



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**EL PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS ALTAMENTE
INSATURADOS (HUFA) EN EL NACIMIENTO, DESARROLLO
Y SOBREVIVENCIA DE JUVENILES DE *Hippocampus erectus*,
PERRY, 1810 (TELEOSTEI: SYNGNATHIDAE).**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

METODIO NICOLÁS VITE GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ELENA PALACIOS MECHETNOV
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DR. FERNANDO NUNO DIAS MARQUES SIMOES
DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
M. EN C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAÍNO
DRA. ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

SISAL, YUCATÁN, MÉXICO, JUNIO DE 2015



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.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



**EL PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS ALTAMENTE
INSATURADOS (HUFA) EN EL NACIMIENTO, DESARROLLO
Y SOBREVIVENCIA DE JUVENILES DE *Hippocampus erectus*,
PERRY, 1810 (TELEOSTEI: SYNGNATHIDAE).**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Doctor en Ciencias

(Biología Marina)

Presenta:

METODIO NICOLÁS VITE GARCÍA

Directora de tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Comité tutorial

Dr. Fernando Nuno Dias Marques Simoes

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés

M. en C. Santiago Capella Vizcaíno

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Sisal, Yucatán, México, Junio de 2015

**EL PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS ALTAMENTE
INSATURADOS (HUFA) EN EL NACIMIENTO, DESARROLLO
Y SOBREVIVENCIA DE JUVENILES DE *Hippocampus erectus*,
PERRY, 1810 (TELEOSTEI: SYNGNATHIDAE).**

COMITÉ JURADO

Dra. Gabriela Gaxiola Cortés

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dr. Fernando Nuno Marques Dias Simoes

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

M. en C. Santiago Capella Vizcaíno

A mis abuelos Ana María, Taide y Metodío Nicolás

A mi padre Metodío Nicolás que en paz descansase

A mi madre Ana

A mi hermana Edna Mónica

*Estoy mirando, oyendo, con la mitad del alma en el mar y la mitad del
alma en la tierra, y con las dos mitades del alma miro el mundo*

Pablo Neruda

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a todos aquellos profesores, que directa o indirectamente han contribuido a mi larga formación académica, formación que por circunstancias y propia convicción ha sido orientada hacia el cultivo de organismos marinos, actividad que tengo la certeza que formará parte integral de las actividades de producción del ser humano en un futuro no muy lejano.

Agradezco especialmente a Elena Palacios y Nuno Simoes por confiar en mi para este proyecto de doctorado, partiendo de una idea original, con todas las dificultades que esto implicó, supieron guiarme acertadamente en los diferentes aspectos de esta investigación. Hago extensivo este agradecimiento a investigadores, técnicos, administrativos y a todo el personal de la UNAM Campus Sisal, y del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por su apoyo en la consecución de este logro, especialmente a los miembros de mi comité tutorial de doctorado: Maité Mascaró, Gabriela Gaxiola, Santiago Capella y Araceli Peña.

También quiero manifestar mi agradecimiento a mi pequeña y mi gran familia, la primera encabezada por mi compañera de vida Mónica y mis dos hijos: Manu y Nico, ya que me han acompañado en todo este camino de esfuerzo, han aguantado mis desveladas y malos humores, y han sido mi principal impulso en la utilización de cada una de las moléculas de ATP por parte de mi cuerpo. A mi madre Ana y a Carlos por estar ahí en todo momento, por ser un apoyo incondicional siempre presente. A los que se fueron antes, mi padre Nicolás y mis abuelos Ana María, Taide y Metodio, que me han dejado como principal herencia un ejemplo de esfuerzo y dedicación a pesar de todas las dificultades que se encuentran en el camino. A mi amada hermana Edna, por ser esa luz que siempre me acompaña.

Finalmente, no puedo dejar de agradecer a todos mis compañeros, colegas, amigos y hermanos, mujeres y hombres de todas las etapas de mi vida, porque gracias a ellos he podido ser lo que soy, y he podido alcanzar una meta más en este largo y sin fin camino de amor al mar, de conocimiento y de vida.

CONTENIDO

RESUMEN
ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.	5
I.1. Antecedentes.	8
I.1.1. Biología de los caballitos de mar.	8
I.1.2. Ecofisiología de los caballitos de mar.	18
I.1.3. Conservación de caballitos de mar en México y en el mundo.	21
I.1.4. Acuicultura de caballitos de mar.	26
I.1.4.1 Condiciones fisicoquímicas del agua en el cultivo de caballito de mar.	26
I.1.4.2. Efecto de la dieta sobre la sobrevivencia y crecimiento de juveniles de caballito de mar en cautiverio.	29
I.1.4.3. Ácidos grasos en caballito de mar.	33
I.1.4.4. Ácidos grasos en la dieta durante el cultivo del caballito de mar.	35
I.2 Hipótesis.	40
I.3 Objetivos.	41
II. SELECCIÓN DE PRESA DE <i>Hippocampus erectus</i> BAJO CONDICIONES DE CAUTIVERIO.	
II.1 Introducción	42
II.2 Materiales y Métodos	44
II.3 Resultados.	48
II.4 Discusión y conclusiones	50
III. CLASES DE LÍPIDOS, PIGMENTOS Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN JUVENILES DE <i>Hippocampus erectus</i> RECIÉN NACIDOS.	
III.1 Introducción.	53
III.2 Materiales y Métodos.	54
III.3 Resultados.	59
III.4 Discusión y conclusiones.	68
IV. ENRIQUECIMIENTO DE NAUPLIOS Y ADULTOS DE <i>Artemia</i> sp. CON HUFA.	
IV.1 Introducción.	73
IV.2 Materiales y Métodos.	76
IV.3 Resultados.	80
IV.4 Discusión y conclusiones.	83

V. DESEMPEÑO DE JUVENILES DE *Hippocampus erectus*, PERRY, 1810, ALIMENTADOS CON DIETAS CON DIFERENTE COMPOSICIÓN DE HUFA.

V.1 Introducción.	89
V.2 Materiales y Métodos.	91
V.3 Resultados.	96
V.4 Discusión y conclusiones.	106
VI. DISCUSIÓN GENERAL	112
VII. CONCLUSIONES GENERALES.	122
VIII. REFERENCIAS.	123
ANEXO I. ANÁLISIS DE ACIDOS GRASOS.	144
ANEXO II.	
Artículo 1: Growth and survival of <i>Hippocampus erectus</i> (Perry, 1810) juveniles fed on <i>Artemia</i> with different HUFA levels	155
Artículo 2: Assessment of lipid classes and fatty acid levels in wild newborn seahorses (<i>Hippocampus erectus</i>) (Perry 1810): implications for survival and growth in aquarium culture	

INDICE TABLAS

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos utilizados para el cultivo de diferentes especies de caballito de mar.....	29
Tabla 2. Resultados de sobrevivencia y crecimiento de juveniles de caballito de mar.....	31
Tabla 3. Fecha de nacimiento, número de crías y su talla al nacer, y talla de 11 machos silvestres analizados en este trabajo.....	60
Tabla 4. Variables morfométricas (en mm) de machos de <i>Hippocampus erectus</i> y sus recién nacidos, muestreados en 2009 y 2010 provenientes de machos silvestres, y una camada abortada de un macho capturado en 2010. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre 2009 y 2010.....	60
Tabla 5. Ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de juveniles de <i>Hippocampus erectus</i> recién nacidos, muestreados en 2009 y 2010 provenientes de machos silvestres, y una camada abortada de un macho capturado en 2010. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre ácidos grasos de camadas de machos muestreados en 2009 y 2010.....	62
Tabla 6. Eigenvalores calculados por análisis de factores, los primeros 7 factores tienen eigenvalores > 1.0.....	63
Tabla 7. Contribución de cada ácido graso a cada factor, considerando 0.7 como una contribución significativa.....	64
Tabla 8. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de los lípidos presentes en los enriquecedores utilizados para el experimento: EPAX 4510TG; EPAX 1050TG; EPAX 3; DHA Protein Selco; E5: Aceite de Canola.....	77
Tabla 9. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de los nauplios de <i>Artemia</i> enriquecidos utilizando EPAX 4510TG; EPAX 1050TG; EPAX 3; DHA Protein Selco; E5: Aceite de Canola. Letras distintas en el mismo renglón denotan diferencias significativas.....	81
Tabla 10. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de los adultos de <i>Artemia</i> enriquecidos utilizando EPAX 4510TG; EPAX 1050TG; EPAX 3; y sin enriquecimiento.....	82
Tabla 11. Niveles bioquímicos (mg g ⁻¹ ww) (media ± error estándar) en nauplios de <i>Artemia</i> sin enriquecimiento y enriquecida con aceite de canola Selco y EPAX. Los nauplios de <i>Artemia</i> fueron analizado utilizando un ANOVA de una vía. Letras distintas en el mismo renglón denotan	

diferencias significativas ($P < 0.05$) en nauplios, analizados por pruebas de Tukey *a posteriori*.....100

Tabla 12. Niveles bioquímicos ($\text{mg g}^{-1}\text{ww}$) (media \pm error estándar) en juveniles de *H. erectus* provenientes de 3 camadas. Se aplicó un ANOVA de una vía para determinar diferencias. La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas.....101

Tabla 13. Niveles bioquímicos ($\text{mg g}^{-1}\text{ww}$) en 3 camadas de *H. erectus* después de comer *Artemia* enriquecida por 30 y 60 días. Se utilizó un ANOVA de dos vías anidado para analizar diferencias entre día (D), camadas anidadas en los tratamientos (B), y tratamientos (T).....101

Tabla 14. Niveles ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) (media \pm error estándar) en nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento y enriquecida con aceite de canola Selco y EPAX. Ver tabla 13 para análisis estadístico.....102

Tabla 15. Niveles de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) (media \pm error estándar) en juveniles de *H. erectus* provenientes de 3 camadas. Se aplicó un ANOVA de una vía para determinar diferencias; letras distintas en el mismo renglón denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) en caballitos de mar, analizadas por pruebas de Tukey *a posteriori*; La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas.....103

Tabla 16. Niveles de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) (media \pm ES) en 3 camadas de *H. erectus* después de comer *Artemia* enriquecida por 30 y 60 días. Ver tabla 11 para análisis estadístico.....105

INDICE FIGURAS.

Figura 1. Ciclo de vida generalizado de <i>Hippocampus</i> sp.....	11
Figura 2. Disección de hembra de caballito mostrando la anatomía de la gónada.....	14
Figura 3. A: Corte transversal a una gónada de caballito de mar. (4x); B: corte transversal dónde pueden observarse los dos lóbulos de la gónada y su desarrollo en espiral (4x); C: corte transversal dónde se aprecia claramente el desarrollo en espiral, con ovocitos más desarrollados hacia las paredes de la gónada (20x).....	15
Figura 4. Macho preñado de <i>H. erectus</i> (izquierda) con el marsupio distendido y macho de la misma especie después de parir (derecha) en el que se puede observar el marsupio en estado de flacidez.	16
Figura 5. Rutas metabólicas para la biosíntesis de HUFA a partir de 18:3n-3 y 18:2n-6, mostrando las dos posibles rutas para la producción de 22:6n-3 desde 20:5n-3 (y 22:5n-6 desde 20:4n-6). $\Delta 6$, $\Delta 5$ y $\Delta 4$ representan las actividades microsomaes desaturadas, E1, E2 y E3 denotan las actividades microsomaes elongadas, y CS denota acorte de cadena peroxisomal. Las flechas punteadas indican rutas para las cuales no hay evidencia en peces (Tomado de Tocher et al., 2003).....	37
Figura 6. Ejemplo de un anfípodo y un copépodo, presas comunes de caballitos de mar en su medio natural.....	43
Figura 7. A. Anfípodo de agua dulce, <i>Hyallela azteca</i> al frente (A) y <i>Artemia</i> sp. al fondo (B); B. <i>Hyallela azteca</i> alimentándose de la planta regional <i>Chaya Cnidoscolus chayamansa</i>	44
Figura 8. <i>Artemia</i> sp. en etapa adulta (tomado de www.naturfoto.cz).....	45
Figura 9. Especímenes de <i>H. erectus</i> en cada uno de tres tratamientos con presas vivas: T1: 100% <i>Artemia</i> ; T2: 100% <i>Hyallela</i> ; T3; 50% <i>Artemia</i> + 50% <i>Hyallela</i>	47
Figura 10. Promedio del porcentaje de presas ingeridas por parte de especímenes de <i>H. erectus</i> mantenidos en cautiverio durante 3-4 meses en los tres tratamientos del experimento: T1: 100% <i>Artemia</i> ; T2: 100% <i>Hyallela</i> ; T3; 50% <i>Artemia</i> + 50% <i>Hyallela</i>	48
Figura 11. Promedio del porcentaje de presas ingeridas por parte de especímenes de <i>H. erectus</i> mantenidos en cautiverio durante 24 horas, en los tres tratamientos del experimento: T1: 100% <i>Artemia</i> ; T2: 100% <i>Hyallela</i> ; T3; 50% <i>Artemia</i> + 50% <i>Hyallela</i>	49
Figura 12. Ubicación geográfica de la Laguna de Chelem, Yucatán (Modificado de Tapia et al., 2008).....	55
Figura 13. Especímenes de <i>H. erectus</i> recién nacidos dispuestos sobre papel milimétrico, observados al microscopio estereoscópico.....	56

Figura 14. Medidas morfométricas generales para caballitos de mar. Adaptado de Foster y Vincent (2004).....57

Fig. 15. Representación gráfica de los 3 primeros componentes principales (71.3% de la varianza acumulada). CP1 (x), CP2 (y) y CP3 (z), calculados por las contribuciones de la proporción de ácidos grasos en juveniles nacidos en 2009 y 2010. El primer grupos “a” está formado por las camadas marcadas con los círculos negros, el segundo grupo “b” marcado con círculos grises, y el grupo “c” marcado con círculos negros sólidos.....67

Figura 16. (A) Recipientes cónicos con nauplios y (B) con adultos de *Artemia* y diferentes emulsiones utilizadas para su enriquecimiento.....78

Figura 17. Composición relativa de EPA en adultos y nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento y sometidos a 3 diferentes enriquecedores (E1: EPAX 4510TG; E2: EPAX 1050TG; E3: Epax 3) (media + E.S.).....85

Figura 18. Composición relativa de DHA en adultos y nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento (SE) y sometidos a 3 diferentes enriquecedores (E1: EPAX 4510TG; E2: EPAX 1050TG; E3: Epax 3) (media + E.S.).....86

Figura 19. Juveniles de *H. erectus* dentro de uno de los acuarios donde se realizó el experimento.....95

Figura 20. A. Supervivencia diaria (%) de juveniles de *H. erectus* durante los 60 días de experimento. B. Índice de condición de Fulton K en juveniles de *H. erectus* durante los tratamientos. Cuadrados negros = *Artemia* sin enriquecimiento (TC); Rombo blancos = *Artemia*+Aceite de Canola; Triángulos blancos = *Artemia*+Selco; Círculos blancos =*Artemia*+EPAX.11B. Barras negras = 0 días; barras grises = 30 días; barras blancas = 60 días. Letras diferentes indican diferencia entre los tratamientos y días de cultivo.....97

Figura 21. Crecimiento de juveniles de *H. erectus* en peso (A) y longitud (B) después de 15, 30 y 60 días de tratamiento. TC = *Artemia* sin enriquecimiento; T1 =*Artemia* + Aceite de Canola; T2 = *Artemia* + Selco; T3 = *Artemia* + EPAX. Barras negras = 0 días; barras grises = 20 días; barras blancas = 60 días. Letras diferentes indican diferencia entre los tratamientos y días de cultivo.....99

RESUMEN

A pesar de que el caballito de mar *Hippocampus erectus* muestra preferencia por alimentarse de una presa natural (anfipodos) en relación con una presa desconocida (*Artemia*), se demostró que esta última es ingerida por esta especie cuando es presentada sin opción. La adaptabilidad a nuevas presas presentada por *H. erectus* en cautiverio, y en especial a *Artemia*, permite utilizar esta presa como alimento con todas las ventajas que esta ofrece como son su fácil adquisición y cultivo, y su potencial para enriquecerla con ácidos grasos y otros nutrientes.

Se analizó el tamaño de las camadas, las clases de lípidos, el perfil de ácidos grasos y los pigmentos en juveniles de *Hippocampus erectus* recién nacidos, provenientes de machos capturados del medio natural durante enero-marzo de 2009-2010. Los lípidos de los caballitos recién nacidos están compuestos de fosfolípidos (75-80% promedio), colesterol libre (8-10%), ésteres de colesterol (4-9%), y acilglicéridos (3-11%). Los principales pigmentos fueron los carotenoides totales (58-79 µg/g). Los ácidos grasos más abundantes en caballitos de mar recién nacidos fueron 22:6n-3 (21-27%) y 20:4n-6 (7-9%). Ambos resultaron mayores que los niveles reportados para otros caballitos de mar. Se sugiere que se requieren elevados niveles de 22:6n-3 en detrimento de 20:5n-3 para producir juveniles de buena calidad del caballito de mar *H. erectus*. Para propósitos prácticos, una dieta para adultos y juveniles a base de presas vivas, y particularmente *Artemia*, debe ser enriquecida con 22:6n-3, para incrementar el crecimiento y sobrevivencia en cautiverio.

Con base en lo anterior, se realizó un bioensayo con nauplios de *Artemia* enriquecidos con emulsiones o aceites disponibles comercialmente con diferentes niveles de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), para alimentar juveniles de *H. erectus* durante 60 días, con el fin de evaluar el desempeño (crecimiento y sobrevivencia), la composición bioquímica

(carbohidratos, proteínas y lípidos), y el perfil de ácidos grasos a los 30 y 60 días de tratamiento, dado que la sobrevivencia de los caballitos de mar durante los primeros meses de vida es uno de los cuellos de botella para la consolidación de la industria del cultivo de caballito de mar. Los niveles de HUFA tuvieron una fuerte influencia en el crecimiento y la sobrevivencia, así como en la composición de ácidos grasos de los caballitos objeto de experimentación. Después de 60 días de tratamiento, nauplios de *Artemia* enriquecida con al menos 8% de DHA utilizados como dieta, mantienen los niveles de este ácido graso por arriba de 20% en juveniles. En cambio, en tratamientos sin enriquecimiento de HUFA y sin DHA, la concentración de DHA en caballitos juveniles decreció hasta 4% después de 60 días. Las variaciones en los niveles de EPA no fueron tan evidentes como las variaciones en DHA. Los juveniles alimentados con dietas ricas en HUFA alcanzaron tallas significativamente mayores que aquellos caballitos alimentados con dietas carentes de HUFA. La sobrevivencia presentó correlación con los niveles de ARA, particularmente en los primeros estadios de sobrevivencia. Además se encontró una correlación negativa entre la sobrevivencia y la relación DHA/EPA a los 30 días y la relación EPA/ARA a los 15 días. Se propone alimentar juveniles de *H. erectus* con nauplios de *Artemia* enriquecida que contengan al menos 8% de DHA.

