

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**“CALIDAD DE HUEVO EN REPRODUCTORES SILVESTRES Y EN
CAUTIVERIO DE BOTETE DIANA (*Sphoeroides annulatus*)”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N Ó L O G O
PRESENTA:
CARLOS CRISTIAN MARTÍNEZ CHÁVEZ**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MAYO 2003

**"CALIDAD DE HUEVO EN REPRODUCTORES SILVESTRES Y EN
CAUTIVERIO DE BOTETE DIANA (*Sphoeroides annulatus*)"**

**TESIS QUE PRESENTA:
CARLOS CRISTIAN MARTÍNEZ CHÁVEZ**

Aprobada por:



Director

Dr. Neil John Duncan Main


Sinodal

Dr. Eugenio Carpizo Ituarte



Sinodal

MC. Conal David True

DEDICATORIA

A mi madre, mujer hermosa, trabajadora incansable, consejera sabia, rival noble, confidente comprensiva, amiga en las buenas y las malas; te dedico este trabajo, para agradecerte el haberme traído a este mundo, guiarme, y con tu ejemplo, darme la oportunidad de demostrar tus enseñanzas únicas a través de mi persona; porque, por sobre todo lo que eres, y no sólo una mamá: La mejor.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal del CIAD, Unidad Mazatlán, especialmente: al laboratorio de Reproducción y Genética por su incondicional amistad y apoyo en la realización de este trabajo. Además a las personas que me ayudaron en alguna etapa de la realización de esta tesis:

A Neil, por ser un excelente amigo y director de tesis, gracias por tu paciencia.

A Lenin, porque sin tu “guía y asesoría estadística”, aun estuviese tratando datos.

A Estela, por tu apoyo logístico, amistad brindada durante todo el tiempo y por hacer más agradables los ratos en el laboratorio.

A ti Adriana por tu apoyo en las revisiones de la tesis, y por ser la mejor compañía que he tenido y me ha soportado en tiempos difíciles....gracias

A Noemí, Gaby, Zohar y Eduardo alias “laloanael”, por su amistad y ayuda en la realización de los experimentos.

A todos los amigos y maestros de la Facultad de Ciencias Marinas por formarme y hacerme participe de una experiencia invaluable. Especialmente a mis sinodales Mc. Conal D. True y el Dr. Eugenio Carpizo por su amistad, apoyo y pronta revisión de la tesis. Y también al Dr. Trujillo por su colaboración en el tratado de los datos y sus consejos.

Las secretarias de la Facultad por su invaluable ayuda durante la carrera y la realización de este documento.

A la generación Nautilus, especialmente a los **pólipos** por su amistad, momentos y experiencias inolvidables que han marcado mi vida.

A mi familia por todo su apoyo y paciencia, espero que este trabajo compense en algo los momentos difíciles en que ambos nos hicimos falta.

A mi madre y padre por enseñarme y darme el gusto por la investigación, siendo ambos perfectos ejemplos de un profesionista excepcional, brillante y trabajador, les doy gracias por esto y mucho más.

A mi hermana por soportarme todos estos años y los que te faltan!!!

A todos los demás que pude haber omitido pero que saben que tuvieron alguna influencia en mi o este trabajo durante los últimos 6 años les doy las gracias.....

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objeto realizar comparaciones de calidad de huevo entre reproductores de un año de cautiverio y silvestres de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) capturados en la temporada de reproducción. Los parámetros observados de los grupos experimentales fueron peso, longitud, fecundidad relativa de las hembras, diámetro de huevos, porcentaje de fertilización, porcentaje de divisiones celulares simétricas, tiempo de incubación y eclosión. Los parámetros ambientales (temperatura, oxígeno disuelto y salinidad) se obtuvieron del sistema experimental. Las longitudes, pesos, fecundidad relativa de las hembras y los parámetros ambientales durante el período incubatorio no difirieron significativamente ($p < 0.05$), entre tratamientos y fueron adecuados para el desarrollo embrionario. Altos valores de fertilización (entre 82-100%; $94.53 \pm 5.32\%$) y eclosión ($47.30-98.42\%$; $82.92 \pm 13.71\%$) fueron encontrados para ambos tratamientos en todos los casos. No se encontraron diferencias significativas entre la fertilización (95.200 ± 5.596 y $93.867 \pm 5.153\%$) y la eclosión ($82.603 \pm 16.961\%$ y $83.216 \pm 10.100\%$) de huevos silvestres y de cautiverio; solamente el porcentaje de divisiones simétricas fue significativamente diferente ($p < 0.05$; 96.667 ± 4.451 y $94.267 \pm 3.369\%$). No se encontró correlación alguna entre los parámetros de fertilización, divisiones simétricas, diámetro de huevo, fecundidad relativa, longitud de hembra, tiempo de incubación, temperatura y oxígeno disuelto (OD) contra la eclosión. Se observó, que el porcentaje de fertilización se mantiene alto hasta 10 horas después de la ovulación, sin embargo la sobrevivencia de los embriones a las 48 horas de incubación disminuye de 91.707% a 50.043% después de la segunda hora post-ovulatoria.

Se concluye que no existe ventaja alguna de los huevos de reproductores silvestres sobre los de un año de cautiverio. Al parecer, ninguno de los parámetros (fertilización, divisiones simétricas, diámetro de huevo, fecundidad relativa) refleja la calidad de huevo al momento de la eclosión. Sin embargo, la calidad de huevo disminuye después de 2 horas post-ovulación y es necesario fertilizarlos en este período para asegurar la obtención de huevos de alta calidad. Estos resultados muestran que huevos de buena calidad pueden ser obtenidos de peces en cautiverio, siendo esta característica indispensable en especies con potencial acuícola y de principal importancia para el sector productivo y con fines de investigación. Además, con la información encontrada se puede mejorar el manejo de los tiempos de fertilización para optimizar e incrementar la calidad y número de larvas producidas en cautiverio.

ÍNDICE

	Pág.
CONTENIDO.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
 1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Estatus de la acuicultura a nivel mundial.....	1
1.2 Acuicultura en México.....	2
1.3 Factores relevantes en la reproducción de peces.....	4
1.3.1 Estrés.....	5
1.3.2 Nutrición.....	9
1.3.3 Huevos.....	11
1.4 Aspectos biológicos de la especie.....	17
1.4.1 Importancia Comercial.....	18
1.4.2 Estatus actual de la investigación de la especie.....	19
1.4.3 Potencial para la Acuicultura.....	24
 2. PLANTEAMIENTOS	
2.1 Hipótesis.....	26
2.2 Objetivos generales.....	26
 3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Preparación y condiciones de reproductores.....	27
3.1.1 Obtención de reproductores en cautiverio.....	27
3.1.2 Captura y acondicionamiento de peces silvestres.....	27
3.1.3 Mantenimiento de los reproductores.....	28
3.1.3.1 Reproductores en cautiverio.....	28

3.1.3.2 Reproductores silvestres.....	31
3.2 Inducción artificial para el desove.....	32
3.2.1 Anestesia.....	33
3.2.2 Protocolo de inducción	34
3.3 Identificación de hembras.....	34
3.4 Selección de machos.....	35
3.5 Experimento # 1.....	36
3.5.1 Muestreo de huevos.....	36
3.5.2 Incubación.....	37
3.5.2.1 Muestreo de incubadoras.....	39
3.5.2.2 Obtención de datos de eclosión.....	40
3.6 Experimento # 2	40
3.7 Análisis estadístico	41

4. RESULTADOS

4.1 Experimento # 1	43
4.1.1 Peces	43
4.1.2 Parámetros físicos y biológicos	43
4.1.2.1 Salinidad	43
4.1.2.2 Temperatura	43
4.1.2.3 Oxígeno disuelto (OD)	44
4.1.2.4 Bacterias	45
4.1.2.5 Longitud	45
4.1.2.6 Fecundidad	45
4.1.2.7 Porcentajes de fertilización	48
4.1.2.8 Diámetro de huevo	49
4.1.2.9 Porcentaje de huevos con blastómeros simétricos	50
4.1.2.10 Períodos de incubación	50
4.1.2.11 Porcentajes de eclosión	51
4.1.3 Correlaciones	54
4.2 Experimento # 2	54

4.2.1 Fertilización	55
4.2.2 Supervivencia	56
5. DISCUSIÓN	
5.1 Porcentaje de eclosión	59
5.2 Predictores de calidad de huevo	61
5.2.1 Porcentaje de fertilización	62
5.2.2 Porcentaje de huevos con blastómeros simétricos	65
5.2.3 Diámetro de huevo	66
5.2.4 Fecundidad relativa	67
5.2.5 Longitud	69
5.3 Parámetros biológicos del sistema experimental	70
5.3.1 Salinidad.....	70
5.3.2 Oxígeno disuelto (OD)	70
5.3.3 Temperatura	71
5.4 Parásitos	72
6. CONCLUSIÓN	74
7. RECOMENDACIONES	75
8. REFERENCIAS.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Resumen de factores sugeridos de calidad de huevos y larvas (Tomado de Bromage, 1995).....	5
Figura 2.- Reproductor de <i>Sphoeroides annulatus</i>	18
Figura 3.- Biopsias realizadas canulizando las hembras de botete diana (<i>Sphoeroides annulatus</i>) por el oviducto y extrayendo ovocitos.....	34
Figura 4. - Sistema incubatorio de huevos de botete diana (<i>Sphoeroides annulatus</i>).....	39
Figura 5.- Regresión lineal entre peso de hembras utilizadas y # de huevos producidos..	47
Figura 6.- Porcentajes de eclosión de huevos incubados de hembras silvestres.....	52
Figura 7.- Porcentajes de eclosión de huevos incubados de hembras en cautiverio.....	53
Figura 8.- Efecto del porcentaje de fertilización con respecto al tiempo-postovulación en huevos de dos hembras de botete diana.....	55
Figura 9.- Efecto de la sobrevivencia en una serie de tiempos post-ovulatorios en huevos de dos hembras de botete diana.....	57

Pág.

V

Tabla XVI.- ANOVA dos vías para porcentajes de eclosión de lotes de huevos de hembras silvestres y de cautiverio de botete diana.....	51
Tabla XVII.- Tabla resumida de correlaciones.....	54
Tabla XVIII.- Análisis de varianza para regresión polinomial (6to grado) de datos de fertilización de hembra en cautiverio.....	55
Tabla XIX.- Análisis de varianza para regresión polinomial (3er grado) de datos de fertilización de hembra silvestre.....	56
Tabla XX.- Análisis de varianza para regresión polinomial (6to grado) de datos de sobrevivencia de hembra de cautiverio.....	57
Tabla XXI.- Análisis de varianza para regresión polinomial (2 ^{do} grado) de datos de sobrevivencia de hembra silvestre.....	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estatus de la acuicultura a nivel mundial

Durante las pasadas tres décadas, la acuicultura se ha desarrollado como el sector de más rápido crecimiento en la producción de alimentos del mundo. La acuicultura es altamente diversa y contempla un amplio espectro de técnicas, métodos, sistemas, prácticas y operaciones que van desde sistemas sencillos de traspatio, hasta sistemas intensivos de producción masiva comercial. Una gran proporción de la producción acuícola viene de pequeños productores de países en vías de desarrollo y de países con bajos ingresos y déficit alimentario (Low Income Food Deficit Countries "LIFDCs"), los cuales contribuyen a la seguridad alimenticia, a la reducción de la pobreza y al bienestar social en muchos países (Jiansan *et al.*, 2000).

La producción acuícola mundial esta dominada por países LIFDCs, principalmente asiáticos encabezados por China, la cual reportó incrementos en su producción de 0.7 millones de toneladas por año hasta 1992, año a partir del cual su producción anual se elevó a 2.6 millones de toneladas. África es uno de los continentes que aunque cuenta con poca tradición acuícola, ha elevado su producción de 37,000 toneladas en 1984 a 189,000 para 1998 en su mayoría proveniente del cultivo de carpa y tilapia (Fuente: FAOa). Para el periodo de 1998-99, la producción mundial de la acuicultura se incrementó de 30.8 a 33.3 millones de toneladas mientras que la región Asiática (particularmente China) continuó dominando la producción acuícola mundial con un 89 % del volumen total (Fuente FAOb).

Los planes futuros de desarrollo de esta actividad deben reconocer las considerables diferencias existentes en las dimensiones geográfica, cultural, social,

económica y técnica y poner particular atención en la aportación potencial que la acuicultura podría hacer a la seguridad alimentaria y a la reducción de la pobreza (tomado de FAOb). La proyección para el año 2010 según la FAOb es que la producción pesquera mundial total (incluyendo acuicultura) se encuentre entre las 107 y 144 millones de toneladas. De este gran total, la mayor parte del incremento en la producción de pescado será proveniente de la acuicultura.

1.2 Acuicultura en México

México posee 11,592.77 Km de litoral, una plataforma continental de 357,795 Km² y 2'946,825 Km² de Zona Exclusiva Económica con aproximadamente 1'500,000 ha de lagunas costeras, esteros y bahías litorales con características oceanográficas adecuadas para desarrollar la acuicultura (Avilés, 2000). También cuenta con una amplia diversidad de especies tropicales y subtropicales de alta demanda en el mercado nacional e internacional, que permiten considerarlo como un país de alto potencial acuícola. Sin embargo, el desarrollo de la acuicultura se ha limitado a una cuantas especies de peces y crustáceos dulceacuícolas como los langostinos del género *Macrobrachium* sp. y al cultivo marino de moluscos bivalvos y crustáceos como camarones peneidos, descuidándose el potencial que ofrece el cultivo de especies marinas como cabrilla, robalos, pargos, pámpanos, lenguados y corvinas de alto valor comercial (Avilés, 2000).

Los trabajos de acuicultura en México en cuanto a peces se refiere, se han desarrollado principalmente en aguas interiores con una gran predominancia del cultivo de especies exóticas sobre las autóctonas y principalmente desde un enfoque de piscicultura de siembra o de repoblación. En cuanto a los grupos de peces mas

cultivados, con mayor éxito se tiene a las tilapias las cuales son especies que representan más del 60% del cultivo de los centros acuícolas y productores del sector (Alvarez, 2000).

Actualmente se están desarrollando cultivos experimentales a partir de la colecta de peces silvestres, fortaleciendo al mismo tiempo la investigación biológica y el desarrollo tecnológico para diversificar la actividad acuícola, incrementar la producción y generar divisas para el país (Avilés, 2000). Con tal objeto, se han dado los primeros avances en piscicultura marina en la porción noroeste del Pacífico Mexicano con el proyecto de repoblación de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y engorda de atún en jaulas flotantes, en el Golfo de California con la producción de semilla de cabrilla (*Paralabrax sp.*) y su engorda en jaulas, en donde también se ha experimentado con algunas especies de pargos (*Lutjanus sp.*) en jaulas. En las costas de Sinaloa y Sonora se ha practicado el cultivo del pargo amarillo en jaulas flotantes, mientras que en la costa occidental de Baja California Sur se realizan estudios para el cultivo de Jurel aleta amarilla (*Seriola lalandi*). En el Litoral del Golfo de México los trabajos sobre cultivo experimental de peces marinos se ha enfocado prácticamente al estudio del robalo (*Centropomus undecimalis*), huachinango (*Lutjanus campechanus*), corvina roja (*Sciaenops ocellatus*), pámpano y palometa (*Trachinotus carolinus* y *T. falcatus*) y boquinete (*Lachnolaimus maximus*) (Avilés, 2000).

En las costas de Sinaloa el botete diana (*Sphoeroides annulatus*) representa una pesquería ribereña importante debido al alto valor en el mercado regional. En el CIAD Mazatlán se tienen dos años trabajando con la biología reproductiva de la especie y un poco menos de tiempo con cultivos piloto de botete diana en jaulas y estanques camaronícolas (Abdo y Duncan, 2002).

Los principales factores que limitan el cultivo de peces marinos en México y el mundo son los problemas asociados a aspectos reproductivos y de cultivo de larvas; el suministro de dietas balanceadas adecuadas para cada especie y la prevención de enfermedades y selección de sitios (Avilés, 2000).

El control sobre la reproducción es esencial para el éxito de la acuicultura y debe tener en consideración los factores externos que la regulan (Bardach, 1978). Uno de los principales problemas de reproducción en peces es que la mayoría no desovan en cautiverio, y aquellos que lo logran, lo hacen de manera asincrónica o en momentos no deseados por el productor para poder optimizar y manejar eficientemente sus recursos (Yaron y Zohar, 1993). Cambios adversos en el medio ambiente y una nutrición inadecuada son factores estresantes que pueden afectar la fecundidad y la calidad de los gametos (Schreck *et al.*, 2001). La temperatura y el fotoperiodo son algunos de los factores más importantes a considerar ya que actúan a través del sistema nervioso y pueden afectar el ciclo reproductivo principalmente en peces que desovan anualmente (Reinert, 1980).

1.3 Factores relevantes en la reproducción de peces.

El medio ambiente acuático abarca una amplia variedad de parámetros y prácticamente todos ellos influyen en la homeostasis de los organismos, siendo esenciales para el crecimiento y la reproducción de los peces (Roberts, 1981). Dentro de los más importantes se encuentran los factores ambientales, el estrés, las enfermedades o patógenos y la nutrición o disponibilidad de alimento (Fig. 1).

