



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas.



Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*.

PRESENTA:

Conal David True.

Tesis de Doctorado para cubrir parcialmente los requisitos necesarios

para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera.

¹ Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas Km 103
Carretera Tijuana – Ensenada Código Postal 22860, Ensenada, Baja California

Ensenada Baja California, Enero 2012.

Antecedentes

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es una especie perteneciente a la familia Sciaenidae también conocida como curvinas, roncadores o tambores por su habilidad de producir sonidos con la vejiga natatoria. Esta especie soportó una importante pesquería durante la primera mitad del siglo XX, dando origen a muchos de los asentamientos humanos que hoy día conocemos en la parte Alta del Golfo de California. La falta de regulación en su extracción y la alteración del hábitat asociado a la disminución drástica del flujo del Río Colorado, condujeron al colapso de la actividad. El descenso extremo que se produjo en su población, promovió que a esta especie se le diera protección bajo la legislación mexicana mediante la imposición de una veda permanente a partir de 1974. Asimismo, para evitar su venta a nivel internacional, se incluyó en la Convención internacional del tráfico de especies silvestres de flora y fauna en peligro (CITES) como especie en peligro de extinción en 1976.

A partir de 1993, en la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la UABC, se iniciaron investigaciones para establecer las bases de su cultivo con fines de repoblación. Entre los principales logros está el haber capturado y mantenido en cautiverio un grupo de reproductores, el haber cerrado su ciclo reproductivo desarrollando así la tecnología de cultivo que se presenta en este trabajo. El avance del cultivo de las corvinas en Baja California inició hace ya más de 20 años, con la colaboración entre la FCM/UABC y el “Hubbs Sea World Research Institute” de San Diego, California, con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la fisiología de la corvina blanca del Pacífico *Atractosion nobils* bajo condiciones de cultivo. Después de conocer los avances de esta especie y establecer los paralelismos con otras pertenecientes a la misma familia es que se decide iniciar con esta investigación.

Como en toda especie en peligro de extinción, una de las mayores limitantes fue la adquisición de los reproductores, pero más aún la escasa información sobre su biología, ya que representaba una gran incertidumbre sobre el grado de desarrollo tecnológico requerido para su manutención bajo condiciones de cautiverio. En sus inicios el trabajo comenzó en

los laboratorios de docencia de la FCM en chapoteaderos plásticos para posteriormente construir un par de estanques de concreto con la capacidad de 30 m³ donde se reprodujo por primera vez en cautiverio a la Totoaba en 1998, este hecho dio origen a la construcción de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP). Durante los pasados 18 años se fueron desarrollando gradualmente una serie de procedimientos que se describen en esta disertación y que hoy día permiten la producción de juveniles de 4-6 meses de edad, que sustentan la factibilidad del inicio de un programa de repoblación en el Alto Golfo de California y así mismo permiten explorar el posible desarrollo del cultivo a talla comercial.

En un primer capítulo, se sintetizan todos los aspectos relacionados con el proceso de cultivo hasta la producción de juveniles, desde la captura de los sementales, su traslado, acondicionamiento previo y profilaxis inicial. Asimismo se establecen los parámetros iniciales para el control de la maduración en condiciones de cautiverio, su reproducción, desarrollo larvario temprano y las condiciones propias para su cultivo. El segundo capítulo es una nota técnica en la que se describe el desarrollo ovárico de la totoaba en condiciones de cautiverio, enfatizando sobre la identificación de la etapa de bloqueo reproductivo y su posterior inducción a la reproducción. El tercer capítulo es una investigación que versa sobre la caracterización bioquímica y molecular de las vitelogeninas, así como el uso de estas en la identificación temprana de las hembras. Finalmente el cuarto capítulo es un análisis de la orientación futura de esta biotecnología en el cual se explora su posible aplicación.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Totoaba macdonaldi.

PRESENTA:

Conal David True.

Tesis de Doctorado para cubrir parcialmente los requisitos necesarios

para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera.

APROBADA POR:

COMITÉ DE TESIS



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte
Co. Director



Dr. Craig Sullivan
Co. Director



Dr. Roberto Millán Núñez
Sinodal



Dr. Luis M. Enríquez Paredes
Sinodal



Dr. Benjamín Barón Sevilla
Sinodal

Ensenada Baja California, Enero 2012.

Dedicatoria

Este trabajo de primera instancia se lo dedico a mis papás que aunque ya no están conmigo, sé que desearían ver terminada esta etapa de mi vida. Se lo dedico a mi esposa “Coco” por siempre alentarme a continuar, por sus consejos y paciencia, “Gracias Amor”, a mi hija Ixchel por ser hija en todos los aspectos, “Gracias mi sirena diseñadora”, sin Uds no tendría propósito haber seguido este camino; finalmente se lo dedico a toda mi familia y a mis amigos.

Agradecimientos

El terminar este trabajo representa para mi muchas cosas pero sin duda no habría sido posible sin la participación de un gran grupo de personas é instituciones que apoyaron mi desarrollo. Realmente todo avance personal es consecuencia de los consejos, empuje, conocimientos y amistad brindados durante el camino a cumplir dicha meta.

Quisiera agradecer a mi comité de tesis, por su incondicional apoyo. Al †Dr. Jorge de la Rosa Vélez mi primer tutor interno (UABC) por su persistencia y convencimiento para que iniciará este grado de estudio. Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte por asumir el cargo de co-director y tutor interno. Al Dr. Craig Sullivan por su continua dirección concerniente a la reproducción de teleósteos, por permitirme ser colega y amigo, así mismo por facilitar mi estancia en North Carolina State University. Al Dr. Luis Enríquez Paredes por su siempre visión critica y consejos prácticos que me permitieron ver mas allá de los simples resultados. Al Dr. Benjamín Barón le agradezco su crítica abierta, disposición a la colaboración y acceso al procesado histológico de los tejidos. Finalmente a al Dr. Roberto Millán Núñez quien siempre me mostró confianza y certeza de que esta meta era alcanzable, mi sincero agradecimiento y aprecio como amigo.

Deseo extender un profundo agradecimiento al grupo pasado y presente del hoy día “Unidad de Biotecnología en Piscicultura”, ya que sin ellos este trabajo no habría sido posible. Les agradezco las incontables horas en el campo y laboratorio, su disposición a modificar planes personales y horarios en función de las metas del proyecto, pero sobre todo su habilidad en aceptar mis fracasos solo como un paso mas a lograr esta meta común, “La biotecnía de la Totoaba”. Este grupo lo han conformado muchas personas y por ello me disculpo si existe alguna omisión. Al MC. Antonio Silva por ser colega y un excelente profesor, esto no seria posible sin su empuje inicial. A Gerardo Sandoval, por siempre estar allí dispuesto a discutir, trabajar y por tener una forma diferente de ver las cosas. A Norberto Castro Castro, “mi compadre” le agradezco su animo, trabajo y consejos prácticos que en muchas ocasiones acortaron y lo reorientaron el trabajo. A la Dra. Luz López Acuña por integrarse al grupo, siempre aportar de forma constructiva y por su apoyo

como amiga. Un extenso agradecimiento a los técnicos: Eduardo Talamás, Ivan Monay, Miguel Espinoza y Estefana Valdenegro por su trabajo, disposición y convivencia durante cada etapa del proyecto, la verdad que son y/o fueron mucho más que técnicos.

Un extenso agradecimiento a los estudiantes y voluntarios que aportaron ideas, trabajo y una excelente actitud durante este trabajo. †Abisai, Joselyn, Esther, Flor, Kelly, Alejandra, Roberto, Jazmín, Rafa y Cesar entre muchos otros que han participado, a través de los años.

Un agradecimiento institucional a mi Universidad y Facultad por promover mi desarrollo profesional y personal pero si duda por alentarme a terminar, en especial a los profesores que despertaron en mí el interés por la ciencia.

Agradezco al grupo de trabajo del laboratorio del Dr. Sullivan del Departamento de Biología de la Universidad Estatal de Carolina del Norte NCSU, por su instrucción y apoyo en el análisis de muestras durante mis estancias de estudio. En particular al Dr. Benjamín Reading a Valerie Williams y al personal de la estación de cultivo de peces Pamlico.

Asi mismo un extensivo agradecimiento a la familia Valverde en particular al Sr. Javier Valverde é hijos por compartir su experiencia como guías durante la pesca de los reproductores usados para el desarrollo de este estudio y mi mas profunda gratitud al Sr. †Tony Reyes é hijos por su colaboración en los viajes de colecta de largo alcance.

INDICE

Antecedentes.....	I
Dedicatoria	IV
Agradecimientos.....	IV
LISTA DE FIGURAS.	X
LISTA DE TABLAS	XIV
CAPITULO I.....	2
Abstract	3
Introduction	4
Reproductive life history	6
Broodstock acquisition and adaptation to captivity	7
Broodstock holding system	8
Practical diets for broodstock and juveniles.....	9
Environmental conditioning for spawning	10
Puberty and gender identification	11
Reproductive ethology	13
Selection of candidate spawners	15
Induction of final maturation and spawning	15
Larval and juvenile husbandry	17
Early juvenile grow out procedures	21
Health and disease issues.....	24
Summary	25
Acknowledgments.....	26
References.....	27

Figures	35
CAPITULO II.....	43
Resumen.....	44
Abstract	44
Introducción	45
Método.....	47
Reproductores usados en este estudio	47
Simulación del ciclo anual para la promoción de la maduración ovárica	47
Selección de hembras y obtención de muestras ováricas.....	47
Selección de hembras candidatas a la inducción al desove y seguimiento de proceso de ovulación	48
Análisis histológico	48
Resultados	49
Distribución de tamaños y clasificación de los estadios de maduración ovárica	49
Tratamiento hormonal y descripción de las fases de maduración citoplásmica final	50
Seguimiento del proceso de Ovulación	50
Presencia de Atresia.....	51
Discusión	51
Conclusiones.....	53
Agradecimientos.....	53
Literatura Citada	54
Figuras	59
CAPITULO III.....	67
Resumen.....	68
Abstract	68

Introducción	69
Método.....	71
Origen de los organismos usados en el estudio y obtención de muestras	71
Inducción de vitelogénesis y obtención de muestras de suero y tejido	71
Proteómica	72
Purificación de vitelogeninas	72
Detección de vitelogeninas.....	73
Electroforesis en poliacrilamida y Western Blots	73
Biología molecular.....	74
Extracción, purificación y obtención de cDNA	74
Clonación y obtención de secuencias moleculares parciales	74
Análisis de datos (Dendrogramas).....	75
Identificación vitelogeninas mediante espectrofotometría de masas.....	75
Uso de las vitelogeninas como marcadores de sexo para la identificación de hembras	76
Resultados	77
Proteómica	77
Biología molecular.....	78
Identificación de vitelogeninas mediante espectrofotometría de masas	79
Uso de las vitelogeninas para la identificación de hembras de Totoaba	79
Discusión	80
Conclusiones.....	82
Agradecimientos	83
Literatura Citada	84
Figuras	90

ANEXO	98
CAPITULO IV	111
Desarrollo	112
Visión Futura.....	115
Agradecimientos.....	116
Literatura Citada.	116
Figuras.....	118

LISTA DE FIGURAS.

Capítulo I.	Pág.
Índice de Figuras	
Figure 1. Simplified totoaba reproductive life history and broodstock capture locations. (A) Northern capture region in and around San Felipe Bay. (B) Southern capture location at midway island archipelago. Specific capture locations ($\oplus$), temperature (Δ) and photoperiod ($\blacklozenge$) register locations for development of captive environmental regimens used to condition broodstock for spawning.	49
Figure 2. Life support and environmental control system for totoaba maturation and spawning. Closed recirculating system schematic: (1) sand filters for mechanical and biological filtration, (2) foam fractionation on a side loop, (3) integrated UV sterilization, photoperiod control through the use of fluorescent lights on a timer (not shown), and temperature control with, (4) heat exchanger plates, (5) upper section with access windows, (6) bottom section with observation window, (7) sump & (8) egg collecting net. Tanks have 100 m ³ volume, 7.3 m diameter x 2.2 m depth to water line. See text for details.	50
Figure 3. Annual photothermal regime used to promote totoaba maturation in captivity. Black upper line indicates day length and gray lower line indicates water temperature. Horizontal arrow indicates the spawning period.	51
Figure 4. Development of test for identifying vitellogenic female totoaba undergoing oocyte growth. A) Poros 50 ion exchange chromatogram of mature totoaba female serum indicating collected elution fractions 50 to 76 for vitellogenin-like proteins. Inset: Immunodiffusion plate using antiserum against striped bass vitellogenins (α), note conjugation with E66 (Fraction 66) and blood plasma from female 540 but not plasma from male 279. B) SDS-PAGE of plasma from totoaba of known gender (lanes 2 and 3) and unknown gender (lanes 4-6) using fraction E 66 (lane 1) as a positive control, Females show a distinct band at same level as E 66 (arrow) and males or immature fish do not.	52
Figure 5. Broodstock behavior. A) Outside the reproductive season fish have a uniform color tone with no distinction among genders, they occupy all of the water column. B) One or two weeks prior to spawning males assume a lighter coloration and females remain largely unchanged. C) One or two weeks prior to spawning fish exhibit a head down position at the bottom of the tank with evident tonal color change (males lighter than females). D & E) Spawning; up to 3 males participate with one female at tank surface (swim up), color tone is very distinct. Eggs usually present in egg trap once lights are off. Drawing not to scale (Fish size range 12-18 kg body weight; TL 0.9-1.20 m).	53

Figure 6. Summary of totoaba spawnings in 2009. Each box labeled with a roman numeral indicates results for an individual female. Vertical bars indicate individual spawns. Upper dark part of bar indicates viable (floating) eggs and lower lighter part of bar indicates unviable (sinking) eggs. Numbers above the bars indicate the percentage of viable eggs hatching. NE=not evaluated. The box inset at the lower right indicates the female weight and total fecundity.	54
Figure 7. Totoaba larval and juvenile growth during early development. a) Larval growth in total length, b) Juvenile growth in wet weight (ww) and total length (TL). Arrows indicate feeding regime with overlapping days for food type transition (weaning). *flexion stage.	55

Capítulo II	Pág.
Índice de Figuras	
Figura 1. Distribución típica del tamaño de los ovocitos de Totoaba durante el periodo de vitelogénesis (Crecimiento).	73
Figura 2. (a) Corte histológico de biopsia ovárica de Totoaba a fines de invierno, tinción hematoxilina-eosina con contraste (Arteta), ovocitos en estadios inmaduros; cr=cromatina nuclear, pr= perinuclear, avc=alveolo cortical. (b) detalle de estadios cromatina nuclear y perinuclear; n= núcleo, nu=nucléolo. (c) Detalle del estadio de alveolo cortical; n=núcleo, un=nucléolo, av=alveolo cortical, zr=zona radiata.	74
Figura 3. a) Corte histológico de biopsia ovárica de Totoaba a inicios de la primavera, tinción hematoxilina-eosina con contraste (Arteta), ovocitos en vitelogénesis primaria; vgp=vitelogénesis primaria. b) Detalle gránulos de vitelo iniciales ;vg=gránulos de vitelo, ac=alveolo cortical, n=núcleo, un=nucléolo. c) Detalle de gránulos de vitelo; gv=gránulos de vitelo, cf=células foliculares, zr=zona radiata, n=núcleo.	75
Figura 4. Corte histológico de biopsia ovárica de Totoaba a mediados de Verano, tinción hematoxilina-eosina con contraste (Arteta), ovocitos en vitelogénesis avanzada; vga=vitelogénicos avanzados. Detalle de ovocitos vitelogénicos avanzados. n=núcleo ó vesícula germinal, un= nucléolo, zr=zona radiata, cf=células foliculares, gv=gránulos de vitelo.	76
Figura 5. Secuencia de maduración citoplásmica final de los ovocitos de Totoaba hasta el momento de la ovulación (posterior al implante con GnRHa). Comparativa entre muestras ováricas frescas aclaradas y cortes histológicos. a,b) Vitelogénicos terciarios con núcleo central, c,d) con migración de vesícula germinal, e,f) etapa de conjunción, g,h) conjunción avanzada-hidratación e i,j,k) ovulación; vgr=vesícula germinal (núcleo), vgrm=vesícula germinal migrando, vvit=vesículas vitelinas, ga=gota de aceite.	77

Figura 6. Secuencia de ovulaciones en cortes histológicos de muestras ováricas de Totoaba con tinción H&E a partir del momento del implante. (a) Momento de implante 0h, notar versículo germinal migrado, (b) 28 horas post implante con evidencia de ovocitos hidratados y ovulados, (c) 42 h post implante con evidencia de vitelogénicos avanzados y folículos post-ovulatorios, d) 51 h post implante ovocitos hidratados y ovulados, e) 64 h post implante evidencia de vitelogénicos avanzados y en etapa avanzada de conjunción, f) 72 h post implante ovocitos hidratados y ovulados.	78
Figura 7. Distintos grados de atresia en ovocitos presentados en hembras de Totoaba durante la época reproductiva. zr= zona radiata, atr=atrésicos, fpov=folículo post ovulatorio.	79

Capítulo III.	Pág.
Índice de Figuras	
Figura 1. Purificación parcial de proteínas tipo vitelogenina a partir del suero de juveniles de Totoaba inducidos con β -estradiol mediante cromatografía de intercambio iónico de columna (Poros 50 HQ. a) Curva espectrofotométrica de las fracciones colectadas ante el cambio en la [NaCl]; en café: sección de "PASS", en morado: sección "Elusión". b,c) Placas de imuno-difusión con el anticuerpo aFSPP Toto/Wp; c') inserto: detalle de bandas de precipitación. d) SDS-PAGE de la sección del "PASS" y sección de la "Elusión" para confirmación de presencia de proteínas tipo vitelogenina.	104
Figura 2. Placas de imuno-difusión para comprobar la especificidad del anticuerpo aFSPPwp/toto contra proteínas tipo Vtgs. a) Placa de comprobación de especificidad en la cual se observa que la fracción de elusión 66 precipita en conjunto con el suero de hembra vitelogénica y no hay precipitación con suero de macho. b) Placa comparativa entre fracciones extremas de la elusión E56-E75. No hay entrecruzamiento entre dichas fracciones, suero de hembra y macho como controles.	105
Figura 3. Resultados de electroforesis desnaturalizante con gradiente 4-15%. SDS-PAGE. a) Tinción azul/coomassie al 0.1%, carril1: marcador de peso molecular, carril 2: Plasma de macho maduro de totoaba, carril 3: plasma de hembra de totoaba vitelogénica y carril 4: fracción #66 de la elusión cromatográfica a partir de juveniles de totoaba inducidos con β estradiol. b) Correspondiente western blot ante anticuerpo aFSPP adsorbido con suero de macho de perca blanca + totoaba (aFSPPwp/toto) y c) Correspondiente western blot ante anticuerpo aFSPP adsorbido solo con plasma de macho de perca blanca (aFSPPwp). * indica proteínas de tipo vitelogenina PM ~190 kDa.	106

Figura 4. Resultados de electroforesis no-desnaturalizante con gradiente 4-15%. NATIVE-PAGE. a) Tinción azul/coomassie al 0.1%, carril1: marcador de peso molecular, carril 2: Plasma de macho maduro de totoaba, carril 3: plasma de hembra de totoaba vitelogénica y carril 4: fracción #66 de la elusión cromatográfica a partir de juveniles de totoaba inducidos con β estradiol. b) Correspondiente western blot ante anticuerpo aFSPP adsorbido con suero de macho de perca blanca + totoaba (aFSPPwp/Toto) y c) Correspondiente western blot ante anticuerpo aFSPP adsorbido solo con plasma de macho de perca blanca (aFSPPwp). * indica proteínas de tipo vitelogenina PM ~544 kDa.	107
Figura 5. Resumen gráfico de la clonación de secuencias parciales de cDNA que codifican para VtgAa a partir de juveniles de Totoaba inducidos con β-Estradiol. a) Dendrograma del clado de agrupación general de las VtgAa de acuerdo de las secuencias deducidas para teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading <i>et al.</i>, 2009). b) Dendrogramas de ubicación específica de los fragmentos clonados para totoaba dentro del clado para VtgAa: fragmentos 1-4 (168-428, 555-961, 1150-1288 y 1277-150). c) Posición relativa de los fragmentos clonados en relación a la secuencia total del gen que codifica para VtgAa en teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading <i>et al.</i>, 2009). * Indica porcentaje de identidad del fragmento con respecto a <i>M.americana</i>.	108
Figura 6. Resumen gráfico de la clonación de secuencias parciales de cDNA que codifican para VtgAb a partir de juveniles de Totoaba inducidos con β-Estradiol. a) Dendrograma del clado de agrupación general de las VtgAb de acuerdo de las secuencias deducidas para teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading <i>et al.</i>, 2009); en el cual se indica la posición del único fragmento clonado para totoaba para VtgAb: Flecha indica la posición del fragmento 168-428, b) Posición relativa del fragmento clonado en relación a la secuencia total del gen que codifica para VtgAb en teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading <i>et al.</i>, 2009). * Indica porcentaje de identidad del fragmento con respecto a <i>Morone americana</i>.	109
Figura 7. Resumen gráfico de la clonación de secuencias parciales de cDNA que codifican para VtgAa a partir de juveniles de Totoaba inducidos con β-Estradiol. a) Dendrograma del clado de agrupación general de las VtgC de acuerdo de las secuencias deducidas para teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading <i>et al.</i>, 2009). b) Dendrogramas de ubicación específica de los fragmentos clonados para totoaba dentro del clado para VtgC: fragmentos 1-2 (Clado 47-389 y 801-1024). c) Posición relativa de los fragmentos clonados en relación a la secuencia total del gen que codifica para VtgC en teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading <i>et al.</i>, 2009). * Indica porcentaje de identidad del fragmento con respecto a <i>Morone americana</i>.	110

Figura 8. Resultados de la electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE realizada para la identificación de hembras de Totoaba. Para ambos electroforetogramas, <i>Carril 1</i> : Control=Fracción 66 de la purificación cromatográfica de vitelogeninas a partir de juveniles inducidos con β -Estradiol, <i>Carril 2</i> : Control negativo= Plasma de macho de Totoaba maduro, <i>Carril 3</i> : Control positivo secundario=Plasma de hembra vitelogénica de Totoaba previamente identificada, <i>Carriles 4-10</i> : muestras de plasma de reproductores 2 meses antes de la reproducción para identificación. Carácter macho y hembra indican la clasificación. Nota: los machos se corroboraron posteriormente por presencia de semen.	111
--	-----

Capítulo IV.	Pág.
Índice de Figuras	
Figura 1. Liberación de Totoabas juveniles en el golfo, detalles del traslado y la liberación.	132
Figura 2. Crecimiento de Totoaba en una prueba de engorda a talla comercial. Longitud total y peso húmedo. Insertos muestran la variación térmica y un organismo típico al final de la prueba.	133
Figura 3. Totoaba con evidencias de síndrome de hígado verde. Panel de arriba muestra una pigmentación verde atípica. Panel de abajo muestra una disección con clara evidencia de hígado verde.	134

LISTA DE TABLAS

Capítulo I.	Pág.
Índice de Tablas	
Table 1. Chemical composition (g 100 g ⁻¹ , d.w.b.) and gross energy (MJ kg ⁻¹) of practical diets for <i>Totoaba macdonaldi</i> during early and late juvenile stages and broodstock reared at the Autonomous University of Baja California, Mexico.	35
Capítulo II.	
Tabla 1. Pruebas de inducción hormonal con el análogo GnRH suministrado en suero salino y mediante implante de liberación prolongada.	80

CAPITULO I.

Captive breeding and husbandry of *Totoaba macdonaldi*: an endangered giant sciaenid from the Gulf of California.

¹Conal D. True, ²Craig V. Sullivan, ¹Gerardo Sandoval-Garibali,

¹Lus M. López-Acuña y ¹Norberto Castro-Castro.

¹Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas,
Km 103 Carretera Tijuana – Ensenada Código Postal 22860 , Ensenada, Baja California

²Department of Biology, North Carolina State University, Raleigh, NC 27607, USA

SENT TO: AQUACULTURE RESEARCH.

Correspondence: Conal D. True, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, Carretera Tijuana, Ensenada Km 103, Ensenada, Baja California, México. CP 22860. Email: ctrue@uabc.edu.mx

Running title: Totoaba captive breeding and husbandry.

Index words: Totoaba, reproduction, larval rearing, sciaeniade.

Abstract

The totoaba is a giant, endangered sciaenid from the Sea of Cortes. During the past 15 years, captive breeding procedures for this species have been developed and are reviewed here. Although they are physoclists prone to barotrauma during capture, wild totoaba readily adapt to captivity, usually accepting inert food within 7 days and easily transitioning to prepared broodstock diets. Adults undergo gonadal growth and exhibit courtship under simulated natural environmental conditions, but do not spawn volitionally in captivity and are induced to spawn by implantation with pellets containing a synthetic analog of gonadotropin releasing-hormone. As totoaba are not sexually dimorphic, identification of gravid female candidates for spawning is based on a simple test for detection of vitellogenin in their blood serum. Development of totoaba through metamorphosis during intensive rearing (26°C, 35 gL⁻¹ salinity) takes 35-50 days, after which time growth of juveniles fed practical diets is rapid and comparable to that in other cultured sciaenids. Major difficulties with early husbandry involve swim bladder over inflation during weaning from rotifers to artemia, and size disparity leading to cannibalism during the transition to granular or pelleted diets. Efforts to establish totoaba commercial aquaculture and fishery enhancement enterprises are presently underway in Mexico.

Key Words: Totoaba, sciaenid, induced spawning, reproductive behavior, GnRH α , vitellogenin, larvae, metamorphosis

Introduction

The totoaba, *Totoaba macdonaldi*, a giant sciaenid endemic to the Gulf of California, supported one of the most important marine fisheries in northwestern Mexico during the first 70 years of the 20th century (Flanagan & Hendrickson, 1976). Originally classified as *Cynoscion macdonaldi* (Gilbert, 1890), it has since been reclassified to a unique genus termed with its vernacular name “totoaba” (Villamar, 1980). Lack of proper fishery regulations and environmental protection led to the current status of totoaba as endangered. The species has been protected by the Mexican government with a fishery moratorium since 1975 (Flanagan & Hendrickson, 1976) and it has been listed by CITES to avoid international trade since 1976 (Barrera-Guevara, 1990). Interestingly, it was the totoaba swim bladder that was of value in the early fishery (Craig, 1926; Chute, 1928; Chute 1930). In the Orient, fish swim bladders are known as “fish maw” and are a valuable culinary and medicinal commodity (Lin, 1939), especially so for maw obtained from very large and long-lived species. The totoaba shares a striking similarity to a species from China known as Bahaba, *Bahaba taipingensis*, a fish with one of the highest valued maw, with prices up to \$20,000 for an individual bladder in the year 2000 (Sadovy & Cheung, 2003). Both species are giant croakers with estimated life spans around 50 years and reported sizes over 150 kg in body weight and exceeding 2 m in total length (Lin, 1939; Chu, 1963; Anderson, 1972; Flanagan & Hendrickson, 1976; Trewavas, 1977). Totoaba entered this unique fish maw market with initial values of \$11 kg⁻¹ during the 1950’s and soon were under heavy fishing pressure (Berdegue, 1955), which was exacerbated by later development of a sport fishery for the giant fish (Cisneros-Mata *et al.*, 1995) and by drastic environmental changes

resulting from the damming of the Colorado river in the early 1960's (Flanagan & Hendrickson, 1976).

Almost 15 years ago, we began to inquire whether a captive breeding program might be worth developing for totoaba fishery restoration (True *et al.*, 1996), as has been done for other overharvested and endangered fish species (Blankenship, 1995; Blaxter, 2000; Bell *et al.*, 2006). Other croakers had been successfully bred in captivity and supported aquaculture programs, including red drum, *Sciaenops ocellatus*, in Texas (Arnold, 1988), white sea bass, *Atractoscion nobilis*, in California (Hervas *et al.*, 2010), mullet, *Argyrosomus hololepidotus*, from Australia (Battaglione & Talbot, 1994), and yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* in China (Wan-shu & Qi-yong, 2002). Progress with aquaculture of these species and our review of the available literature on totoaba reproductive biology suggested that captive breeding of this species was feasible. It was clear we would need to capture wild broodstock, condition them to captivity, establish controlled environmental conditions to promote their gonadal growth, and develop procedures for inducing final maturation and spawning. Furthermore, we would need to establish reliable protocols for rearing larvae and juveniles. We have accomplished these initial steps toward captive breeding of totoaba, having established preliminary but reproducible procedures for the mass production of juveniles. This article is a summary of the present status and future directions of totoaba aquaculture based upon our research findings and presented as a guide to others engaging in propagation of this important, even iconic, species from the Gulf of California.

Reproductive life history

The known distribution of totoaba is from the uppermost area of the Colorado River Delta to a region around the mid rift islands halfway down the Gulf of California, on both the Sonoran and Baja California coasts (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). This distribution relates to a yearly reproductive migratory pattern (Flanagan & Hendrickson, 1976) thought to start from the islands during late winter and progress along the Sonoran coast where brood schools follow prey (mainly sardines) north to the delta area, where they will spawn in shallow waters during spring tides, after which time they return along the Baja California coast to their winter grounds (**Fig. 1**). During early spring and summer, the delta area serves as a spawning ground and then as a nursery for early life stages, from fertilized eggs on up to two year-old fish, while the southern region around the islands constitutes the winter grounds where adult and pre-adult fish congregate in deep waters (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). Juvenile totoaba eat small benthic organisms, mainly small crabs, fish, amphipods, and shrimp; adults prey on larger more pelagic items, such as sardines and adult crabs (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). Totoaba have been described as iteroparous fish, where females spawn only once each year (Barrera-Guevara, 1992) with average fecundity estimated by two different studies at 61,067 or 470,570 eggs kg⁻¹ (Barrera-Guevara, 1992 ; Coterio-Altamirano, 1993), length at first maturity of 1.2 m and 1.3 m for males and females, respectively (Arvizu & Chavez, 1972; Molina-Valdéz, 1988), and age at first reproduction being six years for males and seven years for females (Cisneros-Mata *et al.*, 1995).

Broodstock acquisition and adaptation to captivity

In our experience, pre-adult and adult totoaba feed close to the bottom at depths ~20 m or deeper when not spawning, do not feed during spawning, and associate with a combination of rocky and soft bottom habitats. They are physoclistous (have a closed swim bladder) and, if captured at depths greater than 10 m, suffer from different degrees of barotrauma depending upon depth. We initially utilized complex procedures to decompress captured fish (True *et al.*, 1997) but now we only fish during low tides at locations <20 m depth, such as rocky ledges, overhangs, and small seamounts, thus reducing the severity of barotrauma. We remove any excess gas by swim bladder puncture using a hypodermic needle (Keniry *et al.*, 1996), which results in ~60% survivorship following capture. Relative size distribution and abundance of captured adults has varied from one collecting trip to another and among locations, with larger but fewer adult fish being captured during trips in the northern delta area in contrast to greater numbers of younger, subadults being caught on trips to the midway archipelago (**Fig.1**). Immediately after capture, the totoaba are transferred from collecting skiffs to a mother ship with a large holding system made up of 8 individual 1 m³ bins, interconnected by a system in which seawater recirculation is provided by a 1 hp centrifugal pump, mechanical and biological filtration is accomplished using a 51 cm diameter, spherical sand filter, and supplementary oxygen is provided through airstones to each bin. The system, which provides for collection of up to 50 adult fish at a time, is operated as a flow through system while at sea. At port, the fish are transferred to conventional live hauling trucks for transport to our research facilities at the Autonomous University of Baja California.

Broodstock holding system

Upon arrival, the wild adult totoaba are tagged with 14 mm passive integrating transponders (AVID, Norco, CA) and transferred to one of our two final holding systems and further treated for lacerations and parasites as described by True *et al.* (1997). These simple, partially-recirculating seawater aquaculture systems (**Fig. 2**) are similar to those used to condition broodstock of related species for spawning (McCarty, 1987). The cylindrical holding tanks are fiberglass with a 2 inch foam core for insulation, 7.5 m in diameter and 2.3 m in depth up to the water line, holding $\sim 100 \text{ m}^3$ of seawater. The upper part of the tank extends 1.5 m above the water line and is covered with a cap (ceiling) to form an enclosed structure in which both day length and water temperature can be controlled. Access ports for feeding and service are located in this upper section. A window in the bottom section provides for observation of the fish. Mechanical and biological filtration are accomplished using two 91 cm diameter, spherical sand filters with total tank volume turning over every 8 h via new seawater supplied by a 3 hp centrifugal pump. Additionally, culture water (190 l min^{-1}) is passed through a 150 W UV sterilization unit and a cylindrical foam fractioner (40 cm dia. X 305 cm h) to lessen bacterial load and dissolved organics. Water discharge from the holding tank is directed to a 2 m^3 sump that can be fitted with 300 μm mesh bag for collection of spawned eggs.

Practical diets for broodstock and juveniles

Once the totoaba have overcome capture and transport stress, they adapt readily to captivity, feeding on raw food items similar to their natural diet, such as squid, shrimp or sardines (Cisneros-Mata *et al.*, 1995) within 2-3 weeks after capture, however, such a diet does not ensure long term reproductive health. Broodstock nutritional requirements are typically difficult to assess and have a direct relation to reproductive success (Izquierdo *et al.*, 2001). While our limited infrastructure and broodstock availability made detailed nutritional studies impossible, we have developed practical diets for adult and juvenile totoaba that have resulted in good adult reproductive success and juvenile survival and growth (discussed below). For our purposes, practical diets for totoaba needed to be reproducible and made of locally available ingredients, easily prepared, adjustable over time, and amenable to preparation of pellets large enough ($\simeq$ 2 cm dia.) for presentation to the broodstock. We produce a soft food pellet made with an industrial meat grinder-sausage machine (4346 Mixer/Grinder, HOBART, Troy, OH). The diet (**Table 1**) was developed empirically from general information available in the fish nutrition literature (Love, 1970; Halver, 1989) with protein and lipid content being gradually adjusted over time by observing apparent digestibility (amount of feces left in tank $\sim$ 45m and 24 h after feeding) and by evaluating visceral fat content and liver appearance (healthy or otherwise) for fish that have been necropsied over the years. The main protein source has remained marine fish meal varying from 45-60% of the diet by weight, with no apparent effects on broodstock health or reproductive performance, suggesting that, within these limits, protein levels are adequate and the gross energy content of the diet is not excessive (Izquierdo *et al.*, 2001).

However, high levels of lipid (>22% by weight), even though being totality of marine origin, reduced apparent digestibility (as evidenced by observation of increased feces production), and increased peritoneal fat deposition associated with fatty liver disease (evidenced by a creamy color compared with livers of healthy fish) if maintained for long periods (>6 months). Fatty liver disease (steatosis) in fish fed high lipid levels has previously been reported for juvenile teleosts and for haddock broodstock (reviewed by Bolla *et al.* 2011). Our juvenile and adult diets are presently 10-15% fat by weight. Addition of 1.5 g kg⁻¹ vitamin E and 3.0 g kg⁻¹ of vitamin C to our broodstock diet has been empirically associated with improved reproductive performance, as a significant reduction in larval-juvenile deformities has been observed, with incidence rates decreasing from 30% to less than 10% (Cahu *et al.*, 2003). Common deformities observed in totoaba have been missing operculum, fused vertebrae and lordosis. Initial acceptance of inert formulated food by recently captured broodstock has been reduced from 3 weeks to 7 days by adding raw squid and krill meal both as a protein source and as an “attractant”. Presently, we feed the broodfish at a rate of 1-3% of body weight (BW) every 2nd or 4th day, depending on the time of year, whereas juveniles are fed 3-6% BW D⁻¹ depending on their developmental stage.