ABSTRACT

Although the seahorse *Hippocampus erectus* shows preference for feeding on natural prey (amphipods) in relation to an unknown prey (*Artemia*), it was shown that the latter is ingested by the species when presented with no option. Adaptability to new preys by *H. erectus* in captivity, and especially to *Artemia*, allows to use this prey for food with all the advantages that it offers, such as its easy acquisition and cultivation, and their potential to enrich it with fatty acids and other nutrients.

Brood size, lipid classes, fatty acids, and pigments were analyzed in newborn *Hippocampus erectus* juveniles from recently captured pregnant wild males during January–March 2009–2010. The lipids of newborn seahorses are composed of phospholipids (mean 75–80%), free cholesterol (8–10%), cholesterol esters (4–9%), and acylglycerides (3–11%). The main pigments were total carotenoids (mean 58–79 µg/g). The most abundant fatty acids in newborn seahorses were 22:6n-3 (21–27%) and 20:4n-6 (7–9%). Both were higher than levels reported in other seahorses. It is suggested that high levels of 22:6n-3 are required in detriment of 20:5n-3 to produce good quality juveniles seahorse *H. erectus*. For practical purposes, a diet for adults and juveniles using live preys, particularly *Artemia*, must be enriched with 22:6n-3, to increase growth and survival in captivity.

Based on the above, *Artemia metanauplii* enriched with two highly unsaturated fatty acids (HUFA) rich commercial emulsions with different docosahexaenoic acid (DHA) levels (63% and 14% of total lipids), a vegetable oil with no DHA, and non-enriched *Artemia* as control, were used to feed 5-day-old juvenile *Hippocampus erectus* for 60 days. Enriched *Artemia* had similar levels of DHA (13% and 9%), despite great differences of DHA in the emulsions, with traces of

DHA in non-enriched and vegetable oil enriched *Artemia*. More than 20% of DHA was found in 24 h starved juveniles fed both DHA-enriched treatments, similar to values in newly born juveniles, but those fed vegetable oil enriched *Artemia* or non-enriched *Artemia* had 5% of DHA. Total lipid and protein levels were similar in juveniles from the four treatments. The n-3/n-6 ratio was almost four-fold higher in seahorses fed DHA-enriched treatments compared to juveniles fed the nonenriched treatments. Survival of seahorses only partially reflected the DHA levels: it was lower in the vegetable oil treatment, similar in the seahorses fed *Artemia* with higher DHA and in the control treatment, and higher in seahorses fed the HUFA-enriched *Artemia* with lower DHA levels, although growth was similar in the two DHA-enriched *Artemia* treatments. Juvenile *H. erectus* seahorses perform better when they have at least 20% of DHA in their tissues, and these levels can be attained with no more than 14% of DHA in emulsions, eliminating the need for more expensive emulsions with higher DHA levels.

I. INTRODUCCIÓN.

Los caballitos de mar (*Hippocampus* sp.) se encuentran entre las especies más emblemáticas del ambiente marino. Su inusual morfología, su cabeza parecida a la de los caballos terrestres, su gran variedad de colores junto con su capacidad de mimetismo, y su forma de reproducción única dentro del reino animal, son algunas de las características que han hecho tan populares a estos peces. Se distribuyen en todo el mundo entre las latitudes 50°N y 50°S, habitando ecosistemas costeros dominados por algas y/o vegetación sumergida, arrecifes de coral o manglares, principalmente (Foster y Vincent, 2004). En México se han descrito cuatro especies de caballito de mar: *H. ingens* en el litoral del Pacífico; mientras que en el Golfo de México y Mar Caribe habitan *H. erectus*, *H. zosterae* e *H. reidi* (Lourie et al., 1999; Lourie et al., 2004).

A pesar de tener una amplia distribución, las poblaciones de caballito de mar podrían estar amenazadas por diversos factores de los cuales el principal es su utilización para la medicina tradicional de China y otros países asiáticos, pero también se ven afectados por la degradación o destrucción de sus hábitats, la pesca incidental, y el mercado de la acuariofilia. Estos últimos tres factores podrían ser los que afecten a las poblaciones de caballitos de mar en México. Ante estas amenazas se han adoptado en el mundo algunas medidas de protección para estos organismos, como son la restricción o prohibición del comercio de ejemplares capturados del medio natural (incluidas en el Apéndice II de CITES), el establecimiento de zonas de protección, la educación ambiental para la concientización de la población de las zonas costeras y, más recientemente, la implementación de programas de cultivo de estos animales, tanto con fines comerciales, como de investigación.

El cultivo de caballito de mar ha cobrado importancia a partir de fines del siglo pasado, ya que ha sido propuesto en reiteradas ocasiones como una solución para reemplazar la captura de animales silvestres, proveer de oportunidades económicas a los pescadores de países desarrollados y satisfacer cualquier incremento futuro en su demanda (Koldewey y Martin-Smith, 2010). Dentro de la investigación, se ha realizado un importante esfuerzo en diferentes partes del mundo para desarrollar una adecuada tecnología para el cultivo de estos peces (Wilson y Vincent, 1998; Payne y Rippingale, 2000; Job et al., 2002, 2006; Woods, 2000, 2003a,b,c; Wong y Benzie, 2003; Wlison et al., 2006; Sheng et al., 2006, 2007; Lin et al., 2006, 2007, 2008a,b, 2009a,b,c, 2010; Olivotto et al., 2008; Planas et al. 2008, 2010; entre otros).

Como en toda actividad acuícola, la investigación en torno a la nutrición de los organismos a cultivar resulta uno de los aspectos más importantes para el buen desarrollo de la misma. Durante el mantenimiento y maduración de reproductores, así como en etapas críticas como los cultivos larvarios, una adecuada alimentación y nutrición de las especies puede representar la diferencia entre el éxito o el fracaso del proceso de cultivo. Los peces marinos estudiados hasta el momento, además de sus requerimientos generales de proteínas, lípidos y carbohidratos, y de algunos oligoelementos como vitaminas y minerales, tienen la necesidad de consumir lípidos que contengan ciertos ácidos grasos que no pueden sintetizar, y que cumplen una variedad de funciones fisiológicas indispensables para su organismo (Sargent et al., 2002). Estos ácidos grasos, llamados en conjunto ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés), comprenden principalmente a tres por su importancia fisiológica: el ácido araquidónico, 20:4n-6 o ARA (de la familia o grupo n-6 u omega 6); el ácido eicosapentaenóico, 20:5n-3 o EPA; y el ácido docosahexaenóico, 22:6n-3 o DHA (estos últimos de la familia n-3 u omega 3). Además de que los HUFA deben estar contenidos en los alimentos, cada uno de estos HUFA

deben encontrarse en una concentración y proporción adecuada. Lo anterior es de gran importancia ya que estos ácidos grasos cumplen una variedad de funciones con gran especificidad dentro del organismo, y dentro del metabolismo de ácidos grasos ocurren competencias e interferencias por los sitios activos de las enzimas, por lo que las razones de proporción de estos ácidos grasos son tan importantes como las concentraciones mismas de éstos (Sargent et al., 2002).

En relación con los caballitos de mar, poco es lo que se sabe de la composición bioquímica y en particular de ácidos grasos en las diferentes etapas de su ciclo de vida, así como poco se ha determinado en cuanto a los requerimientos nutricionales de estos peces. Al tratarse de peces marinos se puede esperar que sus requerimientos en cuanto a HUFA sean similares a los de otros peces marinos. Sin embargo los caballitos de mar tienen hábitos particulares y la trama trófica en la que evolucionaron pudiera ser distinta de la de peces marinos con hábitos menos sedentarios y que persiguen a sus presas en lugar de esperarlas, lo cual hace necesario investigar acerca de los requerimientos particulares de los caballitos de mar en cuanto a ácidos grasos.

En el presente estudio se determinó, en primer lugar, la preferencia de *H. erectus* entre dos presas vivas: *Artemia* sp, y *Hyalella azteca*. La primera de ellas se trata de un crustáceo branquiópodo cuyo hábitat natural se compone de estanques hipersalinos donde generalmente se encuentran en altas densidades; esta especie ha sido utilizada ampliamente en la acuicultura por la simplicidad de su cultivo, entre otras razones. *H. azteca* es un anfípodo gamárido de agua dulce que, aunque no es una presa natural del caballito de mar, su morfología y movimientos asemejan a la de sus parientes marinos que se encuentran dentro de la dieta natural de *H. erectus*.

En segundo lugar, se determinaron las clases de lípidos y la composición de ácidos grasos presentes en caballitos de mar *H. erectus* recién nacidos, provenientes de diferentes camadas silvestres. El perfil de ácidos grasos de juveniles recién nacidos, previo a su primera alimentación, es el reflejo del perfil de ácidos grasos del vitelo de los huevos, nutrientes que originalmente deben provenir de la madre. Asimismo, con este perfil se puede inferir la función de algunos ácidos grasos en relación con su concentración, tomando en cuenta lo que ocurre con otros peces marinos. Además, la presencia de HUFA en el perfil de los recién nacidos puede ser un buen indicador de la importancia de incluirlos en la dieta, en concentraciones proporcionales a las que se presentan en los lípidos de los juveniles.

En un siguiente paso se determinó el efecto de dietas, con base en *Artemia* viva con diferente composición de ácidos grasos, sobre el crecimiento, la supervivencia y la composición de estas moléculas en juveniles *H. erectus* durante los primeros dos meses de vida. Se puso especial énfasis en establecer dietas con diferente composición de HUFA, con el fin de tener una aproximación a los requerimientos de estos ácidos grasos para esta especie de hipocampo.

I.1 Antecedentes.

I.1.1 Biología de los caballitos de mar.

Los caballitos de mar o hipocampos, como se conocen comúnmente, son peces teleósteos pertenecientes a la familia Syngnathidae que incluye también a los peces pipa, a los dragones de mar y a los caballitos pipa. El gran parecido morfológico entre muchas especies, el elevado número de nombres comunes que aparecen en la literatura (>120), así como la hibridación provocada en cautiverio, hacen que la clasificación taxonómica de estos organismos resulte

complicada. Todos los caballitos de mar se agrupan taxonómicamente en un solo género (*Hippocampus*), dentro del cual Lourie et al. (2004) reconocen 33 especies, mientras que Kuitert (2000) menciona que existen más de 50. Al parecer el género *Hippocampus* tiene una antigüedad de al menos 20 millones de años (Fritzsche, 1980), sin embargo, el origen de la mayoría de las especies parece ser mucho más reciente. Por ejemplo *Hippocampus algiricus* e *Hippocampus reidi* se piensa que divergieron hace 0.5 y 1.3 millones de años, respectivamente (Casey et al., 2004).

Todos los hipocampos tienen la misma morfología y función corporal básica: cabeza flexionada ventralmente sobre un cuerpo alargado y arqueado; postura erguida; ojos que se mueven de manera independiente uno del otro; un largo hocico tubular (sin dientes) que succiona el alimento; piel (sin escamas) ajustada a una serie de placas óseas en forma de anillos; aleta caudal modificada en una larga cola flexible y prensil; tracto digestivo sin estómago diferenciado; presencia de un marsupio o bolsa incubadora en los machos adultos (Foster y Vincent, 2004).

El cuerpo alargado les permite desempeñarse en un ambiente dominado por vegetación acuática, ambiente dentro del cual estos peces han logrado una notable capacidad de mimetismo. La forma de su cuerpo y su capacidad de camuflaje cumplen dos funciones claves para el desempeño de los caballitos de mar dentro de su ambiente natural. Por un lado, los hacen ser menos visibles a los ojos de posibles depredadores, y por otro lado les permite pasar desapercibidos antes sus presas potenciales (Foster y Vincent, 2004).

Se ha supuesto que la fuerte asociación con el ambiente que presentan los syngnathidos ha tenido implicaciones evolutivas tan importantes como la misma aparición de los caballitos de mar, durante el oligoceno, a partir de un linaje de peces pipa. Durante el Oligoceno tardío, eventos

tectónicos en el Indo-Pacífico occidental resultaron en la aparición de vastas zonas de aguas someras a las cuales está asociada la expansión de hábitats de pastos marinos, lo cual pudo haber favorecido la postura erecta de los caballitos de mar, al favorecer su mimetismo dentro de estos hábitats (Teske y Beheregaray, 2009). Aún si no se cuenta con registro fósil de los ancestros de los caballitos de mar, existen tres especies vivientes llamadas caballos pipa (pipehorses) del género *Idiotropiscis* que tienen un auténtico aspecto de caballitos de mar, pero carecen de la posición erecta de estos últimos. Esta radiación adaptativa de los caballitos de mar los pudo haber llevado, junto con otras características de la especie, a ocupar casi todos los mares templados y tropicales del mundo, mientras que las especies de caballos pipa se quedaron restringidas a sus hábitats originales dominados por macroalgas (Teske y Beheregaray, 2009).

Desde el momento de nacer, los caballitos de mar cuentan con adaptaciones importantes para la ingestión de presas, que consisten en una variedad de pequeños crustáceos (copépodos, anfípodos, misidáceos, palaemonidos, etc.), y en menor medida en larvas de peces y otros organismos del zooplancton (Teixeira y Musick, 2001; Payne y Rippingale, 2000). Además de su mimetismo y relativa inmovilidad, con los que utilizan una estrategia llamada “sentarse y esperar” (“sit and wait”), sus ojos pueden moverse de manera independiente el uno del otro, permitiéndoles tener una visión periférica de su medio ambiente (James y Heck, 1994). Las presas son ingeridas enteras mediante un rápido movimiento de succión con su largo hocico tubular y protáctil, sin dientes, por lo que el tamaño de la boca limita el espectro de tallas de presas potenciales (Foster y Vincent, 2004; Ripley y Foran, 2007).

La reproducción de los syngnathidos refleja una serie de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y conductuales, que confieren a esta familia sus características más distintivas, y han moldeado en gran medida su evolución (Paczolt y Jones, 2010). En contraste con la mayoría de las especies

de vertebrados, el cuidado parental principalmente por parte del macho es común en peces y engloba una notable diversidad de adaptaciones (Baylis, 1981).



Figura 1. Ciclo de vida generalizado de *Hippocampus* sp. (tomado de <http://biologiacaballitodemar.blogspot.mx/>)

Los peces de la familia syngnathidae presentan una de las formas más especializadas de cuidado parental en animales (Paczolt y Jones, 2010). Durante la cópula las hembras transfieren los ovocitos maduros a estructuras morfológicas especializadas que se encuentran localizadas ya sea en tronco (Subfamilia Gastrophori) o en la cola del macho (Subfamilia Urophori) (Wilson et al., 2001). El macho provee todo el cuidado post-fertilización y tiene, para ello, adaptaciones fisiológicas para osmoregular y oxigenar a los embriones en desarrollo (Wilson et al., 2001,

2003; Carcupino et al., 2002; Monteiro et al., 2005; Ripley y Foran, 2006; Paczolt y Jones, 2010). Aunque no se ha demostrado en el género *Hippocampus* se sabe que en otros miembros de la familia Syngnathidae ocurre una transferencia de nutrientes del padre preñado a los huevos/embriones (Ripley y Foran, 2009; Kvarnemo et al., 2011) e incluso de los embriones al padre (Sagebakken et al., 2010). Mientras que todas las especies de syngnathidos se encuentran adaptadas para el cuidado parental, la estructura de incubación varía entre las especies, desde simples áreas de adhesión ventrales hasta estructuras mucho más complejas como los marsupios de los caballitos de mar, que pueden ser completamente sellados (Wilson et al., 2001, 2003; Ripley y Foran, 2006). Wilson et al. (2001) demostraron, usando análisis genéticos, que la rápida diversificación de las estructuras de incubación en machos ha estado asociada con la mayor radiación evolutiva del grupo, sugiriendo que el desarrollo y diversificación de estructuras involucradas en el cuidado parental pudo haber sido una innovación evolutiva clave de la familia Syngnathidae.

Sin embargo, contrariamente de lo que podría pensarse, hay suficiente evidencia para decir que la evolución del saco incubador es independiente de la conducta sexual en los syngnathidos (Wilson et al., 2001). Más bien factores ambientales y limitaciones morfológicas y fisiológicas pueden determinar diferencias en las tasas de potencial reproductivo entre los sexos (Vincent et al., 1992; Ahnesjö, 1995; Kvarnemo y Ahnesjö, 1996; Sogabe et al., 2008), lo que a su vez determina la competencia por pareja y la selección sexual.

La monogamia, que se encuentra en muchas especies de syngnathidos, y que ha sido documentada en la mayoría de las especies de caballitos de mar analizados, probablemente actúa para incrementar el éxito reproductivo de peces encontrados en bajas densidades, que tienen poca movilidad, y que dependen del camuflaje como defensa contra la depredación (Vincent y Sadler,

1995). Los caballitos posiblemente podrían tener una mayor eficiencia reproductiva apareándose con la misma pareja, lo cual resultaría en camadas más numerosas, acoplamiento de las tasas reproductivas, y menor tiempo y energía empleados en el cortejo (Kvarnemo et al., 2000; Foster y Vincent, 2004).

El tamaño de los huevos y el cuidado parental, son dos características reproductivas que pudieron haber co-evolucionado en peces (Kolm y Anhesjö, 2005). En general, las especies de peces que proveen cuidado parental, también producen huevos más grandes que las especies que desovan directamente a la columna de agua, (Bagarinao y Chua, 1986; Goodwin et al., 2002; Wilson et al., 2003; Foster y Vincent, 2004). El cuidado parental parece incrementar las posibilidades de sobrevivir y el desempeño de su descendencia, pero reduce la habilidad de los padres para diseminar su descendencia, y reduce además la cantidad de huevos/embriones que pueden ser gestados (baja fecundidad) (Wilson et al., 2003).

Aparentemente la talla de los ovocitos entre las especies de hipocampos está más relacionada con la latitud, y por tanto con la temperatura del agua, que con la talla de los padres (Foster y Vincent, 2004), lo cual apoya la teoría de que el tamaño óptimo del ovocito es independiente del tamaño de los padres (Wootton, 1990). Vincent (1990) reporta que los ovocitos maduros de *H. erectus* tienen un diámetro promedio de 1.5 mm, mientras que en observaciones realizadas por el autor de esta tesis, los ovocitos maduros de esta especie presentaron una forma de pera con una talla promedio de 3.6 mm en el eje mayor y 1.8 mm en el eje menor (n=20). En general, los caballitos de mar, como algunos otros peces con cuidado parental, tienen diámetros mayores de ovocitos que la mayoría de los teleósteos marinos (Goodwin et al., 2002; Planas et al., 2010).



Figura 2. Disección de hembra de caballito mostrando la anatomía de la gónada.