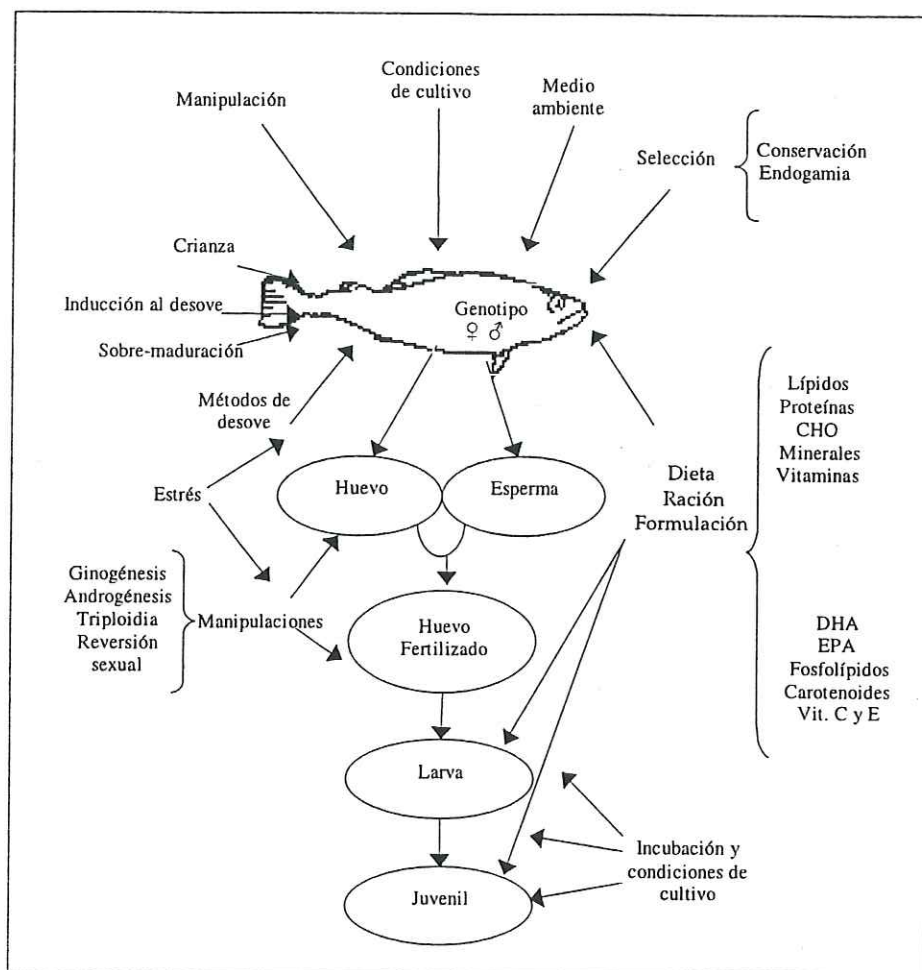


Figura 1.- Resumen de factores sugeridos de calidad de huevos y larvas (Tomado de Bromage, 1995).

1.3.1 Estrés

El estrés es uno de los factores mas importantes que afectan los procesos fisiológicos normales de los peces y es usado para describir las respuestas a cambios súbitos en las condiciones de crianza (Lee y Donaldson, 2001). Estos autores también argumentan que el estrés afecta a los peces en todos sus estadios y el efecto puede variar conforme a la especie y etapa de maduración. Es necesario llevar acabo estudios sobre estrés en la reproducción para poder controlar sus efectos. No se

conocen los efectos del manejo o comportamiento del pez sobre la fecundidad y calidad de huevo en condiciones de estrés. Tampoco se conocen los efectos a largo plazo de las larvas de reproductores sometidos a estrés, siendo estos ejemplos de gran reto para la acuicultura (Lee y Donaldson, 2001).

El estrés es causado por cambios rápidos o semi-rápidos desfavorables para la especie. En el medio natural estos se refieren principalmente a factores físicos como la temperatura, corrientes, presión por depredadores etc. En organismos en cautiverio representa un problema importante ya que las prácticas comunes de manejo de los sistemas como la limpieza, muestreos, sombras, altas densidades y fluctuaciones de parámetros son factores de estrés importantes para los peces. Experimentos hechos por Mazeaud *et al.* (1977) sobre los efectos primarios y secundarios del estrés en peces, indican que salmones del Pacífico sometidos a condiciones estresantes de manejo (forzados a luchar por 5 minutos) a temperaturas diferentes de las normales, resultan con niveles de adrenalina de hasta 10 veces mayor que los controles, encontrando valores entre 4.20 y 21.60 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ plasma a los 10 minutos de haber aplicado el estrés. No se encontró ninguna diferencia significativa entre los organismos no estresados y los sedados con 2-phenoxyethanol. Además se encontraron valores altos de adrenalina (1.11 y 3.44 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ plasma) y corticoesteroides (32 y 20.1 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ plasma) en dos organismos (supuestamente sin estrés) enfermos por hongos.

El estrés afecta la condición reproductiva en términos de la calidad de los gametos o de los progenitores (Schreck *et al.*, 2001). La fisiología asociada con la maduración y el desove parecen estar fuertemente acoplados con el estrés. Las

variables ambientales, y la nutrición, son importantes en las repercusiones de la calidad de gametos y tiempos de reproducción. Los efectos del estrés nutricional es moderado por los efectos en los tiempos de primera madurez o subsecuentes eventos reproductivos y/o por el mantenimiento de una baja calidad en algunos huevos vía atresia (Schreck *et al.*, 2001).

En experimentos de estrés efectuados con trucha (*Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta*), Campbell *et al.* (1994) han demostrado que el volumen y peso de los huevos provenientes de hembras estresadas por confinamiento durante el periodo de maduración resultaron ser significativamente menores ($p < 0.05$) que los observados en los controles. La sobrevivencia en distintas etapas de desarrollo resultaron más altas para los embriones y larvas provenientes de reproductores sin estrés que los afectados por éste, encontrando las mayores diferencias (68.3% y 95.7 %) en el estadio de aparición de los ojos (oculación) entre los provenientes de reproductores estresados y sin estrés respectivamente. Esta reducción en sobrevivencia larval puede ser debida a las reservas energéticas limitadas designadas a los huevos, además del posible daño mecánico producido por el estresor (Schreck *et al.*, 2001).

Por el contrario, Faulkner y Moberg (1997) probaron que el manejo a corto plazo de rutinas y prácticas normales de manejo durante la administración de hormona de liberación de gonadotropina análoga (GnRHa por sus siglas en inglés) en machos de esturión (*Acipenser transmontanus*) no interfieren con la acción de esta hormona inductora de secreción de hormona gonadotropina (GtH) necesaria para la espermiación y ovulación de muchas especies.

El factor estrés interviene en todas las enfermedades de los peces y puede ser causado principalmente por la temperatura, el fotoperiodo, la intensidad de la luz y el hacinamiento o altas densidades.

La temperatura del agua influye sobre ciertas propiedades del medio acuático importantes para la salud del pez (Roberts, 1981).

Cuando existe un aumento en el estrés del animal, la resistencia del organismo a enfermedades disminuye incrementando la posibilidad de que organismos patógenos invadan o enfermen al animal (Espinoza y Labarta, 1988). Otro factor a considerar principalmente en el medio de cultivo y el manejo de animales silvestres es que debido al manejo y los procesos de producción, se pueden producir lesiones físicas que aunque en su origen podrían no ser graves, si pueden facilitar posteriores infecciones, sobre todo aquellas de tipo bacteriano y fúngico (Espinoza y Labarta, 1988). Las enfermedades en los peces pueden afectar el potencial reproductivo de tal manera que un pez enfermo o menguado tiende a reducir sus hábitos alimenticios y muy probablemente a re-direccionar la energía destinada a la reproducción. Esto es muy importante antes y durante la temporada de reproducción. El re-direccionamiento de energía más común afecta la fecundidad y la sobrevivencia (Schreck *et al.*, 2001).

El control del medio ambiente y factores externos en animales de cautiverio para la disminución del estrés, es de gran utilidad para la industria. Además es una herramienta muy potente ya que trabaja al principio de la cadena que controla y regula la maduración (Lee y Donaldson, 2001).

Existen diversas enfermedades en peces provocadas por microsporidios que afectan el desarrollo y proceso reproductivo en general. La plasmodia sporogonial es

provocada por *Pleistophora mirandellae* en ciprínidos del viejo mundo. Las lesiones macroscópicas son fácilmente visibles en las gónadas de ambos sexos. La infección ocurre en los ovocitos en donde las esporas se insertan dentro del vitelo en formación, llegando a ocupar el 20% del total de ovocitos, promoviendo atresia temprana y fecundidades bajas (Dyková, 1995).

Otra especie de pez marino del mediterráneo *Dicentrarchus labrax* puede ser infectado por otro microsporidio (*Sphaerospora testicularis*) el cual reduce significativamente la fecundidad de los machos (Bobadilla y Pellitero 1990).

1.3.2 Nutrición

De acuerdo a De Silva y Anderson (1995) el estado nutricional de los animales afecta el potencial reproductivo, dentro de los aspectos nutricionales más importantes se encuentran: el tiempo de primera madurez, la fecundidad, el tamaño de los huevos, la calidad de los huevos desde el punto de vista de su composición, eclosión y sobrevivencia larval.

Por otro lado, Watanabe (1985) menciona que la nutrición tiene un profundo efecto sobre el crecimiento gonadal y la fecundidad. También indica que para la iniciación de estudios sobre la nutrición de reproductores es necesario primero evaluar si el desove y la calidad de huevo son afectados por la calidad nutricional de la dieta de los reproductores.

Cerdá *et al.* (1994) probaron dos dietas con variación en el contenido energético de las mismas (dieta1= 51% (p)roteína, 13% (l)ípido y 10% (c)arbohidrato contra Dieta 2= 34% P, 14% L, 32% C) en lobina europea *Dicentrarchus labrax* L. y

encontraron diferencias significativas entre los parámetros medidos y la eficiencia reproductiva entre los animales con suministro de una u otra dieta. Los peces alimentados con la dieta 2, no mostraron un pico durante la producción de huevos y mostraron un periodo de desove ligeramente mayor. La fecundidad relativa encontrada en peces suministrados con la dieta 2 también fue significativamente menor a los peces suministrados con la dieta 1. Aunque en el análisis bromatológico de los huevos entre dietas no obtuvo diferencias, los huevos provenientes de reproductores con la dieta 2, tenían menos flotabilidad y tasa de eclosión que los provenientes de padres suministrados con la dieta 1. El 50% de las larvas provenientes de reproductores con la dieta 2 fueron deformes.

La baja fecundidad reportada en especies marinas puede ser causada por la deficiencia de un balance nutricional en el sistema endocrino o bien por la restricción en la disponibilidad de algún componente bioquímico para la formación de los huevos (Izquierdo *et al.*, 2001).

Un estudio de Morehead *et al.* (2001) en donde evaluaron la diferencia en calidad de huevo entre organismos silvestres y en cautiverio de *Latris lineata* a los que se les ofrecieron diferentes dietas, mostró no haber diferencias en el contenido de lípidos, sin embargo encontró diferencias significativas entre el diámetro de los huevos provenientes de reproductores silvestres y los de cautiverio alimentados con pescado fresco, también encontró diferencias entre los silvestres y los de cautiverio alimentados con pellets. Los resultados iniciales indicaron que la mejor dieta podría ser la de pellets, pero aunque en esta última se obtuvieron mejores diámetros de huevo, fecundidad, porcentajes de eclosión y sobrevivencia a los 8 días post-eclosión fue significativamente mayor para los animales alimentados con pescado fresco. Los

autores sugieren que la principal diferencia se encuentra en los valores bajos de ácidos DHA/EPA que indican que el alimento fresco fue de mejor calidad que las dietas de pellets suministradas, promoviendo mayor crecimiento y sobrevivencia.

La principal diferencia y problemática entre los organismos silvestres y en cautiverio es la disponibilidad de alimento de buena calidad para los primeros, mientras que los animales en cautiverio se encuentran sujetos a que las dietas proporcionadas sean de calidad y que satisfagan los requerimientos nutricionales para cada etapa. Esto es especialmente difícil ya que estos requerimientos varían mucho de especie a especie y en sus diferentes etapas. El hecho de que las necesidades nutricionales sean especie-específicas debe ser tomado en cuenta al momento de describir algún parámetro de calidad de huevo para cierta especie, el cual puede ser descrito como un parámetro inefectivo para alguna otra (Kjorsvik *et al.*, 1990).

1.3.3 Huevos

El desarrollo ovárico de la mayoría de los teleósteos ha sido clasificado como sincrónico o asincrónico de acuerdo al patrón de ovocitos en el ovario en cualquier momento dado (Scott, 1987). En peces de ovulación sincrónica existen generalmente dos poblaciones de ovocitos, una en desarrollo / maduración próxima a desovar y otra en estadios más tempranos que sustituirán a los primeros eventualmente. En peces de ovulación asincrónica, se reclutan ovocitos de una población heterogénea de ovocitos que pueden madurar y formar varios lotes de huevos durante la temporada de desove (Scott, 1987).

Para producir un ovocito viable, es muy probable que se requiera de una estrecha relación entre factores endógenos y exógenos a la gónada. Sin embargo no se sabe si factores "exógenos" a la gónada como las gonadotropinas sean un prerequisite para el crecimiento de los ovocitos o solo sirvan para iniciar tal proceso (Tyler y Sumpter, 1996). El desarrollo ovárico final en peces involucra grandes cambios fisiológicos y bioquímicos que resultan en una incorporación masiva de lípidos y proteínas a los ovocitos (Zohar *et al.*, 1995).

Muchas especies costeras y la mayor parte de las especies de peces dulceacuícolas desovan huevos demersales que generalmente son mayores que los pelágicos y pueden o no ser adhesivos y/o puestos en algún tipo de nido o formación. Es sabido que el tamaño de huevo y la fecundidad están inversamente relacionadas y que los huevos de mayor tamaño también necesitan de un mayor periodo de incubación (Kjorsvik, 1996). Los peces producen huevos grandes y con vitelo abundante, particularmente aquellos que se fijan a substratos (Tyler y Sumpter, 1996).

Los problemas concernientes a calidad de huevo o viabilidad de huevos han recibido una atención creciente en relación con el cultivo y la valoración de la reproducción y reclutamiento de peces silvestres. La variación de la calidad de los huevos es uno de los principales factores limitantes para la producción exitosa de grandes volúmenes de juveniles, debido a que una mala calidad de huevo disminuye el potencial de sobrevivencia de la larva eclosionada. La calidad de huevo puede ser definida como: el potencial de los huevos para producir larvas viables. La viabilidad de los huevos y larvas con vitelo está influenciada por factores paternos y medioambientales (Kjorsvik, 1996).

Se ha visto que diversos factores bióticos y medioambientales tienen influencia en la fecundidad y diámetro de huevo. Entre algunos de los factores medioambientales más importantes se encuentran la temperatura, salinidad, estrés mecánico y luz, pero también la microbiología y la exposición a antibióticos afectarán el potencial de sobrevivencia (Fig. 1). Por otro lado, la calidad de las larvas al momento de ingerir alimento por primera vez se verá afectada por su historial ambiental (Bromage, 1995).

Los huevos de buena calidad normalmente están definidos como aquellos que exhiben niveles bajos de mortalidad durante la fertilización, la aparición de estructuras oculares en el embrión, eclosión, primera alimentación y aquellos que produzcan los animales de mejor y mayor crecimiento. No existe ningún acuerdo general sobre niveles de mortalidad que definan una buena calidad de huevos; ni siquiera se conocen adecuadamente los factores responsables de los diferentes estándares de calidad. Lo que es claro es que existe considerable variabilidad en la calidad de los huevos e inclusive entre huevos de reproductores mantenidos bajo las mismas condiciones (Bromage *et al.*, 1992).

No existe consenso sobre la existencia de métodos confiables para la evaluación de calidad de huevos en peces marinos, debido a que se ha notado una poca consistencia entre los distintos parámetros en diferentes géneros y especies de peces marinos (Bromage, 1995) por lo que mientras para algunas especies algunos parámetros (fertilización, flotabilidad de huevo, número de gotas lípidos, tasa de eclosión, peso húmedo y seco, composición bioquímica) son muy eficaces para determinar la calidad de huevo, para otras no tienen ninguna correlación o no son aplicables.

Los principales criterios determinantes en la calidad de huevo fueron descritos por Kjorsvik *et al.* (1990) en donde menciona que dentro de los parámetros con mayor validez se encuentran los procesos de fertilización, propiedades físicas (aparición del corion, forma del huevo, etc.) y fisiológicas (variaciones osmóticas), morfología (simetría en primeras divisiones, etc.), tamaño de huevo, contenido químico y aberraciones cromosómicas, siendo las dos últimas de mayor complejidad para su estudio debido al equipo y técnicas necesarias.

En la lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) se han usado una gran variedad de criterios para determinar la calidad de huevo, dentro de las que se incluyen viabilidad, flotabilidad de huevo, tasas de fertilización y eclosión, número tamaño de gotas de lípidos, tamaño de huevo, peso húmedo y seco, incidencia de deformidades, composición bioquímica y recientemente ciertos niveles hormonales (Carrillo *et al.*, 1995). Debido a que la medición de estos parámetros no ha sido estandarizada, los resultados obtenidos por distintos autores no son congruentes, además que otros parámetros como los pigmentos, micronutrientes y aberraciones cromosómicas deberán ser tomadas en cuenta.