Environmental conditioning for spawning

Natural annual cycles of photoperiod and water temperature are simulated to promote maturation of the captive totoaba broodstock. Photoperiod was established in reference to a fixed geographical location from their natural habitat (114°W 30°N), an area midway along

their natural distribution (**Fig. 1**), and four florescent daylights (40W each) on a digital timer provide 100-320 lux at the water surface to simulate natural photoperiod conditions. The water temperature regime used to condition broodstock is a hypothetical reconstruction from two field data sets (**Fig. 1**); one from the northern delta area reported by Granados-Guzmán & Hidalgo-González (1994) where we averaged monthly registers for spring, summer and autumn conditions from two consecutive years, and the second one from López & García (2003) where deep water temperatures around the islands were reported for winter conditions. Temperature is maintained by circulating seawater through heat exchanger plates connected to central heating and chilling units (**Fig. 2**). The annual photo-thermal regime is advanced by 2 months with respect to the actual calendar so that February actually corresponds to April inside the fish tank, allowing early spawning and providing additional time to complete juvenile grow-out before winter conditions require considerable heating of the water (**Fig. 3**).

Puberty and gender identification

The age of our captured totoaba broodstock has ranged from 3-18 years based on routine scale analyses. Under captive conditions, females appear to mature in their 5th or 6th year of age (100-130 cm TL), whereas males typically do so during their 5th year (70-90 cm TL), although we have observed spermiation in a few 4-year-old males. This corresponds with what has previously been described for this species regarding length at first maturity, where males are smaller than females (Arvizu & Chavez, 1972; Molina-Valdéz, 1988), although

totoaba appear to mature one year earlier in captivity than do free ranging wild fish (Cisneros-Mata *et al.*, 1995).

Although totoaba males are slenderer and slightly shorter than females of same age (~4/5 of female length), the species exhibits no obvious sexual dimorphism outside the breeding season. Maintenance of suitable sex ratios of broodstock, allocation of limited culture resources by gender, and identification and targeting of specific females for induced maturation and spawning all require that maturing females be identified well before breeding. Given the rarity and value of captive totoaba broodstock, we avoid ovarian biopsy (King *et al.*, 1994; Asturiano *et al.*, 2000) until the spawning season in order to avoid potential damage to reproductive tissues. Instead, a simple method for gender identification based on detection of the yolk protein precursor, vitellogenin (Vtg), in blood serum is utilized. This protein has proven useful as a marker for identification of females undergoing gonadal growth (vitellogenesis) in other teleost species (Takemura & Oka, 1998; Heppell & Sullivan, 2000; Chu-Koo *et al.*, 2009). To develop the test, blood samples were obtained just before the breeding season from gravid females identified by ovarian biopsy and from spermiating males. Blood plasma from the females was subjected to anion exchange chromatography on Poros 50 media (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the peak fractions containing the complete forms of Vtg, VtgAa and VtgAb (Reading *et al.*, 2009), were collected (**Fig. 4A**) as described by Hiramatsu *et al.* (2002). These fractions were then subjected to double immunodiffusion using totoaba male and female plasma as negative and positive controls, respectively, and an antibody against Vtgs from another perciform fish (**Fig. 4A, inset**), the striped bass, *Morone saxatilis* (Hiramatsu *et al.*, 2002).

The peak Vtg fraction and female plasma reacted strongly with the antibody and male plasma did not, verifying that this peak fraction contained totoaba Vtgs. Thereafter, plasma samples taken from totoaba broodstock of unknown gender have been subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by (Hiramatsu *et al.*, 2002) using the peak Vtg fraction and plasma from known gravid females as positive controls and plasma from spermiating males as the negative control (**Fig. 4B**). This test based on the presence of an ~170 KDa band in “positive” females allows for economical and reliable identification of vitellogenic female totoaba several months before the breeding season, although we usually perform the test two months before spawning when we initially identify candidate breeders.

Reproductive ethology

As in other sciaenid species, tonal differences in body coloration are only evident in totoaba during the spawning season and are a response to courtship (Guest & Lasswell, 1978; Aalbers & Drawbridge, 2008). Totoaba males exhibit the most distinct change, blanching from a brown-copper-gold to a light silvery color, whereas females remain brown-copper-gold. Under captive conditions outside the reproductive season the fish have no distinct color differences between genders, they do not display any obvious gender-based behaviors, and they occupy the entire water column in the tank (**Fig. 5A**). One or two weeks prior to spawning, the fish exhibit a tonal color change as described above, males assume a lighter coloration and females remain largely unchanged (**Fig. 5B**). In addition to the tonal color change in males, most fish periodically aggregate together with equidistant

spacing and assume a head down position at an $\sim 45^\circ$ angle to the bottom of the tank (**Fig. 5C**), and they retain this position and distribution for various lengths of time (~ 5 to 20 m). This behavior is constantly repeated unless interrupted by an outside stimulus such as a sudden sound or feeding. Obvious courtship behavior is only evident when an extremely gravid female is present and males have initiated spermatation. During courtship, females are followed closely by as many as 3 males and rapidly swim towards the water surface where males push and nudge females in the ventral area with their snouts, after which they may break away and return to the head down position or swim randomly about the tank. This conduct intensifies once fish have received GnRHa implants (discussed below). During courtship and spawning, feeding is significantly reduced. During pre-spawning behavior and spawning, sound production is evident, with loud clicks and grunts constantly being heard and intensifying towards the evening hours. During spawning, males flank females in a very tight group as they swim up toward the surface (**Fig. 5D,E**). Spawning usually is initiated around dusk and the actual release of eggs (verified by collection in the external egg trap) is commonly accompanied by a distinct “purring” sound. Such sound production by sciaenid fishes has previously been described as an important component of reproductive behavior, possibly involving mate selection or timing of gamete release and in some species being gender-specific while in others involving both the male and female (Fish, 1972; Mok, 1983; Connaughton, 1996). It is not known whether both totoaba sexes are acoustically capable, and we have not yet examined totoaba for gender-based differences in development of sonic muscles attached to their swim bladders (Vance *et al.*, 2002). However, during handling for biopsy or hormone implantation, the males tend to grunt repeatedly and the females do not.

Selection of candidate spawners

Once environmental spawning conditions (April-May) are simulated, the fish are observed daily for pre-spawning and courtship behaviors. Once these are observed, positively identified females with highly distended abdomens are captured, anesthetized in a 50mg L⁻¹ bath of tricainemethanesulfonate (MS-222; Western Chemical Inc., Ferndale, WA) and biopsied for ovarian tissue using a plastic cannula (2mm ID) inserted into the ovary through the urogenital pore (King *et al.*, 1994). Sampled tissue is immediately transferred to ice-cold 0.9% NaCL, observed under a stereomicroscope, and photographed for further measurements. Diameters of at least 100 of the largest oocytes are measured to the nearest 25 μm and a subsample of tissue is also cleared with a clearing fixative (Pankhurst, 1985) in order to assess the position of the oocyte germinal vesicle in the largest oocytes. Ovarian biopsies are repeated weekly until suitably mature brood females are identified for hormone treatment; these exhibit average maximum oocyte diameters $\geq 600\mu\text{m}$ with the largest oocytes containing a migrating germinal vesicle (MGV). Males are assessed for the presence of milt after gentle abdominal palpation. After being treated with hormones, the fish are returned to the breeding tank and are allowed to spawn volitionally.

Induction of final maturation and spawning

In our initial spawning trials, totoaba that were held under the simulated natural photo-thermal conditions for ~2 years and were not treated with hormones produced fully grown MGV stage oocytes or spermated, and exhibited courtship behaviors, but did not actually spawn. This block to spawning, which is commonly observed in many cultured teleost

species and is presumably due to lack of natural cues that trigger final maturation coupled with stressors present in the culture setting, can be overcome by timely administration of a synthetic analog of gonadotropin releasing-hormone (GnRHa) (reviews: Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas *et al.*, 2010). In later trials in which fish meeting the criteria discussed in the previous section were injected with $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ GnRHa in 0.9% saline (Gwo *et al.*, 1993), the females ovulated once or twice within 72 h after hormone injection, but the timing of spawning and egg quality were highly variable between females. We later switched to utilization of implanted pellets that slowly release GnRHa prepared as described by Hodson & Sullivan (1993), an approach that has resulted in more predictable timing, with one or two consecutive spawns generally occurring ~ 36 and ~ 60 h after hormone implantation, but for which high variability in egg fertility between females remained.

Our most recent iterations of this procedure performed with totoaba captured as subadults (3-4 years of age) and held in captivity under simulated natural photothermal conditions until they reached full maturity have produced excellent results, as shown for 2009 (**Fig. 6**). Nine females were induced to spawn during a 60-day period, with some females spawning up to 8 consecutive times. This result provides conclusive evidence that the totoaba is a group synchronous, multiple clutch spawner and not a single batch spawner as suggested by Barrera-Guevara (1992). Moreover, most spawns were of high quality as judged by the percentage of viable, floating eggs versus sinking eggs in the spawn and the percentage of viable eggs hatching. Viable totoaba eggs are translucent with an average diameter of $830 \pm 100 \mu\text{m}$, may contain single or multiple oil droplets, are neutrally buoyant in seawater, and are usually fertilized and give rise to hatched fry if males adequately release semen

during the spawn. For each spawn, we harvest eggs from the external tank trap, count them via volumetric procedures, assess the proportion of viable (floating) versus sinking eggs in a graduated cylinder, and later enumerate the number of hatched fry during incubation (discussed below).

Also evident in **Fig. 6** is the gradual reduction in the number of eggs produced by a given female over consecutive spawns. Estimates of total egg production (all spawns) for a single ~20 kg female range from 0.5 to over 10 million eggs, which is within the range of previous estimated fecundity for this species (Barrera-Guevara, 1992; Coterio-Altamirano, 1993). However, it is uncertain whether or not the reduction for individual females in eggs produced per spawn over time is an artifact related to depletion of GnRHa from the implants or stress related due to repeated handling of the fish prior to spawning. Various stages of ovarian atresia were evident in ovarian biopsies taken at the conclusion of spawning trials from females that spawned multiple times, and the incidence of atretic oocytes was particularly high for the last two females to reproduce (females VIII and IX), which were biopsied more times before spawning and spawned only once or twice.

Larval and juvenile husbandry

Our larval rearing approach relies on intensive culture procedures based on progress with related species (Holt *et al.*, 1981; Holt, 1990; Dutton, 1992; Battaglione & Talbot, 1994) and on emerging knowledge of marine fish larvaculture in recirculating aquaculture systems (Lee & Ostrowski, 2001; Kolkovski *et al.*, 2004). The current totoaba larviculture system is composed of four 2200 L, insulated, cone bottom fiberglass tanks, 1.3 m in

diameter and 2.4 m in depth, that are supplied by water from a recirculating aquaculture system (RAS). Culture tanks have a central standpipe for control of internal water level covered by an outer standpipe with both surface and deep screens for wastewater removal. Wastewater is collected in a sump from where it is removed by a 1.5 hp centrifugal pump and passed through a set of 25 to 50 micron bag filters (Canister Type, FSI, Michigan City, USA) to remove particulate waste, further passed through a DF6 POLYGEYSER BIOFILTER™ (Aquaculture Systems Technologies, New Orleans, LA) and a 50 W UV sterilizer (HO-UV, Emperor Aquatics, Inc., Pottstown, PA) and then delivered to a head tank from where it returns to culture tanks. New seawater (35 gL^{-1}) is added daily at a rate 3-10% of system volume. Water flow through each culture tank is adjusted over the larval rearing period (~25 days) from 4 L m^{-1} initially to 8 L m^{-1} by the time fry are harvested. An alternate loop is used for temperature control, where culture water is circulated through heat exchanger plates connected to a central heating and cooling system and maintained at 24-26 °C. Lighting is provided by 20 W incandescent reflector lamps dimmed to a low setting (100-50 Lux at the water surface), with a 12L:12D photoperiod cycle provided via a digital light timer. Light aeration is maintained in the culture tanks to prevent stratification and to maintain uniform larval distribution.

Current initial stocking density of the tanks is ~ 100 fertile eggs L^{-1} , although this has ranged from 50 to 125 fertile egg L^{-1} over the years due to variable egg availability, egg quality and live larval feed production capabilities. Embryo development is very fast. First cell division occurs within 10-20 m after fertilization and, by 22-24 h, hatching is initiated at 26°C. At this stage, larvae emerge at $\text{TL} = 2462 \pm 60 \text{ }\mu\text{m}$ and, as with other sciaenids (Holt

et al., 1981; Moser, 1983; Battaglione & Talbot, 1994), they have a large yolk sack that contains a single or multiple oil droplets ($\sim 50 \pm 20 \mu\text{m}$ diameter), lack a functional mouth and gut, and have poor eye development and undeveloped fins. As they progress through the following 36 h the larvae consume their yolk sac and gradually develop a digestive system with evident peristaltic movement in the gut and, by 72 h after hatching, they have functional eyes and mouth with a TL = $3000 \pm 218 \mu\text{m}$. Swim bladder inflation initiates at 3 days post hatch (dph) and is completed by 4 dph, by which time the only remaining evidence of the yolk sack is the oil droplet and the larvae have a TL = $3398 \pm 313 \mu\text{m}$. As in other marine fishes, swim bladder inflation involves larvae swimming up to the surface and gulping a small amount of air to fill their bladder (Woolley & Qin, 2010). At this time (3-6 dph) surface cleanliness of the air to water interface in the culture tanks is maintained by skimming, a process performed daily using handmade styrofoam booms with which we aggregate surface scum and oil and remove it into a beaker (Kolkovski *et al.*, 2004). Once 80% of larvae have completed swim bladder inflation as evaluated by direct observation of groups of 30 larvae under a stereo microscope, we begin feeding.

Our feeding regime is very similar to that used for other sciaenids with small mouth sizes in intensive rearing (Holt, 1990; Battaglione & Talbot, 1994; Ballagh *et al.*, 2010; Roo *et al.*, 2010) starting with rotifers followed by artemia nauplii and finally weaning the fish onto a formulated diet (**Fig. 7a**). During the 8 days following swim bladder inflation, larvae are feed 24 h enriched rotifers (ALGAMAC 3000, Aquafauna Bio-Marine, Inc., Hawthorne, CA) at a concentration of $10 \text{ rotifers mL}^{-1}$, 3 times a day and progressively substituted for newly hatched artemia nauplii. By 11 dph, the larvae attain a TL of $4912 \pm 519 \mu\text{m}$, at

which time the “flexion” stage is initiated, where the urostile is upwardly flexed to form the caudal fin. From 11-15 dph, newly hatched artemia are replaced by 24 h enriched metanauplii (ALGAMAC 3000) up until 24 dph, with prey concentrations adjusted from 0.5 to 2 artemia mL⁻¹. By 22 dph, larvae reach an average TL of 9550 ± 800 µm. Growth during this period is very fast, with the larvae growing to almost 4 times their initial size from 5-22 dph (**Fig. 7a**).

During rotifer to artemia substitution (~11-15 dph) swim bladder over inflation has been a significant problem, sometimes producing mortalities of >95%. This syndrome has many possible causes and is difficult to study because of the small size of the larvae and their rapid development (Woolley & Qin, 2010). Initially we associated it with gas oversaturation caused by recirculation of our culture water, as low gas saturation could be one of the environmental conditions during early development in the delta area (natural habitat) as it is a rather shallow and high temperature environment (Carriquiry & Sanchez, 1999). We constructed a vacuum degasser (Fuss, 1986) and integrated it into our culture system, thus reducing saturation levels to 90, 60 and 30% of normal values (100% sat ~7.2 mg L⁻¹, 25 °C and 33 gL⁻¹) with mostly inconclusive results (data not shown). We later considered that obstruction or infection of the pneumatic duct and/or swim bladder itself was a possibility, either from surface debris during initial swim bladder inflation and/or pathogens emanating from the live prey (rotifers and artemia). Hence, we intensified surface skimming and established a rinsing procedure for our live feeds. Rinsing of live feeds is done within a harvesting vessel fitted with a screen of mesh size adequate to retain the feed, allowing sterile, filtered sea water to wash live feeds at a flow rate of 10 Lm⁻¹ for

at least 40 min prior to feeding. Average larval survivorship to 15 dph has increased from less than 5% to over 60%, based on repeated volumetric larval counts, since the rinsing procedure was introduced.

Heterogeneous size distribution of larvae and resulting cannibalism are a common problem in intensive larviculture arising from a number of factors, such as inadequate feeding, heavy stocking, large temperature variations and genetic makeup, as examples (Smith & Reay, 1991). For totoaba, we have observed that regular feeding at short intervals (every 4 h) and reduction of light intensity (to ~50 lux) appears to yield a more uniform larval size distribution and, therefore, lessens cannibalism. During the period from 20-26 dph, larvae switch from inhabiting the water column to exhibiting bottom dwelling behavior. At this age, young fish are harvested and moved to a grow out system where they are weaned onto a dry commercial marine larval diet (Otohome, Tokyo, Japan) by gradually replacing the artemia with increasing crumble sizes (0.36-1.80 mm). Size grading of the fish at this stage has proven to be very important for normalizing fish size distribution in individual tanks and in reducing cannibalism. Growth and development from this point onward is similar to that for other cultured sciaenids (Holt, 1990; Battaglene & Talbot, 1994; Ballagh *et al.*, 2010; Roo *et al.*, 2010) where juveniles are fed roughly 3%-1% body weight day⁻¹.

Early juvenile grow out procedures

Our totoaba grow-out RAS has the same setup as our larval rearing system with some exceptions, as follows. Mechanical filtration is done with 100 and 200 µm bag filters. The culture tanks are larger fiberglass, sloped bottom units with 8 m³ capacity, 3.3 m in

diameter and 1.2 m depth to the water line. They have both a central and side drain for wastewater removal and surface skimming, respectively. Individual flow to these tanks is kept at 8 turnovers per day with adjustment of the incoming water direction so as not to cause excessive water velocities. Aeration and/or oxygen are supplemented to maintain oxygen levels over 4 mg L⁻¹. Initial stocking density has varied considerably over the years due to changes in juvenile availability from larval rearing. We currently harvest our larval rearing system around 26 dph, grade the fingerlings using a box-type bar grader to remove large fish (<14,000 µm TL) and small fish (<7000 µm TL), and stock the remaining more abundant middle size grade (~12,000 µm TL) into our grow out system at a density of 1000-1500 fish m³.

Studies of nutritional requirements for juvenile totoaba led us to formulate the practical diet that we use for this early grow out stage (López *et al.*, 2006; Solorzano-Salazar *et al.*, 2006). As shown in Table 1, the overall protein and lipid content of the diet reflect the needs of a carnivore together with an expected low tolerance to carbohydrates. In unpublished preliminary diet trials, very high levels of energy (> 21 MJ/kg gross energy) and carbohydrates (> 100 g kg⁻¹ diet) appeared to hinder growth and impair the overall health of juvenile totoaba. We have found that liver is highly affected and exhibits what has been described as “Green Liver Syndrome” for other marine species (Takagi *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2008), which appears to be related to a lack or reduced accessibility of taurine, a nutrient required for bile transport in carnivores. Addition of taurine at 0.5-2% by weight into our juvenile diets has largely eliminated the occurrence of green liver syndrome. The juveniles are feed a high protein diet (500-600 g kg⁻¹ diet) in a progression

of crumble and pellet sizes from ~2 mm to the final 3.5 mm at a rate of ~2-4% BW day⁻¹ divided in to three rations fed by hand or using an automatic feeder. Post-metamorphic juveniles can be fed a lower protein diet (450-550 g kg⁻¹ diet), **Table 1**.

Juveniles at this stage have a distinct pigmentation where chromatophores appear scattered just below the dorsal fin, a series of side bars follow the lateral line, and fins that appear pigmented. They prefer to remain close to surfaces, mostly the bottom but also the tank walls, and they only approach the tank surface during feeding. By 45-50 dph, they have undergone final stages of metamorphosis, attaining a copper-gold tone with scattered dark brown small chromatophores all over their body and resemble an adult fish, thus they are termed “juveniles”. Growth during this stage is still very rapid, and changes in length and weight are similar in rate from week 7 to 28, with the fish attaining a TL of 20 ± 1.5 cm and a wet weigh of 152 ± 25 g by week 30 (**Fig. 7b**). Juveniles at this stage/size have been transferred to commercial farm settings or have been tagged and released into the wild. In our current experience, survival of totoaba during early juvenile rearing ranges from ~2.0-4.0% from 2 dph until the end of week 28 with ~80% of the fish showing no apparent physical abnormalities.

Size disparity and cannabilism is minimized by routine grading (every two weeks) of the fish from ~30 dph until the fish are ~4 months of age. Water temperature requirements for early juvenile stages of totoaba have not been thoroughly investigated, but we have observed that, under laboratory conditions, they feed actively from 13 to 28 °C and stop feeding at or below 11°C. At low temperatures, roughly 13-15 °C, they require at least ~60 h for complete digestion (evidenced by gut fullness in dissected specimens sampled at

different times after feeding) and at temperatures above 22 °C, digestion takes place within ~24 h .

Health and disease issues

Most health problems with our totoaba have been caused by protozoan parasites. Outbreaks appear to coincide with acute temperature changes (e.g. spring to summer and summer to autumn transitions). Our broodstock, and to a lesser extent juveniles during grow out, routinely get infested with one of at least 3 types of protozoa: *Oodinium*, *Cryptocaryon*, and *Uronema*. They all share similar symptomology and all appear as dispersed talcum-like or velvet-like patches, or very small white dots, spread all over the fish's body (they may cover the eye giving it an opaque *appearance*). Such infestations are usually associated with loss of appetite and lethargic behavior. Treatment is standard and the same for all afflictions (Noga, 2000), involving copper sulfate and formalin baths (1mg L⁻¹ CuSO₄, 3.7 mg L⁻¹formalin) for no longer than 4h, with subsequent 100% water renewal. Baths are administered for two consecutive days and then every other day until 7 baths are completed, thus disrupting the protozoan's life cycle with an almost 100% effectiveness. Only in severe cases have two rounds of baths been required. Other problems have been bacterial and difficult to diagnose. Many appear as typical fin rot (Noga, 2000) and ulcers on the dorsal, ventral and facial areas. In some cases during necropsies, liver degeneration and gill discolorations have been evident, but these have not been associated with a specific illness or pathogen other than the fatty liver disease and green liver syndrome previously described. The only bacteria that we have positively identified are *Flexibacter* sp observed

by direct fresh mount observation and *Vibrio sp* identified through bacterial thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) culture media (Lotz *et al.*, 1983). Flexibacter appears in dorsal, ventral and mouth lesions; they have a fibrous appearance in wet mounts and are commonly mistaken for fungi. Treatment has been to incorporate antibiotics, *oxytetracycline* or amoxicillin, into the feed (Soltani *et al.*, 1995) for a 9 d period, with variable results. *Vibrio* is usually associated with high organic loads and low dissolved oxygen, such as when feces or mortalities accumulate in the culture tanks, and can be provisionally identified from pink stains on the tank walls at the water surface. Usually, aggressive tank cleaning, maintenance of proper water circulation, and avoidance of oxygen levels <3mg L are adequate preventative measures. When *Vibrio* spreads on the fish, lesions resemble typical fin rot, with highly inflamed lacerations and, in extreme cases, loss of the caudal fin, which may spread to other fins. Treatment has been to feed diets supplemented with the antibiotic, *oxytetracycline* (Noga, 2000), with good results.

Summary

Although future improvements in propagation of captive totoaba are anticipated, the results of our 2009 and later spawning and rearing trials confirm that our present collective procedures for environmentally and nutritionally conditioning broodfish, selecting candidate spawners, hormonal induction of spawning, and rearing of larvae and juveniles are adequate for mass production of fingerlings for the purposes of commercial aquaculture and fishery enhancement. We have recently initiated several grow out trials on commercial fish farms, where comparisons of extensive vs intensive rearing will provide baseline

information for continued development of totoaba aquaculture. Furthermore, evaluations of the genetic variability of captive and wild stocks of totoaba are underway and we have released ~12,000 tagged fish into the wild in an effort to assess the feasibility of a fishery restocking program. Additional understanding of the genetics, reproductive biology, ontogeny, nutritional physiology and growth of totoaba under captive conditions will promote further aquaculture development.

Acknowledgments

The authors would like to thank Javier Valverde and Francisco Valverde for sharing their invaluable knowledge and guidance during broodstock acquisition. We also kindly thank Sr. Tony Reyes and sons for providing guidance and countless ship hours during our long-range collecting trips. Special thanks are due to Antonio Silva Loera for his stewardship during the first 5 years of the project. We extend thanks to Jorge de la Rosa Velez and Luis Enríquez Paredes for sharing valuable insight during this research. Special gratitude is given to Don Kent and Mark Drawbridge from Hubbs Sea World Research Institute for the early years of experience in intensive marine fish culture and for their continued collaboration. We also thank Ivan Monay, Eduardo Talamás and Miguel Espinosa, among others on our past and present technical staff, and all students and volunteers for their unconditional assistance. Special thanks are due to Ben Reading and Valerie Williams for providing technical assistance and insight during development of the vitellogenin assay. Institutional thanks extend to UABC, to our School of Marine Science, SAGARPA/CONAPESCA, SEMARNAT/Vida Silvestre, to our State Government

“SEPESCA-BC”, our local gas company “Grupo Z Gas”, to the past committee for “Vaquita and Totoaba Preservation”, to “Fundacion Selva Negra” and “Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza” and to CONACYT among other institutions that have made this project viable through funding and logistical support. All broodstock used during this research were collected under special permits as follows: 090394-310-03 (Secretaría de Pesca 1994); 200596-213-03 (SEMARNAP 1996); 08052000-213-03 (SEMARNAP 2000) and SGPA/DGVS-04294 (SEMARNAT 2005).

References

- Aalbers, S.A. and Drawbridge, M.A. (2008) White seabass spawning behavior and sound production. *Transactions of the American Fisheries Society* **137**, 542-550.
- Anderson, E.N. (1972) Essays on south China's boat people. *Asian Folklore & Social Life Monographs-Taipei: The Orient Cultural Service*, pp 1-146.
- Arnold, C.R. (1988) Controlled year-round spawning of red drum *Sciaenops ocellatus* in captivity. In: Arnold, C.R.; Holt, G.J.; Thomas, P. Eds *Red Drum Aquaculture Proceedings of A Symposium on the Culture of Red Drum and Other Warm Water Fishes. Contributions in marine science supplement to Vol 30. Marine Science Institute. Port Aransas Texas*. pp 65-70.
- Arvizu, J. and Chavez, H. (1972) Sinopsis sobre la biología de la totoaba *Cynoscion macdonaldi*, Gilbert 1890. *Fisheries series 108, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy*. pp 1-25.
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Ramos, J., Kime, D.E., Carrilo, M. and Zanuy, S. (2000) Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach. *Journal of Fish Biology* **56**, 1155-1172.
- Ballagh, D.A., Fielder, D.S. and Pankhurst, P.M. (2010) Weaning requirements of larval mullet, *Argyrosomus japonicus*. *Aquaculture Research* **41**, e493-e504.

- Barrera-Guevara, J.C. (1990) The conservation of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert), (Pisces: Sciaenidae), in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Fish Biology* **37** (Supplement sA), 201-202.
- Barrera-Guevara, J.C. (1992) Biología reproductiva de la totoaba *Totoaba macdonaldi* (Gilbert)(1891) (Teleostei: Scienide). MSc. Thesis. *Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, "Campus Guaymas"*. pp 72.
- Battaglene, S.C. and Talbot, R.B. (1994) Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture* **126**, 73.
- Bell, J.D., Bartley, D.M., Lorenzen, K. and Loneragan, N.R. (2006) Restocking and stock enhancement of coastal fisheries: Potential, problems and progress. *Fisheries Research* **80**, 1-8.
- Berdegue, A.J. (1955) La Pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* **16**, 45-78.
- Blankenship, H.L. and Leber, K.M. (1995) A responsible approach to marine stock enhancement. *American Fisheries Society Symposium* **15**, 167-175
- Blaxter, J.H.S. (2000) The enhancement of marine fish stocks. *Advances in Marine Biology* **38**, 1-54.
- Bolla, S., Nicolaisen, O. and Amin, A. (2011) Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. Histological and biochemical aspects. *Aquaculture* **312**, 117-125.
- Caballero, M.J., López-Calero, G., Socorro, J, Roo, FJ, Izquierdo, M.S. and Fernández, A.J. (1999) Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **179**, 277-290.
- Cahu, C., Zambonino-Infante J. and Takeuchi, T. (2003) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* **227**, 245-258.
- Carriquiry, J.D. and Sanchez, A. (1999) Sedimentation in the Colorado River delta and upper Gulf of California after nearly a century of discharge loss. *Marine Geology* **158**, 125-145.
- Cisneros-Mata, M.A., Montemayor-Lopez, G. and Roman-Rodriguez, M.J. (1995) Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology* **9**, 806-814.

- Connaughton, M.A. and Taylor, M. H. (1996) Drumming, courtship, and spawning behavior in captive weakfish *Cynoscion regalis*. *Copeia* **1996**, 195-199.
- Cotero-Altamirano, C.E. and Tapia-Vázquez, O. (1993) Madurez y fecundidad de la Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert en la prospección invierno-primavera 1987. *Secretaria de Pesca, Instituto Nacional de la Pesca, Centro Regional de Investigación Pesquera de Ensenada, Baja California, Mexico*.
- Craig, J.A. (1926) A new fishery in México. *California Fish and Game*. **12**, 166-169.
- Chu-Koo, F., Dugué R., Alván-Aguilar, M., Casanova-Daza, A., Alcántara-Bocanegra F., Chávez-Veintemilla C., Duponchelle F., Renno J.F., Tello S. and Nuñez J. (2009) Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry* **35**, 125-136.
- Chu, Y.-T., Lo Y.-L. and Wu H.-L. (1963) A study on the classification of the sciaenid fishes of China, with description of new genera and species. *Science and Technology Press Shanghai*.
- Chute, R. (1928) The totuava fishery at the California Gulf. *California Fish and Game* **14**, 275-281.
- Chute, R. (1930) "Seen Kow", a regal soup-stock. *California Fish and Game* **16**, 23-351.
- Dutton, P. 1992 Effects of experience on feeding success by larval white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Journal of Fish Biology* 41(5), 765–773.
- Fish, J.F. and Cummings, W.C. (1972) A 50-dB increase in sustained ambient noise from fish *Cynoscion xanthulus*. *Journal of the Acoustical Society of America* **52**, 1262-1270.
- Flanagan, C.A and Hendrickson, J.R. (1976) Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin* **74**, 531-544.
- Fuss, J. (1986) Design and application of vacuum degassers. *The Progressive Fish-Culturist* **48**, 215–221.

- Gallagher, M. (1996) Growth responses and liver changes in juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) associated with dietary protein and lipid level. *Journal of Applied Aquaculture* **6**, 75-85.
- Guest, W.C. and Lasswell, J.L. (1978) A note on courtship behavior and sound production of red drum. *Copeia* **1978**, 337-338.
- Granados-Guzman, A. and Hidalgo-González, R. (1994) Variabilidad temporal de temperatura en dos localidades del Alto Golfo de California de Marzo 1990 a Marzo de 1993. In: *Serie Ecológica*. Centro de Investigación Científica y Educacion Superior de Ensenada, Ensenada Baja California, pp. 27.
- Gwo, J.C., Strawn, K. and Arnold, C.R. (1993) Induced ovulation in Atlantic croaker (Sciaenidae) using hCG and an LHRH analog: A preliminary study. *Theriogenology* **39**, 353-361.
- Halver, J.E. (1989) *Fish nutrition.*, Academic Press, San Diego.
- Heppell, S.A. and Sullivan, C.V. (2000) Identification of gender and reproductive maturity in the absence of gonads: muscle tissue levels of sex steroids and vitellogenin in gag (*Mycteroperca microlepis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**, 148-159.
- Hervas, S., Lorenzen, K., Shane, M.A., and Drawbridge, M.A. (2010) Quantitative assessment of a white seabass (*Atractoscion nobilis*) stock enhancement program in California: Post-release dispersal, growth and survival. *Fisheries Research*, **105**, 237-243.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Hara, A., Donato, D.M., Hiramatsu, K., Denslow, N.D. and Sullivan, C.V. (2002) Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 355-370.
- Hodson, R.G. and Sullivan, C.V. (1993) Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected hCG. *Aquaculture & Fisheries Management* **24**, 389-398.
- Holt, J., Arnold, C.R. and Riley, C.M. (1990) Intensive culture of larval and post larval red drum. In: G.W. Chamberlain, R.J. Midget, & M.G. Haby (eds.), **Red Drum**

- Aquaculture*, pp. 53-56. Texas A&M Sea Grant College Program No. TAMU-SG-90-603. College Station, Texas, United States of America.
- Holt, J., Johnson, A.G., Arnold, C.R., Fable, W.A, Jr. and Williams, T.D. (1981) Description of eggs and larvae of laboratory reared red drum, *Sciaenops ocellata*. *Copeia* **1981**, 751-756.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H. and, Tacon, A.G.J (2001) Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* **197**, 25-42.
- Keniry, M.J., Brofka, W.A., Horns, W.H. and Marsden, J.E. (1996) Effects of decompression and puncturing the gas bladder on survival of tagged yellow perch. *North American Journal of Fisheries Managemen.* **16**, 201-206.
- King, W.5th., Thomas, P., Harrell, R.M., Hodson, R.G. and Sullivan, C.V. (1994) Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *General And Comparative Endocrinology* **95**, 178-191.
- Kolkovski, S., Curnow, J. and King, J. (2004) Intensive rearing system for fish larvae research: I. Marine fish larval rearing system. *Aquacultural Engineering* **31**, 295-308.
- Lee, C.S. and Ostrowski, A.C. (2001) Current status of marine finfish larviculture in the United States. *Aquaculture* **200**, 89-109.
- Lin, S.Y. (1939) Fish air-bladders of commercial value in China. *The Hong Kong Naturalist* **9** (April 9),108-118.
- López, M. and García, J. (2003) Moored observations in the northern Gulf of California: A strong bottom current. *Journal of Geophysical Research* **108**(C2), 3048.
- López, L. M., Durazo, E., Rodríguez-Gómez, A., True, C.D. y Viana, M. T. (2006). Composición proximal y perfiles de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdinaldi*. *Ciencias Marinas*, **32**, 303-309.
- Lotz, M., Tamplin, M. and Rodrick, G. (1983) Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and its selectivity for clinical and marine vibrio organisms. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **13**, 45-48.
- Love, R.M. (1970) *The chemical biology of fishes: Advances 1968-1977; with a supplementary key to the chemical literature. Volume 1.* Academic Press. pp 547.

