



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA**



**CO-ALIMENTACIÓN DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE LARVAS  
DE TOTOABA (*Totoaba Macdonaldi*) BAJO CONDICIONES DE CULTIVO**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA**

PRESENTA:

**Brandon Escárcega Miranda**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

junio 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



TESIS

CO-ALIMENTACIÓN DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE LARVAS DE TOTOABA  
(*Totoaba macdonaldi*) BAJO CONDICIONES DE CULTIVO

Presentada por:

**Brandon Escárcega Miranda**

Aprobada por el comité:

Dr. MARIO ALBERTO GALAVIZ ESPINOZA

Presidente del Jurado

Dr. FERNANDO BARRETO CURIEL

Sinodal Propietario

Dr. SANCHEZ SERRANO SAMUEL

Sinodal Propietario

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

Junio de 2021

## RESUMEN

### CO-ALIMENTACIÓN DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE LARVAS DE TOTOABA (*Totoaba Macdonaldi*) BAJO CONDICIONES DE CULTIVO

En la acuicultura, uno de los principales cuellos de botella en la producción de peces marinos se presenta en las primeras etapas de la vida, lo que disminuye el comercializar nuevas especies de producción. Este tipo de práctica depende de la producción de alimento vivo, el cual consiste en rotífero (*Brachionus sp.*) y Artemia (*Artemia sp.*) por su fácil producción masiva, sin embargo, estos organismos no cuentan con los suficientes perfiles nutricionales que requieren las larvas en esa etapa de desarrollo, los cuales se compensan con la ingesta de microdieta. Es por tal motivo, se realizaron cuatro tratamientos para deshabitación, con el fin de evaluar el crecimiento y la supervivencia en larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de cultivo: T1 protocolo de alimentación tradicional (Rotífero - Artemia - Microdieta), T2 protocolo de alimentación tradicional con doble ración (Rotífero - Artemia - Microdieta \* 2), T3 deshabitación temprano directo (Rotífero+Microdieta - Artemia) y T4 deshabitación temprano (Rotífero - Artemia+Microdieta). No se presentaron diferencias significativas en crecimiento, longitud y supervivencia, únicamente se presentó una ligera diferencia en longitud en el dpe14 del T1, sin embargo, la tendencia fue mayor en el T1 y T2. Por otra parte, en el T3 y T4, presentó un mejor desarrollo ontogénico, por lo tanto, en base a los resultados de este estudio, implementar una co-alimentación a partir del día post eclosión 18 como un protocolo de destete temprano, puede ser una estrategia prometedora para la producción de esta especie.

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico a mi familia en especial a mis padres, a mi madre Olympia y su esposo Alfonzo por todo el apoyo incondicional que me ha otorgado durante mis estudios, por brindarme un hogar feliz, lleno de paz y amor, y enseñarme a tener metas en la vida, guiándome a ser siempre una persona de bien. A mi padre Tomas por todo el amor, cariño y comprensión que pudiste brindarme durante mi formación académica, siempre apoyándome con el camino que fui dándole a mi vida, aunque ya no estés conmigo, siempre mi esfuerzo será tu esfuerzo y mi éxito tu éxito. No tengo nada más que agradecimiento para ustedes.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma de Baja California por poseer un rendimiento académico excelente el cual me permitió culminar mi carrera con satisfacción.

A la Facultad de Ciencias Marinas por permitirme estudiar esta carrera que elegí, teniendo un personal académico y administrativo siempre dispuestos a ayudar, creando siempre un ambiente de calidad y armonía.

Al fondo SADER-CONACyT 247698, DE LA CONVOCATORIA 2017-4 de FONDO SECTORIAL SAGARPA-CONACYT” por haberme apoyado con la beca económica para realizar la presente tesis.

Gracias a mi director de tesis, el Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza por permitirme ser su estudiante y enseñarme sobre el desarrollo larval de peces marinos, siempre dispuesto a resolver mis dudas, siempre con un carácter tranquilo y paciente.

A los miembros del comité por la revisión del presente trabajo, al Dr. Fernando Barreto Curiel y al Dr. Samuel Sánchez Serrano, gracias por siempre tomarse el tiempo de resolver mis dudas y brindarme sus conocimientos.

A todos mis hermanos por siempre alentarme a terminar una carrera académica. Gracias al personal del laboratorio de Nutrición en especial a Samantha Victoria Cota, por el apoyo que me brindaste para el proceso de mis muestras y ser paciente.

Al Dr. Conal David True por la donación de los organismos que fueron indispensables para el inicio de mi trabajo.

Al personal de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura ya que sin ellos mi trabajo no habría sido posible.

A mi Tío Miguel Ortiz, por enseñarme a trabajar con entusiasmo y esfuerzo, siendo esto una herramienta importante que me ayudara a triunfar.

Al Oc. Antonio Venegas, por siempre compartirme sus conocimientos y experiencias que me ayudaran a lo largo de mi formación tanto académica como laboral.

## Índice

Resumen .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Dedicatoria .....	III
Agradecimientos.....	IV
Índice.....	VI
Índice de figuras .....	VIII
Índice de cuadros .....	XI
I. Introducción.....	12
II. Antecedentes .....	15
III. Hipótesis.....	18
IV. Objetivo general.....	18
IV.1 Objetivos específicos .....	18
V. Diseño experimental y metodología.....	19
V.1 Desove y obtención de huevos fertilizados .....	19
V.2 Siembra:.....	20
V.3 Colecta de las larvas.....	21
V.4 Análisis histológico de larvas .....	22
V.5 Análisis Estadístico .....	23
VI. Resultados .....	25
VI.1 Crecimiento y supervivencia .....	25
VI.2. Desarrollo del sistema digestivo dpe 4.....	25
VI.2.1 Sistema visual dpe 14 .....	26
VI.2.2 Sistema digestivo dpe 14 .....	28
VI.3.1 Sistema visual dpe 20 .....	31

VI.3.2 Sistema digestivo dpe 20 .....	32
VI.4. Sistema visual dpe 28 .....	36
VI.4.1 Sistema digestivo dpe 28 .....	37
VII. Discusiones.....	44
VIII. Conclusiones .....	52
IX. Recomendaciones .....	53
X. Bibliografía citada .....	54

## Índice de figuras

- Figura 1. Protocolo de alimentación utilizando durante el cultivo larvario de totoaba. Microdieta (Otohime Japanese Marine Weaning, Red Mariculture; proteína 52.11%, lípidos 16.3% y cenizas 11.2%, tamaño de partículas desde 200 hasta 1410  $\mu\text{m}$ )..... 21
- Figura 2. Procedimiento histológico utilizado para la realización del desarrollo del sistema digestivo en larvas de totoabas. (A) Histoquinete utilizado para la deshidratación., (B) técnica de desparafinación., (C) equipo utilizado para embeber muestras en parafina líquida., (D) micrótopo convencional utilizado para realizar cortes de 4 y 5  $\mu\text{m}$ ., (E y F) colorantes utilizados para la tinción de células y tejidos de las muestras. .... 23
- Figura 3. Larva de totoaba dpe 4 5x (BR= branquia, DV=, E= esófago, GA= gota de aceite, I= intestino, IP= intestino posterior, N= notocordio, O= ojo, P= páncreas, V). .... 26
- Figura 4. Sistema visual dpe 14. Figura A(T1-10x), Figura B (T2-10x), figura C (T3-40x), figura D (T4). (CPE= capa de pigmento epitelial, ONL= capa nuclear externa, CPEx= capa plexiforme externa, CNI= capa nuclear interna, CPI= Capa plexiforme interna, CG= células ganglionares, L= lente, NO= nervio óptico, o= otolitos, C= cerebro)..... 28
- Figura 5. Sistema digestivo dpe 14. Figura A (T1-10x), Figura B (T2-10x), Figura C (T3-40x), Figura D (T4-10x). (AB= arcos branquiales, CO= capsula ótica, ES= esófago, H= hígado, P= páncreas, Pen= páncreas endocrino, IA= intestino anterior, IP= intestino posterior, BF= bucofaringe)..... 30

Figura 6. Sistema digestivo en larva de totoaba dpe 14 del T2. Figura A y B 40x. (PE= páncreas exocrino, Pen= páncreas endócrino EC= enterocitos, BB= como brush border o borde de cepillo, NE= núcleo enterocitos). .....	31
Figura 7. Sistema visual dpe 20. Figura A(T1-10x), Figura B (T2-40x), Figura C (T3-10x), Figura D (T4). (CO= capsula ótica, o= otolito, NO= nervio óptico, L= lente). .....	32
Figura 8. Sistema digestivo dpe 20. Figura A (T1-10x), Figura B (T2-10x), Figura C (T3-10x), Figura D (T4-10x) (A= ano, B= branquias, BF= bucofaringe, BR=branquias, CO= capsula ótica, VG= vejiga gaseosa, P= páncreas, H= hígado, I= intestino, IA= intestino anterior, IP= intestino posterior, VB= vesícula biliar, R= riñón, O= ojo). .....	34
Figura 9. Vacuolas pinocitóticas en intestino posterior en larva de totoaba dpe 20 del T2 y T3 (40x) (VP= vacuolas pinocitóticas). .....	35
Figura 10. Papila gustativa dpe 20 del T4 (PG= papila gustativa) 40x.....	35
Figura 11. Sistema visual dpe 28 (10x) (CPE= capa de pigmento epitelial, CNE= capa nuclear externa, CPE= capa plexiforme externa, CNI= capa nuclear interna, CPI= Capa plexiforme interna, CG= células ganglionares, NO= nervio óptico, L= lente). .....	37
Figura 12. Sistema digestivo dpe 28 (10x) (EA= esófago anterior, EP= esófago posterior, H= hígado, P= páncreas, IL= islotes de Langerhans, GG= glándulas gástricas, R=riñón, IA=intestino anterior, IM=intestino medio, IP=intestino posterior, B= bazo, VB= vesícula biliar, CP= ciego pilórico, V= vacuolas). .....	39

Figura 13. Células mucosas en el esófago anterior, esófago posterior y glándulas gástricas y musculo liso del estómago de larva de totoaba dpe 28 T1 (GG= glándulas gástricas, ML= musculo liso). Figura A, B y C 40x. ....	40
Figura 14. (H= hígado, P= páncreas, VB= vesícula biliar B= bazo). 40x.....	41
Figura 15. Segmentos del intestino de larva de totoaba dpe 28 T4 (CM= Células mucosas, H= hígado, P= páncreas, BB= microvellosidades de los enterocitos). Figuras 40x. ....	42
Figura 16. Vacuolas y microvellosidades del intestino anterior (V= vacuolas, MB= microvellocidades) 40x. ....	43

## Índice de cuadros

Tabla 1. Parámetros biológicos analizados en los dpe 14 y 28 de larvas de totoaba alimentadnos con diferentes protocolos de alimentación. ....	25
--	----

## I. Introducción

La acuicultura no es solo un complemento a la pesca, también es una de las actividades de mayor crecimiento en lo que respecta a la generación de alimentos de alta calidad, y es debido a que los organismos que se cultivan en acuicultura son más eficientes a la hora de convertir el alimento que los terrestres (Vallés-Bueno, 2013). Es por ello que el rápido crecimiento de la acuicultura ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías orientadas al mejoramiento de los procesos de producción y los rendimientos económicos en los cultivos. El mejoramiento genético, sanidad, alimentación y nutrición de los organismos que se cultivan, son algunos de los campos de investigación más activos en relación con los organismos marinos (Kraul, 1989).

La alimentación y nutrición de organismos destinados a la acuicultura es una de las áreas de mayor importancia y que se considera crítica no sólo para alcanzar niveles óptimos de crecimiento de los peces, sino también para mantener la salud de los mismos (Sealey & Gatlin 2001). Es por ello que el conocimiento sobre las etapas tempranas de la vida en los peces (huevos, larvas y alevines) es un punto crítico en las áreas de alta prioridad en la investigación acuícola. La experiencia ha demostrado que los principales cuellos de botella en la acuicultura de peces marinos se producen en las primeras etapas de la vida, lo que detiene los esfuerzos por comercializar nuevas especies de producción (Kertaoui *et al.*, 2019). Como una regla en general, los requisitos en términos de nutrición con el entorno físico, químico y microbiano debe de cumplirse para garantizar una tasa alta de

supervivencia y un desarrollo adecuado durante las primeras etapas de la vida (Vidar-Helvik *et al.*, 2009).

En la acuicultura de peces marinos, la producción de larvas depende del uso de alimento vivo. En la naturaleza las larvas de peces marinos se alimentan principalmente de copépodos siendo estas una de sus presas preferidas debido a su tamaño y perfil nutricional, sin embargo, en laboratorio, los copépodos son difíciles de producir en altas concentraciones para satisfacer la demanda en la producción comercial de larvas de peces (Hatchery) (Flores Rojas, 2011). En una Hatchery, los organismos utilizados para la alimentación de larvas de peces marinos en cautiverio constan principalmente de rotíferos (*Brachionus sp.*) y *Artemia* (*Artemia sp.*) por su fácil producción masiva (Gunvor Ø, 2011). Sin embargo, no se pueden mantener tasas de crecimiento aceptables en larvas de peces marinos utilizando alimentos vivos exclusivamente, esto, debido al bajo contenido de nutrientes y la ingesta restringida de estos alimentos (Fosse *et al.*, 2018).