La tasa de fertilización ha probado ser un buen parámetro de calidad de huevo en salmónidos (Bromage, 1995), sin embargo parece que esto no es aplicable para especies marinas por lo que otros parámetros como la simetría de las primeras divisiones o blastómeros podrían funcionar como predictores tempranos de calidad de huevo (Kjorsvik *et al.*, 1990; Shields *et al.*, 1997). En Salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), la fertilización, fecundidad relativa y el diámetro de huevos han mostrado diferencias significativas al ser ofrecidas diferentes tipos de dietas (Eskelinen, 1989) y en la trucha café (*Salmo trutta*), la fertilización ha sido de los

parámetros más sensibles a efectos negativos de calidad de huevo por ovulación temprana por inducciones con GnRHa y es el parámetro más importante de calidad de huevo para evaluar la producción de semilla (Mylonas *et al.*, 1992)

Morehead *et al.*, (2001) observó diámetros de huevo, contenido de lípidos y volumen de vitelo mayores en reproductores en cautiverio de *Latris linneata* comparados con los silvestres, sin encontrar diferencias en la fertilización y porcentaje de divisiones simétricas y aunque la eclosión fue significativamente mayor para los de cautiverio, no se observó un mayor tamaño larval entre grupos. Concluye que la diferencia en diámetros pudo deberse a un incremento en la hidratación de los huevos. Y que la diferencia en el porcentaje de eclosión se relaciona con el uso de la hormona LHRHa para inducir a los peces silvestres, ya que el desarrollo de los ovocitos pudo ser detenido entre el periodo de captura y de estimulación con hormonas exógenas.

Lahnsteiner *et al.* (2001) investigaron el potencial de posibles bio-marcadores de calidad de huevo en peces cyprinidos. Evaluaron el fluido ovárico, peso de huevos antes y después de el proceso de hidratación, composición bioquímica y actividades enzimáticas. Encontraron correlaciones positivas entre la fertilización y la actividad de algunas enzimas como aspartato aminotransferasa, la malato dehidrogenasa y pyruvato cinasa en los huevos, pH en fluido ovárico, contenido protéico y el peso de huevos hidratados y endurecidos.

Otro factor importante en la pérdida de calidad y viabilidad de los huevos es debido al envejecimiento (sobre-maduración) de éstos; esto sucede cierto tiempo después de la ovulación debido a un proceso de añejamiento de los huevos en el cual

empiezan a ocurrir cambios morfológicos y de composición que eventualmente llevan a la pérdida paulatina de la calidad y viabilidad de los huevos (Sakai* *et al.*, 1975 *En*: Bromage, 1995, Springate *et al.*, 1984). El envejecimiento es muchas veces visible como una decoloración o falta de transparencia, fusión de los alvéolos corticales y una apariencia “indentada” del citoplasma (Kjorsvik *et al.*, 1990). Los huevos utilizados en este estado tienen una baja tasa de fertilización y sobrevivencia siendo difícil atribuir esto a la calidad de los mismos. El estadio final del envejecimiento o sobre-maduración natural es la atresia, aunque esta puede presentarse en cualquier momento del desarrollo de los ovocitos (Tyler y Sumpter 1996). Los peces inducidos hormonalmente pueden llegar a desovar óvulos atrésicos. La atresia es la degeneración de los ovocitos y juega un papel importante en el reclutamiento de huevos en las etapas finales de maduración (Tyler y Sumpter 1996). Es posible entonces que la mayoría de los problemas concernientes a calidad de huevo, se deban a cambios (envejecimiento) en los huevos después de la ovulación (Kjorsvik *et al.*, 1990). Ya que este fenómeno ocurre eventualmente en reproductores, es importante obtener y fertilizar los huevos en el tiempo correcto después de la ovulación (Kjorsvik *et al.*, 1990).

La variabilidad entre peces silvestres y de cautiverio observada en muchas especies, se atribuye a muchos factores, pero dos han sido claramente demostrados, y son los procesos independientes que ocurren post-fertilización: la composición bioquímica de los huevos y el tiempo de fertilización después de la ovulación (Bromage, 1995).

1.4 Aspectos biológicos de la especie.

El botete diana fue descrito por primera vez por Jenyns en 1842 como *Sphoeroides annulatus*. Es abundante en el Golfo de California y tiene un rango geográfico de San Diego hasta Perú. Los botetes del género *Sphoeroides* son elongados, relativamente muy suaves al tacto y capaces de inflarse considerablemente. Al igual que la mayoría de los peces tienen un par de nostrilos, los cuales tienen dos aberturas a cada lado. Su nombre común se debe a los patrones característicos en la piel de la especie que simulan un blanco de tiro (Fig. 2). El botete diana habita costas arenosas y estuarios aunque también es común encontrarlo en arrecifes y fondos rocosos (Thomson *et al.*, 2000) (Tabla I).

Tabla I.- Clasificación Taxonómica del Botete diana (Thomson *et al.*, 2000).

Clase	Actinopterygii
Superorden	Acanthopterygii
Orden	Tetradontiformes (Pletognathi)
Superfamilia	Tetradontoidea
Familia	Tetradontidae
Subfamilia	Tetradontidae
Género	<i>Sphoeroides</i>
Especie	<i>Annulatus</i>

Actualmente existe muy poca información sobre la biología de esta especie, básicamente se conoce su distribución, en la región se conocen algunos centros de reunión (bocas de ríos y esteros) donde llegan organismos en estadios de madurez de

diversas áreas a reproducirse. Los peces de esta familia son ávidos comedores de moluscos y crustáceos, y los pescadores usan estos últimos para su selecta captura.



Figura 2.- Reproductor de *Sphoeroides annulatus*

1.4.1 Importancia Comercial

Una especie (*Takifugu rubripes*) de la misma familia taxonómica que el botete diana tiene el valor comercial más alto que cualquier otro pez en Japón, Corea y China a pesar de que sus órganos internos sean altamente venenosos debido al contenido del potente veneno llamado tetradontoxina (TTX). La producción de semilla en estos países comenzó exitosamente en 1962 y ha sido cultivado hasta la talla comercial en Japón. En este mismo país la producción total de esta especie se incrementó de 69 toneladas en 1980 a 1028 t para 1987 (Kanasawa, 1991), y a 4733

t. para el año 2000 (FAO 2000). Es importante mencionar que los peces cultivados de *Takifugu rubripes* carecen de TTX en músculo, tejido, hígado y ovario (Chih-Yu y Hong-Nong, 1998) lo cual hace más importante y atractiva su producción.

En Sinaloa el botete es un recurso que no se aprovechó sino hasta 1972 y actualmente constituye uno de los productos pesqueros con mayor demanda por la población. Esta especie se captura principalmente en las costas de Mazatlán y Escuinapa en donde su facilidad de captura y disponibilidad han hecho de él una pesquería importante en la región. Sin embargo su facilidad de captura y la temporada de pesca coinciden con la temporada de reproducción de la especie, lo cual hace surgir la apremiante necesidad de desarrollar estudios sobre la especie y su pesquería (Peraza, 1983). La captura de esta especie en la península de Baja California aumentó de 33 toneladas en 1993 a 198 toneladas para 1997 (Núñez *et al.*, 2000).

Actualmente el precio del kilogramo de filete fluctúa entre los \$ 80-90 MN en el mercado de Mazatlán. El botete se vende en su mayoría deshuesado con una técnica local que permite separar la piel y los órganos tóxicos del filete.

1.4.2 Estatus actual de la investigación de la especie.

En 1996 Martínez *et al.* (2002) iniciaron la investigación sobre el Botete diana (*Sphoeroides annulatus*) en el CIAD A.C. Mazatlán (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo en Acuicultura y Manejo Ambiental) cuyas principales líneas estaban encaminadas a la reproducción, desarrollo embrionario y nutrición. En 1998 se inició formalmente el estudio como proyecto financiado por CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) No. J28342B con el Título

“Investigación de la Maduración y cultivo del botete diana (*Sphoeroides annulatus*)” dentro del cual se tiene como principales objetivos investigar aspectos de maduración, nutrición, genética y cultivo del botete diana para desarrollar sistemas y técnicas de cultivo potenciales para la industria de la acuicultura. Desde entonces, la mayor parte de los trabajos realizados han sido sobre la biología y el comportamiento de la especie en condiciones de cultivo, las cuales se han llevado a cabo en el CIAD A.C. Mazatlán. Desde entonces, se han realizado estudios sobre la parasito-fauna de la especie, cultivo de larvas, nutrición y reproducción en cautiverio.

Se ha observado que estos animales albergan una alta diversidad de parasito-fauna por lo que al principio se tuvieron muchos problemas con los reproductores debido principalmente la presencia de ectoparásitos. Fájér y Chávez (1999) identificaron tres especies y dos géneros de parásitos los cuales se encontraron en piel, branquias, mesenterio, epitelio de la vejiga natatoria, intestinos, gónadas y aletas. En los cortes histológicos se encontraron organismos de la familia Trypanosomatidae en el riñón, hígado y branquias. Los síntomas más obvios fueron hemorragias y zonas erosionadas de la piel.

Moravek y Fájér (2000), encontraron que los huevos de los nemátodos encontrados en el epitelio de la vejiga natatoria pertenecen a una nueva especie a la que diagnosticaron, describieron y denominaron con el nombre científico de *Huffmanella mexicana*. Por otro lado Ho *et al.* (2001) describieron otra nueva especie de copépodo parásito en botete diana denominado *Lepeophtheirus simplex*. Se determinó la prevalencia y abundancia de monogeneos de la clase Tremátoda al igual que se describieron las lesiones asociadas al parasitismo branquial en donde las cantidades más altas se encontraron con temperaturas del agua entre 24-25.5 °C

(Contreras y Fajer, 2001). Fájér *et al.* (2001) estudiaron el efecto de la formalina en el botete diana para su posible uso contra ectoparásitos encontrando que las concentraciones efectivas para los parásitos estudiados se encuentran muy alejadas de la concentración letal media para el botete, por lo cual hace factible su uso en el control de este tipo de parasitosis.

Recientemente otra nueva especie de parásito ha sido descrita por Dykova *et al.*, (2002) nombrada *Kudoa diana* (Myxosporea: Multivalvulida) del cual aún se desconoce el ciclo de vida. Todos estos estudios han ayudado a que se haya cerrado el ciclo de producción de la especie y actualmente están enfocados en el mejoramiento y perfeccionamiento de las técnicas de control de enfermedades principalmente en los puntos críticos del ciclo para eficientizar su potencial de cultivo y que sea de interés para el sector productivo.

Con respecto al cultivo larval, Martínez *et al.* (2002) describieron por primera vez el desove, el desarrollo larval y juvenil, el destete y el crecimiento temprano de la especie en cautiverio. Se utilizaron tanques de un metro de diámetro y 90 cm. de profundidad, con agua de mar estática con aireación a 34 ‰ y 27 °C con fotoperiodo ambiental. El intervalo de incubación (fertilización hasta eclosión) encontrado fue de entre 65 y 90 hrs. en donde para este último tiempo, había eclosionado el 100 %. En este mismo estudio se encontró que el desove manual de los peces silvestres y la obtención de esperma resulta relativamente fácil si son capturados en la época de reproducción y se seleccionan los organismos totalmente maduros.

Abdo *et al.*, (2001) realizó un estudio sobre el cultivo larvario del botete diana en condiciones de laboratorio en el cual describe el desarrollo temprano de huevos y larvas lo que le permitió elaborar un protocolo para su incubación y

crecimiento. Encontró valores de fertilización de $97.61 \pm 2.65 \%$. El periodo de incubación varió entre 72 y 92 horas post fertilización, momento en el cual empezaron a eclosionar las larvas. Durante este periodo la temperatura aumentó de 24.5°C a 27.5°C .

Martínez *et al.* (2000) llevaron acabo un estudio sobre el efecto de diferentes tratamientos alimenticios sobre la sobrevivencia y crecimiento de larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) en tres diferentes tipos de agua (agua de mar, de mar filtrada y agua de mar filtrada y pasada por UV), concluyendo que estos diferentes tratamientos no influyen en el crecimiento y sobrevivencia de las larvas y que estas pueden desarrollarse con cualquiera de las dos especies de microalgas (*Isochrysis* sp. y *Nanochloropsis* sp. 50,000 cel/ml de cada una) y rotíferos utilizados (*Brachionus plicatilis* 15 org/ml).

García-Ortega *et al.*, (2001) realizaron un experimento sobre el destete de larvas de *Sphoeroides annulatus* con micro-dietas a partir de nauplios de *Artemia* sp. como alimento vivo en donde concluyen que se puede realizar el destete al 29^{vo} día posterior a la eclosión y posiblemente antes sin alterar considerablemente el desarrollo y la sobrevivencia final.

El botete diana al igual que otras especies tiene problemas para desovar de manera natural en cautiverio. Incrementos en los volúmenes de esperma han sido observados por Rodríguez y Duncan (2001) al evaluar el efecto de la hormona LHRHa en la calidad del esperma del botete diana. Los incrementos en los intervalos totales de volumen de esperma de los machos, mantuvieron la calidad espermática (motilidad, concentración y tasa de fertilización) observada en los grupos de control, sin inyección y con inyección de solución salina. En este mismo estudio se evaluaron

diferentes parámetros de calidad de esperma (porcentaje de motilidad, tiempo máximo de actividad del esperma a 1,5,15 y 30 minutos), encontrando diferencias significativas entre el porcentaje de esperma activado, siendo la mejor dilución 1:100 ($82.06 \pm 2.24\%$). Encontró que el esperma podía ser utilizado sin observar diferencias significativas de fertilización hasta 30 minutos después de haber sido obtenido y que no hay diferencia significativa en calidad entre el semen obtenido de peces inducidos y el de peces no inducidos. Duncan *et al.* (2003) realizó experimentos de inducción a la maduración final y desove en hembras. Tres grupos en total fueron analizados, dos tratamientos con hormona LHRHa (múltiple inyección e implantes de liberación prolongada co-polímero de Acetato de Vinil Etileno "EVACs") fueron utilizados además de un grupo control inyectado con solución salina. El grupo inyectado con el implante EVAc liberó progresivamente la hormona (LHRHa) a una concentración diaria de $75\mu\text{g}$ por pez $<800\text{g}$ o $150\mu\text{g}$ por pez $>800\text{g}$ y fue administrado una sola vez. El protocolo de inducción para el grupo inyectado fue el siguiente: día 0- $20\mu\text{gKg}^{-1}$, día 2- $40\mu\text{gKg}^{-1}$, día 4- $80\mu\text{gKg}^{-1}$, día 6- $160\mu\text{gKg}^{-1}$. El grupo control también recibió las inyecciones de solución salina los días 0,2,4 y 6. Un total de 82% de los peces tratados con hormona de ambos grupos desovaron durante la primera semana de aplicación comparado con 18% del grupo control. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los parámetros de calidad evaluados (diámetro, fertilización y fecundidad) entre los 3 tratamientos. Aproximadamente 50% de los peces desovaron después de la segunda inyección con hormona, y se sugiere que una primera dosis de hormona ($20-40\mu\text{gKg}^{-1}$) seguida por una segunda dosis ($40-80\mu\text{gKg}^{-1}$) son suficientes para que un alto porcentaje de los peces a inducirse desoven huevos de buena calidad. Este protocolo ha sido utilizado

desde entonces como método de inducción artificial con el cual se pueden programar desoves de botete diana en estadios finales de maduración durante la temporada de reproducción.

Komar (2001) realizó un estudio sobre distintos tratamientos de agua en la incubación de los huevos del botete diana (*Sphoeroides annulatus*). Los distintos tratamientos consistieron en incubadoras con flujo estático, de recirculación y estático con aireación, todas con y sin agua previamente filtrada con UV. Se encontró que las mejores condiciones de incubación probadas correspondían a las incubadoras (Botellas de agua de 2 lts. volteadas de cabeza con 1500 ml de agua) con agua de mar filtrada a 5 μm y pasado por UV, el agua se mantenía estática (sin recambios) y con aireación. Además describió el desarrollo embrionario de la especie y realizó un estudio de la carga bacteriana en los diferentes sistemas de incubación probados, encontrando que las incubadoras con sistema de flujo continuo tenían mayores concentraciones de bacteria que las estáticas y a su vez las estáticas sin aireación presentaban mayores concentraciones que sus contrapartes con aireación. Además las incubadoras estáticas con o sin aireación pero con tratamiento UV siempre tenían menor carga bacteriana que las que no tenían el tratamiento UV. El mejor sistema incubador encontrado fue el estático con aireación y tratamiento UV el cual tuvo la eclosión más alta de $87 \pm 3.5\%$.

1.4.3 Potencial para la Acuicultura

La principal característica de una especie con potencial acuicultural es su demanda, seguida por las facilidades de la especie a reproducirse en cautiverio, tener una buena (alta) densidad de cultivo y una tasa de crecimiento relativo alto. Ya en la

sección 1.4.1 se describe el mercado regional que tiene la especie así como su importancia potencial a nivel exportación, principalmente a oriente. Martínez *et al.* (2002) menciona la posibilidad de considerar el cultivo de botete como alternativa regional al cultivo de camarón e inclusive propone la posibilidad de desarrollar un policultivo camarón/botete.

Los estudios previos alientan el seguimiento de la investigación de la especie. Los principales logros hasta el momento han sido la inducción hormonal de reproductores y la obtención de desoves programados (Duncan *et al.*, 2003, Martínez *et al.*, 2002), desarrollo de protocolo de incubación, crecimiento y destete temprano de larvas obtenidas de peces silvestres (Abdo *et al.*, 2001, García-Ortega *et al.*, 2001).

El presente trabajo pretende evaluar la condición de los reproductores en cautiverio *versus* reproductores silvestres y determinar el periodo post-ovulatorio óptimo para la fertilización de los huevos de botete diana. Los resultados están encaminados a determinar la viabilidad de utilizar hembras de botete diana como reproductores. Ampliará el conocimiento sobre las primeras etapas de desarrollo de la especie e incubación los cuales son de suma importancia para el abastecimiento de crías de buena calidad para la engorda y el desarrollo de técnicas para el cultivo a escala comercial.