Los ovarios pareados de las hembras de *H. erectus* son órganos tubulares alargados, los cuales se localizan en la región posterior del celoma, por detrás y embebidos en la masa visceral, y resultan conspicuos debido a su color anaranjado (Fig. 2). El ovario contiene las células sexuales femeninas, las ovogonias, las que, a través de la ovogénesis, constituirán los ovocitos. La ovogonia se rodea de células somáticas, llamadas foliculares, formando el folículo primario. Durante esta etapa, la ovogonia inicia el proceso meiótico, avanzando hasta la fase diploteno de la profase I, en la cual ocurrirá su crecimiento. Cuando el ovocito llega a su máximo desarrollo, continuará la meiosis hasta la telofase I, coincidiendo con el tiempo de ruptura del folículo, en la ovulación (Estrada y Uribe, 2002). El epitelio interior del ovario (luminal) se deriva del epitelio celómico y los huevos son generados a través de este revestimiento epitelial y se acumulan en el lumen del ovario (Selman et al., 1991). La ovogénesis ocurre en el llamado borde germinal (germinal ridge), e *H. erectus* cuenta con dos en cada ovario, siguiendo los huevos los estadios típicos de desarrollo que han sido descritos para otros teleósteos marinos, los cuales incluyen un estadio primario de crecimiento, estadio alveolo cortical, vitelogénesis (el mayor estadio de crecimiento), maduración y finalmente ovulación (Selman et al., 1991). El desarrollo de los ovocitos dentro del ovario se da desde los bordes germinales hacia la pared de la gónada,

siguiendo un patrón en espiral, con los ovocitos de mayor desarrollo localizados más cerca de la pared del ovario (Fig. 3).



Figura 3. A: Corte longitudinal a una gónada de caballito de mar, OP: ovocitos previtelogénicos; PV: ovocitos vitelogénicos; EL: epitelio luminal; W: pared muscular del ovario. (4x); B: corte transversal dónde pueden observarse los dos lóbulos de la gónada y su desarrollo en espiral (4x); C: corte transversal dónde se aprecia claramente el desarrollo en espiral, con ovocitos desarrollándose del borde germinal (BG) hacia las paredes de la gónada (20x). Tinción utilizada: Hematoxilina-Eosina.

La duración del “embarazo”, o tiempo de gestación, de los hipocampos machos, varía de 9 a 45 días en poblaciones naturales, dependiendo de la especie y la temperatura del agua (Foster y

Vincent, 2004). En poblaciones en cautiverio Lin et al. (2007) encontraron variación en los tiempos de gestación de machos de *H. kuda* (15 a 30 días) dentro de los mismos tratamientos, probando diferentes dietas para la maduración de reproductores. De igual forma Lin et al. (2008b) encontraron variaciones intra-tratamientos en los tiempos de gestación de machos de *H. erectus*, yendo de 12 a 22 días.

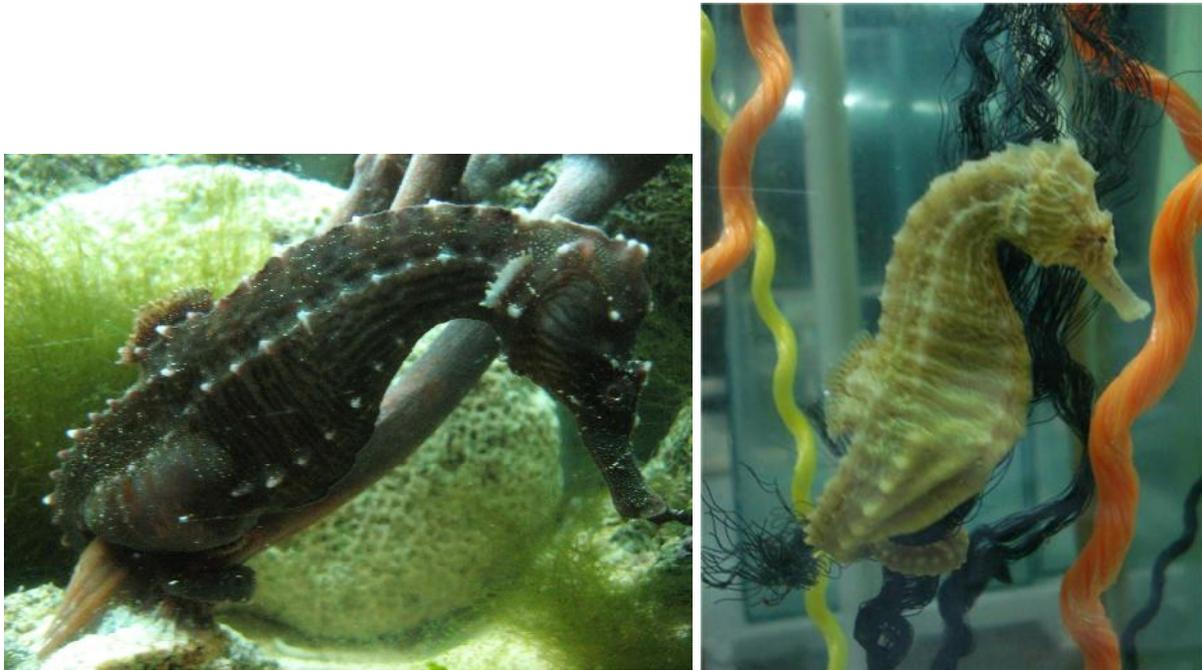


Figura 4. Macho preñado de *H. erectus* (izquierda) con el marsupio distendido y macho de la misma especie después de parir (derecha) en el que se puede observar el marsupio en estado de flacidez.

Al parecer, los machos de todas las especies tienen varios embarazos durante una temporada reproductiva. Las hembras tienen huevos disponibles también todo el tiempo, pero no está bien establecida la frecuencia con la que cada individuo de cada especie se reproduce (Vincent y Sadler, 1995; Kvarnemo et al., 2000; Perante et al., 2002; Foster y Vincent, 2004). Para determinar la frecuencia reproductiva también es importante el tiempo que pasa el macho entre la expulsión de su descendencia y un nuevo cortejo-apareamiento. Se ha establecido que los machos

de *H. whitei* están listos para aparearse el mismo día que expulsan a sus crías (Foster y Vincent, 2004).

Al final del tiempo de gestación se dice que el macho entra en “labor de parto”: sujetándose por la cola realiza contorsiones para expulsar a sus crías, lo cual puede llevarle horas (Vincent, 1990; Foster y Vincent, 2004). Cuando son expulsados por el padre, los nuevos caballitos son una réplica en miniatura de los adultos, con sus aletas radiales completas, anillos óseos en el tronco y pigmentación (Mi et al., 1998). Por esta razón en la literatura se utiliza indistintamente el término cría, juvenil y recién nacido (Foster y Vincent, 2004). En este trabajo, se utilizará el término juvenil para los caballitos desde que son expulsados por el padre hasta su maduración sexual, y en cada caso se especificará la edad de los mismos. De igual forma se utilizará el verbo nacer para hacer referencia a la expulsión de los caballitos por parte del padre.

De manera similar que con los huevos, entre las especies de caballitos, la longitud de los juveniles al nacer está más relacionada con la latitud (temperatura) que con la talla de los padres, y esta longitud generalmente es mayor que la de otros teleósteos marinos al momento de la eclosión, lo cual puede deberse al mayor tiempo de desarrollo antes del nacimiento (Foster y Vincent, 2004). En contraste, se ha encontrado una correlación positiva entre el número de huevos maduros por hembra (fecundidad), así como el número de huevos/embriones dentro del macho, con la talla de los padres en una población silvestre de *H. erectus* (Teixeira y Musick, 2001). Los autores citados encontraron caballitos maduros de ambos sexos de 4.0 a 12.6 cm, teniendo los machos cantidades similares de huevos/embriones (97-1552) que las hembras de ovocitos maduros (90-1313). Por otro lado, Lin et al. (2008b) reportan valores de fertilidad de 189-362 en seis parejas de caballitos mantenidas en cautiverio. Esta diferencia entre la fecundidad caballitos del medio natural y caballitos cultivados refleja, por un lado, una mayor

homogeneidad en los resultados obtenidos en cautiverio, y por otro lado, que el potencial de reproducción de esta especie es muy superior a lo obtenido hasta ahora en acuicultura, y un mejor entendimiento de las factores que favorecen la eficiencia reproductiva debe contribuir a alcanzar ese potencial.

I.1.2. Ecofisiología de los caballitos de mar.

Los syngnathidos se distribuyen en aguas tropicales y templadas, por lo general formando asociaciones estrechas con su hábitat, constituido principalmente por praderas de pastos marinos o macroalgas, y en menor medida por arrecifes de coral, zonas rocosas y fondos arenosos (Lourie et al., 1999; Kuitert, 2000). La mayoría de las especies de peces pipa son de latitudes templadas; en contraste, la mayor parte de los hipocampos son tropicales y el 70% del género habita aguas del Indo-Pacífico (Lourie et al., 1999; Kuitert, 2000; Perante et al., 2002; Lourie et al., 2004). Los caballitos de mar habitan generalmente aguas costeras someras (<30m prof.), sin embargo, existen reportes de organismos capturados a profundidades de hasta 100 m (Foster y Vincent, 2004). En general, las especies templadas habitan pastos marinos y macroalgas, mientras que las especies tropicales, aparte de ocupar estos ecosistemas, habitan en zonas arrecifales y en menor medida en zonas de manglar (Foster y Vincent, 2004).

La especie *Hippocampus erectus* se distribuye desde el Sur de Nueva Escocia en Canadá, a lo largo de la costa oeste del Atlántico, incluyendo el Golfo de México y el Caribe, hasta Venezuela. (Lourie et al., 1999; Fritzsche y Vincent, 2002). Habita zonas costeras y estuarinas comúnmente asociados con praderas de *Thalassia*, *Zoostera* y *Sargassum*, o bien se les puede encontrar sobre corales blandos, algas bentónicas, esponjas y fondos suaves a profundidades de 0 hasta 70 m (Kuitert, 2000; Foster y Vincent, 2004; Froese y Pauly, 2004). Debido a su amplio rango de

distribución y a la diversidad de hábitats que ocupa, se considera una especie tolerante a un amplio intervalo de temperatura (5.0 a 29.9 °C) y de salinidad (10.0 a 36.6 ‰) (Teixeira y Musick, 2001; Froese y Pauly, 2004).

Los caballitos de mar estudiados parecen tolerar amplios intervalos de salinidad, aunque no hay especies de agua dulce (Lourie et al., 1999; Foster y Vincent, 2004). Hay reportes de especies encontradas en hábitats estuarinos, tales como *H. abdominalis* (Foster y Vincent, 2004), *H. capensis* (Whitfield, 1995; Bell et al., 2003), *H. kuda* (Kuitert, 2000), *H. reidi* (Rosa et al., 2005), e *H. erectus* (Teixeira y Musick, 2001; Vite-García, obs pers.), que parecen tolerar salinidades fluctuantes, aunque pueden experimentar altas tasas de mortalidad durante fuertes escurrimientos de agua dulce (Russell, 1994; Bell et al., 2003).

Se ha determinado que la mayor parte de los ajustes osmoregulatorios en la composición del fluido corporal en peces ocurre tempranamente durante la exposición o tratamiento (Mancera et al., 1994). El caballito de mar *H. kuda* ajusta su fluido corporal dentro de los primeros cuatro días de tratamiento y puede tolerar salinidades de 15 a 50 ‰, con altas tasas de sobrevivencia y crecimiento de 15 a 30 ‰, y dentro de este último intervalo de salinidad el contenido total de agua en el cuerpo no se altera de forma significativa, indicando una fuerte capacidad osmoregulatoria en estos peces (Hilomen-García et al., 2003).

Lin et al. (2009) encuentran que en *H. erectus* hay una influencia significativa de la salinidad sobre el crecimiento en longitud y peso. Estos autores encontraron un mayor crecimiento a 31-33 ‰ (salinidad óptima) y mencionan que en las otras salinidades analizadas (27, 29 y 35 ‰), los costos energéticos osmoregulatorios podrían ser los causantes de un menor crecimiento. Sin embargo en todas las salinidades estudiadas se encontró crecimiento, lo cual indica que se

encuentran dentro del límite de tolerancia de la especie. En estudios de campo realizados por el grupo de trabajo de la UMDI-Sisal (UNAM), se han encontrado organismos de la especie *H. erectus* en una laguna costera de la costa de Yucatán, donde la condición predominante es una mayor evaporación que precipitación, con ausencia de escurrimientos y escasos aportes de agua dulce subterráneos, lo que provoca una condición anti-estuarina en buena parte del año. En esta laguna se han reportado salinidades desde 10 ‰ (después del paso de un huracán) hasta 65 ‰ (Valdez-Lozano et al., 1994).

En poblaciones silvestres de peces las variaciones anuales de temperatura regulan en gran medida los ciclos reproductivos. En general, las especies de syngnathidos que habitan latitudes templadas se reproducen durante los meses más cálidos del año, mientras que las especies que habitan latitudes tropicales o sub-tropicales, se reproducen a lo largo del año, aunque parecen tener cierto periodo de inhibición de la reproducción durante los meses más cálidos (Masonjones y Lewis, 2000; Monteiro et al., 2001; Foster y Vincent, 2004). Las variaciones latitudinales en la temperatura pueden tener un efecto en las poblaciones de una misma especie, sobre todo cuando ésta tiene una amplia distribución. De acuerdo con Teixeira y Musick (2001) *H. erectus* tiene su temporada reproductiva de mayo a octubre en Chesapeake Bay (USA, latitud templada), pero observaciones del autor de este documento parecen indicar que esta misma especie tiene inhibida su reproducción en los meses de verano en la costa de Yucatán (latitud tropical), cuando las temperaturas son máximas, lo cual coincide con lo encontrado por Monterio et al. (2001) para *Nerophis lumbriciformis*, un pez pipa.

En general, se ha reportado que los peces experimentan mayores tasas metabólicas a mayores temperaturas dentro del intervalo de tolerancia de la especie, lo cual se puede ver reflejado en mayores tasas de crecimiento. En condiciones naturales *H. whitei*, una especie subtropical,

experimenta una variación anual de temperatura de 16 a 21 °C cerca de Sydney, Australia; sin embargo, en condiciones de cautiverio su tasa de crecimiento se ve favorecida a 26 °C (Wong y Benzie, 2003). Aunque los caballitos de mar en general tienen intervalos amplios de tolerancia a la temperatura, dependiendo su zona geográfica, algunas especies parecen ser vulnerables a las altas temperaturas. Hay observaciones de mortalidades masivas de *H. capensis* en eventos estocásticos con temperaturas entre 28 y 32°C, siendo una especie que normalmente habita entre 14 y 25 °C (Bell et al., 2003). En cautiverio *H. erectus* e *H. reidi* experimentan diferentes enfermedades con mayor frecuencia a temperaturas por encima de los 28 °C (Gomezjurado com. pers.; Vite-García obs. pers.).

I.1.3. Conservación de caballitos de mar en México y en el mundo.

Muchas de las características de la historia de vida especializada de los syngnathidos y de los caballitos de mar en particular, incluyendo un largo cuidado parental por parte de los padres, baja fecundidad, estructuras sociales definidas (monogamia estricta en muchas especies), baja movilidad, pequeños rangos de hogar, escasa distribución y asociación estrecha con el hábitat, hacen a las poblaciones de estos peces ser altamente vulnerables al impacto humano (Foster y Vincent, 2004; Martin-Smith y Vincent, 2005; Vincent et al., 2005; Curtis and Vincent, 2006; Freret-Meurer y Andreatta, 2008).

Las principales amenazas que afectan a las poblaciones de caballito de mar a nivel mundial son su captura para venta como materia prima para la medicina tradicional china, su pesca incidental (principalmente relacionada con la pesquería de camarón), y posterior venta para la medicina china o como souvenir en diferentes partes del mundo, su captura para venta como especie ornamental, y la degradación de su hábitat (Lourie et al., 1999; Foster y Vincent, 2004).

Se estima que se comercializan varios millones de caballitos de mar en todo el mundo cada año, teniendo como destino principal la medicina tradicional china. India, Filipinas, Tailandia y Vietnam han sido reportados como los principales países exportadores, mientras que China, Hong Kong y Taiwan resultaron ser los principales países importadores (Vincent, 1996; Foster et al., 2014). La principal especie utilizada en la medicina tradicional china es *H. kuda*, pero especies como *H. histrix*, *H. kelloggi*, *H. spinosissimus*, *H. trimaculatus* y varias más también son capturadas de manera importante para este fin (Vincent, 1996; Lourie et al., 2004; Foster et al., 2014).

Poco se ha hecho para estimar los efectos de la pesca incidental sobre las poblaciones de caballito en el mundo. Entre éstos esfuerzos Meeuwig et al. (2006) estimaron que, en Vietnam central, se pescan entre 36,000 y 55,000 caballitos cada año, de manera incidental, por una flota camaronera de un total de 150 a 170 embarcaciones, lo que corresponde a 0.9 a 1.6 caballitos/embarcación/noche. Por otra parte, en Hernando Beach, Florida, Baum et al. (2003) calcularon que se pescan anualmente 72,000 organismos de la especie *H. erectus* en las redes camaroneras de la flota de ese lugar, compuesta por 31 embarcaciones que pescan por las noches en zonas de pastos marinos. Tomando en cuenta la captura por unidad de esfuerzo, los citados autores realizaron una estimación de 9.64 caballitos/embarcación/noche. En la Laguna de Chelem, en la costa de Yucatán, se ha constatado que los pescadores locales capturan caballitos de mar (*H. erectus*), parte de los cuales son devueltos al mar (lo cual no deja de tener posibles afectaciones sobre la estructura social), pero también una parte de éstos son vendidos en las zonas turísticas aledañas como objetos de “recuerdo” y otros más son vendidos vivos en acuarios de la región (Vite-García, obs. pers.).

Otro de los aspectos que más impacto tiene sobre las poblaciones naturales de caballitos de mar, es la degradación de las zonas costeras que estos habitan (Lourie et al., 1999; Foster y Vincent, 2004). Las actividades humanas y el desarrollo económico en la región costera han ejercido una presión extrema sobre los ecosistemas costeros y han tenido como resultado una significativa pérdida del hábitat (Schindler et al., 2003; Hood, 2004; Rupp-Armstrong y Nicholls, 2007). La degradación de la zona costera ocurre a diferentes escalas temporales y espaciales e involucra procesos tan variados que incluyen niveles de organización desde el molecular o bioquímico, hasta el socioeconómico.

Desgraciadamente, poco es lo que se sabe del estado de conservación de las poblaciones de caballito de mar y de la densidad de poblaciones naturales. Se tienen algunos datos que indican que estas poblaciones presentan por lo general una distribución escasa y en “parches” (Perante et al., 2002; Vincent et al., 2005). Sin embargo estas podrían ser zonas también impactadas anteriormente, con lo cual se vuelve muy difícil conocer la densidad “natural” de los caballitos de mar y el impacto al que han estado sometidos.

Ante las amenazas a nivel mundial a las que se encuentran expuestas las poblaciones naturales de caballito de mar, a partir de noviembre de 2002 (con implementación en mayo de 2004), todas las especies de caballito de mar se encuentran dentro del Apéndice II de CITES, que es la Convención Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas de la Flora y Fauna Silvestres (www.cites.org). Esta es una medida que regula el comercio mundial de estos organismos; sin embargo, no mitiga las amenazas a que están sujetas las poblaciones naturales de muchas especies, entre ellas *H. erectus*.

La conservación de los caballitos de mar es importante, no sólo por tratarse de organismos carismáticos y por sus interesantes comportamientos para la investigación, sino porque su conservación puede significar la conservación de toda una comunidad biológica, que actualmente recibe poca atención en cuanto a su conservación y que se encuentra fuertemente amenazada por el impacto humano. Asimismo, el monitoreo de sus poblaciones puede servir como un fuerte indicador del estado de salud de la comunidad biológica que habita (Shokri et al., 2009). Además, como lo mencionan Froese y Pauly (2003), aunque pueden tener poca importancia comercial o como alimento directo, las pequeñas especies contribuyen a la biodiversidad marina, a la función del ecosistema y a la producción de alimento, con la última función siendo más importante en cuanto los peces se encuentran más abajo en la cadena trófica.

