities in semi-intensively operated seawater ponds in Eilat, Israel. *Aquaculture*, 49: 159-177.
- LALL, S.P. & HINES, J.A. 1985. Manganese bioavailability and requirements of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Abstr. Symp. on Assessment by Physiological and Biochemical Methods of Nutrient Availability in Fish*. Brighton.
- LASKER, R. & THEILACKER, G.H. 1962. The fatty acid composition of the lipids of some Pacific sardine tissues in relation to ovarian maturation and diet. *J. Lipid Res.* 3: 60-64.

- LASSERRE, P. & LABOURG, J.P. 1974. Etude comparée de la croissance de la daurade *Sparus aurata* des régions d'Arcachon et de Sète. 1st note: *Vie Milieu* 24 (1A): 156-170. 2nd note: *Vie Milieu* 24 (2A): 357-364.
- LÉGER, C., FREMONT, L., MARION, D., NASSOUR, I. & DESFARGES, M-F. 1981a. Essential fatty acids in trout serum lipoproteins, vitellogenin and egg lipids. *Lipids*, 16: 593-600.
- LÉGER, C., FREMONT, L. & BOUDON, M. 1981b. Fatty acid composition of lipids in the trout. I: Influence of dietary fatty acids on the triglyceride fatty acid desaturation in serum, adipose tissue, liver, white and red muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 99-105.
- LOZANO CABO, F. 1954. Una campaña de prospección pesquera en Mar Menor (Murcia). *Bol. Inst. Esp. Ocean.*, 66: 28-33.
- LUMARE, F. & VILLANI, P. 1971a. Preliminary report on induced spawning and artificial fertilization of *Sparus aurata* L. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.*, 26: 109-112.
- LUMARE, F. & VILLANI, P. 1971b. Prime esperienze di fecondazione artificiale sull'orata (*Sparus aurata*). *Riv. Ital. Piscic. Ittiopatol.*, 6 (4): 95-97.
- LUMARE, F. & VILLANI, P. 1973. Maturità sessuale indotta e fecondazione artificiale in *Sparus aurata* (L.). *Invest. Pesqu.* 37 (1): 57-71.
- LUQUET, P. & WATANABE, T. 1986. Interaction "nutrition-reproduction" in fish. *Fish. Physiol. Biochem.* 2: 121-129.
- MATSUYAMA, M., ADACHI, S., NAGAHAMA, Y. & MATSUURA, S. 1988. Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. *Aquaculture*, 73: 357-372.
- MIKULIN, A. Ye. & SOIN, S.G. 1975. The functional significance of carotenoids in the embryonic development of teleosts. *J. Ichthyol.*, 15: 749-759.

- MOURENTE, G. & ODRIOZOLA, J.M. 1990a. Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 8: 93-101.
- MOURENTE, G. & ODRIOZOLA, J.M. 1990b. Effect of broodstock diets on total lipids and fatty acid composition of larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 8: 103-110.
- MOURENTE, G. & TOCHER, D.R. 1992. Effects of weaning onto a pelleted diet on docosahexaenoic acid (22:6n-3) levels in brain of developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 105: 363-377.
- MOURENTE, G. & TOCHER, D.R. 1993. Incorporation and metabolism of ¹⁴C-labelled polyunsaturated fatty acids in juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *in vivo*. *Fish Physiol. Biochem.*, 10 (6): 443-453.
- MOURENTE, G., CARRASCOSA, M.A., VELASCO, C. & ODRIOZOLA, J.M. 1989. Effect of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) broodstock diets on egg lipid composition and spawning quality. *EAS Spec. Publ.* 10: 179-180.
- MOURENTE, G., TOCHER, D.R. & SARGENT, J.R. 1991. Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. *Lipids*, 26: 871-877.
- NAGLER, J.J. & IDLER, D.R. 1990. Ovarian uptake of vitellogenin and another very high density lipoprotein in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and their relationship with yolk proteins. *Biochem. Cell Biol.*, 68: 330-335.
- NASSOUR, I. & LEGER, C.L. 1989. Deposition and mobilization of body fat during sexual maturation in female trout *Salmo gairdneri* R. *Aquatic Living Resources*, 2: 153-159.
- NAVARRO, F.P. 1927. Observaciones sobre el Mar Menor (Murcia). *Notas y Resúmenes. Instituto Español de Oceanografía*, serie II, nº 16.
- NAVARRO, J.C., HONTORIA, F., VARO, I. & AMAT, F. 1988. Effect of alternate feeding a poor long chain polyunsaturated fatty acid *Artemia* strain and a rich