2. PLANTEAMIENTOS

2.1 Hipótesis.

- a) No existen diferencias significativas en la fecundidad y calidad de huevo (tasa de fertilización, diámetro de huevo, simetría de las primeras divisiones, tiempo de incubación y tasa de eclosión) de reproductores del botete diana (*Sphoeroides annulatus*) procedentes del medio silvestre y los mantenidos en cautiverio.
- b) Existe un periodo post-ovulatorio en el cual los huevos tienen la viabilidad o sobrevivencia más alta.

2.2 Objetivos generales.

- Comparar distintos parámetros de calidad de huevos de reproductores de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) silvestres y mantenidos en cautiverio.
- Examinar los efectos en la fertilización y sobrevivencia (48 horas) de distintos periodos post-ovulatorios en los huevos de botete diana.

Objetivos específicos:

Comparar la fecundidad y los siguientes parámetros de calidad de huevos:

- Tasa de fertilización
- Diámetro de huevo
- Simetría de las primeras divisiones
- Tasa de eclosión

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los bioensayos fueron efectuados en el laboratorio de reproducción del CIAD Mazatlán durante el periodo de reproducción de la especie (Abril-Junio de 2002) la cual coincide con la temporada de pesca regional.

3.1 Preparación y condiciones de reproductores

3.1.1 Obtención de reproductores en cautiverio

Los reproductores (machos y hembras) en cautiverio seleccionados para el experimento fueran traídos del medio silvestre con un año de anticipación al experimento. Fueron escogidos en esa ocasión por su madurez sexual y apariencia general. Algunos de estos peces desovaron natural o inducidamente durante la temporada de reproducción anterior a la de los experimentos.

3.1.2 Captura y acondicionamiento de peces silvestres

Se programaron cinco salidas a lo largo de la temporada de reproducción para traer los organismos silvestres. Las fechas de las salidas fueron 3 y 17 de abril, 17 y 24 de mayo y 4 de junio. Los animales fueron capturados con anzuelo por pescadores de Teacapán a bordo de pangas con motor fuera de borda. El criterio de selección de los reproductores incluyó la revisión de madurez gonadal, tamaño, apariencia general y biopsias de los machos calculando la cantidad de esperma posible a obtener. Los animales fueron sacados del agua y puestos en tinas con agua de mar y oxigenación, para posteriormente ser llevados a tierra y enviados al CIAD en un tanque de 400

litros con oxigenación y hielo. Se trajeron alrededor de 20 animales por viaje, entre hembras y machos.

3.1.3 Mantenimiento de los reproductores.

Los reproductores se mantuvieron en tanques de 3 metros de diámetro por 80 cm de altura. Los tanques de ambos grupos de reproductores tuvieron el mismo flujo continuo de agua de mar bombeada desde la playa y previamente filtrada a 20 μ m, así como la misma tasa de recambio. A los tanques de todos los grupos de reproductores se les cepilló y succionaron los restos de comida y heces y por lo menos una vez a la semana se les vació el tanque y se limpió para eliminar suciedad, restos de comida y algas. Para evitar la contaminación cruzada de parásitos y enfermedades, cada tanque contó con su propio cepillo de limpieza, las redes y cubetas usadas fueron desinfectadas con cloro previamente a su utilización en cada tanque.

3.1.3.1 Reproductores en Cautiverio

Durante el año previo a los experimentos, los reproductores en cautiverio se encontraron separados equitativamente en dos tanques.

Estos animales estuvieron alimentados con diferentes dietas experimentales lo cual determinó su estado nutricional y en consecuencia pudo influenciar en la calidad de los huevos obtenidos. A continuación se presentan las diferentes dietas y sus contenidos suministrados hasta el termino del experimento. En el primer tanque (T1) se encontraban los organismos que no desovaron con éxito el año anterior, el

segundo tanque (T2) se encontraban los inducidos y desovados con éxito, ambos tanques tuvieron la misma dieta (D1) durante el periodo abril-diciembre 2001.

La dieta D1 estuvo basada en alimento peletizado formulado en el CIAD por el laboratorio de Nutrición (Tabla II) el cual constituyó el 50% de la dieta. El otro 50 % lo constituyó un alimento para reproductores de trucha (El Pedregal Silver Cup, Tabla III). La ración total de la dieta constituyó entre el 1-2 % de la biomasa de cada tanque. Esta cantidad fue dividida y proporcionada dos veces al día. La biomasa fue obtenida pesando los animales aproximadamente cada mes para modificar las raciones.

Tabla II.- Alimento CIAD para reproductores de botete diana en cautiverio.

Ingredientes	%	Composición Nutricional	Valor
Harina de Pescado	35	Proteínas	42%
Pescado fresco	15	Lípidos	14%
Calamar fresco	15	Energía	460 Kcal
Dextrina	19	Mezcla Vitamínica*	3%
Harina de Trigo	3	Mezcla de Minerales**	3%
Lípidos	5	*Carosen, Bayer®, Mex. **Superbifos, Bayer®, Mex.	
Vitaminas	3		
Minerales	3		
Aglutinante	2		

Tabla III.- Alimento para reproductores de trucha suministrado a reproductores de botete diana

*El Pedregal Silver Cup (alimentos acuícolas)	Peletizado Sumergible de ¼"
Proteína 45 %	L.A.B. Planta Toluca
Grasa 10 %	Fax (7) 215-71-02
	E-mail: jalmazan@netspace.com.mx

Al T1 se le siguió dando la misma dieta (D1) hasta el termino del experimento, pero T2 recibió una variación (Dieta 2) los siguientes seis meses (enero-junio 2002) previo y durante los experimentos. Esta nueva dieta (D2) constó de alimento formulado por el CIAD y cubrió el 50% de la misma, el otro 50% de la dieta lo complementó una dieta comercial enriquecida para reproductores de peces marinos (*INVE Lansy Breed® Tabla IV). Además a ambos tanques (T1 y T2) se les suministró una dieta complementaria la cual consistió de calamar fresco picado suministrado una vez al día. La ración de esta dieta también representó el 1-2 % de la biomasa de cada tanque. A partir de este cambio de alimento, el recambio de agua utilizado diario para todos los tanques fue de 155%.

Tabla IV.- Composición de alimento para reproductores de peces marinos INVE (Lansy Breed).

Lansy Breed®	
Proteína	> 45 %
Lípidos	> 16 %
N3 HUFA (mg/g DW)	> 40 %
EPA (20:5w3)	> 13
DHA (22:5w3)	> 26
Carbohidratos	<15 %
Ceniza	< 15 %
Humedad	< 9 %
Vit A (IU/kg DW)	> 10,000
Vit D3 (IU/kg DW)	> 2,000
Vit E (mg/kg DW)	2,500
Vit C (mg/kg DW)	4,500
*INVE Aquaculture	México S.A. de C.V.
Tel. 669-901003	Fax. 669-901006

3.1.3.2 Reproductores Silvestres

Una vez llegados a la Unidad a los reproductores silvestres, se les ofreció alimento fresco (calamar picado) el cual empezaron a aceptar aproximadamente a los 2 días de su llegada. Cada lote de peces silvestres no fue utilizado al menos una semana después de su llegada, periodo en el cual se aclimataron y se les dieron baños antiparásitos. Tales baños al igual que los proporcionados con regularidad a los reproductores de cautiverio, constaron en inmersiones de agua dulce por periodos de 2 hrs.

3.2 Inducción artificial para el desove

Se utilizó la técnica de inducción al desove implementada por Duncan *et al.* (2003) que comprende la inyección de una cantidad (Tabla V) de hormona LHRHa al pez para inducir a su maduración final y ovulación. Esta metodología solo es funcional cuando el promedio de la muestra ($n=20$) de los ovocitos tenga un tamaño promedio de al menos 0.5 mm de diámetro. Para verificar esto, se hicieron biopsias de las hembras para seleccionar las adecuadas para la inducción. Estas biopsias (Fig. 3) constaron de la extirpación de pequeños fragmentos de gónada con una cánula de plástico flexible de diámetro interno de 1mm, que posteriormente fueron puestas en láminas histológicas y cubiertas con una solución aclaradora YBAG/85 (Rodríguez, 1992). Después de unos segundos fueron vistas al microscopio, se tomaron 20 muestras al azar y el diámetro promedio fue evaluado al igual que la posición del núcleo (centro o migrando) para considerar la inducción de cada hembra. La hormona utilizada fue des-Gly¹⁰[D-ala⁶]- Lutenizing Hormone Releasing Hormone Ethylamine (Sigma, USA).



Figura 3.- Biopsias realizadas canulizando las hembras de botete diana (*Sphoeroides annulatus*) por el oviducto y extrayendo ovocitos.

3.2.1 Anestesia

Con la finalidad de reducir el estrés y facilitar el trabajo, se usó anestesia para adormecer al pez antes de cualquier manipulación, ya sea pesado, medición, biopsias, inyecciones, etc. El anestésico fue una solución de agua de mar con 2-phenoxyethanol (Sigma, USA) a 0.5 ml/l. El tiempo de duración en la solución dependió de la reacción de cada pez pero tuvo un promedio de 1 minuto.⁷

3.2.2 Protocolo de inducción

Antes de inyectar a las hembras, su peso fue tomado para conocer la cantidad de hormona a inyectarse. La inyección fue puesta intramuscularmente en el área dorsal usando una jeringa de insulina de 1ml. El protocolo de inyección está resumido en la Tabla V.

Tabla V.- Protocolo de inyección de LHRHa usado en experimentos de evaluación de calidad de huevo en botete diana

Proceso	Tiempo	Acción
Primera Inyección	0	20 µl/kg. de pez
Segunda Inyección	48 horas	40 µl/kg. de pez
Ovulación	≈68-72 horas	Desove manual del pez

3.3 Identificación de Hembras

Para identificar a los organismos, en este trabajo se utilizan las palabras tratamiento o grupo indistintamente para referirse al origen de la hembras, ya sean silvestres o en cautiverio.

Para cada experimento y sus réplicas se inyectaron dos hembras por tratamiento (silvestre y cautiverio) para asegurar que por lo menos una hembra de cada tratamiento desovara. Después de la primera inyección, las hembras fueron puestas en un tanque separado e identificadas de acuerdo a una descripción básica de tamaño, forma, color y patrones en la piel además de un marcaje con microchip insertado debajo de la piel y/o intramuscularmente el cual consta de un código único para cada hembra y es leído por un lector electrónico "Destron Fearing USA". Esto sirvió para identificar a las hembras al momento de hacer las revisiones y no confundirlas a la

hora de los desoves ni en futuros experimentos, pudiendo llevar así un seguimiento de peso y estatus de cada hembra.

3.4 Selección de machos

Una vez sexualmente maduros, los machos de botete diana tienen una producción continua de semen durante la temporada de reproducción, (Komar, 2001). Se utilizó un macho silvestre para fertilizar las hembras (de ambos tratamientos) de cada replica de los experimentos. El criterio de selección de los machos dependió del porcentaje de espermatozoides móviles y su duración. Para esto, se tomó una gota de esperma y se le añadió una gota de agua de mar para activarlo. Inmediatamente después se observó al microscopio compuesto "Cole & Palmer" con un objetivo 400x. El porcentaje de motilidad fue estimado del campo observado (Rodríguez, 1992). El tiempo de duración fue evaluado tomando como inicio el tiempo de activación (adición de agua) y terminando al mismo tiempo que el porcentaje de motilidad. Se tomó el tiempo de inicio (activación del esperma con agua de mar) con un cronómetro digital "SPER SCIENTIFIC Taiwán" el cual se detuvo una vez que se observó que el esperma dejara de desplazarse a través del campo visual en su totalidad. Para cada macho utilizado, el porcentaje debió ser igual o mayor al 90% con un tiempo de motilidad mayor a 50 segundos.

3.5 Experimento # 1

El experimento constó de dos tratamientos o grupos: huevos fertilizados de reproductores silvestres y de cautiverio. El experimento se repitió un total de cinco veces a lo largo de la temporada reproductiva, las fechas de los experimentos estuvieron entre el 11 de abril y el 7 de junio de 2002.

Las hembras fueron monitoreadas cada hora durante todo el día de desove para conocer la hora de ovulación (determinada por el desprendimiento de los primeros huevos del estroma hacia fuera del oviducto naturalmente o por presión abdominal). Una vez ovulada la hembra se hicieron los preparativos para el desove y se seleccionó el macho a utilizarse en ambos tratamientos.

Una vez desovados los huevos manualmente y obtenido el esperma del macho, se procedió a pesar los huevos para calcular la fecundidad relativa como lo indican Duncan *et al.* (2003) para posteriormente fertilizarlos. Todos los huevos usados de cada hembra fueron fertilizados en un periodo entre una y dos horas y media de haber sido ovulados. La fertilización se hizo con 2 ml de esperma del mismo macho obtenidos previo a cada desove. Una vez fertilizados, se pusieron aproximadamente 50 huevos en cada lámina (4 láminas en canastas de plástico por incubadora) obteniendo 10 incubadoras para cada tratamiento con aproximadamente 200 huevos cada una.

3.5.1 Muestreo de huevos

Cada incubadora fue manipulada solo dos veces: una al principio cuando se pusieron las canastas con los huevos y la otra al final cuando se retiraron para hacer

el muestreo, después de esto cada incubadora no fue utilizada hasta el próximo experimento.

Una vez completadas las incubadoras con huevos, otra porción de huevos fue tomada y de ésta se seleccionaron 3 muestras de 50 huevos al azar durante el primer par de horas post-fertilización (estadio en la cual el huevo del botete se encuentra en el tercer plano de división celular generando 8 blastómeros), de los cuales se obtuvieron datos de fertilización y 3 muestras de 20 huevos para el diámetro y porcentaje de huevos con blastómeros simétricos, para cada tratamiento.

3.5.2 Incubación

El sistema incubador fue puesto en un cuarto con aire acondicionado (YORK 2 Ton.) dentro del laboratorio de producción de larvas del CIAD con el fin de mantener la temperatura lo más constante y homogénea posible. El fotoperiodo fue de 12 hrs. controlado automáticamente con un temporizador.

El sistema incubador a utilizarse fue el mismo utilizado y hecho por Komar (2001) con algunas variantes (Fig. 4).



Figura 4. - Sistema incubatorio de huevos de botete diana (*Sphoeroides annulatus*).

El experimento constó de 10 incubadoras por tratamiento. Las 20 incubadoras fueron construidas con botellas de agua de marca conocida de 2 lt aproximadamente, recortadas de la base y puestas de cabeza sobre una estructura de madera. Estas se llenaron con 1.5 lts. de agua de mar previamente filtrada a $5\ \mu\text{m}$ y tratada con dos lámparas de UV General Electric 50 Watts. La aireación fue suministrada por una manguera de aire insertada en la tapa de cada botella con burbujeo constante (100 ml/min. aprox.). Cada manguera tuvo un microfiltro de aire de $1\ \mu\text{m}$ para detener partículas y microorganismos provenientes del soplador. La estructura con las incubadoras se encontraban en una tina con agua de mar con flujo continuo (y constante durante todos los experimentos) que mantuvo la temperatura ambiental de las incubadoras homogéneamente a temperatura ambiente. Se tomaron al inicio y al

final de la incubación la temperatura (T^0), salinidad (S‰) y oxígeno disuelto (OD) de cada incubadora con un oxímetro manual YSI (Modelo 55/12 ft) y un refractómetro de mano Fisher con compensación automática de temperatura (CN:13-946-27) y diariamente a la misma hora se tomaron datos de la temperatura máxima y mínima dentro del baño con un termómetro de mercurio Scienceware (-20 a 50 °C). Las 20 incubadoras fueron distribuidas al azar y marcadas por tratamiento del 1 al 10 para identificarlas a la hora del muestreo.

3.5.2.1 Muestreo de incubadoras

Las incubadoras marcadas como uno para ambos tratamientos fueron muestreadas entre las 18 y 22 horas post-fertilización en donde se contó el número de embriones vivos y muertos con la finalidad de tener datos de sobrevivencia a ese tiempo, en el mismo momento se hizo una descripción general del estado de desarrollo embrionario.

Las incubadoras marcadas como 2 para ambos tratamientos fueron muestreadas el primer día de eclosión el cual estuvo definido por la aparición de las primeras larvas. En este muestreo se contaron el número de embriones vivos y muertos de cada lámina así como el número de larvas eclosionadas. La incubadora 3^o se muestreó aproximadamente a las 12 hrs. después de que empezaron a eclosionar las larvas y así consecutivamente cada 12 hrs. (incubadoras 4^o, 5^o, 6^o y 7^o) hasta que no hubiera embriones vivos en las láminas o hubieran uno o dos en las 4 láminas, es decir que hubieran eclosionado el mayor porcentaje.

3.5.2.2 Obtención de datos de eclosión

Una vez que se observó que la eclosión se había completado, se muestrearon el resto de las incubadoras, estas variaron entre 3 y 7 dependiendo de el tiempo de desarrollo y periodo de eclosión de cada lote de huevos. Todas estas incubadoras se usaron como réplicas de la eclosión final y fueron usadas para obtener los porcentajes de eclosión total de cada repetición del experimento.

Después de cada muestreo las incubadoras fueron desocupadas y limpiadas. Los huevos sobrantes de cada incubadora después de cada muestreo no fueron utilizados durante el resto del experimento. Una vez terminado cada experimento se volvieron a seleccionar nuevas hembras con el fin de inducirlas a la maduración final y ovulación para repetir el experimento.