- McCarty, C.E. (1987) Design and operation of a photoperiod/temperature spawning system for red drum. In: *Manual of Red Drum Aquaculture* (ed. by G. Chamberlain, R.J. Miget & M.G. Haby), pp. 27-31. Texas Agricultural Extension Service and Sea Grant College Program, Texas A&M University, College Station, TX, USA.
- Mok, H, and Gilmore, R.G. (1983) Analysis of sound production in estuarine aggregations of *Pogonias cromis*, *Bairdiella chrysoura*, and *Cynoscion nebulosus* (Sciaenidae). *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica* **22**(1), 57-186.
- Molina-Valdéz, D., Cisneros-Mata, M. A., Urlas-Sotomayor, R., Cervantes-Vaca, C. and Márquez-Tiburcio, M. A. (1988.) Prospección y evaluación de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California. *Informe final al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras de Guaymas, Instituto Nacional de la Pesca, Guaymas, Sonora, Mexico.*
- Moser, H.G., Ambrose, D.A., Busby, M.S., Butler, J.L., Sandknop, E.M., Sumida, B.Y., and Stevens, E.G. (1983) Description of early stages of white seabass, *Atractoscion nobilis*, with notes on distribution. *California. Cooperative Oceanic Fisheries Investigation Report*, **24**:182-193.
- Mylonas, C.C., Fostier, A. and Zanuy, S. (2010) Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 516-534.
- Noga, E.J. (2000) *Fish disease: diagnosis and treatment*. Wiley-Blackwell. pp 536.
- Pankhurst, N.W. (1985) Final maturation and ovulation of oocytes of the goldeye, *Hiodon alosoides* (Rafinesque), in vitro. *Canadian Journal of Zoology*. **63**, 1003-1009.
- Reading, B., Hiramatsu, N., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Hara, A., Lively, M. and Sullivan, C.V. (2009) Conserved and variant molecular and functional features of multiple egg yolk precursor proteins (vitellogenins) in white perch (*Morone americana*) and other teleosts. *Marine Biotechnology* **11**, 169-187.
- Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D. and Fernández-Palacios, H. (2010) Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* **302**, 82-88.

- Sadovy, Y. and Cheung, W.L. (2003) Near extinction of a highly fecund fish: the one that nearly got away. *Fish and Fisheries* **4**, 86-99.
- Smith, C. and Reay, P. (1991) Cannibalism in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **1**, 41-64.
- Solorzano, Y., López, L.M., Durazo, E., True, C.D. and Sandoval, G. (2006) Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de Totoaba macdonaldi. *IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, 1181-1192.
- Soltani, M., Shanker, S. and Munday, B.L. (1995) Chemotherapy of Cytophaga/Flexibacter-like bacteria (CFLB) infections in fish: studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials. *Journal of Fish Diseases* **18**, 555-565.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Endo, M., Yamashita, H. and Ukawa, M. (2008) Taurine is an essential nutrient for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. *Aquaculture* **280**, 198-205.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Ichiki, T., Endo, M., Hatate, H., Yoshida, T., Sakai, T., Yamashita, H. and Ukawa, M. (2006) Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Science* **72**, 1191-1199.
- Takemura, A. and Oka, M. (1998) Immunochemical sexing of living yellowfin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogeninlike protein. *Aquaculture Research* **29**, 245-249.
- Trewavas, E. (1977) The sciaenid fishes (croakers or drums) of the Indo-west Pacific. *The Transactions of the Zoological Society of London* **33**(4), 255-255.
- True, C.D., Silva-Loera, A. and Castro-Castro, N. (1996) Is aquaculture the answer for the endangered totoaba? *World Aquaculture Magazine* **27**, 38-43.
- True, C.D., Silva-Loera, A. and Castro-Castro, N. (1997) Acquisition of broodstock of *Totoaba macdonaldi*: Field handling, decompression, and prophylaxis of an endangered species. *Progressive Fish Culturist* **59**, 246-248.

- Vance, T.L., Hewson, J.M., Modla, S., Connaughton, M.A. and Gatten Jr., R.E. (2002) Variability in sonic muscle size and innervation among three sciaenids: Spot, Atlantic croaker, and weakfish. *Copeia* **2002**, 1137-1143.
- Villamar, A. (1980) Totoaba, un nuevo género de la familia Sciaenidae en el golfo de California, Mexico. (Pisces) Teleostei. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de Mexico* **23**, 129-133.
- Wan-shu, H. and Qi-yong, Z. (2002) Artificial propagation and breeding of marine fish in China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* **20**, 41-51.
- Woolley, L.D. and Qin, J.G. (2010) Swimbladder inflation and its implication to the culture of marine finfish larvae. *Reviews in Aquaculture* **2**, 181-190.
- Zohar Y. and Mylonas C.C. (2001) Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture* **197**, 99-136.

Figures

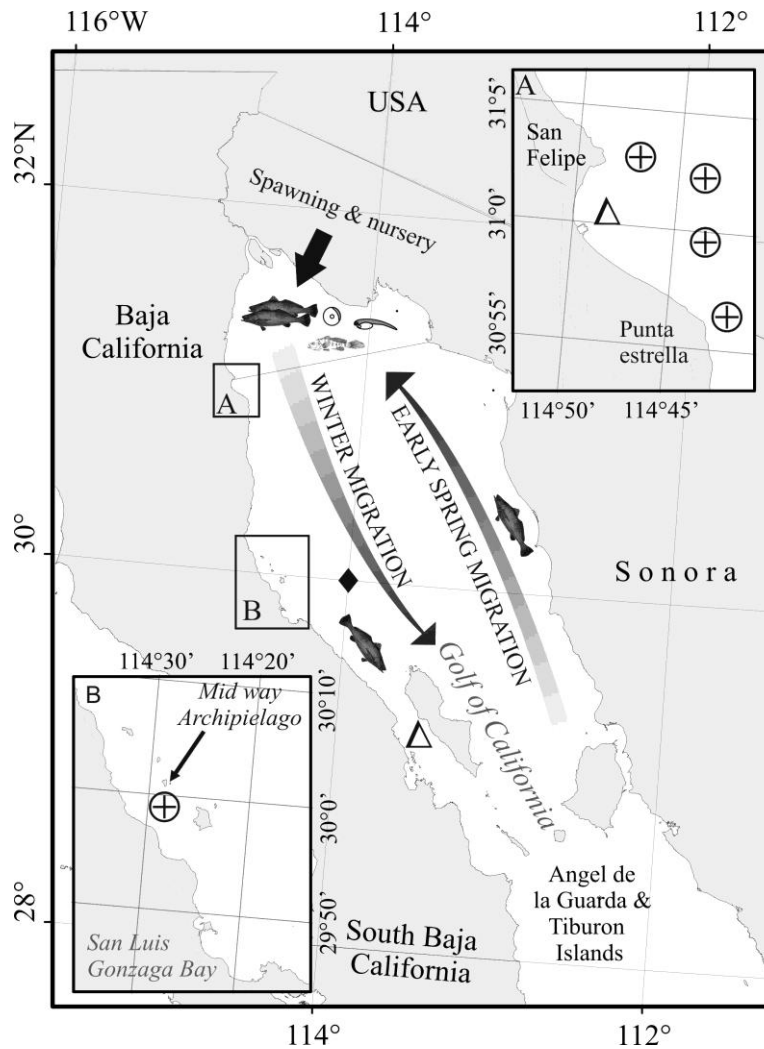


Figure 1. Simplified totoaba reproductive life history and broodstock capture locations. (A) Northern capture region in and around San Felipe Bay. (B) Southern capture location at midway island archipelago. Specific capture locations ($\oplus$), temperature (Δ) and photoperiod ($\blacklozenge$) register locations for development of captive environmental regimens used to condition broodstock for spawning.

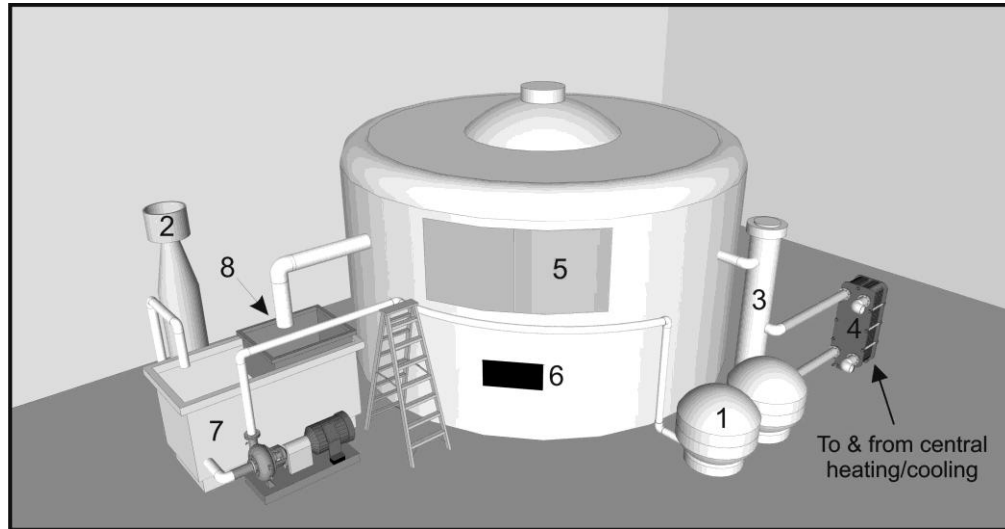


Figure 2. Life support and environmental control system for totoaba maturation and spawning. Closed recirculating system schematic: (1) sand filters for mechanical and biological filtration, (2) foam fractionation on a side loop, (3) integrated UV sterilization, photoperiod control through the use of fluorescent lights on a timer (not shown), and temperature control with, (4) heat exchanger plates, (5) upper section with access windows, (6) bottom section with observation window, (7) sump & (8) egg collecting net. Tanks have 100 m³ volume, 7.3 m diameter x 2.2 m depth to water line. See text for details.

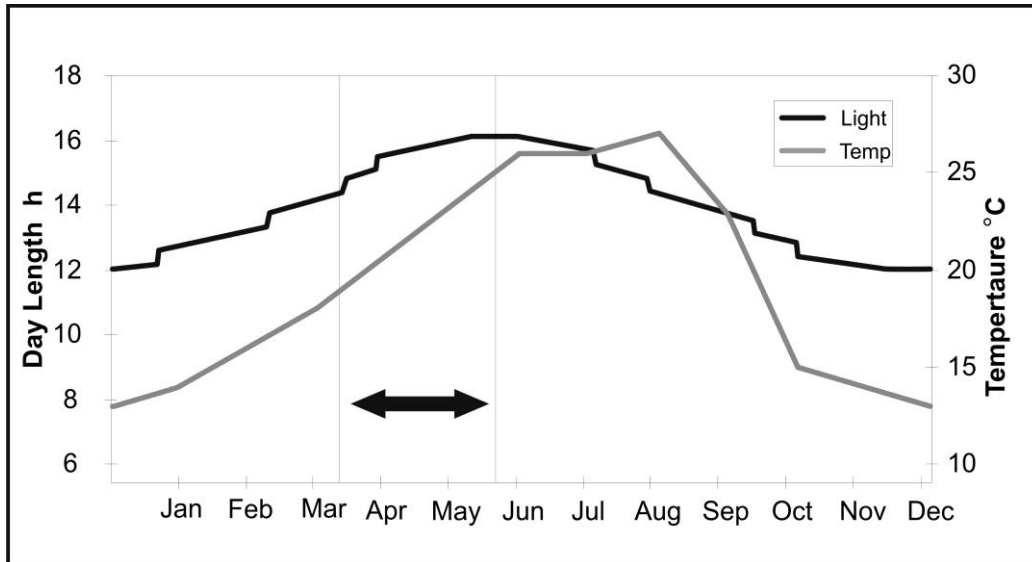


Figure 3. Annual photothermal regime used to promote totoaba maturation in captivity. Black upper line indicates day length and gray lower line indicates water temperature. Horizontal arrow indicates the spawning period.

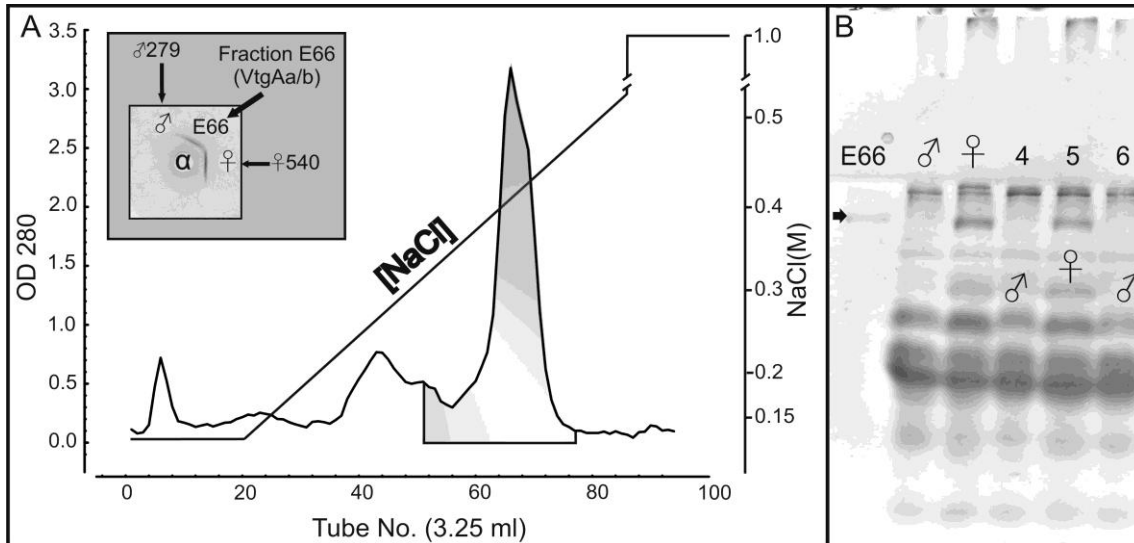


Figure 4. Development of test for identifying vitellogenic female totoaba undergoing oocyte growth. A) Poros 50 ion exchange chromatogram of mature totoaba female serum indicating collected elution fractions 50 to 76 for vitellogenin-like proteins. Inset: Immunodiffusion plate using antiserum against striped bass vitellogenins (α), note conjugation with E66 (Fraction 66) and blood plasma from female 540 but not plasma from male 279. B) SDS-PAGE of plasma from totoaba of known gender (lanes 2 and 3) and unknown gender (lanes 4-6) using fraction E 66 (lane 1) as a positive control, Females show a distinct band at same level as E 66 (arrow) and males or immature fish do not.

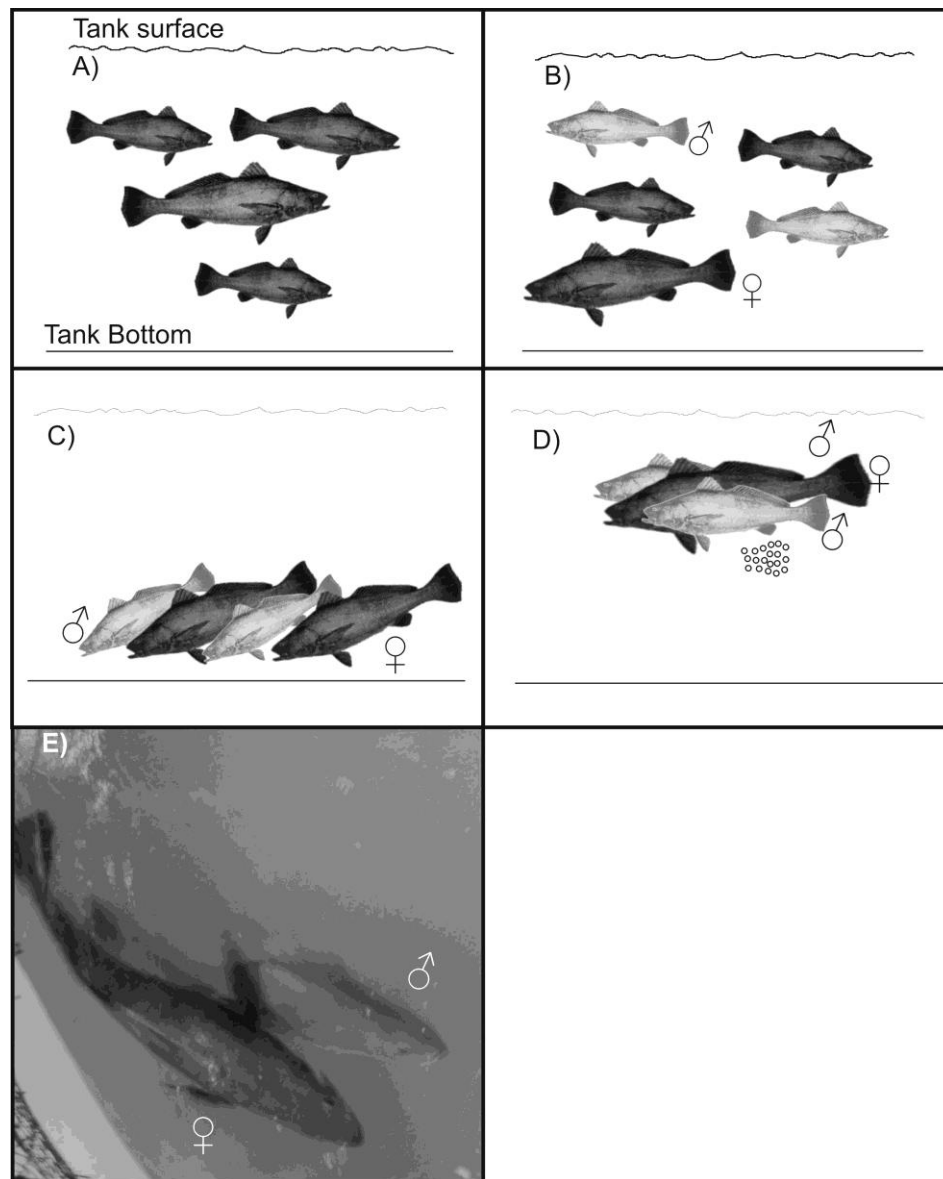


Figure 5. Broodstock behavior. A) Outside the reproductive season fish have a uniform color tone with no distinction among genders, they occupy all of the water column. B) One or two weeks prior to spawning males assume a lighter coloration and females remain largely unchanged. C) One or two weeks prior to spawning fish exhibit a head down position at the bottom of the tank with evident tonal color change (males lighter than females). D & E) Spawning; up to 3 males participate with one female at tank surface (swim up), color tone is very distinct. Eggs usually present in egg trap once lights are off. Drawing not to scale (Fish size range 12-18 kg body weight; TL 0.9-1.20 m).

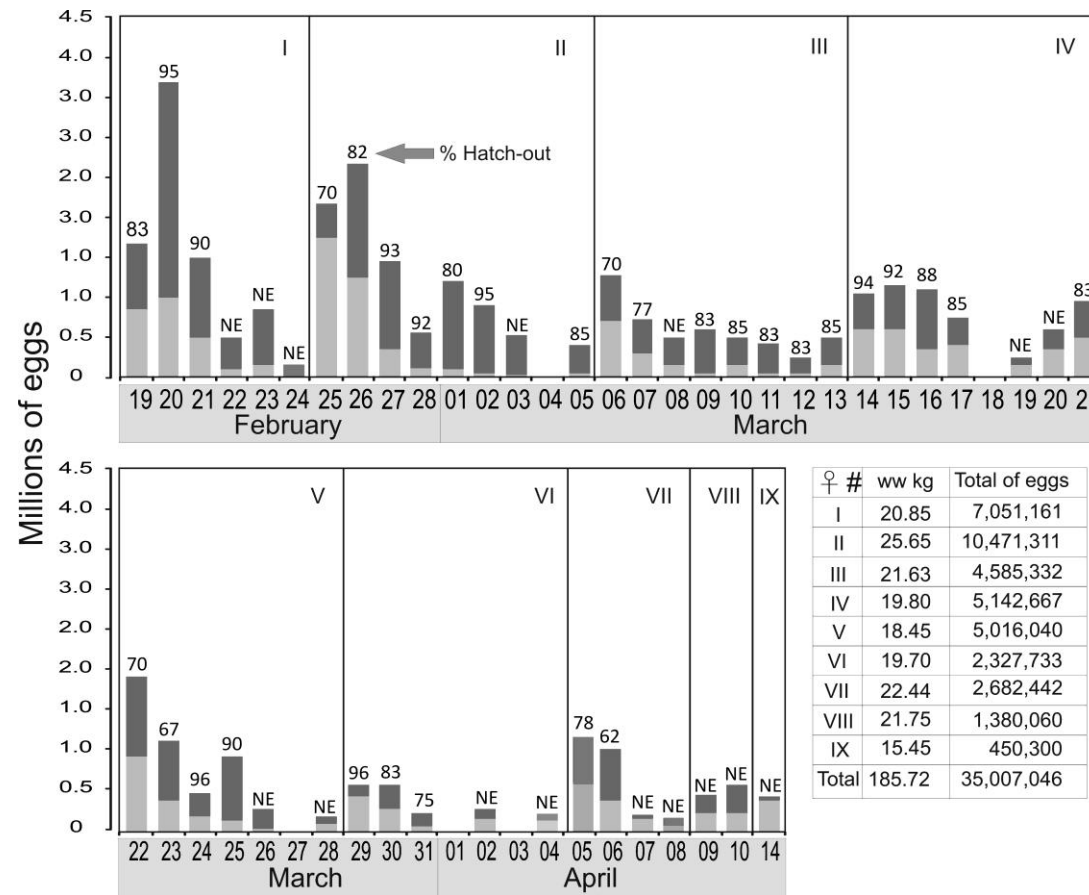


Figure 6. Summary of totoaba spawnings in 2009. Each box labeled with a roman numeral indicates results for an individual female. Vertical bars indicate individual spawns. Upper dark part of bar indicates viable (floating) eggs and lower lighter part of bar indicates unviable (sinking) eggs. Numbers above the bars indicate the percentage of viable eggs hatching. NE=not evaluated. The box inset at the lower right indicates the female weight and total fecundity.

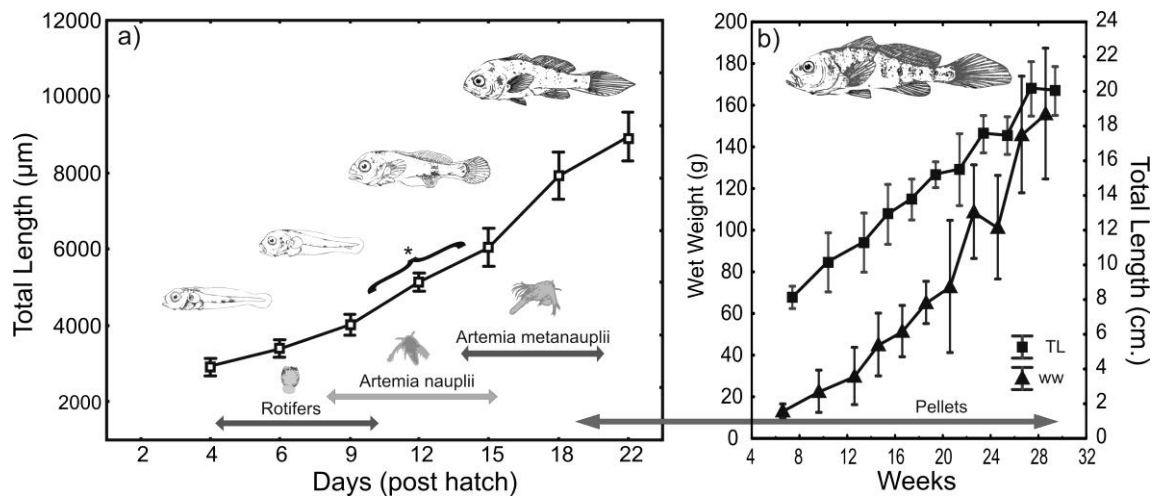


Figure 7. Totoaba larval and juvenile growth during early development. a) Larval growth in total length, b) Juvenile growth in wet weight (ww) and total length (TL). Arrows indicate feeding regime with overlapping days for food type transition (weaning). *flexion stage.

Table 1. Chemical composition (g 100 g⁻¹, d.w.b.) and gross energy (MJ kg⁻¹) of practical diets for *Totoaba macdonaldi* during early and late juvenile stages and broodstock reared at the Autonomous University of Baja California, Mexico.

Proximal composition	Early juvenile	Late juvenile	Broodstock
Crude protein	50 – 60	45 - 55	45 - 50
Crude fat	10 – 15	10 - 15	10- 15
Total starch	5 – 10	5 - 15	5 - 10
Total ash	5 – 8	8 - 10	8 - 10
Gross energy	20 – 22	20 - 21	20 - 21
Lysine	2 – 3	2 - 3	2 - 3
Methionine	1	1	1
Threonine	1.5	1.5	1.5
Taurine	0.5 – 2	0.5 - 2	0.5 - 2

Fish meal, krill meal, pork meat and bone meal, poultry meal, fresh squid and meal, gelatin, spirulina meal, soybean meal, wheat meal, corn meal, fish oil, corn oil, linseed oil, nutrikelp from ALBIOMAR (Ensenada, Baja California), asthaxanthin. Minerals (mg/kg): KH₂PO₄(2050); KI(20); Ca(H₂PO₄)₂(3950); MgSO₄·H₂O(400); CuSO₄·5H₂O(6.0); CoCl₂·H₂O(3.0); Al(OH)₃(1.0), MnSO₄(300); Fe₂(SO₄)₃(6.0); ZnSO₄(5.0); Na₂Se₂(0.2).

CAPITULO II.

Descripción del ciclo ovárico de Totoaba en cautiverio y efecto de la inducción hormonal con GnRH α .

¹Conal D. True, ²Benjamín Barón-Sevilla y ¹Gerardo Sandoval Garibaldi.

NOTA TECNICA

¹Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas,
Km 103 Carretera Tijuana – Ensenada Código Postal 22860 , Ensenada, Baja California

² Centro De Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada.
Km. 107 Carretera Tijuana – Ensenada Código Postal 22860, Ensenada, B.C. México

Conal D. True, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas,
Carretera Tijuana, Ensenada Km 103, Ensenada, Baja California, México. CP 22860.

Email: ctrue@uabc.edu.mx

Titulo Breve: Desarrollo ovárico de Totoaba en cautiverio.

Palabras Clave: Totoaba, reproducción, ovocitos, Sciaenidae, inducción, GnRH α .

Resumen

La totoaba es una especie endémica del Golfo de California, la cual se considera en riesgo de extinción. Durante los últimos años se ha establecido un banco de seminales en cautiverio a partir de organismos silvestres con la finalidad de lograr su reproducción. En el presente trabajo se describe una disfunción reproductiva en las hembras a causa de la cautividad y como el uso de la inducción con la hormona GnRHa resuelve este aspecto. Así mismo se identificó como una especie con un desarrollo ovárico de tipo sincrónico de grupo y se presenta evidencia concluyente de que es a su vez un desovador múltiple. Se describe la presencia de diversos grados de atresia folicular asociados a las condiciones de cautiverio.

Abstract

Totoaba is an endemic species to the Gulf of California and considered endangered. During recent years a captive breeding population has been established. The present study describes a common reproductive dysfunction in fish caused by captive holding, where females fail to spawn, and the use of hormonal induction with GnRHa to resolve this blockage. Conclusive evidence is presented for a group synchronous ovarian development and multiple spawning type of reproduction for totoaba. Different stages of atresia are described and related to captive breeding.

Introducción

Para lograr desarrollar el cultivo de una nueva especie es necesario conocer distintos aspectos de su biología, de entre los cuales la reproducción resalta como uno de los aspectos clave, ya que solo asegurando la obtención de gametos (huevos y espermatozoides) en los estadios apropiados es factible lograr la perpetuación y por ende la continuidad en el desarrollo. En especies sin historial previo de cultivo por lo general los parámetros y/o condiciones ambientales con las cuales se promueven los procesos de maduración se desconocen total o parcialmente y es común que al trasladarlas a cautiverio presenten cierto grado de disfunción y/o inhibición reproductiva (Bromage 1995). Tal es el caso del presente estudio con *Totoaba macdonaldi*, especie de teleosteo de la familia Sciaenidae, endémico del Golfo de California que se encuentra en peligro de extinción (Flanagan y Hendrickson 1976), en la cual hemos identificado que las hembras no desovan de forma voluntaria ante el solo control ambiental, siendo esto una barrera significativa para el desarrollo del cultivo de esta especie.

Las disfunciones reproductivas de peces en cautiverio se han documentado de forma regular y en general se asocian a fallas en hembras cerca de la etapa de maduración final, ovulación o desove (Zohar 1988, 1989a, b; Peter *et al.*, 1993). Estas disfunciones probablemente resultan de la combinación del estrés inducido por el cautiverio (Sumpter *et al.*, 1994; Pankhurst y Van der Kraak 1997) y la falta de un ambiente adecuado para el desove natural (Zohar 1989a, b; Yaron 1995; Battaglene y Selosse 1996). El bloqueo reproductivo en hembras de teleosteos se ha clasificado en 3 niveles, la primera y más sencilla es aquella en la cual el proceso de la vitelogénesis se lleva a cabo de forma normal seguido de la maduración citoplásmica y de la ovulación pero sin la liberación de los huevos (Bromage y Cumaranatunga 1988; Zohar 1989), la cual se presenta en la mayoría de los salmónidos en cautiverio (Liley y Kroon 1995; Slater *et al.*, 1995). La segunda (intermedia) es aquella que se encuentra interrumpida a nivel de la maduración citoplásmica y es la más frecuente en la mayoría de los teleosteos (Watanabe *et al.*, 1995; Berlinsky *et al.*, 1996; Yang y Chen 2004) y finalmente la más severa es aquella en la cual

la vitelogénesis ocurre de manera limitada o no se presenta (Ohta *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2000).

Un aspecto de gran ventaja es que a la fecha se han cultivado varios scianidos y así mismo han sido objeto de extenso estudio de fisiología y biología reproductiva (Trant y Thomas, 1989; Kucherka *et al.*, 2006). En general las especies de scianidos cultivados responden bien ante la manipulación de condiciones ambientales para promover su recrudescencia, pero como la mayoría de los peces exhiben distintos grados de disfunción reproductiva la cual se ha resuelto mediante inducción hormonal (Prentice 1987; Thomas 1988; Arnold 1991; Gwo *et al.*, 1993 ; Mylonas *et al.*, 2004).

Las terapias hormonales para liberar ó sobrepasar dichos bloqueos se han convertido en una aplicación cada vez más común en el cultivo de peces (Mylonas y Zohar 2007) y se basan en la intervención del eje neuroendocrino “cerebro-pituitaria-gónadas” CPG (Weltzien *et al.*, 2004) a dos posibles niveles: El primero actúa directamente a nivel de las gónadas mediante la aplicación de hormonas gonadotrofinas (GtH) y la segunda incide a nivel de la secreción en la pituitaria mediante el uso de hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) (Kah *et al.*, 1993). Esta intervención externa aunque resuelve el bloqueo en muchos casos enmascara y/o desencadena eventos muy distintos a los normales tales como la alteración en la frecuencia de desoves, la fecundidad y la calidad misma de los gametos (Mylonas *et al.*, 2010), lo que hace más complicado entender la biología reproductiva de una nueva especie en cautiverio.

A pesar del grado de desarrollo de las técnicas moleculares y bioquímicas, la observación en fresco de los estadios ováricos en conjunto con técnicas histológicas básicas son una de las herramientas más comunes para entender dicho proceso, ya que permiten corroborar paso a paso el efecto de las distintas condiciones que impone el manejo en cautiverio (West 1990). Por lo que el objetivo de este trabajo fue dar seguimiento mediante estas técnicas al ciclo de desarrollo ovárico de la totoaba producido bajo condiciones controladas, identificar

el tipo de disfunción reproductiva que presenta esta especie y evaluar un proceso de inducción hormonal para lograr la eliminación del bloqueo.

Método

Reproductores usados en este estudio

Los organismos usados en este estudio, corresponden a una serie de colectas científicas realizadas en el Alto Golfo de California (ver sección anterior). Los organismos fueron capturados como adultos y sub-adultos mediante pesca de línea y anzuelo, transportados a las instalaciones de la UBP de la UABC y se acondicionaron durante 2-3 años antes de iniciar este experimento de acuerdo a lo descrito por (True *et al.*, 1997)

Simulación del ciclo anual para la promoción de la maduración ovárica

A falta de condiciones específicas conocidas para la especie se recurrió al análisis de la información existente sobre su biología y distribución en el medio natural para así simular las condiciones a partir de la construcción de un perfil de variación anual de fotoperiodo y temperatura (ver sección arriba en Capítulo I).

Selección de hembras y obtención de muestras ováricas

Las hembras usadas en este estudio se seleccionaron al identificarlas justo antes del periodo reproductivo por su abdomen distendido y/o mediante la aplicación previa de una prueba de presencia de vitelogeninas (ver capítulo III siguiente). Una vez identificadas se les colocó una etiqueta electrónica (Avid 12 mm, Norco, CA) que permite su seguimiento a largo plazo. Durante este estudio los organismos se muestrearon a partir de las condiciones de invierno intensificando dicho muestreo hacia el final del periodo de reproducción (fines del verano), sin incluir el otoño. Las muestras ováricas se realizaron anestesiando previamente a los organismos en un baño de tricainemetanosulfonato (TMS-222; Western Chemical Inc., Ferndale, WA) a 50mg L^{-1} y mediante la inserción de un catéter de 2mm de diámetro interno en el oviducto (King *et al.*, 1994), con lo que se obtuvieron 1.0 a 0.5cm^3 de tejido. Las muestras se colocaron inmediatamente en un vial de 3 ml cerrado sobre hielo y transportadas al laboratorio para su análisis inmediato. En el laboratorio se procedió a fijar

una porción de la muestra (Paraformaldehído al 4%, amortiguado a 7.3 pH) para su posterior procesamiento histológico y otra porción se colocó en suero fisiológico amortiguado (Wolf, 1963) a 4°C. Inmediatamente después la porción de tejido en suero fisiológico se disgregó con la ayuda de agujas de disección y fórceps entomológicos bajo el microscopio, a continuación se fotografió en conjunto con una retícula ocular para su posterior análisis. A partir de las imágenes y con el uso de software especializado (PAX-it software, PAXcam, IL, USA) se midieron no menos de 300 ovocitos ó 30% del total de la muestra descartando de las mediciones los ovocitos pre-vitelogénicos ($< 100 \mu\text{m}$).

Selección de hembras candidatas a la inducción al desove y seguimiento de proceso de ovulación

Dos ó tres semanas antes de llegar a las condiciones ambientales propicias para la reproducción (ver capítulo anterior), se seleccionó mediante observación directa a aquellas hembras que presentaran el abdomen distendido y se les practicó una biopsia ovárica conforme a lo descrito anteriormente. La biopsia se disgregó en suero fisiológico y fue adicionada con una solución aclaradora que permitió evidenciar la posición de la vesícula germinal ó núcleo celular (Pankhurst 1985). Las candidatas para el procedimiento de inducción correspondieron a aquellos organismos con ovocitos 500-700 μm con vesícula germinal excéntrica ó migrada a la periferia (VGM). La inducción se efectuó por medio de la administración de la hormona análoga liberadora de gonadotrofinas LHRHa des-Gly¹⁰ D Ala⁶, (Sigma, St. Louis, MO), en una dosis de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Gwo *et al.*, 1993). Dicha hormona se administró como una dosis única con suero salino NaCl 0.9% ó mediante el uso de implantes de liberación prolongada de acuerdo a lo descrito por Hodson y Sullivan (1993). Una vez realizada la inducción los organismos se regresaron a los tanques de desove ó se colocaron en un sistema alterno de recirculación para ser revisados en intervalos de 4-6 horas.