- one on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and prawn (*Penaeus kerathurus*) larvae. *Aquaculture*, 74: 307-317.
- NAVARRO, J.C. & SARGENT, J.R. 1992. Behavioural differences in starving herring *Clupea harengus* L. larvae correlate with body levels of essential fatty acids. *Journal of Fish Biology*, 41: 509-513.
- ORTEGA, A. & ROS, J. 1973. Primeras experiencias sobre cultivos de peces en el Mar Menor. *Boletín del Inst. Esp. Ocean.*, 163: 20 pp.
- ORTEGA, A., SANTAELLA, E., GARCÍA, A., OLMEDO, M. & PELETEIRO, J.B. 1983. Cultivo de dorada *Sparus aurata*, L. en el Centro Costero del Mar Menor durante la temporada 1978-79. *Inf. Téc. Inst. Esp. Oceanog.*, 5: 29 pp.
- PAGLIARINI, A., PIRINI, M., TRIGARI, G. & VENTRELLA, V. 1986. Effect of diets containing different oils on brain fatty acid composition in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 83: 277-282.
- PAPERNA, I. 1984. Review of diseases affecting cultured *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. En: *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*. G. Barnabé & R. Billard (Eds.). INRA Publ., Paris, pp. 465-482.
- PAPERNA, I., COLORNI, A., GORDIN, H. & KISSIL, G. Wm. 1977. Diseases of *Sparus aurata* in marine culture at Elat. *Aquaculture*, 10: 195-213.
- PASQUALI, A. 1941. Contributo allo studio dell'ermafroditismo e del differenziamento della gonade nell'orata (*Sparus auratus*, L.). *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 18(3): 283-312.
- PELETEIRO, J.B., LAVENS, P., RODRIGUEZ-OJEA, G. & IGLESIAS, I. 1995. Relationship between egg quality and fatty acid content of various turbot broodstocks (*Scophthalmus maximus* L.). *ICES mar. Sci. Symp.*, 201: 51-56.
- PETERSEN, I. & KORSGAARD, B. 1989. Experimental induction of vitellogenin synthesis in eel (*Anguilla anguilla*) adapted to sea-water or freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 93B: 57-60.

- PITT, R., TSUR, O. & GORDIN, H. 1977. Cage culture of *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 11: 285-298.
- PLACK, P.A., PRITCHARD, D.J. & FRASER, N.W. 1971. Egg proteins in cod serum. Natural occurrence and induction by injections of oestradiol 3-benzoate. *Biochemical Journal*, 121: 847-856.
- PORTER, C. 1980. Cage culture of gilthead bream (*Sparus aurata*) in the Gulf of Eilat (Aqaba) 1976-1978. *Stud. Rev. Gen. Fish. Counc. Medit.*, Rome, 57: 1-10.
- PORTER, C. 1981. Cage culture of gilthead bream (*Sparus aurata*) at an exposed site on the Red Sea. *European Mariculture Society, Special Publication*, 6: 15-24.
- PORTER, C.B., KROM, M.D. & GORDIN, H. 1986. The effect of water quality on the growth of *Sparus aurata* in marine fish ponds. *Aquaculture*, 59: 229-315.
- QUILLET, E. & CAMARET, D. 1982. Elevage des daurades. *Publ. de l'Association pour le Développement de l'Aquaculture*. Synthèse bibliographique. N° 9: 98 pp.
- RAMOS, M.A. & PEREIRA, T.G. 1990. Reprodução espontânea e contínua da dourade, *Sparus aurata* (L. 1758) em cativeiro. *Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas*, 15: 15-21.
- RAVAGNAN, G. 1978. Elementi di vallicultura moderna. Edagricole. Bologna. 283 pp.
- RAVAGNAN, G. 1984. L'élevage du loup et de la daurade en valliculture. En: *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*. G. Barnabé & R. Billard (Eds.). INRA Publ., Paris, pp. 435-446.
- RENÉ, F. 1974a. Données sur la croissance chez *Sparus auratus* Linné 1758 par l'élevage en condition intensive d'alevins de reproduction contrôlée. *Actes de Colloques CNEXO*, 1: 279-291.