3.6 Experimento # 2

Para este experimento el cual fue al final de la temporada y el último par de desoves exitosos; se usó una hembra de cada tratamiento o grupo. Ambas hembras sufrieron el mismo protocolo de inducción que las del experimento #1 (sección 3.2.2). Se llenó un tanque de 400 lts. previamente con agua de mar filtrada de la misma manera que el experimento # 1 y se le puso una piedra con aireación al centro la cual tenia un efecto de recirculación. Una vez inyectadas, se monitorearon para determinar la hora exacta de ovulación la cual fue denominada tiempo 0.

La fertilización también se hizo de la misma manera, con la variante que si se utilizó el esperma del mismo macho para ambas hembras. El esperma fue sacado previo a cada fertilización.

A partir este momento (tiempo 0), a cada hora se anestesió, se peso y se hizo un desove manual de las hembras para obtener aproximadamente 20g de huevos para fertilizar y fijarlos en seis laminillas que a su vez fueron puestos en el fondo del tanque. Tres de estas laminillas fueron revisadas para la fertilización aproximadamente a las dos horas post-fertilización ya que alrededor de este tiempo el huevo se encuentra alrededor de las 4ta y 8va división celular (Komar, 2001) y es más sencillo determinar los huevos que no fueron fertilizados. Las otras tres laminillas restantes fueron revisadas para la sobrevivencia a las 48 hrs. post fertilización, momento en el cual el embrión se encuentra en su ultima fase de desarrollo, empieza a pigmentarse y a latir el corazón (Komar, 2001). Este procedimiento se hizo a cada hora hasta que las hembras desovaron completamente por sí mismas.

3.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron hechos con el programa SigmaStat para Windows Versión 2.03 (1992-1997 SPSS Inc.) y en Microsoft Excel 2000 versión 9.0.2812. Las graficas presentadas fueron realizadas en Excel y STATISTICA (data analysis software system), versión 6. www.statsoft.com en StatSoft, Inc. (2001). Los datos referentes a porcentajes fueron transformados a arcoseno; una variación ligeramente modificada de Freeman y Tukey 1950 (*citado en*: Zar J., 1999). Se hicieron pruebas de normalidad y homocedasticidad por Kolmogorov Smirnov y χ^2 de Bartlett respectivamente. Los datos normales se compararon por pruebas t y los no normales por U de Mann-whitney. Los diámetros de huevo fueron comparados por un ANOVA anidado doble Modelo III (mixto) para diámetros y los

porcentajes de eclosión por un ANOVA de dos vías y utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para el segundo experimento, los análisis fueron hechos en Microsoft Excel. Se hicieron regresiones entre el tiempo pos-ovulatorio contra el porcentaje de fertilización y porcentaje de sobrevivencia. Además se obtuvo el coeficiente de determinación para cada regresión. Todos los resultados son presentados como (Promedio $\pm$ DE).

4. RESULTADOS

Las hembras seleccionadas para cada experimento fueron inyectadas un viernes y domingo de cada semana con el fin de que el desove tuviera lugar cada lunes. Algunas hembras no desovaron al ser inducidas y no se pudieron realizar más réplicas de ambos experimentos.

4.1 Experimento # 1

4.1.1 Peces

Los peces en cautiverio utilizados en el experimento 1 provinieron de dos tanques con diferentes dietas (D1 y D2) descritas en la sección 3.1.3. La primera réplica de los peces en cautiverio correspondió a una hembra del segundo tanque (sección 3.1.3.1). Después de haber corrido la primera réplica, los peces del segundo tanque murieron a causa de una infección provocada por el parásito *Heterobothrium ecuadori*, por lo que las demás réplicas de organismos en cautiverio utilizadas correspondieron solo a hembras del primer tanque (T1).

4.1.2 Parámetros físicos y biológicos

4.1.2.1 Salinidad

Este parámetro se obtuvo al inicio y al final de cada réplica de incubación, y fluctuó entre 34 ‰ y 36 ‰ aumentando durante y hacia el final de la temporada.

4.1.2.2 Temperatura

La temperatura durante los diferentes experimentos aumentó conforme transcurría la temporada de reproducción teniendo un intervalo entre 26°C al inicio

del experimento y 29°C hacia el final del mismo (inició y final de temporada respectivamente). Sin embargo, durante la incubación de los diferentes lotes de huevos de cada pareja de hembras (silvestre y cautiverio), la variación máxima que hubo fue de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.1.2.3 Oxígeno disuelto (OD)

El flujo de aire para cada incubadora se calibró a 100 ml/min y varió ligeramente durante la incubación. El valor más alto de oxígeno encontrado al inicio del periodo de incubación para todas las réplicas fue de 5.7 mg/l OD mientras que el más bajo encontrado al final de todas las réplicas fue de 2.55 mg/l OD. La media encontrada para todas las incubadoras fue de $4.56 \pm .7236$.

No se encontraron diferencias significativas $P = 0.498$ entre las medias de oxígeno de ambos grupos 4.519 ± 0.298 y 4.686 ± 0.434 silvestres y de cautiverio respectivamente (Tabla VI). Sin embargo, se deben considerar los datos con reserva debido a que el poder con que se realizó esta prueba (0.050) se encuentra por debajo del valor deseado de 0.8.

Tabla VI.- Análisis t para los niveles de OD en las incubadoras de huevos silvestres y de cautiverio de botete diana.

Fuente de Variación	N	gl	Media	Desviación Estándar	Resultado ($P < .05$)
OD Silvestres	5	8	4.519	0.298	0.498
OD Cautiverio	5	8	4.686	0.434	

4.1.2.4 Bacterias

No se desarrollaron colonias bacterianas en ninguna de las incubadoras que pudieran haber afectado el desarrollo natural de los embriones, solo un par de incubadoras registraron pequeños rastros de colonias de bacterias color rosa, sin embargo los resultados obtenidos de esas incubadoras fueron similares a las demás.

4.1.2.5 Longitud

No se encontraron diferencias significativas $P = 0.690$ entre las longitudes de ambos grupos 32.320 ± 0.766 cm. y 31.820 ± 2.594 , silvestres y de cautiverio respectivamente (Tabla VII). Sin embargo los datos se deben considerar con reserva debido a que el poder con que se realizó esta prueba (0.050) se encuentra por debajo del valor deseado de 0.8.

Tabla VII.- Análisis t para medias de las longitudes de hembras utilizadas en ambos grupos de botete diana.

Fuente de Variación	N	gl	Media	Desviación Estándar	Resultado ($P < .05$)
Longitud (cm.) Silvestres	5	8	32.320	0.766	0.690
Longitud (cm.) Cautiverio	5	8	31.820	2.594	No existe diferencia significativa

4.1.2.6 Fecundidad

En la Tabla VIII se muestran las parejas de hembras utilizadas en cada réplica. Los valores máximos y mínimos de peso fueron 601.9 gr. y 1,263 gr. El resto de los valores dentro de este intervalo fueron mas homogéneos. Los números

máximos y mínimos de número de huevos encontrados para las hembras de ambos grupos fueron 425,000 y 1'630,800 y no correspondieron a los pesos extremos.

Tabla VIII.- Caracterización física y reproductiva de las hembras de botete diana utilizadas en el experimento # 1.

Hembra (gpo)	Longitud cm.	Peso gr.	Fecundidad (# total de huevos)	Fecundidad Relativa
Silvestre 1	33.3	893.7	942,586	1054.700
Cautiverio 1	35.6	1,263	696,528	551.486
Silvestre 2	31.7	709.3	1'024,988	1445.069
Cautiverio 2	32.1	886.8	1'630,800	1838.971
Silvestre 3	32.6	799	986,420	1234.568
Cautiverio 3	31.5	862	914,500	1060.904
Silvestre 4	31.4	849.6	506,258	595.878
Cautiverio 4	31.6	789	490,364	621.500
Silvestre 5	32.6	902	425,000	471.175
Cautiverio 5	28.3	601.9	525,594	873.224

Se realizó una regresión lineal con la finalidad de encontrar alguna correlación entre el peso de las hembras y el número de huevos producidos (Figura 5). El coeficiente de determinación $r = 0.0372$ y $r^2 = 0.00138$ fueron muy bajos, por lo que no se encontró ninguna correlación entre ambos parámetros.

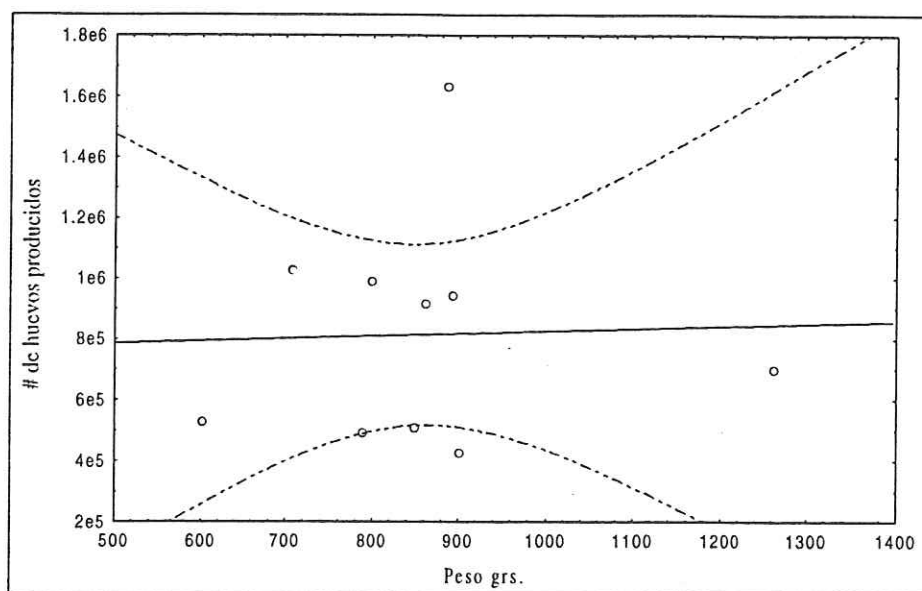


Figura 5.- Regresión lineal entre peso de hembras utilizadas y # de huevos producidos.

No se observó diferencia significativa entre las medias (960.278 ± 415.687 y 989.218 ± 516.599) de los animales silvestres y los de cautiverio respectivamente ($P = 0.925$) ver Tabla IX. Esto significa que no hubo diferencia significativa entre la razón número total de huevos / peso hembra entre los dos grupos. Los datos deben tratarse con reserva debido a que el poder con que se realizó esta prueba (Poder = 0.050) se encuentra por debajo del valor deseado de 0.8.

Tabla IX.- Análisis t para la fecundidad relativa de ambos grupos.

Fuente de Variación	N	gl	Media	Desviación Estándar	Resultado ($P < .05$)
Fecundidad Relativa Silvestres	5	8	960.278	415.687	0.925
Fecundidad Relativa Cautiverio	5	8	989.218	516.599	No existe diferencia significativa

4.1.2.7 Porcentaje de fertilización

No se encontró diferencia significativa ($P = 0.520$) entre los promedios de fertilización de ambos grupos 95.200 ± 5.596 y 93.867 ± 5.153 ; silvestre y cautiverio respectivamente (Tabla X).

Tabla X.- Prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para fertilización entre los huevos del grupo silvestre y de cautiverio.

Silvestre	Cautiverio	N	gl	Resultado ($P < .05$)
95.200 ± 5.596	93.867 ± 5.153	15	28	.520 No existe diferencia Significativa

Consecutivamente, los porcentajes se transformaron y se realizó una prueba de normalidad de mayor nivel de confianza (W de Shapiro-Wilk's) en donde ambos grupos resultaron no normales pero sí homocedásticos por la prueba de Levene. Los datos se transformaron de acuerdo a la ecuación de arcoseno ligeramente modificada de Freeman y Tukey (1950). Esta prueba es específica para valores extremos (bajos o altos) de proporciones (Zar J. 1999). La transformación fue la siguiente:

$$P = \frac{1}{2} \left[\arcsin \sqrt{\frac{x}{n+1}} + \arcsin \sqrt{\frac{x+1}{n+1}} \right]$$

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney a los datos transformados. No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.152$) entre los datos transformados de fertilización de ambos grupos (Tabla XI). El análisis estadístico realizado para los porcentajes y sus transformaciones indica que no existe diferencia

entre la fertilización de ambos grupos. Sin embargo los datos deberán ser tratados con reserva pues el Poder de la prueba es menor a 0.8.

Tabla XI.- Prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para datos transformados de fertilización de ambos grupos.

Silvestre	Cautiverio	N	gl	Resultado ($P < .05$)
48.076 ± 0.328	48.225 ± 0.190	15	28	.152 No existe diferencia significativa

4.1.2.8 Diámetro de huevo

Los diámetros promedio encontrados para ambos grupos fueron 0.716 ± 0.0501 mm y 0.718 ± 0.0427 mm (silvestre y cautiverio respectivamente). Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas ($P = 0.452$) entre los diámetros de las hembras silvestres y las de cautiverio. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($P = 0.466$) entre los diámetros de las distintas hembras de cada grupo (Tabla XII).

Tabla XII.- ANOVA anidado doble Modelo III (mixto) para diámetros de huevos provenientes de hembras silvestres y de cautiverio.

Fte.var.	SC	gl	CM	F	P	Comp.var
Gps. (Silvestre y Cautiverio)	0.000	1	0.000	0.57	0.4525	
Subgps (Individuos)	0.703	8	0.088	1.00	0.4660	56.38 %
Error	0.499	570	0.001			35.65 %
Total	1.299	599				

4.1.2.9 Porcentaje de huevos con blastómeros simétricos

En la Tabla XIII se observa la prueba realizada para comparar los porcentajes de divisiones o blastómeros simétricos de ambos grupos. Se observa una diferencia significativa ($P = 0.046$) de porcentaje de divisiones simétricas entre ambos grupos siendo mayor el silvestre.

Tabla XIII.- Prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para porcentaje de divisiones simétricas entre huevos provenientes de hembras silvestres y de cautiverio.

Silvestre	Cautiverio	N	gl	Resultado ($P < .05$)
96.667 $\pm$ 4.451	94.267 $\pm$ 3.369	15	28	.046 Existe diferencia Significativa

Los datos transformados de este parámetro se compararon (Tabla XIV) encontrando la misma diferencia significativa entre grupos vista en la Tabla XIII.

Tabla XIV.- Prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para datos transformados de porcentaje de divisiones simétricas de ambos grupos.

Silvestre	Cautiverio	N	gl	Resultado ($P < .05$)
48.269 $\pm$ 0.248	48.136 $\pm$ 0.188	15	28	.046 Existe diferencia significativa

4.1.2.10 Periodos de incubación

Los tiempos de incubación se acortaron conforme aumentó la temperatura, teniendo un intervalo entre 92 y 119 horas (4 a 5 días aproximadamente).

No se encontraron diferencias significativas $P = 0.970$ entre las medias de los tiempos de incubación de ambos grupos 111.400 $\pm$ 20.489 horas y 111.000 $\pm$ 10.149 horas, silvestres y de cautiverio respectivamente (Tabla XV). Sin embargo, se deben

considerar los datos con reserva debido a que el poder con que se realizó esta prueba (Poder = 0.050) se encuentra por debajo del valor deseado de 0.8.

Tabla XV.- Análisis t para los tiempos de incubación de huevos silvestres y de cautiverio de botete diana.

Fuente de Variación	N	gl	Media (días)	Desviación Estándar	Resultado (P<.05)
Tiempo. Incubación Silvestres	5	8	4.519	0.298	0.970
Tiempo. Incubación Cautiverio	5	8	4.686	0.434	

4.1.2.11 Porcentajes de eclosión

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.651$) entre los porcentajes de eclosión de ambos grupos; 82.603 ± 16.961 y 83.216 ± 10.100 silvestres y cautiverio respectivamente, sin embargo, se observó una diferencia significativa ($P = 0.001$) entre individuos, por lo que se realizó un análisis de comparación múltiple de Tukey con el fin de identificar las diferencias. El resultado obtenido para grupos deberá ser tratado con reserva debido a que el poder con el que se trabajó la prueba (Poder = 0.05) es menor al deseado (0.8).

Tabla XVI.- ANOVA dos vías para porcentajes de eclosión de lotes de huevos de hembras silvestres y de cautiverio de botete diana.

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	P
Grupos (Silv. Vs. Cau.)	1	14.652	14.652	0.207	0.651
Individuos (Hembras)	4	1640.919	410.230	5.805	<0.001
Grupos x Individuos	4	4829.346	1207.336	17.083	<0.001
Residual	46	3250.987	70.674		
Total	55	10341.049	188.019		

El análisis de comparación múltiple de Tukey se hizo separado, primero por grupo y después por experimento (o parejas de réplicas). En las figuras 6 y 7 se enumeran las hembras o réplicas (1,2,3,4,5) de cada grupo. Las hembras denominadas 1 para ambos grupos fueron pareja del mismo bioensayo, y así consecutivamente las demás. Las diferentes réplicas de este bioensayo se corrieron a lo largo de la temporada de reproducción natural de la especie, por lo que la pareja de hembras 1 corresponden al inicio y la 5 al final de la temporada. Se observa que la hembra 1, 3 y 5 del grupo silvestre no presentaron diferencias significativas, mientras que la hembra 2 y 4 fueron diferentes contra las demás y entre ellas. No se observa ningún patrón de aumento o disminución de porcentajes de eclosión conforme avanza la temporada (Figura 6).

