



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MADURACIÓN Y DESOVE DE HEMBRAS DE MERO ROJO (*Epinephelus morio*) EN CAUTIVERIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Nestor Armando Quijano Reyes

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Xavier Chiappa Carrara
ENES Mérida y UMDI Sisal, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Daniel Arceo Carranza
Dra. Gabriela Gaxiola Cortés
UMDI SISAL, UNAM
Dr. Marcial Arellano Martínez
CICIMAR, IPN

ASESORA EXTERNA:

Dra. Claudia Verónica Durruty Lagunes
UMDI SISAL, UNAM

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO | ABRIL, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mi familia: Mamá, esto ha sido posible en gran parte por ti, por siempre apoyarme, motivarme y creer en mí como nadie y desde el principio. Todos mis logros son tuyos también.

A mi hermana y a mi papá, que de igual forma siempre me han alentado y apoyado con su cariño, que siempre se han preocupado por mí. Con ustedes los buenos momentos y las risas siempre me han hecho disfrutar al máximo esta vida.

A cada integrante en mi familia que me ha inspirado y dado el ejemplo de diferentes maneras; con su experiencia siempre me han enseñado, dándome así sus mejores consejos. Por los que siguen en esta vida y por los que tuvieron que partir antes lo esperado, esto es por ustedes.

“En este mundo, una especie sólo puede prosperar cuando todo lo que la rodea prospera también.” – Sir David Attenborough

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con el número **1045609** para la realización de este proyecto de posgrado.

Al apoyo del Proyecto Biotecnología del mero rojo *Epinephelus morio* con numero de convenio 56013 UNAM- Secretaría de Pesca y Acuicultura Sustentable de Yucatán.

A la UNAM y proyecto mero UNAM por el financiamiento, instalaciones y bienes materiales suministrados para llevar a cabo cada tarea para el inicio, desarrollo y culminación de este proyecto.

Al Dr. Xavier Chiappa Carrara por su invaluable apoyo, calidez humana incomparable, dirección y paciencia durante más de dos años, tiempo en el cual me pude percatar de la excelente persona y profesionista que es, no me queda más que expresarle mi admiración y agradecerle infinitamente. Al Dr. Daniel Arceo por compartir sus conocimientos especialmente en el procesamiento estadístico de los resultados de este proyecto además de sus atinadas observaciones y comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo. A los Doctores Marcial Arellano y Gabriela Gaxiola por el tiempo invertido en las revisiones de esta tesis, así como sus recomendaciones basadas en su amplia experiencia. A la Dra. Claudia Durruty por ser una guía con sus enseñanzas y paciencia antes y durante la etapa experimental del proyecto y a todo el comité tutorial que sin su apoyo y cooperación este proyecto no hubiera sido posible, gracias totales.

A la maestra Maribel Badillo por cada momento incluso antes de realizar este proyecto desde la estancia de investigación en la licenciatura con la cual pude acercarme al equipo de proyecto mero UNAM, hasta los análisis y técnicas aplicadas en los cortes histológicos de las muestras de las gónadas. Su dedicación y apoyo siempre fue con la mejor de las disposiciones sin pedir nada a cambio, por esto y mucho más siempre le tendré admiración le estaré agradecido.

A la técnico y habitante de Sisal Concepción Uc que ha sido y es una pieza clave para el correcto funcionamiento y mantenimientos de los meros y las instalaciones, pues su amplia experiencia, apoyo y compañía durante estos dos años fueron invaluable para la elaboración de este proyecto.

A mi amigo Marco Salas que durante su estancia al realizar su servicio social nos apoyó con tareas de mantenimiento, así también su compromiso, excelente actitud y buena compañía fueron un apoyo inigualable, gracias por los buenos momentos y a hacer más llevaderos los días difíciles.

Al Dr. Manuel Valenzuela por sus valiosos consejos, enseñanzas y apoyo durante los muestreos y tareas de mantenimiento.

Al Dr. Martín Arenas por el apoyo y guía en la elaboración de los análisis para la estimación de nutrientes en la alimentación suministrada a los peces.

Al Señor José y a los pescadores que sin su valiosa participación en la colecta de los meros este proyecto no hubiera sido posible.

A toda mi familia en especial a mi mamá, a mí hermana y a mí papá, por su cariño y soporte en toda mi formación personal y académica, sin ustedes yo no habría llegado tan lejos.

A César Ríos por ser un gran amigo que contagia de su entusiasmo por la ciencia, que me ayudó en las clases durante los primeros dos semestres y que en todo momento estuvo ahí para escuchar y prestar su hombro ante cualquier dificultad que se me presentó.

A mi entrañable amiga, mi pareja y a una de las personas que más admiro. Gracias por cada momento en el que me mantuviste a flote, a siempre impulsarme y ayudarme a mejorar, por que solo tu sabes el sacrificio, tiempo y trabajo que requerí para completar esta misión, no me imagino el haber recorrido esta senda sin tu apoyo, cariño y comprensión. Por que cada meta cumplida en mi historial no solo me pertenece a mí si no a los dos. Gracias Ariana te amo con todo mi ser.

Índice

.....	0
Índice	4
Resumen.....	7
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
Panorama de la acuicultura mundial y en México	11
Las hormonas en la reproducción	12
Reproducción de meros en México	14
Inducción hormonal en cautiverio	16
JUSTIFICACIÓN	17
HIPOTESIS	18
OBJETIVOS GENERALES	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Colecta de organismos y condiciones en cautiverio	19
Dieta de los peces	20
Biopsias y aplicación de hormona.....	21
Análisis estadísticos.....	23
RESULTADOS	24
Condiciones de cautiverio	24
Biopsias	26
Seguimiento de la maduración final	27
Caracterización del desove y descripción de los huevos	36
CONCLUSIONES	42
ANEXOS	43
LITERATURA CITADA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Fases de la maduración de la gónada, tomado de Brown-Petersen et al. (2011)	14
Figura 2. Condiciones de los estanques donde se mantuvieron a los peces durante el estudio. En la figura 2 A se ilustran los estanques interiores 1 y 2 y en la figura 2 B, el estanque exterior.	20
Figura 3. Esquema del sistema de circulación semi-cerrado, se muestran los estanques de interior donde se mantuvieron a los adultos de <i>E. morio</i> y las tinas (en color gris) para los peces que fueron seleccionados para recibir la hormona. Las flechas indican el flujo del agua.....	23
Figura 4. Valores de la mediana de las temperaturas (°C) de cada estanque durante la temporada de reproducción, M1-estanque de interior1, M2-estanque de interior 2, M21-Estanque de exterior. Se muestran los resultados de la prueba estadística Kruskal Wallis.	24
Figura 5. Muestras con ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos presentes en las hembras seleccionadas para la aplicación de dosis de hormona, en la primera columna se encuentran las fotografías de las primeras biopsias durante febrero del 2021 y las de la tercera columna en abril del 2021. Las secciones A -C corresponden a la hembra 3, D-F a la hembra 2 y G-I a la hembra 1. En las fotos A, B y D se observan solo ovocitos previtelogénicos, en las E, G y H se observan tanto previtelogénicos como vitelogénicos y en el resto solo ovocitos vitelogénicos	29
Figura 6. Porcentaje de ovocitos vitelogénicos con diámetros mayores y menores de 450 μm de las hembras maduras previo a la aplicación de la hormona, los datos corresponden a 50 ovocitos medidos por pez.	30
Figura 7. Frecuencia de los diámetros de los ovocitos vitelogénicos en las tres hembras inyectadas, en el eje X se encuentran los diámetros de los ovocitos en μm y en el eje Y el número de ovocitos (AI- antes de la inducción, PI-Posterior a la inducción)	31
Figura 8. Gráfica de cajas y bigotes para la comparación entre los diámetros (μm) de los huevos expulsados por cada una de las hembras (Hembra 1, Hembra 2 y Hembra 3) inyectadas con LHRH-a.....	33
Figura 9. Corte histológico de un fragmento de gónada extraído de la hembra 2 durante la temporada reproductiva, I.- Sección donde se señala un ovocito en Vitelogénesis secundaria temprana (Vt1) vitelogénesis secundaria tardía (Vt2) a 4x. II.- Se señalan los ovocitos en fase de Vitelogénesis primaria o alveolos corticales (Ac), y Atrésicos (At) a 10x escalas igual a 100 μm	34
Figura 10: Ovocitos en diferentes estadios observados A) en fresco y B) en los cortes histológicos, se encuentran numerados con las fases descritas por Brulé et al. (1999), excepto por AT que no está incluida en la descripción. Todas las escalas equivalen a 100 μm -se refiere a ovocitos primarios a 10x, III- a	

Vitelogénesis primaria a 10x, IV- Vitelogénesis secundaria temprana a 4x y AT-como Atrésicos a 10x.....	35
Figura 11. Protrusión del gonoporo y abultamiento en la zona abdominal en la hembra 3 durante el masaje abdominal para inducir el desove.	36
Figura 12. A. Ovocitos vitelogénicos de la hembra 3 previo a la inducción hormonal observados en 4x. B. Huevos obtenidos mediante stripping de la misma hembra 48 horas después de la inducción hormonal vistos en 4x, escala equivalente a 500 μm	37
Figura 13. Gráfico de dispersión y valores de correlación de Pearson. DFO. diámetro del huevo (μm); DGA: diámetro de la gota de aceite (μm).	38
Figura 14. Pasos a seguir para obtener el desove mediante masaje abdominal y separación de los huevos para realizar el conteo por método volumétrico.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis suministradas a cada hembra de E. morio con ovocitos vitelogénicos. DU-Dosis única, DI-Dosis inicial y DR-Dosis de resolución.	22
Tabla 2. Temperatura promedio del agua de los estanques por mes, durante el periodo de julio del 2019 a abril del 2021 (DE: Desviación estándar, SR: Sin registros).	25
Tabla 3. Valores mensuales promedio de la temperatura durante la temporada de reproducción de enero a abril del 2021 (DE: Desviación estándar, * meses durante los cuales se mantuvo un sistema cerrado con temperatura controlada en los estanques de interior).	26
Tabla 4. Datos obtenidos durante las últimas biopsias en la temporada reproductora de febrero a mayo del 2021 (ID Pez- Clave de identificación de marca del pez, * organismos que no se contemplaron en un inicio, pero al presentar condiciones de maduración fueron incluidos durante las biopsias.	27
Tabla 5. Diámetros de ovocitos y características de hembras maduras que fueron sometidas a inducción hormonal. (DAI-diámetro antes de la inducción, DPI-diámetro posterior a la inducción, PI-posterior a la inducción *Dosis real suministrada a cada organismo n- número de ovocitos medidos.	28
Tabla 6. Valores de p obtenidos con pruebas de Shapiro Wilks (SW) y Kruskal Wallis (KW) para el diámetro de ovocitos antes y después de la inyección para cada hembra. En la cuarta columna los valores de p en prueba de KW en los diámetros finales de los ovocitos.* 24 horas después de la dosis de resolución.....	32
Tabla 7. Comparación de los estadios de ovocitos entre muestras procesadas mediante técnica histológica y las observaciones en fresco durante las biopsias.	35

Resumen

El mero rojo es objeto de una de las principales pesquerías del Golfo de México, siendo la principal pesquería de “escama” de la península de Yucatán. Ello conlleva que una gran parte de la economía de la zona costera dependa de este recurso. La pesca del mero rojo sin planes adecuados y normas de manejo ha repercutido en la disminución de la biomasa capturada en los últimos 30 años, incluso desde hace más de una década hay evidencias para considerar como sobreexplotado al stock de esta especie. Debido a esto es urgente elaborar y poner en práctica estrategias sustentables que tengan como objetivo su recuperación, para así poder contribuir a la preservación del recurso. Una alternativa probada con otras especies es la reproducción en cautiverio, y para ello se han utilizado diversas hormonas para inducir el desove entre las más efectivas se encuentran las hormonas análogas, como por ejemplo la Hormona análoga Luteinizante. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue conocer la dosis adecuada de esta hormona para inducir la maduración final en tres hembras de mero rojo en cautiverio bajo condiciones de cautiverio. Para lograr dicho objetivo 16 peces fueron mantenidos durante 18 meses en tres estanques circulares bajo condiciones de luz natural, alimento formulado, flujo continuo de agua marina y control de la temperatura en uno de los estanques y solo durante la temporada reproductiva. La alimentación consto de dos dietas, una para la temporada de reposo o preparación de las gónadas y otro para la temporada reproductiva, ambas con un porcentaje de proteína mayor al 45 % y de lípidos de 7% y 14% respectivamente. El avance o desarrollo sexual de las gónadas fue monitoreado mediante biopsias por medio de una cánula durante la temporada de reproducción, una vez que se observaron ovocitos maduros (vitelogénicos) se procedió a separar a las hembras candidatas en tinas individuales para facilitar la observación así como la manipulación e inyectar la hormona LHRH-a con tres dosis distintas (Una dosis por hembra) con una jeringa debajo de la aleta pectoral en las tres hembras que presentaron los ovocitos maduros. Para conocer si hubo diferencias significativas entre los diámetros de los ovocitos posterior a la aplicación de las dosis de la hormona y la temperatura entre los estanques durante la temporada reproductora, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis y un análisis de correlación de Pearson para observar la correlación entre el diámetro del huevo y el de su gota de aceite. El desove se obtuvo a partir de masaje abdominal en una de las tres hembras inyectadas 48 horas después de la inyección, la principal diferencia encontrada entre esta hembra y las otras dos fue el diámetro de los ovocitos antes la inyección (496 μm) y la protrusión del gonoporo antes de

realizar el masaje. La dosis suministrada fue de 184 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo. Los huevos tuvieron un diámetro promedio de 903 μm , las gotas de aceite de 183 μm y se estimó una cantidad de 192,000 huevos. Como conclusiones y recomendaciones para estudios posteriores se estableció que a una temperatura promedio de entre 24 y 26 $^{\circ}\text{C}$ es posible observar maduración y por ende ovocitos vitelogénicos. Para la aplicación de la hormona se sugiere que el promedio del diámetro de los ovocitos sea mayor a 450 μm al momento de inyectar la hormona LHRH-a y a una concentración próxima a 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para tener una mayor probabilidad de obtener desoves.

Abstract

The red grouper is one of the most important species among the fisheries in the Gulf of Mexico, it is considered the principal "scale" fishery within the Yucatan Peninsulas. This implicate that a great part of the economy across de coastal zone depends on the use of the resource. The poor planification and the inappropriate planification for the red grouper fishery have diminished the populations on the last 30 years, since more than a decade there are proofs to consider the stock of this species as overfished. Thus, is very important to elaborate sustainable strategies that pursue the recovery of the fish stock populations to preserve the resource. An alternative proven in other species is the reproduction on captivity, then many hormones have been used to induce spawning on aquaculture studies among the most effective hormones, the agonists specifically the Luteinizing hormone realizing hormone agonist (LHRHA-a) stand out. Therefore, the objective of this work was to know the adequate dose of this hormone to induce final maturation in three red grouper females in captivity under captive conditions. To achieve this objective, 16 fish were kept for 18 months in three circular ponds under conditions of natural light, formulated food, continuous flow of seawater and temperature control in one of the ponds and only during the reproductive season. The feeding consisted of two diets, one for the resting season or preparation of the gonads and the other for the reproductive season, both with a percentage of protein greater than 45% and lipids of 7% and 14%, respectively. Once mature oocytes (vitellogenic) were observed, the candidate females were separated into individual tubs to facilitate observation and manipulation, and the LHRH-a hormone was injected in three different doses (one dose per female) with a syringe under the pectoral fin in the three females that presented mature oocytes. To determine if there were significant differences between oocyte diameters after the application of the hormone doses and temperature between ponds during the breeding season a Kruskal-Wallis test was used and a Pearson correlation analysis was obtained to assess the correlation between egg diameter and egg oil drop diameter. Spawning was obtained from abdominal massage in one of the three females injected 48 hours after injection. The main difference found on the spawner female was the diameter of the oocytes before injection (496 μm) and the protrusion of the gonopore before massage. The dose administered was 184 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 192,000 eggs were estimated and a 903 μm average diameter was found, for the oil droplets an average of 183 μm was calculated. As conclusions and recommendations for further studies, it was established that is possible to observe maturation and vitellogenic

oocytes in temperatures between 24 and 26 °C. For the application of the hormone, it is suggested that the average diameter of the oocytes be greater than 450 µm when injecting the LHRH-a hormone and a concentration close to 160 µg/ kg, in order to have a greater probability of obtaining spawning.