Actualmente las poblaciones naturales de *H. erectus* en México no han sido estudiadas y poco o nada se sabe del estado natural de éstas (antes del posible impacto) ni de su estado de conservación actual. Sin embargo, es importante hacer un estimado de las poblaciones en el pasado, con el fin de evitar que la distribución y abundancia actuales sean consideradas como el escenario normal (Pauly et al., 1998). Un entendimiento del cambio en las poblaciones de caballitos de mar en el pasado requiere de análisis genéticos y otro tipo de información técnica, conocimiento tradicional, documentos históricos y arqueología (Pitcher, 2001; Johannes, 2002; Roman y Palumbi, 2003).

Independientemente del estado de conservación en el que se encuentran en la actualidad, ya se han mencionado algunas de las amenazas a las que podrían estar sujetas estas poblaciones, y resulta imperante desarrollar un programa de evaluación de poblaciones naturales, con el fin de proponer medidas de conservación. Asimismo es importante hacer estimaciones del comercio de esta especie a nivel nacional, así como del número de caballitos que son capturados por la flota

pesquera camaronera del Golfo de México, principalmente, y por los pescadores locales de escama dentro de los sistemas costeros.

En primer lugar, es necesario identificar las poblaciones de *H. erectus* dentro del Golfo de México, lo cual podrá hacerse con mayor precisión cuanto más gente e instituciones se encuentren involucradas. Una vez identificando las poblaciones naturales de esta especie, el siguiente paso es conocer su estado actual, con el fin de sentar un precedente y tener un punto de comparación y de calibración de las medidas de conservación que se puedan tomar en el futuro. Se debe establecer un programa de muestreos mensuales durante uno o, preferentemente, dos años, y un posterior programa de monitoreo permanente. Si los recursos, tanto materiales como humanos, son limitados, es importante enfocarse en aquellas poblaciones que puedan estar sujetas a mayor impacto, tomando también como punto de comparación a poblaciones menos impactadas. Entre la información que se puede obtener de los muestreos mensuales y que puede servir para implementar estrategias de conservación se encuentran la distribución y densidad, la proporción de sexos, talla de primera madurez, temporada reproductiva, fecundidad, asociaciones de hábitat, observaciones conductuales (conducta sexual, rangos de hogar), composición de la dieta, genética de poblaciones, entre las más importantes.

Con esta información se puede establecer un estimado del estado de conservación de las poblaciones de *H. erectus* y se está en mejores condiciones de plantear medidas de tendientes a la preservación de estas. Una de las principales estrategias de conservación para estos organismos debe ser, sin duda, el establecimiento de áreas protegidas en donde su hábitat natural se encuentre bien representado en el presente y en el futuro (de manera sustentable). Para ello, se deben conocer correctamente las asociaciones del hábitat de la especie y su cambio ontogénico, con el

fin de establecer posibles zonas de crianza o de abundancia de reproductores, como lo mencionan Morgan y Vincent (2007) para la especie *H. comes* en Filipinas.

El establecimiento de áreas protegidas y otro tipo de prohibiciones a la pesca debe ser realizadas proporcionando a la población humana afectada alternativas de producción que les permitan, por un lado, mantener una economía estable y, por otro lado, coadyuvar con las medidas de conservación, en este caso, de caballito de mar. El involucramiento de la población local dentro de las medidas de conservación puede realizarse con actividades como el ecoturismo, la educación ambiental y la acuicultura de estos organismos.

La acuicultura del caballito de mar, llevada a cabo con las medidas y condiciones adecuadas puede ser una importante medida de conservación si se desarrolla con este fin, y actualmente existe suficiente información para desarrollar un programa exitoso de cultivo de estos peces (Koldewey y Martin-Smith, 2010). Esta actividad puede ser implementada para la repoblación en zonas donde se infiera que la densidad pudo haber disminuido, y también puede llevarse a cabo como actividad productiva dentro del comercio de especies ornamentales. El comercio de especies ornamentales puede ser cuestionado desde diversas perspectivas, pero llevado a cabo con las medidas precautorias necesarias, puede resultar en una actividad que, además de reeditar económicamente a los pobladores locales, puede tener una fuerte injerencia en la educación ambiental.

I.1.4. Acuicultura de caballitos de mar.

I.1.4.1 Condiciones fisicoquímicas del agua para caballitos de mar en cautiverio.

Existen variaciones en cuanto a los parámetros fisicoquímicos utilizados para el crecimiento, mantenimiento y reproducción de caballitos de mar en cautiverio. Estas diferencias están relacionadas con la zona de distribución de cada una de las especies y con los resultados experimentales que se han obtenido. Así, especies de climas templados como *H. abdominalis*, *H. hippocampus* y *H. guttulatus* se mantienen adecuadamente a temperaturas entre 13 y 20 °C (Woods, 2000, Wilson et al., 2006; Planas et al., 2008) mientras que caballitos con distribución preferentemente tropical, entre los que se puede mencionar a *H. erectus*, *H. reidi* e *H. kuda*, prefieren temperaturas por encima de los 25 °C (Lin et al., 2008b; Olivotto et al., 2008) (Tabla 1). Como podría esperarse, ahora se sabe que la temperatura es un parámetro principal que afecta de manera importante el crecimiento, la sobrevivencia y la reproducción de caballitos de mar (Wong y Benzie, 2003; Lin et al., 2006; Lin et al., 2008b). En cuanto a la salinidad y el pH, las variaciones se encuentran menos relacionadas con el origen de las especies, oscilando entre 30 y 37 ‰ para la primera y 7.6 y 8.3 para el segundo, en todas las investigaciones consultadas (Tabla 1). En relación con el fotoperiodo, se encuentran trabajos que utilizan desde luz continua (24:0 L:O) (Olivotto et al., 2008) hasta fotoperiodos de 8L:16O (Koldewey, 2005). En una comparación directa, Olivotto et al. (2008) encontraron un mayor crecimiento de juveniles de *H. reidi* utilizando luz continua que con un fotoperiodo de 14L:10O lo cual atribuyen al hecho de que, al ser depredadores visuales, la luz continua favorece la captura de presas durante las 24 horas del día. De 13 trabajos consultados, 11 utilizaron o recomiendan sistema de cerrado de recirculación de agua para el mantenimiento de los caballitos y únicamente dos sistema abierto (Tabla 1). Los tanques o reservorios que se utilizan para el cultivo de caballito de mar presentan

una amplia gama de tamaños, formas y materiales, de acuerdo con las necesidades de los caballitos y con el ingenio, disposición de recursos y necesidades experimentales o comerciales de los cultivadores. Al parecer la principal restricción consiste en proveer a los caballitos de columna de agua suficiente para realizar sus actividades, principalmente reproductivas, lo cual se consigue utilizando tanques con altura suficiente, de acuerdo con la talla máxima de las especies. Por ejemplo, para *H. erectus*, es recomendable utilizar tanques con al menos 70 cm de altura.

La densidad poblacional utilizada también ha resultado muy variable, en general los caballitos juveniles se pueden mantener adecuadamente a densidades de 1 a 2 caballitos/mL (Lin et al., 2006; Wilson et al., 2006), y aunque hay reportes de hasta 25 caballitos/mL (Sheng et al., 2006) únicamente se recomienda una densidad tan alta en las primeras etapas, ya que la competencia por alimento y espacio, así como algunos parámetros fisicoquímicos del agua, pueden verse comprometidos.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos utilizados para el cultivo de diferentes especies de caballito de mar.

Especie	T °C	S ‰	pH	O ₂	Luz	Sistema	Tanques	Densidad	Citas
<i>H. kuda</i>	23 ± 0.5	35 ‰	8.1-8.3	95-99 %	12L:12O	Recirculación 480 %/d	30 l (parejas) 15 l (juveniles)	2 juv/l	Lin et al, 2006
<i>H. kuda</i>	26	32			2500-3000 lux	Recirculación (sump de 22 ton)	5 x 6 x 1.8 m ³ (reproductores)	100 rep/tanque	Lin et al, 2007
<i>H. abdominalis</i>	13-19.5	33.8-35.1	7.8-8.19	7.1-8.1	14L:10O (2 TF 55 W)	Abierto 1 l/min	75 l exterior (Machos gestantes)	1 macho /75 l	Woods, 2000
<i>H. abdominalis</i>	13.6 – 19.5	33.4-34.7	7.8-8.14	7-8.4 mg/l	variable	Recirculación (30% recambio/d)	var	Var	Woods, 2000
<i>H. abdominalis</i>	15.9 ± 0.4	32.6 ± 1.4	8.1 ± 0.1	8 ± 0.7	12L:12O 6.8 µE s-1 m-2.	Recirculación 2.9 l/m (25 % rec. semanal)	8 x 25 l (sump 150 l)	1.8 juv/ l	Wilson et al, 2006
<i>H. abdominalis</i>	23 ± 0.5	35	8.1-8.3	95-99 %	12:12	Recirculación 480 % rec/d en c/tanque	8 x 30l 6 x 15 l	1 par/30 l 2 juv/l	Payne & Rippengale 2000
<i>H. trimaculatus</i>	26				14L:10° (700-1000lx)	Recirculación	1000 l (crianza juveniles)	25 juv/l	Sheng et al, 2006
<i>H. ingens</i>	15-25 23* (opt)	34*	8.25 (c/CaO H)		12:12 L:O	Recirculación 10 l/min (10 % rec/ d)	> 1m altura para adultos		Koldewey, 2005
<i>H. erectus</i>	13-28	25-35	7.6-8.3		De 8:16 a 14:10 L:O	Recirculación filtro húmedo-seco o grava	Mínimo de 45 a 53 cm altura		Koldewey, 2005
<i>H. erectus</i>	28 ± 0.5	35 ± 1.0	7.8 ± 0.3	6.5 ± 0.5 mg/l	16L:8O 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 lux	Recirculación	40 l (juveniles de 2 días)	0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 y 6 juv/l	Lin et al., 2010
<i>H. hippocampus</i>	17-19	35	7.9-8.3		14:10 verano; 10:14 invierno L:O	Recirculación Filtro grava y filtr. externa (20 % rec. semanal)	684 L mínimo 45 cm altura	2 pares por 684 L	Koldewey, 2005
<i>H. guttulatus</i>	15-17.5	37 ± 2	8 ± 0.2		16:9 verano; 10:14 invierno L:O	Recirculación	160 L 85 alto x 75 largo x 25 ancho	1 pareja/ 80 L	Planas et al, 2008
<i>H. guttulatus</i>	19.7 ± 0.1	37.6 ± 0.1			12L:12O	Abierto flujo constante 20 L/h	Tanques plásticos de 90 L	1 pareja silvestre/ 30 L	Palma et al, 2008
<i>H. reidi</i>	28 ± 0.5	30	8-8.2		14L:10 O 24L:0 O	Recirculación	200 L para reproductores		Olivotto et al, 2008

I.1.3.2. Efecto de la dieta sobre la sobrevivencia y crecimiento de juveniles de caballito de mar en cautiverio.

Entre los trabajos que evalúan el efecto de la dieta sobre la sobrevivencia y el crecimiento de juveniles recién nacidos, se encuentra el de Payne y Rippingale (2000), quienes encontraron una mayor sobrevivencia y tasa de crecimiento durante los primeros doce días de vida de *H. subelongatus* alimentados con copépodos en comparación con *Artemia* enriquecida. Asimismo, reportaron que la mayor parte de la mortalidad ocurre durante los primeros 5 días de vida (Tabla 2). En contraste, Otero-Ferrer et al. (2010) obtuvieron una alta sobrevivencia en larvas de *H. hippocampus* a las que se les proporcionó *Artemia* enriquecida como primer alimento, en comparación con los que se les proporcionó rotíferos (Tabla 2). Lin et al. (2008b) encontraron sobrevivencias de 27 a 87% y tasas de crecimiento de 0.69 a 1.7 mm/d en juveniles de *H. erectus* sometidos a distintas temperaturas y alimentados durante los primeros 14 días de vida con nauplios de *Artemia* recién eclosionados (Tabla 2).

En organismos de *H. guttulatus*, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento durante los primeros 5 días de nacidos utilizando como dietas rotíferos enriquecidos o rotíferos con nauplios de copépodos, sin embargo a partir del día 6 y hasta el día 21, al utilizar dietas con base únicamente de nauplios de *Artemia* el crecimiento fue significativamente menor que en los caballitos alimentados con nauplios de *Artemia* y copépodos (Olivotto et al., 2008).

Tabla 2. Resultados de sobrevivencia y crecimiento de juveniles de caballito de mar.

Especie	Alimentación	Tasa de Crecimiento	% Sobre vivencia	Talla inicial mm (edad)	Talla final mm	Tiempo Cultivo	Referencia
<i>H. kuda</i>	<i>Artemia</i> + Acetes	0.9 mm/d	73.3	72.1 (42 d)	120.7	56 d	Job et al, 2002
	<i>Artemia</i> + Pescado		40.0				
	<i>Artemia</i> + Mezcla		70.0				
<i>H. abdominalis</i>	<i>Artemia</i> + Super Selco	0.71 mm/d	96.7	33.7 (1 mes)	55.2	30 d	Woods, 2003
	<i>Artemia</i> + Super Selco	0.87 mm/d	100		60		
	GP1	0.51 mm/d	26.7		49		
	Cyclop-eeze	0.53 mm/d	90		49.8		
	<i>Artemia</i> + Super Selco	0.40 mm/d	93.3	55.6 (60 d)	67.8	30 d	Wilson et al, 2006
	GP2	0.19 mm/d	66.7		61.4		
	Cyclop-eeze	0.21 mm/d	60.0		61.8		
	<i>Artemia</i> + Super Selco	3.16 % /W/día	95.0	1.17 g		30 d	
	Misidáceos congelados	2.92 % /W/día	97.5				
	Pellets de Misidáceos	-0.11 % /W/día	96.25				
Alimento comercial	0.35 % /W/día	97.5					
<i>H. erectus</i>	<i>Artemia</i> + Super Selco	0.7 mm/d	100	35.0 (1 mes)	99.8	90 d	González et al, 2006
	<i>Artemia</i> + Spirulina	0.69 mm/d	100		98.9		
	<i>Artemia</i> + oil fish	0.67 mm/d	100		94.0		
	<i>Artemia</i>	0.53 mm/d	100		8.31		
	Nauplios de <i>Artemia</i> r.e.(4-6/ml 4 veces/d)	0.69-1.7 mm/d	26.7-86.7	11.9-12.4 (recién n.)	21.5-36.7	14 d	Lin et al, 2008
<i>H. subelongatus</i>	<i>Artemia</i> + Super Selco	0.31 mm/d	25	12.6 (recién n.)	16.3	12 d	Payne & Rippingale, 2000
	Copépodos	0.72 mm/d	65		21.3		

Espece	Alimentación	Tasa de Crecimiento	% Sobre vivencia	Talla inicial Mm	Talla final mm	Tiempo Cultivo	Referencia
<i>H. whitei</i>	<i>Artemia</i> + DC Selco	0.26 mm/d	100	36-40 (105 d)	67.2	107 d	Wong & Benzie, 2003
	<i>Artemia</i>	0.22 mm/d	100		63.3		
<i>H. hippocampus</i>	Rotíferos + <i>Artemia</i> + Selco	1.4 mm/d	25.9	5 (recién n.)	48.6	34 d	Otero-Ferrer et al., 2010
	<i>Artemia</i> + Selco	1.8 mm/d	60.0		62.6		“
<i>H. ingens</i>	Rotíferos + <i>Artemia</i>		21.5; 69.1; 59.0	5.0 (recién n.); 15.0 (12 d); 27.0 (20 d)	45; 54; 67	95 d	Ortega-Salas & Reyes-Bustamante, 2006
<i>H. spp</i>	<i>Artemia</i>		48.3		18.1	30 d	Chang y Southgate, 2001
	<i>Artemia</i> + DC Selco		66.7		18.6		
	<i>Artemia</i> + DC DHA Selco		71.7		20.2		
	<i>Artemia</i> + DC Super Selco		78.3		19.7		
<i>H. reidi</i>	<i>Artemia</i> + Copépodos		33.5		16.9	14 d	Willadino et al., 2012
	<i>Artemia</i>		6.0		17.3		

Se ha evaluado también el efecto de diferentes dietas sobre el crecimiento y la sobrevivencia de juveniles de caballito de mar con edades a partir de un mes, y en estos trabajos se ha probado el efecto del alimento vivo, enriquecido y sin enriquecer, alimento congelado y alimento artificial (*H. kuda*: Job et al., 2002; *H. abdominalis*: Woods, 2003; Wilson et al., 2006; *H. whitei*: Wong y Benzie, 2003; *H. erectus*: González et al., 2006). Se tiene un consenso general en cuanto a que el alimento vivo enriquecido mejora la sobrevivencia y favorece el crecimiento de los juveniles de caballito de mar. Aun así, trabajos como el de Wilson et al. (2006) y Woods (2003) demuestran que es posible “destetar” juveniles de caballitos de mar (*H. abdominalis* de 1g) con misidáceos congelados y otro tipo de alimentos inertes (Tabla 2).

En estudios a largo plazo sobre hipocampos juveniles y adultos, se ha concluido que el efecto fisiológico de la nutrición, puede afectar directamente el crecimiento, la sobrevivencia y la reproducción de estos peces (Chang y Southgate, 2001; Masonjones, 2001; Lin et al., 2007). Sin embargo, existen variaciones sobre la sobrevivencia y crecimiento en relación a la calidad nutricional, dado que la composición bioquímica de dietas y enriquecedores, incluso utilizando la misma especie como *Artemia*, varía de forma importante. Job et al. (2002) mencionan la importancia de adecuar la dieta a los diferentes estadios de desarrollo de *H. kuda*. En este contexto, se ha demostrado que la habilidad de los juveniles para digerir y asimilar sus alimentos está relacionada con el estadio de desarrollo en *H. trimaculatus* (Sheng et al., 2006). En otros peces marinos, se sabe que influye la calidad nutricional, las diferentes características organolépticas, características fisicoquímicas del alimento, ritmos diarios de alimentación, la tasa de ingestión, y la selectividad de los peces hacia el alimento (Boujard y Latherland, 1992; Hoang et al., 1998;

Sheng et al., 2006). Los ritmos endógenos generalmente se encuentran sincronizados con los ritmos circadianos, y es común encontrar desfases latitudinales y estacionales en relación con los ritmos de alimentación (Boujard y Leatherland, 1992; Spieler, 1992). De esta manera, las tasas de alimentación y la selectividad del alimento en los hipocampos se ven influenciadas por parámetros ambientales y varían entre los diferentes estadios de desarrollo. Por ejemplo, en *H. trimaculatus* la temperatura y la intensidad luminosa afectan de manera significativa la tasa de alimentación (Sheng et al., 2006).

I.1.4.3. Ácidos grasos en caballito de mar.