- RENÉ, F. 1974b. Données comparatives des phases de la croissance chez *Sparus auratus* en élevage intensif d'alevins obtenus par la pêche et le contrôle de la reproduction. *Actes de Colloques CNEOX*, 1: 305-312.
- RENÉ, F. 1984. Essais d'élevage du loup (*Dicentrarchus labrax*), de la daurade (*Sparus auratus*) et du sar (*Diplodus sargus*) à la Martinique. En: *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*. G. Barnabé & R. Billard (Eds.). INRA Publ., Paris, pp. 403-418.
- RIVAS, A., CEJAS, J., VILLAMANDOS, J. & ESCÁNEZ, J. 1987. Primeras experiencias de reproducción de dorada *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), en el Archipiélago Canario. *Cuad. Marisqu. Publ. Téc.*, 8: 11-20.
- ROLEY, D.D. 1983. The effect of diet protein level, feeding level and rearing water temperature on the growth and reproductive performance of rainbow trout. Ph. D. Dissertation, University of Washington, Seattle, WA, 271 pp.
- SANDNES, K. 1984. Some aspects of ascorbic acid and reproduction in fish. In: *Ascorbic acid in domestic animals*. Ed. I. Wegger, F.J. Tagwerker & J. Moustgaard. The Royal Danish Agricultural Soc. Copenhagen.
- SANDNES, K. & BRAEKKAN, O.R. 1981. Ascorbic acid and the reproductive cycle of ovaries in cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 70A: 545-546.
- SANDNES, K., ULGENES, Y., BRAEKKAN, O.R. & UTNE, F. 1984a. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed for reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43: 167-177.
- SANDNES, K., JULSHAMN, K. & BRAEKKAN, O.R. 1984b. Interrelationship between ascorbic acid and trace elements in ovarian development in fish. In: *Ascorbic acid in domestic animals*. Ed. I. Wegger, F.J. Tagwerker & J. Moustgaard. The Royal Danish Agricultural Soc. Copenhagen.
- SANTAELLA, E. 1993. La acuicultura española en el contexto europeo. *El Acuicultor*: 27-34.

- SARGENT, J.R. 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. En: N.R. Bromage and R.J. Roberts (eds.) *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Oxford, pp: 353-372.
- SARGENT, J.R. & HENDERSON, R.J. 1986. Lipids. In *The Biological Chemistry of Marine Copepods*, (eds. E.D.S. Corner & S.C.M. O'Hara), pp: 59-108. Clarendon Press, Oxford.
- SARGENT, J.R., McINTOSH, R.M., BAUERMEISTER, A.E.M. & BLAXTER, J.H.S. 1979. Assimilation of the wax esters of marine zooplankton by herring (*Clupea harengus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Marine Biology*, 51: 203-207.
- SARGENT, J.R. & HENDERSON, R.J. & TOCHER, D.R. 1989. The lipids. In *Fish Nutrition*, (ed. J. Halver), 2nd edn. pp: 153-218. Academic Press, New York.
- SARGENT, J.R., BELL, M.V., HENDERSON, R.J. & TOCHER, D.R. 1990. Polyunsaturated fatty acids in marine and terrestrial food webs. In *Comparative Physiology, Vol. 5, Animal Nutrition and Transport Processes: Nutrition in Wild and Domestic Animals*, (eds. J. Mellinger, J.P. Truchot & B. Lahlou), pp: 11-23. Karger, Basel.
- SARGENT, J.R., BELL, J.G., BELL, M.V., HENDERSON, R.J. & TOCHER, D.R. 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*, (eds. B. Lahlou & P. Vitiello). *Coastal and Estuarine Studies*, 43: 103-124. American Geophysical Union, Washington DC.
- SCOTT, D.P. 1962. Effect of food quantity on fecundity of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 19: 715-731.
- SHIMMA, Y., SUZUKI, R., YAMAGUCHI, M. & AKIYAMA, T. 1977. The lipids of adult carps raised on fish meal and SCP feeds and hatchabilities of their eggs. *Bull. Freshw. Fish. Res. Lab.* 27: 35-48.
- SMITH, C.E., OSBORN, M.D., PIPER, R.G. & DWYER, W.P. 1979. Effect of diet composition on performance of rainbow trout broodstock during three year period. *Prog. Fish-Cult.*, 41: 185-188.