INTRODUCCIÓN

La pesquería de mero en el Golfo de México y mar Caribe es una de las más importantes para el consumo local y de producción industrial, que coadyuva al desarrollo regional y a la economía familiar como fuente de trabajo de aproximadamente 16,000 familias de pescadores sólo en el banco de Campeche (DOF, 2014). El mero rojo (*Epinephelus morio*) es la especie más importante de la pesquería multiespecífica que se lleva a cabo en esta zona, ya que representa del 55 al 60% de la captura total (Johnson *et al.*, 1998; Giménez-Hurtado *et al.*, 2005). En el ámbito nacional, la captura promedio de mero ha sido de 11,243 toneladas anuales de 2006 a 2011, con una derrama económica de 334 millones de pesos; Yucatán contribuye con el 85% de la captura total del Golfo de México y el 77% a nivel nacional (SAGARPA, 2011). El último registro de captura para esta pesquería multiespecífica es del 2018 durante el cual se pescaron 9,494 toneladas a nivel nacional de las cuales 5,715 fueron obtenidas en el estado de Yucatán (CONAPESCA, 2018).

El mero rojo *E. morio* es un pez marino que se distribuye desde las costas de Estados Unidos hasta las de Brasil. Se distingue de otras especies del mismo género porque presenta una coloración dorsal de marrón a café en la cabeza y el cuerpo, y de color rosa a roja en la región ventral. En la sección de los radios de las aletas dorsal y anal tiene una coloración oscura y los márgenes de estas mismas aletas son blancos. Usualmente se observan manchas y motas blancas en la superficie del cuerpo. Alcanza una talla máxima de 95 cm de longitud total (Giménez-Hurtado *et al.*, 2003).

Respecto a su reproducción, el mero rojo es una especie hermafrodita protogínica secuencial (por lo que todos los organismos inician su vida como hembras y alcanzan la madurez sexual como tales al menos una vez, posteriormente, algunos cambian de sexo), realiza fecundación externa, sus huevos y larvas son plantónicos y en el banco de Campeche la talla de primera madurez sexual se ha estimado desde los 38 cm de longitud total (Giménez-Hurtado *et al.*, 2003) hasta los 50.9 cm de longitud furcal (Brulé *et al.*, 1999).

La época reproductora inicia en enero y termina en mayo, con el mayor desove durante los meses de febrero, marzo y abril, aunque varía dependiendo de la zona. Por ejemplo, en la costa norte del estado de Yucatán se ha encontrado un mayor porcentaje de hembras maduras en el mes de febrero (Brulé *et al.*, 1999) y durante marzo a mayo en la región este de banco de Campeche (Moe, 1969). La dinámica espacial es más compleja de lo que se creía con respecto a los movimientos efectuados en las temporadas de reproducción y el resto del año. Previamente se creía que ocurría una migración de adultos sexualmente maduros desde la región occidental del banco de Campeche hacia la zona oriental; sin embargo, realizando un análisis más profundo se encontró que no todos los adultos se mueven hacia la misma dirección y que, si bien el mayor flujo de organismos se dirige a la zona oeste del banco de Campeche, otros se dirigen hacia el norte. Estos movimientos suceden previo a la temporada reproductora (otoño a invierno) y durante la temporada reproductora disminuye el flujo de organismos permaneciendo en estas zonas durante el invierno y al inicio de la primavera comienzan a moverse lentamente hacia la zona este (López-Rocha y Arreguín Sánchez, 2007); por lo que las zonas de reproducción no están bien definidas o simplemente no se agrupan como en otras especies de meros (Shapiro 1987, Sadovy 1996).

Algunos de los estudios que han abordado aspectos reproductores de esta especie son el de Johnson *et al.* (1998), quienes calcularon el índice gonadosomático para determinar la temporada de desove de *E. morio*, la cual según sus resultados ocurre de enero a junio en el este del Golfo de México y sugieren que la temporada más activa ocurre de marzo a mayo. Por otra parte, Brulé *et al.* (1999) describieron el mismo índice y otros aspectos de la biología reproductora como son la talla de primera madurez sexual y la proporción de sexos, en individuos de mero rojo procedentes de la región nerítica y oceánica del Banco de Campeche durante un periodo de 5 años. Se estimó que la temporada de desove ocurre de enero a mayo en la región sur del Golfo de México.

Con respecto a estadios tempranos, hasta el momento el estudio que describe de manera más completa el desarrollo desde huevo, hasta juveniles de mero rojo, corresponde al de Colin *et al.* (1996). Entre sus resultados más relevantes calcularon el diámetro promedio de los huevos (0.95 mm), el número de glóbulos de aceite por huevo y el tiempo de eclosión (30-38 h después de la fecundación).

Como ya se ha señalado, el mero rojo es objeto de una de las principales pesquerías del Golfo de México, siendo la principal pesquería de “escama” de la península de Yucatán. Ello conlleva que una gran parte de la economía de la zona costera dependa de este recurso (DOF, 2014). La pesca del mero rojo sin planes adecuados y normas de manejo ha repercutido en la disminución de la biomasa capturada en los últimos 30 años (DOF, 2014), incluso desde hace más de una década hay evidencias para considerar como sobreexplotado al stock de esta especie (Burgos y Defeo, 2004, Giménez-Hurtado *et al.*, 2005). Debido a esto es urgente elaborar y poner en práctica estrategias sustentables que tengan como objetivo su recuperación (DOF, 2012; DOF, 2014) por lo que es importante reducir el impacto que la pesca tiene sobre las poblaciones naturales de esta especie, para así poder contribuir a la preservación del recurso (Monroy-García *et al.*, 2014).

ANTECEDENTES

Panorama de la acuicultura mundial y en México

La acuicultura en Latinoamérica crece un 20% al año, un porcentaje alto comparándolo con el crecimiento anual a nivel mundial que es del 7%, siendo este el mayor crecimiento entre los otros sectores alimentarios (FAO, 2020a). El crecimiento anual en parte se debe al aumento del consumo de pescado en el mundo. En valores per cápita, el consumo anual de pescado aumentó a partir de 1961 de 9.0 kg peso vivo a 20.3 kg en 2017 (FAO, 2020b).

Es claro que en Latinoamérica esta actividad asciende rápidamente y esto se debe a un aumento importante que, a partir de 1990, se le puede atribuir en gran parte a la actividad que se realiza en Brasil y en Chile. Estos países destacan por su producción de camarón y salmón respectivamente, sin embargo, el resto de zonas costeras en Latinoamérica presentan posibilidades de desarrollo para la maricultura, puesto que existen algunos factores a favor, como son: la presencia de amplios espacios costeros libres de contaminantes, ideales para la ubicación de las instalaciones, así como la existencia de una variedad de especies con potencial desde la perspectiva económica por su alto valor en el mercado, incluso algunas de los géneros *Centropomus*, *Lutjanus*, *Paralabrax* y varias de la familia Carangidae ya fueron estudiadas y hasta cultivadas a nivel piloto. La temperatura

cálida del agua que permite un rápido crecimiento de las especies cultivadas (principalmente la zona norte de México, mar Caribe y América Central), y por último un mercado interno en crecimiento, además de generación de divisas por exportación (Orvay, 2013).

Específicamente en México, la piscicultura marina comenzó a desarrollarse a finales de la década de 1980. Se realizaron estudios de engorda del pámpano en la costa de Baja California Sur y posteriormente estudios biológicos sobre el desarrollo de huevos y larvas de especies de importancia comercial en la costa del Pacífico (Avilés, 2000). Aunque esta actividad tiene potencial de desarrollo por la diversidad de ambientes y especies viables para la crianza en cautiverio, el avance es ínfimo pues las acciones del sector privado, gubernamental e investigación requieren de una mayor coordinación (Orvay, 2013). Dentro del territorio mexicano los esfuerzos han sido dirigidos en mayor medida a las especies del Pacífico tales como la totoaba, pámpano, lenguado, huachinango, pargo y cabrilla en comparación con el Atlántico que solamente han sido estudiados para completar este ciclo el robalo y el mero (Avilés, 2000). La cobia, la corvina, el atún rojo del Atlántico y el esmedregal han sido cultivados desde juveniles o larvas (FAO, 2021). Específicamente, técnicas de reproducción inducida y larvicultura han sido implementadas en instalaciones de nivel piloto-experimental de la UNAM en el puerto de Sisal, Yucatán, con las especies *Centropomus undecimalis*, *Cynoscion nebulosus*, *Ocyurus chrysurus* y en el CIAD- Unidad Mazatlán con *Lutjanus guttatus*, *Centropomus viridis* y *Spheroides anulatus* (Escárcega-Rodríguez, 2020).

Las hormonas en la reproducción

Para entender la reproducción de cualquier especie es necesario comprender el complejo endocrino de cascada llamado eje hipotálamo-pituitario-gónada (similar en todos los vertebrados), el cual mediante regulaciones a nivel fisiológico se encarga del control de la reproducción y otras funciones sexuales. La *cascada* comienza con la producción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo y la estimulación de las células gonadotrópicas en la glándula pituitaria. Estas células sintetizan y secretan dos hormonas, la hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), las cuales son transportadas por el sistema circulatorio hacia los receptores de unión en la membrana de las células gonadales (Pankhurst, 1998). En esta región se sintetizan diversos esteroides y otras hormonas a partir del colesterol que varían de especie a especie y también varían

dependiendo del estadio de maduración sexual (Frish, 2005). A la par ocurre la vitelogénesis, proceso responsable de la síntesis de vitelogenina, la cual sucede en el hígado y es liberada al torrente sanguíneo, su función es actuar como precursora del vitelo el cual provoca un crecimiento del ovocito (Carrillo y Zanuy, 1993; Habibi & Andreu-Vieyra 2007)

En los peces óseos gonocóricos (especies con sexos separados) la hormona FSH es responsable de la vitelogénesis y espermatogénesis y la LH se encarga de la maduración final en las hembras (Peter y Yu 1997). Sin embargo, en los peces hermafroditas es más complejo; en el caso de algunos meros (del género *Epinephelus*) la FSH se encarga de detonar los cambios de sexo y la LH tiene la función principal de mantener los gametos masculinos pero sin un efecto en el cambio de sexo (Chen *et al.*, 2019). Morfológicamente estos procesos de vitelogénesis y espermatogénesis se ven reflejados en el tamaño de las gónadas, y en diversas especies de peces se han descrito y catalogado las fases de maduración de las gónadas en inmaduro, desarrollo, desovador capaz, regresión y regeneración. La etapa de inmaduro se describe como una fase en la cual el pez nunca ha realizado el evento de desove, la de desarrollo como una maduración temprana, pero con ovocitos previtelogenicos, la de desovador capaz como maduración tardía en la que las gónadas están grávidas, con ovocitos vitelogénicos y capaces de efectuar el desove en cualquier momento. La etapa de regresión se caracteriza por la recuperación de la gónada en la que el organismo es sexualmente maduro pero inactivo para la reproducción (Brown-Petersen *et al.*, 2011).

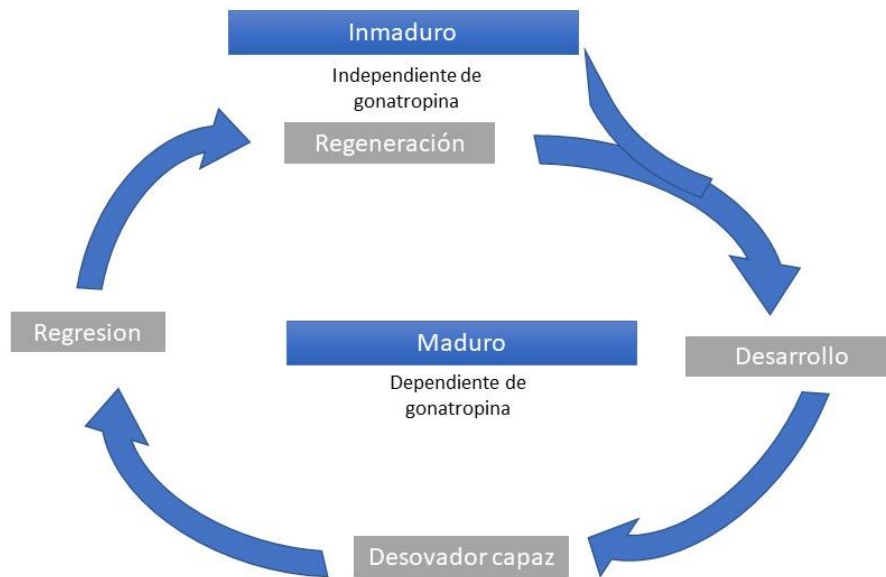


Figura 1: Fases de la maduración de la gónada, tomado de Brown-Petersen et al. (2011)

Reproducción de meros en México

La investigación sobre el desove de los meros u otras especies de la familia Serranidae es escasa, encontrándose pocos estudios publicados; únicamente se ha estudiado a la cabrillera sardinera (*Mycteroperca rosacea*) y a la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Para la primera especie hay dos estudios, el primero fue elaborado por Gracia-López *et al.* (2004) quienes realizaron inducción al desove utilizando la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG). Dos hembras desovaron y obtuvieron una tasa de fecundación del 10% y 0%, las larvas eclosionaron 40 horas después de la fecundación y evaluaron su desarrollo embrionario. El segundo es el de Kiewek-Martínez (2009), quien describió el periodo reproductivo a través del desarrollo gonadal. Las hembras mantenidas en cautiverio desarrollaron ovocitos en estadios de vitelogénesis avanzada a partir de marzo y hasta junio; 38 hembras silvestres fueron inducidas al desove por medio de HCG y Hormona Luteinizante-análoga (LHRH-a) en diferentes concentraciones. Se comprobó

que, de estas dos, la primera hormona produjo un mayor número de huevos y en el caso de los machos una mayor viabilidad del esperma.

Otro estudio de inducción hormonal con *P. maculatofasciatus* es el de Alcántar-Vázquez *et al.* (2016) quienes evaluaron el efecto de LHRH-a en concentraciones de 25, 50 y 100 µg/kg, siendo la primera la que produjo los desoves más numerosos. Para la misma especie Avilés (2005) estudió el ciclo sexual en condiciones de cultivo, evaluó el efecto de dietas compuestas de alimento congelado y formulado sobre la reproducción y calidad del desove de los reproductores y el cultivo de juveniles en jaulas flotantes. Dentro de sus resultados reportó los intervalos de temperatura y fotoperiodo durante la temporada reproductora que se extiende de enero a junio, las cuales fueron 20-23° C y 12.25-14.25 horas-luz-día. El alimento con mejores resultados en cuanto al tamaño y viabilidad de los huevos fue una dieta semihúmeda con 53.6% de proteína y 9.5 % de lípidos.