Dentro del estudio de la nutrición acuícola se conoce como ácidos grasos esenciales (EFA, por sus siglas en inglés) a aquellos que tienen una importancia fisiológica pero que los organismos no pueden sintetizar por medio de sus propios procesos metabólicos. Dentro de estos, se encuentran los ácidos grasos altamente insaturados (Highly Unsaturated Fatty Acids-HUFA) en caso de los peces marinos (Sargent et al., 2002). Los HUFA con mayores funciones fisiológicas descritas en los peces marinos son el ácido docosahexaenóico (22:6n-3 o DHA), el ácido eicosapentaenóico (20:5n-3 o EPA), y el ácido araquidónico (20:4n-6 o ARA) (Watanabe, 1993; Rainuzzo et al., 1997; Tocher et al., 2003; Sargent et al., 1997, 1999, 2002). El DHA es esencial en la formación del tejido neuronal y visual durante las primeras etapas de vida de los peces marinos. Dietas con insuficiente contenido de DHA producirán juveniles con problemas para distinguir y capturar a sus presas, por lo cual se verá afectada su sobrevivencia. Sin embargo, un exceso de DHA puede disminuir el crecimiento dado que éste ácido graso produce menor energía que un ácido graso de la misma longitud pero saturado (Sargent et al., 2002). Además, el DHA aumenta el gradiente de Na⁺ a través de la membrana celular, por lo que se requiere mayor trabajo de la

Na⁺/K⁺-ATPasa para que la célula mantenga su homeostasis en presencia de este ácido graso (Palacios et al., 2004). Se ha sugerido que las necesidades de HUFA para los caballitos de mar, pueden ser similares a las de otros peces marinos (Payne et al., 1998; Payne y Rippingale, 2000), pero se ha hecho poco para respaldar esta afirmación.

Al respecto, se han realizado algunos estudios tendientes a determinar los perfiles de ácidos grasos en adultos silvestres de caballito de mar (Lin et al., 2008), huevos (Sandoval-Muy, 2006; Faleiro y Narciso, 2010; Planas et al., 2010), juveniles recién nacidos (Sandoval-Muy, 2006; Faleiro y Narciso, 2010) y en juveniles con un mes de vida alimentados con diferentes dietas (Chang y Southgate, 2001). Los resultados obtenidos de estas investigaciones, presentan diferencias entre las especies y zonas geográficas que abren la puerta a nuevas interrogantes relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos durante las diferentes etapas del ciclo de vida de estos organismos. Por ejemplo, mientras que en huevos provenientes de padres silvestres de la especie *H. guttulatus* los principales ácidos grasos son: 16:0 (20%), 22:6n-3 (17%), 20:5n-3 (13%) y 18:1n-9 (10%) (Faleiro y Narciso, 2010), en huevos provenientes de padres en cautiverio los principales ácidos grasos son: 18:1n-9 (18%), 16:0 (16%), 18:2n-6 (12%), 20:5n-3 (9%), 18:0 (7%) y 22:6n-3 (7%) (Planas et al., 2010). Estas diferencias probablemente reflejan la alimentación de los reproductores, ya que el perfil de ácidos grasos reportado en huevos de la especie mencionada es muy similar al de la *Artemia* adulta utilizada para alimentar a los reproductores en cautiverio (Planas et al., 2010). Sandoval-Muy (2006), también encuentra una relación entre el perfil de ácidos grasos de la dieta (*Artemia* adulta congelada) proporcionada a los reproductores de la especie *H. ingens* con respecto al perfil de ácidos grasos en huevos y juveniles, en particular con relación a un bajo contenido de 20:5n-3 y

22:6n-3. Sin embargo, existe la posibilidad de que la acumulación de ácidos grasos sea distinta en organismos en cautiverio en comparación con los silvestres, dados los cambios del sistema (temperatura, luz, oxígeno, etc.), además del factor de estrés. Por ejemplo, en un estudio realizado en adultos de las especies *H. kuda* e *H. trimaculatus* se encontraron importantes diferencias entre las concentraciones relativas de ácidos grasos en organismos cultivados y silvestres, sobre todo en lo que respecta al DHA, teniendo los organismos cultivados concentraciones significativamente mayores (27.2 y 22.4%) de este ácido graso que los organismos silvestres (12.0 y 13.0% para *H. kuda* e *H. trimaculatus*, respectivamente) (Lin et al., 2009).

I.1.4.4. Ácidos grasos en la dieta durante el cultivo del caballito de mar.

Según Faleiro y Narciso (2010), la optimización de la nutrición de la progenie es vital para alcanzar protocolos de crianza exitosos para caballitos de mar, ya que las dietas deben satisfacer los requerimientos nutricionales de los juveniles desde el comienzo de su alimentación exógena. No obstante, a la fecha se desconoce si los HUFA son esenciales para los caballitos o si los requerimientos de ácidos grasos pueden ser cubiertos con ácidos grasos polinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés). Los PUFA que cumplen la función de precursores metabólicos de los HUFA son, en el caso de peces marinos, el 18:2n-6 (ácido linoléico), que es precursor de ARA (familia n-6), y el 18:3n-3 (ácido linolénico), que es precursor de EPA y DHA (familia n-3) (Fig. 5). Los peces marinos carnívoros por lo general no pueden sintetizar HUFA a partir de PUFA en la dieta (Sargent et al., 2002; Tocher et al., 2003) (Fig. 5). En caso de que el caballito de mar pudiera sintetizar HUFA, o que sus requerimientos en la dieta fueran menores que los de otros peces marinos, los costos de alimentación podrían ser reducidos considerablemente, dado que el alimento

representa aproximadamente la mitad del costo de cultivo y los aceites de origen marino, con alto contenido de HUFA, han incrementado en precio considerablemente en los últimos años (Naylor et al., 2009).

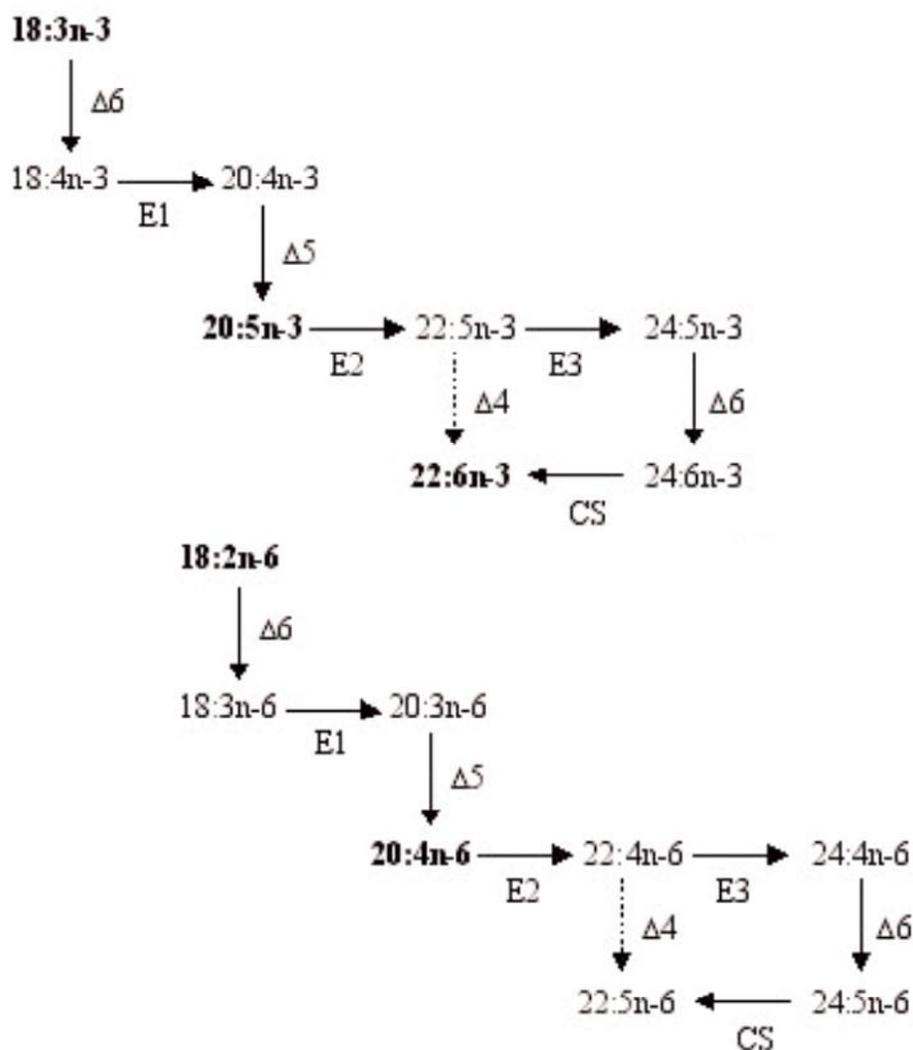


Figura 5. Rutas metabólicas para la biosíntesis de HUFA a partir de $18:3n-3$ y $18:2n-6$, mostrando las dos posibles rutas para la producción de $22:6n-3$ desde $20:5n-3$ (y $22:5n-6$ desde $20:4n-6$). $\Delta 6$, $\Delta 5$ y $\Delta 4$ representan las actividades microsomales desaturadas, E1, E2 y E3 denotan las actividades microsomales elongadas, y CS denota acorte de cadena peroxisomal. Las flechas punteadas indican rutas para las cuales no hay evidencia en peces (Tomado de Tocher et al., 2003).

A la fecha, existen pocos trabajos donde se estudia la importancia de los HUFA en los caballitos de mar durante el comienzo de su vida. En algunos de ellos se toma en cuenta el perfil de ácidos grasos en huevos (Sandoval-Muy, 2006; Planas et al., 2010; Faleiro y Narciso, 2010; 2011), y recién nacidos (Sandoval-Muy, 2006; Faleiro y Narciso, 2010; 2011). Sin embargo, únicamente el trabajo de Chang y Southgate (2001) hace un intento por establecer los requerimientos de HUFA para juveniles de caballito de mar durante su primera etapa de vida libre, fuera del marsupio. Estos autores estudiaron el efecto de la composición de ácidos grasos en la dieta sobre el crecimiento y la sobrevivencia en caballitos de mar (probablemente de la especie *H. kuda* de acuerdo con los autores) y encontraron que crías de 3 a 33 días de vida requieren niveles relativamente elevados de DHA en la dieta (>9.3 mg DHA/g peso seco) para obtener resultados óptimos en cuanto a crecimiento y sobrevivencia. En otro estudio realizado en juveniles y adultos de las especies *H. kuda* e *H. trimaculatus* se encontraron niveles de DHA+EPA de alrededor de 25% en juveniles silvestres y de alrededor de 22% en juveniles cultivados (35 días de vida), mientras que en adultos al suma de DHA+EPA resultó de 23% en organismos silvestres y de 27% en organismos cultivados, lo cual podría indicar diferencias de requerimientos de HUFA entre adultos y juveniles (Lin et al., 2009).

En reproductores, los niveles de DHA como enriquecimiento de *Artemia* se ven reflejados en los niveles de este ácido graso en huevos y juveniles de recién nacidos (Sandoval-Muy, 2006; Planas et al., 2010). Durante el desarrollo embrionario de *H. guttulatus* se ha reportado una fuerte utilización de HUFA, habiendo una disminución de 87% de EPA, seguramente utilizado con fines energéticos para el crecimiento y la embriogénesis, ya que este ácido graso es fácilmente metabolizado por la beta oxidación en la mitocondria

(Sargent et al., 2002). También se da una disminución de 67% de DHA, sin embargo la ruta de oxidación del DHA ha sido poco estudiada en peces y aparentemente ocurre en los peroxisomas de la célula (e involucra un gasto de energía) (Sargent et al., 2002; Tocher et al., 2003), por lo que su utilización durante la embriogénesis es incierta. En otros peces se da una retención selectiva de este ácido graso en relación a los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, que son sustratos más fácilmente metabolizables y con mayor rendimiento energético (Sargent et al., 2002; Faleiro y Narciso, 2010).

El hecho de que los HUFA se utilicen durante el desarrollo embrionario, podría indicar que éstos son utilizados como sustrato energético sólo cuando se encuentran en exceso, o bien podría reflejar una menor importancia de éstos durante los primeros días de vida exógena. Una tercera posibilidad es que los HUFA se encuentren en la dieta natural del caballito desde sus primeros días de vida, por lo que no dependen tanto de su retención selectiva durante el desarrollo embrionario.

Por lo anterior es necesario analizar, en primer lugar, los perfiles de ácidos grasos y en especial de HUFA en caballitos recién nacidos, y a partir de ahí determinar los niveles óptimos de DHA y otros HUFA en el desarrollo temprano exógeno, para poder establecer un protocolo de alimentación y nutrición de juveniles adecuado para la especie de *H. erectus*.

I.3 Hipótesis.

De acuerdo con los antecedentes, el principal factor que influye en la elección entre dos presas por parte de los caballitos de mar es el tamaño de éstas. Por lo tanto, se esperaría que *H. erectus* no presentara preferencia por *Artemia* o *Hyaella azteca* (anfípodo), ya que ambas presas son de tamaño similar. Esto se probará usando dos grupos de caballitos, uno aclimatado a comer *Artemia* y el otro en condiciones naturales, es decir, jamás expuesto a *Artemia*, esperando que los caballitos aclimatados a comer *Artemia* tendrán mayor preferencia por esta presa cuando sea presentada junto con anfípodos, en relación con caballitos de mar recién capturados.

En una segunda etapa, se espera que los organismos recién nacidos de la especie *H. erectus* presenten una composición de ácidos grasos esenciales (EPA y DHA) similar entre las diferentes camadas, dada su importancia fisiológica, pero con variaciones en otros ácidos grasos en relación al tipo de alimentación, la condición biológica y el año en el que fueron colectados. Se ha demostrado que el DHA juega un papel muy importante en el desarrollo del tejido nervioso y visual de los peces en sus primeras etapas, y puesto que los caballitos de mar son depredadores que desde su nacimiento dependen en gran medida de la visión, la expectativa es que la proporción de este ácido graso sea elevada en juveniles recién nacidos de *H. erectus*. Sin embargo, se esperan niveles menores de este ácido graso en comparación con especies de climas templados, dado que el DHA también afecta la fluidez de la membrana y por ende, se concentra menos en organismos de climas tropicales y subtropicales.

Se espera que exista una mayor sobrevivencia de juveniles de caballito de mar alimentados con dietas ricas en HUFA (DHA y EPA), con respecto a las dietas con bajas o nulas concentraciones de estos ácidos grasos. Sin embargo, un exceso de HUFA en la dieta puede ser perjudicial para el crecimiento dado que los HUFA están más oxidados que otros ácidos grasos y por ende, proveen de menos energía al organismo.

I.4 Objetivo General

Establecer las condiciones adecuadas de zootecnia (reproducción y crecimiento de juveniles) y alimentación de juveniles de *H. erectus* en relación a los ácidos grasos, para lograr su cultivo en cautiverio.

1.4.1 Objetivos particulares.

- Determinar la preferencia de *H. erectus* entre una presa similar a la que encuentra en condiciones naturales (anfípodo) y una presa típicamente usada en la acuicultura pero que no se encuentra en condiciones naturales (*Artemia*), con el propósito de establecer la pertinencia del uso de la *Artemia* durante su cultivo.
- Determinar el perfil de ácidos grasos en diferentes camadas de juveniles de *H. erectus* al momento de nacer, con el fin de tener una primera aproximación de los niveles requeridos en el alimento (*Artemia*) durante el cultivo.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en *Artemia*, utilizada como presa viva, sobre la sobrevivencia, el crecimiento y el perfil de ácidos grasos en juveniles de *H. erectus*.

II. SELECCIÓN DE PRESA EN *Hippocampus erectus* BAJO CONDICIONES DE CAUTIVERIO.

II.1 Introducción.

Los hipocampos son depredadores visuales y en el medio natural ingieren principalmente presas vivas y móviles (Bergert y Wainwright, 1997). Su dieta está dominada por crustáceos copéodos, anfípodos, decápodos y mysidos (Teixeira y Musick, 2001; Woods, 2002; Kendrick y Hyndes, 2005; Castro et al., 2008; Kitsos et al., 2008; Storero y González, 2008).

Se ha demostrado que los syngnathidos cambian su dieta ontogénicamente lo cual puede ser un reflejo de cambios en su capacidad alimenticia, o bien de transiciones o cambios de hábitat (Franzoi et al., 1993; Teixeira y Musick, 1995; 2001; Kanou y Kohono, 2001; Woods, 2002). En particular en caballitos de mar, análisis del tracto digestivo de especímenes de *H. abdominalis* indican que pequeños individuos (9.52-13-75 cm de altura) consumen una gran cantidad de anfípodos, mientras que caballitos más grandes (> 13.84 cm) consumen camarones carídeos más frecuentemente (Woods, 2002). En el mismo sentido, especímenes de *H. erectus* menores a 6 cm de altura se alimentan tanto de copéodos como de anfípodos, mientras que aquellos mayores a 6 cm se alimentan únicamente de anfípodos (Teixeira y Musick, 2001). Individuos silvestres de *H. mohnikei* también muestran una selección de presas entre las clases de talla con pequeños individuos seleccionando presas de menor tamaño (Kanou y Kohno, 2001).



Figura 6. Ejemplo de un anfípodo y un copépedo, presas comunes de caballitos de mar en su medio natural.

En cautiverio, la principal dieta viva utilizada para alimentar caballitos de mar ha sido *Artemia*, dado su fácil cultivo y que puede enriquecerse, lo cual la convierte en una presa que potencialmente puede cubrir los requerimientos nutricionales de caballitos de mar en cautiverio.

Al no ser *Artemia* una presa natural de *H. erectus* es importante determinar si existe algún comportamiento de selección de presa en esta especie, y de ser así, la capacidad que ésta podría mostrar de adaptarse a una nueva presa como podría ser *Artemia*. Los anfípodos de agua dulce utilizados en este experimento, tampoco son una presa natural de *H. erectus* pero comparten con los anfípodos marinos su apariencia y el tipo de movimiento y desplazamiento, el cual difiere sustancialmente del de *Artemia*, ya que esta última nada en forma circular dentro de la columna de agua, mientras que los anfípodos principalmente se desplazan con movimientos rápidos de una superficie sólida a otra.

II.2 Materiales y métodos.

Presas

El modelo de presa utilizado en este estudio consiste en un anfípodo de agua dulce del género *Hyallella*, *H. azteca*, el cual se considera que es un organismo común de agua dulce (Fig. 7). Originalmente se creía que *H. azteca* (Sassure, 1858) era una especie con una amplia distribución a lo largo de casi todo el continente americano, pero ahora se sabe que la especie abarca un complejo de especies que no han sido descritas (González y Watling, 2002; Wellborn y Cothran, 2004; Wellborn et al., 2005; EPA, 2008).