Análisis histológico

A las porciones fijadas de las biopsias ováricas (ver sección anterior) se les dio un tratamiento de deshidratación en distintos grados de alcohol, se embebieron en parafina y se seccionaron a 5 μm de grosor para finalmente teñirlas con hematoxilina-eosina de acuerdo

a las técnicas estándar de histología (Bancroft y Gamble 2007). En algunos casos se utilizó la tinción de Arteta (López *et al.*, 1982) como contraste adicional. Los distintos grados de maduración ovárica se asignaron de acuerdo a los criterios de clasificación de Wallace y Selman (1981), así como a los de Tyler y Sumpter (1996).

Resultados

Distribución de tamaños y clasificación de los estadios de maduración ovárica

A partir de los muestreos mensuales se construyó una distribución del desarrollo ovárico por tamaños, presentada para una hembra típica en la **Figura 1**, en la que se puede apreciar que al final del invierno (Dic) la presencia de una pequeña cohorte de ovocitos en desarrollo, con una moda central de $\sim 200 \mu\text{m}$, representada principalmente por ovocitos vitelogénicos primarios (**Fig 3**), caracterizados por el inicio de la acumulación de vitelo (**Fig 3c**), la migración de los alvéolos corticales (**Fig 3b**) y el inicio del engrosamiento de la zona radiata (**Fig 3c**). Hacia la primavera la vitelogénesis avanzó y en consecuencia la distribución se amplió con un rango de diámetros de $100\text{-}700 \mu\text{m}$, pero sin una moda sobresaliente durante los siguientes meses (Feb-Abr) y cubriendo el espectro completo de estadios (incluyendo vitelogénicos). Durante esta etapa se observó un aumento en la deposición de vitelo, el núcleo permanece de forma central con los nucléolos cada vez más pequeños y el engrosamiento de la zona radiata es muy evidente (**Fig 4**). A inicios del verano (Jun) la distribución comenzó a cargarse hacia una mayor talla ($\sim 600 \mu\text{m}$) incrementado la presencia de los estadios vitelogénicos avanzados. Finalmente durante el último mes (Julio) la distribución se separó en dos aparentes cohortes. Una menor y menos abundante con una moda $\sim 300 \mu\text{m}$ y otra mayor con una moda $\sim 700 \mu\text{m}$. En relación a las etapas pre-vitelogénicas, aunque no se presentan en la distribución, es importante mencionar que están presentes en todas las muestras independientemente de la época y están representadas por los estadios de cromatina nuclear, peri nuclear y alveolo cortical con tamaños $< 10 \mu\text{m}$ (**Figs. 1 y 2**).

Tratamiento hormonal y descripción de las fases de maduración citoplásmica final

Como puede observarse en la **Tabla 1** el resultado de la administración del tratamiento hormonal redujo y/o eliminó el bloqueo. Los organismos desovaron como máximo en dos ocasiones consecutivas en intervalos de ~24-30 h, aunque la cantidad y calidad de los huevos fue muy variable y no se apreció relación alguna entre el número de desoves y el modo de suministro de la hormona GnRHa. Sin embargo, el uso de los implantes sincronizó en mayor grado los desoves pues el intervalo entre desoves fue más constante.

La **Figura 5** muestra una progresión de las etapas de maduración citoplásmica en donde se compara su aspecto en fresco (aclaradas) y su correspondiente corte histológico. La **Figura 5 a y b** muestran un ovocito vitelogénico avanzado con la vesícula germinal VG en posición central. La **Figura 5 c y d** muestra el inicio de maduración citoplásmica con la VG levemente excéntrica. A continuación (**Fig 5 e-h**) es evidente el inicio de la conjunción del vitelo y de la fracción lipídica, puede observarse la posición excéntrica de la VG. Finalmente se presenta la ovulación (**Fig 5 ijk**), una etapa que se ve acompañada del aumento sustancial en tamaño a causa de la hidratación para culminar con un huevo de ~830-930 μm con una o varias gotas de aceite.

Seguimiento del proceso de Ovulación

Se dio seguimiento a una hembra durante un periodo de ~74 h a partir de la inducción hormonal mediante biopsias ováricas de forma periódica, encontrando al menos 3 ovulaciones consecutivas. La biopsia a ~28 h posteriores al implante (0h) muestra un grupo de ovocitos hidratados y ovulados además de un grupo más reducido en distintas etapas de la vitelogénesis (**Fig 6b**), a las 42 h la biopsia reveló ovocitos vitelogénicos muy avanzados (**Fig 6c**) y para las 51 h se presentó la segunda ovulación (**Fig 6d**). Fue posible documentar un tercer ciclo a las 64 h encontrando que un tercer grupo de células presentaban un grado avanzado de conjunción de vitelo (**Fig 6e**) culminando en ovulación para las 74 h.

Presencia de Atresia

Durante todo el proceso de muestreo de las hembras fue posible observar distintos grados de deterioro ó atresia ovárica. La **Figura 7** resume distintos aspectos de la atresia presentes en algunas de las hembras. El **panel a** de la **Figura 7** muestra dos ovocitos; el de la izquierda con evidencia clara de atresia y el de la derecha aun normal. El inserto ejemplifica de forma comparativa la ruptura y la integridad de la envoltura celular (zona radiata), así mismo en el interior del ovocito atrésico (izq) es evidente la desintegración de las estructuras mientras que el normal (der) aún conserva claramente su grado de organización interna. El **panel b y c** de la **Figura 7** muestran ovocitos vitelogénicos con un mayor grado de degradación donde la proteólisis ha desintegrado por completo la envoltura y el proceso de degradación del contenido es muy marcado por el proceso de fagocitosis celular. Finalmente el **panel d de la Figura 7** muestra un ovocito hidratado pero no ovulado en el cual la atresia es clara ya que su envoltura (zona prelucida ó radiata) está comprometida en más de un lugar y el proceso de la degradación del vitelo interno ha iniciado.

Discusión

La ovogénesis que presenta Totoaba en cautiverio es característica de una especie con un desarrollo ovárico sincrónico de grupo (Tyler y Sumpter, 1996), ya que presenta varios estadios de desarrollo en cualquiera de las etapas evaluadas y en particular siempre están presentes las distintas fases pre-vitelogénicas, lo cual era esperado para un miembro de la familia Sciaenidae (Barbaro *et al.*, 2002 ; Garcia-Alonso y Vizziano 2004). El proceso podría resumirse como un ciclo reproductivo que inicia durante el invierno con la proliferación de ovogonias y su posterior transformación en ovocitos previtelogénicos, seguida de una etapa de crecimiento y deposición de vitelo durante la primavera, con la continua generación de más etapas inmaduras. El verano quedo establecido como la época reproductiva, que culmina con las fases finales de la maduración, ovulación y expulsión de huevos. El otoño (no documentado), constituiría la etapa de reabsorción, limpieza y “reposo ovárico” en preparación para el inicio de un nuevo ciclo.

El constatar en múltiples ocasiones que la vitelogénesis progresaba de forma normal con la continua maduración ovárica, pero carente de la ovulación y liberación de los huevos, nos llevó a ubicar la falla o bloqueo reproductivo como de tipo intermedio (Mylonas y Zohar 2007). Esta disfunción, como se ha mencionado anteriormente, es la que más comúnmente se presenta en teleósteos bajo condiciones de cautiverio. Aunque sus causas no han sido totalmente identificadas, se han asociado al estrés por la manipulación y/o a la alteración de ciertos factores ambientales que inducen y sincronizan la reproducción de forma natural; la temperatura, luz, salinidad y niveles de confinamiento, destacan como los más sencillos en recrear (Ekcstein 1975, Daettlaff y Davydova 1979, Sower y *et al.*, 1982).

El uso de terapias hormonales para resolver el bloqueo reproductivo en cautiverio ha originado un significativo avance en el desarrollo del campo de la piscicultura durante las últimas dos décadas (Mylonas y Zohar 2007). Para las especies de la familia Sciaenidae el uso del análogo de la hormona GnRH ha resuelto en la mayoría de los casos este bloqueo (Prentice 1987; Thomas y Boyd 1988ab; Mylonas *et al.*, 2004 ; Duncan N 2008;) y por tal motivo fue el elegido para este trabajo. Como puede apreciarse la inducción logró en repetidas ocasiones un máximo de dos desoves con periodos de ovulación entre 28 y 36 hrs (**Tabla 1**), pero con una baja reproducibilidad, aun y a pesar del cambio en la forma de entrega del tratamiento hormonal, de una sola dosis inyectada a implantes de liberación prolongada. En *Umbrina cirrosa* una especie de scianido con desarrollo ovárico sincrónico de grupo, la administración de este tratamiento también tuvo resultados ambiguos ya que solo inyecciones consecutivas y no la administración prolongada de GnRHa lograron producir desoves múltiples (Barbaro *et al.*, 2002 ,Mylonas *et al.*, 2000, Mylonas *et al.*, 2004c). Inicialmente este aspecto nos llevó a pensar que Totoaba era un desovar único y que los dos desoves consecutivos eran un artefacto de la inducción hormonal. Sin embargo, este no era un resultado convincente, en particular por la continua presencia de ovocitos atrésicos avanzados en las etapas finales de la maduración (**Fig 7**). Por este motivo se dio seguimiento a una de las hembras durante más de 74 h post implante, tiempo durante el cual fue posible documentar 3 ovulaciones independientes en periodos ~24-30 hrs y la presencia de ovocitos vitelogénicos tardíos al final de este periodo de muestreo (**Fig 6**), con

lo que se obtuvo evidencia de que la totoaba es un desovador múltiple con la posibilidad de 3 ó más desoves.

Conclusiones

Por todo lo arriba expuesto, podemos concluir que el bloqueo reproductivo de esta especie es de tipo intermedio y que la inducción con GnRHa logra librar esta disfunción. Así mismo que posee un desarrollo ovárico sincrónico de grupo y es desovador múltiple. Se espera que en la medida que se reduzca el grado de estrés por manejo en cautiverio y se genere información sobre factores adicionales que inciden sobre la reproducción tales como la nutrición se logrará un proceso de inducción aún más confiable, con múltiples desoves y por ende una producción de huevos más predecible para esta especie.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó mediante una serie de apoyos institucionales a los cuales se les agradece su apoyo administrativo y financiero, gracias a: SAGARPA/CONAPESCA, SEMARNAT/Vida Silvestre, al gobierno del Estado de Baja California a través de “SEPESCA-BC” y a Fundación Produce BC. Así mismo los autores agradecen al Laboratorio de Sanidad y Patología de CICESE y a Yanet Guerrero Rentería por su excelente trabajo de histología. Finalmente se agradece la colaboración del personal técnico de la UBP por la disposición en tiempo y experiencia profesional durante la obtención de las muestras ováricas. Todos los reproductores empelados en este estudio se obtuvieron bajo los siguientes permisos de colecta especial: 090394-310-03 (Secretaría de Pesca 1994); 200596-213-03 (SEMARNAP 1996); 08052000-213-03 (SEMARNAP 2000) and SGPA/DGVS-04294 (SEMARNAT 2005).

Literatura Citada

- Arnold CR (1991) Precocious spawning of red drum. *Prog.Fish Cult.*, **53**, 50-51.
- Bancroft JD y M Gamble (2007) Theory and Practice of Histological Techniques (5th Ed), *Churchill Livingstone London*. PP 125-138.
- Barbaro A, Francescon A, Bertotto D, Bozzato G, Di Maria I, Patarnello P, Furlan F, Colombo L (2002) More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonist in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture. *Journal of Applied Ichthyology*, **18**, 192-199.
- Battaglione SC, PM Selosse. (1996) Hormone-induced ovulation and spawning of captive and wild broodfish of the catadromous Australian bass, *Macquaria novemaculeata* (Steindacher), (Percichthyidae). *Aquac Res* **27**, 191-204.
- Berlinsky DL., King WV, Smith TIJ, Hamilton RD II, Holloway J. Jr, Sullivan CV (1996) Induced ovulation of Southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants. *J. World Aquacult. Soc.* **27**:143–152.
- Bromage,NR. (1995) Broodstock management and seed quality – general considerations. In: Bromage,N.R.,Roberts, R.J. (eds.), Broodstock Management and Egg and Larval Quality. *Blackwell Science*, Oxford, pp. 1–24.
- Bromage NR y Cumaranatunga R (1988) Egg production in the rainbow trout. In: *Muir, J.F., Roberts, R.J. (eds.), Recent Advances in Aquaculture. Croom Helm/Timber Press, London*,pp. 63–138.
- Duncan N, Padros F, Aguilera C, Montero FE, Norambuena F, Carazo I, Carbo R. y CC Mylonas (2008) Acclimation to captivity and GnRHa-induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). *Cybium*, **32**, 332-333.
- Ekstein B. (1975) Possible reasons for the infertility of grey mullets confined to fresh water. *Aquaculture* **5**, 9-17.

- Daetlaff TA y MN Davydova (1979) Differential sensitivity of cells of follicular epithelium and oocytes in the stellate sturgeon to unfavorable conditions, and correlating influence of triiodothyronine. *Gen Comp Endocrinol* **39**, 236-243.
- Flanagan CA y J.R.Hendrickson (1976) Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*, **74**, 531-544.
- Garcia-Alonso J, Vizziano D (2004) Induction of Oocyte Maturation in the White Croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by Human Chorionic Gonadotropin. *Brazilian journal of biology*, **64**, 73-80.
- Garcia A, Diaz MV, Schulz RW y Agulleiro B. Gonadal development and hormonal levels of captive Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso) under photoperiod control. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. (eds.), *Reproductive Physiology of Fish. University of Bergen, Bergen, Norway*, pp. 436–491 (2000).
- Gwo JC, Strawn K, Arnold CR (1993) Induced ovulation in Atlantic croaker (Sciaenidae) using hCG and an LHRH analog: A preliminary study. *Theriogenology*, **39**, 353-361.
- Kah O, Anglade I, Leprêtre E, Dubourg P, y de Monbrison D (1993). The reproductive brain in fish. *Fish Physiol.Biochem.*, **11**:85-98.
- Kucherka WD, Thomas P y Khan IA (2006) Sex differences in circulating steroid hormone levels in the red drum, *Sciaenops ocellatus* L. *Aquaculture Research*, **37**, 1464-1472.
- King Wt, Thomas P, Harrell RM, Hodson RG, Sullivan CV (1994) Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *General And Comparative Endocrinology*, **95**, 178-191.
- Liley NR y Kroon FJ (1995) Male dominance, plasma hormone concentrations, and availability of milt in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Zool.* **73**:826–836.
- López M, Leyton C, Graf M (1982) Técnicas de histología y citología. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago

- Mylonas CC, Georgiou G, Stephanou D, Attack T, Afonso A. y Zohar Y (2000). Preliminary data on the reproductive biology and hatchery production of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in Cyprus. In: Basurco, B. (ed.) *Cahiers Options Méditerranéennes, Vol. 47: Mediterranean Marine Aquaculture Finfish Species Diversification. CIHEAM, Zaragoza, Spain*, pp. 303–312.
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S (2010) Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, **165**, 516-534.
- Mylonas CC, Kyriakou Y, Sigelaki I, Georgiou G, Stephanou D, Divanach P (2004) Reproductive biology of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GNRHA. *The Israeli journal of aquaculture = Bamidgeh.*, **56**, 77.
- Mylonas CC, Zohar Y (2007) Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish *The Fish Oocyte*. (ed. by Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E). Springer Netherlands, pp. 437-474.
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Iimura N y Hirose K. (1997) Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.* 17:163–169.
- Pankhurst NW (1985) Final maturation and ovulation of oocytes of the goldeye, *Hiodon alosoides* (Rafinesque), in vitro. *Canadian Journal of Zoology*, **63**, 1003-1009.
- Pankhurst NW, G van der Kraak. (1997) Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB (eds). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, Pp 73-93.
- Peter RE, HR Lin, G Van der Kraak, EM Little (1993) Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. In: Muir JF, Roberts RJ (eds). *Recent advances in aquaculture*. Blackwell Scientific, Oxford, UK, Pp 25-30.
- Prentice JAPT (1987) Successful spawning of orangemouth corvina following des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶]-luteinizing hormone-releasing hormone (1-9) ethylamide and pimozide injection. *Progressive Fish Culturist*, **49**, 66-69.

- Slater CH, Schreck CB y Amend DF (1995) GnRHa injection accelerates final maturation and ovulation/spermiation of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in both fresh and salt water. *Aquaculture* **130**:279–285.
- Sower SA, B Schreck y EM Donaldson (1982) Hormone induced ovulation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) held in sea water and fresh water. *Can J Fish Aquat Sci* **39**, 627-632.
- Sumpter JP, Pottinger TG, Rand-Weaver M y Campbell PM (1994) The wide-ranging effects of stress on fish. In: Davey KG, Peter RE, Tobe SS (eds). *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council, Ottawa, Canada, Pp 535-538.
- Strussman CA y Patino R. (1995) Temperature manipulation of sex differentiation in fish. In: Goetz FW, Thomas P (eds.), *Proceedings of the 5th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Austin: The University of Texas at Austin: 153–157.
- Thomas P y Boyd N (1988a) Induced spawning of spotted sea trout, red drum and Orangemouth corvine (family: Sciaenidae) with luteinizing hormone-releasing hormone analog injection. *Contrib. Mar. Sci.* **30**:43–48.
- Thomas P y Boyd NW (1988b) Induced spawning of spotted seatrout, red drum and orangemouth corvina (family: Sciaenidae) with luteinizing hormone-releasing hormone analog injection. *Contributions in Marine Science*, **30 (Suppl.)**, 43-47.
- Thomas P y Boyd NW (1989) Dietary administration of an LHRH analogue induces spawning of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Aquaculture* **80**:363–370).
- Trant JM, Thomas P (1989) Changes in ovarian steroidogenesis in vitro associated with final maturation of Atlantic croaker oocytes. *General and Comparative Endocrinology*, **75**, 405-412.
- True CD, Silva-Loera A, Castro-Castro N (1997) Acquisition of broodstock of *Totoaba macdonaldi*: Field handling, decompression, and prophylaxis of an endangered species. *Prog.Fish Cult.*, **59**, 246-248.

- Tyler CR y Sumpter JP (1996) Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **6**, 287-318.
- Wallace RA y Selman K (1981) Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer Zool* **21**, 325-343.
- Watanabe WO, Ellis SC, Ellis EP, Head WD, Kelley CD, Moriwake A, Lee CS y Bienfang PK Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. *Aquaculture* **138**:205–219 (1995).
- West G (1990) Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. *Aust J Mar Freshwat Res* **41**, 199-222.
- Wolf, K. (1963). Physiological salines for freshwater teleosts. *Progve Fish Cult.* 35, 135-40.
- Weltzien F-A, Andersson E, Andersen Ø, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B (2004) The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular amp; Integrative Physiology*, **137**, 447-477.
- Yaron Z (1995) Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* **129**, 49-73.
- Yang Z y Chen YF (2004) Induced ovulation in obscure puffer Takifugu obscurus by injections of LHRH-a. *Aquacult. Int.* **12**:215–223.
- Zohar Y (1988) Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: Basic and applied considerations. In: Zohar Y, Breton B (eds). *Reproduction in fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. INRA Press, Paris, France, Pp 47-62.
- Zohar Y (1989a). Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. In: Shilo M, Sarig S (eds). *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, USA, Pp 65-119.
- Zohar Y (1989b) Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction growth, and smoltification. *Fish Physiol Biochem* **7**, 395-405.
- Zohar Y y Mylonas CC (2001) Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197**, 99-136.

Figuras

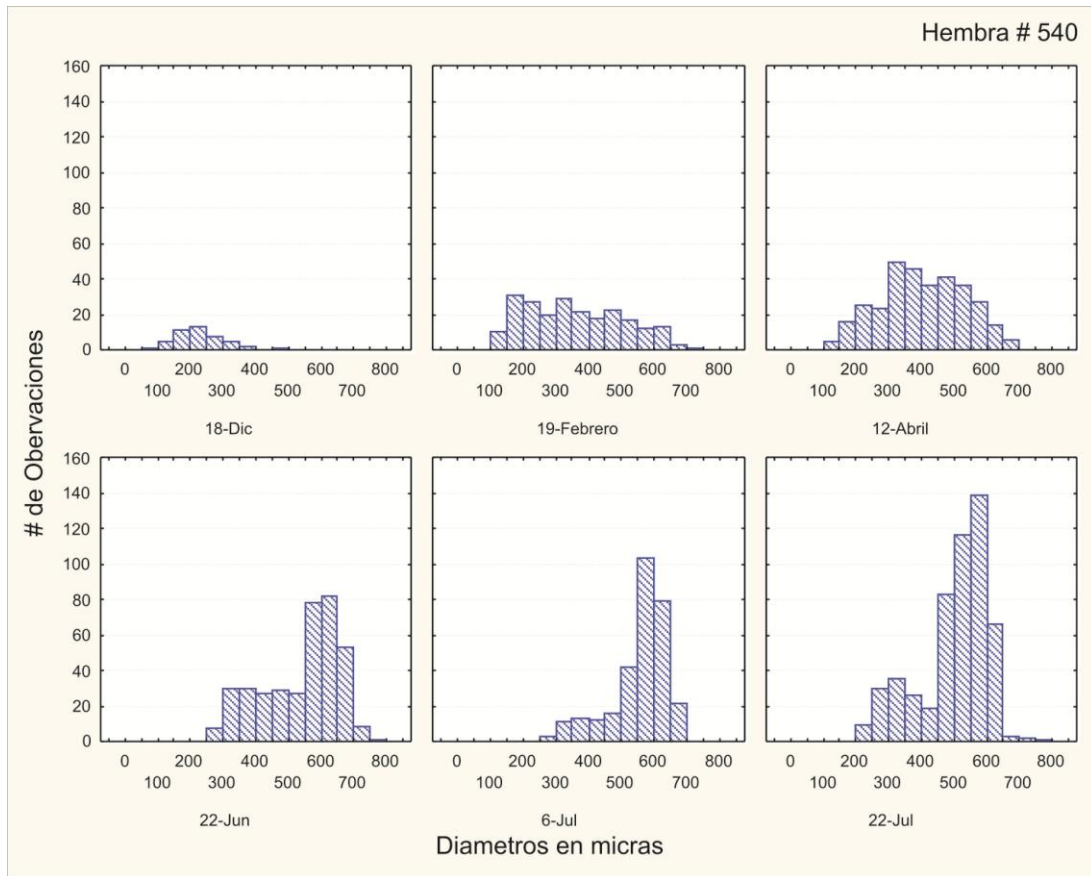


Figura 1. Distribución típica del tamaño de los ovocitos de Totoaba durante el periodo de vitelogénesis (Crecimiento).

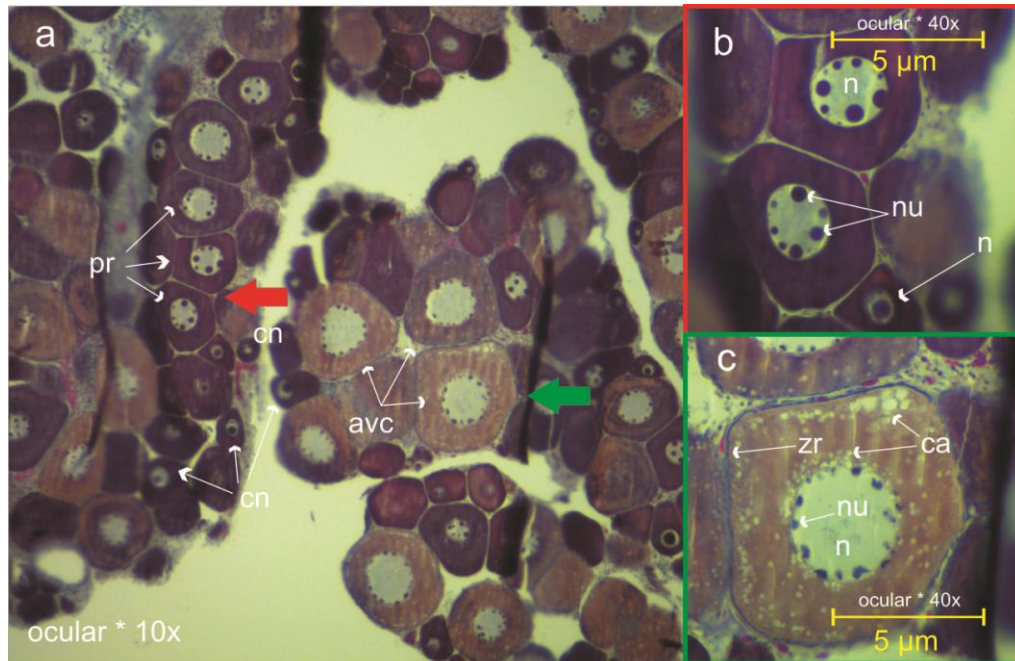


Figura 2. a) Corte histológico de biopsia ovárica de Totoaba a fines de invierno, tinción hematoxilina-eosina con contraste (Arteta), ovocitos en estadios inmaduros; cr=cromatina nuclear, pr= perinuclear, avc=alveolo cortical. b) detalle de estadios cromatina nuclear y perinuclear; n= núcleo, nu=nucléolo. c) Detalle del estadio de alveolo cortical; n=núcleo, un=nucléolo, av=alveolo cortical, zr=zona radiata.

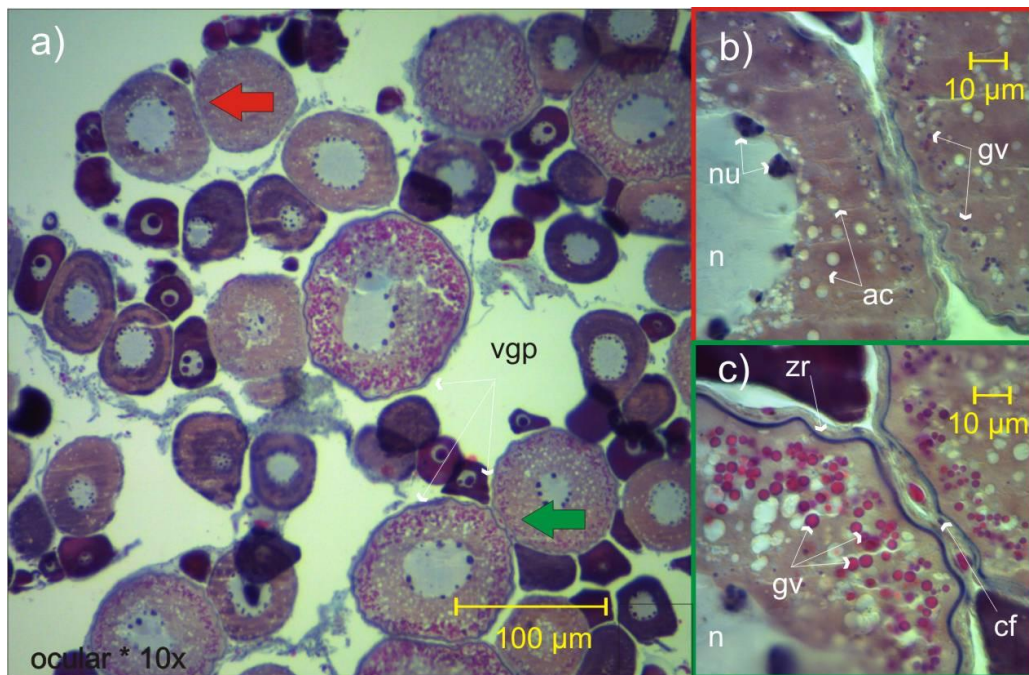


Figura 3. a) Corte histológico de biopsia ovárica de Totoaba a inicios de primavera, tinción hematoxilina-eosina con contraste (Arteta), ovocitos en vitelogénesis primaria; vgp=vitelogénesis primaria. b) Detalle gránulos de vitelo iniciales ;vg=gránulos de vitelo, ac=alveolo cortical, n=núcleo, un=nucléolo. c) Detalle de gránulos de vitelo; gv=gránulos de vitelo, cf=células foliculares, zr=zona radiata, n=núcleo.

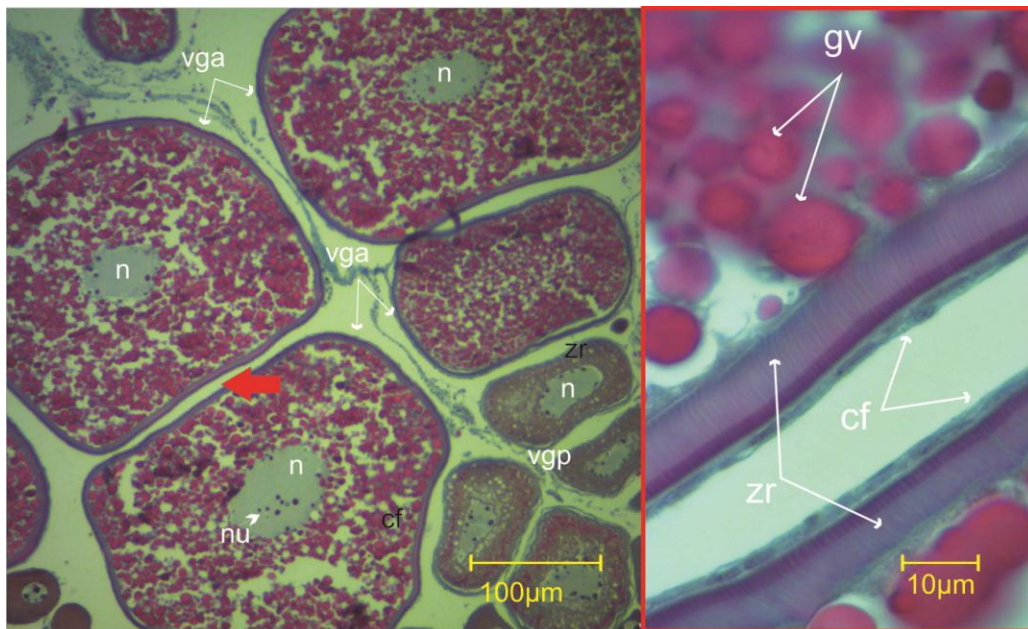


Figura 4. Corte histológico de biopsia ovárica de Totoaba a mediados de Verano, tinción hematoxilina-eosina con contraste (Arteta), ovocitos en vitelogénesis avanzada; vga=vitelogénicos avanzados. Detalle de ovocitos vitelogénicos avanzados. n=núcleo ó vesícula germinal, un= nucléolo, zr=zona radiata, cf=células foliculares, gv=gránulos de vitelo.

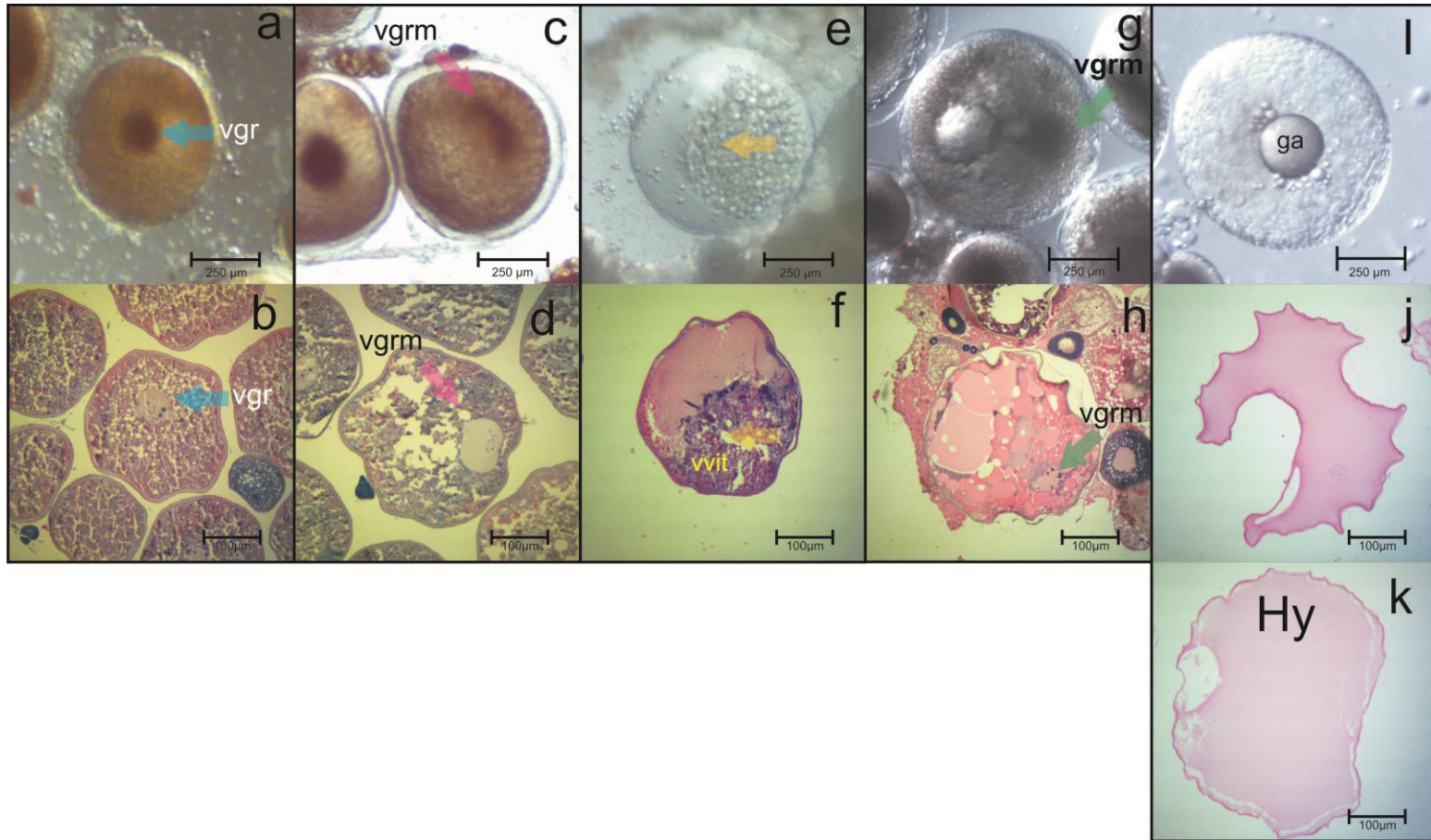


Figura 5. Secuencia de maduración citoplásmica final de los ovocitos de Totoaba hasta el momento de la ovulación (posterior al implante con GnRHa). Comparativa entre muestras ováricas frescas aclaradas y cortes histológicos. a,b) Vitelogénicos terciarios con núcleo central, c,d) con migración de vesícula germinal, e,f) etapa de conjugación, g,h) conjugación avanzado-hidratación e i,j,k) ovulación; vgr=vesícula germinal (núcleo), vgrm=vesícula germinal migrando, vvit=vesículas vitelinas, ga=gota de aceite.