La calidad de los huevos depende mucho de los nutrientes que aporte el alimento suministrado, y los lípidos son los que más afectan la composición de los huevos, según los mencionan Álvarez-Lajonchère (2006) y Gatlin III (2000). Estos están conformados por ácidos grasos divididos en saturados e insaturados, para los reproductores los más importantes son los insaturados y más específicamente los polinsaturados (PUFA) por lo que estos deben estar presentes en cualquier alimento para mejorar los nutrientes del vitelo, el cual se convierte en el primer alimento de las larvas; sin embargo, los requerimientos varían entre especies.

Para el mero rojo son pocos los estudios; Durruty (2014) logró la reversión sexual de hembras inmaduras a machos con implantes hormonales, así como las primeras colectas de hembras maduras silvestres confinadas en laboratorio. También se han hecho estudios nutricionales en juveniles silvestres por Rocher (2013), Ferreira (2017) y Castillo (2018), quienes determinaron los porcentajes óptimos de proteína, carbohidratos y la digestibilidad de algunos ingredientes que aportan estas biomoléculas. Estos estudios son antecedentes relevantes para la formulación de las dietas que se utilizaron para alimentar a los peces de este estudio.

Inducción hormonal en cautiverio

El uso de estas hormonas mediante inyecciones de una sola o dos aplicaciones es una estrategia que funciona con peces que presentan ovocitos vitelogénicos, ya que induce la maduración final de la gónada. Diversas sustancias han sido utilizadas para la inducción hormonal en peces. Desde la década de 1930 se utiliza el extracto de glándulas pituitarias de carpa, posteriormente comenzó a emplearse la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), ambas sustancias se utilizan cada vez menos porque causan una respuesta inmune (Zohar y Mylonas, 2001). De manera más específica para el género *Epinephelus*, Watanabe *et al.* (1995) fueron los primeros en reportar el efecto de diversas hormonas en *E. striatus*, compararon el efecto de tres sustancias solas o en combinación, las cuales fueron un homogenizado de glándula pituitaria de carpa, HCG y Hormona Leutinizante-análoga (LHRH-a). Encontraron que la mejor hormona para uso prolongado es la LHRH-a y la combinación entre dos hormonas no confiere ninguna ventaja.

Otra estrategia en la aplicación de hormonas es con dispositivos de liberación lenta que son introducidos a través de una incisión o con una inyección intramuscular en la que se inserta el dispositivo en el cuerpo del pez y mediante distintos mecanismos la hormona es liberada en el torrente sanguíneo, por lo que se puede estimular el desarrollo de los ovocitos desde fases tempranas previas a la vitelogénesis (Kanemaru *et al.*, 2012). Esta clase de dispositivo, por medio de implantes de Hormona Liberadora de Gonadotropina-análoga, (por sus siglas en inglés, GNRH-a) fue utilizada por Marino *et al.* (2003) quienes llevaron a cabo la inducción hormonal de *Epinephelus marginatus*. Ellos realizaron tres experimentos que iniciaron en diferentes temporadas de acuerdo con el estado de maduración de la gónada (antes, durante y después del pico de maduración de los ovocitos). Encontraron que el uso de la hormona da un mejor resultado en la temporada del pico de maduración y con una concentración de la hormona de 33.8 a 40.3 µg/kg de pez. Obtuvieron desoves y evaluaron la calidad de la puesta considerando la cantidad de huevos, porcentaje de eclosión y fecundidad relativa.

El uso de hormonas para el desove suele ser el método más efectivo, sin embargo, en algunas ocasiones se ha conseguido obtener el desove de forma espontánea (conocido en acuicultura como desove natural) y sin necesidad de realizar masaje abdominal o “stripping” para obtener los huevos. Hasta 1991 se conocían al menos cuatro especies del género

Epinephelus que podían desovar de manera natural: *E. striatus*, *E. andersoni*, *E. tauvina* y *E. akaara* (Tucker *et al.*, 1991).

En Colombia también se consiguió obtener desoves naturales del mero Goliat (*E. itajara*) después de 10 años de monitorear las condiciones ambientales en cajas flotantes sobre la costa (documento no publicado). De igual forma en Indonesia, Sudaryanto *et al.* (2004) consiguieron desoves naturales de *E. fuscoguttatus* y *E. coioides* manteniendo a los adultos en cajas flotantes, de esta forma se observó el comportamiento de cortejo y las fases lunares en las que ocurrieron los desoves; estas condiciones son importantes para entender los factores que influyen en los desoves naturales de los meros.

Lo más reciente en cuanto al desove en condiciones controladas y de manera natural se ha realizado en sistemas de recirculación cerrado con *E. coioides* donde, además del desove, ocurrió la fertilización y eclosión, todo esto en el transcurso de un año, con luz natural y sin añadir hormonas para inducir el desove (Ranjan *et al.*, 2017).

Es así como adquieren importancia algunas estrategias, como la reproducción en cautiverio, que puede verse favorecida implementando el uso de hormonas para inducir el desarrollo gonadal y la maduración. Esta técnica ha sido muy utilizada por los resultados positivos que se han obtenido en diferentes grupos de difícil manejo para completar su ciclo reproductivo en medios artificiales (Zohar y Mylonas, 2001).

JUSTIFICACIÓN

Conocer los parámetros ambientales necesarios para mantener e inducir la maduración de las hembras de mero rojo (*Epinephelus morio*), así como determinar la concentración de hormona necesaria para inducir el desove de esta especie en cautiverio, son aspectos fundamentales para desarrollar la biotecnología necesaria para lograr la reproducción de esta especie. Los resultados de este trabajo aportan información científica sobre las condiciones de cautiverio necesarias para conseguir desoves en las hembras de *E. morio*. Se espera que esta información forme parte de un paquete tecnológico transferible a instituciones públicas y/o privadas interesadas en desarrollar el cultivo comercial de esta especie, con la consiguiente derrama de recursos económicos y de generación de empleos,

la disminución de la presión pesquera sobre las poblaciones naturales y su impacto en el ecosistema.

HIPOTESIS

Las hembras de mero rojo obtenidas del medio silvestre mantenidas durante al menos 18 meses en cautiverio con un alimento formulado, luz con un fotoperiodo natural y un intervalo de temperatura 23-30°C, presentarán maduración de los ovocitos (vitelogénesis) durante la temporada reproductora.

La aplicación de la Hormona Luteinizante-análoga (LHRH-a) a una concentración igual o mayor a 100 µg/kg en hembras adultas de mero rojo mantenidas en condiciones de cautiverio, con ovocitos vitelogénicos, inducirá el desove natural o asistido mediante técnicas de “stripping”.

OBJETIVOS GENERALES

- Determinar las concentraciones de hormona LHRH-a necesarias para inducir el desove de hembras de mero rojo (*Epinephelus morio*) bajo condiciones de cautiverio, alimentadas con alimento formulado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Registrar el tiempo de aclimatación que requieren las hembras silvestres así como el alimento formulado para que inicie el proceso de vitelogénesis en las gónadas de los peces en cautiverio.
- Durante la temporada de reproducción de la especie, registrar los valores de las variables físicas del agua, particularmente de la temperatura, en las que ocurre el inicio de la vitelogénesis en las hembras silvestres de mero rojo mantenidas en laboratorio.
- Determinar las concentraciones de la hormona LHRH-a necesarias para inducir el desove y obtener el tiempo de desove tras la inducción hormonal.

- Describir las características morfométricas de los huevos obtenidos (diámetro, gotas de aceite, correlación entre diámetro del huevo y diámetro de la gota de aceite).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de organismos y condiciones en cautiverio

Los peces fueron capturados en diferentes campañas de muestreo desde el 2016 hasta el 2019 en aguas del Golfo de México, frente a la península de Yucatán. A su llegada al Laboratorio de Peces Marinos, todos los organismos se sometieron a un tratamiento profiláctico con agua dulce y formol al 2%, como medida de sanidad para eliminar parásitos. Los peces fueron marcados mediante un chip electrónico y desde julio del 2019 hasta mayo del 2021 se mantuvieron en tres estanques, dos de ellos en instalaciones cerradas y uno al aire libre (figura 2). Las condiciones y dimensiones de los estanques fueron las siguientes: en el medio cerrado, los estanques fueron de 12 m³, sujetos a un régimen de iluminación con luz natural y un sistema abierto con flujo de agua marina filtrada continua que suministraba de 713 a 1360 L por hora. De febrero a mayo se utilizó un sistema de circulación semicerrado, equipado con una bomba de calor marca Interheat con capacidad de calentamiento de 7.64 kW para mantener la temperatura constante. Tubería de PVC conectaba los dos estanques con la bomba de calor equipada con un filtro de arena de 25 kg. El sistema contaba con un depósito de 1000 L con una bomba sumergible y un filtro desmontable en forma de torre vertical con materiales porosos (conchas de moluscos, fieltro o guata y carbón activado). Durante la temporada reproductora, la densidad de organismos presentes en los estanques de interior fue de 2.27 kg/m³ para el estanque de interior 1 y de 2.23 kg/m³ para el estanque 2, en la misma temporada la proporción de sexos fue de 1M: 3H en el estanque interior número 1 y 1M: 1H en el estanque interior número 2.

Por otro lado, el tanque en exterior tenía un volumen de 15 m³ provisto con tres mallasombras para disminuir la cantidad de luz incidente. El sistema estaba equipado con dos aireadores y entrada de agua continua a un flujo de 1660 a 1860 L por hora. Durante la temporada reproductora la densidad fue de 1 kg/m³ y la proporción sexual se mantuvo en 1M: 6H. Para establecer y registrar las condiciones en cautiverio de los peces, diariamente a las 8 am se midió la temperatura con un equipo multiparamétrico marca HACH.

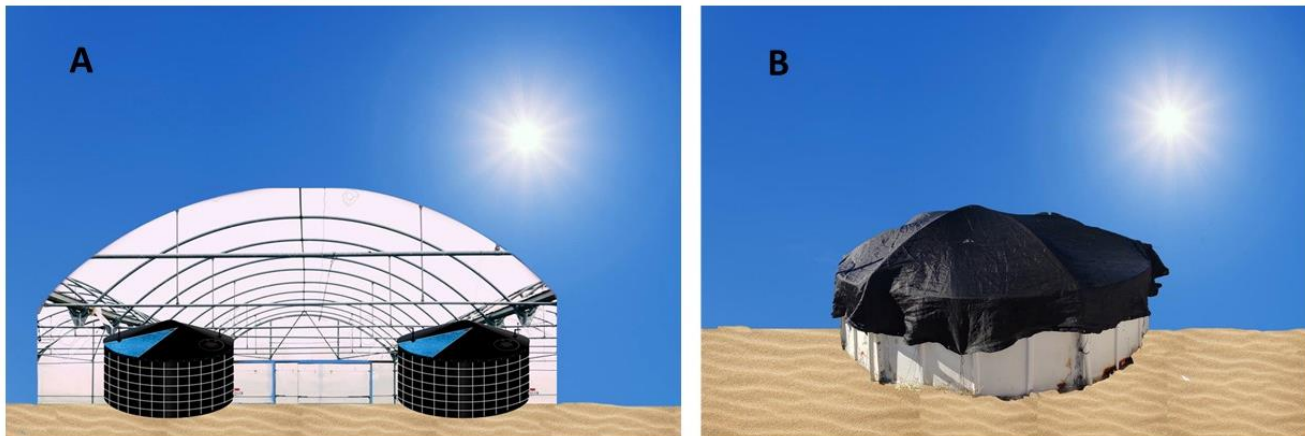


Figura 2. Condiciones de los estanques donde se mantuvieron a los peces durante el estudio. En la figura 2 A se ilustran los estanques interiores 1 y 2 y en la figura 2 B, el estanque exterior.

Dieta de los peces

Se utilizaron dos tipos de alimento semihúmedo, uno formulado para ser suministrado durante la temporada de reproducción o maduración de la gónada y otro para la temporada de descanso o regeneración de la gónada. La principal diferencia entre ellas son los ingredientes que aportan los lípidos y el porcentaje de lípidos, que es mayor en la dieta de reproducción. Estas formulaciones fueron elaboradas por la Dra. Gabriela Gaxiola y se detallan en el anexo I. En adelante, se denominan dietas de reproducción y mantenimiento.

Todo el alimento se preparó en el Laboratorio de Nutrición de la UMDI Sisal con una mezcladora semiindustrial de marca Blazer de 10 kg. Para su preparación se vertieron primero las harinas, seguido de los ingredientes líquidos y se mezclaron hasta obtener una masa consistente, finalmente todo el alimento se almacenó en un congelador.

Los peces fueron alimentados aproximadamente cada tercer día a saciedad con las dietas semihúmedas previamente mencionadas. Durante el período comprendido entre diciembre del 2020 a abril del 2021 fueron alimentados con la dieta de reproducción, el resto de los meses fueron alimentados con la dieta de mantenimiento.

Biopsias y aplicación de hormona.

Durante la temporada reproductora (enero-abril del 2021) se obtuvieron una serie de indicadores, tales como la presencia de ovocitos vitelogénicos a través de biopsias, abultamiento de la zona abdominal y si el gonoporo se encontraba abierto o cerrado. Tales indicadores fueron útiles para generar un programa de monitoreo de la maduración sexual. Para realizar las biopsias, los peces fueron anestesiados con aceite de clavo a una concentración de 1mL/20L de agua marina, lo que permite alcanzar el nivel A5 de anestesia, de acuerdo con la escala estandarizada por Park *et al.* (2008), que se caracteriza por la pérdida del equilibrio del pez e incapacidad para mover la aleta caudal. Una vez anestesiados, los peces se fotografiaron y pesaron con una balanza electrónica marca TORREY ($\pm 50g$). Se tomaron muestras de las gónadas mediante la inserción de una cánula de 1mm de diámetro en el gonoporo. Las muestras de ovocitos se observaron en fresco al microscopio óptico para determinar el estado de madurez: un ovocito de forma irregular o no redondeada y de una apariencia transparente en su totalidad, indica un ovocito previtelogénico. Si la célula es mayor a 400 μm , con una forma redonda y con el centro oscuro u opaco, se considera en fase vitelogénica (Watanabe *et al.*, 1995; Ibarra y Duncan, 2007; Álvarez Lajonchère y Puello-Cruz, 2011). Paralelamente a las observaciones de los ovocitos en fresco, se conservaron en formol al 10% aquellas muestras con un tamaño mayor a 2 mm de diámetro. Estas muestras fueron procesadas con técnicas histológicas para poder observar los estadios de maduración según las descripciones realizadas por Brulé *et al.* (1999) durante la temporada reproductora. La técnica de histología empleada se basó en los métodos descritos por Verdín Terán *et al.*, 2013 y se encuentra en el anexo II. Una vez teñidas y montadas, las muestras histológicas se fotografiaron con un microscopio óptico; los datos biométricos se obtuvieron mediante el programa NIS Elements versión 4.10.01

Se planificó el procedimiento para el evento de desove para ello se siguió la metodología realizada por Marino *et al.* (2003) con modificaciones propias. Algunos de los procedimientos se describen en el anexo III por ser fundamentales, requiriendo mayor detalle para una mejor instrucción durante y después del proceso de desove.

Cuando a partir de las biopsias se detectaron ovocitos vitelogénicos, se procedió a transferir a cada hembra a tinas de 80 cm³ (una hembra por tina) para evitar pérdida de huevos en

caso de desove, las tinas se encontraban conectadas al sistema de recirculación semicerrado (Figura 3). Una vez en las tinas, se inyectó a cada hembra debajo de la aleta pectoral con una jeringa de 1 ml con las diferentes dosis de LHRH-a (tabla 1). Al no haber antecedentes en la aplicación de hormonas para esta especie, se aplicó tanto dosis única como dosis divididas en dos inyecciones, conocidas como dosis inicial y de resolución. Esta última fue suministrada 24 horas después de la dosis inicial.