Por otro lado, cualquier dieta que pueda reducir la dependencia de la producción de presas vivas es de gran interés técnico y económico (Person Le Ruyet *et al.*, 1993). El uso de microdietas en la larvicultura pueden balancear la composición nutricional del alimento vivo especialmente en cuanto a los perfiles de aminoácidos se refiere, debido a que estos son difíciles de modificar en el alimento vivo, por ello, se espera que la alimentación conjunta (Co-Alimentación) mejore el estado nutricional de las larvas y podría facilitar la transición únicamente al alimento seco (Nhu *et al.*, 2010; Conceição y Tandler, 2018).

La familia *Scianidae* tienen la habilidad de producir sonidos con la vejiga natatoria por lo que se les conoce como peces roncadores, tambores o corvinas. La totoaba

(*T. macdonaldi*) pertenece a esta familia, siendo esta una especie que tuvo un impacto en su población debido a una importante pesquería que se presentó durante primera mitad del siglo XX en el Alto Golfo de California, en la actualidad se ha desarrollado la biotecnología para la producción en cautiverio de esta especie por medio de la acuicultura, con el fin de contrarrestar el impacto que tuvo dicha pesquería (True, 2012). Durante los primeros días de vida de la larva de totoaba (*T. macdonaldi*) esta adquiere su alimento de manera endógena, debido a que carece de boca y ano abierto, por lo que cubre sus requerimientos nutricionales con reservas energéticas destacando aminoácidos y ácidos grasos esenciales que contiene en su saco vitelino y la gota lipídica. Normalmente la formación de la boca se finaliza al tercer o cuarto día post eclosión (dpe), esto dependerá de los parámetros fisicoquímicos en el que se desarrolle el cultivo larvario. La formación de la boca ayudará a tragar el alimento vivo disponible para la suplementación externa de los nutrientes necesarios para el mismo desarrollo de las larvas (Galaviz et al., 2015). Una vez que la larva comience el cambio de alimentación, es de importancia que sus reservas vitelinas no se hayan reabsorbido por completo, ya que estas mismas le serán de utilidad para contar con energía y poder alimentarse de presas vivas (alimentación exógena). En totoaba (*T. macdonaldi*), durante la alimentación exógena el desarrollo del esófago, intestino, páncreas e hígado cuentan con una diferenciación completa de todos los órganos digestivos (Galaviz et al., 2015). En cuanto a la expresión y actividad enzimática, la tripsina y quimotripsina están presentes desde el dpe 1. Por otro lado, la pepsina se presenta con la aparición de las glándulas gástricas durante desarrollo en los dpe 24-28 (Galaviz et al., 2015). El objetivo del presente estudio fue evaluar la Co-alimentación

durante el desarrollo temprano de larvas de totoaba (*T. macdonaldi*) bajo condiciones de cultivo.

## II. Antecedentes

A diferencia de utilizar únicamente alimento vivo, la co-alimentación en una etapa temprana del desarrollo, mejora la supervivencia y el crecimiento de las larvas de peces marinos. Este tipo de práctica ayuda a mejorar y estabilizar la condición nutricional, además de pre condicionar a las larvas para que acepten la dieta cuando se retira el alimento vivo, con el objetivo de tener un periodo de deshabitación (destete) más corto (Rosenlund y Talbot 1997).

Cañavate y Fernández-Díaz (1999) observaron que la alimentación conjunta (Co-alimentación 1:1) y la viabilidad del destete temprano en larvas de *Solea senegalensis* mejora el crecimiento y la supervivencia después del destete en comparación con el alimento vivo. Al igual Aristizábal y Suárez (2006) observaron en su estudio con larvas de *Pagrus Pagrus* mejores tasas de supervivencia y crecimiento con alimentación conjunta, utilizando alimento vivo (rotífero) y microdieta a partir del dpe 20, siendo una estrategia prometedora para el destete de esta especie. Chang *et al.* (2006) observaron que las larvas de *Cynoglossus semilaevis* alimentadas con dietas mixtas de alimento vivo (rotífero y *Artemia*) y microdieta, presentan tasas de supervivencia y crecimiento mejores en comparación a las que fueron alimentadas únicamente con alimento vivo. Engrola *et al.* (2009) observaron que en la fase pelágica en larvas de *Solea senegalensis* que fueron alimentadas con una dieta mixta (Co-alimentación) de alimento vivo y microdieta desde la apertura de la boca, eran más pequeñas que las que fueron

alimentadas únicamente con alimento vivo. Sin embargo, la maduración del sistema digestivo de las larvas se vio beneficiado al ser alimentadas con una la alimentación conjunta. Además, en la fase bentónica, al final del experimento las postlarvas con alimentación conjunta eran significativamente más grandes que los otros tratamientos además de tener un mejor desarrollo de la aleta caudal. Rónyai y Feledi (2013) observaron que una alimentación conjunta con tubiflex y microdieta con un tamaño de 0.4 - 0.8 mm a partir del dpe 14, presenta un mejor rendimiento en crecimiento en comparación a los distintos tratamientos de alimentación conjunta con diferentes tamaños de microdieta, día de destete y la alimentación suplementaria. Ljubobratović *et al.* (2015) observaron mejores resultados en crecimiento y supervivencia en larvas de *Sander lucioperca* con una co-alimentación de 7 días a partir del dpe 15, en comparación a una alimentación suplementaria de *Artemia* a microdieta, a pesar de que presento un mayor porcentaje de canibalismo en la Co-alimentación. Stejska *et al.* (2017) presentaron un rendimiento significativamente mayor en larvas de *Coregonus peled* destetadas después del dpe 20 con una alimentación conjunta de 1, 3 y 6 días con microdieta (Biomar LARVIVA ProWean 100) y alimento vivo. independientemente de la duración de los tratamientos, concluyeron que después del dpe 20 con una alimentación conjunta, puede proporcionar una producción adecuada reduciendo el esfuerzo y los costos relacionados con la producción de alimento vivo. Mata-Sotres *et al.* (2015), realizó un estudio con diferentes días de destete de larvas de totoaba 17, 22 y 27 dpe, utilizando la supervivencia, crecimiento en peso y factor de condición como variables de respuesta. Los autores observaron que las larvas destetadas al dpe 17 tuvieron respuestas positivas en crecimiento y factor de condición, sin embargo, la

supervivencia fue mayor en el tratamiento control donde las larvas fueron alimentadas con el protocolo normal de alimentación.

### **III. Hipótesis**

Si la alimentación conjunta, alimento vivo y microdieta (Co-alimentación) ayuda en a mejorar el crecimiento, supervivencia y formación del desarrollo ontogénico de larvas, entonces, se tendrá un efecto significativo en las etapas tempranas de desarrollo de la larva de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

### **IV. Objetivo general**

Determinar el efecto de la alimentación conjunta (Co-alimentación) en las etapas tempranas de larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

#### **IV.1 Objetivos específicos**

- Evaluar el crecimiento en peso y longitud en larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) sometidas a una alimentación conjunta (Co-alimentación) en las etapas tempranas.
- Evaluar el desarrollo ontogénico de las larvas sometidas a una la alimentación conjunta (Co-alimentación) en las etapas tempranas.

## **V. Diseño experimental y metodología**

### **V.1 Desove y obtención de huevos fertilizados**

Huevos fertilizados de totoaba fueron obtenidos de reproductores mantenidos en cautiverio en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada. Debido a que el desove no ocurre de forma espontánea en los tanques de reproducción de la UABC, se optó por utilizar la inducción hormonal a base de hormonas liberadoras de gonadotropinas (LHRHa) también llamada hormona liberadora de hormona luteinizante. Este método ha sido útil en muchos otros reproductores de peces. Su administración se realizó por medio de implantes a una dosis de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal. El implante se aplicó en el seno dorsal justo debajo de la aleta. Esta hormona tiene efecto tanto en hembras como en machos ya que estimula a la producción normal de las gonadotropinas, que son las hormonas naturales con controlan el proceso de la reproducción. En el caso del macho se le indujo a una mayor producción de semen e hidratación del mismo (semen más fluido), mientras que a las hembras se les estimula a entrar en la fase final de maduración en la cual el ovocito sale de su arresto y procede a hidratarse y a la ovulación final (True, 2012).

La colecta de huevos se realizó mediante el drenado del tanque para lo cual se conectará el drenaje a un depósito de compensación donde se instalará un colector para huevos con una malla de  $300 \mu\text{m}$ . El cortejo de los peces machos y hembras inicio 10-12 horas después del implante de la hormona y la reproducción se dio 24-36 horas. Los huevos con flotación neutra se colectaron en el depósito de

compensación entre 5 y 6 horas después del desove. Los huevos fueron colectados con una malla de 500  $\mu\text{m}$  y puestos en un contenedor con agua marina previamente filtrada. Posteriormente recibieron un baño con formol al 0.026% durante 20 minutos para eliminar las bacterias y protozoarios que pueden traer adheridos al corion. Este procedimiento se realizó en cubetas con aireación suficiente para que los huevos permanecieran en suspensión. Después de recibir el tratamiento, los huevos fueron lavados con agua de mar previamente filtrada y pasada por rayos ultravioleta con el fin de evitar presencia de agentes patógenos antes de la siembra. Los huevos se colocaron en probetas para separar los viables (con flotabilidad neutra) de no viables (se precipitan al fondo). Para facilitar la separación se incrementó la densidad del agua de mar. Para estimar la cantidad de huevos viables se tomaron varias muestras de un mililitro y se cuantificaron bajo un microscopio estereoscópico, de la misma manera se evaluarán los huevos no viables (True, 2012).

## **V.2 Siembra:**

Huevos de totoaba fueron colocados a razón de 150 huevos  $\text{L}^{-1}$  en 12 con tanques de fibra de vidrio con una capacidad de 100 litros con ambiente controlado (24 °C, 34 ups, 6 mg  $\text{O}_2 \text{L}^{-1}$ ). La eclosión de los huevos se dio a las 20 horas después de haber sembrado los huevos fertilizados en las incubadoras, posteriormente a la eclosión se procedió a sifonera cuidadosamente por primera vez el fondo para extraer los huevos que no eclosionaron y evitar una contaminación por materia orgánica descompuesta dentro del sistema. Antes de la primera alimentación exógena (dpe 3), cuatro tratamientos de alimentación fueron manejados. El primer tratamiento (T1) consistió en utilizar el protocolo de alimentación propuesto por (Galaviz, *et al.* 2015). El segundo tratamiento (T2) fue

duplicar la ración de alimento vivo de acuerdo al protocolo (1). El tercer tratamiento (T3) consistió en realizar una co-alimentación (rotífero-microdieta) a partir del día post eclosión (dpe) 6, mientras que el tratamiento cuatro (T4) fue en iniciar la co-alimentación al dpe 12 (nauplios de Artemia-microdieta) Figura 1.

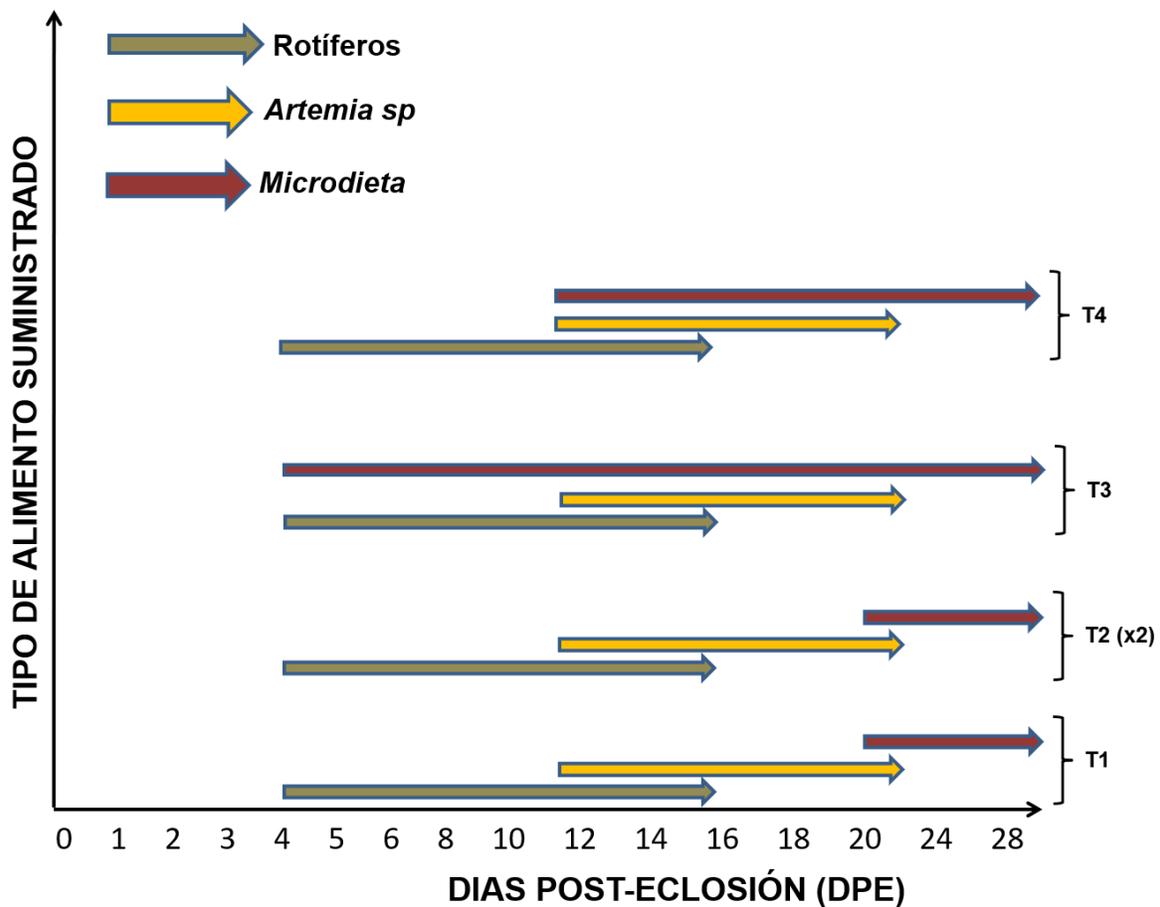


Figura 1. Protocolo de alimentación utilizando durante el cultivo larvario de totoaba. Microdieta (Otohime Japanese Marine Weaning, Red Mariculture; proteína 52.11%, lípidos 16.3% y cenizas 11.2%, tamaño de partículas desde 200 hasta 1410  $\mu\text{m}$ ).