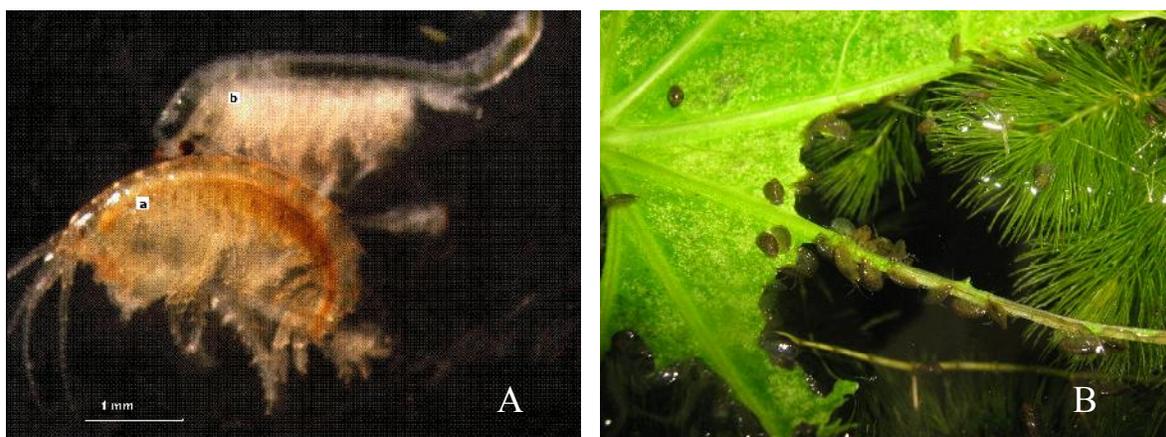


Figura 7. A. Anfípodo de agua dulce, *Hyallella azteca* al frente (a) y *Artemia sp.* al fondo (b); B. *Hyallella azteca* alimentándose de la planta regional Chaya *Cnidoscolus chayamansa*.

Individuos de *H. azteca* fueron colectados en una granja de peces ornamentales en la localidad de Hunucmá, Yucatán, México (21°01'24" N y 89°52'02" W) y fueron mantenidos en tanques de 200 L con agua dulce y aireación constante hasta su utilización en el experimento. Los especímenes de *H. azteca* fueron alimentados con una planta regional llamada Chaya *Cnidoscolus chayamansa* (Fig. 7B). Para propósitos del experimento, observaciones previas demostraron que especímenes de *Hyallella* pueden

sobrevivir, y moverse activamente, de 30 a 40 minutos después de su introducción en agua dulce.

El segundo modelo de presa utilizado fue *Artemia* en su etapa adulta (Fig. 8), y fue adquirida con productores en la comunidad de Celestún, Yucatán (20°51'N y 90°23'W), donde producen *Artemia* en estanques seminaturales a cielo abierto. Al momento del experimento, las presas presentaban una talla similar entre sí: *Hyaella* 4.9 ± 0.8 mm, n =10; *Artemia* 5.2 ± 0.6 mm, n = 10.



Figura 8. *Artemia* sp. en etapa adulta (tomado de www.naturfoto.cz).

Experimento de selección de presa

Los organismos utilizados de la especie *Hippocampus erectus* fueron colectados en la Laguna de Chelem, Yucatán, ubicada en los 21°15' N y 89°44' W. Se utilizaron un total de 36 adultos de la mencionada especie divididos en dos grupos o lotes:

Lote 1 (L1): 15 caballitos (9 machos y 6 hembras; 14.4 ± 1.5 cm de altura) mantenidos durante 3-4 meses en cautiverio alimentados con *Artemia* adulta, y sometidos a inanición 24 horas antes del experimento.

Lote 2 (L2): 21 caballitos (9 machos y 12 hembras; 15.0 ± 1.3 cm de altura) recién capturados y mantenidos 24 horas en inanición antes del experimento.

Durante el experimento se colocó un caballito (réplica) en cada uno de tres acuarios de 8.2 L de capacidad con agua de mar filtrada, conectados a un sistema de recirculación y se dejó pasar un tiempo de 20 min para su aclimatación (Fig. 9). Al cabo de este tiempo a cada acuario se le agregó un total de 20 presas vivas de la siguiente manera:

Tratamiento 1: 100% de *Hyaella* (20 anfípodos).

Tratamiento 2: 100% de *Artemia* (20 artemias).

Tratamiento 3: 50% *Hyaella*, 50% *Artemia* (10 anfípodos y 10 artemias).

Una vez agregadas las presas se contó un tiempo de 15 min al cabo del cual se procedió a retirar a los caballitos de mar del acuario y a contar el número de presas restantes.



Figura 9. Especímenes de *H. erectus* en cada uno de tres tratamientos con presas vivas: T1: 100% *Artemia*; T2: 100% *Hyallela*; T3; 50% *Artemia* + 50% *Hyallela*.

De esta manera se realizaron 5 réplicas por tratamiento para los especímenes del L1 (15 caballitos entre tres tratamientos), y 7 réplicas para los especímenes del L2 (21 caballitos entre tres tratamientos).

Análisis estadístico.

Para determinar la preferencia de *H. erectus* por alguna de las dos presas vivas, fue necesario probar la existencia de diferencias significativas entre las frecuencias de ingestión de *Hyallela* y *Artemia*.

$$H_0 = q_1/p_1 = q_2/p_2$$

Dónde:

q1: proporción de *Hyallolela* ingeridos sin alternativa

q2: proporción de *Artemia* ingeridas sin alternativa

p1: proporción de *Hyallolela* ingeridos con alternativa

p2: proporción de *Artemia* ingeridas con alternativa

II.3 Resultados.

En el caso de los especímenes de *H. erectus* mantenidos durante 3.4 meses en cautiverio se puede observar que ingieren cantidades similares de presas cuando no tienen opción (95 ± 5 % de *Artemia* y 81 ± 13 % de anfípodos), sin embargo cuando tienen elección ingieren una mayor proporción de anfípodos que de *Artemia* (47 ± 10 % y 22 ± 8 %, respectivamente), lo cual corresponde al 94 y 44 % del total de cada una de las presas en el tratamiento con opción (Fig. 10).

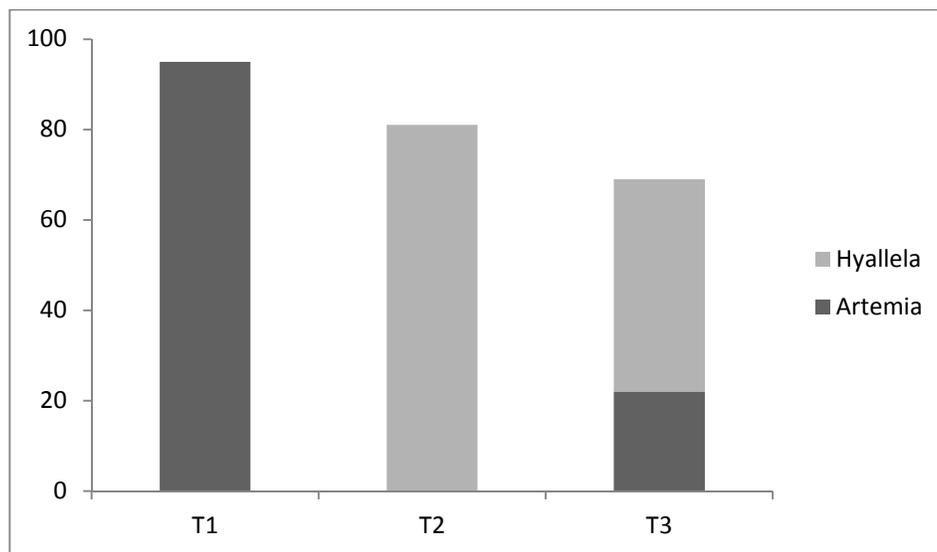


Figura 10. Promedio del porcentaje de presas ingeridas por parte de especímenes de *H. erectus* mantenidos en cautiverio durante 3-4 meses en los tres tratamientos del experimento: T1: 100% *Artemia*; T2: 100% *Hyallolela*; T3; 50% *Artemia* + 50% *Hyallolela*.

Esto quiere decir que existe una preferencia por anfípodos en relación con *Artemia* en caballitos que han sido aclimatados a comer *Artemia*, contrariamente de lo que podría esperarse.

En el caso de los caballitos con 24 horas de ser capturados antes del experimento, se observa que mantienen la proporción de consumo entre las presas, tanto cuando éstas son presentadas solas ($75 \pm 10\%$ de anfípodos y $46 \pm 6\%$ de *Artemia*), como cuando son presentadas en conjunto ($43 \pm 11\%$ de anfípodos y $26 \pm 8\%$ de *Artemia*, lo que equivale al 86 y 53% del total de anfípodos y *Artemia*, respectivamente, en el tratamiento con opción) (Fig. 11). Esto quiere decir que con opción y sin opción, estos caballitos capturan más anfípodos, lo cual no quiere decir que los prefieran como un resultado de una decisión activa, sino más bien los capturan más como resultado de las características físicas del sistema.

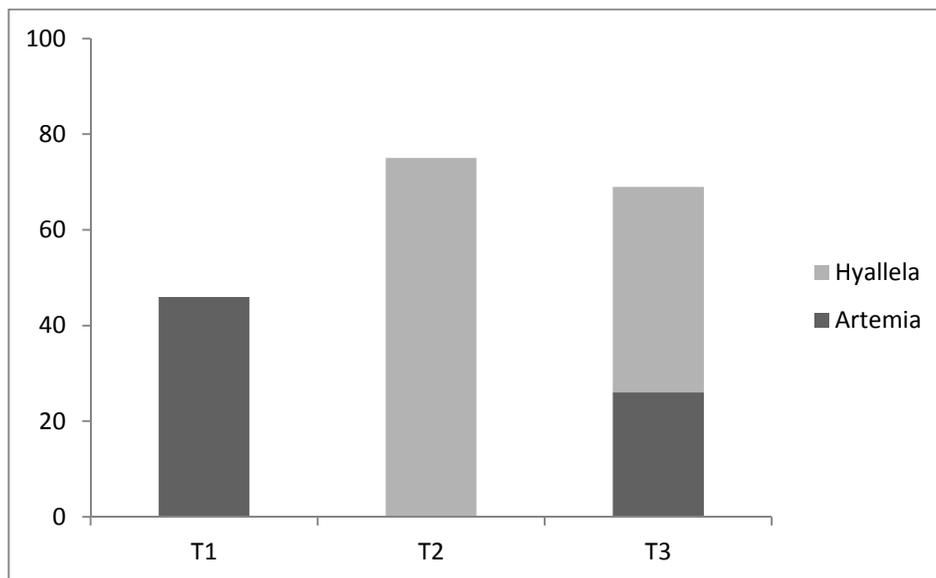


Figura 11. Promedio del porcentaje de presas ingeridas por parte de especímenes de *H. erectus* mantenidos en cautiverio durante 24 horas, en los tres tratamientos del experimento: T1: 100% *Artemia*; T2: 100% *Hyallela*; T3; 50% *Artemia* + 50% *Hyallela*.

II.4 Discusión y conclusiones.

Contrariamente a lo que se había esperado, los caballitos mantenidos en cautiverio por algunos meses y alimentados únicamente con *Artemia*, presentaron una preferencia por anfípodos cuando ambas presas fueron presentadas; sin embargo, consumieron casi la totalidad de las presas de *Artemia* cuando fueron presentadas solas. Por otro lado, los caballitos con sólo 24 hrs de cautiverio, consumieron únicamente 46% de las presas de *Artemia* cuando fueron presentadas solas, contra 75% de anfípodos consumidos sin otra opción. Esta proporción se mantuvo cuando tuvieron opción, lo cual quiere decir que el hecho de que consuman más anfípodos que *Artemia* se debe a propiedades físicas del movimiento de las presas y la capacidad visual de los depredadores, lo cual se podría resumir en una mayor adaptación para el consumo de anfípodos que de *Artemia*. Una menor ingestión por parte de organismos recién capturados también podría deberse a que se encuentran menos aclimatados al cautiverio, lo cual fácilmente puede afectar su tasa de ingestión de presas.

De acuerdo con la teoría del forrajeo óptimo (Bres, 1986), los peces tienen preferencia por las presas que le proporcionen un mayor beneficio energético, es decir una relación inversa entre el tamaño de la presa y el costo invertido en su captura. En este sentido, tomando en cuenta que las presas utilizadas en este trabajo presentaron una talla sin diferencias significativas, es factible pensar que el caballito de mar preferirá la presa que le involucre un menor costo energético, en este caso anfípodos, al no tener que nadar por ellos. Sin embargo, el hecho de que los caballitos con algunos meses en cautiverio consuman casi la totalidad de las presas de *Artemia* cuando éstas son presentadas sin opción, indica que los organismos de esta especie pueden adaptarse adecuadamente al consumo de *Artemia* y

aceptarla como presa potencial. Storero y González (2009), demuestran que *Artemia* es una presa preferida por *Hippocampus patagonicus* en cautiverio, sin diferencias significativas en relación con anfípodos que conforman su dieta en ambiente natural, sin embargo, lo experimentos realizados por los citados autores fueron realizados utilizando 10 presas pero dejando un tiempo demasiado largo (3 h) para su consumo, con lo cual se podrían diluir las posibles diferencias en la preferencia de presas. En este trabajo el tiempo utilizado para que los caballitos consumieran sus presas fue de 15 minutos, lo que permite saber con mayor precisión si existe una preferencia o selectividad entre las presas.

Generalmente se ha considerado que los caballitos tiene una estrategia de alimentación pasiva y oportunista, basados en una estrategia de “sit and wait” (sentarse y esperar) para capturar a sus presas (Woods, 2002; Foster y Vincent, 2004). No obstante, se ha observado que en cautiverio, en ausencia de fuertes corrientes y otras condiciones físicas adversas, así como de depredadores, los caballitos de mar adoptan una conducta activa en la captura de sus presas, persiguiéndolas y capturándolas a través del nado, sin estar sujetos por la cola a ninguna estructura (James y Heck, 1994; Storero y González, 2009). En este trabajo, se observó que *H. erectus* utiliza la estrategia pasiva de alimentación (“sit and wait”) cuando ingiere anfípodos, manteniéndose sujeto por la cola a la estructura proporcionada para ello, pero adopta una actitud activa al momento de ingerir *Artemia*. Esto se debe a que las diferencias en el desplazamiento entre las dos presas: los anfípodos realizan movimientos rápidos de una superficie sólida a otra, principalmente en el fondo del acuario; *Artemia* se desplaza con movimientos circulares en toda la columna de agua. Esto se puede observar en la Fig. 9, en la que en el T1 (sólo anfípodos) y T3 (*Artemia* + anfípodos) los caballitos se

observan capturando anfípodos en el fondo, sujetos con su cola, mientras que en el T2 el caballito se encuentra nadando capturando *Artemia* como presa única.

En cualquier caso, los caballitos de esta especie presentan adaptación al cambio de presa y tras un periodo de cautiverio, son capaces de consumir *Artemia* sin dificultad. Esto nos permite considerar el uso de esta especie de fácil cultivo y enriquecimiento para los experimentos de nutrición.

III. CLASES DE LÍPIDOS, PIGMENTOS Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN JUVENILES DE *Hippocampus erectus* RECIÉN NACIDOS.

III.1. Introducción.

Un primer paso necesario para lograr el cultivo de caballitos de mar, es conocer sus necesidades bioquímicas, y en este caso, de ácidos grasos. Los caballitos de latitudes templadas han sido mucho más estudiados, y se ha demostrado que tienen una gran necesidad nutricional de ácidos grasos altamente insaturados (Chang y Southgate, 2001). *H. erectus* es un pez teleósteo localizado en aguas costeras desde Nueva Escocia hasta Uruguay, abarcando todo el Golfo de México, dónde generalmente vive asociada con *Thalassia* sp. (Linton y Soloff, 1964; Teixeira y Musick, 2001). Diferencias en la composición de ácidos grasos han sido encontradas en huevos y juveniles de caballitos de mar de diferentes especies, muestreadas en diferentes localidades geográficas (Sandoval-Muy, 2006; Lin et al., 2008; Faleiro y Narciso, 2010). Por ser un pez carnívoro marino, se espera que tenga necesidad de DHA y EPA, dado que estos ácidos grasos no se pueden sintetizar a partir de PUFA (Sargent et al., 2002; Tocher et al., 2003).

Un procedimiento común cuando se establecen las necesidades de ácidos grasos en reproductores y larvas en nuevas especies de peces, es analizar la composición de ácidos grasos en gónada o en huevos. Sin embargo, los caballitos de mar tienen un ciclo de vida particular, en el cual los huevos son transferidos de la hembra al marsupio del macho, dónde ocurre la gestación y el desarrollo larval, después de lo cual los juveniles nacen con características morfológicas muy similares a los padres (Foster y Vincent, 2004). Por lo tanto, la composición de la gónada o los huevos puede no ser un indicativo de la composición de los ácidos grasos de los organismos antes de empezar a alimentarse exógenamente. En este estudio, se analizó la composición de ácidos grasos de caballitos de

mar recién nacidos provenientes de machos silvestres capturados preñados, para determinar la variación para esta especie en el mismo sitio en dos años distintos. Con estos resultados se establece la base para un adecuado suministro de ácidos grasos en la dieta de juveniles de *H. erectus*, bajo condiciones de cautiverio.

III.2. Materiales y métodos.

Muestreo

Caballitos de mar silvestres (*Hippocampus erectus*) fueron capturados bajo permiso oficial (“Oficio SGPA/DGVS/03153/10”, de Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT) en la Laguna de Chelem, Yucatán, México, entre los 21° 15’ a 21° 17’ N y 89° 39’ a 89° 48’, de enero a marzo, durante 2009 y 2010. Esta laguna costera tiene una forma alargada y se localiza paralela a la línea de costa, teniendo conexión permanente con el mar a través de un canal artificial de 1.2 x 0.1 km en su parte central (Fig. 12). Limita en su parte norte con Yucalpetén, un desarrollo urbano e industrial pesquero. El borde sur está dominado por un área de manglar afectada por cambios hidrológicos producidos por el canal artificial del puerto de Yucalpetén (Tapia et al., 2008). Durante los dos años de muestreo de este trabajo la temperatura del agua presentó un mínimo de 19°C en febrero de 2009 y un máximo de 31°C en julio y agosto de 2009 y 2010. La salinidad presenta un patrón marino, con un intervalo de 34-38 ‰. La vegetación sumergida está dominada por las especies *Thalassia testudinum*, *Laurencia microcladia*, *Ruppia marítima* y *Halodule wrightii*, las cuales componen el complejo hábitat del caballito de mar.