Dado que el tiempo de efecto de la hormona se desconoce para la especie en estudio, las hembras se revisaron a las 24:00, 30:00 y 48:00 horas después de la aplicación de la hormona cuando se inyectó una sola dosis. Cuando se aplicó la dosis de resolución, se revisaron a las 12:00, 24:00, 30:00 y 48:00 horas después de la aplicación.

Tabla 1. Dosis suministradas a cada hembra de *E. morio* con ovocitos vitelogénicos. DU-Dosis única, DI-Dosis inicial y DR-Dosis de resolución.

Marca de identificación	Hembra	Dosis $\mu\text{g}/\text{kg}$
AB5	1	DU 184
ACE	2	DI 184 + DR368
A93	3	DU 163

Para registrar los diámetros tanto de los ovocitos correspondientes a cada hembra (cuando fue posible se utilizaron 50 ovocitos por hembra) como de las gotas de aceite de los huevos, estos se midieron bajo el microscopio óptico mediante el software ISC capture (versión 3.6.8).

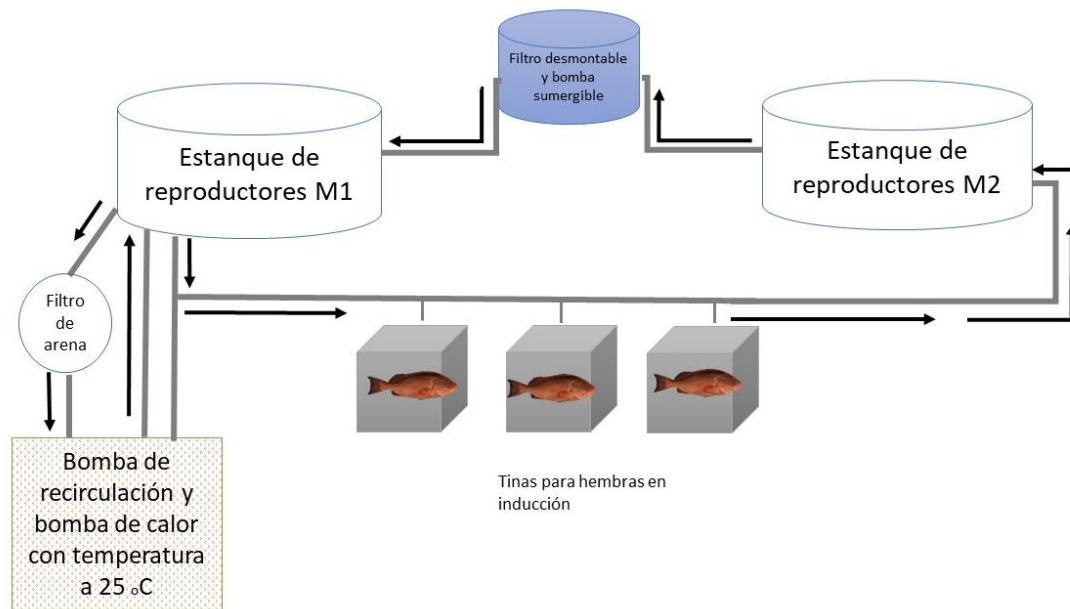


Figura 3. Esquema del sistema de circulación semi-cerrado, se muestran los estanques de interior donde se mantuvieron a los adultos de *E. morio* y las tinas (en color gris) para los peces que fueron seleccionados para recibir la hormona. Las flechas indican el flujo del agua.

Análisis estadísticos

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la normalidad de los datos correspondientes a los diámetros de los ovocitos o huevos por cada hembra inyectada y las temperaturas registradas en los estanques. Para conocer si hubo diferencias significativas entre los diámetros de los ovocitos posterior a la aplicación de las dosis de la hormona y la temperatura entre los estanques durante la temporada reproductora, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis.

Se aplicó una prueba de correlación de Pearson usando los diámetros tanto de los huevos como de las gotas de aceite de estos mismos, esto para observar el tipo y grado de correlación entre sus diámetros. Para estos análisis se utilizó el software STATISTICA (data analysis software system), versión 10.

RESULTADOS

Condiciones de cautiverio

Se obtuvieron los valores promedio de la temperatura del agua mensualmente de julio del 2019 a abril del 2021 (Tabla 2). Durante la temporada de reproducción (enero-abril) las temperaturas promedio del estanque de interior 1, estanque de interior 2 y el estanque de exterior fueron de 25.24, 25.20 y 25.54°C respectivamente (Tabla 3). Debido a que los datos de temperatura no presentaron un comportamiento normal (Shapiro Wilks, $p < 0.05$) se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para observar si hubo diferencias significativas entre las temperaturas de los estanques durante el periodo reproductivo. De acuerdo con esta prueba no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$; Figura 4).

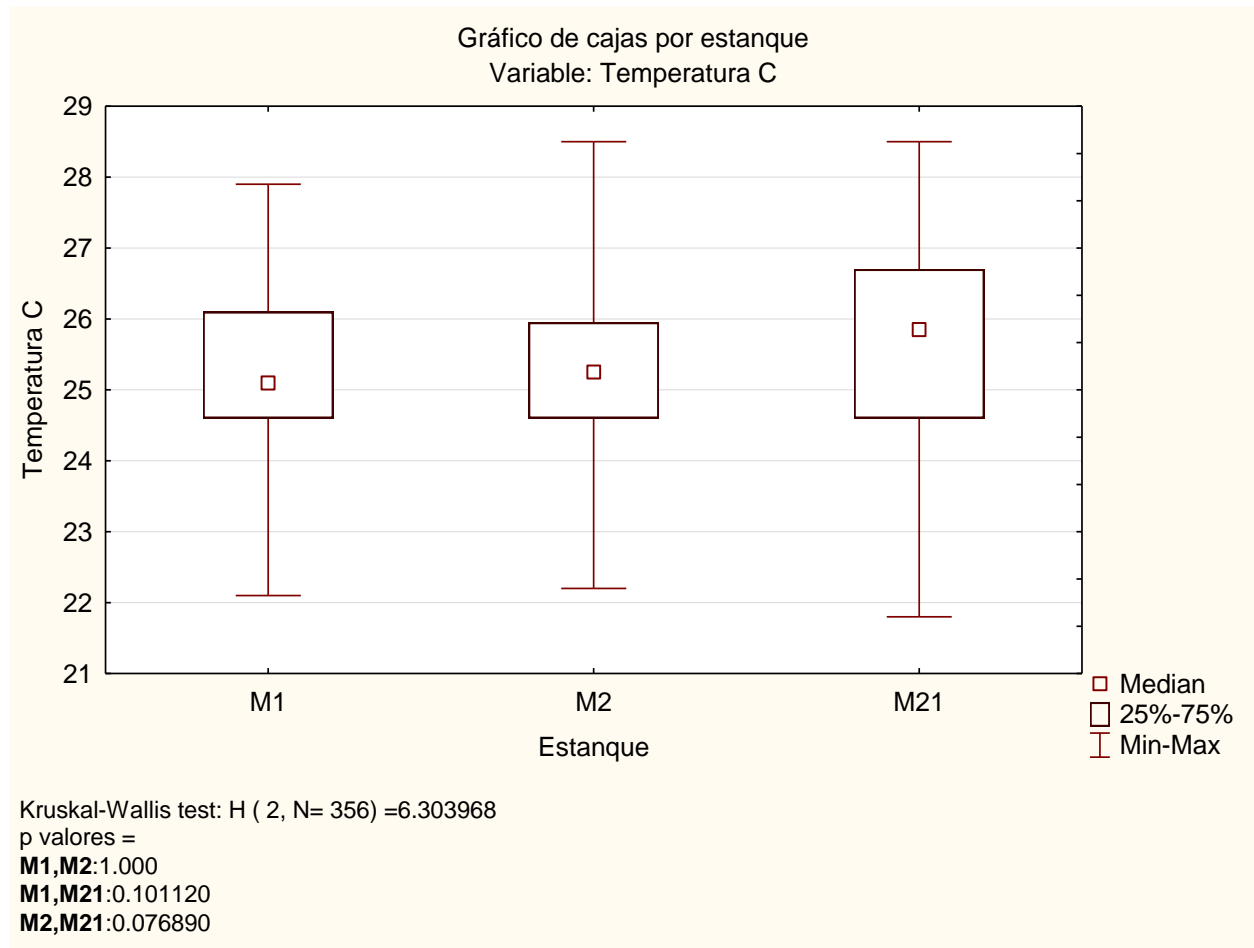


Figura 4. Valores de la mediana de las temperaturas (°C) de cada estanque durante la temporada

de reproducción, M1-estanque de interior1, M2-estanque de interior 2, M21-Estanque de exterior. Se muestran los resultados de la prueba estadística Kruskal Wallis.

Tabla 2. Temperatura promedio del agua de los estanques por mes, durante el periodo de julio del 2019 a abril del 2021 (DE: Desviación estándar, SR: Sin registros).

Mes	Estanques de interior Temperatura (°C)	DE	Estanque exterior Temperatura (°C)	DE
Jul-Ago	28.89	0.45	-	-
Sep	28.67	0.41	-	-
Oct	28.4	0.46	-	-
Nov	26.7	1.33	-	-
Dic	25.82	1.15	-	-
Ene	25.13	1.17	-	-
Feb	25.20	1.44	-	-
Mar	26	1.45	-	-
Abr	28.50	0.60	28.8	0.81
May	28.31	0.81	28.28	0.32
Jun	28.84	1.24	28.49	1.21
Jul	29.70	1.3	29.19	0.84
Ago	29.29	0.88	28.63	0.82
Sep	29.17	0.6	28.45	0.51
Oct	28.09	1.06	SR	-
Nov	26.56	0.87	SR	-
Dic	23.85	1.45	SR	-

Tabla 3. Valores mensuales promedio de la temperatura durante la temporada de reproducción de enero a abril del 2021 (DE: Desviación estándar, * meses durante los cuales se mantuvo un sistema cerrado con temperatura controlada en los estanques de interior).

Mes	Tanque interior 1 Temperatura °C	DE	Tanque interior 2 Temperatura °C	DE	Tanque exterior Temperatura °C	DE
Enero	25.89	1.55	24.78	1.60	24.39	1.7
*Febrero	25.27	1.46	25.13	1.41	25.09	1.51
*Marzo	25.91	0.88	25.82	0.84	25.79	0.76
*Abril	24.90	0.52	25.06	0.50	26.76	1.08

Biopsias

Durante los meses de febrero a mayo del 2021 se hizo un seguimiento del desarrollo de la maduración gonadal mediante las biopsias de al menos 16 peces adultos, cuyo peso osciló de 1995 a 4960 gramos. A través de las biopsias se monitoreó la maduración de los ovocitos en cada pez cada 3 semanas aproximadamente; en la tabla 4 se pueden observar los resultados.

Tabla 4. Datos obtenidos durante las últimas biopsias en la temporada reproductora de febrero a mayo del 2021 (ID Pez- Clave de identificación de marca del pez, * organismos que no se contemplaron en un inicio, pero al presentar condiciones de maduración fueron incluidos durante las biopsias.

ID Pez	Estanque	Sexo	Peso (g)	Ovocitos aproximados a 400 μ m (vitelogénicos)	Aplicación de hormona (LHRH-a)
*A98	Exterior	Hembra	1995	No	No
*A87	Exterior	Hembra	2200	No	No
*AA1	Exterior	Hembra	2615	No	No
*ACE	Exterior	Hembra	2715	Si	Si
*A75	Exterior	Hembra	3010	No	No
A93	Interior 1	Hembra	3050	Si	<u>Si</u>
AAF	Interior 1	Hembra	3400	No	No
AB2	Interior 2	Hembra	3550	No	No
*SM	Interior 1	Hembra	3700	Si	No
A81	Interior 1	Hembra	3900	No	No
ABA	Interior 2	Hembra	3950	No	No
AB5	Interior 2	Hembra	4070	Si	Si
ABF	Interior 2	Macho	4350	-	No
A8E	Interior 2	Macho	4470	-	Si
A92	Interior 1	Hembra	4850	No	No
AB3	Interior 2	Macho	4960	-	No

Seguimiento de la maduración final

La maduración de las gónadas se observó en las muestras obtenidas al realizar la canulación y la progresión de la maduración de las hembras que fueron inyectadas se puede observar en la figura 5. La fase de vitelogénesis en las hembras se presentó en diferentes fechas, por lo tanto la inyección de LHRH-a a cada hembra también se suministró en días distintos y al aplicar la hormona se mantuvieron separadas del resto en una tina para el seguimiento de la maduración final.

En la hembra 1 solo se aplicó una dosis y se optó por revisarla 30 horas después, al encontrar el mismo promedio del diámetro que al inicio se decidió esperar a las 48 horas,

tiempo al cual tampoco se registró cambio en el diámetro de los ovocitos. Para la hembra 2 se suministraron dos dosis, el promedio máximo observado fue de 567 μm de diámetro 30 horas después de la segunda dosis. Para la hembra 3 al igual que a la 1 se le aplicó una sola dosis, pero se decidió revisarla con menos frecuencia, ésta se dejó sin revisar hasta 48 horas después de la inyección, tiempo al cual se obtuvo el desove. Los datos como la concentración de la dosis de hormona, diámetros de los ovocitos antes de la inducción y diámetro posterior a la revisión, entre otros importantes para la estandarización del desove de esta especie se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Diámetros de ovocitos y características de hembras maduras que fueron sometidas a inducción hormonal. (DAI-diámetro antes de la inducción, DPI-diámetro posterior a la inducción, PI-posterior a la inducción *Dosis real suministrada a cada organismo n- número de ovocitos medidos.

Hembra	Peso del pez en kg	Dosis de LHRH-a $\mu\text{g/Kg}$	Características morfológicas del pez en abdomen y gonoporo PI	Desove	n	Promedio Ovocito DAI μm	n	Promedio Ovocito DPI μm	% de ovocitos $>450 \mu\text{m}$
1	4.07	184.27	Abdomen poco abultado y gonoporo ligeramente abierto	No	50	385.7 \pm 58.8 2	33	385 \pm 80.76(30 h)	6
2	2.71	1 ^a dosis 184	Abdomen poco abultado y gonoporo ligeramente abierto	No	50	416 \pm 111	50	442.3 \pm 80.17 (30 h)	48
2	2.71	2 ^a dosis 368	Abdomen poco abultado y gonoporo ligeramente abierto	No	50	442.3 \pm 80.1 7	43	557.4 \pm 102.4 (24 h)	84
2	2.71	2 ^a dosis 368	Abdomen poco abultado y gonoporo ligeramente abierto	No	50	442.3 \pm 80.1 7	16	567.25 \pm 103.92 (30 h)	87.5
2	2.71	2 ^a dosis 368	Abdomen poco abultado y gonoporo ligeramente abierto	No	50	442.3 \pm 80.1 7	30	494.6 \pm 125.62(48 h)	70
3	3.05	163	Abdomen muy abultado y gonoporo abierto y protruido	Sí	50	496 \pm 47.29	50	903 \pm 21.93 (48 h)	88

Entre las características del organismo que desovó (Hembra 3) a diferencia de las otras dos hembras maduras, fue el porcentaje de ovocitos vitelogénicos y el porcentaje de mayores a 450 μm (figura 6). De manera similar solo la hembra 3 presentó diferencias significativas en los diámetros de los ovocitos antes y después de la aplicación de hormona (DU 163mg/ml) gráficamente se puede observar el aumento de los diámetros antes y después de la aplicación de la dosis (figura 7), esto pudo deberse a la combinación de una manipulación menos frecuente y a la dosis de la hormona utilizada.