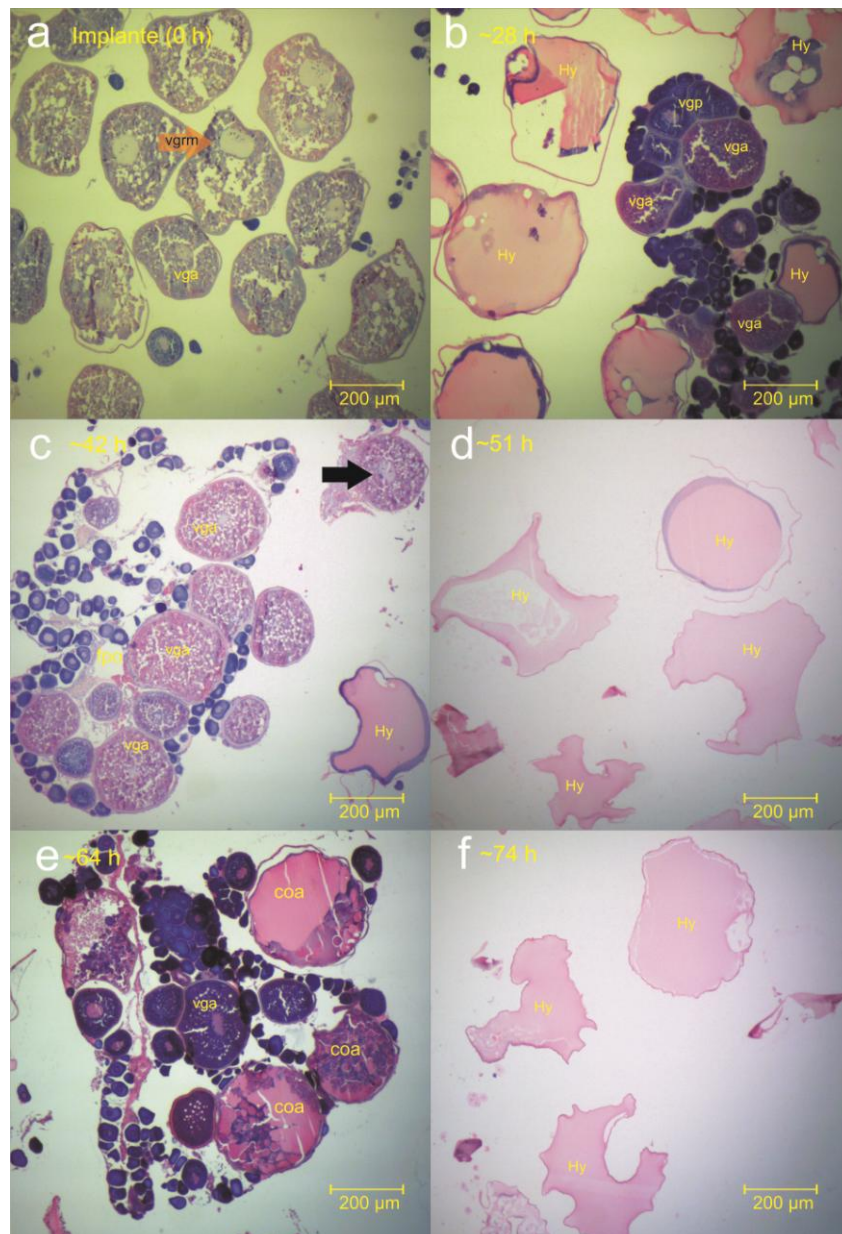


Figura 6. Secuencia de ovulaciones en cortes histológicos de muestras ováricas de Totoaba con tinción H&E a partir del momento del implante. (a) Momento de implante 0h, notar versículo germinal migrado, (b) 28 horas post implante con evidencia de ovocitos hidratados y ovulados, (c) 42 h post implante con evidencia de vitelogénicos avanzados y folículos post-ovulatorios, d) 51 h post implante ovocitos hidratados y ovulados, e) 64 h post implante evidencia de vitelogénicos avanzados y en etapa avanzada de conjunción, f) 72 h post implante ovocitos hidratados y ovulados.

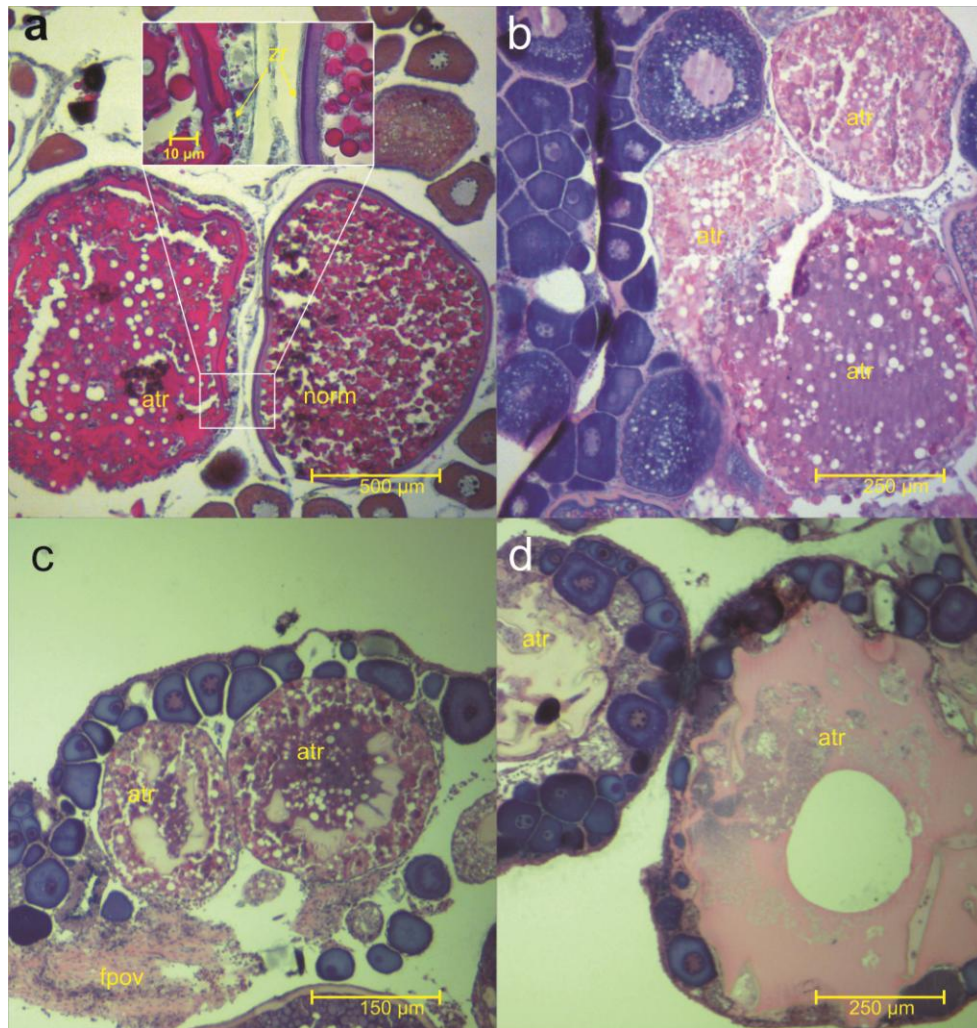


Figura 7. Distintos grados de atresia en ovocitos presentados en hembras de Totoaba durante la época reproductiva. zr= zona radiata, atr=atrésicos, fpov=folículo post ovulatorio.

Tabla 1. Pruebas de inducción hormonal con el análogo GnRH suministrado en suero salino y mediante implante de liberación prolongada.

Forma de entrega de GnRHa	Desoves / ♀ (A) #Huevos/hembra		Desoves / ♀ (B) #Huevos/hembra		Desoves / ♀ (C) #Huevos/hembra		Total de Huevos
	~36 h	~60 h	~36 h	~60 h	~36 h	~60 h	
NaCl 0.9%	10,567,000	NA	NA	NA	NA	NA	10,567,000
NaCl 0.9%	NA	3,467,000	765,000	NA	NA	NA	4,232,000
NaCl 0.9%	4,523,500	NA	980,000	470,800	NA	NA	5,974,300
NaCl 0.9%	856,700	2,567,800	460,550	340,600	NA	NA	4,225,650
NaCl 0.9%	970,000	540,560	NA	NA	NA	NA	1,510,560
*Implante	560,000	450,000	740,760	780,700	540,700	NA	3,072,160
*Implante	790,900	NA	NA	750,800	840,300	NA	2,382,000
*Implante	740,600	NA	NA	870,000	NA	NA	1,610,600

CAPITULO III.

Purificación, caracterización y uso de las vitelogeninas de Totoaba como elemento para sexar a los reproductores hembra de Totoaba.

¹Conal D. True, ²Benjamin J. Reading y ²Craig Sullivan.

¹ Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas,
Km 103 Carretera Tijuana – Ensenada Código Postal 22860 , Ensenada, Baja California

² Department of Biology, North Carolina State University, Raleigh, NC 27607, USA.

Conal D. True, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas,
Carretera Tijuana, Ensenada Km 103, Ensenada, Baja California, México. CP 22860.

Email: ctrue@uabc.edu.mx

Titulo Breve: Caracterización e identificación de vitelogeninas en Totoaba.

Palabras Clave: Totoaba, reproducción, vitelogeninas, Sciaenidae.

Resumen

A partir del suero sanguíneo de especímenes de totoaba jóvenes, inducidos con estradiol, fue posible purificar por cromatografía de intercambio iónico una fracción que presenta un peso molecular de ~540 kDa en su forma nativa y ~190 kDa después de su reducción. Dicha fracción presentó immuno-reactividad positiva al anticuerpo α FSPWP/toto, formando dos bandas de precipitación que sugirieron la presencia de una mezcla de dos tipos de vitelogenina, presumiblemente VtgAa y VtgAb. Mediante espectrofotometría de masas se obtuvo evidencia concluyente de la presencia de estos dos tipos de proteínas. De forma complementaria, a partir de tejido hepático de los organismos inducidos con estradiol, se aislaron y se clonaron secuencias (cDNA) parciales que codifican para los tres tipos de vitelogenina conocidos; VtgAa, VtgAb y VtgC. Los resultados de este trabajo indican que hay evidencia suficiente para establecer que *Totoaba macdonaldi* presenta múltiples formas de vitelogenina. La extracción e identificación de estas proteínas constituye una herramienta para la tipificación del género “hembra” en el periodo de maduración en cautiverio, lo cual ha probado ser muy importante para lograr su reproducción.

Abstract

From estrogen induced juvenile totoaba serum it was possible to purify a protein fraction by means of ion exchange chromatography, this fraction had a MW ~540 kDa in its native form and ~190 kDa after reducing conditions, it had positive immuno reactivity to the antibody α FSPWP/toto, suggesting this protein fraction is a vitellogenin type protein. Two precipitin bands were evident in such immune reactions proposing the presence of two forms of vitellogenin, presumably VtgAa and VtgAb. Using mass spectrophotometry conclusive evidence of both vitellognins was established. In a complementary study using hepatic tissue from estrogen induced juveniles partial cDNA sequences for all the types of vitellogenin were deduced; VtgAa, VtgAb and VtgC. The results from this study establish sufficient evidence that multiple forms of vitellogenin are present in *Totoaba macdonaldi*. Extraction and identification of these proteins has become a useful tool in female gender identification during reproductive maturation.

Introducción

Las vitelogeninas (Vtgs) son el grupo de precursores proteícos de origen hepático de mayor importancia en la formación de la yema del huevo en los animales ovíparos (Wallace 1985; Mommsen y Walsh 1988). En los teleósteos su arreglo general comprende 5 dominios dispuestos de forma lineal consecutiva en el siguiente orden: Una lipovitelina de cadena pesada (LvH), una fosvitina (Pv), una lipovitelina de cadena ligera (LvL), un componente designado β (c- β), y una proteína C-terminal (c-t) (Hiramatsu *et al.*, 2005; Finn y Kristoffersen, 2007). Durante los últimos años, con el avance en el desarrollo de técnicas moleculares y proteómicas, se ha logrado descubrir que en los peces estas proteínas están caracterizadas por al menos 3 variantes y que poseen un alto grado de conservación taxonómica evolutiva (Finn y Kristoffersen 2007, Reading *et al.*, 2009). Dos de ellas contienen todos los elementos antes descritos con una estructura homóloga muy similar (VtgAa y VtgAb) y la tercer variante que carece de la “fosvitina” (VtgC).

Esta multiplicidad y grado de conservación en los peces ha llamado mucho la atención, iniciando estudios para elucidar sus funciones fisiológicas en las etapas finales de la maduración ovárica y durante el desarrollo embrionario. En el lenguado japonés *Verasper moseri* cuyos huevos presentan el fenómeno de la hidratación tan común en especies pelágicas se ha identificado que existe una proteólisis diferenciada a partir de las VtgAa y VtgAb. En la cual la primera de estas proteínas es la que aporta una mayor cantidad de aminoácidos libres y desencadena dicho proceso de hidratación (Matsubara *et al.*, 1999). De forma concomitante se ha detectado un uso diferencial de estas proteínas durante el desarrollo embrionario de *Gambusia affinis* (Sawaguchi *et al.*, 2005).

Muchas de las especies de teleósteos marinos con potencial de cultivo han probado presentar ciertas dificultades para su domesticación ya sea a nivel de su etapa reproductiva (Zohar y Mylonas, 2001) ó durante el cultivo larvario (Rønnestad *et al.*, 1999) y el estudio de las vitelogeninas y sus derivados proteolíticos han permitido aminorar dichas dificultades (Specker y Sullivan 1994; Patiño y Sullivan 2002). Su uso más directo es en la

identificación del género en especies de peces que carecen de dimorfismo sexual secundario, ya que esta proteína es sintetizada específicamente por las hembras (Takemura y Oka, 1998; Heppell y Sullivan, 2000; Mendoza Alfaro *et al.*, 2008; Chu-Koo *et al.*, 2009) permitiendo así su correcta clasificación. Otra de las aplicaciones, no menos importante, es el estudio de la vitelogénesis *per se* en relación con la descripción de las distintas etapas de la ovogénesis en teleósteos; ya que se ha documentado que el inicio de la etapa de maduración ovárica final coincide con una disminución abrupta en la síntesis de estas proteínas, lo que conjuntamente con evidencias morfo-fisiológicas permite acotar la ventana propicia para la inducción hormonal (Weber *et al.*, 2000; Zohar y Mylonas, 2000; Sullivan *et al.*, 2003; Cnaani y Levavi-Sivan, 2009).

A pesar del extenso estudio de la vitelogénesis en perciformes (Patiño y Sullivan, 2002), para la familia Sciaenidae el nivel de conocimiento es limitado, aún cuando se han desarrollado el cultivo comercial y experimental de varias especies (Arnold 1988 ; Battaglione y Talbot 1994 ; Wan-shu y Qi-yong 2002 ; Hervas *et al.*, 2010). A la fecha sólo se tiene registro de la identificación y cuantificación general de estas proteínas en dos especies de scianidos; en la curvina moteada *Cynoscion nebulosus* y el tambor rojo *Sciaenops ocellatus* (Copeland y Thomas, 1988 ; Ying *et al.*, 2007).

Durante los últimos años se han desarrollado de forma muy intensa los procedimientos generales para el cultivo de *Totoaba macdonaldi* (ver capítulo 1 de este trabajo), especie de teleósteo endémico y en peligro de extinción del golfo de California de la familia Sciaenidae (Flanagan y Hendrickson 1976). Durante el desarrollo de estos procedimientos uno de las limitantes iniciales era la ausencia de características sexuales secundarias que permitieran diferenciar el sexo de los reproductores, aspecto que ha probado ser fundamental para lograr su reproducción en condiciones de cautiverio. El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar mediante técnicas proteómicas y moleculares las vitelogeninas en esta especie y así mismo explorar su uso para la identificación positiva de hembras previo a la reproducción.

Método

Origen de los organismos usados en el estudio y obtención de muestras

Todos los organismos adultos de este estudio son resultado de la colecta de organismos silvestres acorde a las disposiciones oficiales en la Norm Ecol 059 (SEMARNAT). Previo al inicio de este estudio habían permanecido en cautiverio bajo control de maduración artificial por lo menos 3 años, exhibiendo cortejo reproductivo de forma evidente (ver Capítulo 1). Del total del banco de reproductores (36 organismos), fue posible identificar de forma previa 2 hembras y 5 machos. Las hembras se identificaron por el abultamiento de su abdomen durante la fase final reproductiva y corroborado por la presencia de ovocitos vitelogénicos avanzados $>600\ \mu\text{m}$ mediante biopsia ovárica (King *et al.*, 1994). Los machos se identificaron por la producción de semen, evidenciado mediante palpo ventral. Para la obtención de muestras de sangre (hembras y machos) se procedió a anestesiarse a los organismos en un baño de tricainemetanosulfonato (TMS-222; Western Chemical Inc., Ferndale, WA) a 50mg L^{-1} de forma individual, y se les extrajo un mínimo de 6 ml de sangre con jeringas hipodérmicas previamente heparinizadas (heparina de amonio Sigma). Inmediatamente después la sangre se adicionó con 25 μL aprotinina (Sigma) (3mg/ml en 0.9% NaCl) y se centrifugó a 9000 rpm 20 min para separar el suero. Finalmente el suero se separó en alícuotas y congeló a -80°C para su posterior análisis.

Inducción de vitelogénesis y obtención de muestras de suero y tejido

Un total de 6 juveniles de Totoaba de un año de edad y $\sim 1.2\ \text{kg}$ de peso corporal, producto de la reproducción del banco de reproductores silvestres de la UBP se utilizaron para la inducción de vitelogénesis mediante la aplicación de $17\ \beta$ estradiol (Sigma). La inducción se realizó a una concentración de $5\ \text{mg kg}^{-1}$ a partir de una solución stock de $50\ \text{mg ml}^{-1}$ previamente disuelto en propilenglicol (5mg ml^{-1}) e inyectado de forma intraperitoneal de acuerdo a lo descrito por (Jackson y Sullivan, 1995). La respuesta se reforzó en 3 ocasiones adicionales mediante la aplicación en intervalos de 7 días y finalmente el día 22 días los organismos se sacrificaron mediante trauma cefálico y se les

extrajo ~ 6 ml de sangre de acuerdo a lo descrito anteriormente. Inmediatamente después de la extracción la sangre se centrifugo para separar el suero de las células sanguíneas, se adiciono 25 μ L de aprotinina (3mg/ml en 0.9% NaCl) como inhibidor de proteasas y procedió a congelarse en sub alícuotas para su posterior uso. Los organismos experimentales se disectaron para obtener muestras hepáticas, seccionándolas en cubos de $\sim 1\text{cm}^3$ que se conservaron en RNAlater® (AMBION) y almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

Proteómica

Purificación de vitelogeninas

La purificación de las fracciones que putativamente contenían las vitelogeninas, se realizó de acuerdo a las metodologías descritas por Tao *et al.*, (1996), Heppell *et al.*, (1999) y Hiramatsu *et al.*, (2002) con algunas modificaciones. Se inició a partir de un “pool” del plasma de 3 juveniles de Totoaba inducidos a la vitelogénesis con estradiol, en un volumen combinado inicial de 2.4 ml disuelto 1:1 v/v en el amortiguador TBP (1, 3-bis [tris (hydroximetil) metilamino]-propano, 20mM, pH 9) adicionado con 150mM NaCl, 4 IU/L aprotinina y 10% sacarosa, filtrado a $0.8\mu\text{m}$ con un filtro membrana (Nalgen). El plasma diluido fue sujeto a una cromatografía iónica de columna abierta (0.5cm X 33.5cm) con medio de perfusión POROS 50 HQ (Perspective Biosystems) previamente equilibrada a 4°C a un flujo de 40 mL h^{-1} con TBP 20mM, adicionado con 150mM NaCl y 4 IU/L aprotinina. El plasma previamente diluido se inyectó a la columna usando como eluyente cromatográfico TBS 20 mM. La sección del “PASS” se colectó de las fracciones 1-18 en tubos de 3.5 ml, seguido de la adición de un gradiente salino a partir de 150 mM a 600 mM NaCl en conjunto con el mismo amortiguador. La elusión se monitoreo a una longitud de onda de 280 nm. Se colectaron las fracciones 55-78 de acuerdo a lo propuesto por (Hiramatsu *et al.*, 2002a) conservando las muestras a 4°C para su posterior análisis. Las fracciones identificadas con mayor absorbancia 65-69 que se dividieron en dos subgrupos; el primero se guardó -80°C para posterior análisis y el segundo se dializó en 500 ml de

solución amortiguadora PBS (0.14 M NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ , 2 mM KH₂PO₄, ajustado a pH 7.2) por 24 hrs para su posterior uso.

Detección de vitelogeninas

Para la identificación de la presencia de las vitelogeninas de totoaba en las fracciones colectadas se utilizó un ensayo de immuno-difusión (Mancini *et al.*, 1965) en presencia de un anticuerpo específico contra vitelogenina desarrollado en lobina *Morone saxatilis* (α FSPP; Tao *et al.*, 1996). Para aumentar la especificidad de este anticuerpo ante la vitelogenina de totoaba se adsorbió con volúmenes equivalentes v/v 1:1 de plasma de macho de totoaba y de perca blanca *Morone americana* (conspecífico taxonómico de *Morone saxatilis*) (Tao *et al.*, 1996). La immuno-difusión se realizó en geles de agarosa al 1% usando un amortiguador 50 mM barbital y 0.9% NaCl conteniendo 0.1% Azida de sodio (NaN₃). La presencia de vitelogenina se evidenció mediante la formación de bandas de precipitación, teñidas con una solución preparada de “Amido Black”.

Electroforesis en poliacrilamida y Western Blots

Las fracciones y muestras de plasma fueron sometidas a electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) y no desnaturalizante (Native-PAGE) en geles de poliacrilamida de gradiente 4-15% (Ready Gels; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970). Los geles se tiñeron de forma estándar con azul brillante de Coomassie al 0.1% (Tao *et al.*, 1993). La estimación de los pesos moleculares de las fracciones cromatográficas y muestras de plasma se realizó de forma comparativa con estándares de peso molecular correspondientes (SDS-PAGE y NATIVA) (Broad range; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las proteínas separadas en los geles SDS-PAGE y NATIVO se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una solución amortiguadora (50 mM Tris, 380 mM glicina, 0.1% SDS, 20% metanol, pH 8.3) usando un sistema de transferencia semi-seco (PhastTransfer TM ,Pharmacia Inc.) ajustado al tamaño de los geles. Las áreas de reacción no específicos se bloquearon incubando dichas membranas en la siguiente solución amortiguadora; PBS (0.14 M NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ , 2 mM KH₂PO₄, ajustado a pH 7.2) adicionado con 5% de suero de cabra y 0.02% NaN₃; durante 24 horas con agitación. Las membranas se lavaron en dos ocasiones

sucesivas por 5 min en PBS y se incubaron con el anticuerpo (α FPSP adsorbido con suero de totoaba y percas macho v 1:1:1) de la siguiente forma. El anticuerpo se diluyó 1:100 v/v en PBS con suero de cabra al 5%, la incubación se realizó durante 2 horas a 37°C, luego las membranas fueron lavadas en 4 ocasiones por 5 min en PBS. Seguido se incubaron en una solución con el anticuerpo secundario (anti-conejo immuno-y-globulina conjugada (SIGMA) durante una hora a 37 °C. La solución de este anticuerpo fue preparada en PBS 1:2000 v/v adicionado con 5% de suero de cabra. La visualización de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó usando el kit para identificación (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Biología molecular

Extracción, purificación y obtención de cDNA

A partir de las muestras de tejido de hígado de juveniles inducidos a la vitelogénesis y conservados en RNAlater®, se realizó la extracción de RNA total con Trizol (Invitrogen) (125 mg tejido) seguido de los procedimientos estándar de limpieza, purificación (GeneClean, Q-Bio Gene) y obtención cDNA usando transcriptasa reversa (SuperScript® II, Invitrogen) logrando suficiente muestra para la posterior clonación de secuencias parciales.

Clonación y obtención de secuencias moleculares parciales

Para la obtención de secuencias parciales de los genes que codifican para vitelogeninas en el cDNA hepático de los juveniles inducidos con estradiol se procedió a realizar un procedimiento de RT-PCR (HotStar taq, Qiagen y/o Platinum® Taq DNA Polimerasa High Fidelity, Invitrogen) con una serie de cebadores desarrollados para vitelogeninas en otras especies de teleósteos (Anexo I; **Tabla 3**), a partir de la premisa que las vitelogeninas son un grupo de moléculas evolutivamente conservadas (Finn y Kristoffersen 2007). Los cebadores se usaron concordantemente en su forma “Forward ó hacia adelante” y “reverso”. Una vez realizada la amplificación se verificó el resultado de los productos en electroforesis en gel de agarosa de 1.5 %, se seccionaron los productos del gel y se realizó la extracción y purificación de los mismos (GeneCleane, Q-BioGene). Los productos

limpios provenientes de cada cebador se clonaron independiente mediante el uso del kit de clonación (pCR® II vector-One Shot® INVaF, Invitrogen). A partir de las transformaciones competentes se seleccionaron las colonias positivas y se comprobó a veracidad la presencia del inserto mediante digestión de restricción (HotStar Taq, Invitrogen) y seguido se procedió a su cultivo en fase líquida. A las 24 hrs se aislaron los insertos a partir del cultivo en fase líquida de cada clonación (Mini-prep Kit, Promega) y se enviaron a secuenciar al Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Chicago.

Análisis de datos (Dendrogramas)

Las secuencias parciales obtenidas a partir de la secuenciación se compararon a otras secuencias primarias publicadas en la literatura y mediante la consulta de las bases de datos del NCBI (Centro Nacional de información Biotecnológica, USA) usando la herramienta de alineación y búsqueda “BLAST” (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias encontradas se alinearon de forma manual empleando el programa de MacVector™ (Oxford Molecular Ltd.) y el software con el algoritmo ClustalW (v 1.83) (Thompson *et al.*, 1994). Los parámetros de alineación múltiple se fijaron como sigue: “open gap penalti” =10.0; “extended gap penalti” =0.2; “delay divergent” =30%; “gap distance” =4 y “similarity matrix” =gonnet. Con estos datos se construyeron los dendrogramas taxonómicos correspondientes resaltando en qué posición se encuentran los fragmentos identificados.

Identificación vitelogeninas mediante espectrofotometría de masas

A partir de las muestras plasmáticas obtenidas de hembras de totoaba vitelogénicas HTV y juveniles inducidos con estradiol JTE se procedió a realizar una electroforesis reductiva (SDS-PAGE). Los productos de este procedimiento, dos bandas (HTV y JTE) se seccionaron respectivamente del gel y se sometieron de forma individual a una digestión con tripsina y enviados a espectrofotometría de masas (LC-ESI/MS/MS) a la Unidad de Ciencias Genómicas de la Universidad Estatal de Carolina del Norte. En breve de acuerdo a la metodología descrita por Zhang *et al.*, (2004), el proceso es el siguiente: Las proteínas se desnaturalizaron y sus residuos cisteínicos fueron modificados. Las muestras resultantes se liofilizaron en un concentrador SpeedVac® (Thermo Scientific), digeridos y activados con tripsina a 37 °C durante 24 horas. Subsecuentemente se centrifugaron para coleccionar los

posibles precipitados y finalmente fueron sujetas a espectrofotometría de masas en un espectrofotómetro tipo LC-ESI/MS/MS (Thermo). Los criterios de búsqueda e identificación de las secuencias proteicas se realizaron con los algoritmos Sequest versión SRF v. 5 (Thermo Fisher Scientific) y X! Tandem versión 2007.01.01.1. Los parámetros de búsqueda para dichos algoritmos se centraron en un juego de secuencias vitelogenicas conocidas incluyendo: *Pagrus major*, *Hippoglossus hippoglossus* y *Mugil cephalus*; asumiendo una digestión enzimática no específica. Los parámetros generales para la búsqueda asignados a los algoritmos fueron: fragmento de masa iónica = 1.00 Da y tolerancia iónica compartida = 2.00 Da. La modificación de las terminaciones cisteinicas (marca de mercaptoethanol) se especificó como un criterio fijo en ambos algoritmos. Un análisis de Scaffold (versión Scaffold_2_06_01, Proteome Software, Inc.) se usó para validar las identificaciones peptídicas encontradas.

Uso de las vitelogeninas como marcadores de sexo para la identificación de hembras

Dos meses antes de llegar a periodo de reproducción (inicio de la primavera) se procedió a obtener muestras de plasma de todos los reproductores presentes en el banco de la UABC, entre los cuales solo existía la confirmación previa del sexo en 7 organismos (2 machos y 5 hembras). Las muestras de plasma se obtuvieron de acuerdo al método antes descrito, en este capítulo. Se procedió a realizar una electroforesis reductiva (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida discontinuo, con la primera sección 5% “staging” y la segunda sección “resolving” del 10%. Las muestras de suero se diluyeron con una solución amortiguadora (50 mM Tris, 380 mM glicina, 0.1% SDS, 20% metanol, pH 8.3) y se cargaron a una dilución 1:10 v/v. Como control positivo de VtgAab se usó la fracción #66 de la cromatografía seguido de un macho y una hembra (carriles 1-3 respectivamente), usando los carriles adicionales para los desconocidos. Al término del corrimiento, el gel se tiñó con azul brillante de coomassie al 0.1% para su interpretación. (Tao *et al.*, 1996)

Resultados

Proteómica

A partir de la cromatografía de intercambio iónico se distinguen dos picos (**Fig 1a**) ó máximos de absorbancia. El primero que corresponde a la sección “PASS” entre las fracciones 4~10 y no presenta imuno-reactividad alguna ante el anticuerpo α FSPPwp/toto (**Fig 1b**). El segundo pico de máxima absorbancia se ubicó en la elusión entre 0.350 y 0.450 M NaCl y corresponde aproximadamente a la fracción 66 (**Fig 1a**). Es de notar que en la elusión las fracciones 55-78 presentan una alta imuno-reactividad al anticuerpo (α FSPPwp/toto) (**Fig 1c**), presentando dos líneas de precipitación (**inserto Fig 1c**) lo cual es indicio de la presencia de 2 proteínas homologas de peso molecular similar. La **Figura 1d** muestra la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) correspondiente a esta cromatografía. Se aprecia claramente la carencia de proteínas de gran peso molecular en las sección “PASS” comprendida de las fracciones 1-18 en contraste con las fracciones presentadas para la elusión (fracciones 60-73) en las que se observa claramente una franja marcada entre ~100 y 190 kDa de peso molecular, con algo de degradación marginal hasta los 50 kDa.

En búsqueda de una comprobación ortogonal de la presencia de proteínas específicas de tipo vitelogenina, se realizaron una serie de pruebas imuno-reactivas (Mancini *et al.*, 1965). La **Figura 2a** es la comprobación de que la fracción 66 de la elusión y el suero de una hembra vitelogénica (hembra 540) precipitan de igual forma ante el anticuerpo (α FSPPwp/toto) y constituyen la primer evidencia de que las proteínas purificadas son específicas para hembras, así mismo es de notar que no hay línea de precipitación en el macho 279, el cual se presenta como control negativo. La **Figura 2b** corresponde a una prueba imuno-reactiva para evidenciar la presencia de vitelogeninas VtgAa y VtgAb mediante su reactividad independiente al anticuerpo (Hiramatsu *et al.*, 2002d, Tao *et al.*, 1996). Para esta prueba se tomaron las fracciones en ambos extremos de la elusión (E56 y E75) y empleando una hembra (540) y un macho (279) como controles positivo y negativo respectivamente. La **Figura 2b** no es concluyente para la presencia de 2 proteínas

independientes pues a pesar de darse la precipitación no existen líneas entrecruzadas entre las fracciones de las eluciones.

A partir de la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) es posible ver como la fracción 66 de la elusión presenta una banda definida a los ~190 kDa de peso molecular, la cual también se evidencia en la hembra vitelogénica pero no en el macho (**Fig 3a**). Esto se confirma en sus correspondientes western blot (α FSPP wp/toto y α FSPP wp) mediante la reacción positiva ante el anticuerpo y por la presencia de la misma banda a los ~190 kDa de peso molecular tanto para la hembra como para en la fracción 66 (**Fig 3b y c**). La electroforesis “NATIVA”, en su tinción de azul de coomassie revela dos bandas en la fracción 66, una muy tenue ~544 kDa y otra abajo más definida ~294 kDa sin una clara correspondencia con la hembra vitelogénica (**Fig 4 a**), mas sin embargo ambas bandas si se evidencian para la fracción 66 en los western blot de este mismo electroforetograma, ante los anticuerpos (α FSPP-wp/toto y α FSPP-wp) (**Fig 4b y c**). No obstante la banda de mayor peso molecular ~544 kDa no se presenta para la hembra vitelogénica.

Biología molecular

En el presente estudio fue posible obtener evidencia molecular concluyente de la presencia de los genes que codifican para los tres tipos de vitelogeninas identificados en teleósteos VtgAa, VtgAb y VtgC (Finn y Kristoffersen 2007). Para VtgAa se lograron clonar 4 secuencias parciales de cDNA (168-428, 555-961, 1150-1288 y 1277-1503; ver Anexo) que se agrupan filogenéticamente con los teleósteos avanzados (**Fig 5b**) y que presentan este tipo de vitelogenina según Finn y Kristoffersen (2007). Para la VtgAb solo se logró clonar una secuencia parcial cDNA (1445-1587; ver Anexo) que de igual forma se agrupa en una posición taxonómicamente correcta (**Fig 6a**) de acuerdo a Finn y Kristoffersen (2007). Para la VtgC se obtuvieron 3 secuencias parciales de las cuales dos conformaron un contig ya que sus secuencias se traslaparon al momento de hacer el alineamiento quedando una sola secuencia parcial de cDNA (47-389; ver Anexo) y una tercer secuencia parcial de

cDNA para VtgC (801-1042; ver Anexo), quedando agrupados dentro del grupo taxonómico que presenta genes para esta proteína (**Fig 7b**). Es interesante notar que en los distintos clados presentados para las secuencias parciales anteriores en los que aparece totoaba, la comparten mayormente con *Morone americana*, *Pagrus major* y *Thunnus thynnus* (Figs 5-7). Utilizando a *Morone americana* se probó el grado de homologación de las secuencias parciales obtenidas, encontrando que en general se encuentran ente 79.3 y 86.6%, a excepción de la secuencia para VtgAa de 1050-1288 que presento un grado de identidad homóloga de 64.4 % (Ver * los dendrogramas (**Figs 5-7**).

Identificación de vitelogeninas mediante espectrofotometría de masas

A partir de la hembra vitelogénica (HTV) la espectrofotometría de masas produjo 15 espectros peptídicos únicos correspondientes a la VtgAb, asociando 11 de ellos a *Pagrus major* y cuatro de ellos a *Mugil cephalus* (Ver Anexo). En el caso de los juveniles inducidos con estradiol (JTE) se produjeron 56 espectros únicos correspondientes tanto para VtgAa como para VtgAb y asociados a las siguientes especies de teleósteos: *Pagrus major*, *Hippoglossus hippoglossus* y *Mugil cephalus*. De estas 56 secuencias, 26 a VtgAa y 30 corresponden a VtgAb (ver Anexo). No se detectaron secuencias para VtgC.