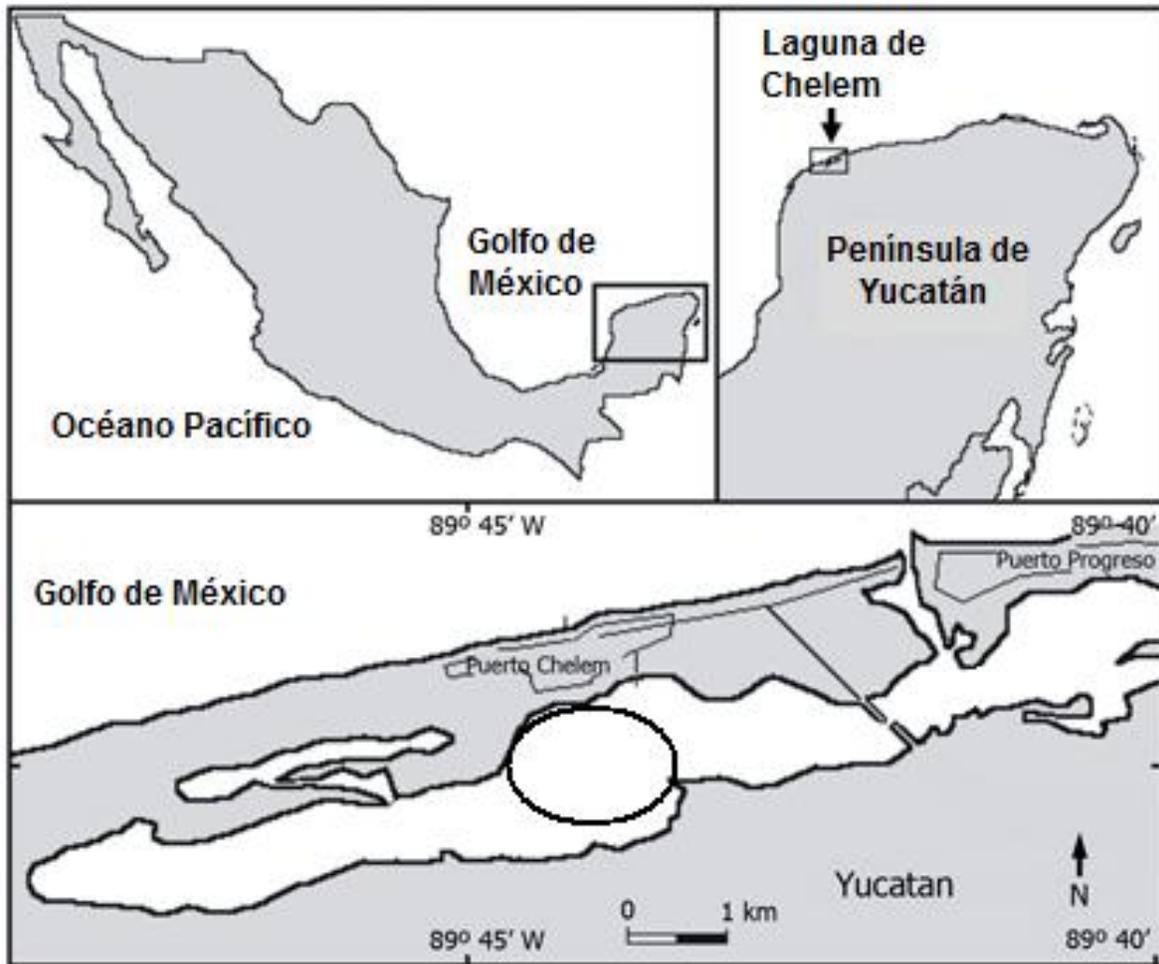


Figura 12. Ubicación geográfica de la Laguna de Chelem, Yucatán. En el ovalo se puede observar la zona de muestreo (Modificado de Tapia et al., 2008).

La Laguna de Chelem es somera (1 m de profundidad promedio), lo cual permite la localización de los caballitos de mar desde una embarcación con motor fuera de borda. Una vez localizado el caballito de mar, una red de mano fue utilizada para capturar cada organismo y examinarlo; los machos preñados fueron puestos en bolsas de plástico individuales con agua de mar y aireación y transportada (en no más de dos horas) a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, UNAM, Sisal, Yucatán. En dicho lugar los caballitos fueron mantenidos en acuarios de vidrio de 100L (70 x 50 x 30 cm) conectados a un sistema de recirculación. La temperatura fue regulada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, la

salinidad a 33-36‰, pH a 8.1-8.3, $\text{NO}_2^- < 0.3 \text{ mg/L}$, $\text{NO}_3^- < 5 \text{ mg/L}$, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+ < 0.1 \text{ mg/L}$, y fotoperiodo de 12L:12O. Los acuarios fueron limpiados diariamente mediante sifón. Dentro de los tanques se colocaron estructuras de cabo de polipropileno para el anclaje de los caballitos. Los adultos fueron alimentados *ad libitum* dos veces al día con *Artemia* adulta, la cual fue adquirida con productores de *Artemia* en condiciones semi-naturales en Celestún, Yucatán. La composición de ácidos grasos de *Artemia* utilizada fue típica con un elevado nivel de 20:5n-3 (18.4%), 18:1n-7 (15.7%), 16:1n-7 (13.4), 18:0 (11.0%), 16:0 (10.7%), 18:2n-6 (5.4%), 18:3n-3 (3.4%), y 20:4n-6 (2.5%), careciendo de 22:6n-3. El tiempo de cautiverio de machos preñados resultó de entre 1 y 10 días. Todos los juveniles de cada camada fueron contados y se tomaron muestras inmediatamente después del parto y antes de su primera alimentación. Aproximadamente 15 caballitos por camada fueron medidos con ayuda de un microscopio estereoscópico (Fig. 13).



Figura 13. Especímenes de *H. erectus* recién nacidos dispuestos sobre papel milimétrico, observados al microscopio estereoscópico.

Los machos reproductores también fueron medidos, utilizando un vernier (0.5 mm), después de la expulsión de los caballitos. Tanto en caballitos juveniles como en adultos, la altura fue determinada como la distancia vertical desde la punta de la corona, hasta la punta de la cola estirada, con la cabeza mantenida en ángulo recto con respecto al cuerpo (Lourie et al., 2003; Foster y Vincent, 2004) (Fig. 14).

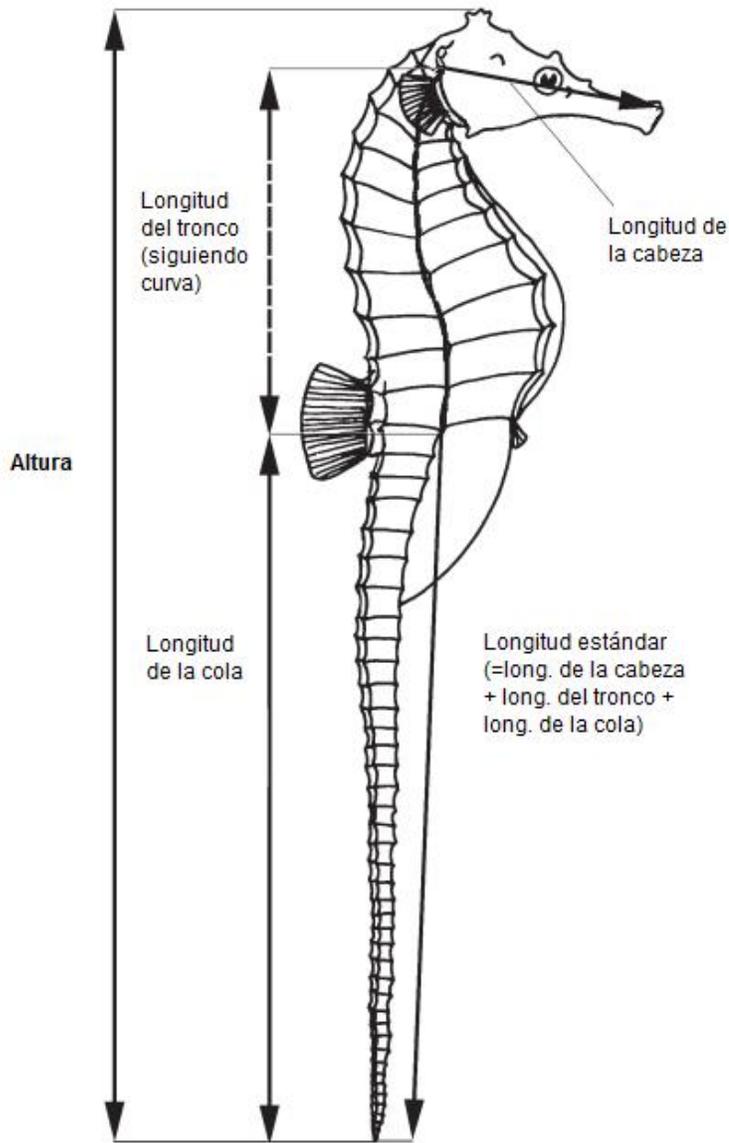


Figura 14. Medidas morfométricas generales para caballitos de mar. (Modificado de Foster y Vincent, 2004).

Análisis de lípidos y ácidos grasos.

A muestras de seis juveniles por camada se le registró el peso y se colocaron en viales de vidrio conteniendo Cloroformo:Metanol (2:1 v/v), con 0.01% de Butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante y 5 µl de 23:0 como estándar interno (Sigma, Bellefonte, PA, USA), se empacaron en hielo y se enviaron al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, (CIBNOR), La Paz, B.C.S., México, donde fueron realizados los análisis de lípidos y ácidos grasos.

Las muestras de lípidos totales fueron corridas en cromatografía de capa fina acoplada a detección por ionización de flama (Iatrocan TLC/FID MK-5 analyzer), utilizando “chromarods” S-III, los cuales fueron previamente llevados a humedad constante en una cámara de hidratación (Palacios et al., 2007). Las clases de lípidos neutrales fueron desarrolladas por 30 minutos en una fase móvil de hexano: acetato etílico: éter dietílico: ácido fórmico (90:7:3:1). Las barras (rods) fueron escaneadas en un flujo de hidrógeno de 160 mL/min, flujo de aire de 2000 mL/min, y una velocidad de escaneo de 30 mm/min. Las clases de lípidos fueron identificadas por los tiempos de retención contra estándares externos apropiados (Sigma, St. Louis, USA), y la concentración fue calculada con base en las áreas de los picos de los estándares externos.

Los ácidos grasos fueron determinados utilizando el método descrito para peces por Palacios et al. (2007), con algunas modificaciones tomando en cuenta las placas óseas de los caballitos como se describe en el anexo 1.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de una vía (ANOVA) para determinar diferencias en ácidos grasos entre las camadas de 2009 y 2010: los datos obtenidos como porcentajes fueron

transformados a arco seno para el análisis. El intervalo de confianza utilizado para todas las pruebas estadísticas fue de 0.95. Todos los resultados se presentan como media \pm error estándar.

Se utilizó un Análisis de Factores para extraer la varianza máxima de los grupos de datos con cada componente principal como una combinación lineal de ácidos grasos individuales de caballitos de mar juveniles, considerando un factor de carga ≥ 0.7 y eigenvalores ≥ 1.0 . Los factores extraídos fueron usados como nuevos factores para analizar la variabilidad de ácidos grasos y, en un análisis de regresión, para determinar la asociación con la talla, número/camada, como se describe en Hurtado et al. (2012). Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando StatisticaTM v. 6.0.

III.3. Resultados.

Tomando en cuenta todos los machos muestreados, éstos presentaron una talla promedio de 151 ± 13 mm, y tuvieron al parir un promedio de 308 ± 138 juveniles, los cuales midieron en promedio 11.5 ± 1 mm al momento de nacer (Tabla 3). No se encontraron diferencias significativas para la talla de machos o juveniles entre 2009 y 2010 (Tabla 3). Sin embargo, más juveniles por camada fueron producidos en 2010 comparado con 2009.

Tabla 3. Fecha de nacimiento, número de crías y su talla al nacer, y talla de 11 machos silvestres analizados en este trabajo.

	Fecha nacimiento	Talla del padre (mm)	Número de crías	Talla al nacer (mm)
Camada 1	03/02/2009	153	220	12 ± 0.9
Camada 2	10/03/2009	142	130	12.4 ± 0.9
Camada 3	11/03/2009	136	180	11.0 ± 0.8
Camada 4	08/01/2010	144	396	11.3 ± 1.1
Camada 5	09/01/2010	134	427	11.0 ± 1.2
Camada 6	12/01/2010	146	285	11.4 ± 1.1
Camada 7	16/01/2010	145	391	11.5 ± 1.2
Camada 8	17/01/2010	171	247	11.8 ± 1.3
Camada 9	17/01/2010	174	606	11.9 ± 0.9
Camada 10	18/01/2010	160	306	11.7 ± 0.8
Camada 11	02/02/2010	158	196	10.6 ± 0.7
Promedio		151 ± 13	307.6 ± 137.9	11.5 ± 1.0

Tabla 4. Variables morfométricas (en mm) de machos de *Hippocampus erectus* y sus recién nacidos, muestreados en 2009 y 2010 provenientes de machos silvestres, y una camada abortada de un macho capturado en 2010. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre 2009 y 2010.

	2009 (n=3)	2010 (n=20)	Abortados
Altura total Macho	143.7 ± 5.0	154.6 ± 2.7	145
Juveniles/camada	176.7 ± 26.0	344.3 ± 24.3 *	391
Altura total juveniles	11.8 ± 0.4	11.5 ± 0.1	11.4

Los lípidos de los caballitos recién nacidos estuvieron compuestos principalmente por fosfolípidos (75-80 %) y en menor medida por colesterol libre (8-10 %), ésteres de colesterol (4-9%) y acilglicéridos (3-11 %). No se encontraron diferencias para los fosfolípidos totales ni para el colesterol entre juveniles de 2009 y 2010, pero en cuanto a los triglicéridos los juveniles nacidos en 2010 tuvieron una mayor concentración de éstos (7.3 %) que los de 2009 (1.4 %). Los caballitos abortados tuvieron elevados niveles de triglicéridos (21.6 %), en detrimento de ésteres de colesterol (1.1 %) y fosfolípidos (69.1 %).

La proporción de ácidos grasos de juveniles recién nacidos en diferentes machos muestreados en 2009 y 2010 se presenta en la Tabla 5. Juveniles nacidos en 2009 tuvieron mayores niveles de 18:0 (10.3 vs. 8.9%) 22:6n-3 (26.7% vs. 21.5), y la suma de los ácidos grasos ramificados (1.9 vs. 0.7%), y varios ácidos grasos menores (16:1n-9, 24:1n-9, 18:2n-4). Juveniles nacidos en 2010 tuvieron una mayor proporción de 16:0 (12.4% vs. 11.0), 24:0 (4.8 vs. 3.5%), 16:1n-7 (2.7 vs. 1.8%), 18:1n-7 (4.5 vs. 3.6%), 20:4n-6 (9.2 vs. 7.2%), 20:5n-3 (7.4 vs. 3.6%), y la suma de los ácidos grasos saturados (29.6 vs. 27.4%), y varios ácidos grasos menores (14:0, 17:0, 16:1n-5, 20:1n-7, 24:1n-7, 18:3n-6, 20:2n-6). Los ácidos grasos totales fueron mayores en juveniles nacidos en 2009 comparados con los de 2010. No se encontró diferencia en la suma de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) ni poliinsaturados (PUFA).

Tabla 5. Ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de juveniles de *Hippocampus erectus* recién nacidos, muestreados en 2009 y 2010 provenientes de machos silvestres, y una camada abortada de un macho capturado en 2010. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre ácidos grasos de camadas de machos muestreados en 2009 y 2010.

	2009 (n=3)	2010 (n=8)	Abortados
14:0	0.40 ± 0.01	0.60 ± 0.02 *	0.79
15:0	0.29 ± 0.09	0.30 ± 0.01	0.21
16:0	11.0 ± 0.17	12.4 ± 0.18 *	13.1
17:0	1.24 ± 0.05	1.72 ± 0.04 *	1.90
18:0	10.3 ± 0.09	8.93 ± 0.09 *	8.18
20:0	0.26 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.37
21:0	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.21
22:0	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.24
24:0	3.45 ± 0.31	4.83 ± 0.13 *	5.17
16:1n-9	0.86 ± 0.02	0.40 ± 0.01 *	0.29
16:1n-7	1.76 ± 0.11	2.73 ± 0.11 *	3.71
16:1n-5	0.27 ± 0.04	0.36 ± 0.01 *	0.42
18:1n-9	9.50 ± 0.75	5.92 ± 0.60 *	6.64
18:1n-7	3.56 ± 0.48	4.50 ± 0.07 *	4.95
20:1n-9	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.13
20:1n-7	0.20 ± 0.04	0.27 ± 0.04 *	0.29
24:1n-9	4.19 ± 0.12	3.65 ± 0.07 *	3.19
24:1n-7	0.19 ± 0.02	2.60 ± 0.14 *	1.65
18:2n-6	1.70 ± 0.22	1.46 ± 0.04	1.54
18:2n-4	0.32 ± 0.03	0.07 ± 0.00 *	0.08
18:3n-6	0.16 ± 0.01	0.29 ± 0.01 *	0.35
18:3n-3	0.50 ± 0.22	0.43 ± 0.08	0.41
20:2n-6	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.01 *	0.22
20:4n-6	7.20 ± 0.17	9.16 ± 0.11 *	9.26
20:5n-3	3.63 ± 0.27	7.44 ± 0.35 *	10.0
21:4n-6	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18
22:4n-6	1.56 ± 0.15	1.41 ± 0.13	1.85
22:6n-3	26.7 ± 1.74	21.5 ± 0.56 *	17.7
Saturados (SAT)	27.4 ± 0.15	29.6 ± 0.31 *	30.17
Monoinsaturados (MUFA)	21.0 ± 1.34	21.5 ± 0.42	22.03
Polinsaturados (PUFA)	49.0 ± 1.32	47.7 ± 0.33	46.64
Ramificados	1.88 ± 0.05	0.73 ± 0.01 *	0.67
Totales (µg/g ww)	819 ± 128	512 ± 31.0 *	760

Se aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA) a las concentraciones de ácidos grasos en juveniles de las diferentes camadas, y los eigenvalores, así como las varianzas acumuladas se presentan en la Tabla 6. Los primeros 7 factores tienen eigenvalores mayores a 1.0. Los primeros 3 factores acumulan el 71% de la variabilidad total. El primer componente principal (CP1) explica el 48.7% de la variación; el segundo componente principal (CP2) explica el 13.5%, y el tercer componente principal (PC3) explica el 9.1% de la variabilidad total.

Tabla 6. Eigenvalores calculados por análisis de factores, los primeros 7 factores tienen eigenvalores > 1.0.