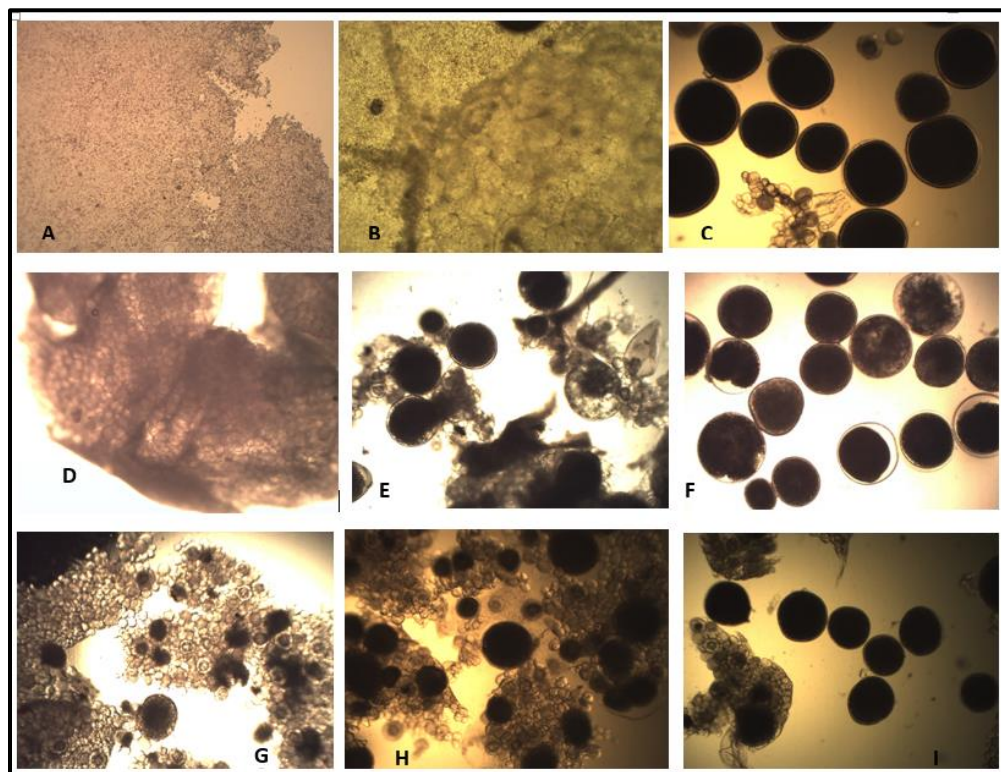


Figura 5. Muestras con ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos presentes en las hembras seleccionadas para la aplicación de dosis de hormona, en la primera columna se encuentran las fotografías de las primeras biopsias durante febrero del 2021 y las de la tercera columna en abril del 2021. Las secciones A -C corresponden a la hembra 3, D-F a la hembra 2 y G-I a la hembra 1. En las fotos A, B y D se observan solo ovocitos previtelogénicos, en las E, G y H se observan tanto previtelogénicos como vitelogénicos y en el resto solo ovocitos vitelogénicos

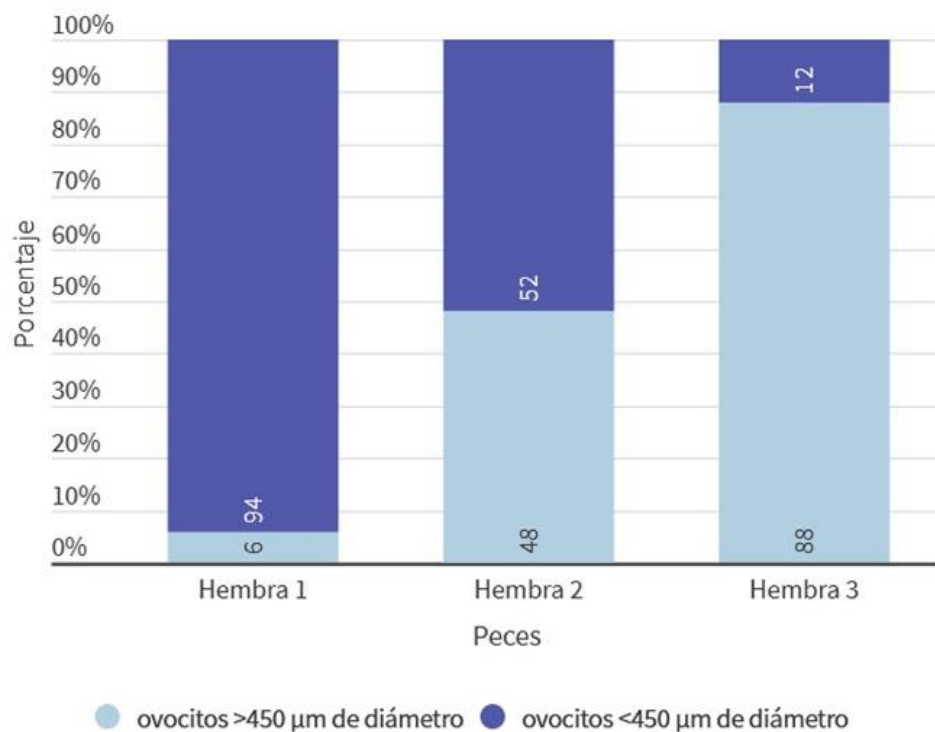


Figura 6. Porcentaje de ovocitos vitelogénicos con diámetros mayores y menores de 450 μm de las hembras maduras previo a la aplicación de la hormona, los datos corresponden a 50 ovocitos medidos por pez.

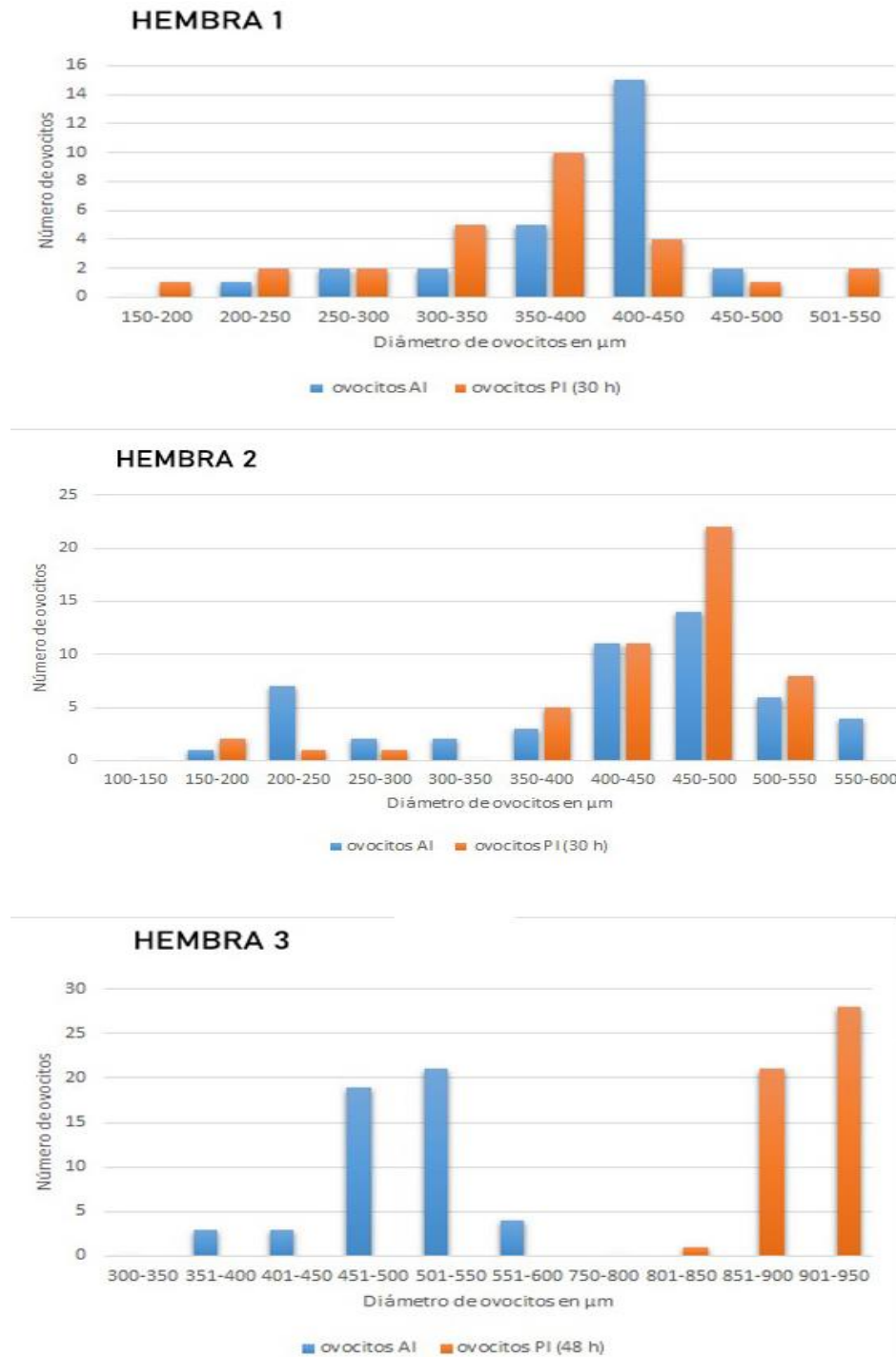


Figura 7. Frecuencia de los diámetros de los ovocitos vitelogénicos en las tres hembras inyectadas, en el eje X se encuentran los diámetros de los ovocitos en μm y en el eje Y el número de ovocitos (AI- antes de la inducción, PI-Posterior a la inducción)

La prueba de Shapiro-Wilks de los diámetros de los ovocitos obtenidos para las tres

hembras antes de la inyección muestra que los datos no se ajustaron a una distribución normal ($p < 0.05$). En cambio, los diámetros de ovocitos posteriores a la inyección para las mismas tres hembras sí presentan una distribución normal (tabla 6). Sin embargo, las varianzas no fueron homogéneas, pues la prueba de Barlett arrojó un valor igual a 0, por lo que no se cumplen los supuestos para considerar que se ajustan a una distribución normal. Debido a ello se utilizó una prueba de Kruskal Wallis en la que si se encontraron diferencias significativas entre los diámetros de los ovocitos posterior a la inyección en las tres hembras (figura 8).

Tabla 6 Valores de p obtenidos con pruebas de Shapiro Wilks (SW) y Kruskal Wallis (KW) para el diámetro de ovocitos antes y después de la inyección para cada hembra. En la cuarta columna los valores de p en prueba de KW en los diámetros finales de los ovocitos.* 24 horas después de la dosis de resolución.

Hembra	Valor p en prueba SW antes de la inyección	Valor p en prueba SW posterior a la inyección	Valor p en prueba KW
1	0.0034	0.6650	<0.01
2	0.0001	* 0.19610	<0.01
3	0.0065	0.4328	<0.01

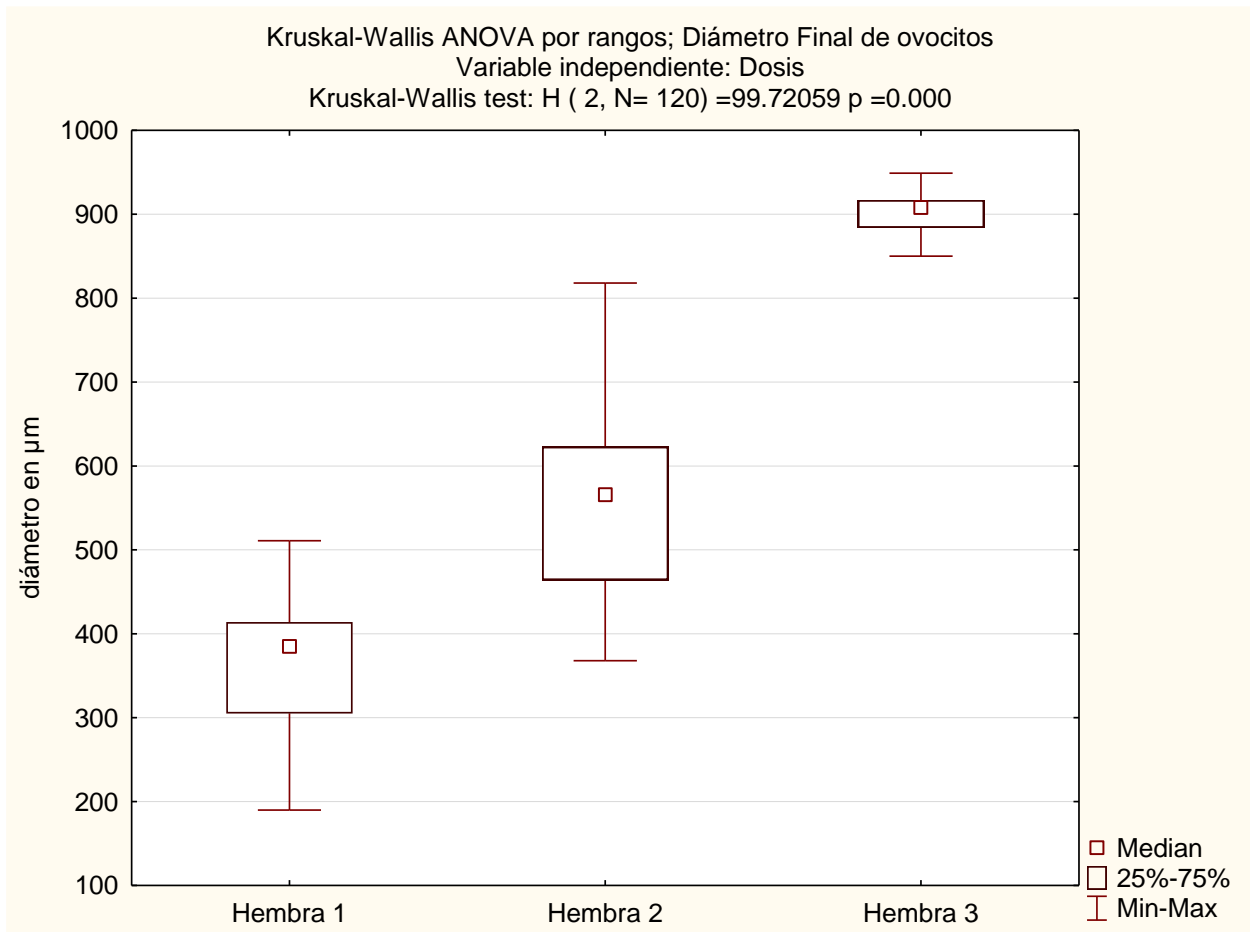


Figura 8. Gráfica de cajas y bigotes para la comparación entre los diámetros (μm) de los huevos expulsados por cada una de las hembras (Hembra 1, Hembra 2 y Hembra 3) inyectadas con LHRH-a.

Durante las últimas biopsias de las tres hembras inducidas hormonalmente se obtuvieron un par de muestras suficientemente grandes para realizar cortes histológicos. Se encontraron ovocitos en diferentes estadios de desarrollo desde previtelogénicos hasta vitelogénicos. Entre los previtelogénicos se pudieron encontrar perinucleolares y en los vitelogénicos se encontraron las fases de vitelogénesis primaria, vitelogénesis secundaria temprana y vitelogénesis secundaria tardía (Figura 9). Las preparaciones histológicas permitieron compararlas con las imágenes tomadas en fresco durante las últimas biopsias de la temporada reproductiva, pudiendo así identificar al menos cuatro fases (Figura 10), los detalles del promedio de los diámetros, tallas mínimas y tallas máximas por cada fase se muestran en la tabla 6.