Uso de las vitelogeninas para la identificación de hembras de Totoaba

La **Figura 8** muestra la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) realizado con muestras de plasma del banco de reproductores de totoaba de la UABC. El primer carril corresponde al control positivo (Fracción 66), el segundo carril es el control negativo (macho maduro previamente identificado) y el tercer es un segundo control positivo (hembra previamente identificada). En lo carriles subsecuentes se puede apreciar la clara correspondencia e identificación de 10 hembras, por la presencia de la banda correspondiente a la fracción 66.

Discusión

Antes de la identificación de las vitelogeninas en teleósteos ya se habían reconocido mediante técnicas inmunológicas proteínas en suero cuya especificidad era exclusivamente relacionada a las hembras; (Plack *et al.* 1971; Aida *et al.* 1973; Le Menn 1979; Hara *et al.* 1983, 1986), constituyendo esto uno de los primeros antecedentes de la posible multiplicidad de esta familia de proteínas. En subsecuentes años la integración de métodos moleculares en conjunto con mejores técnicas de purificación y técnicas proteómicas (Hiramatsu *et al.*, 2006) han hecho posible comprobar tres variantes de vitelogeninas VtgAa, VtgAb y VtgC en especies de peces con diferente posición taxonómica (Hiramatsu *et al.*, 2005, 2006; Sawaguchi *et al.*, 2005, 2006; Amano *et al.*, 2007a, b, 2008; Finn and Kristoffersen 2007). En el presente estudio se usaron tres vías para esta determinación: 1) la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico en conjunto con evidencia inmunológica, 2) la clonación parcial de secuencias que codifican para estas proteínas y 3) la identificación mediante espectrofotometría de masas.

La evidencia cromatográfica para los juveniles inducidos del presente estudio indica la presencia de dos proteínas con immuno-reactividad específica ante el anticuerpo α FSPWp/toto como puede verse por las dos líneas de precipitación en las fracciones de la elución (**Inserto Fig 1c**) (Hiramatsu *et al.*, 2002). Estas proteínas se eluyeron a altas concentraciones de [NaCl] que de acuerdo a la metodología descrita por Hiramatsu *et al.*, (2002a) y Reading *et al.* (2008) y pueden corresponder a VtgAa y VtgAb; aunque sin ser de todo concluyente, ya que al momento de hacer la prueba de immuno-reacción con las fracciones extremas (E56 y E75) de la cromatografía que deberían corresponder a dichas proteínas no formaron un entrecruzamiento a causa de precipitación diferencial (**Fig 2**). La posible causa de esto puede deberse a dos factores: 1) Que el anticuerpo utilizado no sea lo suficientemente específico por haber sido desarrollado en una familia distinta a la Sciaenidae y/o 2) Que el grado de purificación cromatográfica no sea suficiente para separar dichas proteínas por tener un peso y estructura molecular muy similar. Esto es muy factible ya que las vitelogeninas Aa y Ab en los teleósteos son dímeros con una estructura

homologa muy similar (Finn and Kristoffersen, 2007) y en muchas especies su clasificación solo se ha logrado mediante el desarrollo de anticuerpos específicos (Hiramatsu *et al* 2002d; Amano *et al.*, 2007a). Es de gran importancia resaltar que fue posible determinar que estas proteínas son específicas para hembras puesto que presentan actividad inmunológica de forma análoga con plasma de una hembra vitelogénica y no con el plasma de macho maduro, como se puede constatar en los western blot (**Fig 3 y 4**) y en la prueba de imuno-difusión (**Fig 2**). El peso molecular estimado de estas proteínas a través de electroforesis desnaturizante y no desnaturizante y verificado por su correspondencia en los western blot ante el anticuerpo α FPSP-wp/toto es de ~190 kDa y ~544 kDa respectivamente, lo cual la ubica dentro del rango de tamaños reportados para los homólogos VtgAa y VtgAb en otras especies de teleósteos (Hiramatsu *et al.*, 2005). Por lo que la banda presentada en las electroforesis y sus correspondientes western blots (Figs. 3 y 4), representa una combinación de ambas proteínas, a la que se designó VtgAab. Cabe resaltar la aparente ausencia del tercer tipo de proteína vitelogénica VtgC a partir de la cromatografía.

La clonación molecular a partir de los transcritos del tejido hepático de los juveniles inducidos, proporcionó evidencia de que dicho transcriptoma presenta tres moléculas únicas e independientes clonadas parcialmente y corresponden a los tres tipos de vitelogeninas VtgAa, VtgAb y VtgC identificados a partir de la alineación con las secuencias reportadas para otros teleósteos (**Figs. 5-7**). A pesar de ser secuencias parciales, la agrupación de cada secuencia parcial en los dendrogramas corresponde al grupo taxonómico que comparte su correspondiente tipo de Vtg de acuerdo a la clasificación taxonómica para este grupo de proteínas propuesta tanto por Finn y Kristoffersen (2007), como por Reading *et al.* (2008). Aunado a lo anterior, la alta homología de las secuencias parciales (65-85%) con sus correspondientes genes ortólogos en *Morone americana* son evidencia de que la totoaba cuenta con genes que codifican para los tres tipos de vitelogenina identificadas en teleósteos (Finn y Kristoffersen, 2007).

El análisis de espectrofotometría de masas para la hembra vitelogénica y el juvenil inducido confirman la presencia de VtgAa y VtgAb identificados en base a las secuencias reportadas para otras especies de teleósteos (Sawaguchi *et al.*, 2006; Finn 2007^a; Amano *et al.*, 2008) pero no muestra evidencia alguna de VtgC, lo cual es de sorprender ya que a partir de la secuenciación se identificó el gen que codifica para esta proteína (**Anexo**). Asimismo, es interesante denotar que el análisis espectrofotométrico de la hembra vitelogénica solo identificó VtgAa, mientras que en el juvenil inducido estuvieron presentes ambos homólogos VtgAa y VtgAb (**Anexo**). Una explicación para este fenómeno, podría estar asociada con que al momento del muestreo la hembra no presentara altos niveles de VtgAb en el plasma a causa de una rápida asimilación de esta molécula por los ovocitos durante su vitelogenénesis y/o por la falta de su producción hepática (Hiramatsu *et al.*, 2002c).

Las Vtgs han sido de gran utilidad como marcadores del género femenino en distintas especies de peces sujetas al desarrollo de técnicas de cultivo y reproducción (Takemura and Oka 1998; Heppell y Sullivan, 2000; Pottinger *et al.* 2005; Mendoza-Alfaro *et al.*, 2008; Chu-Koo *et al.*, 2009). Como resultado práctico del presente estudio fue posible usar la fracción purificada correspondiente a VtgAab (Fracción 66) como un indicador de la presencia de hembras de Totoaba dos meses antes de que iniciara el ciclo reproductivo mediante la realización de una simple electroforesis desnaturalizante (**Fig 8**). Esto es de gran importancia ya que la clasificación e identificación pertinente de las hembras en las etapas finales de la maduración ovárica para su posterior implante ha representado uno de los mayores obstáculos para la reproducción exitosa en cautiverio.

Conclusiones

En conjunto la información antes presentada nos permite ver que totoaba es una especie con multiplicidad vitelogénica, en la cual la evidencia molecular a partir de la secuenciación parcial ubica genes para los tres tipos de vitelogeninas VtgAa, VtgAb y VtgC. Sin embargo la información inmunológica y de espectrofotometría de masas solo soporta la evidencia de

VtgAa y VtgAb. En este contexto será necesario hacer un estudio que logre identificar con mayor especificidad estas proteínas lo cual debería de realizarse con anticuerpos creados para tal propósito a partir de hembras vitelogénicas y mediante la subsecuente clonación de las secuencias completas que codifican para este grupo de proteínas como confirmación. Finalmente estudios previos de vitelogeninas en la familia Sciaenidae solo están reportados para otras dos especies: *Sciaenops ocellatis* (Ying *et al.*, 2007) y *Cynoscion nebulosus* (Copeland y Thomas, 1988), en los que se identifica una sola variante de vitelogenina, por lo que el presente estudio es el primer reporte de multiplicidad vitelogénica para esta familia. Finalmente el uso de las vitelogeninas como marcador para identificar a las hembras antes del periodo reproductivo fue de gran relevancia en reducir el manejo de los reproductores en cautiverio y en consecuencia lograr su reproducción.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó mediante una serie de apoyos institucionales a los cuales se les agradece su soporte administrativo y financiero, gracias a: SAGARPA/CONAPESCA, SEMARNAT/Vida Silvestre, al gobierno del Estado de Baja California a través de “SEPESCA-BC” y a Fundación Produce BC. Así mismo se agradece a Valerie N. Williams y Norm Glassbrook de los laboratorios “David Clark” y Ciencias Genómicas de la Universidad Estatal de Carolina del Norte por sus asistencia en las etapas de purificación y secuenciación presentadas en este trabajo. Finalmente se agradece la colaboración del personal técnico de la UBP por la disposición en tiempo y experiencia profesional durante la obtención de las muestras ováricas y de plasma. Todos los reproductores empelados en este estudio se obtuvieron bajo los siguientes permisos de colecta especial: 090394-310-03 (Secretaría de Pesca 1994); 200596-213-03 (SEMARNAP 1996); 08052000-213-03 (SEMARNAP 2000) and SGPA/DGVS-04294 (SEMARNAT 2005).

Literatura Citada

- Aida K, Ngan PV, Hibiya T. (1973) Physiological studies of gonadal maturation of fishes. I. Sexual differences in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull Jpn Soc Sci Fish* **39**: 1107–1115.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW y Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403–410.
- Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, Sawaguchi S, Matsubara T, Sullivan C.V. y Hara A. (2007a). Purification of multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). *Mar. Biol.* **152**:1215-1225.
- Amano H., Fujita T, Hiramatsu N, Shimizu M, Sawaguchi S, Matsubara T, Kagawa H, Nagae M, Sullivan C.V, y Hara A. (2007b). Egg yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes. *J. Exp. Zool.* **307A**:324-341.
- Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, Kagawa H, Matsubara T, Sullivan C.V, y Hara A. (2008). Multiple vitellogenin-derived yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): Disparate proteolytic patterns associated with ovarian follicle maturation. *Mol. Reprod. Dev.* **75**:1307-1317.
- Arnold CR. (1988) Controlled year-round spawning of red drum *Sciaenops ocellatus* in captivity. *Red Drum Aquaculture. Proceedings of A Symposium on the Culture of Red Drum and Other Warm Water Fishes.* Arnold, C.R.; Holt, G.J.; Thomas, P. Eds, 65-70.
- Battaglene SC. y Talbot RB. (1994) Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture.*, **126**, 73.
- Cnaani A. y Levavi-Sivan B. (2009) Sexual Development in Fish, Practical Applications for Aquaculture. *Sexual Development*, **3**, 164-175.

- Copeland PA. y Thomas P. (1988) The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **91**, 17-23.
- Chu-Koo F, Dugué R, Alván-Aguilar M, Casanova-Daza A, Alcántara-Bocanegra F, Chávez-Veintemilla C, Duponchelle F, Renno JF, Tello S, Nuñez J (2009) Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, **35**, 125-136.
- Finn RN. y Kristoffersen BA. (2007). Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the “3R hypothesis”: correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. PLoS ONE, 2(1):e169.doi:10.1371/journal.pone.0000169.
- Finn, RN. (2007a). The maturational disassembly and differential proteolysis of paralogous vitellogenins in a marine pelagophil teleost: a conserved mechanism of oocyte hydration. *Biol. Reprod.* **76**:936-948.
- Flanagan CA y Hendrickson JR. (1976) Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*, **74**, 531-544.
- Hara A y Hirai H (1978) Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol* **59B**:339–343.
- Hara A, Takano K. y Hirai H. (1983) Immunochemical identification of female-specific serum protein, vitellogenin, in the medaka, *Oryzias latipes* (Teleosts). *Comp Biochem Physiol* **6A**:135–141 45.
- Hara A, Takemura A, Matsubara T y Takano K. (1986) Immunochemical identification of female-specific serum proteins in a viviparous fish, the white-edged rockfish (*Sebastes taczanowskii*), during vitellogenesis and pregnancy, and after estrogen treatment. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* **37**:101–110.

- Heppell SA. y Sullivan CV. (2000) Identification of gender and reproductive maturity in the absence of gonads: muscle tissue levels of sex steroids and vitellogenin in gag (*Mycteroperca microlepis*). *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, **57**, 148-159.
- Hervas S, Lorenzen K, Shane MA y Drawbridge MA. (2010) Quantitative assessment of a white seabass (*Atractoscion nobilis*) stock enhancement program in California: Post-release dispersal, growth and survival. *Fisheries Research*, **105**, 237-243.
- Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita T, Sullivan C. y Hara A. (2006) Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology*, **149**, 35-47.
- Hiramatsu N, Hiramatsu K, Hirano K. y Hara A. (2002c). Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.* **131A**: 429–441.
- Hiramatsu N, Matsubara T, Weber GM, Sullivan CV. y Hara A. (2002a). Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish. Sci.* **68**. Suppl. I: 694–699.
- Hiramatsu N, Hara A, Hiramatsu K, Fukada H, Weber GM, Denslow ND, y Sullivan CV. (2002a) Vitellogenin-derived yolk proteins of white perch, *Morone americana*: Purification, characterization and vitellogenin-receptor binding. *Biol. Reprod.* **67**:655-667.
- Hiramatsu N, Matsubara T, Hara A, Donato DM, Hiramatsu K, Denslow ND. y Sullivan CV. (2002d) Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.* **26**:355-370.
- Jackson LF y Sullivan CV. (1995) Reproduction of White Perch: The Annual Gametogenic Cycle. *Transactions of the American Fisheries Society*, **124**, 563-577.
- King Wt, Thomas P, Harrell RM, Hodson RG y Sullivan CV. (1994) Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *General And Comparative Endocrinology*, **95**, 178-191.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Le Menn F. (1979) Some aspects of vitellogenesis in a teleostean fish: *Gobius niger* L. *Comp Biochem Physiol* **62A**:495–500
- Mancini G, Carbonara AO. y Heremans JF. (1965) Immunological quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**: 235-254.
- Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T, Sullivan CV. y Hara A. (1999) Two Forms of Vitellogenin, Yielding Two Distinct Lipovitellins, Play Different Roles during Oocyte Maturation and Early Development of Barfin Flounder, *Verasper moseri*, a Marine Teleost that Spawns Pelagic Eggs. *Developmental Biology*, **213**, 18-32.
- Mommsen TP. y Walsh PL. (1988) Vitellogenesis and oocyte assembly. In: *Fish Physiology Vol. XI A*, pp. 347–406. Edited by Hoar, W.S. and Randall, D.J. Academic Press, New York.
- Mendoza-Alfaro R, González CA y Ferrara AM. (2008) Gar biology and culture: status and prospects. *Aquaculture Research*, **39**, 748-763.
- Patiño R y Sullivan C. (2002) Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, **26**, 57-70.
- Plack PA, Pritchard DJ y Fraser NW (1971). Egg proteins in cod serum: natural occurrence and induction by injections of oestradiol 3-benzoate. *Biochem J* **121**:847–856
- Pottinger TG, Pulman KGT, Carrick TR y Scott AP. (2005) Evaluation of biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. *J Fish Biol* **67**:1514–1533
- Reading B, Hiramatsu N, Sawaguchi S, Matsubara T, Hara A, Lively M y Sullivan C (2009) Conserved and Variant Molecular and Functional Features of Multiple Egg Yolk Precursor Proteins (Vitellogenins) in White Perch (*Morone americana*) and other Teleosts. *Marine Biotechnology*, **11**, 169-187.
- Rønnestad I, Thorsen A, Finn RN (1999) Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, **177**, 201-216.
- Sawaguchi S, Ohkubo N, Koya Y y Matsubara T (2005) Incorporation and Utilization of Multiple Forms of Vitellogenin and their Derivative Yolk Proteins during

- Vitellogenesis and Embryonic Development in the Mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zoological Science*, **22**, 701-710.
- Sawaguchi S, Koya Y, Yoshizaki N, Ohkubo N, Andoh T, Sullivan CV, Hiramatsu N, Hara A, y Matsubara T. (2005). Identification, characterization and cDNA cloning of three forms of vitellogenin, two general forms and a phosvitinless form, in a viviparous mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Biol. Reprod.* **72**:1045-1060.
- Sawaguchi S, Kagawa H, Ohkubo N, Hiramatsu N, Sullivan CV, y Matsubara T. (2006). Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.* **73**:719-736.
- Specker JL y Sullivan CV (1994) Vitellogenesis in fishes; Status and perspectives; in *Perspectives in comparative endocrinology* (eds) K G Davey R E Peter and S S Tobe (National Research Council of Canada) pp 304–315
- Sullivan CV, Hiramatsu N, Kennedy AM, Clark RW, Weber GM, Matsubara T y Hara A (2003) Induced maturation and spawning: opportunities and applications for research on oogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, **28**, 1-4.
- Tao, Y., Berlinsky, D.L., and Sullivan, C.V. 1996. Characterization of a vitellogenin receptor in white perch (*Morone americana*). *Biol. Reprod.* **55**:646-656.
- Takemura A y Oka M (1998) Immunochemical sexing of living yellowfin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogeninlike protein. *Aquaculture Research*, **29**, 245-249.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **22**:4673–4680
- Wallace, R.A. (1985) Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrate. In: *Developmental Biology*. Vol. 1. pp. 127–177. Edited by Browder, L.W. Plenum Press, New York.
- Wan-shu H y Qi-yong Z (2002) Artificial propagation and breeding of marine fish in China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **20**, 41-51.

- Weber GM, King V W, Clark RW, Hodson RG y Sullivan CV (2000) Morpho-physiological predictors of ovulatory success in captive striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture*, **188**, 133-146.
- Ying LI, Shaoguo RU y Xin B. (2007) Purificaton and Electrophoretic Comparison of *Sciaenops ocellatus* Vitellogenin. *Chinese Journal of Applied & Enviromental Biology*, **13**, 61-65.
- Zhang F, Bartels MJ, Brodeur JC y Woodburn KB (2004) Quantitative measurement of fathead minnow vitellogenin by liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry using a signature peptide of vitellogenin. *Envion Toxicol Chem* **23**:1408–1415.
- Zohar Y, Mylonas CC (2001) Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, **197**, 99-136.

Figuras

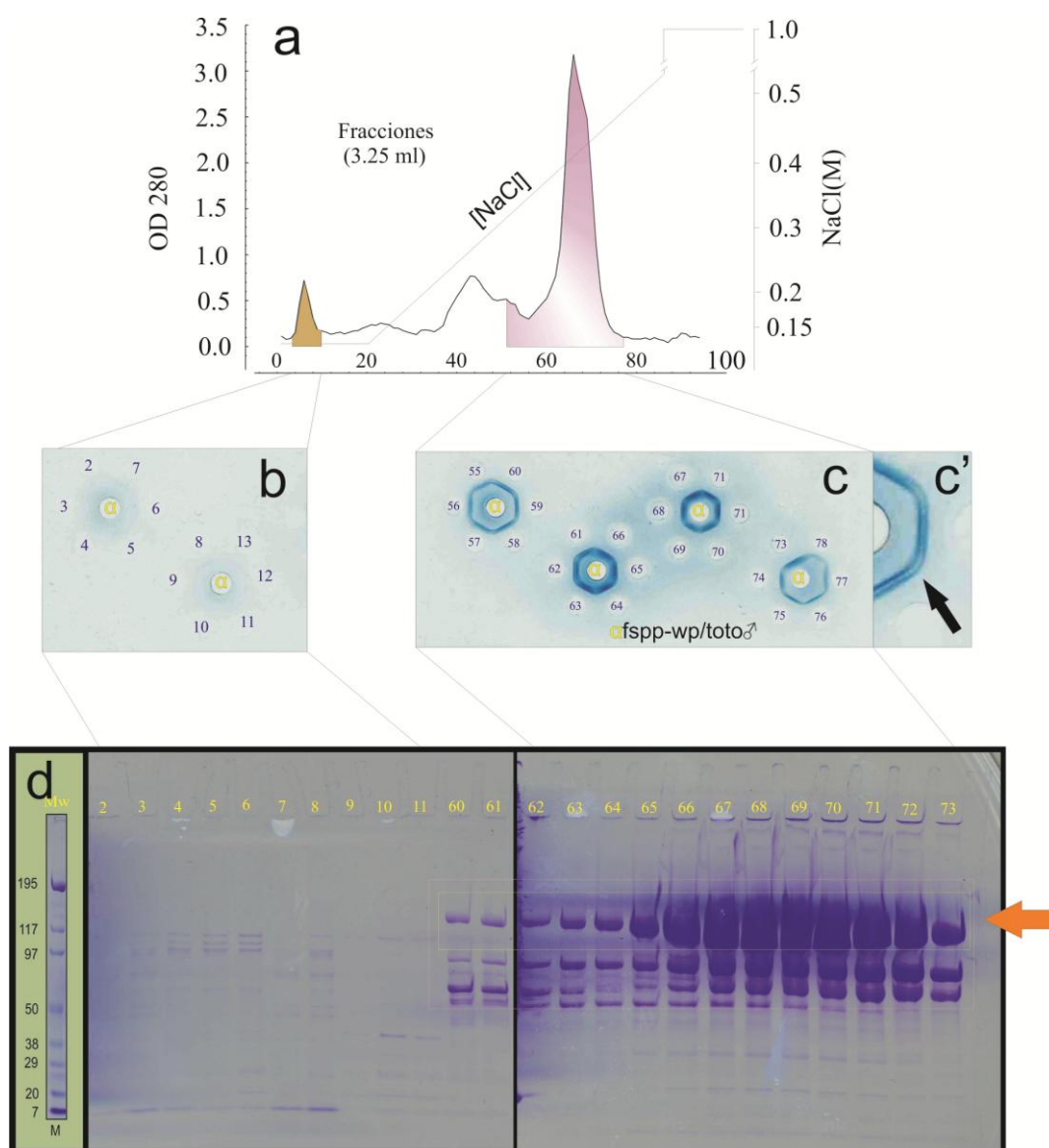


Figura 1. Purificación parcial de proteínas tipo vitelogenina a partir del suero de juveniles de Totoaba inducidos con β -estradiol mediante cromatografía de intercambio iónico de columna (Poros 50 HQ. a) Curva espectrofotométrica de las fracciones colectadas ante el cambio en la [NaCl]; en café: sección de "PASS", en morado: sección "Elusión". b,c) Placas de imuno-difusión con el anticuerpo α FSPP Toto/Wp; c') inserto: detalle de bandas de precipitación. d) SDS-PAGE de la sección del "PASS" y sección de la "Elusión" para confirmación de presencia de proteínas tipo vitelogenina.

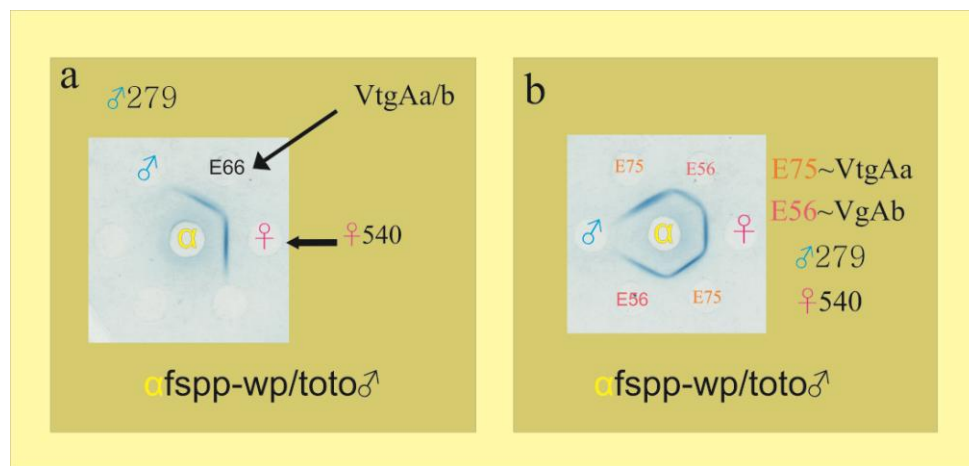


Figura 2. Placas de imuno-difusión para comprobar la especificidad del anticuerpo α FSPPwp/toto contra proteínas tipo Vtgs. a) Placa de comprobación de especificidad en la cual se observa que la fracción de elusión 66 precipita en conjunto con el suero de hembra vitelogénica y no hay precipitación con suero de macho. b) Placa comparativa entre fracciones extremas de la elusión E56-E75 fracciones de elusión, no hay entrecruzamiento entre dichas fracciones, suero de hembra y macho como controles.

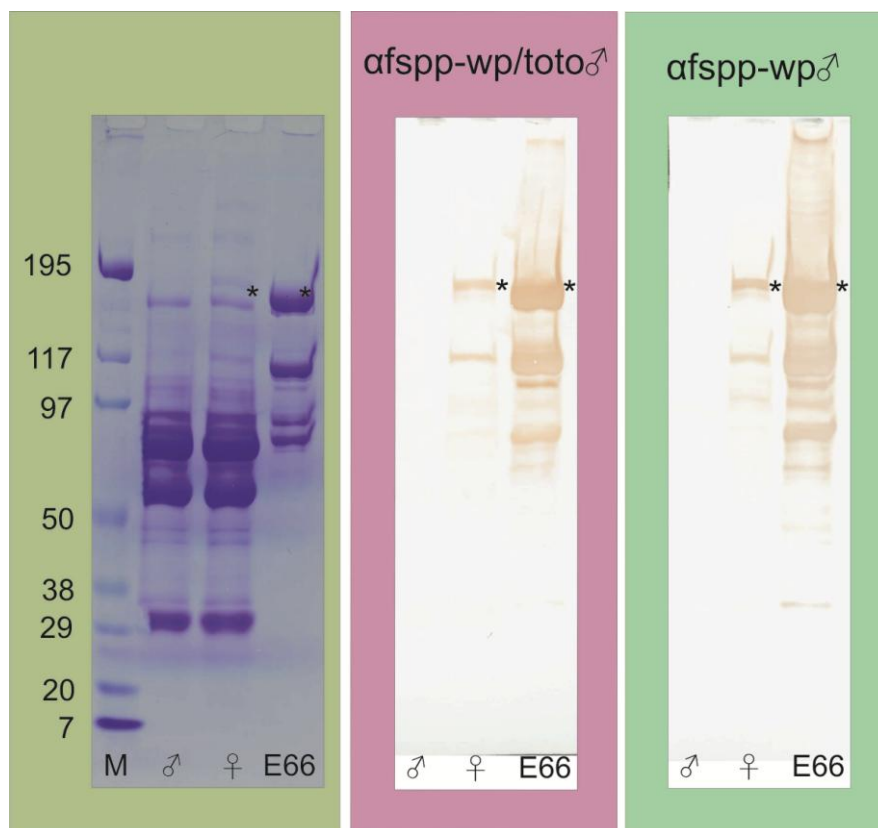


Figura 3. Resultados de electroforesis desnaturalizante con gradiente 4-15%. SDS-PAGE. a) Tinción azul/coomassie al 0.1%, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Plasma de macho maduro de totoaba, carril 3: plasma de hembra de totoaba vitelogénica y carril 4: fracción #66 de la elución cromatográfica a partir de juveniles de totoaba inducidos con β estradiol. b) Correspondiente western blot ante anticuerpo α FSPP adsorbido con suero de macho de perca blanca + totoaba (α FSPPwp/toto) y c) Correspondiente western blot ante anticuerpo α FSPP adsorbido solo con plasma de macho de perca blanca (α FSPPwp). * indica proteínas de tipo vitelogenina PM ~190 kDa.

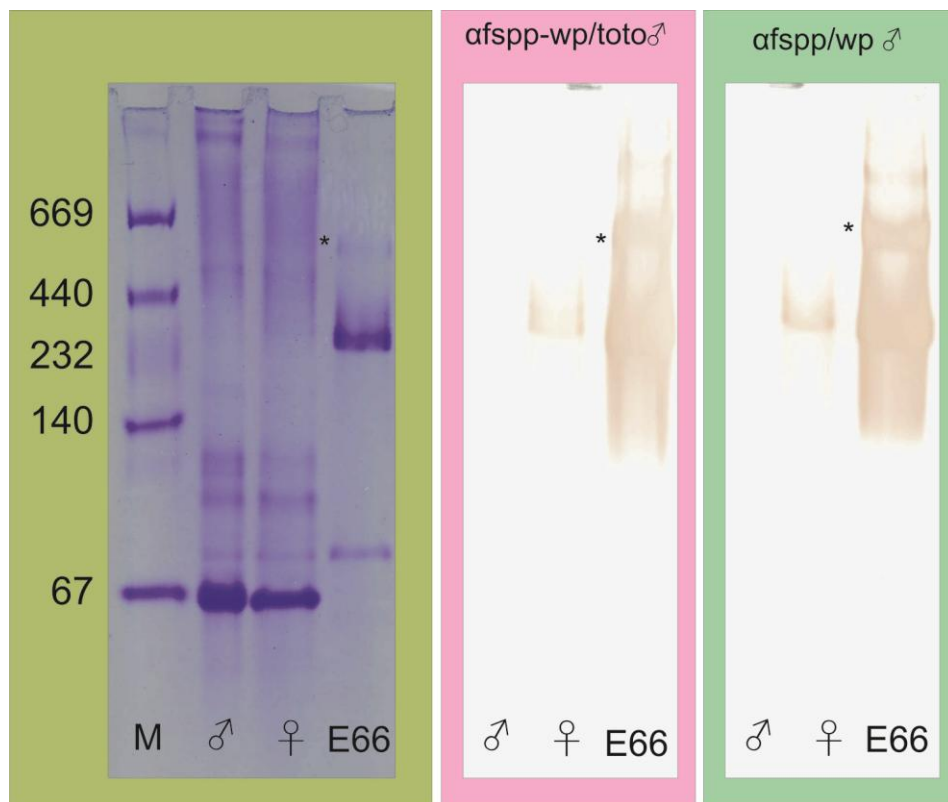


Figura 4. Resultados de electroforesis no-desnaturalizante con gradiente 4-15%. NATIVE-PAGE. a) Tinción azul/coomassie al 0.1%, carril1: marcador de peso molecular, carril 2: Plasma de macho maduro de totoaba, carril 3: plasma de hembra de totoaba vitelogénica y carril 4: fracción #66 de la elusión cromatográfica a partir de juveniles de totoaba inducidos con β estradiol. b) Correspondiente western blot ante anticuerpo α FSPp adsorbido con suero de macho de perca blanca + totoaba (α FSPpwp/Toto) y c) Correspondiente western blot ante anticuerpo α FSPp adsorbido solo con plasma de macho de perca blanca (α FSPpwp). * indica proteínas de tipo vitelogenina PM ~544 kDa.

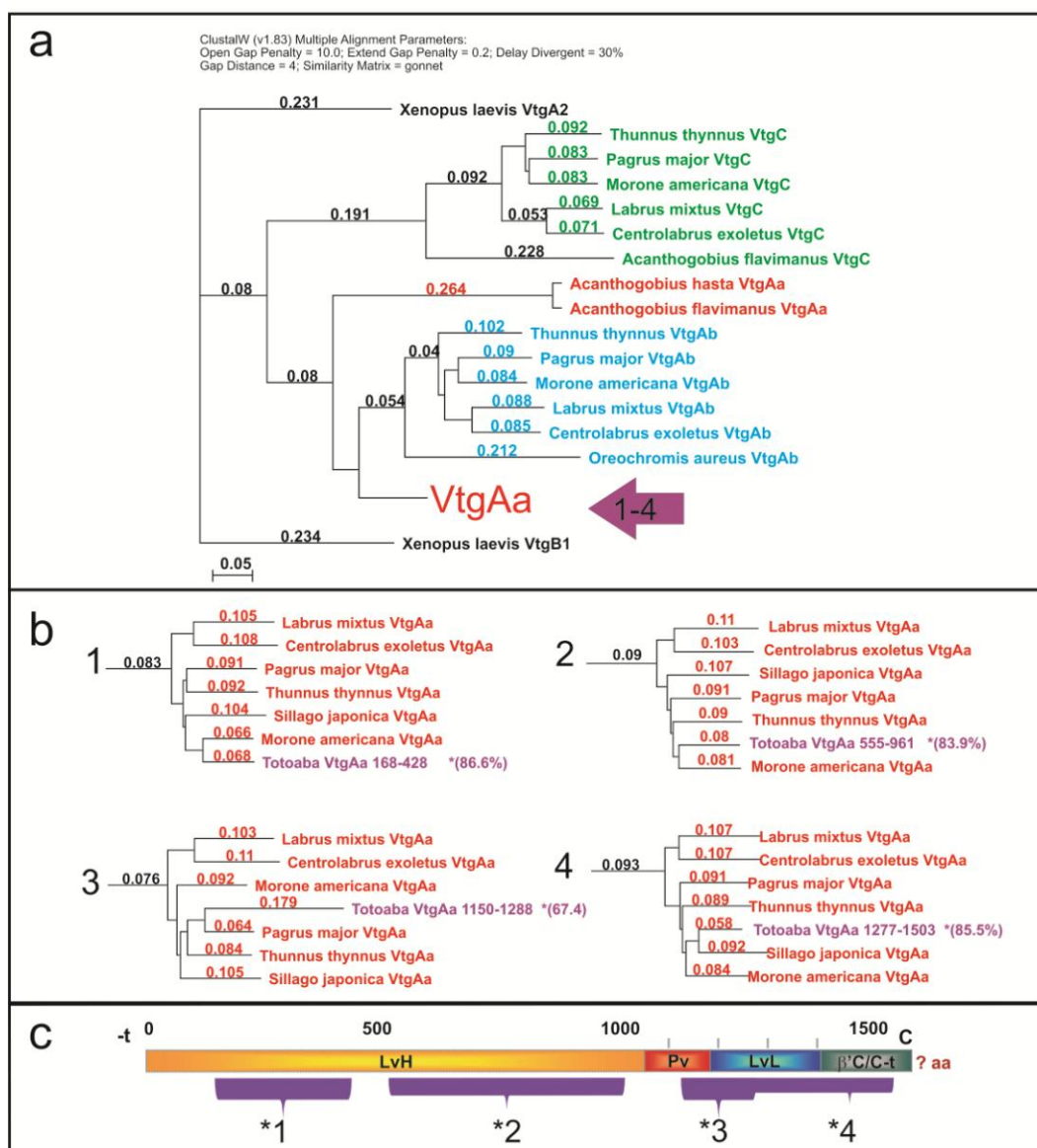


Figura 5. Resumen gráfico de la clonación de secuencias parciales de cDNA que codifican para VtgAa a partir de juveniles de Totoaba inducidos con β -Estradiol. a) Dendrograma del clado de agrupación general de las VtgAa de acuerdo de las secuencias deducidas para teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading *et al.*, 2009). b) Dendrogramas de ubicación específica de los fragmentos clonados para totoaba dentro del clado para VtgAa: fragmentos 1-4 (168-428, 555-961, 1150-1288 y 1277-150). c) Posición relativa de los fragmentos clonados en relación a la secuencia total del gen que codifica para VtgAa en teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading *et al.*, 2009). * Indica porcentaje de identidad del fragmento con respecto a *Morone americana*.