### V.3 Colecta de las larvas

Dependiendo de su talla, larvas de totoaba fueron muestreadas aleatoriamente directamente de los tanques de cultivo experimental, usando una

malla de 300µm. Las muestras fueron colectadas una hora antes de la primera alimentación (8.00 a.m.) esto con el fin de descartar posibles efectos de enzimas provenientes de la dieta. Las muestras de larvas fueron colectadas desde el dpe 4, 14, 20 y 28. Después de haber muestreado las larvas, estas fueron anestesiadas con tricaina metansulfonato (MS 222), lavadas con agua destilada para remover el exceso de sales. Muestras (n=10-30) fueron tomadas para registrar datos de talla en longitud total y peso húmedo durante los días dpe 4, 14, 20 y 28. La longitud total promedio (mm) fue obtenida mediante la medición de una muestra de larvas (10 larvas) utilizando una regla. El peso húmedo individual de las larvas (mg) fue calculado pesando tres submuestras de larvas (n=30) con una balanza analítica (Sartorius, Gottingen, Germany; precisión  $1 \times 10^{-4}$  g) por triplicado en cada uno de los tratamientos.

#### **V.4 Análisis histológico de larvas**

Las muestras de larvas fueron fijadas en paraformaldehído con solución amortiguadora de fosfatos al 4%, durante 24 horas. Pasado este tiempo las muestras se transfirieron a alcohol al 70% hasta su análisis, todas las muestras se transfirieron a histocasetes histológicos para realizar el proceso de deshidratación en gradientes alcohólicos, aclaración en benceno e inclusión en parafina en un procesador automático de tejidos (LEICA TP 1040). Una vez finalizada la deshidratación, se embebieron en parafina utilizando un incluidor de parafina automático de tejidos (LEICA EG 1150 H) y se realizaron cortes histológicos seriados de 4 a 5 µm de grosor por medio de un microtomo (LEICA RM2235). Estos cortes se extendieron en un baño de agua destilada, grenetina y alcohol a 43-45°C para fijarse al portaobjetos. Estas laminillas se dejaron secar en una estufa

(GCA/PRECISION SCIENTIFIC, TRAUNEP MD) por 24 h a 70°C y se tiñeron utilizando el protocolo de Hematoxilina-Eosina (H&E) con el fin de diferenciar la estructura celular y tisular. Finalmente, se montaron con un cubreobjetos y resina (Cytoseal 60, Thermo Scientific).

Las cortes de las muestras de larvas de totoaba se observaron en un microscopio invertido izzi a una magnificación de 5x,10x, 20x y fotografiadas con la ayuda de una cámara al microscopio y el programa AxioVision 4.8.2 SP3 (08-2013). Se observó en específico el desarrollo del sistema digestivo (intestinos, hígado, páncreas y estomago) de las larvas de los días muestreados para identificar la maduración de este sistema. Figura 2.

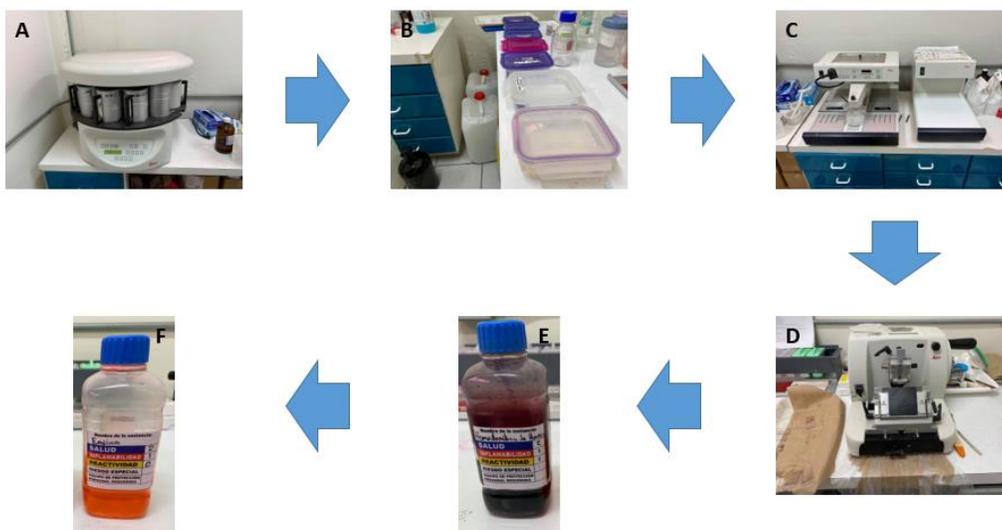


Figura 2. Procedimiento histológico utilizado para la realización del desarrollo del sistema digestivo en larvas de totoabas. (A) Histoquinete utilizado para la deshidratación., (B) técnica de desparafinación., (C) equipo utilizado para embeber muestras en parafina líquida., (D) micrótomos convencional utilizado para realizar cortes de 4 y 5 µm., (E y F) colorantes utilizados para la tinción de células y tejidos de las muestras.

## V.5 Análisis Estadístico

Los resultados están expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Se determinó la normalidad y homocedasticidad (prueba de Levene's) de los datos. Se realizó una prueba paramétrica, ANOVA de una Vía, misma que nos ayudó a determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos y los índices biológicos, tal como, peso, longitud, supervivencia y tasa de crecimiento específico. Una vez encontradas las diferencias significativas, se realizó un análisis a posteriori mediante una prueba post-hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa Statistica 10.0 (Stat Soft, Inc. Tulsa, OK, EE. UU.).

## VI. Resultados

### VI.1 Crecimiento y supervivencia

Las mejores tendencias de crecimiento longitud y supervivencia se encontraron en los tratamientos 1 y 2 (Tabla. 1). Las larvas alimentadas con alimento vivo (rotífero y nauplios de Artemia) presentaron una tendencia mayor en cuanto el crecimiento en mg en los dpe 14 y 28. Con respecto a crecimiento en mm al dpe 14 en el T1 presento una ligera diferencia significativa de tamaño, a diferencia del dpe 28 donde no se presentó una diferencia significativa, así como en la supervivencia. Por otra parte, las larvas alimentadas con una alimentación conjunta (T3 y T4) no presentaron diferencias significativas en el crecimiento en mg y longitud en el dpe 14 y 28, al igual que en la supervivencia. Sin embargo, las tendencias son más bajas que en el T1 y T2.

Tabla 1. Parámetros biológicos analizados en los dpe 14 y 28 de larvas de totoaba alimentados con diferentes protocolos de alimentación.

Parámetro	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Crecimiento (mg) dpe 14	17.9±4.6	22.36±8.2	11.2±6.1	12.67±1.27
Crecimiento (mg) dpe 28	108.73±35.76	90.96±7.5	85.60±1.66	81.42±2.76
Longitud (mm) dpe 14	6.6±0.87 <sup>a</sup>	5±0.0 <sup>b</sup>	4.86±0.50 <sup>b</sup>	4.73±0.50 <sup>b</sup>
Longitud (mm) dpe 28	12.7±5.7	9.93±1.80	7.8±1.11	6.8±1
Supervivencia	13.37±8.73	10.64±8.73	4.31±0.64	3.93±0.57

### VI.2. Desarrollo del sistema digestivo dpe 4

Al dpe 4, la larva de totoaba está en proceso de desarrollo de los diferentes órganos. A este día, se empieza a observar el desarrollo del ojo, así como el

esófago, aun presenta residuos de vitelo y gota de aceite, característica de la mayoría de las larvas de peces marinos de ontogenia indirecta. La presencia de gránulos de zimógeno como páncreas exocrino están presentes indicando la posible preparación para la excreción de enzimas digestivas. Así mismo, el desarrollo de intestino anterior y posterior se empiezan a desarrollar, además de observarse aun presencia de notocordio, ducto biliar y branquias. Figura 3.

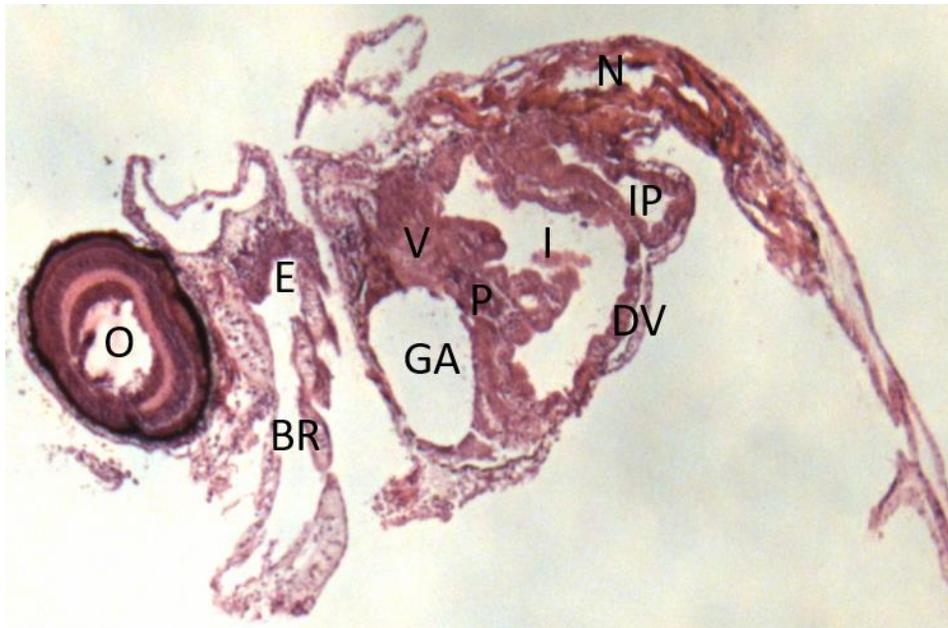


Figura 3. Larva de totoaba dpe 4 5x (BR= branquia, DV=, E= esófago, GA= gota de aceite, I= intestino, IP= intestino posteriores, N= notocordio, O= ojo, P= páncreas, V).

#### VI.2.1 Sistema visual dpe 14

Al dpe 14 del T1 (Figura 4A) se observa la retina, la cual esta diferenciada en capas. El número de capas en la retina se mantienen a lo largo del ciclo de vida, desde el momento en que se diferencia, lo cual ocurre cuando se pigmentan los

ojos al inicio de la alimentación exógena. Los nombres de las capas de la retina, desde el exterior hasta el interior, son: capa de pigmento epitelial, capa nuclear externa, en donde se encuentran los núcleos de los conos, capa plexiforme externa que es muy delgadita por debajo de los núcleos de los conos. La capa nuclear interna con núcleos de las neuronas sensoriales. Capa plexiforme interna que son los axones de las neuronas y las células ganglionares. Además de puede apreciar donde se forma el nervio óptico, de los axones de las células ganglionares (Flecha roja).

En el dpe 14 del T2 (Figura 4B) se distingue la retina, con las mismas capas del T1 (Fig 4A). Sin embargo, en este tratamiento se nota más el nervio óptico. Por otra parte, se nota la bucofaringe, los arcos branquiales y la parte anterior del cerebro.