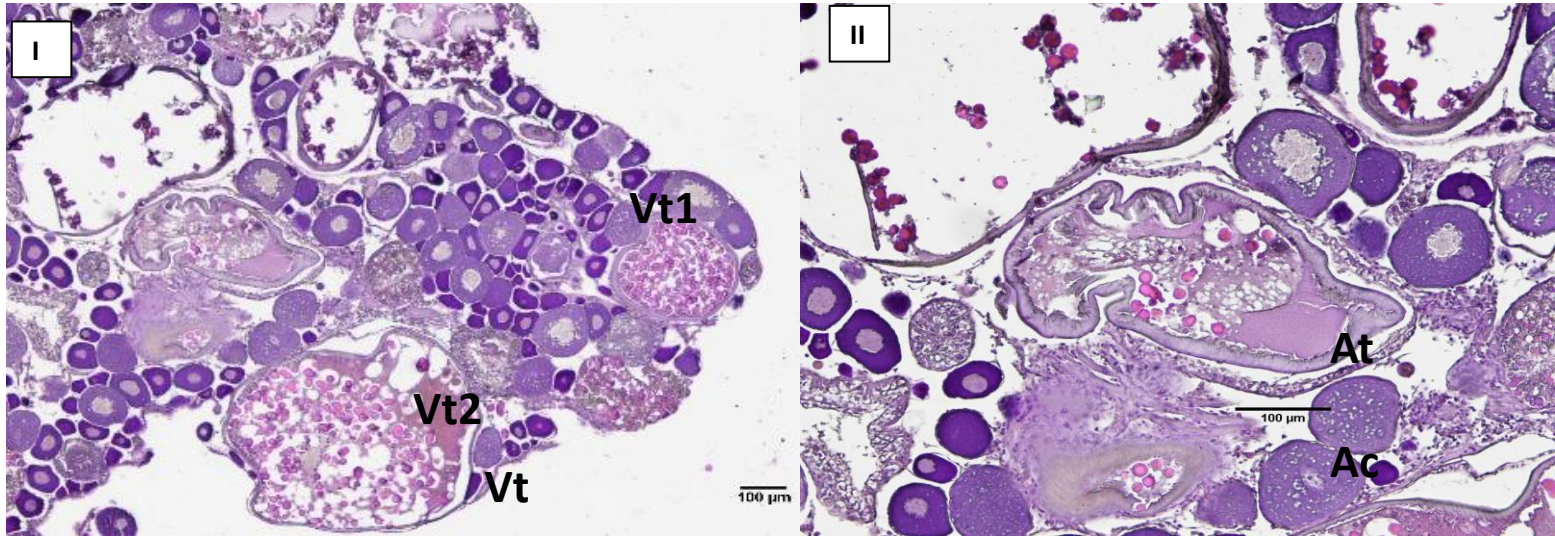


Figura 9. Corte histológico de un fragmento de gónada extraído de la hembra 2 durante la temporada reproductiva, I.- Sección donde se señala un ovocito en Vitelogénesis secundaria temprana (Vt1) vitelogénesis secundaria tardía (Vt2) a 4x. II.- Se señalan los ovocitos en fase de Vitelogénesis primaria o alveolos corticales (Ac), y Atrésicos (At) a 10x escalas igual a 100 µm.

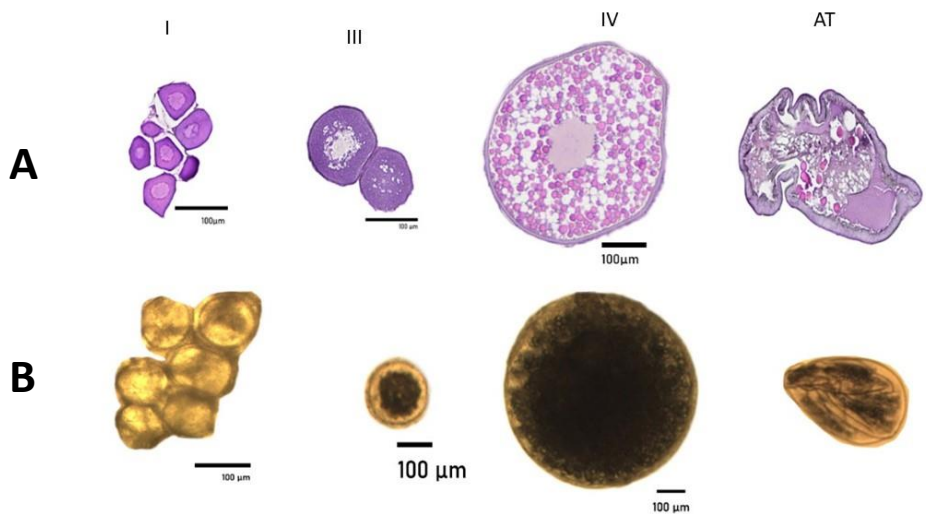


Figura 10: Ovocitos en diferentes estadios observados A) en fresco y B) en los cortes histológicos, se encuentran numerados con las fases descritas por Brulé *et al.* (1999), excepto por AT que no está incluida en la descripción. Todas las escalas equivalen a 100µm -se refiere a ovocitos primarios a 10x, III- a Vitelogénesis primaria a 10x, IV- Vitelogénesis secundaria temprana a 4x y AT- como Atrésicos a 10x

Tabla 7. Comparación de los estadios de ovocitos entre muestras procesadas mediante técnica histológica y las observaciones en fresco durante las biopsias.

Fase	Perinucleolares		Alveolos corticales		Vitelogénesis Primaria	
	Histología	Fresco	Histología	Fresco	Histología	Fresco
Promedio(µm)	80.44	97.27	118.69	178.5	375.6	483.1
Max (µm)	103.36	128.1	130.86	253.5	462.52	546.1
Min (µm)	55.83	64	103.06	130.7	245.82	371.4
n	50	29	6	28	10	20
Desv Est (µm)	11.12	15.57	9.22	38.97	67.63	44.84

Caracterización del desove y descripción de los huevos

El desove de la hembra 3 se obtuvo 48 horas después de la inyección (DU 163 μ g/kg) mediante el método de masaje abdominal o “stripping”, previo al masaje se pudo observar un abultamiento en el abdomen de la hembra y el gonoporo protruido (figura 11).



Figura 11. Protrusión del gonoporo y abultamiento en la zona abdominal en la hembra 3 durante el masaje abdominal para inducir el desove.

El diámetro de los huevos estuvo en un intervalo de 850-949 μ m. Se estimó un desove de 192,000 huevos en total. Se llevó a cabo una segunda revisión 24 horas después para determinar si habría otro desove, sin embargo, la hembra ya no presentaba las mismas características morfológicas del abdomen y el gonoporo, por lo que ya no se obtuvieron más huevos por masaje. Posterior a la manipulación de la hembra se procedió a vaciar la tina donde se encontraba y filtrar el agua, donde se encontraron 118 huevos, pero no se pudo determinar la hora a la cual expulsó esos últimos huevos.

El diámetro promedio de las gotas de aceite fue de 183.6 μ m, de los huevos observados solo uno presentó dos gotas de aceite y fueron más pequeñas que el promedio (169 y 103 μ m de diámetro), el resto tuvieron solo una gota por huevo (figura 12). Por último, el índice

de correlación de Pearson arrojó valores significativos ($p < 0.05$) entre el diámetro de los huevos y el diámetro de la gota de aceite, lo cual indica una correlación positiva con un nivel bajo a moderado ($r = 0.335$) entre el diámetro del huevo y el diámetro de la gota de aceite (figura 13).

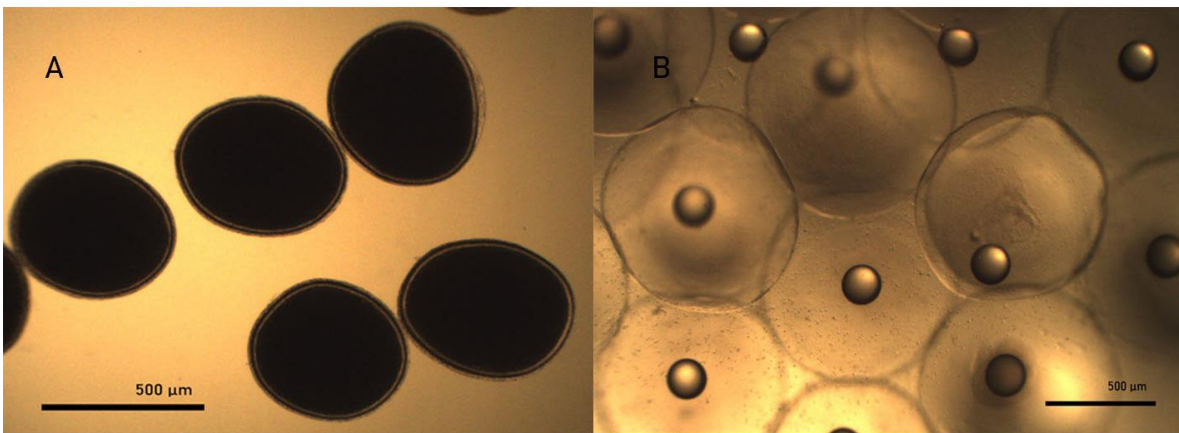


Figura 12. A. Ovocitos vitelogénicos de la hembra 3 previo a la inducción hormonal observados en 4x. B. Huevos obtenidos mediante stripping de la misma hembra 48 horas después de la inducción hormonal vistos en 4x, escala equivalente a 500 μm .

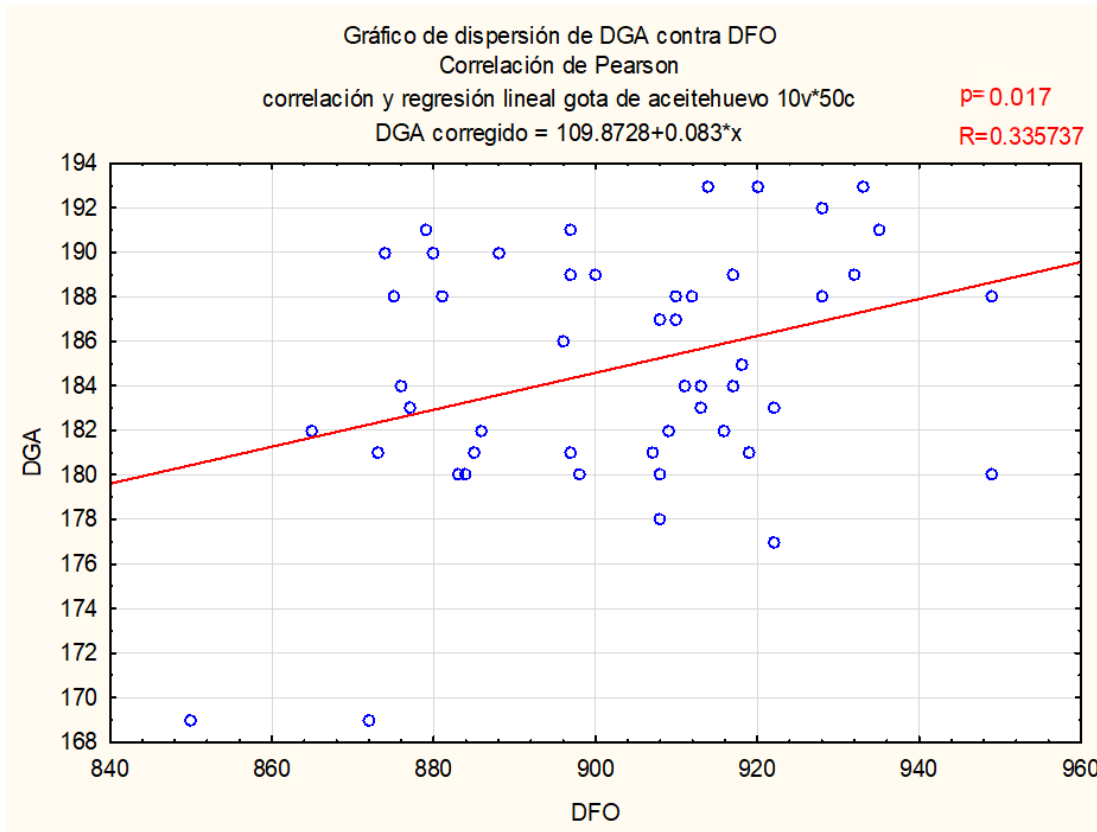


Figura 13. Gráfico de dispersión y valores de correlación de Pearson. DFO. diámetro del huevo (μm); DGA: diámetro de la gota de aceite (μm).

DISCUSIÓN

Los promedios de temperatura del agua durante la temporada reproductiva del 2021 fueron muy similares, la mayor diferencia fue entre el mes de enero (24.39°C) y abril (26.76°C) en el estanque exterior. Las diferencias entre las temperaturas de los tres estanques no fueron significativas. Dado que tanto en los estanques de interior como del exterior se encontraron hembras con ovocitos vitelogénicos, se puede establecer que mientras la temperatura se mantenga a $25^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ puede ocurrir el desove y el uso de un enfriador o bomba de calor no es estrictamente necesario.

Con respecto a la alimentación, Álvarez-Lajonchère (2006) menciona que suministrar alimento fresco o congelado, tal como se reporta en otros estudios, no aporta los nutrientes necesarios para los reproductores y su descendencia, además de que incrementa las probabilidades de transmitir enfermedades por patógenos bacterianos y virales. Es por ello, que durante este estudio el alimento suministrado fue de tipo semihúmedo balanceado. El uso de este tipo de alimentos y sus beneficios en la reproducción de peces de la familia Serranidae pueden observarse en lo reportado por Avilés (2000) que evaluó los desoves de cabrillas areneras (*Paralabrax maculatofasciatus*) con tres tipos distintos de dieta: piensos semihúmedos, lisa descongelada y lisa con calamar descongelados, siendo la primera dieta la que presentó diferencias significativas en cuanto a cantidad de huevos y mayor diámetro de estos.

El diámetro promedio de los ovocitos vitelogénicos por hembra que superó los 450 μm antes de la inyección se observó únicamente en la hembra que desovó, las otras dos hembras presentaron promedios de diámetro de ovocitos inferiores a los 450 μm . Esto coincide con lo reportado por autores como Watanabe *et al.* (1995) quienes lograron obtener huevos de hembras de la especie *Epinephelus striatus*, con diámetros de ovocitos a partir de 457 y hasta 561 μm , incluso en peces de familias distintas, como *Lutjanus guttatus* (Lutjanidae), Ibarra y Duncan (2007) comprobaron mediante modelos de regresión no lineal que los diámetros propicios para la inducción hormonal son a partir de 440 μm . Volviendo a especies de la familia Serranidae, autores como Alcántar Vázquez *et al.* (2016) reportaron desoves de la especie *Paralabrax maculatofasciatus* mediante inducción hormonal con ovocitos mayores a 400 μm . Esto podría explicar por qué la hembra 1 (diámetro de ovocito \bar{x} = 385 μm) no desovó, pero no explica el caso de la hembra 2 (diámetro de ovocito \bar{x} = 416 μm), sin embargo, esto podría deberse a que se le aplicaron dos dosis de hormona con una concentración mayor en cada dosis comparado con las otras dos hembras, altas dosis pueden causar una inhibición de la maduración final del ovocito y atresia en los ovocitos más desarrollados tal como lo reportan Zohar y Mylonas (2001) además el monitoreo del pez fue más frecuente, por lo que la manipulación pudo ser una causa de estrés en el organismo evitando el desarrollo de los ovocitos.