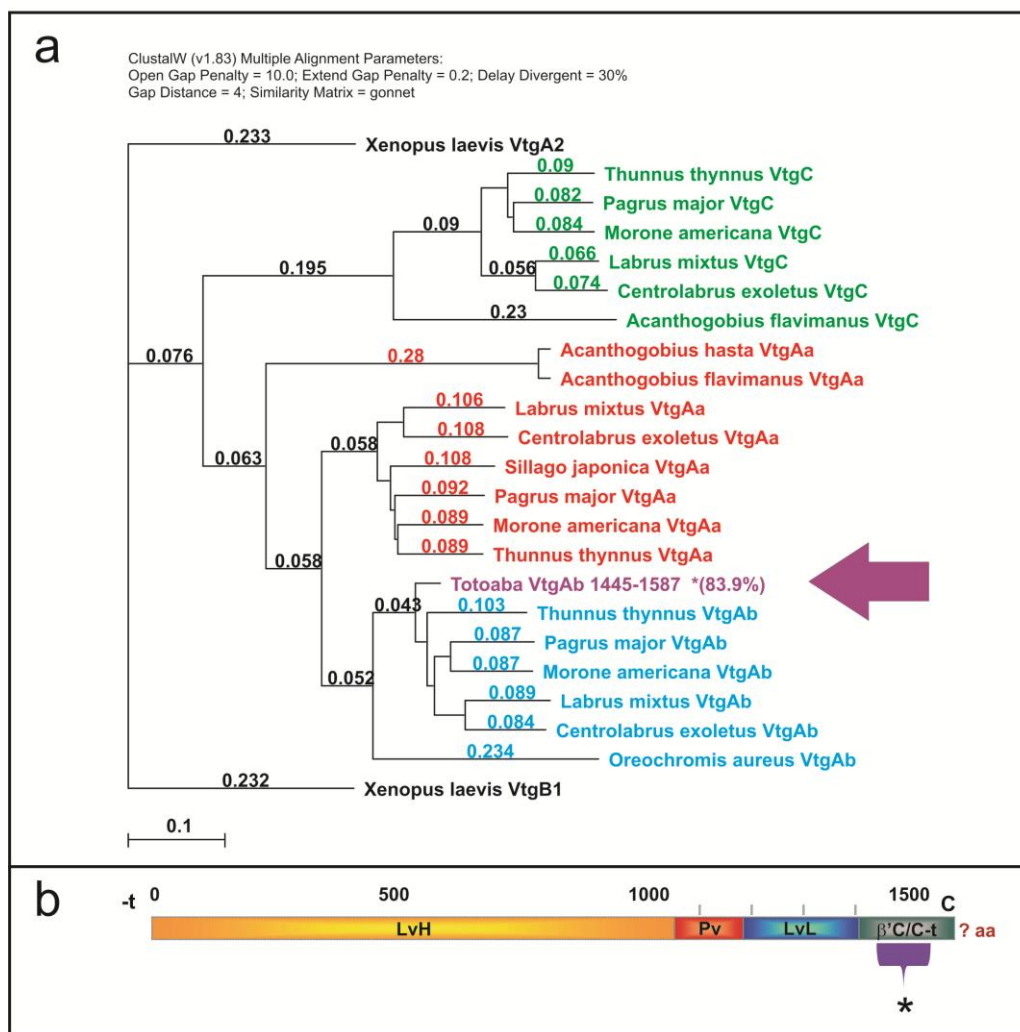


Figura 6. Resumen gráfico de la clonación de secuencias parciales de cDNA que codifican para VtgAb a partir de juveniles de Totoaba inducidos con β -Estradiol. a) Dendrograma del clado de agrupación general de las VtgAb de acuerdo de las secuencias deducidas para teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading *et al.*, 2009); en el cual se indica la posición del único fragmento clonado para totoaba para VtgAb: Flecha indica la posición del fragmento 168-428, b) Posición relativa del fragmento clonado en relación a la secuencia total del gen que codifica para VtgAb en teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading *et al.*, 2009). * Indica porcentaje de identidad del fragmento con respecto a *Morone americana*.

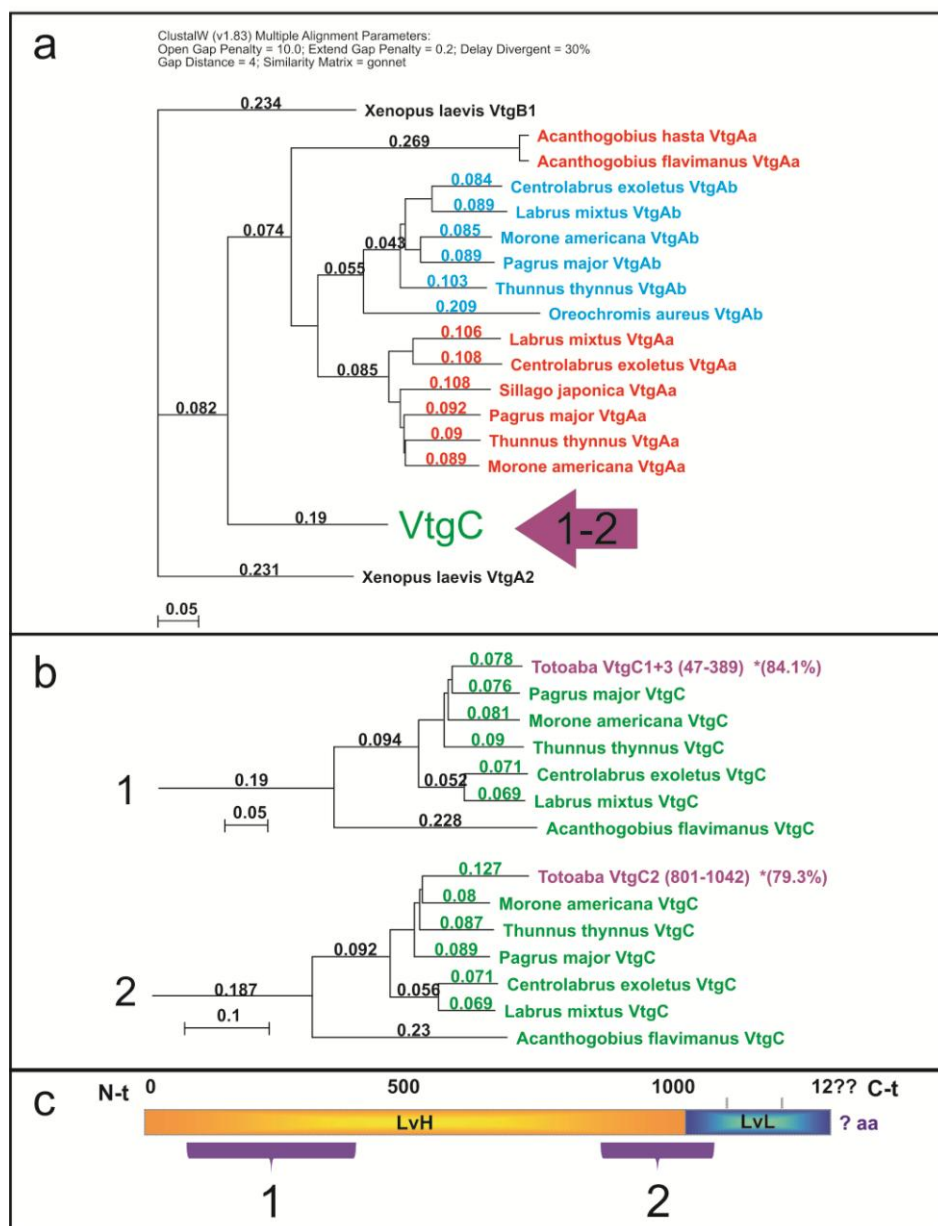


Figura 7. Resumen gráfico de la clonación de secuencias parciales de cDNA que codifican para VtgAa a partir de juveniles de Totoaba inducidos con β -Estradiol. a) Dendrograma del clado de agrupación general de las VtgC de acuerdo de las secuencias deducidas para teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading *et al.*, 2009). b) Dendrogramas de ubicación específica de los fragmentos clonados para totoaba dentro del clado para VtgC: fragmentos 1-2 (Clado 47-389 y 801-1024). c) Posición relativa de los fragmentos clonados en relación a la secuencia total del gen que codifica para VtgC en teleósteos (Finn y Kristoffersen 2007 y Reading *et al.*, 2009). * Indica porcentaje de identidad del fragmento con respecto a *Morone americana*.

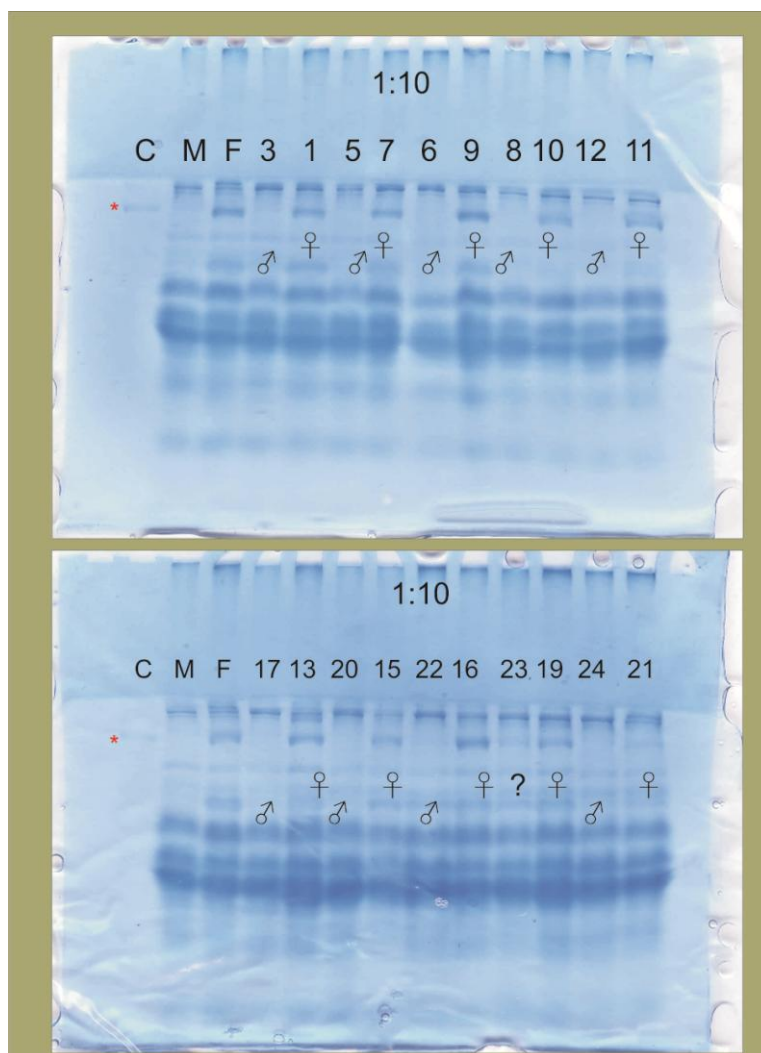


Figura 8. Resultados de la electroforesis desnaturizante SDS-PAGE realizada para la identificación de hembras de Totoaba. Para ambos electroforetogramas, *Carril 1*: Control=Fracción 66 de la purificación cromatográfica de vitelogeninas a partir de juveniles inducidos con β -Estradiol, *Carril 2*: Control negativo= Plasma de macho de Totoaba maduro, *Carril 3*: Control positivo secundario=Plasma de hembra vitelogénica de Totoaba previamente identificada, *Carriles 4-10*: muestras de plasma de reproductores 2 meses antes de la reproducción para identificación. Carácter macho y hembra indican la clasificación. Nota: los machos se corroboraron posteriormente por presencia de semen.

ANEXO

Tabla 1. Nombres y secuencias de los cebadores utilizados en este estudio.

Nombre del Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia.
VgA/B-forward	CAR GT N YTN GCN CAR GAY TG	Bowman et al., 2000; Reading et al., 2009
VgA/B-reverse	GCA YTC NSW NGC RTC NCK RC	Bowman et al., 2000; Reading et al., 2009
VgC2-forward	TCC AAG CYA CMW CCS TSG GKC TCC C	Reading et al., 2009
VgC2-reverse	GCK TCC TTG GAM AKM CTY CKC A	Reading et al., 2009
VgC1-forward	GGT RAA YTW TGG RCK KGG SAW RCC AAA	Reading et al., 2009
VgC1-reverse	CWG GRT YAT CYA RKT TCT GCA KCA T	Reading et al., 2009
VgC3-forward	CAR CAC TTC AGT SCY TTC AA	Reading et al., 2009
VgC3-reverse	TAC ACC AGA GAG CCR TAG GWA AG	Reading et al., 2009
VgASaw-forward	<i>unknown</i>	Sawaguchi et al., 2005, 2006.
VgASaw-reverse	CCT TTC ATC CAG TCA GCA AT	Sawaguchi et al., 2005
VgA5-forward	GAC CAR TYT TGA YGA AGC TDA AG	V.N. Williams and C.V. Sullivan, <i>unpublished</i>
VgA5-reverse	CTT GGA CCA ACA AGA CCA CT	V.N. Williams and C.V. Sullivan, <i>unpublished</i>
VgA8-forward	TGC TGC TGC CAG TGC TTT CTA C	V.N. Williams and C.V. Sullivan, <i>unpublished</i>
VgA8-reverse	AGA TGA GGA GGA TGA GGT GCT AAT C	V.N. Williams and C.V. Sullivan, <i>unpublished</i>
VgA9-forward	ACA ACA CCA TAA TCA CAG CCG AG	V.N. Williams and C.V. Sullivan, <i>unpublished</i>
VgA9-reverse	CAC AGA GAT ACC CTC ACC ATT TGG	V.N. Williams and C.V. Sullivan, <i>unpublished</i>

R=A or G; N=A or C or G or T; Y=C or T; S=C or G; W=A or T; K=G or T; M=C or A

Tabla 2. Secuencias de parciales de cDNA para Vtg's de Totoaba (Este estudio).

VtgAa 168-428 (787nt)

CCATCACTGAAGACGACAAGGCTGAACGCATCCTTTTGACAAAGACCAGAGATCTGAACCACTGTCAGGAGAGGA
TCATAAAGGACTTGGGGTTGGCATACTGAGCATTGTGCAAAGTGCCAGCAGGACTCAAAGAATCTGAGAGGAG
CCACATCATAACAGCTACATCTTAAAGGAAATTACTACCGGAATCCTGATCCTGGAGGCATCAGTCAATGAGTTGAT
CCAGTTCTCACCTTTCAATGAGATTAATGGAGCTGCCCAGATGCATACCAAGCAATCCTTGGTCTTCCTTGAGACT
CAGAGAGCCCCGATTGTGCCTGTTGAAGCTCAGTATCTTCATCGTGGATCTCTACAGTATGAATTTTCCACTGAGC
TTCTTCAGACACCCATTGAGCTCATCAAGATCAACAATGTACAGGCACAGATTGTGGAGGTTTTGAATCATCTGGT
TGCCCACAATGTGGAAAGAGTCCATGAGGATGCCCTCTTAAGTTTTTGGAATCATTGAGCTCCTCCGTGCAGCC
CGCTTTGAAGACCTGGAAATGATCTGGAACCAACTCAGAACCAGACTTACCTACAGACAGTGGATCTTGGACACC
ATCCCTGCCATTGGAATCCGGCTACTCTGAGATTCATCAAGGAGAAATTCCTGGCGGATGATCTGACCGTTGCTG
AAGCAGCTCAGGCTTTGATTGCATCTATTCACATGGTGACAGCAAATACTGAGGCCATCAAGCTGGTTGAGGCCCT
CTCAGTCAACAGCAAAATAGTGGAACCCC

VtgAa 555-961 (1233nt)

AAGCATCCTGATGTTTGAGACAAGGCCTGCAATGGGTTTGGTCACAACAGTTGCTAACATTGTGAAGACAGAGGA
GAATCTGCAGGTAGCAAGCTTCACTTACTCTCATATGAAGTCCCTGACCAGGAGCACCGCTGCTATCAATGCCGCA
CTTGCTGCAGCTTGCAACGTCGCTGTCAAAATCTTGAGCCCTAAGCTGAACAGACTGAGCTTACGTTTCAGCAAAG
CCATCCAAATGGACATCTATAACAGTCCCCTAATGCTTGGTGCTGCTGCCAGCGCTTTCTACATCAATGATGCTGC
CACCATTCTGCCCAGATCTATTGTGGCTAAGACCAACGCATATCTTGCTGGAGCTGCTGCTGATGTTCTGGAGGTT
GGAGTGAGAACCGAGGGACTCCAGGAGGCTTTACTGAAAAACCCTGCACTTCTTGACAATGTTGACAGAATCACC
AAGATGAAGCGTGTCATCAAGGCTCTCTCTGAGTTGAGGTCTCTGCCAGCCATGACACCTCTGGCCTCTGTCTATG
TCAAATTCTTTGGACAAGAAATTGCTTTTGCCAACATTGACAAGGCCATGATTGATCAGGCCATTGCGCTAGCCAC
CGGTCCTCTGTTTCAGGCACATGGCTGGAACGCCATCAAGGCTCTGTTGTCTGGTGCTTCCTTCCAACCTTGCTAAG
CCTCTGCTGGTCACTGAGATTAGGCGTATCCTGCCTACTGCTGCTGGTCTTCCAATGGAGCTCAGCCTGTACACTG
CTGCTGTGGCTGCTGCAGCTGTTCAAGTCAAGGCAGCCACAACACCAGCTCTGCCAGAAAAATTCATCTTGCTCA
CCTTCTGAAGACAGAAATCCAGTTTGAGACTGAGATTAAACCAAGCATTGCTGTGAACACATTTGCTGTGATGGG
GGTCAACACTGCCATACTCCAGGCTGCCATGATTTCAAGAGCTAACTCAACTCCATTGTGCCTGCCAAAATCGCT
GCAAGTCTTGACATCAAGGAGGGCCACTTTAAATCGAAGTTCTGCCTGTTTCTGTGCCTGAAGAGGTTGCAGCTG

TGTATGTTGAGACTCTTGCTGTGGCAAGAAATATTGAGGACCTTGCTTCTGCAAAAATGACTCCCATCATCCCTGC
CAAAGTCTTGCAGTCCATCTCAAGGGAGACGCTCACATCTAAGATTTTCTCATCTGCCGCTGATAGTTTGTGGAA
TCCTCAGAGATCATTAGCA

VtgAa 1150-1288 (692nt)

AAGGAAATCCTGGCTCCTGGTCTGTGGAATAACACCTCCTCCTCAAGCTCCAGTAGCTCTCGCTCAAGCCTGAGCT
CTAGTTCTTCTTCCAGCTCCTCAACTCGTGTCAAAGCCATCAATCCAGCTGATCCAACCAGAAGACTTCGCAGCAG
CAGCAGCAGCAGCAGACTTAGCTCCTCCAGATCTGTGAGCAGATCTTCCAGGTCCAGCTCCGCATCTAGCCTTGCA
TCGCTCTTCAGTGCTAGCTCAAGTTCCTCTCGCTCCAGCGCTCGTATCTCAAAGCAAGTGATTTATCGCCACAAGTT
CCAGAAGGACCACAAGAAGCAGGGTCGCAACTCTCAAGCCACCTCAGCAGCACTTTCCAAGAGCAGAAGCAGTG
CCTCAAGCTTTGAAGCCATCCGAAGACAGAACAAATTCCTTGGCAATGAACTAGCTCCTACCTTTGCAGTTATCTT
CCGTGTTGTCAGAGCTGATAGGAAGGTGCTGGGATACCAACTGGCAACCTACTTAGACAAACCTAACACCAGACT
TCAGATTATTCTGGCTGCCTTGGCAGCTGATGACAACTGGAAGTTCTGTGCTGATGGAGCTCTGCTTAGCAGGCAC
AAAGTCACAGCTAAAATCGGATGGGGAATTGAATGCAAGCAGTATGACACCTCAATCACAGCCGAAACTGGTCTT
GTTGGTCCAAG

VtgAa 1277-1503 (683nt)

ACACCATAATCACAGCCGAGACTGGTCTTGTTGGTCCAAACCCTGCAGCTCGCCTCAGAGTGGCCTGGGATGAAC
TACCTTCTGCTCTTAAACGNTATGCAAAGAGGGTGTATGACTTGATTCTGCTTCCATGCTGAATGGCTTGATTAA
AGGAAAGGATGCCAACAGCGCCAATCAGCTCTCATTAACAGTGGTTGCCACATCTGACAAGACCCTTGACCTCAT
TTGGAAAACACCAACACATATTGTCTATAAGCTGGCTTTGCATCTTCCCATCGCTCTGCCACTTGATGAAATCAAA
GGTCTCACTCCCTTCGATGAGCTTGCAGATAAAATCCATTACTTGTTTGCCAAGGCTGGCGCAGCCAAATGTAGCT
TCAACGGAAACACACTGACCACATTCAACAACAGGAGGTATAAGAACGAGATGCCATTGTCTTGCTACCAAGTTC
TGGCACAGGATTGCACCGATGAGCTGAAATTCATGGTTCTCCTGAAGAAGGATCACATTGAGCAGAACCATATCA
ATGTGAAAATTGCTGACATTGATATTGACCTGTACCCAAAGAACACTAATGTGATCGTGAAGGTCAATGGAATGG
AAATACCCATCAACAATCTGCCATACCAGCATCCACAGCTAAAATCCAGATCAGACCAAATGGTGAGGGTATCT
CTGTG

VtgAb 1445-1587 (429nt)

TGCACCCAAGAACTTAAATTCATAGTTCTGCTGAAGAGGGACCAAACCCAGGAACAGAACCAGATCAACGTTAAG
ATTGCAGACATTAATGTGACATGTACCCGAAGGACAGTGCCATCATGGTGAAGGTTAATGGAGTAGAAATTCCC
AACAAACCTGCCATATCAGCATCCACAGGCAAAATCCAGGTCAGACAGAGAGGTGAGGGCATCGCTCTCTTT

GCTCCCAGCCATGGTCTTCAGGAGGTCTACTTTGATCTGAACGCATGGAAGGTTAAAGTTGTGGACTGGATGAAG
 GGACAGACTTGTGGACTCTGTGGAAAGGCTGACGGTGAAATCAGACAGGAGTACCGCACTCCCAATGAACGCCTG
 ACCAAGAACGCAGTCAGCTACGCTCATTCTGGGTAATGCCTGGAAAGAGCTGC

VtgC1 (747nt)

CCTTGCAGAGGCTGGGATGAGAATATCATGTAAAGGTCAAGATCACTGGTATGTCTGATCAAACATTCAGCCTTCA
 GGTTTCAGATTTGGCCTTTTCAGGAGTTCAACGGTTTCCCGGGGAAAAACGACTTTAATACCTCCCCAAAGCTCAGC
 CAGCGTATTGCTGCCCAGCTCGTCAAACCATTTCATGTTTGACTACACCAGTGGACACATTAGTGACATCCGCGCCT
 CTCCTGAGGTTTCTGACACTGTTGTCAACATTGTGAGAGGGATCTTGGGTTTCTTCCAAGTCACTGTCAAGACTAC
 ACAAAGGATCTATGAGCTTGTAGAGGTTGGCATCCATGGAAAGTGTGAGAGTAACTATGCTACAGAGGAAAATGT
 GGAAACAAAGGACATGACCATCACTCAGGTGGTGGACCTCAGTGGCTGCAGTGAGAAAGCAGCTATCTACAGGG
 GAATGGCAACAGCTGTGCTCGATAAAGTTGCCAAACAGAGAGGAGAATCTGTCATTTCAACAGTGAGATATGTTT
 ACACAGTCAAACCAACAGCAGAGGGTGGTCTCATTACGAGGGGCTCACGGCCTGGAGCAACAGCACTTCAGTCCCT
 TCAATGTGAAGGGTGGCAGTTTCAAGATGCAAGCGATGAAGGAAATGGTGCTGCTCGGCATGAGTGACACAGGTA
 GAGCCGTCATGTATGGACCAATGGAGAGCAAGGGCAACCTCGTGTACAAGTTTGTCAATGCAGAAGCTAA

VtgC2 (728nt)

ACTGGAGATTAGTAAATATTATGAAACCGTCAATGGGATCACTGTTAATGCCAAAGCAGCAATAAATCCACCTCC
 GACTGAACGTCTCGGACAACCTCTTTAATTCTGAAATTACATTGGAGAGTGATGGTTTTATTGGTTTCACAAAGGAT
 TTATGGGTTTTCTATGGGATCAACACAGAGCTGTTCCAGTGTGGTTCTGAGTTTAAGAGCAAAATGCCTCTTGCTA
 TCCCATGGAAGATTGCTGCCAAGATCAATATCAGAGAAAAGAAGTTTGAAGTTCGACTTTGCTCCATGGAAAAATG
 AGTTTGAAGTCTTTTCAGTCAGCTCCAATGTGTATGCAGTCACCAGGAACATTGAGGAGCCAGCTTTGGCTAAAAT
 GACTCCAATAATGCCCACCGCTGTAACTCCAATGAAGAAGTCGTCCACATTGGCTCCACCGGTGTGACGCCTGA
 GGCAGATCAGGTCCTGACACCAAACACCTGGAATCCAAGGGGGAAAATGTGTGCTGAGAGTAACATTTATGGAGT
 TGGTGTCTGTGTGGAATCTCAGTTCAGGAGAGAGTATTACCACGAGGAATACCCCCTGTATTATTTCTTGAGAG
 ACCTACATGGGAGTCAAAGTACACTCAGCCCAGGCAATCAAAGCTGTTGACAAAATCCACTTTGAGGTTAATGCT
 GGCCCAAGCAGACATCCAATGAGTGCAAGCCAACCTCCTTGAGACTCTGC

VtgC3 (562nt)

TGTGAAGGGTGGCAGTTTCAAGATGCAAGCGATGAAGGAAATGGTGCTGCTCGGCATGAGTGACACAGGTAGAG
 CCGTCATGTATGGACCAATGGAGAGCAAGGGCAACCTCGTGTACAAGTTTGTCAATGCAGAAGCTAATGTCCCA
 TTATGATGCAGAACCTGGAGAACCCAGTATCAAAGGCTATAGAGTTGGTCAAACATTTGGCTGAAGTTAATAAAT

ACCAGATTGACAGCGCAAGTACTGAAGATACTATAAAGCTTTATCAACTTCTCAGAGTGGTGCCTTATGAAGGATT
AGAGGCTATGTGGAAAGAGTTTGCAGGAAATGAAGAGTACAGACGTTGGTTTTTGGACATGATTGTTGAAGTCAG
CGATGCCAGGATCCTGAAGTTCCTGGAAAGCAGGTTACAGGCTGGCGATATTTCTGTGGTCGAAGCTCTGGAGAC
CCTTTTGCTGTCAATTAACCATCTCCAGCCAATCCCTGAGCTGGTTGAGATGGCTAAAATGTTCTGAACATGCCC
TTAGTAAATCCAACATCTATCTGTGGCATACTGTG

VtgC1+3 Contig (1168nt)

CCTTGCAGAGGCTGGGATGAGAATATCATGTAAGGTCAAGATCACTGGTATGTCTGATCAAACATTCAGCCTTCA
GGTTTCAGATTTGGCCTTTCAGGAGTTCAACGGTTTCCCGGGGAAAAACGACTTTAATACCTCCCCAAAGCTCAGC
CAGCGTATTGCTGCCCAGCTCGTCAAACCATTCATGTTTGA CTACACCAGTGGACACATTAGTGACATCCGCGCCT
CTCCTGAGGTTTCTGACACTGTTGTCAACATTGTGAGAGGGATCTTGGGTTTCTTCCAAGTCACTGTCAAGACTAC
ACAAAGGATCTATGAGCTTGTAGAGGTTGGCATCCATGGAAAGTGTGAGAGTA ACTATGCTACAGAGGAAAATGT
GGAAACAAAGGACATGACCATCACTCAGGTGGTGGACCTCAGTGGCTGCAGTGAGAAAGCAGCTATCTACAGGG
GAATGGCAACAGCTGTGCTCGATAAAGTTGCCAAACAGAGAGGAGAATCTGTCATTTCAACAGTGAGATATGTTT
ACACAGTCAAACCAACAGCAGAGGGTGGTCTCATTACGAGGGGCTCACGGCCTGGAGCAACAGCACTTCAGTCCCT
TCAATGTGAAGGGTGGCAGTTTCAAGATGCAAGCGATGAAGGAAATGGTGCTGCTCGGCATGAGTGACACAGGTA
GAGCCGTCATGTATGGACCAATGGAGAGCAAGGGCAACCTCGTGTACAAGTTTGTCAATGCAGAAGCTAATGTCC
CCATTATGATGCAGAACCTGGAGAACCCAGTATCAAAGGCTATAGAGTTGGTCAAACATTTGGCTGAAGTTAATA
AATACCAGATTGACAGCGCAAGTACTGAAGATACTATAAAGCTTTATCAACTTCTCAGAGTGGTGCCTTATGAAG
GATTAGAGGCTATGTGGAAAGAGTTTGCAGGAAATGAAGAGTACAGACGTTGGTTTTTGGACATGATTGTTGAAG
TCAGCGATGCCAGGATCCTGAAGTTCCTGGAAAGCAGGTTACAGGCTGGCGATATTTCTGTGGTCGAAGCTCTGG
AGACCCTTTTGCTGTCAATTAACCATCTCCAGCCAATCCCTGAGCTGGTTGAGATGGCTAAAATGTTCTGAACAT
GCCCTTTAGTAAATCCAACATCTATCTGTGGCATACTGTG

Tabla 3. Secuencias peptídicas deducidas a partir de las secuencias parciales de cDNA para Totoaba (Este estudio)

VtgAa 168-428 (261aa)

ITEDDKAERILLTKTRDLNHCQERIIKDLGLAYTEHCAKCCQDSKNLRGATSSYILKEITTGILILEASVNELIQFSPFNEI
NGAAQMHTKQSLVFLETQRAPIVPVEAQYLHRGSLQYEFSTELLQTPIQLIKINNVQAQIVEVLNHLVAHNVERVHEDA
PLKFLELIQLLRAARFEDLEMIWNQLRTRLTYRQWILDTIPAIGTPATLRFIKEKFLADDLTVAEAAQALIASIHMVTANT
EAIKLVEALSVNSKIVET

VtgAa 555-961 (410aa)

SILMFETRPMGLVTTVANIVKTEENLQVASFTYSHMKSLTRSTAAINAALAAACNVAVKILSPKLNRLSLRFSKAIQM
DIYNSPLMLGAAASAFYINDAATILPRSIVAKTNAYLAGAAADVLEVGVRTGLQEALLKNPALLDNVDRITKMKRVIK
ALSELRLSPAMTPLASVYVKFFGQEIAFANIDKAMIDQAIALATGPSVQAHGWNNAIKALLSGASFQLAKPLLVTEIRRILP
TAAGLPMELSLYTAAVAAAAVQVKAATTPALPEKFHLAHLKTEIQFETEIKPSIAVNTFAVMGVNTAILQAAMISRAK
LNSIVPAKIAASLDIKEGHFKIEVLPVSVPEEVAAYVETLAVARNIEDLASAKMTPPIPAKVLQSSIRETLTSKIFSSAADS
LLESSEIIQ

VtgAa 1150-1288 (230aa)

KEILAPGLWNNTSSSSSSSSSRSSLSSSSSSSSSTRVKAINPADPTRRLRSSSSSSRLSSSRSVSRSSRSSASSLASLFSASSSS
SRSSARISKQVIYRHKFQKDHKKQGRNSQATSAALSKSRSSASSFEAIRRQNKFLGNELAPTFVIFRVVRADRKVLGYQ
LATYLDKPNTRLQIILAAALADDNWKFCADGALLSRHKVTAKIGWGIECKQYDTSITAETGLVGP

VtgAa 1277-1503 (227aa)

TIITAETGLVGPNPAAARLRVAWDELPSALKRYAKRVYDLIPASMLNGLIKGDANSANQLSLTVVATSDKTLDLIWKTP
THIVYKLALHLPIALPLDEIKGLTPFDELADKIHYLEFAKAGAAKCSFNNTLTTFNNRRYKNEMPLSCYQVLAQDCTDE
LKFMVLLKKDHIEQNHINVKIADIDIDLYPKNTNVIVKVNGMEIPINNLPYQHPTAKIQIRPNNEGISV

VtgAb 1445-1587 (143aa)

CTQELKFIVLLKRDQTQEQNQINVKIADINVDMPKDSAIMVKVNGVEIPNNNLPYQHPTGKIQRQRGQGIALFAPSH
GLQEVYFDLNAWKVKVVDWMKGQTCGLCGKADGEIRQEYRTPNERLTKNVSYAHSWVMPGKSC

VtgC1 (248aa)

LAEAGMRISCKVKITGMSDQTFSLQVSDLAQEFNGFPGKNDFNTSPKLSQRIAAQLVKPFMFDYTSGHISDIRASPEVS
 DTVVNIVRGILGFFQVTVKTTQRIYELVEVGIHGKCQSNYATEENVETKDMTITQVVDLSGCSEKAAIYRGMATAVLD
 KVAKQRGESVISTVRYVYTVKPTAEGGLITRAHGLEQQHFSPFNVKGGSFQAMKEMVLLGMSDTGRAVMYGPME
 SKGNLVYKQVNAEA

VtgC2 (242aa)

LEISKYYETVNGITVNAKAAINPPPTERLGQLFNSEITLESDFGIFTKDLWVFYGINTELFQCGSEFKSKMPLAIPWKIAA
 KINIREKKFELDFAPWKNEFEVFSVSSNVYAVTRNIEEPALAKMTPIMPTAVNSNEEVVHIGSTGVTPEADQVLTPTW
 NPRGKMCAESNIYGVGVCVESQFRREYYHEEYPLYFLGETYMGVKVHSAQAIKAVDKIHFEVNAGPSRHPMSASQL
 LETL

VtgC3 (187aa)

VKGGSFQAMKEMVLLGMSDTGRAVMYGPME SKGNLVYKQVNAEANVPIMMQNLENPVSKAIELVKHLAEVNKY
 QIDSASTEDTIKLYQLLRVVPYEGLEAMWKEFAGNEEYRRWFLDMIVEVSDARILKFLESRLQAGDISVVEALETLLLSI
 NHLQPIPELVEMAKMFLNMPFSKSNIYLWHTV

VtgC1+3 Contig (389aa)

LAEAGMRISCKVKITGMSDQTFSLQVSDLAQEFNGFPGKNDFNTSPKLSQRIAAQLVKPFMFDYTSGHISDIRASPEVS
 DTVVNIVRGILGFFQVTVKTTQRIYELVEVGIHGKCQSNYATEENVETKDMTITQVVDLSGCSEKAAIYRGMATAVLD
 KVAKQRGESVISTVRYVYTVKPTAEGGLITRAHGLEQQHFSPFNVKGGSFQAMKEMVLLGMSDTGRAVMYGPME
 SKGNLVYKQVNAEANVPIMMQNLENPVSKAIELVKHLAEVNKYQIDSASTEDTIKLYQLLRVVPYEGLEAMWKEFAG
 NEEYRRWFLDMIVEVSDARILKFLESRLQAGDISVVEALETLLLSINHLQPIPELVEMAKMFLNMPFSKSNIYLWHTV

Tabla 4. Péptidos originales únicos correspondientes a vitelogeninas (VtgAa y VtgAb) secuenciados por espectrofotometría de masas a partir del plasma una hembra vitelogénica de Totoaba. Se muestran las mejores calificaciones de los algoritmos de identificación (Zhang et al., 2004). “Inicio” y “Fin” indican las posiciones de alineación de cada residuo dentro de la secuencia vitelogénica respectiva. Un total de 15 péptidos corresponde a [VtgAb](#); no se identificó ningún correspondiente a VtgAa.