En el dpe 14 del T3 (Figura 4C) se observa de manera clara la estructura de la retina, que es similar a la del Figura 4 A, pero resaltando mejor las capas. Además, se puede distinguir el lente, se notan las cápsulas óticas y los otolitos. Por otra parte, se pueden apreciar las distintas capas de la retina. El T4 del dpe 14

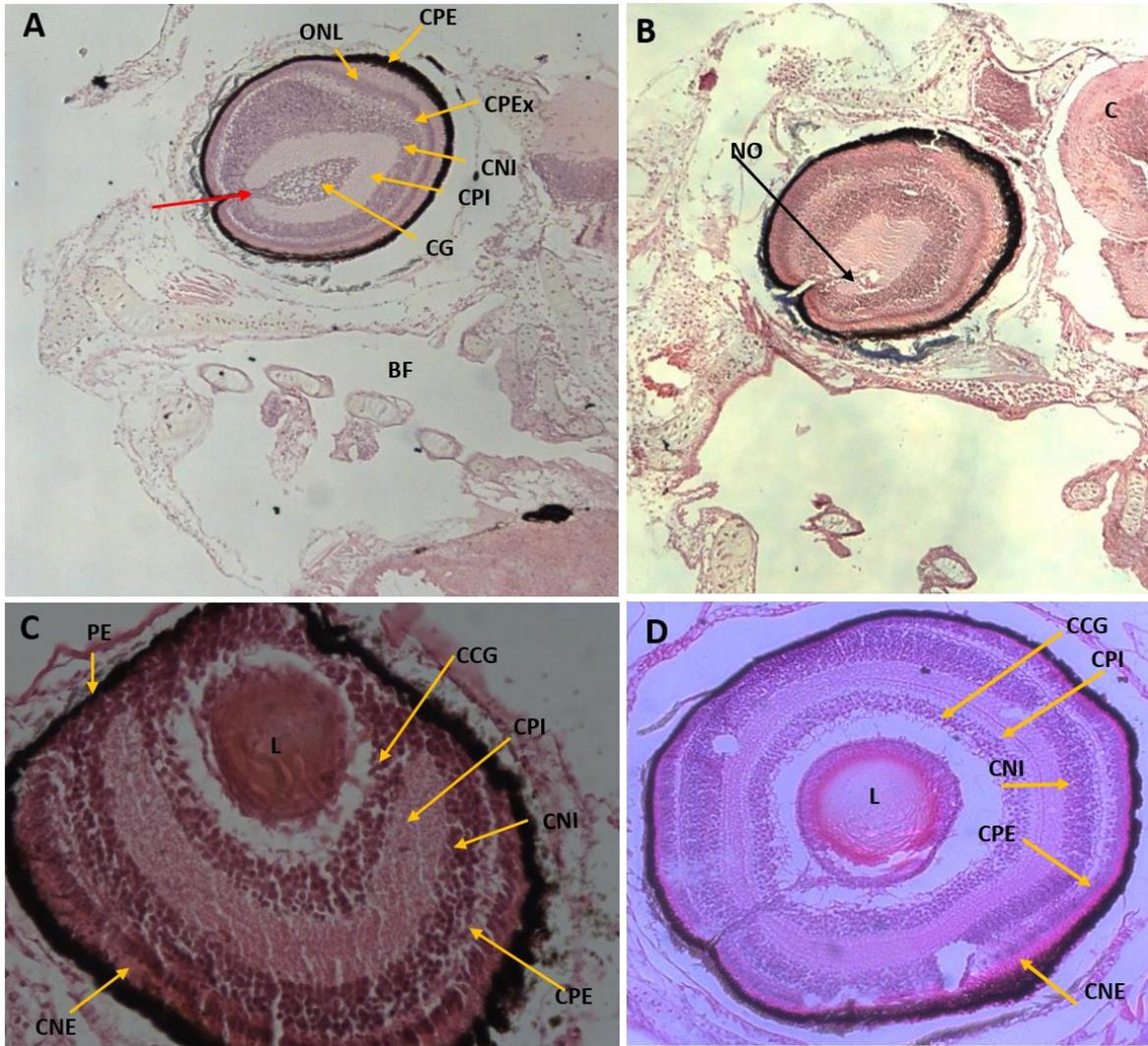


Figura 4. Sistema visual dpe 14. Figura A(T1-10x), Figura B (T2-10x), figura C (T3-40x), figura D (T4). (CPE= capa de pigmento epitelial, ONL= capa nuclear externa, CPEX= capa plexiforme externa, CNI= capa nuclear interna, CPI= Capa plexiforme interna, CG= células ganglionares, L= lente, NO= nervio óptico, o= otolitos, C= cerebro).

### VI.2.2 Sistema digestivo dpe 14

En el dpe 14 del T1 (Figura 5 A) se puede observar la capsula ótica, en donde se encuentran los otolitos, además se puede observar el inicio del esófago y el inicio del ensanchamiento de un estomago primordial. Por otra parte, se observa el

hígado, páncreas, intestino anterior y posterior, sin embargo, no están completamente desarrollados.

En el dpe 14 del T2 (Figura 5B) se distingue de manera clara el esófago, así como parte estómago primordial en desarrollo y los intestinos medio y posterior. Así mismo se puede apreciar hígado y páncreas, donde se logra diferenciar el páncreas endocrino. Por otra parte, se puede apreciar un ensanchamiento de la vejiga gaseosa.

En el dpe 14 del T3 (Figura 5 C) se puede distinguir de manera clara el hígado. Así como el intestino anterior y parte del páncreas. También parece se observa la bufocaringe y lo que aparenta ser papilas gustativas (Flecha azul).

En el dpe 14 del T4 (Figura 5 D) se distingue el bucofaringe, los cartílagos de los arcos branquiales, hígado, y el intestino anterior.

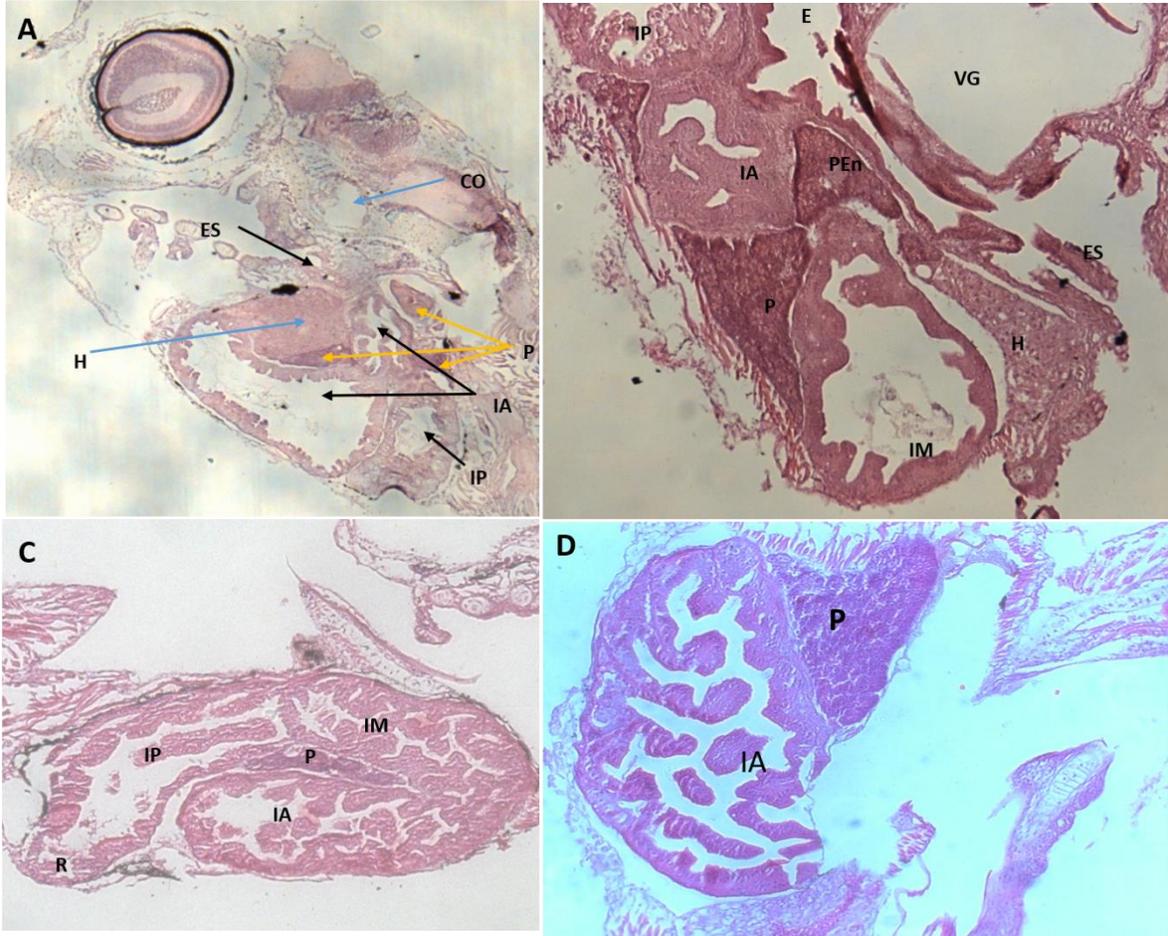


Figura 5. Sistema digestivo dpe 14. Figura A (T1-10x), Figura B (T2-10x), Figura C (T3-40x), Figura D (T4-10x). (AB= arcos branquiales, CO= capsula ótica, ES= esófago, H= hígado, P= páncreas, Pen= páncreas endocrino, IA= intestino anterior, IP= intestino posterior, BF= bucofaringe).

En el tratamiento T2 (Figura 6A) se puede observar tanto el páncreas exocrino el cual se encarga de secretar las enzimas hacia el intestino, como el páncreas endócrino o bien, los islotes de Langerhans, los cuales secretan hormonas que intervienen en la regulación del metabolismo. Es evidente el epitelio columnar en la mucosa intestinal, es decir, en los enterocitos, así como el núcleo de los mismos. Además, se observa el epitelio hasta el borde superior, incluyendo las microvellosidades (líneas amarillas). Las microvellosidades de los enterocitos son

evidentes, las cuales se conocen también como brush border o borde de cepillo (BB), (Figura 6 B).

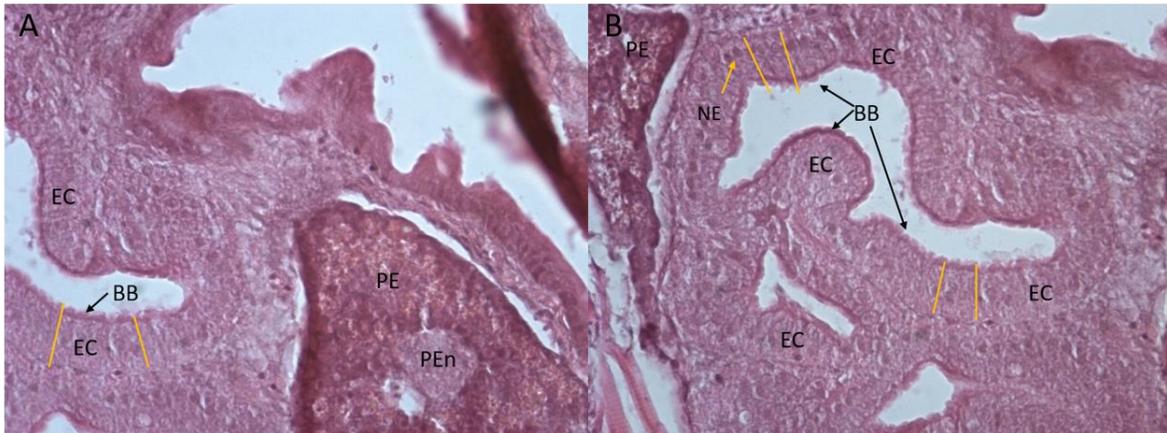


Figura 6. Sistema digestivo en larva de totoaba dpe 14 del T2. Figura A y B 40x. (PE= páncreas exocrino, Pen= páncreas endócrino EC= enterocitos, BB= como brush border o borde de cepillo, NE= núcleo enterocitos).

### VI.3.1 Sistema visual dpe 20

En el dpe 20 del T1 (Figura 5 A) se puede observar la retina con las mismas capas mencionadas anteriormente, como lo son la capa de pigmento epitelial, capa nuclear interna, capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa plexiforme interna que son los axones de las neuronas y las células ganglionares. No se observa el lente, sin embargo, se distingue la cápsula ótica CO y un otolito O.

Por otra parte, en el dpe 20 del T2 la retina resalta con sus capas. Sin embargo, no se ve el lente, pero sí parte del nervio óptico (NO). (Figura 7 B)

En el dpe 20 del T3 (Figura 7 C) la retina y sus capas resaltan, también se presentan bastones y no solamente conos. Además, parece que hay conos dobles, así como se observa el lente.

Al dpe 20 T4 (Figura 7 D) resalta una parte del lente, junto con las distintas capas de la retina y lo que parece ser una parte del nervio óptico.

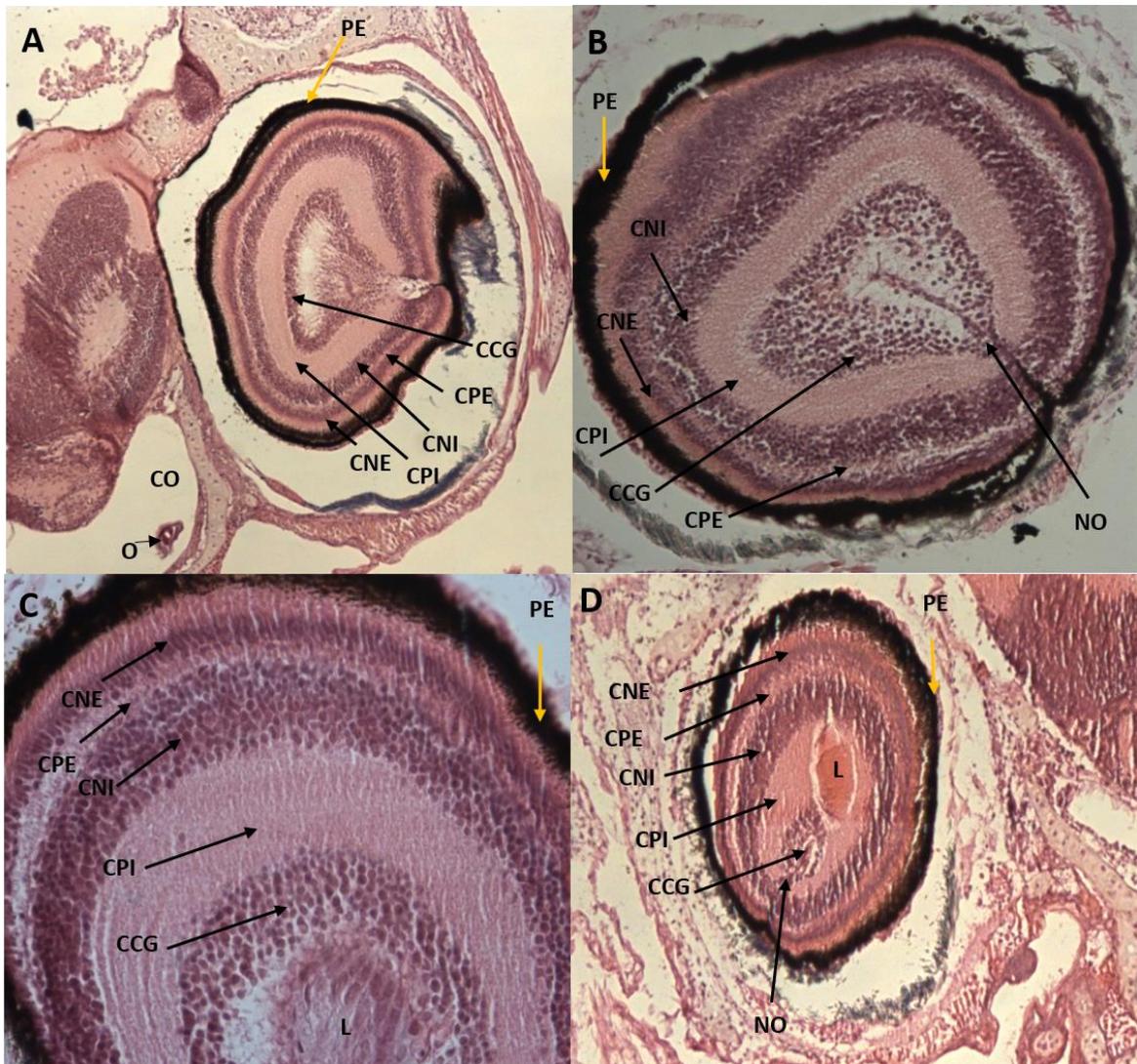


Figura 7. Sistema visual dpe 20. Figura A(T1-10x), Figura B (T2-40x), Figura C (T3-10x), Figura D (T4). (CO= capsula ótica, o= otolito, NO= nervio óptico, L= lente).