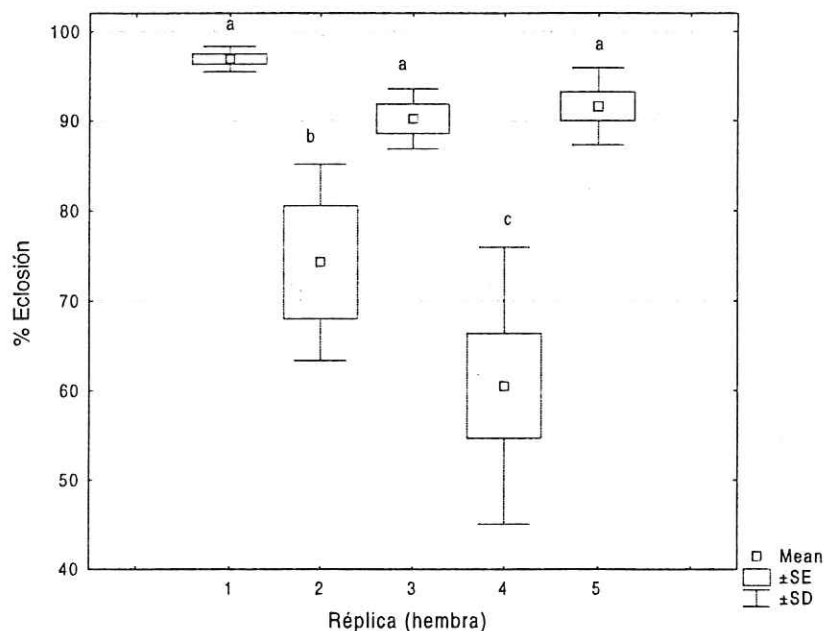


Figura 6.- Porcentajes de eclosión de huevos incubados de hembras silvestres. Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre ambas réplicas.

En el grupo de organismos en cautiverio también es posible distinguir diferencias significativas ($p < 0.05$). El orden o patrón de distribución de las medias es diferente y se observa un aumento en el porcentaje de fertilización a mediados de la temporada (Figura 7).

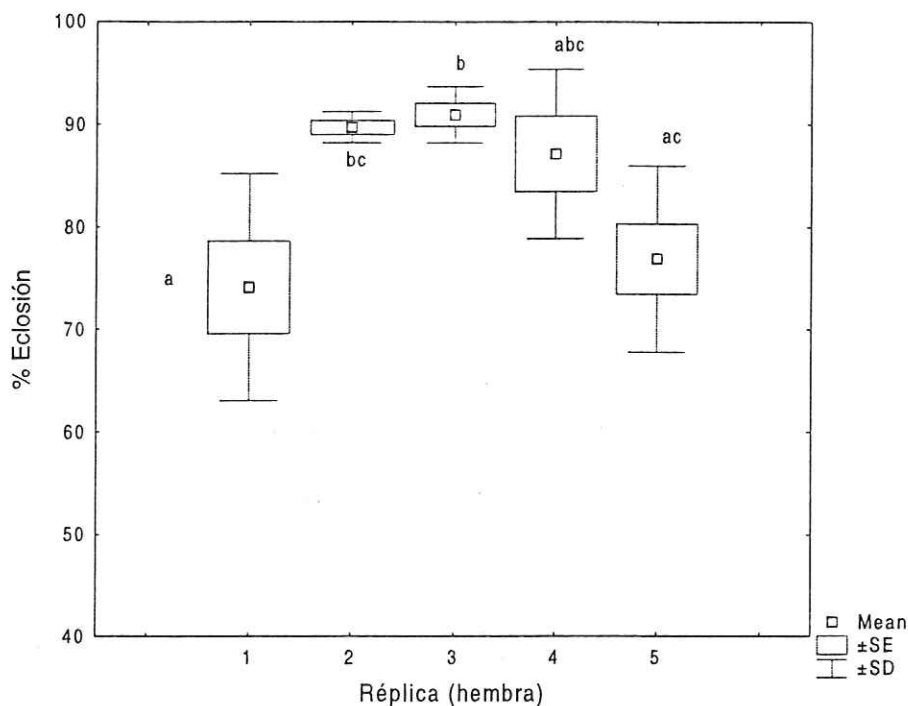


Figura 7.- Porcentajes de eclosión de huevos incubados de hembras en cautiverio. Las letras iguales significan que no existe diferencia significativa entre réplicas.

El análisis de comparación múltiple de Tukey por réplicas (parejas) mostró diferencias significativas entre todas las parejas (silvestres y de cautiverio) con excepción de la réplica 3 donde no se observó diferencia significativa ($P = 0.894$) entre el porcentaje de eclosión de la hembra silvestre y de la hembra de cautiverio.

4.1.3 Correlaciones

Con el fin de encontrar algún parámetro temprano de calidad de huevo en el botete, se hicieron correlaciones entre los parámetros medidos contra el porcentaje de eclosión, el cual es una de las etapas críticas de cualquier cultivo de peces y uno de los primeros parámetros importantes con el que debe contar una especie con potencial de cultivo.

Tabla XVII.- Tabla resumida de correlaciones.

	Fertilización	% Div. simétricas	Diámetro	Fecundidad
Eclosión	$r = 0.2920$ $r^2=0.0852$	$r = -0.4497$ $r^2=0.2022$	$r = -0.4136$ $r^2=0.1710$	$r = .2728$ $r^2=0.0744$
	$p=.029$	$p=.001$	$p=.002$	$p=.042$

	longitud	tiempo Incubación	temperatura	oxígeno
Eclosión	$r = 0.1431$ $r^2=0.0204$	$r = 0.2355$ $r^2=0.0554$	$r = -0.1640$ $r^2=0.0268$	$r = 0.1136$ $r^2=0.0129$
	$p=.293$	$p=.081$	$p=.227$	$p=.4041$

No se observó ninguna correlación con el poder estadístico suficiente que pueda servir como algún predictor de la calidad de huevo en términos de la eclosión (Tabla XVII).

4.2 Experimento # 2

Este experimento fue llevado acabo a finales de la temporada de reproducción. Los máximos y mínimos de temperatura durante las 48 hrs de incubación fluctuaron entre los 27°C y 29 °C. La salinidad fue de 35 ‰ y el fotoperiodo estuvo a 12 horas luz.

Para ambos parámetros (fertilización y sobrevivencia) se hicieron regresiones y ANOVA correspondientes. Las tendencias y ecuaciones fueron polinómicos ya que fueron los valores de tendencia más altos de correlación encontrados.

4.2.1 Fertilización

En los resultados mostrados en la figura 8 se observa claramente que la relación porcentaje de fertilización - horas post-ovulación se mantiene constante para la hembra en cautiverio usada por lo menos hasta las 9 - 10 horas que duró el experimento. El análisis de varianza realizado para la fertilización de la hembra de cautiverio muestra diferencias significativas $P = 0.006$ con un poder alto de 0.997 (Tabla XVIII).

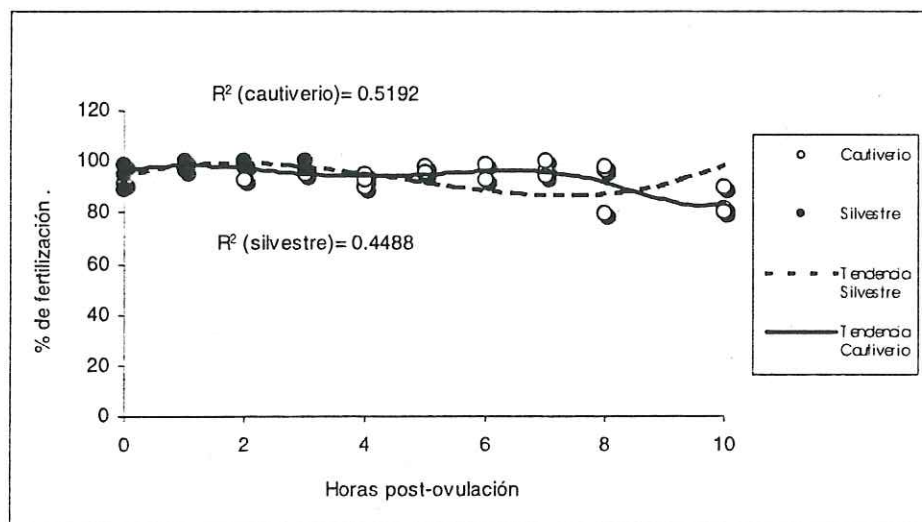


Figura 8.- Efecto del porcentaje de fertilización con respecto al tiempo-postovulación en huevos de dos hembras de botete diana.

Tabla XVIII.- Análisis de varianza para regresión polinomial (6to grado) de datos de fertilización de hembra en cautiverio.

Fte. Variación	DF	SS	MS	F	P
Regresión	6	456.495	76.083	4.140	0.006
Residual	23	422.707	18.379		
Total	29	879.202	30.317		

La hembra silvestre mostró el mismo comportamiento constante que la de cautiverio durante las 3 primeras horas que se pudo obtener información. Después de esto la hembra desovó por completo y no fue posible continuar con la serie de tiempos. Sin embargo, la Figura 8 muestra que la tendencia de los datos es altamente similar a los de la hembra en cautiverio. El resultado del análisis de varianza de la hembra silvestre no fue significativo con un poder alto de $P = 0.681$ (Tabla XIX).

Tabla XIX.- Análisis de varianza para regresión polinomial (3er grado) de datos de fertilización de hembra silvestre.

Fte. Variación	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	47.910	15.970	2.171	0.169
Residual	8	58.845	7.356		
Total	11	106.755	9.705		

En general se observa que la fertilización (para ambas hembras) se mantiene alto y constante durante el periodo de horas post-ovulación probado. Las ecuaciones obtenidas de las regresiones fueron las siguientes:

$$y(\text{cautiverio}) = 0.0015x^6 - 0.034x^5 + 0.2411x^4 - 0.343x^3 - 1.894x^2 + 4.2983x + 96.172$$

$$y(\text{silvestre}) = 0.1535x^3 - 2.1177x^2 + 6.25x + 94.187$$

Estas ecuaciones describen el comportamiento de la fertilización a los diferentes tiempos post-ovulación correspondientes a cada hembra. El factor de correlación más alto fue el de la hembra de cautiverio con $r^2 = 0.5192$ contra $r^2 = 0.4488$ de la hembra silvestre.

4.2.2 Sobrevivencia

La Figura 9 muestra la relación porcentaje de sobrevivencia (48 horas post-fert.) VS las horas post-ovulación para los embriones incubados de ambas hembras.

Los resultados muestran una estrecha correlación ($r^2=0.948$ y $r^2=0.841$ cautiverio y silvestre respectivamente) entre las horas post-ovulación que se utilizaron para fertilizar e incubar los huevos y la sobrevivencia encontrada a esas horas.

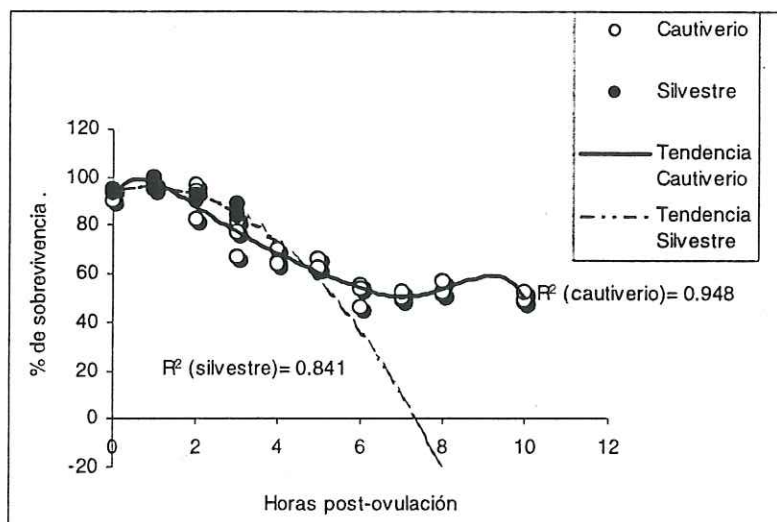


Figura 9.- Efecto de la sobrevivencia en una serie de tiempos post-ovulatorios en huevos de dos hembras de botete diana.

El análisis de varianza para la regresión de la hembra de cautiverio resultó significativamente diferente $P = 0.001$ (Tabla XX) con un poder alto de $P = 1.0$. Los resultados pueden ser interpretados con suficiente confianza.

Tabla XX.- Análisis de varianza para regresión polinomial (6to grado) de datos de sobrevivencia de hembra de cautiverio.

Fte. Variación	DF	SS	MS	F	P
Regresión	6	9171.383	1528.564	69.930	<0.001
Residual	23	502.743	21.858		
Total	29	9674.126	333.591		

El análisis de varianza para la regresión de la hembra silvestre resultó significativamente diferente (Tabla XXI) con un poder alto de Poder = 0.997. Los resultados pueden ser interpretados con suficiente confianza.

Tabla XXI.- Análisis de varianza para regresión polinomial (2^{do} grado) de datos de sobrevivencia de hembra silvestre.

Fte. Variación	DF	SS	MS	F	P
Regresión	2	197.562	98.781	23.806	<0.001
Residual	9	37.345	4.149		
Total	11	234.907	21.355		

5. DISCUSION

5.1 Porcentaje de eclosión

Se encontraron valores altos de eclosión para el grupo silvestre ($82.60 \pm 16.96\%$) y de cautiverio ($83.22 \pm 10.10\%$). El valor más bajo de eclosión encontrado entre las incubadoras de ambos grupos fue 47.30%, aunque la mayoría de éstas tuvieron valores por encima del 80%. Estos resultados son similares a las eclosiones observadas por Martínez *et al.* (2002) de $>90\%$ y Komar (2001) de $87 \pm 3.5\%$, ambos en botete diana y el último en un sistema incubador idéntico al utilizado en el presente estudio. Morehead *et al.* (2001) encontraron porcentajes de eclosión de 64 % en huevos de *Latris linneata* en cautiverio alimentados con una dieta balanceada de pelets mientras que los alimentados con pescado fresco tuvieron 55% y los silvestres 38%, sugiriendo que las diferentes dietas pueden afectar la composición bioquímica y algunos parámetros larvales y de huevo. Mylonas *et al.* (1996) describe porcentajes de eclosión de 45% en reproductores híbridos de cautiverio de lobina blanca X lobina rayada inducidos con liberación prolongada de GHRHa. Las tasas de eclosión reportado por estos trabajos indican que la calidad de huevo reportado en el presente estudio fue buena en base a las altas tasas de eclosión observadas en ambos grupos; $82.60 \pm 16.96\%$ y $83.22 \pm 10.10\%$ silvestres y cautiverio respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.651$) entre los porcentajes de eclosión de ambos grupos; $82.60 \pm 16.96\%$ y $83.22 \pm 10.10\%$ silvestres y cautiverio respectivamente. Morehead *et al.* (2001) observó que la tasa de eclosión era casi el doble para huevos de reproductores en cautiverio no inducidos y alimentados con pelets que para reproductores silvestres inducidos con hormona LHRHa. Cerdá *et al.*

(1994) también encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la eclosión de la lobina europea (*Dicentrarchus labrax* L.) a las que se les administraron dos dietas diferentes.

Los huevos obtenidos de reproductores silvestres deben de ser de una calidad adecuada para la producción de larvas viables (Kjorsvik *et al.*, 1990). Tomando lo anterior como base y a los buenos resultados obtenidos en el pasado con lotes de huevos silvestres de botete diana, se sugiere que los parámetros de los huevos silvestres obtenidos puedan ser utilizados como referencia contra los lotes obtenidos de reproductores en cautiverio de estas y futuras investigaciones concernientes a calidad. Los resultados del presente estudio muestran una buena calidad de huevo de las hembras de cautiverio que no es diferente de las silvestres hasta el punto de eclosión.

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre individuos de cada grupo silvestre y cautiverio (Figuras 6 y 7). Esta variabilidad se aprecia mejor en el grupo silvestre donde (Figura 6) las hembras 1, 3 y 5 tienen porcentajes de eclosión mayor del 90 % y las hembras 2 y 4 tienen una mayor variabilidad y un significativo menor porcentaje de eclosión 70 y 60 % en promedio respectivamente. La edad de las hembras parece afectar la viabilidad y calidad de los huevos después de la ovulación en la mayoría de la especie que no han sido estudiadas (Kjorsvik *et al.*, 1990). Esta variación entre individuos que se encontraron en condiciones similares es natural y dichos factores posiblemente repercutieron en la calidad de huevo y en los porcentajes de eclosión de los lotes de huevos provenientes de tales hembras como Kjorsvik (1994) encontró en el bacalao (*Gadus morhua*). Las diferencias encontradas en el porcentaje de eclosión entre individuos del mismo

grupo (Figuras 6 y 7) sugieren que estas se deben en mayor parte a diferentes factores determinantes de calidad de huevo presentes en cada individuo (deficiencias nutricionales, estrés, edad de las hembras) durante el desarrollo gonadal y la maduración final (MF) los cuales no fueron determinados en el presente estudio. Al parecer, la variación entre individuos de cada grupo sea debida a la variación natural observada en lotes de peces.

En conclusión, se encontró que la calidad de huevo (al momento de eclosión) de las hembras de un año en cautiverio es buena y fue $83.22 \pm 10.10\%$, la cual no es diferente a la encontrada para las silvestres.

5.2 Predictores de Calidad de Huevo

El porcentaje de eclosión es el último parámetro de calidad tomado de cada réplica, el cual sirvió de comparación contra cada uno de los demás parámetros de calidad. Este parámetro, junto con el porcentaje de fertilización, han sido los parámetros de mayor importancia utilizados como criterio en el asesoramiento de calidad de huevo (Kjorsvik *et al.*, 1990). La eclosión es sin duda el parámetro más confiable de todos los observados en este trabajo. Sin embargo es poco útil como parámetro de calidad debido a que involucra la incubación de los huevos hasta ese punto. El parámetro de calidad de huevo más útil y práctico deberá ser aquel que pueda ser observado previo a la incubación, para lo cual es necesario amplio conocimiento sobre el desarrollo normal de huevos (Kjorsvik *et al.*, 1990).