Nombre de la proteína	Números Acceso	Peptides Únicos	Espectros Únicos	Espectros Totales	% de cobertura	Secuencias Peptídicas trípticas	Xcorr	DCn	X! Tandem		
									-log(e)	Inicio	Fin
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	DCPLYAIIGK	2.87	0.548	5.72	1013	1022
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	EIVMLGYGTLVAK	4.25	0.539	6.62	433	445
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	FFGQEIAFANIDK	5.02	0.563	4.66	733	745
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	GSLQYEFGSELLQTPIQLLR	5.48	0.589	8.96	283	302
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	IADIDVDMYPK	2.92	0.398	2.01	1504	1514
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	LTSALAAQLLTPIK	3.53	0.275	2.23	95	108
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	LVEPEIFEYSGIWP	3.87	0.524	3.1	72	86
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	NTAPDFASVAAACNVAVK	4.04	0.424	5.7	597	614
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	NVEDLAAAK	1.45	0.125	2.28	918	926
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	TEGIQEALLK	3.04	0.441	2.39	684	693
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	11	14	23	8.62%	VQVIFANLAENDHWR	2.63	0.306	3.72	1280	1294
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gi 149850248	2	2	2	3.12%	DTLITFNNR	2.5	0.187	1.7	1436	1444
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gi 149850248	2	2	2	3.12%	GSLQYEFGSELLQTPIQLLR	5.84	0.491	7.21	283	302
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gi 149850248	2	2	2	3.12%	LTSALAAQLLTPIK	3.53	0.275	2.23	95	108
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gi 149850248	2	2	2	3.12%	NCPLYALIGK	1.96	0.344	5.34	1014	1023

Tabla 5. Péptidos originales únicos correspondientes a vitelogeninas (VtgAa y VtgAb) secuenciados por espectrofotometría de masas a partir del plasma de juveniles de totoaba inducidos con β -Estradiol. Se muestran las mejores calificaciones de los algoritmos de identificación (Zhang et al., 2004). “Inicio” y “Fin” indican las posiciones de alineación de cada residuo dentro de la secuencia vitelogénica respectiva. Un total de 26 péptidos corresponde a VtgAa y 30 péptidos a VtgAb.

Nombre de la proteína	Números Acceso	Péptidos Únicos	Espectros Únicos	Espectros Totales	% de cobertura	Secuencias Peptídicas trípticas	Xcorr	DCn	X! Tandem			Inicio	Fin
									-log(e)				
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	AKLNSIVPAK	2.58	0.223	3.8			871	880
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	DHIEQNHNIVK	3.4	0.424	5.51			1492	1502
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	FFGQEIAFANIDK	5.44	0.598	6.74			733	745
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	FLELIQLLR	3.57	0.19	1.89			333	341
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	GSLKYEFSTELLQTPIQLIK	4.25	0.562	5.44			283	302
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	IADIDIDLYPK	3.04	0.434	1.89			1503	1513
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	IQIILAALAADNNWK	4.07	0.508	4.62			1283	1297
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	NEMPLSCYQVLAQDCTNELK	5.56	0.461	3.13			1465	1484
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	VNGMEIPINNLPYQHPTAK	4.41	0.483	3.42			1521	1539
<i>Pagrus major</i> VtgAa	gi 74149754	8	10	16	7.58%	YKNEMPLSCYQVLAQDCTNELK	5.45	0.556	1.7			1463	1484
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	CYSVEPVLR	2.35	0.242	4.66			1649	1657
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	DAFIPATK	2.2	0.309	2.36			87	94
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	DCPLYAIIGK	2.8	0.524	4.64			1013	1022
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	DIGLAYTER	2.18	0.276	0.796			195	203
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	DQTQEQNQINVK	3.93	0.293	7			1492	1503
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	EIVMLGYGTLVAK	4.67	0.571	5.23			433	445
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	FFGQEIAFANIDK	5.44	0.598	6.74			733	745
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	FIELIQLLR	3.57	0.19	1.89			333	341
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	GSLQYEFSGSELLQTPIQLLR	4.93	0.528	9.7			283	302
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	IADIDVDMYPK	4.52	0.393	3.68			1504	1514
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	IEIEIQVGDK	3.51	0.286	1.96			1040	1049
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	LTSALAAQLLTPIK	2.06	0.152	3.47			95	108
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	LVEPEIFEYSGIWPVK	4.02	0.527	4.46			72	86
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	NILVPGLK	2.01	0.343	2.34			1078	1085
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gi 74149756	21	27	45	14.70%	NTAPDFASVAAACNVAVK	5.42	0.557	7.54			597	614

<i>Pagrus major</i> VtgAb	gij 74149756	21	27	45	14.70%	NVEDLAAAK	1.83	0.298	2.92	918	926
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gij 74149756	21	27	45	14.70%	TQNVYELQEPGAQGVCK	5.39	0.631	6.82	147	163
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gij 74149756	21	27	45	14.70%	VHEDAPLK	1.95	0.433	2	325	332
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gij 74149756	21	27	45	14.70%	VHTIVPAK	1.99	0.248	1.31	873	880
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gij 74149756	21	27	45	14.70%	VLGNAGHPASLKPIMK	3.08	0.461	1.44	483	498
<i>Pagrus major</i> VtgAb	gij 74149756	21	27	45	14.70%	VQVIFANLAENDHWR	5.2	0.503	6.92	1280	1294
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	CYSVEPVLR	2.35	0.242	4.66	1632	1640
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	DAFIPATK	2.2	0.309	2.36	87	94
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	DTLITFNNR	2.67	0.202	0	1436	1444
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	GSLQYEFGSELLQTPIQLLR	4.94	0.556	8.43	283	302
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	LTSALAAQLLTPIK	2.06	0.152	3.47	95	108
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	NCPLYALIGK	2.79	0.435	2.64	1014	1023
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	TQNVYELQEPGAQGVCK	5.39	0.631	6.82	147	163
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	VHTIVPAK	1.99	0.248	1.31	872	879
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb	gij 149850248	2	2	2	6.53%	VLGNAGHPASLKPIMK	3.08	0.461	1.44	483	498
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa	gij 148299212	2	3	4	6.98%	FFGQEIAFANIDK	5.44	0.598	6.74	730	742
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa	gij 148299212	2	3	4	6.98%	GSLQYEFSTELLQTPLQLIK	4.25	0.562	5.44	280	299
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa	gij 148299212	2	3	4	6.98%	IADIDIDLYPK	3.04	0.434	1.89	1425	1435
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa	gij 148299212	2	3	4	6.98%	ILPIHGTAASLPMR	3.32	0.564	7.77	496	510
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa	gij 148299212	2	3	4	6.98%	IQLILAALAADDNWK	3.83	0.449	4.62	1206	1220
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa	gij 148299212	2	3	4	6.98%	MVQELALQLYMDK	3.82	0.251	2.6	529	541
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa	gij 148299212	2	3	4	6.98%	VHEDAPLK	1.95	0.433	2	322	329
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa	gij 148299212	2	3	4	6.98%	VNGMEIPINNLPYQHPTAK	4.41	0.483	3.42	1443	1461
<i>Mugil cephalus</i> VtgAa	gij 149850246	2	2	4	4.41%	CYSVEPVLR	2.35	0.242	4.66	1632	1640
<i>Mugil cephalus</i> VtgAa	gij 149850246	2	2	4	4.41%	DHIEQNHNIVK	3.4	0.424	5.51	1476	1486
<i>Mugil cephalus</i> VtgAa	gij 149850246	2	2	4	4.41%	DIALYK	1.98	0.223	1.21	1009	1014
<i>Mugil cephalus</i> VtgAa	gij 149850246	2	2	4	4.41%	FFGQEIAFANIDK	5.44	0.598	6.74	735	747
<i>Mugil cephalus</i> VtgAa	gij 149850246	2	2	4	4.41%	FLGNEVAPTFAIIFR	3.21	0.242	1.66	1229	1243
<i>Mugil cephalus</i> VtgAa	gij 149850246	2	2	4	4.41%	MVQELALQLYMDK	3.82	0.251	2.6	534	546
<i>Mugil cephalus</i> VtgAa	gij 149850246	2	2	4	4.41%	VHEDAPLK	1.95	0.433	2	327	334

Tabla 6. Números de acceso del GenBank de todos los peces usados en este estudio.

TAXON	GenBank/	
	Ensemble	Referencia
Superclase: GNATHOSTOMATA		
Infraclase: NEOPTERYGII		
Subdivisión: EUTELEOSTEI		
Super Orden: ACANTHOPTERYGII		
Series: PERCOMORPHA		
<u>Orden: TETRAODONTIFORMES</u>		
<i>Takifugu rubripes</i> VtgAa:	Ensembl ENSTRUP00000044803	
<i>Takifugu rubripes</i> VtgC:	Ensembl ENSTRUP00000009572	
<u>Orden: PLEURONECTIFORMES</u>		
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa:	ABQ58113	Finn, 2007a
<i>Verasper moseri</i> VtgAa:	AB181833	Sawaguchi et al., 2005
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAb:	ABQ58114	Finn, 2007a
<i>Verasper moseri</i> VtgAb:	AB181834	Sawaguchi et al., 2005
<u>Orden: PERCIFORMES</u>		
<i>Acanthogobius flavimanus</i> VtgAa:	AB088473	Ohkubo et al., 2004
<i>Acanthogobius hasta</i> VtgAa:	AAV84912	-
<i>Centrolabrus exoletus</i> VtgAa:	ACK36963	Finn et al., 2009
<i>Labrus mixtus</i> VtgAa:	ACK36967	Finn et al., 2009
<i>Morone americana</i> VtgAa:	DQ020120	Reading et al., 2009
<i>Pagrus major</i> VtgAa:	BAE43870	Sawaguchi et al., 2006
<i>Sillago japonica</i> VtgAa:	AB081299	Yoon et al., 2008
<i>Thunnus thynnus</i> VtgAa:	ACX32463	-
<i>Totoaba macdonaldi</i> VtgAa 168-428:	XXXXXX	Este estudio
<i>Totoaba macdonaldi</i> VtgAa 555-961:	XXXXXX	Este estudio
<i>Totoaba macdonaldi</i> VtgAa 1150-1288:	XXXXXX	Este estudio
<i>Totoaba macdonaldi</i> VtgAa 1277-1503:	XXXXXX	Este estudio
<i>Centrolabrus exoletus</i> VtgAb:	ACK36964	Finn et al., 2009
<i>Labrus mixtus</i> VtgAb:	ACK36968	Finn et al., 2009
<i>Morone americana</i> VtgAb:	DQ020121	Reading et al., 2009
<i>Oreochromis aureus</i> VtgAb:	AAD48085	Teo et al., 1998
<i>Pagrus major</i> VtgAb:	BAE43871	Sawaguchi et al., 2006
<i>Thunnus thynnus</i> VtgAb:	ADD63987	-
<i>Totoaba macdonaldi</i> VtgAb 1445-1587:	XXXXXX	Este estudio
<i>Acanthogobius flavimanus</i> VtgC:	BAC06191	Ohkubo et al., 2004
<i>Centrolabrus exoletus</i> VtgC:	ACK36966	Finn et al., 2009
<i>Labrus mixtus</i> VtgC:	ACK36969	Finn et al., 2009
<i>Morone americana</i> VtgC:	DQ020122	Reading et al., 2009
<i>Pagrus major</i> VtgC:	BAE43872	Sawaguchi et al., 2006
<i>Thunnus thynnus</i> VtgC:	ADD63988	-
<i>Totoaba macdonaldi</i> VtgC2:	XXXXXX	Este estudio
<i>Totoaba macdonaldi</i> VtgC1+3:	XXXXXX	Este estudio
<u>Orden: GASTEROSTEIFORMES</u>		
<i>Gasterosteus aculeatus</i> VtgAa:	Ensembl ENSGACP00000012923	
<i>Gasterosteus aculeatus</i> VtgAb:	Ensembl ENSGACP00000012842	
<i>Gasterosteus aculeatus</i> VtgC:	Ensembl ENSGACP00000012536	
Series: ATHERINOMORPHA		
<u>Orden: CYPRINODONTIFORMES</u>		
<i>Gambusia affinis</i> VtgAa:	AB181835	Sawaguchi et al., 2005
<i>Fundulus heteroclitus</i> VtgAa:	Q90508	LaFleur et al., 1995b
<i>Kryptolebias marmoratus</i> VtgAa:	AY279214	Kim et al., 2004
<i>Poecilia latipinna</i> VtgAa:	ACV65040	-
<i>Xenotoca eiseni</i> VtgAa:	ACI30217	-
<i>Xiphophorus hellerii</i> VtgAa:	ADC55281	-
<i>Gambusia affinis</i> VtgAb:	AB181836	Sawaguchi et al., 2005
<i>Fundulus heteroclitus</i> VtgAb:	Q98893	LaFleur et al., 1995a
<i>Xenotoca eiseni</i> VtgAb:	ACI30218	-
<i>Gambusia affinis</i> VtgC:	BAD93699	Sawaguchi et al., 2005
<i>Xenotoca eiseni</i> VtgC:	ACI30219	-
<u>Orden: BELONIFORMES</u>		
<i>Oryzias latipes</i> VtgAa:	BAB79696	-
<i>Oryzias latipes</i> VtgAb:	BAB79591	-
Series: MUGILOMORPHA		

<u>Orden: MUGILIFORMES</u>		
<i>Mugil cephalus</i> VtgAa:	AB288932	Amano et al., 2007
<i>Mugil cephalus</i> VtgAb:	AB288933	Amano et al., 2007
<i>Mugil cephalus</i> VtgC:	BAF64837	Amano et al., 2007
Superorden: PARACANTHOPTERYGII		
<u>Orden: GADIFORMES</u>		
<i>Melanogrammus aeglefinus</i> VtgAa:	AAK15158	Reith et al., 2001
<i>Melanogrammus aeglefinus</i> VtgAb:	AAK15157	Reith et al., 2001
Superorden: PROTACANTHOPTERYGII		
<u>Orden: SALMONIFORMES</u>		
<i>Oncorhynchus mykiss</i> VtgAsa:	JC4956	Mouchel et al., 1996
Superorden: OSTARIOPHYSI		
<u>Orden: CYPRINIFORMES</u>		
<i>Carassius auratus</i> VtgAo1:	ABG22139	-
<i>Cirrhinus molitorella</i> VtgAo1:	ADB77954	-
<i>Cyprinus carpio</i> VtgAo1:	AAL07472	-
<i>Danio rerio</i> VtgAo1:	NP_739573	Tong et al., 2004
<i>Pimephales promelas</i> VtgAo1:	AAD23878	Korte et al., 2000
<i>Tanichthys albonubes</i> VtgAo1:	ABN13867	-
<i>Cyprinus carpio</i> VtgAo2:	BAD51933	-
<i>Danio rerio</i> VtgAo2:	XP_688036	-
<i>Danio rerio</i> VtgAo2:	XP_688419	-
<i>Clarias macrocephalus</i> Vtg:	ABW96364	Panprommin et al., 2008
<i>Danio rerio</i> VtgC:	AAG30407	Wang et al., 2000
Subdivisión: CLUPEOMORPHA		
<u>Orden: CLUPEIFORMES</u>		
<i>Clupea harengus</i> Vtg:	ACJ65208	Kristoffersen et al., 2009
Subdivisión: ELOPOMORPHA		
<u>Orden: ANGUILLIFORMES</u>		
<i>Anguilla japonica</i> VtgAe1:	AAV48826	Wang and Lou, 2006
<i>Anguilla japonica</i> VtgAe2:	AAR82899	Mikawa et al., 2006
<i>Anguilla japonica</i> VtgAe3:	AAR82898	Mikawa et al., 2006
<i>Conger myriaster</i> VtgAe1:	BAD93275	Mikawa et al., 2006
Infraclase: CHONDROSTEI		
<u>Orden: ACIPENSERIFORMES</u>		
<i>Acipenser transmontanus</i> VtgAB:	Q90243	Bidwell and Carlson, 1995
Superclase: AGNATHA		
<u>Orden: PETROMYZONTIFORMES</u>		
<i>Ichthyomyzon unicuspis</i> VtgABCD:	S28974	Sharrock et al., 1992

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

Aplicación futura de la biotecnología desarrollada.

¹Conal D. True

¹Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas,
Km 103 Carretera Tijuana – Ensenada Código Postal 22860 , Ensenada, Baja California

Conal D. True, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas,
Carretera Tijuana, Ensenada Km 103, Ensenada, Baja California, México. CP 22860.

Email: ctrue@uabc.edu.mx

Palabras Clave: Totoaba, reproducción, repoblación, cultivo comercial, Sciaenidae.

Desarrollo

El desarrollo de biotécnicas de cultivo para especies en riesgo y/o amenazadas con extinción sin duda enfrenta muchos retos, pero es a partir del momento en que se logra cerrar su ciclo reproductivo de forma predecible y que se solventan los mayores obstáculos para su crianza hasta talla juvenil, que se logra la fundamentación suficiente para escalar dicha biotecnia. Para el caso particular de la totoaba, presentado a lo largo de esta disertación, es claro que ya se cuenta con la biotecnia de cultivo, pero aún no es evidente cuál será su aplicación y/o escalamiento final. Tres posibilidades saltan a la vista de inmediato: el desarrollo de un cultivo con fines únicamente de repoblación, un enfoque de desarrollo comercial ó una combinación de ambas.

El cultivo de repoblación conocido en la literatura anglosajona como “stock enhancement” se ha aplicado durante más de un siglo, desde que se desarrollaron las primeras instalaciones de cría, alevinaje y liberación de salmón (Levin *et al.*, 2001), como una forma de aumentar la población pescable cuando los salmones regresaban en su corrida anual de reproducción (Hilborn, 2006), lo cierto es que aunque inicialmente se consideró como una buena idea, con el tiempo ha probado tener muchas complicaciones, pues la movilidad de las poblaciones de forma artificial, la entrecruza de las mismas y la selección artificial han probado tener un efecto negativo en las poblaciones silvestres (Fraser, 2008). Esta lección ha hecho que el cultivo de repoblación sea seriamente revaluada.

Existe una discusión entre dos áreas disciplinarias: la rama de las pesquerías y el estudio de biología de poblaciones. Esta diferencia se origina a partir del origen mismo de dichas disciplinas, ya que el estudio de las pesquerías responde directamente al manejo de un recurso para su explotación, mientras que el estudio de la biología poblacional engloba un profundo entendimiento de cómo se perpetua y desarrolla un recurso biológico en el contexto de su medio ambiente natural. Lo interesante es que ambas disciplinas tienen el mismo fin: asegurar la viabilidad de las poblaciones a largo plazo, pero con un enfoque distinto. Mientras que los administradores de pesquerías buscan maximizar la productividad con fines económicos los biólogos buscan una población reproductivamente estable (Brown

y Day, 2002). Dicho de otra manera para las pesquerías en las cuales se realiza repoblamiento, la sobrevivencia solo requiere darse hasta una edad y/o talla en que los organismos introducidos sean pescables, no necesariamente coincidiendo con la edad reproductiva, mientras que en el contexto de la biología de poblaciones deberán de completar su ciclo hasta la reproducción. Otra diferencia fundamental radica que desde el contexto de las pesquerías el repoblamiento está basado en la liberación de un gran número de individuos a partir del cultivo, sin considerar su aptitud ante el medio, mientras que la biología de poblaciones está más interesada en cómo adaptar a los organismos en su transición de las condiciones de laboratorio al medio natural y así maximizar su sobrevivencia (Johnsson 1993; Fushimi 2001).

Lo cierto es que mientras que las técnicas de cultivo en cautiverio se han perfeccionado durante las últimas dos décadas aumentado significativamente el número el peces liberados, la proporción de estos organismos que llega a talla adulta es cada vez menor (Nickleson 1986; Beamish *et al.*, 1992; Pearcy 1992; Coleman *et al.* 1998; Blaxter 2000), en el caso de los salmónidos típicamente menos del 5% de los organismos liberados llegan a talla adulta (McNeil 1991). De igual forma a pesar de que las liberaciones son cada vez más masivas en la mayoría de los casos no se ha podido registrar un aumento en las poblaciones objetivo, siendo el problema principal la falta de monitoreo de dichas liberaciones por considerarse demasiado complicado técnica y/o financieramente (Coleman *et al.*, 1998; Svasand *et al.*, 2000). Otro rasgo no menos importante es el aspecto genético, sobre todo cuando se trata de poblaciones que han sido afectadas severamente. Existen evidencias claras de que liberaciones masivas a largo plazo a partir de un grupo limitado de reproductores en cautiverio, tienen efecto sobre las poblaciones silvestres, reduciendo ó deteriorando la variabilidad génica (Gross, 1998)

A partir de lo antes expuesto cabe preguntarse sobre la pertinencia de un programa de repoblación de totoaba, de cuáles serían los aspectos a considerar y como se podría implementar. El primer aspecto que deberá de cuidarse en el caso de la repoblación es que la variabilidad génica de la población en el medio natural deberá de tener una alta correspondencia con el grupo de sementales en cautiverio. Deberá de hacerse todo lo

posible por obtener el mayor número de cruza entre los sementales en cautiverio para maximizar la variabilidad génica de la progenie producida para liberación. Tratar de implementar en el transcurso del periodo de cultivo en laboratorio técnicas y/o metodologías que permitan que se dé una selección lo más natural posible, logrando la sobrevivencia de los más aptos. Se deberá de proveer de un periodo de transición para la liberación, donde los organismos se les permitan enfrentar las variaciones del medio natural antes de ser liberados, aspectos como las variaciones en condiciones ambientales, introducción de alimento natural y relaciones con predadores. Finalmente estructurar un programa de monitoreo a corto plazo de la liberación para valorar la sobrevivencia y dispersión inicial y otro a largo plazo que evidencie la integración de los organismos a la población reproductiva. Cabe mencionarse que derivado de este trabajo se ha iniciado una exploración en cuanto a la factibilidad de hacer un programa de este tipo, realizado hasta la fecha la liberación de ~12,000 ejemplares. En síntesis los organismos soportan el transporte a altas densidades $\sim 15 \text{ Kg m}^3$, poseen un comportamiento de refugio inmediato y el interés del sector pesquero de la región es alto (**Fig. 1**). Cabe aclarar que no todos los organismos llegan en las mejores condiciones y que en algunos casos se muestran desorientados, por lo que se considera muy adecuado la recepción en instalaciones intermedias (tanques y/o jaulas) para su recuperación y previo acondicionamiento a la zona antes de su liberación.

La segunda opción se relaciona al desarrollo comercial del cultivo, situación que depende de comprobar la viabilidad técnica y económica para la engorda. Técnicamente esta etapa se puede realizar de diversas formas; mediante el uso de sistemas de recirculación intensivos, en estanquería rústica ó en jaulas; cada uno con su problemática propia. Con la intención de comprobar la factibilidad técnica del cultivo a talla comercial se realizó una prueba de engorda en un sistema de recirculación intensivo en colaboración con un productor local (PEZCO S.A. de C.V.). El sistema estaba constituido por tanques de geomembrana plástica bajo un techo de maya sombra con suministro constante de agua de mar sin control de temperatura. Los tanques eran de $\sim 10 \text{ m}$ de diámetro color negro, con una profundidad de $\sim 70 \text{ cm}$, con un rebosadero central, el flujo se mantuvo a $\sim 120 \text{ lt m}^{-1}$, se

administró aireación suplementaria y se alimentó con una dieta para trucha (Silver Cup, El Pedregal, México). Esta prueba mostró que fue posible lograr una talla ~40 cm y peso de ~1.2 Kg en 16 meses posteriores a la siembra y la mortalidad se estimó en un 30% (**Fig 2**). Un aspecto que se evidenció durante esta prueba, fue la presencia del síndrome de hígado verde. Esta enfermedad se ha identificado en otros peces como un problema asociado a la alimentación con proteínas de fuente vegetal y propiamente a una deficiencia en el suministro de taurina (Takagi *et al.*, 2006). La sintomatología de esta enfermedad no es evidente hasta que está en sus etapas más avanzadas, con muestras de letargia y falta de apetito, en casos extremos los organismos se muestran con una pigmentación amarillenta en la piel y un hígado de color verde brillante (**Fig. 3**), este aspecto se encuentra bajo investigación actual.

Visión Futura.

Realmente la limitante para un futuro desarrollo del cultivo de totoaba radica en definir un claro propósito del desarrollo y con el programar un escalamiento de la tecnología. La integración de un cultivo de repoblación en conjunto con un desarrollo comercial pudiera producir el interés y los recursos necesarios para un programa a largo plazo. El repoblamiento pudiera ser el generador del interés público en la recuperación de la especie, creando las demandas requeridas para justificar recursos de investigación y desarrollo de fondos públicos, así mismo el desarrollo comercial ofrecería la oportunidad de acortar la generación de una cadena de valor alrededor de esta especie. Creando las condiciones en las cuales la pre-engorda y engorda en las instalaciones comerciales permitan una adaptación previa de crías para las liberaciones. Los laboratorios de producción de crías podrían compartir así más de una fuente de recursos tanto públicos como privados para continuar una investigación que optimice y mejore aún más la producción de crías. Todo esto con una meta de largo plazo: Constatar que un porcentaje significativo de los organismos liberados llegaran a taya reproductiva y que su interacción con la población silvestre no tenga efectos negativos. En el camino se desarrollaría una extensa cadena de servicios derivados de un aprovechamiento racional a partir de una captura deportiva y una

comercialización regulada del producto comercial. Para cumplir este plan ya existen los componentes más importantes, la biotecnología, una norma que regula el acceso y administración como recurso bajo protección comercial (NORM-ECOL #059 SEMARNAT) y el interés del sector por recuperar el uso sustentable del recurso, lo difícil será integrarlos en una programa con metas claras a corto, mediano y largo plazo.

Agradecimientos.

El presente trabajo se realizó mediante una serie de apoyos institucionales a los cuales se les agradece su soporte administrativo y financiero, gracias a: SAGARPA/CONAPESCA, SEMARNAT/Vida Silvestre, al gobierno del Estado de Baja California a través de “SEPESCA-BC” y a Fundación Produce BC. Así mismo se agradece a: Nathaniel Schmidt (PEZCO S.A. de C.V.), Enrique Félix (PROVIPSA) y al Sr. Tony Reyes por su apoyo en las pruebas de engorda y liberaciones. Así mismo un extenso agradecimiento en conjunto a los distintos oficiales de las oficinas gubernamentales que facilitaron los trámites para que esta etapa se cumplirá y por compartir sus opiniones. Todos los reproductores empelados en este estudio se obtuvieron bajo los siguientes permisos de colecta especial: 090394-310-03 (Secretaría de Pesca 1994); 200596-213-03 (SEMARNAP 1996); 08052000-213-03 (SEMARNAP 2000) and SGPA/DGVS-04294 (SEMARNAT 2005).

Literatura Citada.

- Beamish, R.J., Thompson, B.L. and McFarlane, G.A. (1992) Spiny dogfish predation on chinook and coho salmon and the potential effects on hatchery-produced salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* **37**,805-811.
- Blaxter, J.H.S. (2000) The enhancement of marine fish stocks. *Advances in Marine Biology* **38**,2-54.
- Brown C, Day RL (2002) The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology. *Fish and Fisheries*, **3**, 79-94.
- Coleman, F., Travis, J. and Thistle, A.B. (1998) Marine stock enhancement: a new perspective. *Bulletin of Marine Science* **62**,303.

- Fraser DJ (2008) How well can captive breeding programs conserve biodiversity? A review of salmonids. *Evolutionary Applications*, **1**, 535-586.
- Fushimi, H. (2001) Production of juvenile marine finfish for stock enhancement in Japan. *Aquaculture* **200**, 33-53.
- Gross MR (1998) One species with two biologies: Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the wild and in aquaculture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, 131-144.
- Hilborn R (2006) Salmon-farming impacts on wild salmon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15277.
- Johnsson, J.J. (1993) Big and brave: size selection affects foraging under predation risk in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Zoology* **45**, 1219-1225.
- Levin PS, Zabel RW, Williams JG (2001) The road to extinction is paved with good intentions: negative association of fish hatcheries with threatened salmon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **268**, 1153-1158.
- McNeil, W. (1991) Expansion of cultured Pacific salmon into marine ecosystems. *Aquaculture* **98**, 173-183.
- Nickleson, T.E. (1986) Influences of upwelling, ocean temperature and smolt abundance in marine survival of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in the Oregon production area. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **43**, 527-535.
- Pearcy, W.G. (1992) Ocean Ecology of North Pacific Salmonids. University of Washington Press, Seattle, 179pp.
- Svasand, T., Kristiansen, T.S., Pedersen, T., Salvenes, A.G.V., Engelsen, R., Naevdal, G. and Nodtvedt, M. (2000) The enhancement of cod stocks. *Fish and Fisheries* **1**, 173-205
- Takagi S, Murata H, Goto T, Ichiki T, Endo M, Hatate H, Yoshida T, Sakai T, Yamashita H, Ukawa M (2006) Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Science*, **72**, 1191-1199.

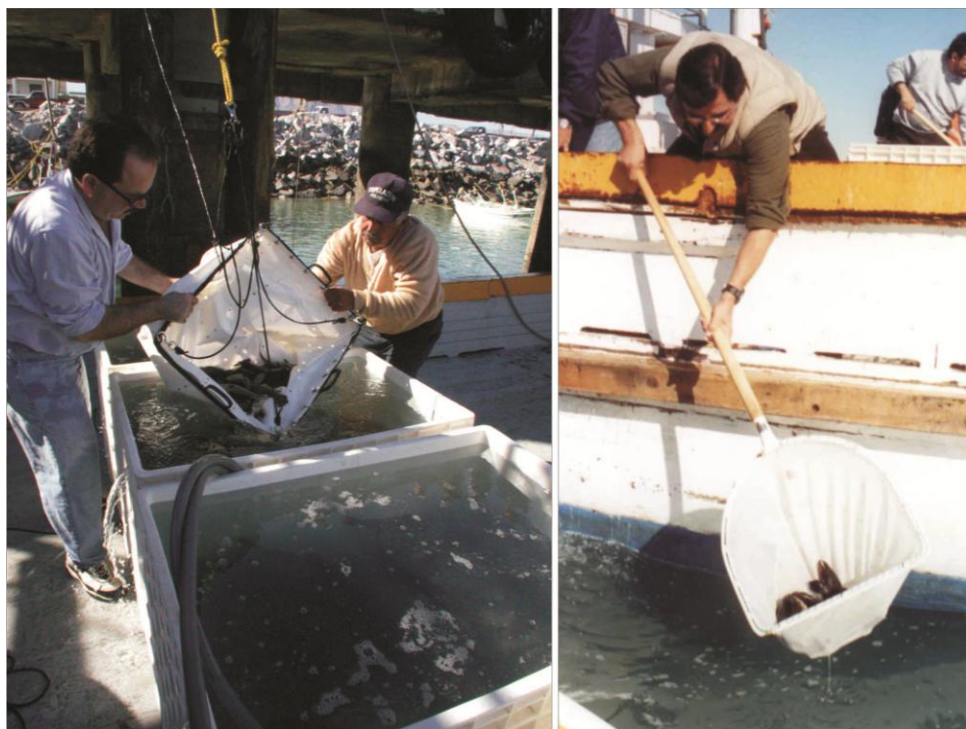
Figuras.

Figura 1. Liberación de Totoabas juveniles en el golfo, detalles del traslado y la liberación.

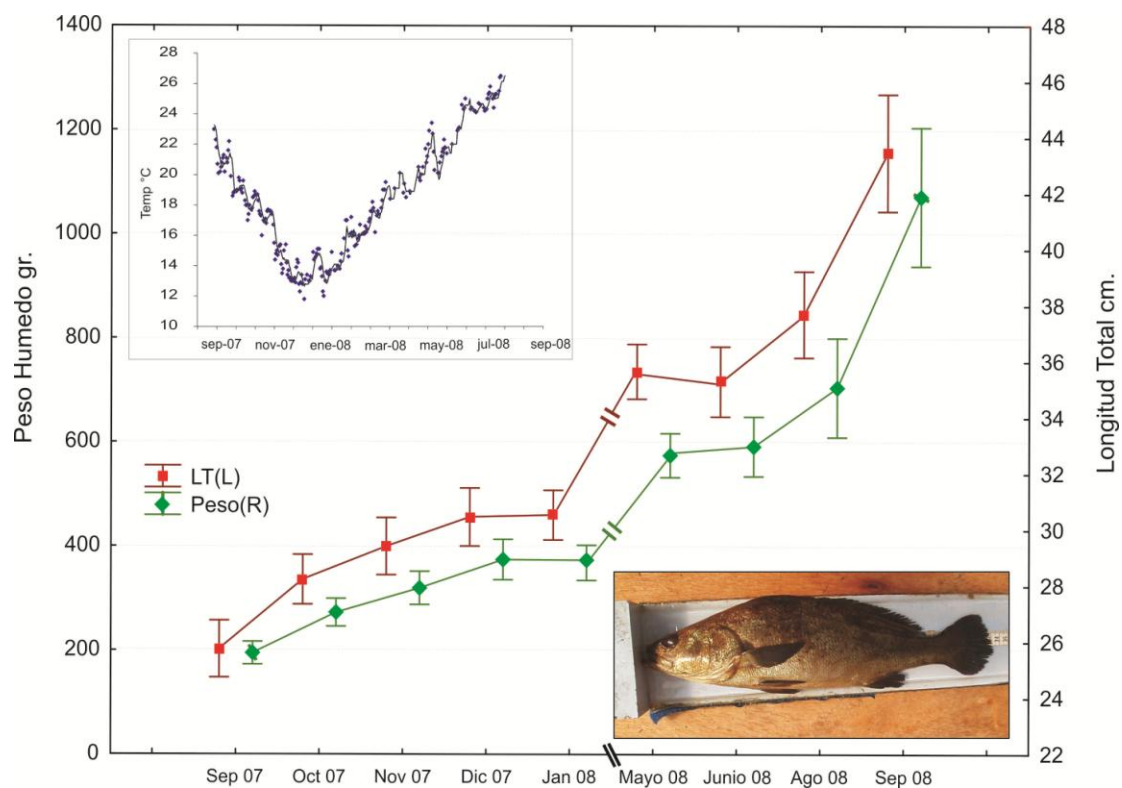


Figura 2. Crecimiento de Totoaba en una prueba de engorda a talla comercial. Logitud total y peso humedo. Insertos muestran la variación térmica y un organismo típico al final de la prueba.



Figura 3. Totoaba con evidencias de síndrome de hígado verde. Panel de arriba muestra una pigmentación verde atípica. Panel de abajo muestra una disección con clara evidencia de hígado verde.

FIN