Es de vital importancia entonces saber el tamaño apropiado del ovocito al momento de aplicar la hormona para que la inducción al desove sea exitosa. Vale la pena señalar que el tamaño de los ovocitos difiere entre las diferentes especies que se han estudiado como

prospectos para ser adoptadas en sistemas acuícolas marinos tal y como lo menciona Sabater-Pascual (2012).

En otras especies de la familia Serranidae, como *Paralabrax maculatofasciatus*, se han obtenido desoves aplicando la hormona LHRH-a. Por ejemplo, Alcántar-Vázquez *et al.* (2016) probaron tres concentraciones (25, 50 y 100 µg/kg). Observaron que en la concentración de 25 µg/kg un mayor número de hembras respondieron a la inducción hormonal, y también se observaron una mayor cantidad de huevos por hembra, comparado con las otras dos concentraciones. En este caso, el desove ocurrió por masaje abdominal realizado 36:00 horas después de la inyección. Para especies del mismo género que la especie abordada en el presente estudio, se tiene documentada a *Epinephelus striatus* pues se registraron desoves con la misma hormona en concentraciones de 150 µg/kg según lo indican Watanabe *et al.* (1995) con tiempos de desove por “stripping” o masaje abdominal desde 33 a 42 horas. Es notable entonces que las dosis y tiempo de desove posterior a la inyección varía en más de un centenar de µg/kg y hasta 15 horas de diferencia en tiempo de desove, respectivamente por lo que nuestros resultados de 160 µg/kg de LHRH-a y desove de 48 horas posterior a la inyección se ajustan al margen de resultados reportados por los diversos autores, aunque se requieren de más desoves de diferentes hembras y probar más concentraciones para mayor precisión y certeza de estos parámetros.

En la mayoría de los peces teleósteos se han aplicado concentraciones de LHRH-a desde 1 µg/kg hasta 600 µg/kg, según lo mencionan Zohar y Mylonas (2001) por lo que hay un gran margen y posibles resultados para encontrar la mejor concentración en una especie y bajo cierta condición como talla, edad o peso.

Una manera de saber en qué momento es el adecuado para realizar el desove por masaje o “stripping” es observando las características morfológicas como la hinchazón abdominal y protrusión del gonoporo, mismas que se observaron en este estudio y que también fueron reportadas por Kiewek-Martínez (2009) para *Mycteroperca rosacea* y por Watanabe *et al.* (1995) para *E. striatus*. Se comprobó que esta misma condición se cumplió en la especie aquí revisada, lo que es crucial para la estandarización del tiempo de desove, ya que en la acuicultura es de suma importancia evitar manipular excesivamente a los peces, pues según Zohar y Mylonas (2001) el tacto y manipulación repetitiva estresa a los peces lo que puede causar, desde la muerte previa al desove hasta inhibición de la maduración final de los ovocitos.

La densidad en los estanques es otro parámetro que influye en la reproducción de organismos marinos y que en el caso de los meros según Chen *et al.* (2019) cobra una importancia aun mayor debido a los cambios de sexo que pueden surgir por la interacción social en el confinamiento de los organismos, tales cambios tienen consecuencias en la regulación hormonal provocando cambios de sexo no solo de hembra a macho si no de macho a hembra. Generalmente una alta densidad puede provocar estrés en meros de edad reproductora, de manera contraria como lo reportan Ranjan *et al.* (2017) una menor densidad (1 kg/m^3) es idónea para el cortejo y maduración sexual.

Estos factores como la densidad, concentración, diámetros al momento de la inducción y el tiempo de desove por masaje o “stripping” son muy importantes para la implementación de estrategias y planes de cultivo a nivel comercial, por lo que es imperativo registrar los datos para la tecnología de cultivo de una nueva especie.

Gracias a los cortes histológicos fue posible definir de manera más detallada las fases en las cuales se encuentran los ovocitos y no solamente clasificarlos como previtelogénicos y vitelogénicos al observarlos en microscopio óptico durante las biopsias, pues se pueden diferenciar en fresco por su opacidad y el tamaño entre vitelogénesis primaria y vitelogénesis secundaria. Las clasificaciones de los ovocitos procesados con la técnica histológica coinciden con lo descrito por Brulé *et al.* (1996) para la misma especie, pues en las tinciones histológicas de nuestros resultados se encontraron, ovocitos primarios, ovocitos inmaduros, ovocitos en vitelogénesis primaria y ovocitos en vitelogénesis tardía secundaria, lo que evidencia el desarrollo asincrónico en las gónadas.

Con respecto a los huevos, Colin *et al.* (1996) reportan un diámetro promedio de 0.95 mm para *E. morio*. Por otro lado, la forma esférica del huevo, la carencia de pigmento y la presencia de una sola gota de aceite coinciden con lo encontrado en nuestros resultados. En otro estudio para la misma especie elaborado por Brulé y Deniel (1994) observaron un diámetro de ovocitos de $0.92 \text{ mm} \pm 0.05 \text{ mm}$ con una gota de grasa de $0.21 \text{ mm} \pm 0.01 \text{ mm}$, siendo estos últimos más parecidos a los diámetros reportados en el presente estudio (0.90 mm el diámetro del huevo y 0.18 mm diámetro de la gota de aceite).

El número de huevos en el desove observado aquí (192,000) fue menor a lo reportado por Giménez Hurtado *et al.* (2003) quien reportó un promedio de 253,000 ovocitos a punto de desovar por hembras de mero rojo en el banco de Campeche. Si bien esa cantidad es mayor, al ser contabilizados aun en las gónadas obtenidas de ejemplares capturados podría

sobreestimarse, ya que en ocasiones no todos los huevos son expulsados. Sin mencionar otros factores como el peso, talla, edad y alimentación de cada hembra influyen en la cantidad de huevos. Es importante mencionar que en el presente estudio la obtención de los huevos fue de un ejemplar mantenido en laboratorio, y generalmente no todos los huevos son expulsados mediante el masaje abdominal, siguiendo esta lógica se pudieron encontrar más huevos al extraerlos de la misma manera que en el estudio realizado por Giménez Hurtado. Esto da un punto de partida para los siguientes desoves en cautiverio y deja un panorama mas claro al estudio de la reproducción en cautiverio para esta especie.

CONCLUSIONES

- Se observaron ovocitos vitelogénicos en hembras de mero rojo a través de las biopsias durante la etapa reproductiva del año 2021. La vitelogénesis detectada en las hembras se encontró después de 20 meses de cautiverio.
- A una temperatura promedio de entre 24 y 26 °C fue posible observar maduración de la gónada y por ende ovocitos vitelogénicos.
- El tiempo de desove ocurrió 48 horas después de la inyección de la hormona.
- Se obtuvieron 192,000 huevos con un diámetro promedio de 903 μm y gotas de aceite con un diámetro promedio de 183.6 μm .
- Existe una correlación significativa entre el diámetro de los huevos y la gota de aceite.

Recomendaciones

- Se recomienda que el promedio del diámetro de los ovocitos sea mayor a 450 μm al momento de inyectar la hormona LHRH-a así como utilizar una concentración próxima a 160 $\mu\text{g/ kg}$, para tener una mayor probabilidad de obtener desoves.

ANEXOS

ANEXO I. Formulación de Dietas

I A. Formulación de la dieta de reproducción con los ingredientes utilizados y sus respectivos valores del porcentaje de inclusión, porcentaje de proteína y porcentaje de lípidos, formulada por la Dra. Gabriela Gaxiola en el laboratorio de nutrición acuícola de la UMDI Sisal.

Ingrediente	%Porcentaje	%Proteína	%Lípidos
Harina de sardina	52.7	33.7	4.48
Harina de calamar	11.5	9.2	0.76
Harina de Krill	11.5	6.44	2.99
Harina de trigo	10	1	0.1
Aceite de bacalao	4	-	4
Lecitina	2	-	2
Premezcla de vitaminas y minerales, Rovimix peces tropicales	3	-	-
Vitamina C	1.385	-	-
Vitamina E	0.85	-	-
Paprika	2	-	-
Carboximetil celulosa	1	-	-
Total	100	50.34	14.33

I B. Formulación de la dieta de mantenimiento con los ingredientes utilizados y sus respectivos valores del porcentaje de inclusión, porcentaje de proteína y porcentaje de lípidos, formulada por la Dra. Gabriela Gaxiola en el laboratorio de nutrición acuícola de la UMDI Sisal

Ingrediente	Porcentaje	% Proteína	% Lípidos
Harina de Sardina	50	28	7.5
Calamar fresco	5-20	3.2	0.245
Gluten de trigo	12	9.6	-
Concentrado proteico de soya	10	6	-
Almidón de trigo	9	-	-
Premezcla de Vitaminas y min	2	-	-
Carboximetil-celulosa	1	-	-
Total	100	46.8	7.74

ANEXO II. Técnica Histológica

i. Deshidratación

Después de tener la muestra fijada en formol al 40% se procedió a lavarla con agua corriente durante 12 horas para después introducirla en histocassettes y deshidratarla en un tren de alcohol y Xilol como lo especifica la tabla a continuación:

Reactivo	Tiempo en minutos
Alcohol al 70%	20
Alcohol al 80%	20
Alcohol al 90%	25
Alcohol al 90%	30
Alcohol al 100%	30
Alcohol al 100%	30
Xilol grado histológico I	35
Xilol grado histológico II	35

ii. Infiltración e Inclusión

Una vez deshidratadas las muestras se sumergen en tres parafinas a 60 °C, posteriormente se deja enfriar durante algunos minutos y se extraen las muestras con parafina de los histocassettes, en una estación de inclusión o en su defecto dentro de una estufa a 60 °C, se coloca la muestra en moldes de inclusión y se vierte un poco de parafina caliente hasta cubrirla totalmente, sobre la parafina se coloca nuevamente el histocasette y se deja enfriar durante unos minutos.

iii. Corte de Tejido

Ya con las muestras frías se procede a separar la parafina de los moldes de inclusión con ayuda de agua fría o metiendo los moldes con la parafina al refrigerador por unos minutos, los bloques de parafina se colocan en el micrótopo y se ajusta a 5µm de grosor para hacer los cortes, previo a realizar los cortes se debe encender el baño de flotación a 45 °C o en un recipiente hondo verter agua a la misma temperatura para poder estirar las láminas de parafina que salgan de los cortes. Después se deben colocar en portaobjetos con extremo esmerilado donde se debe etiquetar a la muestra que corresponda. Finalmente, todas las laminillas deben colocarse en una canastilla y meterse a la estufa a 60 °C por 20-30 minutos para que la parafina excedente se retire y el corte se adhiera al portaobjetos.

iv. Tinción

En la campana de extracción se coloca el tren de tinción en cajas coplin, para sumergir la canastilla con las laminillas en cada reactivo como lo señala la siguiente tabla

Reactivos	Tiempo
Xilol (I)	10 min
Xilol (II)	10 min
Etanol 100%	5 min
Etanol 100%	5 min
Etanol 90 %	10 toques
Etanol 80 %	30 toques
Etanol 70 %	30 toques
Agua corriente	10 toques
Hematoxilina de Harris	8 min
Agua corriente	6 toques
Alcohol ácido	1 toque
Agua corriente	10 toques
Agua amoniacal	15 toques
Agua corriente	10 toques

Eosina amarillenta (1%)	10 minutos
Agua corriente	10 toques
Etanol 70%	10 toques
Etanol 80 %	10 Toques
Etanol 90 %	10 Toques
Etanol absoluto	10 toques
Xilol III	10 min
Xilol IV	10 min

v. Montado

Se saca una laminilla del xilol y se coloca sobre papel absorbente con el tejido hacia arriba, con ayuda de la pipeta o la varilla, se pone un gota grande de resina sobre el tejido procurando que sea en el centro de la laminilla, inmediatamente después se coloca con cuidado el cubreobjetos y se presiona ligeramente con la goma del lápiz, tratando de eliminar las burbujas de aire que se lleguen a formar, se limpian los excesos de resina y por último se deja secar a temperatura ambiente en un lugar seco y con ventilación.

ANEXO III. Planificación de desove

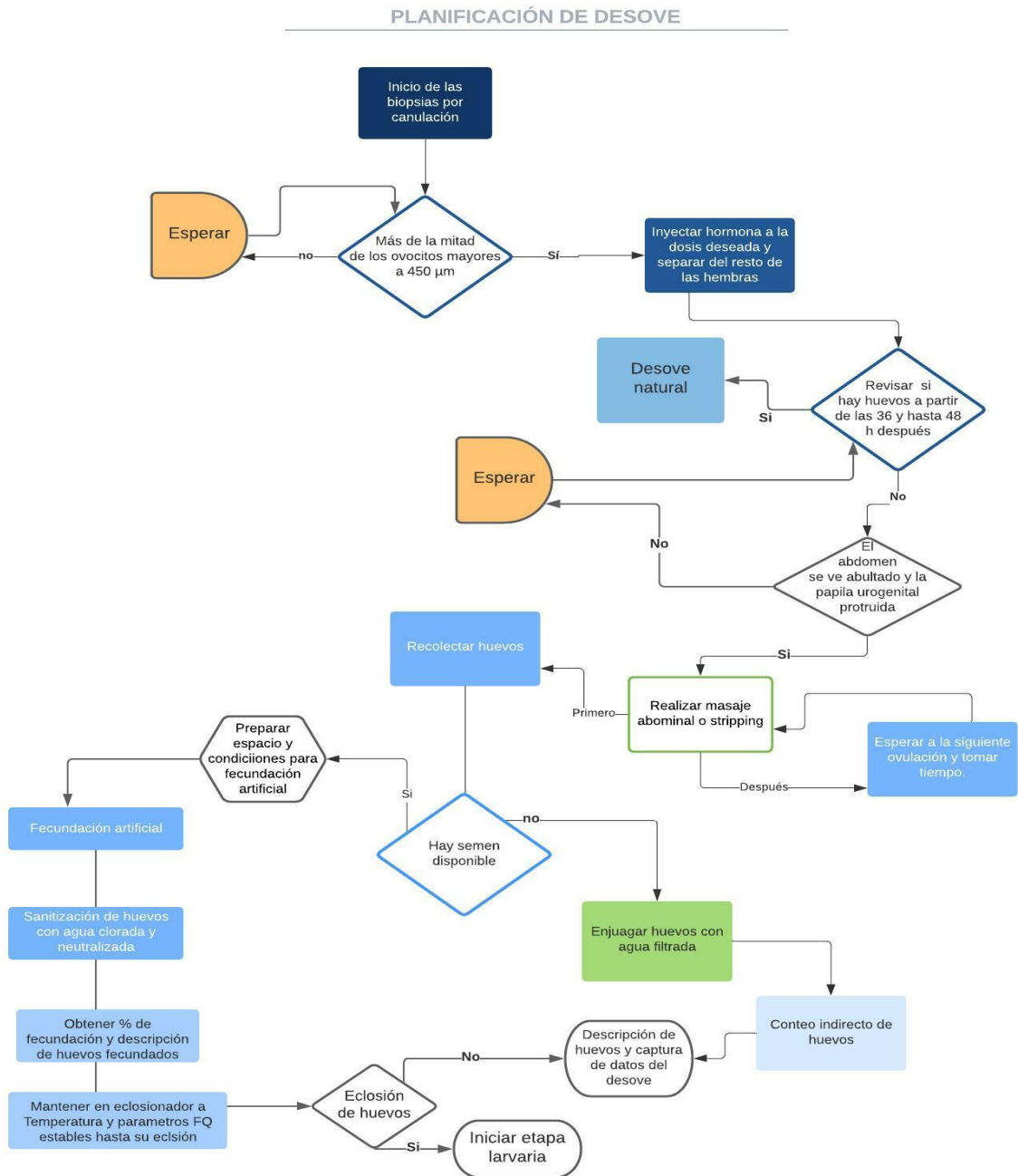


Diagrama de flujo considerando los posibles escenarios al identificar la maduración gonadal en el mero rojo

Descripción de pasos a seguir para el desove

Desove por masaje abdominal o por stripping- Una vez que la anestesia surte efecto, se extrae al pez del agua y se coloca un recipiente debajo del gonoporo para recolectar el desove, se toma al organismo con la región anterior más cercana a la persona que realizara el masaje y con los dedos se aplica una ligera presión empezando debajo de la aleta pectoral en dirección al gonoporo, repitiendo este movimiento continuo hasta que los huevos comiencen a salir (Figura 13 A).