- SMITH, M.A.K., McKAY, M.C. & LEE, R.F. 1988. Catfish plasma lipoproteins: in vivo studies of apoprotein synthesis and catabolism. *Journal of Experimental Zoology*, 246: 223-235.
- SOLIMAN, A.K., JAUNCEY, K. & ROBERTS, R.J. 1986. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus*, Peters. *Aquaculture*, 59: 197-208.
- SPRINGATE, J.R.C., BROMAGE, N.R. & CUMARANATUNGA, P.R.T. 1985. The effects of different ration on fecundity and egg quality in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). En: C.R. Cowey, A.M. Mackie and J.G. Bell (Editors), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, New York, NY, pp: 371-394.
- STEVEN, D.M. 1949. Studies on animal carotinoids. II. Carotenoids in the reproductive cycle of the brown trout. *J. Exp. Biol.*, 26: 295-303.
- SUAU, P. & LOPEZ, J. 1976. Contribución al estudio de la dorada, *Sparus auratus*, L. *Inv. Pesqu.*, 40 (1): 169-199.
- SUGII, K. & KINUMAKI, T. 1968. Distribution of vitamin E in a few species of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 34: 420-428.
- TACON, A.G.J. 1981. Speculative review of possible carotenoid function in fish. *Prog. Fish-Cult.* 43: 205-208.
- TAKEUCHI, T. & WATANABE, T. 1977. Requirement of carp for essential fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43: 541-551.
- TAKEUCHI, T., WATANABE, T., OGINO, C., SAITO, M., NISHIMURA, K. & NOSE, T. 1981. Effects of low protein-high calory diets and deletion of trace elements from a fish meal diet on reproduction of rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47: 645-654.
- TOCHER, D.R. & SARGENT, J.R. 1984. Analysis of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. *Lipids*, 19: 492-499.

- TOCHER, D.R. & HARVIE, D.G. 1988. Fatty acid composition of the major phosphoglycerides from fish neural tissues; (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cod (*Gadus morhua*) brains and retinas. *Fish Physiol. Biochem.*, 5: 229-239.
- TOCHER, D.R., FRASER, A.J., SARGENT, J.R. & GAMBLE, J.C. 1985a. Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). *Lipids*, 20: 84-89.
- TOCHER, D.R., FRASER, A.J., SARGENT, J.R. & GAMBLE, J.C. 1985b. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 20: 69-74.
- VILLANI, P. 1976. Ponte induite et élevage des larves de poissons marins dans les conditions de laboratoire . *Etud. Rev. Cons. Gén. Pêches Méditerr.* 55: 117-132.
- WAAGBØ, R. & SANDNES, K. 1988. Some aspects of ascorbic acid during vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Manuscrito.
- WAAGBØ, R., THORSEN, T. & SANDNES, K. 1989. Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 80: 301-314.
- WASHBURN, B.S., FRYE, D.J., HUNG, S.S.O., DOROSHOV, F.S. & CONTE, F.S. 1990. Dietary effects on tissue composition, oogenesis and the reproductive performance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 90: 179-195.
- WATANABE, T. 1984. Importance of the study of broodstock nutrition for further development of aquaculture. *Abstr. Cong. on Fish Nutrition*. p.27. Aberdeen.
- WATANABE, T. 1985. Importance of broodstock nutrition study for further development of aquaculture. In: *Nutrition and Feeding in Fish*. pp. 395-414. Eds. C.B. Cowey, A.M. Mackie & J.G. Bell. Academic Press. London.