5.2.1 Porcentaje de Fertilización

No se observaron diferencias significativas entre las fertilizaciones silvestres $95.20 \pm 5.60 \%$ y de cautiverio $93.87 \pm 5.15 \%$ lo que significa que este parámetro de calidad de huevo no es diferente entre los dos grupos. La fertilización en ambos grupos fue mayor que la encontrada por Duncan *et. al*, (2003), la cual fue $>81\%$ obtenida también de reproductores silvestres inducidos con hormona LHRHa, pero son ligeramente menores y con mayor desviación que los encontrados por Komar (2001) la cual fue de $95.5 \pm 0.09 \%$. Estudios parecidos de inducción, desove y fertilización en reproductores nacidos en cautiverio de lobina blanca x lobina rayada han reportado una media de 81.2% de fertilización y una eclosión de 45% (Mylonas *et al.*, 1996). Kjorsvik y Lonning (1983) reportan valores altos de porcentaje de fertilización (90-100%) encontrados en estudios de calidad de huevo y desarrollo temprano de el bacalao *Gadus morhua* L. En definitiva se encontraron porcentajes altos de fertilización igual o mayores que los observados en otros estudios con el botete diana y otras especies.

La correlación entre la fertilización y la eclosión no mostró ninguna relación significativa ($r^2=0.085$) entre ambos parámetros. Los valores de fertilización más bajos obtenidos corresponden a algunas de las eclosiones más altas reportadas, mientras que valores de fertilización ligeramente más altos correspondieron a los valores más bajos de eclosión. Esto sugiere que las fertilizaciones encontradas no tienen ningún efecto evidente en la eclosión, por lo que al parecer para este intervalo de datos, este parámetro no es representativo de la calidad de huevo en botete diana. Esta falta de correlación se ha observado para otras especies como carpa (*Cyprinus carpio*), vendance (*Coregonus albula*), lenguado japonés (*Limanda yokohama*),

rodaballo (*Scophthalmus maximus*), bacalao (*Gadus morhua*) y arenque del pacífico (*Clupea harengus pallasii*), (Statova *et al.*, 1982; Dabrowski *et al.*, 1987; Hirose *et al.*, 1979; McEvoy, 1984; Kjorsvik *et al.*, 1984; Hay, 1986; Citado en Kjorsvik *et al.*, 1990). En bacalao (*Gadus morhua*) los huevos con fertilizaciones entre 90-100% son considerados normales (Kjorsvik y Lonning, 1983). Lo contrario se ha visto en trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y trucha café (*Salmo trutta*) en donde los porcentajes de fertilización son bien correlacionados con la sobrevivencia (Springate *et al.*, 1984; Mylonas *et al.*, 1992).

En el segundo experimento, viendo el efecto del tiempo post-ovulatorio utilizado en la fertilización y la sobrevivencia se muestra claramente en la figura 8 que el nivel de asociación de ambos parámetros (fertilización y horas post-ovulación) es bajo para ambas hembras $r^2 = 0.4488$ y $r^2 = 0.5192$ (silvestre y cautiverio respectivamente). Se observó que la fertilización se mantiene constante indistintamente del periodo post-ovulatorio evaluado y que tal periodo no afecta la capacidad de los huevos para fertilizarse. Contrario al efecto observado sobre la fertilización, la sobrevivencia de los embriones incubados a las 48 horas post-fertilización si mostró una disminución durante las primeras 10 horas post-ovulación de 94.6 % a 56.08 % para la hembra de cautiverio y de 94.20% a 84.28 % durante las 3 primeras horas post-ovulación de la hembra silvestre. La sobrevivencia de los huevos a las 48 horas de haber sido fertilizados, estuvo fuertemente correlacionado ($r^2 = 0.841$ y $r^2 = 0.948$) con el tiempo de ovulación a la que fueron fertilizados (Figura 9). La sobrevivencia máxima para las dos hembras fue observada en huevos fertilizados una hora después de haber ovulado. Esto demuestra que los huevos de

botete diana se encuentran en óptima calidad (sobrevivencia 48 horas) durante las primeras dos horas post-ovulación.

Resultados obtenidos por Springate *et al.* (1984) muestran que los huevos recién ovulados de la trucha arcoiris (*Onchorynchus mykiss*) presentaban bajas fertilizaciones comparados con los desovados 4 días después de la ovulación. Lo contrario se observa en reproductores híbridos inducidos con GnRH α de lobina rayada x lobina blanca, en donde se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la fertilización a partir de la primera hora post-ovulación (Mylonas *et al.*, 1996). En la trucha café (*Salmo trutta*) se ha observado que los huevos completan la maduración meiótica y son fertilizables cierto tiempo después de la ovulación (Mylonas *et al.*, 1992). Estas diferencias en efecto post-ovulatorio en especies muestran que el tiempo a fertilizarse después de la ovulación afecta de diferente manera a las especies, y que en botete diana, este parámetro es más importante a considerarse que la fertilización. Lotes de huevos considerados de baja fertilización (<80%) en botete pudieran considerarse de menor calidad aunque esto no ha sido probado.

Los resultados de fertilización en este estudio, mostraron que: a) no hay una correlación respecto a la eclosión en el intervalo de datos obtenidos y b) que hay un efecto negativo conforme avanza el periodo post-ovulatorio utilizado en la sobrevivencia de los embriones, aunque la fertilización se haya mantenido alta durante todo el periodo, por lo que se concluye que la fertilización es un pobre parámetro de calidad de huevo en esta especie.

5.2.2 Porcentaje de huevos con blastómeros simétricos

Los datos de porcentaje de divisiones celulares presentaron la misma diferencia significativa ($p=0.046$) entre huevos de reproductores silvestres $96.67 \pm 4.45 \%$ y en cautiverio $94.27 \pm 3.37 \%$.

En la Tabla XVII se observa una baja correlación ($r^2 = 0.2022$) del porcentaje de divisiones simétricas con respecto a la eclosión y con tendencia negativa. Esto puede deberse principalmente a el pequeño intervalo de datos obtenido, ya que para detectar correlaciones entre parámetros de huevo y su viabilidad, es necesario analizar muestras con un amplio intervalo de calidad (Lahnsteiner *et al.*, 2001).

Según Shields *et al.* (1997) generalmente se observa una relación positiva entre los porcentajes de sobrevivencia y la proporción de embriones “normales”, aunque análisis estadísticos no siempre han sido aplicados. Porcentajes considerables de huevos con blastómeros deformes (30%) se han reportado en reproductores nacidos en cautiverio de *Anarhichas lupus* L. y han sido positivamente correlacionados con la sobrevivencia de dichos huevos (Pavlov y Moksness, 1994). Los porcentajes de blastómeros anormales ($\% \text{ blastómeros simétricos} - 100$) encontrados en este estudio son bajos (entre 4 y 5 %) comparados con estos valores y tienen una baja correlación negativa ($r^2 = 0.2022$) con los porcentajes de eclosión. De igual manera en el bacalao *Gadus morhua* L. Kjorsvik y Lonning (1983) y Kjorsvik (1994) observaron muy pocos huevos anormales pero este último observó que estos bajos porcentajes están presentes tanto en la población natural como en cautiverio.

Probablemente este parámetro pueda ser mejor correlacionado con estadios más avanzados como la sobrevivencia de larvas o con la relación positiva observada

para bacalao (*Gadus morhua* L.) entre el de porcentaje de larvas rectas (normales) y el porcentaje de eclosión observadas por Kjorsvik (1994).

Según Kjorsvik *et al.*, (1990) un buen parámetro de calidad de huevo debe ser aquel que sea eficiente, posible de identificar temprano en el desarrollo y sencillo de diagnosticar mientras que Shields *et al.* (1997) concluye que una revisión cualitativa rápida de este parámetro puede ser utilizado como asesoramiento de calidad de huevo en lenguado del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre este parámetro fueron muy altos para ambos grupos (>90%) y no pueden ser utilizados como parámetro de calidad probablemente debido a que el intervalo de valores encontrado es muy pequeño y a que la calidad de huevos de ambos grupos fue muy similar. Aunque en este experimento no haya sido evidente, no se debe descartar la buena determinación de calidad de huevo con este parámetro en futuras observaciones.

5.2.3 Diámetro de huevo

Los diámetros de huevo silvestres 0.716 ± 0.0501 mm y de cautiverio 0.718 ± 0.0427 mm encontrados no fueron significativamente diferente ($p=0.4525$) entre grupos ni entre individuos ($p=0.4660$) y fueron muy similares a los reportados por Komar (2001) los cuales promediaron 0.75 ± 0.05 mm de diámetro.

No hubo correlación evidente ($r^2=0.171$) entre el diámetro de huevo y la eclosión, lo que significa que el diámetro en estos peces sincrónicos puede variar ligeramente como se ha observado en este estudio sin implicar un cambio de calidad al momento de la eclosión.

El diámetro de huevo ha sido uno de los factores determinantes de calidad de huevo con mayor controversia. Bromage *et al.* (1992) cita a diversos autores como Small, (1979) y Pitman (1979) los cuales sugieren que huevos de menor diámetro muestran un aumento de mortalidad, mientras que otros como Glebe *et al.* (1979), Kato y Kamler (1983) y Springate y Bromage (1985) sugieren que el tamaño de los huevos no afecta la calidad en los mismos. Kjorsvik *et al.* (1990) mencionan que la información publicada al respecto no proporciona evidencia que sugiera que el diámetro de huevo sea un buen parámetro de calidad de huevo y concluyen que los huevos de menor diámetro no son diferentes en cuanto a calidad respecto a los de mayor diámetro.

Estos resultados son constantes con los demás parámetros medidos e importantes para los peces de cautiverio principalmente ya que no dan pie a posibles discrepancias entre los distintos parámetros de calidad medidos. La comparación entre grupos realizada y la correlación con la eclosión sugieren que los diámetros de huevos de los organismos de cautiverio no son diferentes a los silvestres y que ambos no repercuten en la viabilidad del huevo al momento de la eclosión.

5.2.4 Fecundidad relativa

No se observaron diferencias significativas entre las fecundidades relativas medias de cada grupo 960.278 ± 415.687 y 989.218 ± 516.599 #huevos/Kg hembra desovada aunque esta razón fue numéricamente mayor para el grupo de cautiverio. Esto confirma que las hembras utilizadas de ambos grupos fueron similares en tamaño (peso) y producción de huevos lo cual es estadísticamente importante. Fecundidades similares ($953,769 \pm 112,247$; $n=5$) son reportadas por Duncan *et al.*

(2003) para peces silvestres inducidos de esta especie. Otros autores, Martínez *et al.*, (2002) reportan haber extraído hasta 100 gr. de huevos de una hembra de botete diana de 400 gr.

Aunque no se observan diferencias significativas ($p=0.925$) entre ambos grupos (Tabla IX), en la Tabla VIII se pueden observar hembras menos pesadas y con mayor producción de huevos que otras. Esta variabilidad sugiere la existencia de animales obesos con una baja fecundidad y hembras de menor peso, pero con un mayor potencial reproductivo, lo cual debe estar regulado por factores no estudiados en este trabajo como son la edad de madurez, el estatus nutricional y las condiciones ambientales de reproductores silvestres principalmente. En la lobina marina (*Dicentrarchus labrax* L.), se ha observado que las dietas de los reproductores tienen un marcado efecto en la eficiencia reproductiva, fecundidad y características del desove (Cerdá *et al.*, 1994).

Pavlov y Moskness (1996) encontraron una fuerte correlación positiva entre la fecundidad total y el peso de las hembras de *Anarhichas lupus* L. que aparentemente existe en poblaciones naturales. En este estudio esto no fue observado (Figura 5; $r=0.0372$ y $r^2=0.0013$) probablemente debido a dos causas: a) que los reproductores fueron escogidos en base a un tamaño similar y el intervalo obtenido de tamaños y pesos no fue lo suficientemente grande para observar esta relación y b) que el número de muestras fue $n<20$.

Normalmente el trabajar con reproductores de diferentes edades, tamaños y estados nutricionales es un problema ya que estos factores pueden afectar la fecundidad de los organismos (Kjorsvik *et al.*, 1990). La fecundidad relativa no fue significativamente diferente para ambos grupos pero fue ligeramente mayor para el

grupo de cautiverio lo que es un resultado positivo para la producción masiva de larvas. Lo mismo se observa en el bacalao (*Gadus morhua* L.) en donde aunque la viabilidad de huevos provenientes de animales silvestres y de cautiverio puede no variar, el número total de huevos producidos es claramente a favor de los reproductores en cautiverio bien alimentados (Kjorsvik, 1994). La fecundidad relativa tampoco mostró ningún efecto directo sobre la eclosión y se sugiere que el número de huevos producidos por Kg. de hembra no tiene ningún efecto sobre la calidad de los huevos (Tabla XVII) y que la variación observada de fecundidad es debida a factores “externos” mencionados con anterioridad.

5.2.5 Longitud

Al ser difícil determinar la edad de los reproductores y sus estatus reproductivo, se obtuvieron parámetros como el peso y la longitud para obtener datos de un grupo “homogéneo” de reproductores. La longitud fue un parámetro de alguna forma discriminante de animales muy jóvenes o muy viejos, o flacos y muy obesos a la hora de ser inducidos y que de alguna manera influyó en tener lotes de peces inducidos de tamaños y edades similares.

La longitud de las hembras no evidenció ningún efecto sobre los porcentajes de eclosión, concluyendo que la longitud de las hembras utilizadas no tiene correlación con la calidad de los huevos producidos.

5.3 Parámetros biológicos de sistema experimental.

Todas las lecturas tomadas al principio y final de cada proceso incubador se encontraron sobre el nivel tolerable observado para la especie, estas lecturas incluyeron salinidad, OD y temperatura.

5.3.1 Salinidad

El intervalo de salinidades observadas durante ambos experimentos fueron de 34 ‰ a 35 ‰ sin observar ningún efecto de esta variación con la incubación. Martínez *et al.*, (2002) observó valores de 34 ‰ durante el mismo periodo en un sistema incubador de mayor tamaño. Martínez (2001) observó eclosiones altas a las 72 horas post-fertilización (sin llegar a la eclosión total) con salinidades entre 15‰ y 40‰ aplicadas inmediatamente después de la fertilización, lo que sugiere que la especie es eurihalina.

5.3.2 Oxígeno disuelto (OD)

El promedio de OD del de ambos grupos (silvestre y cautiverio) al momento de eclosión total no fue significativamente diferente y ambos estuvieron por encima del nivel letal observado en la especie. Los valores extremos encontrados en las incubadoras fueron 2.55 mg/l con 48.96% y 5.7 mg/l con 97.97% de porcentaje de eclosión. Sin embargo esta relación OD-Eclosión no fue constante en el resto de las réplicas ya que hubo incubadoras con porcentajes altos de OD (mayores a 5 mg/l) que mostraron bajos porcentajes de eclosión. Sin embargo, se observó un agrupamiento de datos con altas eclosiones en incubadoras con concentraciones de OD alrededor de 5 mg/l durante el periodo incubatorio. Esto significa que el OD es

un parámetro importante a considerar en la incubación masiva de los huevos aunque no se haya observado correlación evidente ($r^2=0.0129$) respecto a la eclosión. Komar (2001) encontró que las incubadoras sin flujo de agua y con aireación regulada a 100ml de aire/min, generalmente mantenían los niveles de OD por encima de 5.9 ± 0.1 mg/L. Aunque la cantidad de aire suministrado (100ml de aire/min) fue regulada al comienzo de cada proceso incubador, la cantidad de aire varió debido al cierre o apertura de válvulas en otras áreas ajenas al cultivo; por esta razón los niveles de oxígeno disuelto (OD) variaron.

La variación en OD encontrado en las distintas incubadoras no tuvo ninguna correlación con los parámetros de calidad estudiados, pero es un factor muy importante a considerarse principalmente en la etapa larval y de incubación.

5.3.3 Temperatura

El intervalo de temperaturas encontradas (26°C - 29°C) de marzo a principios de junio, concuerdan con las encontradas por Komar (2001) durante el mismo periodo. Este intervalo de temperaturas es considerado natural para esta especie a diferencia de la tolerancia termal encontrada para otra especie de botete (*Takifugu niphobles*) por Yamahira (1996) la cual estuvo entre 16 y 24°C con eclosiones de hasta 90%.

La correlación hecha entre la temperatura y eclosión muestra muy poca afinidad ($r^2=0.0268$) entre ambos parámetros, en principio porque esta no fue la cuestión en estudio y diferentes temperaturas no fueron probadas (Tabla XVII). Uno de los efectos observados y debidos a la temperatura fue la reducción de los tiempos

incubatorios, la cual se vio al incrementar la temperatura durante los experimentos. Esto mismo fue encontrado por Martínez (2001) a las 96 horas post-fertilización, en donde los valores más altos de eclosión se obtuvieron en las temperaturas mas altas probadas (28 y 31⁰C) indicando un aceleramiento del proceso incubatorio debido a las temperaturas.