### VI.3.2 Sistema digestivo dpe 20

Al dpe 20 se presentaron cambios morfológicos importantes en el desarrollo de las larvas entre los diferentes tratamientos que destacan el desarrollo completo

del hígado, intestino y otros órganos importantes como el desarrollo del estómago primordial, con más notoriedad en los T3 y T4, así mismo, en estos mismos tratamientos, se observó inclusión de vacuolas lipídicas en el hígado, sin embargo, debido a los cortes no se diferenciaron glándulas gástricas en esta fase.

En el dpe 20 del T1 (Figura 8 A) se observan la bucofaringe, donde parece que hay algunas papilas gustativas y tal vez dientes faríngeos, así como la retina con algunas de sus capas, las branquias, la cápsula ótica con un otolito, la vejiga gaseosa, páncreas con lo que parece ser un islote de Langerhans, hígado y algunos segmentos de lo que parece ser intestino anterior y la vesícula biliar.

En el dpe 20 del T2 (Figura 8 B) se aprecia el hígado y parte del intestino anterior. Aquí se distinguen el intestino posterior y el ano, la vejiga gaseosa y también parece verse el riñón.

En el dpe 20 del T3 (Figura 8 C), se aprecia los arcos branquiales, así como el bucofaringe y el esófago. Además, se puede observar el hígado junto con una parte del intestino anterior.

En el dpe 20 del T4 (Figura 8 D) resaltan el ojo y el hígado, se ve la bucofaringe y branquias, algunos conductos del intestino también se distinguen, al igual que una parte del páncreas exocrino y la cápsula ótica.

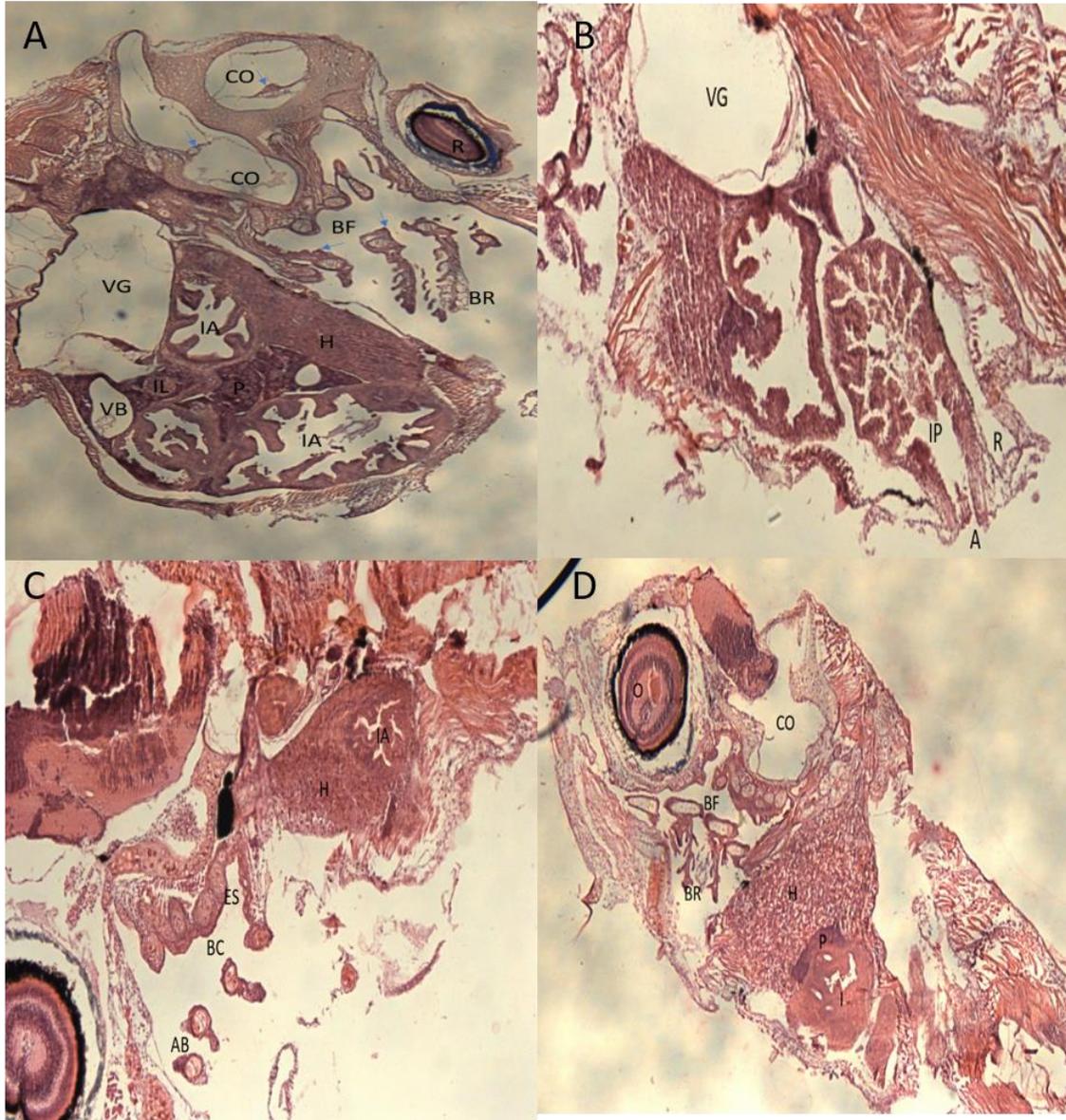


Figura 8. Sistema digestivo dpe 20. Figura A (T1-10x), Figura B (T2-10x), Figura C (T3-10x), Figura D (T4-10x) (A= ano, B= branquias, BF= bucofaringe, BR=branquias, CO= capsula ótica, VG= vejiga gaseosa, P= páncreas, H= hígado, I= intestino, IA= intestino anterior, IP= intestino posterior, VB= vesícula biliar, R= riñón, O= ojo).

En el intestino posterior del T2 (Figura 9 A) se puede apreciar la mucosa, debido a la presencia vacuolas pinocitóticas en los enterocitos. Por otra parte, en el

intestino posterior del T3 (Figura 9 B) se poder ver la presencia de vacuolas pinocitóticas (VP) en los enterocitos como en el tratamiento anterior.

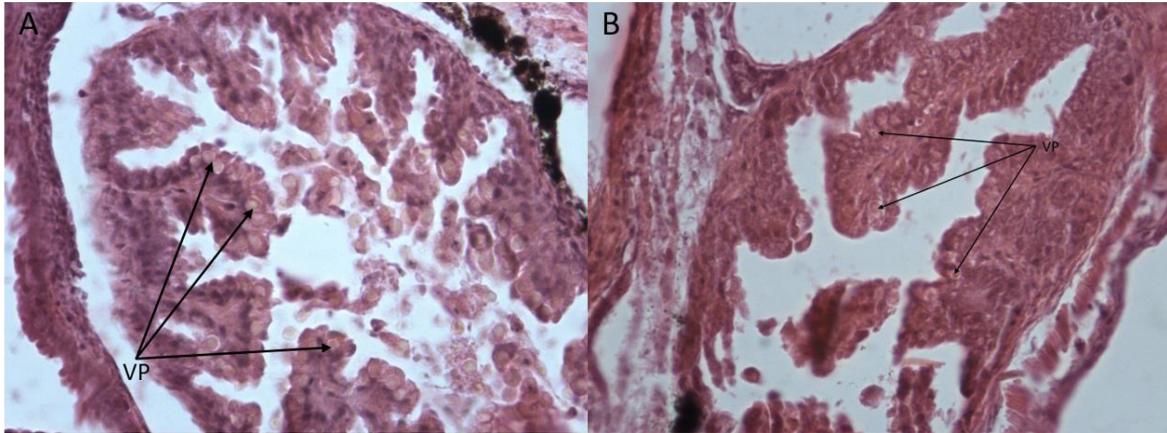


Figura 9. Vacuolas pinocitóticas en intestino posterior en larva de totoaba dpe 20 del T2 y T3 (40x) (VP= vacuolas pinocitóticas).

En el T4 se puede apreciar lo que parece ser una papila gustativa (PG) en la bucofaringe, además se puede observar lo que podrían ser glándulas gástricas en el estómago primordial. Figura 10

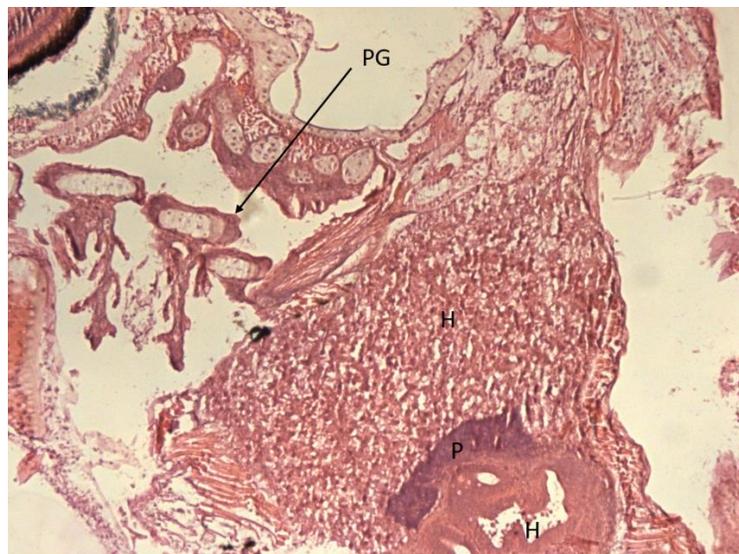


Figura 10. Papila gustativa dpe 20 del T4 (PG= papila gustativa) 40x.

#### **VI.4. Sistema visual dpe 28**

En el dpe 28 del T1 (Figura 11 A) se puede observar la retina junto con sus capas, como lo son la capa de pigmento epitelial, la capa de células ganglionares, capa nuclear externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna, el lente y lo que parece ser el nervio óptico. Sin embargo, no se observa la capa plexiforme externa.

Por otra parte, en el dpe 28 del T2 resalta la capa de células ganglionares, capa nuclear externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna y la capa plexiforme externa. Sin embargo, están distribuidas en diferente posición a los otros tratamientos. (Figura 11 B)

En el dpe 28 del T3 (Figura 11 C) la retina y sus capas resaltan como lo es el lente, la capa de células ganglionares, el pigmento epitelial, capa nuclear externa, capa nuclear interna y la capa plexiforme externa.

En el dpe 28 T4 (Figura 11 D) resalta la capa de células ganglionares, junto con la capa de pigmento epitelial, capa nuclear externa, capa nuclear interna y la capa plexiforme interna y la capa plexiforme externa. Sin embargo, no se observa el lente.