Conteo indirecto de huevos – Se colocan los huevos en una probeta de 500 mL para obtener el volumen total del desove, verter los huevos en un recipiente de plástico y completar con agua marina del mismo estanque donde se encuentre la hembra de la que proviene el desove, posteriormente agitar con una varilla en forma de zig-zag tanto en dirección vertical como horizontal para distribuir los huevos y que las muestras sean homogéneas (Figura 14 B), después tomar 5 ml en la mitad de la altura de la columna de agua (Figura 14 C) y colocarlos en una caja Petri o recipiente pequeño (Figura 14 D), realizar cinco repeticiones para obtener un promedio con el fin de estimar la cantidad de huevos por ml y por el método volumétrico estimar la cantidad de huevos por puesta.

Separación de huevos – Se colocan los huevos en un recipiente y se separan los huevos flotantes de los hundidos. Se obtiene el porcentaje de huevos flotantes dividiendo el peso de estos entre el total de huevos de la puesta.

Descripción de huevos – Se describen las características del huevo como tamaño, color, número de gotas de aceite y diámetro de las mismas. Se toman fotografías y captura de

datos para después procesar los huevos para análisis de nutrientes.

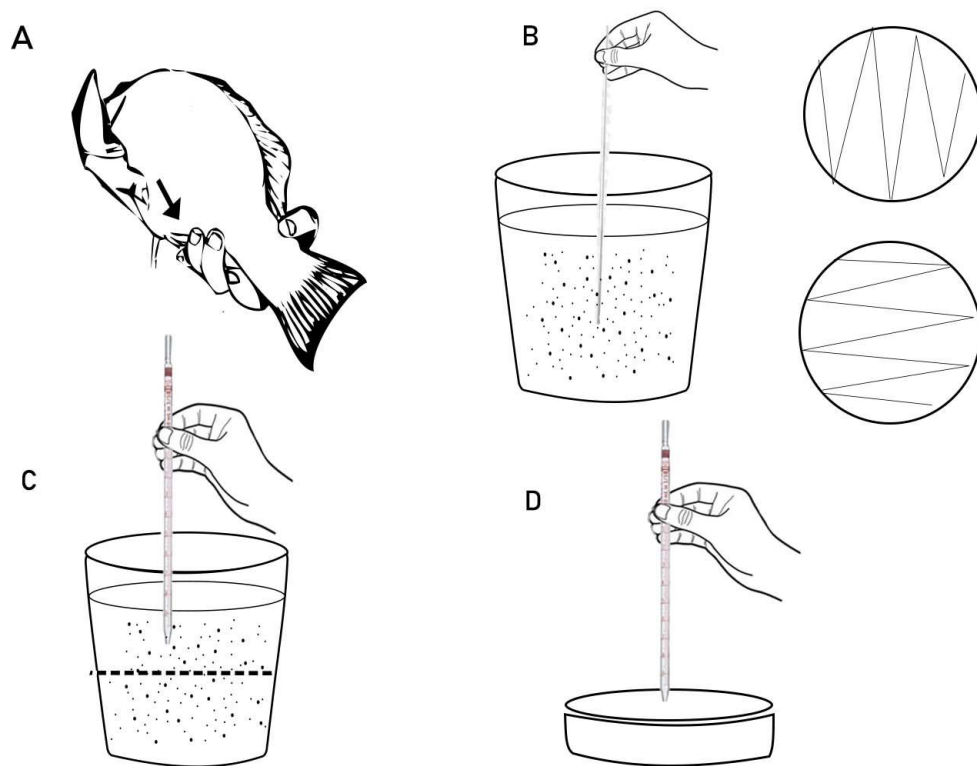


Figura 14. Pasos a seguir para obtener el desove mediante masaje abdominal y separación de los huevos para realizar el conteo por método volumétrico.

LITERATURA CITADA

Alcántar-Vázquez, J. P., Pliego-Cortés, H. S., Dumas, S., Peña-Martínez, R., Rosales-Velázquez, M., & Pintos-Terán, P. (2016). Efectos de un análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRHa) en el desempeño reproductivo de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidae: Serranidae). *Latin American Journal of Aquatic Research* 44 (3): 487–96.

Álvarez-Lajonchère, L.S. & Puello-Cruz, A.C. (2011). El pargo flamenco: *Lutjanus guttatus*, Producción controlada de huevos, larvas y juveniles. Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo. 1ª Edición. 25-40.

Avilés, A. (2000). Cultivo de Peces Marinos. Cap. XV. En: Álvarez-Torres, M., Ramírez-Flores, L.M., Torres-Rodríguez y A. Díaz de León-Corral. Estado de Salud de la Acuicultura, 2000. INP.

Avilés, A. (2005). *Calidad de huevos y larvas según el manejo de los reproductores de la Cabrilla (Paralabrax maculatofasciatus, Pisces: Serranidae)*. Tesis de doctorado. Universitat de Barcelona. 71-171.

Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, Beverly J. & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011). A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, 3: 1, 52 — 70, F: 03.

Burgos, R., & O. Defeo. (2004). Long-term population structure, mortality and modeling of a tropical multi-fleet fishery: The red grouper *Epinephelus morio* of the Campeche Bank, Gulf of Mexico. *Fisheries Research* 66:325-335.

Brulé, T. et Déniel, C. Exposé synoptique des données biologiques sur le mérrou rouge *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828). (1994) du Golfe du Mexique. *FAO Synopsis sur les Pêches*. N° 155. Rome, FAO. 1994. 18.

Brulé, T., T. Maldonado-Montiel, L. Rodríguez-Canche & G. Mexicano-Cintora. (1996). Aspects of the reproductive and trophic biology of the red grouper, *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828), from Campeche Bank, Yucatan, Mexico. *Proc. Gulf. Carib. Fish. Inst.*, 44:39-55.

Brulé, T. Deniel, C. Colas Marrufo, T & Sánchez-Crespo, M. (1999). Red Grouper Reproduction in the Southern Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society* 128:385–402.

Carrillo M. y Zanuy S. (1993). Fisiología de la reproducción de los teleósteos. En *Acuicultura marina*. F. Castello Orvay. Universitat Barcelona Publicacions. España. 125

Castillo López, A. M. (2018) *Efecto de los carbohidratos dietéticos sobre el metabolismo intermediario del mero rojo *Epinephelus morio**. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 39-179.

Chen Jiaying, Ling Xiao, Cheng Peng, Zhifeng Ye, Dengdong Wang, Yuqing Yang & Haifa Zhang. (2019). “Socially controlled male-to-female sex reversal in the protogynous orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*”. *Journal of Fish Biology* 94 (3): 414–21.

Colin, P.L., Koenig, C.C. & Laroche, W.A. (1996). Development from egg to juvenile of the red grouper, *Epinephelus morio* (Pisces: Serranidae) in the laboratory. In: F. Arreguín-Sánchez, J.L. Munro, M.C. Balgos and D. Pauly, *Biology, Fisheries and Culture of Tropical Groupers and Snappers*. Conf. Proc., 48: 399–414.

Comisión nacional de pesca y acuicultura, CONAPESCA. (2018). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. Ficha estadística de mero, 2009 – 2018. 35.

Diario Oficial de la Federación DOF, (2012). Mero. Carta Nacional Pesquera. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de agosto de 2012.

Diario Oficial de la Federación (DOF). (2014). Carta Nacional Pesquera. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de noviembre del 2014.

Durruty-Lagunes, C. V. (2014). *Primeros estudios en la reproducción de mero rojo *Epinephelus morio* bajo condiciones controladas*. Tesis de doctorado. Universitat de Barcelona. 20-138.

Escárcega Rodríguez, Sergio (2020). ¿Cultivo de peces marinos? Hablemos de larvicultura en estanques. *Revista Digital Universitaria (rdu)*. 21, núm. 2 marzo-abril.

FAO, Organización para las naciones unidas para la alimentación y agricultura. (2020a). Producción pesquera y acuícola en América Latina y el Caribe. Fecha de Consulta: 31 julio de 2020. Disponible en:<http://www.fao.org/americas/prioridades/pesca-y-acuicultura/es/>.

FAO, Organización para las naciones unidas para la alimentación y agricultura. (2020b). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Versión resumida. La sostenibilidad en acción. Roma.16. Fecha de consulta: 03 agosto de 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/ca9231es>.

FAO, Organización para las naciones unidas para la alimentación y agricultura. (2021). National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - México. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Text by Montero Rodríguez, M. In: FAO Fisheries and Aquaculture Division [online]. Fecha de consulta 11 agosto de 2021. Disponible en https://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico_es/en.

Ferreira Da Silva, A. (2017). *Requerimientos de proteína y energía: Efecto en el balance bioenergético en juveniles silvestres del mero rojo *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828)*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Frish, A. (2005). Sex change and gonadalsteroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. *Fish Biology and Fisheries*. 14: 481–499.

Gatlin III M. D. (2000). Nutrición de reproductores y juveniles de peces marinos. pp 73-82 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

Gracia-López, V., Rodríguez-Romero, J. & Pérez-Ramírez, J.M. (2004). Inducción del desove con HCG y desarrollo embrionario y de larvas de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Ciencias Marinas* 30(2): 279–284

Giménez-Hurtado, E., Moreno, V., Burgos, R., Alfonso, S., (2003). Reproducción y fecundidad de la cherna americana (*Epinephelus morio*) en el Banco de Campeche. *Oceanides* 18 (1), 13–21.

Giménez-Hurtado, E., Coyula-Pérez-Puelles, R., Lluch-Cota, S. E., González-Yañez, A. A., Moreno-García, V. & Burgos-de-la-Rosa R. (2005). Historical biomass, fishing mortality, and

recruitment trends of the Campeche Bank red grouper (*Epinephelus morio*). *Fisheries research*. 71(3): 267-277.

Habibi, H. R. & Andreu-Vieyra. C. V. (2007). *Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish* In: Babin, P. J., Cerdà, J. & Lubzens, E. From Basic Studies to Biotechnological Applications. Springer .235-240.

Johnson, A. K., Thomas. P & Wilson JR, R. R. (1998). Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology* 52: 502–518.

Ibarra-Castro, L., & Duncan, N. J. (2007). GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 272 (1–4): 737–46.

Kanemaru, Tatsuya, Masaru Nakamura, Ryosuke Murata, Katsuya Kuroki, Hikari Horie, Katsuhisa Uchida, Balasubramanian Senthilkumaran, & Hirohiko Kagawa. (2012). Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture* 358–359: 85–91.

Kiewek- Martínez, N. M. (2009). *Estudio de la reproducción en cautiverio de la cabrilla sardinera, Mycteroperca rosacea: Inducción hormonal al desove, esteroides sexuales y descripción del desarrollo gonadal en el ciclo reproductivo*. Tesis de doctorado. Centro de investigaciones biológicas del noroeste. 26-78.

López-Rocha, J A, & F. Arreguín-Sánchez. (2007). Patrón temporal de movimiento de mero *Epinephelus morio* en la plataforma continental norte de la Península de Yucatán, México. *60th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 1974: 327–34.

Marino, G., Panini, E., Longobardi, A. Mandich, A. Finioia, M.G., Zohar, Y. & Mylonas C.C. (2003). Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture* 219: 841–858.

Moe, M. (1969). Biology of the red grouper *Epinephelus morio* (Valenciennes), from the

eastern Gulf of Mexico. Fla. Dep. Nat. Resour., Mar. Res. Lab., Prof. Pap. Ser., 10:95 .

Monroy-García, C., Galindo-Cortes, G. y Hernández-Flores, A. (2014). Mero *Epinephelus morio* en la Península de Yucatán. En: L.F.J. Beléndez-Moreno, E. Espino-Barr, G. Galindo-Corts, M.T. Gaspar-Dillanes, L. Huidobro-Campos, E. Morales-Bojórquez (ed.), *Sustentabilidad y pesca responsable en México. Evaluación y manejo*. 245-276. SAGARPA/INP, México.

Orvay, F. (2013). *Piscicultura Marina en Latinoamérica* en Manual de Acuicultura. Universitat de Barcelona. 29-32.

Pankhurst, N.W. (1998) Reproduction. En: Black, K.D. and Pickering, A.D. *Biology of Farmed Fish*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1–26.

Park, M. O, Woo J. H., Soo Y. I, Dong W, S., Jinhwan L., In Seok P. (2008). Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture Research* 39 (8): 877–84.

Peter, R.E & Yu, K. L. (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev Fish Biol Fisher* 7, 173-197.

Ranjan, R., Megarajan, S., Xavier, B., Dash, B., Ghosh, S., Menon, M. & Edward, L.L. (2017). Conditioning, maturation and year-round natural spawning of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822), in recirculating aquaculture system. *Aquaculture research*. 48:5864–5873.

Rocher, D. (2013). *Efecto en el crecimiento de juveniles silvestres de mero rojo Epinephelus morio con diferentes porcentajes de inclusión de proteína en la dieta*. Tesis de Doctorado Universidad Nacional Autónoma de México.

SAGARPA. (2011). Registros estadísticos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Delegación Federal en Yucatán. Subdelegación de Pesca. Departamento de Administración de Pesquerías.

Sabater-Pascual, C. (2012). *Eficacia de la inducción hormonal, con distintas dosis de GNRHA, en reproductores de corvina (Argyrosomus regius). Efecto sobre la producción y la calidad de las puestas*. Tesis de maestría. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Sadovy Y.J. (1996) *Reproduction of reef fishery species*. In: Polunin N.V.C., Roberts C.M. (eds) Reef Fisheries. Chapman & Hall Fish and Fisheries Series, vol 20. Springer, Dordrecht.

Shapiro DY. (1987). Reproduction in groupers. En: JJ Polovina y S Ralston (eds.). Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management. Westview Press, Boulder, Colorado. 295-327.

Sudaryanto, Meyer Trevor & Mouse, P.J. (2004). Natural spawning of three species of grouper in floating cages at a pilot broodstock facility at Komodo, Flores, Indonesia. *SPC Live Reef Fish Information Bulletin* 12. 21-25.

Tucker, J. W., Parsons. J. E., Ebanks, G. C. & Bush. P. G. (1991). Induced Spawning of Nassau Grouper *Epinephelus striatus*. *Journal of the world aquaculture Society*. 22:3,190.

Verdín Terán, S. L., Moreno Fierros, Rojo Botello, N. R., García Hernández, A. L., Omana Molina, M., Meneses Aguirre. A. y Nieto Yanez, O.J. (2013). Histología e Inmunohistoquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 4-32.

Watanabe, W. O., Ellis, S.C., Ellis, E. E., Head, W.D., KELLEY, C.D., Morikawe, A., Lee, C.S & Bienfang P.K. (1995). Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. *Aquaculture*. 138. 205-219,

Zohar. Y Mylonas. C. (2001) Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes, *Aquaculture*, 197, 1–4, 2001, 99-136.