Komar (2001) observó que la eclosión del botete diana tenía una relación inversa con la temperatura con el tiempo de incubación; observó periodos de incubación de 120 horas a temperaturas de 22-23⁰C y de 96 horas entre los 24-25⁰C en el mismo sistema utilizado. Asimismo, el tiempo de incubación observado para los distintos lotes de huevos no muestra ninguna correlación significativa ($r^2=0.006$) con los porcentajes de eclosión (Tabla XVII), aunque se observaron lotes de huevos homogéneos de distintas hembras y de ambos grupos que tuvieron una eclosión considerada alta y homogénea (entre 70 y 100 % alrededor de las 115 horas de incubación) la cual correspondió a temperaturas de 28 ⁰C. Lo cual sugiere que la temperatura óptima de incubación podría estar muy cercana a este valor.

5.4 Parásitos.

Se observó una carga parasitaria “normal” en los reproductores silvestres traídos a la unidad. Sin embargo, se ha observado que las altas temperaturas durante el periodo de estudio y el estrés ocasionado por el manejo de los animales, favorece el aumento de parásitos en los organismos, inclusive en los animales de cautiverio que durante el año se mantuvieron en general saludables aunque no exentos de estos problemas. Los parásitos de ambos grupos fueron identificados como *Heterobothrium ecuadori* y *Neobenedenia melleni*, ambos monogeneas, los cuales

se alojan en branquias y piel respectivamente (Fájer y Álvarez 2002). Ambas especies fueron las causantes de la mortandad del tanque con reproductores T2 y la razón por la que solo una hembra de este grupo (la primera de cautiverio) fuera utilizada en el experimento.

El parasitismo en botete ha resultado ser un factor importante a resolver y se han implementado técnicas profilácticas como las inmersiones en agua dulce y formalina que han mostrado buenos resultados (Rodríguez, 2001; Fajer *et al.*, 2001).

6. CONCLUSIÓN

No se encontraron diferencias significativas entre la fecundidad y los parámetros estudiados de calidad de huevo (fertilización, diámetro de huevo, tiempo de incubación y eclosión) entre los reproductores silvestres y en cautiverio utilizados. Esto significa que las practicas comunes de manejo y otras fuentes de estrés como el hacinamiento y la alimentación en peces de cautiverio de un año, no afectan la calidad de los huevos por lo menos hasta el momento de la eclosión.

No se observó ninguna correlación de calidad entre los distintos parámetros estudiados y la eclosión, y se observó que aunque los huevos de botete diana pueden tener altos porcentajes de fertilización aun 10 horas después del desove, la sobrevivencia se ve drásticamente afectada.

Los resultados obtenidos muestran que para mantener una sobrevivencia embrionaria por arriba del 80 % a las 48 horas de incubación, es necesario realizar la fertilización artificial con un máximo de 2 horas después de que la hembra ovula (momento en que la hembra comienza a liberar huevos por presión abdominal artificial).

Es importante y promisorio el hecho de que la mayor parte de los parámetros no sean diferentes entre los dos grupos esto podría que por lo menos las hembras mantenidas en cautiverio por un año puedan utilizarse indistintamente de hembras silvestres lo cual significaría un menor costo y esfuerzo en la captura de estos últimos, además de lo que un mayor control sobre los animales en cautiverio significa, principalmente para su estudio y producción masiva a futuro. Esto es un elemento importantísimo ya que significa un gran avance el poder confiar en los resultados que reproductores y descendencia de un año de cautiverio puedan ofrecer.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio bromatológico de los huevos de botete diana, ya que la composición bioquímica de huevos de buena calidad refleja las demandas nutritivas y de crecimiento embrionarias. Además, el destino larval de ambos grupos deberá ser considerado en futuros estudios de calidad.
- Tratamientos hormonales han sido utilizados para estudiar los procesos de ovulación y sobre-maduración de huevos, sin embargo poco se conoce sobre el efecto de este método sobre la calidad de los huevos. Sería interesante ver si existe alguna diferencia de calidad de huevos entre peces silvestres sin inducción y silvestres y cautiverio inducidos.
- Se recomienda utilizar el mayor número de hembras posibles en experimentos como el 2^{do}, referente a los efectos de la fertilización y sobrevivencia en distintos tiempos post-ovulatorios

8. REFERENCIAS

- Abdo de la Parra M.I., García-Ortega A., Martínez-Rodríguez I., González-Rodríguez B., Velasco G., Hernández C., y Duncan Neil J., 2001. Larval Rearing Of The Mexican Bullseye Puffer *Sphoeroides Annulatus* Under Hatchery Conditions 3RD Fish & shellfish larviculture symposium larvi 2001 Gent, Belgium. September 3-6
- Abdo de la Parra M.I., y Duncan Neil J., 2002. Avances en el cultivo experimental del Botete diana (*Sphoeroides annulatus*), Panorama Acuícola Vol. 7 No. 2
- Álvarez T. Porfirio, 2000. VII Diagnóstico de las Principales Especies Cultivadas en México *IN*: Estado de Salud de la Acuicultura, Instituto Nacional de la Pesca, SEMARNAP.
- Avilés Q. Araceli, 2000. XV Cultivo de Peces Marinos *EN*: Estado de Salud de la Acuicultura, Instituto Nacional de la Pesca, SEMARNAP.
- Bardach John E., 1978. The Growing Science of Aquaculture *IN*: Gerking Shelby D., 1978 Ecology of Freshwater Fish Production, Blackwell Scientific Publications 520 pp.
- Bobadilla y Pellitero 1990. *IN*: Fish Diseases and Disorders Vol. 1 Protozoan and Metazoan infections, CAB International 1995, 808 pp.
- Bromage N., R., 1995. Broodstock Management and Seed Quality General Considerations, *IN*: Bromage Niall R. y Roberts Ronald J. Broodstock Management and Egg and Larval Quality Blackwell Science Ltd. Cambridge University Press Great Britain. 424pp.
- Bromage N., Jones J., Randall C., Trush M., Davies B., Springate J., Duston J. y Barker G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 141-166.

- Campbell P. M., Pottinger T. G. y Sumpter J. P., 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout, *Aquaculture*, 120 : 151-169
- Carrillo M., Zanuy S., Prat F., Cerda J., Ramos J., Mananos E. y Bromage N., 1995. Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) IN: Bromage Niall R. & Roberts Ronald J. Broodstock Management and Egg and Larval Quality Blackwell Science Ltd. Cambridge University Press Great Britain. 424pp.
- Cerdá J., Carrillo M., Zanuy S., Ramos J. y Higuera de la M., 1994. Influence of nutritional composition of diet on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larval quality, *Aquaculture* 128:345-361
- Chih-Yu Chen y Hong-Nong Chou 1998. Detection of Tetradontoxin by High Performance Liquid Chromatography in Lined-Moon Shell and Puffer Fish, *Acta Zoologica Taiwanica* 9(1):41-48
- Contreras Arce R. y Fajer Ávila E., 2001. Monogeneas del Botete Diana *Sphoeroides annulatus* y lesiones asociadas, Libro de resúmenes V Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria Mazatlán, Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria A.C.
- De Silva Sena S. y Anderson Trevor A., 1995. Fish Nutrition in Aquaculture, CHAPMAN & HALL Great Britain.
- Duncan J. Neil, Rodríguez-M. De O. Gustavo, Alok D. y Zohar Y. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture* 218: 625-635
- Duncan J. Neil, Rodríguez M. De O. y G. A., García A., N. 2001. Investigación sobre la maduración y cultivo del Botete Diana *Sphoeroides annulatus*, Book of Abstracts

Aquaculture 2001 January 21-25 Lake Buena Vista Florida World Aquaculture Society.

Dyková I., 1995. Fish Diseases and Disorders *IV*: Vol. 1 Protozoan and Metazoan infections, CAB International, 808 pp.

Dykova I., Fajer Avila E. J. y Fiala I., 2002. *Kudoa diana* sp. n. (Myxosporaea: Multivalvulida), a new parasite of bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Tetraodontiformes: Tetraodontidae), *Folia Parasitologica* 49: 17-23

Eskelinen Paivi, 1989. Effects of Different Diets on Egg Production and Egg Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture* 79:275-281

Espinoza de los Monteros J. Y Labarta U., 1988. Patología en Acuicultura CAICYT, Madrid España

Fajer Ávila E. y Chávez Sánchez Ma. C. 1999. Parasites and their effect on the Wild Bullseye Puffer Fish (*Sphoeroides annulatus* JENYNS, 1843)., *IV*: Book of abstracts, V International Symposium on Fish Parasites, August 1999 Ceske Budejovice, Czech Republic 186 pp.

Fajer Ávila E., Abdo De la Parra I., Aguilar Z. G., Contreras A. R. y Zaldivar R. Betancourt L. M., 2001. Toxicidad del Botete Diana (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) a la formalina y su efecto contra ectoparásitos, Libro de resúmenes V Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria Mazatlán 2001, Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria A.C.

Fajer Ávila E. J. y Alvarez-Borrego J. 2002. Invariant Digital Correlation for the identification of worm parasites from bullseye pufferfish, *Spie*, Vol. 4790. Applications of Digital Image Processing XXV

- FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. FISHSTAT Plus:
Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3 2000
- FAOa, World production of fish, crustaceans and molluscs level.
<http://www.fao.org/fi/trends/worldprod99e.asp>
- FAOb, Decisiones Y Recomendaciones De La Primera Reunión Del Subcomité Del COFI
Sobre Acuicultura, Beijing, China 18 al 22 de abril de 2002, *IN*:
<http://www.fao.org/docrep/meeting/005/y8040S.htm>
- Faulkner N. Iwalani y Moberg Gary P., 1997. Effects of short term management stress on
the ability of GnRHa to induce gonadotropin secretion in the male white sturgeon,
Acipenser transmontanus, *Aquaculture* 159 (1997) 159-168
- García-Ortega A., Abdo I. y Hernández C., 2001. Weaning of bullseye puffer (*Sphoeroides*
annulatus) from live food to microparticulate diets made with decapsulated cysts of
Artemia and Fishmeal, *Aquaculture International* 00: 1-12
- Ho Jushey, Gómez S. y Fajer A. E., 2001. *Lepeophtheirus simplex* sp.n., a caligid copepod
(Siphonostomatoida) parasitic on "botete" (bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus*)
in Sinaloa, México *Folia Parasitológica* 48:240-248, 2001
- Izquierdo M. S., Fernandez-Palacios H. y Tacon A. G. J., 2001. Effect of broodstock
nutrition on reproductive performance of fish, *Aquaculture* 197 25-42
- Jiansan Jia, Wijkstrom U., Subasinghe R. y Barg U. 2000. *Aquaculture Development*
Beyond 2000: Global Prospects IN: International Conference on Acuaculture in the
Third Millennium. 20-25 February 2000 Bangkok Thailand. Department of Fisheries
of Thailand, Network of Acuaculture Centres in Asia-Pacific & FAO. 199 pp.
- Kanasawa A. 1991. Puffer Fish, *Fugu rubripes*. *IN: Handbook of nutrient requierements on*
finfish pp. 123-129. Wilson, R.P.

- Kjorsvik E. y Lonning S., 1983. Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod *Gadus morhua* L, J. Fish Biology 23, 1-12
- Kjorsvik E., Mangor-Jensen A. y Holmefjord I., 1990. Egg quality in Fishes, Advances in Marine Biology, Volume 26: 71-113
- Kjorsvik E., 1994. Egg quality in Wild and Broodstock Cod *Gadus morhua* L., Journal of The World Aquaculture Society Vol.25, No.1 Pages 22-29
- Kjorsvik E. 1996. Comparative early development and egg quality in fishes *IN: VI* International course on fish Larvae Nutrition. May 6-14, 1996 Verreth Johan pp.1-20
- Komar Cedric 2001. Effect of the water treatment on the incubation of demersal, and adhesive eggs of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*) MSc thesis, University of Stirling 77 pp.
- Lahnsteiner F., Urbanyi B., Horvath A., Weismann T., 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish, Aquaculture 195: 331-352
- Lee Cheng-Sheng y Donaldson Edward M., (2001), General Discussion on Reproductive biotechnology in finfish aquaculture, Aquaculture 197: 303-320
- Martínez Palacios C. A., Chávez Sánchez. Ma. C., Papp G.S., Abdo De la Parra I. y Ross G. Lindsay. 2002. Observations on Spawning, Early Development and Growth of the Puffer fish *Sphoeroides annulatus* Jenyns 1843, Journal of Aquaculture in the Tropics 17 (1) 59-66
- Martínez Rodríguez I. E. 2001. Evaluación del efecto de la temperatura y salinidad sobre el desarrollo de huevos y larvas de Botete Diana (*Sphoeroides annulatus*: Jenyns, 1843). Tesis de Maestría. CIAD Mazatlan en Acuicultura y Manejo Ambiental
- Martínez-Rodríguez I, González-Rodríguez B., Puello-Cruz A, Velasco-Blanco G., García-Ortega A, Sangha R. y Abdo de la Parra I., 2000. Efecto de diferentes tratamientos

alimenticios sobre la sobrevivencia y crecimiento de larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*). V SIMPOSIUM INTERNATIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA Noviembre 2000 Mérida, Yucatán, México. 19-22pp.

Mazeaud M. M., Mazeaud F. y Donaldson E. M., 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review, Transactions of the American Fisheries Society Vol. 106 Number 3

Moravek Frantisek y Fajer Ávila E. 2000. HUFFMANELA MEXICANA N. SP. (Nematoda: Trichosomoididae) from the Marine Fish *Sphoeroides annulatus* in Mexico, Journal of Parasitology 86(6) American Society of Parasitologists 2000

Morehead D.T., Hart P.R., Dunstan G.A., Brown M. y Pankhurst N.W., 2001. Differences in egg quality between wild striped trumpeter (*Latris lineata*) and a captive striped trumpeter that were fed different diets, Aquaculture 192: 39-53

Mylonas Costadinos C., Hinshaw Jeffrey M. y Sullivan Craig V., 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality, Aquaculture, 106: 379-392

Mylonas Costadinos C., Magnus Yoav, Gissis Ahikam, Kleanov Yonathan y Zohar Yonathan, 1996. Application of controlled-release, GnRHa-delivery systems in commercial production of white bass x striped bass (sunshine bass), using captive broodstocks, Aquaculture 140 (1996) 265-280

Núñez-Vázquez E. J., Yotsu-Yamashita M., Sierra-Beltrán A. P., Yasumoto T. y Ochoa J. L., 2000. Toxicities and distribution of tetrodotoxin in the tissues of puffer fish found in the coast of the Baja California Peninsula, Mexico, Toxicon 38: 729-734

Pavlov, D. A., y Moksness E., 1994. Production and quality of eggs obtained from wolffish (*Anarhichas lupus* L.) reared in captivity. Aquaculture, 122: 295-312

- Peraza O. D. 1983. El Botete (*Sphoeroides annulatus*) Características y origen como alimento humano Ciencias del Mar 2(5): 9-11
- Reinert R., 1980. Enviromental Factors *IN*: Brown E. E., Gratzek J. B., Fish Farming Handbook, AVI publishing Company, Inc. 391pp.
- Roberts Ronald J. 1981. Patología de los Peces Versión española de Cachafeiro Blanco C. M. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid España 366 pp.
- Rodríguez Gutiérrez M., 1992. Técnicas de Evaluación Cuantitativa de la Madurez Gonádica en Peces, A.G.T. Editor S.A. 79 pp.
- Rodríguez M. De O. Gustavo A. 2001. Evaluación de la calidad del esperma del Botete Diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1834) en condiciones de cautiverio y bajo inducción hormonal con LHRHa, Tesis de Maestría, CIAD Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, México, 129 pp.
- Rodríguez M. De O. Gustavo A. y Duncan, Neil J. 1999. Evaluación de la calidad de esperma del Botete Diana *Sphoeroides annulatus* en condiciones de cautiverio. *IN*: XV Congreso Nacional de Zoología.
- Rodríguez M. De O. Gustavo A. Y Duncan, Neil J. 2001. Effect of the Hormone LHRHa on sperm quality of the Bullseye Puffer *Sphoeroides annulatus* Book of Abstracts Aquaculture 2001 January 21-25 Lake Buena Vista Florida World Aquaculture Society.
- Schreck Carl B., Contreras-Sanchez Wilfrido, Fitzpatrick Martin S. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny, Aquaculture 197 : 3-24
- Scott A. P. 1987. Patterns of ovarian development in Teleosts *IN*: Tyler C. R. y Sumpter J. P., Oocyte growth and development in teleosts, Reviews in Fish Biology and Fisheries 1996, 6, 287-318

- Shields R. J., Brown N.P., Bromage N.R., 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability, *Aquaculture* 155 :1-12
- Springate J.R.C., Bromage N.R., Elliott J. A. K., y Hudson D.L., 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.), *Aquaculture*, 43: 313-322
- Thomson, D., Findley, L. y Kerstitch, N.A., 2000. Reef fishes of the sea of Cortez. The rocky-shore fishes of the golf of California. 3rd Edition The University of Arizona Press. 353p.
- Tyler C. R. y Sumpter J. P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts, *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 287-318
- Watanabe T. 1985. Importance of the Study of Broodstock Nutrition for Further Development of Aquaculture *IN*: Cowey C. B., Mackie A. M., Bell J.G., *Nutrition and Feeding in Fish*, Academic Press London-Orlando-New York.
- Yaron Zvi y Zohar Yonathan, 1993. An Overview *IN*: Muir James F. y Roberts Ronald J., (1993), *Recent Advances in Aquaculture IV*, Blackwell Scientific Publications
- Zar, J. 1999. *Biostatistical Analysis* 4th. Ed. Prentice Hall Inc. U.S.A. pp. 278
- Zohar Y., Harel M., Hassin S. y Tandler A., 1995. Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata*) *IN*: Bromage Niall R. & Roberts Ronald J. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* Blackwell Science Ltd. Cambridge University Press Great Britain. 424pp.