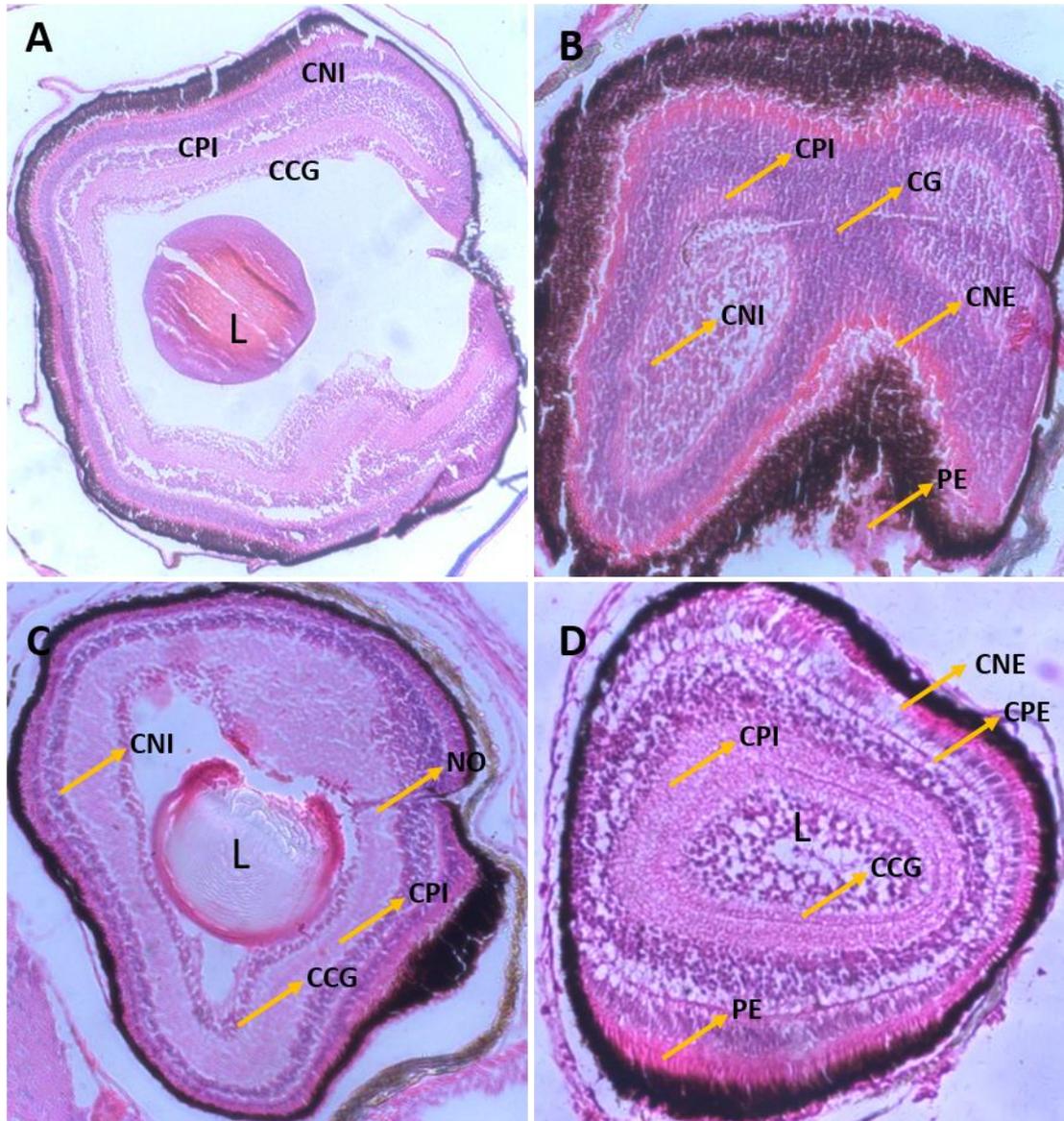


Figura 11. Sistema visual dpe 28 (10x) (CPE= capa de pigmento epitelial, CNE= capa nuclear externa, CPE= capa plexiforme externa, CNI= capa nuclear interna, CPI= Capa plexiforme interna, CG= células ganglionares, NO= nervio óptico, L= lente).

#### VI.4.1 Sistema digestivo dpe 28

En el dpe 28 del T1 (Figura 12 A) se observa que el estómago ya se ha desarrollado por completo. También se nota el esófago anterior y posterior con diferentes tipos de mucosa. El hígado y el páncreas tanto exocrino como endocrino

son claros de observar. Glándulas gástricas ya son evidentes en el estómago. Se puede apreciar lo que parece ser un estómago muy grande el cual tiene una parte anterior con mucha musculatura.

En el dpe 28 del T2 (Figura 12 B) se observa el esófago bien definido, junto con el esófago anterior y posterior. Además, se pueden apreciar algunas glándulas gástricas en el estómago anterior. También se puede apreciar el intestino anterior que está justo después del estómago posterior, al igual que el intestino posterior el cual termina en el recto.

En el dpe 28 del T3 (Figura 12 C) el tubo digestivo se encuentra desarrollado, se aprecian parte de las glándulas gástricas en el estómago. El riñón, encontrándose en la parte de arriba del hígado. Se nota el páncreas exocrino y endócrino, por otra parte, los segmentos del intestino son claros, así como la presencia del bazo y la vesícula biliar.

En el dpe 28 del T4 (Figura 12 D) se distingue el hígado junto con el páncreas, los cuales se encuentran rodeando lo que podría ser un ciego pilórico. Además, se puede ver la presencia de vacuolas en los enterocitos del intestino anterior, además.

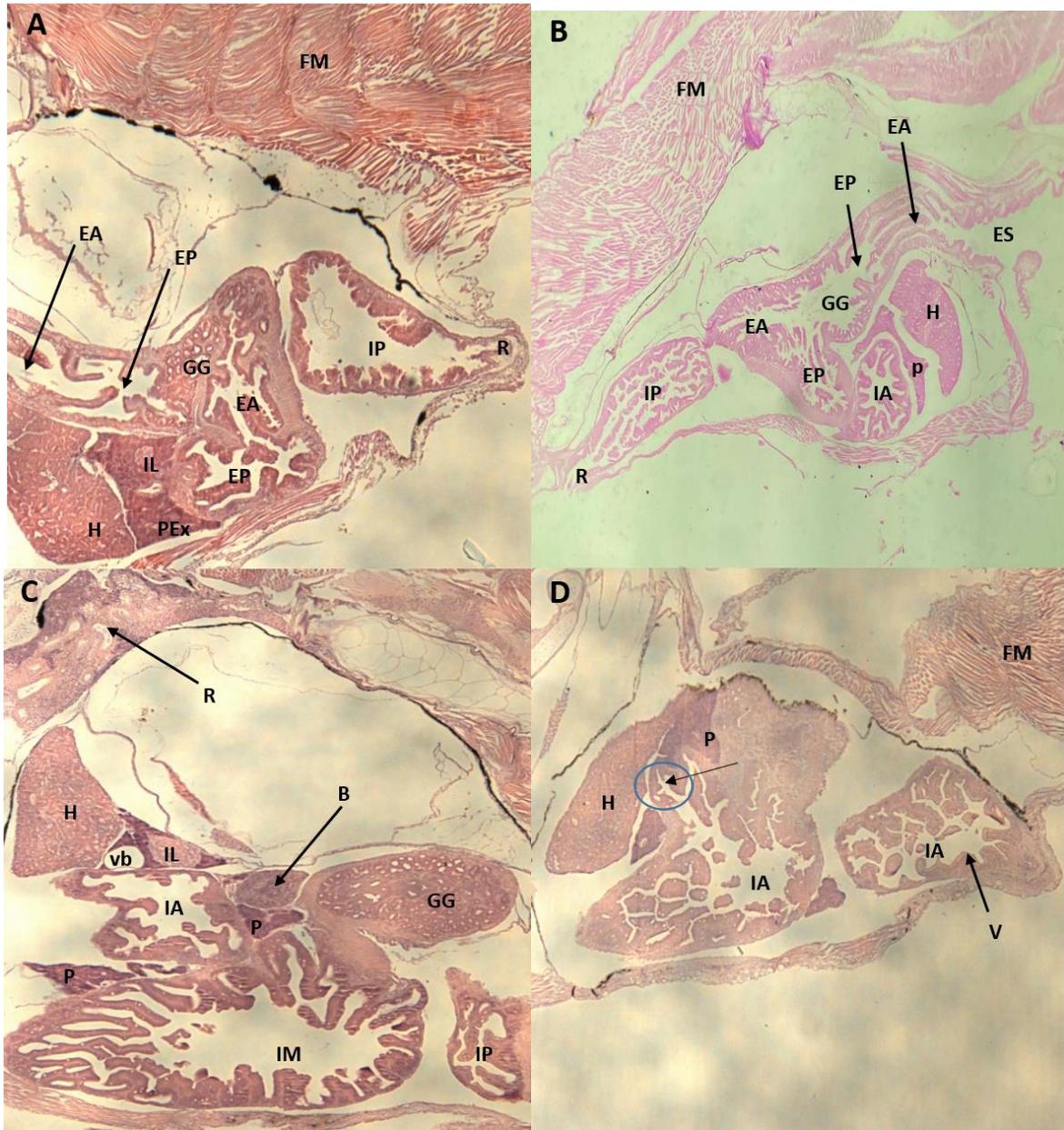


Figura 12. Sistema digestivo dpe 28 (10x) (EA= esófago anterior, EP= esófago posterior, H= hígado, P= páncreas, IL= islotes de Langerhans, GG= glándulas gástricas, R=riñón, IA=intestino anterior, IM=intestino medio, IP=intestino posterior, B= bazo, VB= vesícula biliar, CP= ciego pilórico, V= vacuolas).

En el esófago anterior del T1 (Figura 13 A) se nota la presencia de muchas células mucosas (Flechas negras), las cuales tienen la función de secretar mucus para la protección ante microorganismos y la lubricación del alimento.

En el esófago posterior (Figura 13 B) del mismo tratamiento se nota la mucosa que se une al estómago. Sin embargo, no hay células mucosas.

Además, se puede ver la mucosa del estómago, así como con la presencia de las glándulas gástricas (GG) y abundante músculo liso (ML) en la capa muscular.

(Figura 13 C)

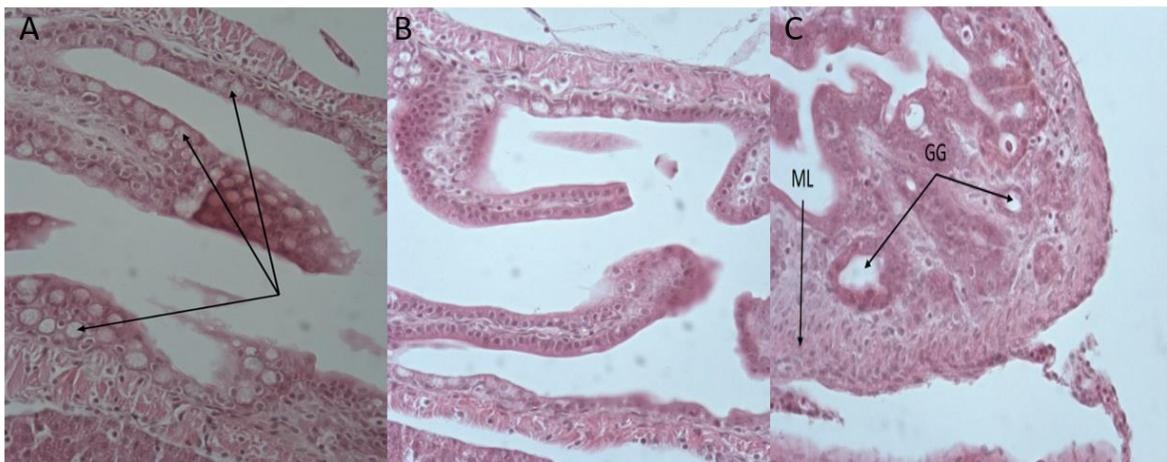


Figura 13. Células mucosas en el esófago anterior, esófago posterior y glándulas gástricas y musculo liso del estómago de larva de totoaba dpe 28 T1 (GG= glándulas gástricas, ML= musculo liso). Figura A, B y C 40x.

En el T3 (Figura 14 A y B) se aprecia el hígado junto con el páncreas y la vesícula biliar.

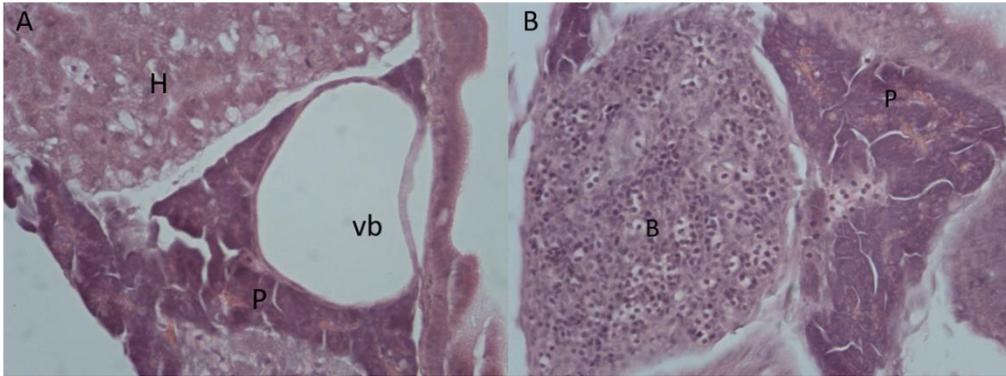


Figura 14. (H= hígado, P= páncreas, VB= vesícula biliar B= bazo). 40x.