- WATANABE, T. 1987. Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. En: *Nutrición en Acuicultura*. Eds. J.Espinosa de los Monteros y U. Labarta. Madrid. Vol.II, pp: 153-217.
- WATANABE, T. & TAKASHIMA, F. 1977. Effect of α -tocopherol deficiency on carp. VI. Deficiency symptoms and changes of fatty acid and trygliceride distributions in adult carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 43: 819-830.
- WATANABE, T., TAKEUCHI, T. & SHIMMA, Y. 1978. Influence of SCP feed on lipid contents and fatty acid composition of rainbow trout. *Bull. Freshw. Fish. Res. Lab.* 28:37-46. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47: 645-654.
- WATANABE, T., OOWA, F., KITAJIMA, C. & FUJITA, S. 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia salina* and their content of omega-3 highly unsaturated fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 46: 35-41.
- WATANABE, T., ARAKAWA, T., KITAJIMA, C. & FUJITA, S. 1984a. Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of Red Sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50: 495-501.
- WATANABE, T., OHASHI, S., ITOH, A., KITAJIMA, C. & FUJITA, S. 1984b. Effect of nutritional composition of diets on chemical components of Red Sea bream broodstock and eggs produced. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50: 503-515.
- WATANABE, T., ITOH, A., KITAJIMA, C. & FUJITA, S. 1984c. Effect of dietary protein levels on reproduction of Red Sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50: 1015-1022.
- WATANABE, T., ITOH, A., MURAKAMI, A., TSUKASHIMA, Y., KITAJIMA, C. & FUJITA, S. 1984d. Effect of nutritional quality of diets given to broodstock on the verge of spawning on reproduction of Red Sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50: 1023-1028.
- WATANABE, T., TAKEUCHI, T., SAITO, M. & NISHIMURA, K.. 1984e. Effect of low protein-high calory or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50: 1207-1215.

- WATANABE, T., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., KITADA, T. & ARAKAWA, T. 1984f. Effect of broodstock diets on the spawning and quality of eggs of Red Sea bream. IX. Effective components of cuttlefish meal and raw krill. Abstr. Ann. Meet. Jap. Soc. Sci. Fish. p.20.
- WATANABE, T., ITOH, A., KITAJIMA, C. & FUJITA, S. 1985a. Effect of dietary protein levels and feeding period before spawning on chemical components of eggs produced by red sea bream broodstock. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51: 1501-1509.
- WATANABE, T., KOIZUMI, T., SUZUKI, H., SATOH, S., TAKEUCHI, T., YOSHIDA, N., KITADA, T. & TSUKASHIMA, Y. 1985b. Improvement of quality of red sea bream eggs by feeding broodstock on a diet containing cuttlefish meal or on raw krill shortly before spawning. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51: 1511-1521.
- YONE, Y. & FUJII, M. 1975. Studies on nutrition of red seabream. XI. Effect of w3 acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 41: 73-77.
- YU, T.C. & SINNHUBER, R.O. 1972. Effect of dietary linolenic acid and docosahexaenoic acid on growth and fatty acid composition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 7: 450-454.
- ZANUY, S & CARRILLO, M. 1992. Nuevas perspectivas de investigación en Acuicultura: aspectos relacionados con la reproducción de peces comerciales. Comunicación presentada en las 1^{as} Jornadas en Ciencias y Tecnologías Marinas, Área de Acuicultura. Alicante. Junio 1992.
- ZOHAR, Y. 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: Basic and applied considerations. In *Reproduction in Fish -Basic and Applies Aspects in Endocrinology and Genetics*. (Eds. Y. Zohar & B. Breton), pp. 47-62. INRA Press. Paris.
- ZOHAR, Y., ABRAHAM, M. & GORDIN, H. 1978. The gonadal cycle of the captivity reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 18 (4): 877-882.

- ZOHAR, Y. & GORDIN, H. 1979. Spawning kinetics in the gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., after low doses of human chorionic gonadotropin. *Journal of Fish Biology*, 15: 665-670.
- ZOHAR, Y., BILLARD, R. & WEIL, C. 1984. La reproduction de la daurade et du bar: Le cycle sexuel et l'induction de la ponte. In *Aquaculture de Bar et des Sparidés*, (eds. R. Billard & G. Barnabé), INRA Press, Paris: 3-24.
- ZOHAR, Y., TOSKY, M., PAGELSON, G. & FINKELMAN, Y. 1989a. Induction of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, using {D-Ala⁶ -Pro⁹NET}-LHRH: Comparison with the use of hCG. *Israel Journal of Aquaculture*, 4: 105-113.
- ZOHAR, Y., GOREN, A., TOSKY, M., PAGELSON, G., LIEBOVITZ, D. & KOCH, Y. 1989b. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7: 59-67.
- ZOHAR, Y., HAREL, M., HASSIN, S. & TANDLER, A. 1995. Gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). En: N.R. Bromage and R.J. Roberts (eds.) *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Oxford, pp: 94-117.