En el T4 (Figura 15 A y B) se nota la presencia de células mucosas (CM) en los diferentes segmentos del intestino. Se distinguen hígado y el páncreas. Así mismo, se observa las microvellosidades en los enterocitos. (Figura 15 C y D)

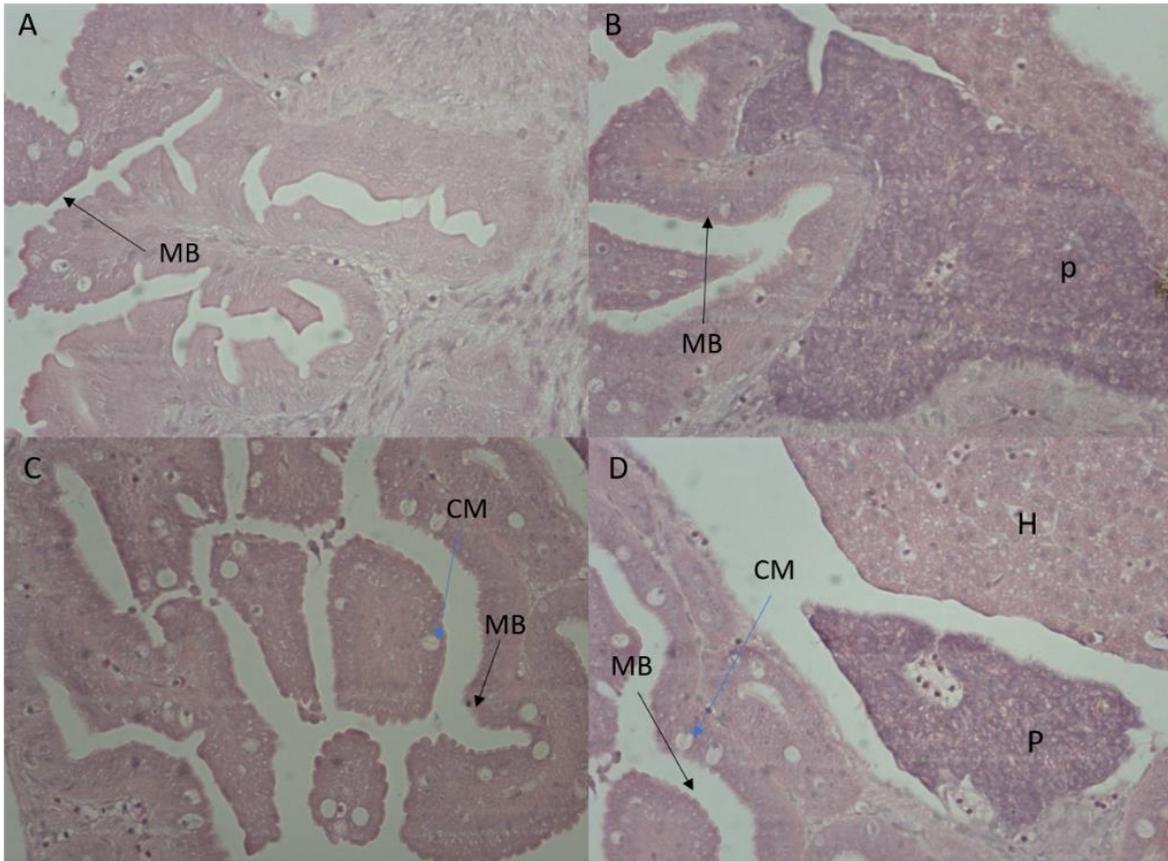


Figura 15. Segmentos del intestino de larva de totoaba dpe 28 T4 (CM= Células mucosas, H= hígado, P= páncreas, BB= microvellosidades de los enterocitos). Figuras 40x.

Por otra parte, se logra apreciar la mucosa del intestino y vacuolas en los enterocitos (flechas azules). Así como las microvellosidades (flechas negras) en la parte apical de los enterocitos. (Figura 16)

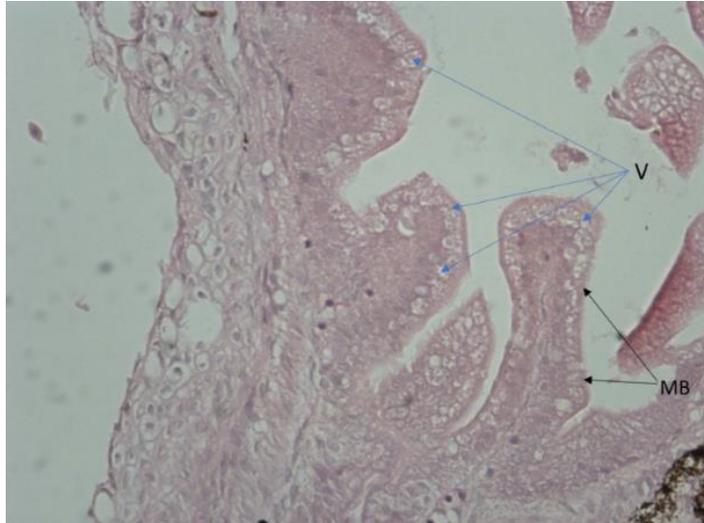


Figura 16. Vacuolas y microvellosidades del intestino anterior (V= vacuolas, MB= microvellocidades) 40x.

## VII. Discusiones

El reto de la alimentación en especies de importancia en la acuicultura es el de encontrar dos aspectos que son considerados esenciales y que juegan un papel crucial en el cultivo de especies: la primera consiste en maximizar el rendimiento de la producción mediante el desarrollo de alimentos económicamente viables, disponibles y especie-específico en cada una de las etapas de desarrollo de los organismos de nuestro interés. El segundo consiste en encontrar el máximo rendimiento económico basado en el uso de alimentos adecuados utilizando innovación tecnológica para el desarrollo de nuevas dietas y protocolos de alimentación, considerando siempre el valor nutritivo del alimento y en especial, la disponibilidad y facilidad de adquirirlos en el mercado. Es por ello que es de suma importancia el analizar la función del sistema digestivo de los organismos a estudiar en cada una de las etapas de desarrollo, ya que el papel del sistema digestivo es el de actuar como una interfase entre el alimento y el organismo, y es debido a que en él se lleva a cabo el proceso inicial, hidrólisis y transferencia de nutrientes hacia el interior del cuerpo del organismo en estudio (Moyano-López, 2006). En el presente estudio, se evaluó el efecto de la alimentación conjunta (Co-alimentación) en las etapas tempranas de larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*), encontrándose resultados interesantes en larvas al ser alimentadas con alimento vivo y microdieta. Durante los primeros 14 días de experimentación, el mejor crecimiento se presentó en el tratamiento donde las larvas eran alimentadas con doble ración de alimento vivo, seguido por el tratamiento que consistió en el protocolo normal de cultivo, mientras que los tratamientos donde se empezó con la co-alimentación (alimento vivo-microdieta) fueron los crecimientos más bajos. Estos resultados podrían

deberse a que el alimento vivo secreta ciertas sustancias químicas que actúan como un estimulante o atrayentes en las larvas que ayudan a que sea atraída por el alimento vivo (Kolkovski *et al.* 1997). Así mismo, durante los primeros días de desarrollo de las larvas se lleva a cabo la maduración del sistema visual de las larvas de peces, lo cual también está relacionado debido a que las larvas son consideradas depredadores visuales durante los primeros días de cultivo. El desarrollo normal del sistema visual es esencial para la captura exitosa de presas y evitar a los depredadores, lo que conduce a un mayor crecimiento y supervivencia de las larvas (Roo *et al.*, 1999).

En la mayoría de las especies de peces marinos que no tienen un estómago funcional al inicio de la alimentación exógena, el alimento vivo como rotíferos y *Artemia* es esencial para un crecimiento óptimo. En cambio, se ha observado que para estas mismas especies el crecimiento y la supervivencia son más bajos cuando en la primera alimentación se ofrecen alimentos artificiales en lugar de rotíferos y *Artemia* (Jones *et al.*, 1993; Watanabe y Kiron, 1994), es por ello, que en la mayoría de la larvicultura de peces marinos como la totoaba, especie del estudio sigue dependiendo del alimento vivo como primera fuente de alimentación exógena, al menos durante los primeros 14 días dpe, esto podría deberse a que el consumo del alimento vivo induce a los estímulos visuales y químicos de las larvas en cultivo, además de que las enzimas presentes en el alimento vivo contribuyen a la digestión del alimento cuando son consumidos por las larvas y por último, también podría deberse a que existen diferencias en la digestibilidad entre los alimentos vivos y las microdietas artificiales, las cuales son usualmente atribuidas a las diferentes fuentes

de macronutrientes de las que están compuesta, lo cual afecta la digestibilidad de las mismas (García-Ortega, 2000).

Como la mayoría de los organismos, los peces requieren una fuente de energía para alimentar sus sistemas y procesos corporales. El cual incluye el crecimiento, el metabolismo y reproducción (Zambonino Infante y Cahí, 2001). La mayoría de los peces cuentan con estructuras de alimentación evolucionadas y mecanismos digestivos que les permiten explotar distintas variedades de fuentes de alimentos tanto vegetales como animales. Debido a esto, el tracto digestivo en los peces cuenta con múltiples adaptaciones para la absorción y descomposición de los nutrientes esenciales, el cual incluye la liberación de enzimas y las áreas de superficie absorbente (Moyle y Cech, 2004). Las enzimas proteolíticas se encuentran en tres regiones del tracto digestivo, el estómago (pepsina), páncreas (tripsina y quimotripsina) e intestino (enzimas membranosas y citosólicas). Las cuales tienen un creciente nivel de especificidad hacia la proteína y cadenas polipeptídicas (Zambonino-Infante y Cahu, 2007), por ello la importancia de poder diferenciar la maduración de cada una de las regiones del sistema digestivo dependiendo del tipo de alimento que reciben en cada etapa de desarrollo. Los cambios anatómicos y fisiológicos que sufren las larvas durante el desarrollo, son factores claves que definen sus requerimientos nutricionales, pues se sabe que las larvas de peces que carecen de un estomago funcional al momento de la eclosión dependerán del alimento vivo como dieta inicial, considerando que el mayor constituyente del alimento vivo es la proteína, la capacidad proteolítica para la digestión puede ser considerada como la más importante durante la etapa larvaria temprana en peces (García-Ortega, 2000).

Al dpe 4, con la apertura de la bucofaringe, las larvas de totoaba mostraban un tracto digestivo con forma de un tubo recto indiferenciado, el cual esta tendido dorsalmente debido a la gota de aceite. Estos resultados coinciden con los de Govoni (1980), de acuerdo a los cuales el tracto digestivo de las larvas de peces marinos es un tubo recto sin diferencias morfológicas e histológicas que también se encuentra sobre la vesícula vitelina y que al momento de la absorción del saco vitelino se pueden observar varias regiones con diferencias histológicas y funcionales. Una vez que el saco vitelino se absorbió por completo y las larvas dependían únicamente de una alimentación exógena, el tracto digestivo contaba con una bucofaringe bien formado, así como un esófago parcialmente diferenciado y un intestino dividido en tres regiones (intestino prevalvular, posvalvular y recto). Al final del período experimental en cada uno de los tratamientos al dpe 28, hubo cambios importantes en la morfología y organización histológica del sistema digestivo de la larva, sobre todo, en el T4 donde la larva fue alimentada con Artemia y microdieta desde el dpe 12 apareciendo grandes pliegues longitudinales en la parte esofágica mediana y posterior. Estas características sugirieron el desarrollo completo de un sistema digestivo. De igual manera, el plegamiento de la mucosa esofágica, así como la diferenciación de las glándulas gástricas y la formación del estómago. Debido a esto, la estructura y forma del sistema digestivo es parecido al de los juveniles y adultos (Galaviz et al., 2015). Así mismo, la presencia de células caliciformes, las cuales secretan mucinas, juega un papel importante en la protección de la mucosa contra ataque bacteriano, daño físico y químico (Allen, 1989). Antes del desarrollo de las glándulas gástricas, la digestión y absorción de nutrientes en las larvas de peces marinos, se basa principalmente en una digestión

alcalina, principalmente enzimas digestivas secretadas por el páncreas e intestino. Debido a la presencia vacuolas en el intestino posvalvular y acidófilos supranucleares, la pinocitosis y digestión intracelular en larvas de peces, es propuesta como el principal mecanismo de absorción de proteínas durante la ausencia de un estómago funcional (Govoni *et al.*, 1986). Durante ese periodo del desarrollo de la larva de totoaba (dpe 4-20), el intestino prevalvular es el sitio principal del tracto digestivo para realizar una digestión proteolítica extracelular, esto debido a que posee un pH alcalino, así como la presencia de tripsina la cual es secretada por el páncreas exocrino (Walford y Lam, 1993; Zambonino Infante y Cahu, 2001). En el presente estudio, al dpe 20, las larvas de los tratamientos 3 y 4 el estómago ya empieza diferenciarse, sin embargo, no fue clara la presencia de glándulas gástricas, la incidencia de vacuolas supranucleares (caliciformes) en la mucosa intestinal incrementó, esto posiblemente a un cambio en el proceso de digestión de las proteínas contenidas en los alimentos suministrados en la dieta, que consistía principalmente en microdieta. La secreción de ácido clorhídrico, así como enzimas producidas por las glándulas gástricas (pepsina) reduce la actividad pinocitótica, así como la digestión intracelular por enzimas citosólicas intestinales (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Debido a esto, se promueve la digestión de proteínas extracelulares (Govoni *et al.* 1986).

El desarrollo del estómago en larvas de *T. macdonaldi* fue observado en el dpe 20, sin embargo, en el dpe 28 fueron observadas las primeras glándulas gástricas, con mayor notoriedad en los T3 y T4, lo que indica que esta especie puede digerir alimento formulado a partir de este día, sin embargo, es probable que glándulas gástricas puedan diferenciarse días antes del dpe 20, sobre todo en los T3 y T4. De

acuerdo a Baglolle *et al.* (1998), el desarrollo de las glándulas gástricas se considera el último evento importante en el desarrollo del tracto digestivo y algunos autores sugieren su presencia como un indicio del final del período larval, y quizá el inicio de la etapa juvenil (Tanaka, 1972; Bisbal y Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 2003). El desarrollo completo del estómago funcional puede aumentar la capacidad digestiva del sistema gastrointestinal, debido a la producción de pepsina y ácido clorhídrico producido por las glándulas gástricas, que implica el establecimiento de digestión ácida y una digestión extracelular de proteínas más eficiente (Yufera y Darias, 2007), y por lo tanto, mejorar la digestión de las proteínas intracelulares que ocurren en el intestino posterior (Govoni *et al.*, 1986). Es por este motivo que el desarrollo completo del estómago juega un papel importante en la capacidad digestiva cuando la alimentación de las larvas cambia de alimento vivo a alimento inerte (Lee y Litvak, 1996; Falk-Petersen y Hansen, 2001).

El alimento vivo como rotíferos y *Artemia* pueden influenciar en la ingestión, digestión y asimilación de las dietas formuladas en los cultivos larvarios de peces durante las primeras etapas de desarrollo, esto debido a que estimula las respuestas endocrinas de la larva, lo cual hace que las secreciones de enzimas digestivas sean activadas durante los primeros días de desarrollo (Kolkovski *et al.*, 1997; Koven *et al.*, 2001). El uso de una co-alimentación temprana, puede ayudar en los cultivos de larvas de peces, debido al ahorro del uso de alimento vivo y manipulación del sistema de cultivo, sin embargo, el inicio de una co-alimentación es especie-específico y debe de ir acorde a la maduración del sistema digestivo (Cahu y Zambonino Infante, 2001). Cahu y Zambonino-Infante 2001 mencionan que las larvas de peces marinos tienen especificaciones diferentes en cuanto a la

digestión y requerimientos nutricionales se refiere, esto en comparación con los juveniles, debido a que los mecanismos de digestión y absorción cambian durante el desarrollo. Nhu *et al* 2010 demostró que con una co-alimentación temprana en larvas de cobia (*Rachicentron canadum*) a partir del dpe 8-23 con estadios umbrella de *Artemia franciscana* y microdieta Proton® presenta mejores resultados en crecimiento en peso y longitud, así como una mayor supervivencia en comparación al uso únicamente de alimento vivo (rotífero y *Artemia franciscana*) de acuerdo a lo reportado en otro estudio realizado por el mismo autor Nhu *et al* 2009. Por otra parte, Aristizábal *et al* 2006 demostró que con una alimentación conjunta a partir del dpe 20-25 en larvas de besugo (*Pagrus pagrus*) con nauplios de *Artemia* enriquecida (DHA-Ce, Oriental Ind., Japan) y microdieta (Otohime B1, B2, C1 y C2, Nisshin Inc., Japan) presenta mejores resultados en crecimiento en peso y en supervivencia en comparación a la alimentación tradicional. Chang *et al* 2006, demostró que con una alimentación conjunta en larvas de *Cynoglossus semilaevis* con una baja ración alimento vivo enriquecido product-50DE (Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai, China) y microdieta [New Love Larva No. 2, particles <0.3 mm, from Linjian Com., Ltd (Shimonoseki, Japan)], presenta resultados más altos en cuanto a la tasa de crecimiento específico y supervivencia se refiere. En este trabajo totoaba presentó un menor crecimiento y supervivencia con una co-alimentación en comparación a una alimentación tradicional. En base a lo mencionado por Cahu y Zambonino-Infante 2001, en cuanto a los requerimientos nutricionales en larvas de peces marinos, totoaba presenta una maduración del sistema digestivo más tardía (>dpe 18) que las especies mencionadas, es por eso que debido a que se forzó a la larva a consumir una microdieta cuando presenta un sistema digestivo inmaduro,

incrementa la mortalidad así como una disminución en crecimiento, debido a que la larva concentra su energía en digerir un alimento el cual no puede aprovechar por completo y por ende, no puede concentrar su energía únicamente a crecimiento (Martínez-Porchas *et al.* 2009). Así mismo, en larvas de peces la morfología y algunas vías metabólicas son diferentes en comparación con los juveniles o adultos. Estas disminuyen a lo largo del período larvario mediante la maduración de algunos órganos y tejidos. Mediante la aparición de la actividad de una amplia gama de enzimas digestivas que van en aumento o disminución. Así mismo las larvas, en base a la composición nutricional de la dieta, dependerá la capacidad para asimilar los nutrientes y adaptar sus enzimas digestivas y los procesos metabólicos (Cahu y Zambonino Infante, 2001).

## **VIII. Conclusiones**

En el presente estudio los resultados indicaron que no se presenta diferencias significativas en los distintos tratamientos que se implementaron, a diferencia de la longitud en el dpe 14 del T1 donde se presenta una ligera diferencia. Sin embargo, las tendencias son crecimientos, longitud y supervivencias en el T1 y T2, los cuales representan un protocolo de alimentación tradicional y con doble ración. Para el T3 y T4, los cuales representan una co-alimentación, los resultados indicaron que una administración de microdieta a temprana edad (dpe 4 y dpe 12) no presenta diferencias significativas en crecimiento, longitud y supervivencia, sin embargo, las tendencias son menores en comparación a los tratamientos T1 y T2. Por otra parte, en base a los resultados obtenidos mediante los cortes histológicos, una co-alimentación mejora el desarrollo del sistema ontogénico al dpe 28, esto debido a la presencia de grandes pliegues longitudinales en la parte esofágica mediana y posterior. Además de un estomago escamoso el cual indica que la larva depende únicamente de una digestibilidad acida, las cuales son características presentes en los juveniles y adultos.

## **IX. Recomendaciones**

Tomando en cuenta, que totoaba puede desovar millones de huevos de manera parcial durante días y que de acuerdo a la maduración del sistema digestivo de las larvas en el tratamiento 4 que su protocolo de cultivo consistió en iniciar la co-alimentación al dpe 12 se podría optar por utilizar el protocolo de co-alimentación a partir del dpe 12 en adelante, aunque se sugiere que se realice un segundo estudio donde se lleven a cabo protocolos de co-alimentación al dpe 12, 15, 18, 21 y 25 complementando el estudio con análisis de actividad de enzimas digestivas, incidencias de deformidades y expresión de genes para determinar el protocolo de alimentación óptimo para la especie.

## X. Bibliografía citada

- Allen, A. 1989. Gastrointestinal mucus. In: Schultz, S.G., Forte, J.G. y Raumer, B.B. (Eds.), Handbook of Physiology. Section 6. The gastrointestinal lumen, pp. 359-382. Bethesda: American Physiological Society.
- Aristizábal, E. O. y Suárez, J. 2006. Efficiency of co-feeding red porgy (*Pagrus pagrus* L.) larvae with live and compound diet. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 41: 2, 203-208.
- Baglole, C.J., Murray, H.M., Goff, G.P., Wright, G.M., 1998. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology* 51, 120–134.
- Bisbal, G.A. y Bengtson, D.A., 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology* 47, 277–291.
- Cañavate J.P. y Fernández-Díaz C. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture*. 174: 3–4, 255-263.
- Conceição, L and Tandler, A, 2018. Success Factors for Fish Larval Production. Wiley Blacwell. Pp. 483
- Chang Q., Liang M.Q., Wang J.L., Chen S.Q., Zhang X.M. y Liu X.D. 2006. Influence of larval co-feeding with live and inert diets on weaning the tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture Nutrition*. 12: 135-139.
- El Kertaoui N., Lund Ivar., Assogba H., Domínguez D., Izquierdo M. S., Baekelandt Sébastien., Cornet V., Mandiki S. N. M., Montero Daniel. y Kestemont Patrick. 2019. Key nutritional factors and interactions during larval development of pikeperch (*Sander lucioperca*). *Scientific Reports*. 9: 7074.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceição, L. E. C., Gavaia, P. J., Ribeiro, L. y Dinis, M. T. 2009. Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouthopening promotes growth at weaning. *Aquaculture* 288: 264–272.

- Falk-Petersen, I.B., Hansen, T.K., 2001. Organ differentiation in newly hatched common wolffish. *Journal of Fish Biology* 59, 1465-1482.
- Fosse P. J., Mattos D. C., Cardoso L D., Radael, M. C., Filho, João Carlos F. F., y Vidal Júnior M. V. 2018. Duration of co-feeding on the Nishikigoi *Cyprinus carpio* larvae during weaning from live to inert food in an indoor system. *Ciência Rural*, 48: 4.
- Galaviz, M. A., López, L. M., Garcia-Gasca A., Alvarez-Gonzalez, C. A., True, C. D., y Gisbert, E. 2015. Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41: 1117–1130.
- García, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de Artemia y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Govoni, J. J., Boehlert, G. W. y Watanabe, Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes* 16: 59-77.
- Govoni, J 1980 falta est cita .... La tienes en el texto
- Jones, D.A., Kamarudin, M.S., Le Vay, L., 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 199-210.
- Flores Rojas A. A. 2011. Uso del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* para el mejoramiento del crecimiento y supervivencia en el cultivo piloto de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. Mazatlán, Sinaloa.
- Gunvor Øie., Kjell Inge Reitan., Jan Ove Evjemo., Josianne Støttrup., y Yngvar Olsen. 2011. *Larval Fish Nutrition*. Holt 1rst edition. John Wiley & Sons, Inc.

- Kolkovski, S., A. Tandler y M.S, Izquierdo. 1997. Effect of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 148. 313-322.
- Koven, W., S. Kolkovski, E. Hadas. K. Gamsiz y A. Tandler. 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194. 107-121.
- Kraul S. 1989. Production of live prey for marine fish larvae. *J. World Aquac. Soc.* 9: 595-607p.
- Lee, G., Litvak, M., 1996. Weaning of metamorphosed winter flounder *Pleuronectes americanus* reared in the laboratory: comparison of two commercial artificial diets on growth, survival and conversion efficiency. *Aquaculture* 144, 251–263.
- Ljubobratović *et al.* (2015) faltaaaaaaaaaMartínez-Porchas M, Martínez-Córdova L. R, Ramos-Enríquez R. (2009). Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. *Revista electrónica de Veterinaria.* 10: 1695-7504.
- Mata-Sotres J. A., Lazo J. P., Baron-Sevilla B. 2015. Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture.* 437, 292-296.
- Fco. Javier Moyano López 2006. Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en la nutrición. En Editores: L. Elizabeth Cruz Suarez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto, David A. Villareal Cavazos, An C. Puello Cruz y Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo Leon, México. ISBN 970-694-333-5.
- Moyle, P., y Cech., J.J. Jr. 2004. *Fishes. An Introduction to Ichthyology*, 5th edition. Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.
- Nhu V., Dierckens K., Nguyen H., Hoang T., Le T., Tran T., Nys C., y Sorgeloos P. 2010. Effect of early co-feeding and different weaning diets on the performance of cobia (*Rachycentron canadum*) larvae and juveniles. *Aquaculture.* 305: 52-58.

- Nhu, V. C., Dierckens, K., Nguyen, T. H., Tran, M. T., Sorgeloos, P., 2009. Can umbrella-stage *Artemia franciscana* substitute enriched rotifers for cobia (*Rachycentron canadum*) fish larvae? *Aquaculture* 289, 64–69.
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M., Ortiz-Galindo, J., 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219, 633- 644
- Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thébaud, L. Mugnier C., 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live preys? *J. World Aquac. Soc.* 24, 211-224
- Rosenlund G., Stoss J. y Talbot C. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture*, 155: 1–4, 183-191.
- Roo FJ, Socorro J, Izquierdo MS, Caballero MJ, Hernández-Cruz CM, Fernández A, Fernández-Palacios H. 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation to changes in the digestive tract and larval feeding habits. *Aquaculture* 179: 499–512.
- Rónyai, A., yFeledi, T. 2013. Co-feeding as a weaning procedure in sterlet (*Acipenser ruthenus*) larvae. *Aquaculture Research*, 44: 1489–1491.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yufera, M., 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130, 79-82.
- Sealey W.M. y Gatlin D.M. 2001. Overview of nutritional strategies affecting the health of marine fish. In: *Nutrition and Fish Health* (ed. by Lim C., Webster C.D.). pp. 103-118, Food Products Press, Binghamton, N.Y.
- Stejskal, V., Matoušek, J., Prokešová, M., Podhorec, P., Šebesta, R. y Drozd, B. 2017. Combined effect of weaning time and co-feeding duration on growth and survival of peled (*Coregonus peled* (Gmelin)) larvae. *Aquaculture Nutrition*. 24(1): 434-441.
- Tanaka, M., 1972. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. Part 5: Epithelial changes in the posterior gut and protein digestion. *Japanese Journal of Ichthyology* 19, 172-180.
- True C. D. 2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas

Km 103 Carretera Tijuana – Ensenada Código Postal 22860, Ensenada,  
Baja California.

Vallés-Bueno R. 2013. Reproducción en cautividad y cultivo de la Corvina (*Argyrosomus regius*). Universidad de Barcelona. 149p.

Vidar Helvik J., Hamre K., Hordvik I., Merren T. V. D., Ressem H., Scharl M., Tveiten H., Øie G. y Sveier H. 2009. The fish larva: a transitional life form the foundation for aquaculture and fisheries. The Research Council of Norway. 74p.

Walford, J. y Lam, T. J. 1993. Development of the digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109: 187-205.

Watanabe, T. y Kiron, V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124, 223-251. de Wet, P.J., 1983. Effect of processing on nutritive value of feeds: Protein. In: Handbook of Nutritive Value of Processed Food, (Rechcigl, M. ed.), pp. 321-341. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.

Yúfera, M. y Darias, M.J., 2007. Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole *Solea senegalensis*. *Aquaculture* 267, 94-99.

Zambonino Infante J.L. y Cahu C., 2001. Ontogeny of the intestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130: 477-487.

Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, C.L., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268, 98-105.