	Eigenvalores	% variación total	variación acumulada %
1	18.03	48.72	48.72
2	4.99	13.49	62.21
3	3.35	9.06	71.27
4	2.81	7.58	78.85
5	1.79	4.83	83.68
6	1.53	4.14	87.82
7	1.38	3.72	91.54
8	0.79	2.13	93.67
9	0.62	1.66	95.33
10	0.51	1.39	96.72
11	0.38	1.03	97.75
12	0.28	0.75	98.50
13	0.18	0.49	98.99
14	0.16	0.44	99.42
15	0.09	0.25	99.67
16	0.03	0.09	99.76
17	0.03	0.08	99.84
18	0.02	0.06	99.90
19	0.01	0.04	99.94

Tabla7. Contribución de cada ácido graso a cada factor, considerando 0.7 como una contribución significativa.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7
14:0	0.95	-0.20	-0.12	0.05	0.13	0.00	-0.08
15:0	-0.15	-0.09	-0.48	0.44	0.51	-0.11	0.03
16:0	0.86	-0.20	-0.27	-0.06	0.27	-0.01	0.09
17:0	0.78	-0.40	-0.17	-0.01	0.12	0.14	0.26
18:0	-0.60	0.60	-0.06	-0.23	0.38	0.05	0.14
20:0	0.43	-0.68	-0.05	-0.06	0.18	0.10	0.48
21:0	0.30	0.12	-0.27	0.18	-0.02	0.23	-0.23
22:0	0.16	0.13	0.14	0.06	-0.11	0.15	0.16
24:0	0.77	-0.36	0.01	0.03	0.05	0.20	0.03
16:1n-9	-0.65	0.74	0.08	-0.03	0.02	0.00	0.04
16:1n-7	0.95	-0.20	-0.12	0.01	0.03	0.01	0.00
16:1n-5	0.89	-0.25	0.19	-0.06	0.09	0.19	0.10
18:1n-9	-0.32	0.26	0.17	0.06	-0.87	-0.11	-0.04
18:1n-7	0.83	-0.33	0.17	-0.28	0.08	0.10	-0.06
20:1n-9	0.02	0.00	-0.02	0.18	-0.03	0.03	-0.96
20:1n-7	0.35	-0.28	-0.56	0.33	0.29	0.02	-0.37
24:1n-9	-0.76	0.29	0.08	-0.23	0.24	0.04	0.08
24:1n-7	-0.12	-0.85	-0.24	-0.23	0.30	0.12	-0.01
18:2n-6	0.02	0.34	0.90	-0.04	-0.06	0.07	-0.03
18:2n-4	-0.30	0.92	-0.06	0.21	-0.04	-0.08	-0.05
18:3n-6	0.82	-0.48	0.14	0.23	-0.01	0.06	-0.06
18:3n-3	-0.09	-0.03	0.94	0.22	-0.10	0.12	0.00
18:4n-3	0.68	0.13	0.48	0.41	0.06	0.07	0.04
18:5n-3	-0.36	0.91	0.04	0.07	-0.02	-0.08	-0.05
20:2n-6	0.58	-0.39	0.33	0.52	0.06	0.20	-0.02
20:3n-3	-0.05	0.22	0.11	0.89	-0.07	0.00	-0.28
20:4n-6	0.70	-0.53	-0.16	0.00	0.26	-0.07	-0.13
20:5n-3	0.91	-0.32	-0.10	0.07	0.16	0.03	0.02
21:4n-6	0.21	-0.20	0.21	0.02	0.09	0.89	-0.02
22:4n-6	0.00	0.00	-0.01	0.09	-0.10	0.00	0.01
22:5n-6	-0.23	0.52	-0.04	-0.17	-0.06	0.17	0.25
22:6n-3	-0.90	0.27	-0.08	0.05	0.26	-0.06	0.08
iso14:0	-0.62	0.77	0.05	-0.07	0.00	-0.07	-0.07
iso15:0	-0.34	0.73	0.37	-0.32	-0.12	0.03	-0.12
anteiso15:0	-0.28	0.80	0.12	-0.21	0.09	-0.02	0.01
iso17:0	-0.31	0.93	0.04	0.07	-0.10	-0.07	0.10
iso18:0	-0.43	0.87	0.12	-0.04	-0.07	0.00	0.04

El CP1 incluye alta (>0.7) contribución positiva de 20:5n-3, y contribución negativa de 22:6n-3, entre otras. El CP2 muestra una alta contribución de 16:1n-9, 18:2n-4, 18:5n-3, iso14:0, iso15:0, anteiso15:0, iso17:0, and iso18:0, y contribución negativa de 24:1n-7. El CP3 presentó una contribución positiva de 18:2n-6 y 18:3n-3 (Tabla 7).

Se utilizaron los tres primeros componentes principales que en análisis que representan el 71.3% de la varianza acumulada (Tabla 6) para construir la representación gráfica de los componentes principales estimados (Fig. 15). Se identificaron tres grupos en el ACP: el primer grupo “a” muestran que las siguientes variables fueron las mejores para diferenciar entre grupos, con los siguientes valores (mínimos y máximos): 14:0 (0.45-0.62), y 20:5n-3 (5.30-7.31). Estos intervalos de valores fueron los opuestos a aquellos observados en el segundo grupo “b” identificado en el ACP. El segundo grupo muestra las siguientes variables y valores: 14:0 (0.63-0.83), y 20:5n-3 (7.52-10.63). Se encontró un traslape para 17:0 (1.41-1.95 y 1.46-2.12), 24:0 (3.80-5.57 y 4.60-5.49), 16:1n-9 (0.38-0.49 y 0.26-0.41), 16:1n-5 (0.27-0.37 y 0.33-0.45), 24:1n-9 (3.66-4.10 y 3.00-3.94). Estas variables no resultaron útiles para separar los grupos “a” y “b”, ya que sus intervalos presentaron un fuerte traslape. Los grupos “a” y “b” estimados presentaron un traslape leve en las siguientes variables del CP1: 16:0 (11.13-12.59 y 12.19-13.90), 16:1n-7 (1.88-2.91 y 2.68-3.80), 18:1n-7 (3.71-4.60 y 4.42-5.12), 18:3n-6 (0.19-0.32 y 0.30-0.36), 20:4n-6 (8.24-9.35 y 9.05-10.41) y 22:6n-3 (20.05-26.57 y 17.13-20.60). Así, considerando los HUFA, el grupo “a” está caracterizado por bajos niveles de 20:5n-3 y 20:4n-6, y un elevado nivel de 22:6n-3. En el grupo “a”, dos camadas tienden a separarse en la parte alta: estas fueron distinguidas por elevados niveles de 18:3n-3 (1.61-1.62 y 0.16-0.34) y 18:2n-6 (1.91 y 1.18-1.53).

El tercer grupo “c” estuvo caracterizado por elevados valores de 18:2n-4 (0.28-0.30), iso14:0 (0.25-0.27), e iso18:0 (0.25-0.33); y bajos valores de 24:1n-7 (0.16-0.24), comparado con los valores en “a” y “b” de 18:2n-4 (0.04-0.14), iso14:0 (0.08-0.14), e iso18:0 (0.05-0.09); y elevados valores de 24:1n-7 (1.54-4.01). Se encontró un traslape para iso15:0 (0.04-0.15), anteiso15:0 (0.05-0.09), e iso17:0 (0.34-0.37). Así, el grupo “c” se caracterizó por tener elevados valores de varios ácidos grasos ramificados.

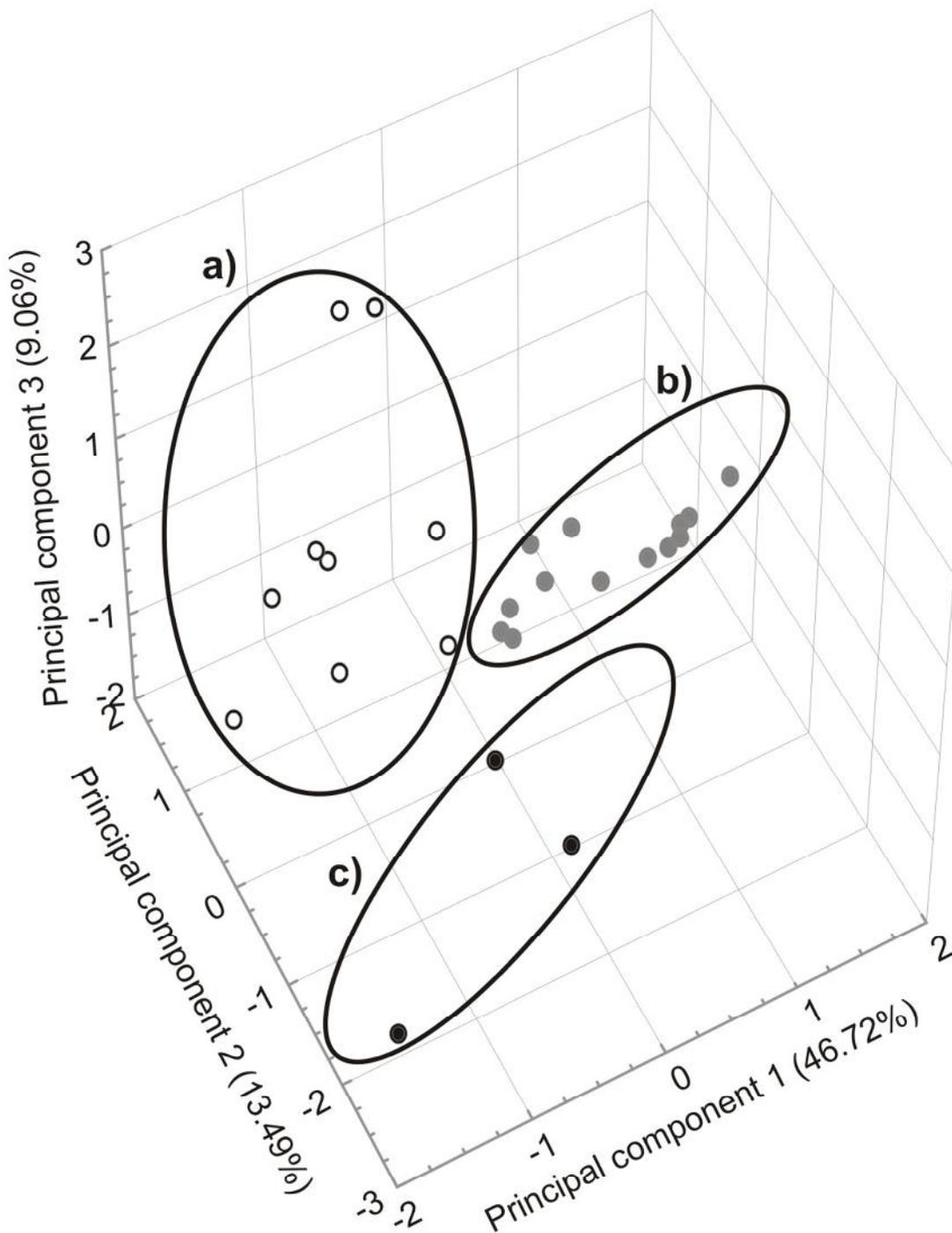


Fig. 15. Representación gráfica de los 3 primeros componentes principales (71.3% de la varianza acumulada). CP1 (x), CP2 (y) y CP3 (z), calculados por las contribuciones de la proporción de ácidos grasos en juveniles nacidos en 2009 y 2010. El primer grupos “a” está formado por las camadas marcadas con los círculos negros, el segundo grupo “b” marcado con círculos grises, y el grupo “c” marcado con círculos negros sólidos.

Cuando se analizaron los primeros 7 CP utilizando ANOVA, únicamente el CP1 ($P < 0.05$) y el CP2 ($P < 0.01$) resultaron significativamente distintos entre 2009 y 2010. Cuando se aplicó una regresión simple a los primeros tres factores, se encontraron correlaciones positivas significativas con la talla de los juveniles y el CP1 ($r = 0.47$; $P < 0.05$) y una negativa correlación con el CP2 ($r = - 0.58$; $P < 0.01$).

III.4 Discusión y conclusiones.

Uno de los principales intereses por comparar ácidos grasos de juveniles de caballito de mar, fue evaluar las variaciones de los caballitos presentes en su medio natural, asumiendo que estos niveles son adecuados para lograr un buen crecimiento y sobrevivencia de los juveniles, en particular los que corresponden a los HUFA (22:6n-3, 20:5n-3 y 20:4n-6).

En el presente trabajo se encontraron mayores niveles (arriba de 20%) de 22:6n-3 en juveniles de *H. erectus*. En comparación con juveniles de otras especies, como de *H. ingens* muestreados en la costa del Pacífico Mexicano, los niveles de 22:6n-3 fueron de 7-8% (Sandoval-Muy, 2006). Sin embargo, en juveniles de *H. guttulatus* obtenidos de padres muestreados en Portugal, Faleiro y Narciso (2011), encontraron un nivel de este ácido graso cercano al 17%, y en adultos de varias especies de caballitos muestreados en diferentes regiones costeras asiáticas, se reportan niveles de 22:6n-3 tan bajos como 8.2% en *H. spinosissimus*, y tan altos como 24.4% en *H. comes* (Lin et al., 2009).

Existe una menor variación entre las diferentes especies de caballitos en relación con 20:5n-3, otro ácido graso considerado de importancia para el cultivo de los peces. El nivel de EPA decrece durante el desarrollo embrionario de *H. guttulatus* y los juveniles recién nacidos de esta especie tienen 5% de este ácido graso (Faleiro y Narciso, 2010; 2011). Aquí se encontraron

niveles de 3.6% en 2009 y más del doble en recién nacidos de 2010. Sandoval-Muy (2006) encontró niveles similares (3.3 a 5.1%) en juveniles de *H. ingens*. Mayores niveles de EPA en embriones menos desarrollados concuerda con los elevados niveles de 20:5n-3 encontrados en este trabajo en organismos abortados (10.0%).

Por otro lado, los niveles encontrados aquí para 20:4n-6 es difícil compararlos con otros estudios. Lin et al. (2009) no reporta 20:4n-6 en su trabajo con caballitos de mar adultos. Sandoval-Muy (2006) reporta niveles de 20:4n-6 de 3-4% para *H. ingens*, cerca de la mitad de los niveles reportados aquí, mientras que Faleiro y Narciso (2010; 2011), encontraron menos de 1% de 20:4n-6. Sin embargo, en el caso de los trabajos de Faleiro y Narciso (2010; 2011), se reportan niveles de 20:n-3 de 3-6%, lo cual es improbable ya que este ácido graso es generalmente un ácido graso menor en peces (Mourente et al., 1993; Cejas et al., 2004; Planas et al., 2010); si los niveles de 20:4n-3 y 20:4n-6 están al revés en los trabajos de Faleiro y Narciso, los valores de 20:4n-6 serían similares a los valores reportados por Sandoval-Muy (2006). En otros peces marinos tales como *Sparus aurata* (Mourente et al., 1993) y *Amphiprion ocellaris* (Olivotto et al., 2011) los niveles de 20:4n-6 son similares a aquellos encontrados aquí. Los niveles de 20:4n-6 fueron mayores en juveniles muestreados en 2010, comparados con los nacidos en 2009 (9.2 vs. 7.2%). Los niveles de 20:4n-6 en juveniles abortados fueron los mayores (9.3%).

El ACP reveló que los ácidos grasos altamente insaturados están agrupados en el CP1, junto con otros ácidos grasos (Tabla 7), pero el 22:6n-3 tiene una carga negativa, mientras que el 20:5n-3 y 20:4n-6 tienen una carga positiva. Si el CP1 refleja los ácidos grasos que son selectivamente acumulados en la gónada de las hembras durante la maduración, como vitelo, las variaciones en estos ácidos grasos pueden ser indicativas del desempeño de los juveniles. Por ejemplo, 16:0, 16:1n-7, 18:1n-7, y 20:5n-3, que tienen valores positivos y eigenvalores > 0.7, son

selectivamente utilizados durante la embriogénesis para propósitos energéticos en varias especies de peces (Palacios et al., 2007), así como en caballitos de mar (Faleiro y Narciso 2010). Considerando los altos valores de 20:5n-3, 16:0, 16:1n-7, y 18:1n-7 en juveniles abortados, bajos niveles de estos ácidos grasos pueden indicar un mayor desarrollo con un consumo selectivo de estos ácidos grasos.

El CP2 estuvo compuesto, entre otros, por ácidos grasos ramificados, que son típicos de bacterias (Kaneda et al., 1991; Budge et al., 2001; Kelly y Scheibling, 2012). Faleiro y Narciso (2010; 2011), reportan ácidos grasos ramificados y en niveles similares a los encontrados aquí, en *H. guttulatus* recién nacidos. En este trabajo se obtuvieron más ácidos grasos ramificados en juveniles nacidos en 2009 en comparación con los de 2010 (1.9 y 0.7%, respectivamente). En el CP2 el 18:5n-3 también fue significativo, y este ácido graso es típico de dinoflagelados marinos (Reus y Poulsen, 2002). Así, parece ser que este factor está más asociado con el consumo reciente de la hembra, que con una acumulación selectiva a lo largo del tiempo en el vitelo. A menos que las bacterias y microalgas estuvieran presentes en el marsupio y de alguna forma fueran ingeridas por los caballitos, la presencia de estos ácidos grasos puede indicar también ingestión por parte de la hembra y transferencia de material no selectivo hacia el huevo: se ha reportado que 18:5n-3 está co-asociado a 22:6n-3 (Ghioni et al., 2001). La identificación de los ácidos grasos ramificados del caballito se encuentra en el Anexo 1.

Como se puede ver en la Fig. 15, la mayor concentración de ácidos grasos ramificados en 2009, permite una clara separación del grupo “c”, que comprende los caballitos nacidos en 2009, del grupo “a” y “b”, que corresponde a los caballitos nacidos en 2010. En contraste, 18:5n-3, típico de fitoplancton marino (Ghioni et al., 2001), estuvo presente en una baja proporción pero únicamente en juveniles muestreados en 2010, estando ausente del todo en los caballitos de

2009. Como lo demuestran Ghioni et al. (2001) en las células de los peces 18:5n-3 es convertido a 18:4n-3, y entonces puede ser elongado y desaturado a 20:5n-3, lo que concuerda con mayores niveles de 20:5n-3 en 2010.

La separación del grupo “a” en la Fig. 15, que está dada por elevados niveles de 22:6n-3 y bajos niveles de 20:5n-3 y 20:4n-6, del grupo “b”, puede ser una primera aproximación para adecuar los niveles que son necesarios en los juveniles. En el grupo “b” hay, entre otros, juveniles abortados y caballitos con tallas menores. Aparentemente, elevados valores de 22:6n-3, en detrimento de 20:5n-3, son necesarios para producir juveniles del caballito tropical *H. erectus* que pueden ser considerados de “mejor calidad”, considerando, entre otras cosas, los niveles en la camada abortada.

El CP3 estuvo principalmente compuesto de 18:2n-6 y 18:3n-3, los cuales han sido asociados con ingestión de pastos marinos (Kelly y Scheibling, 2012). Los caballitos de mar viven en praderas de pastos marinos. De acuerdo con la presencia de éstos ácidos grasos en los caballitos de mar, ellos podrían comer directamente pasto marino (lo cual no se ha observado y es improbable) o consumir organismos que a su vez consumen pasto marino. Los juveniles con altos niveles de 18:3n-3 y 18:2n-6 tienden a separarse en lo alto del grupo “a” ya que tienen altos valores en el CP3.

También se encontró una correlación significativa pero negativa entre la talla de los juveniles y el CP1 ($r = -0.58$; $P < 0.01$) y CP2 ($r = 0.47$; $P < 0.05$). Se pueden esperar juveniles mayores en relación con el vitelo. El tamaño de los juveniles no estuvo relacionado con el número de juveniles en cada camada, con lo que se descarta que una alta densidad dentro del marsupio cause una reducción del crecimiento. Una baja correlación positiva fue encontrada entre la talla de los juveniles y la talla de los padres reproductores ($r = 0.31$; $P < 0.05$). Dzyuba et al. (2006),

encontraron que en *H. kuda* en cautiverio, juveniles de padres de mayor edad (que tienen más experiencia y mayor tamaño), tienen un crecimiento mayor después del nacimiento y durante las siguientes 3 semanas, que juveniles provenientes de padres de menor edad, y por lo tanto menor experiencia y menor talla.

IV. ENRIQUECIMIENTO DE NAUPLIOS Y ADULTOS DE *Artemia* sp. CON HUFA.

IV.1 Introducción.

Los peces marinos que actualmente se cultivan son carnívoros y requieren durante sus primeras etapas de vida alimentarse de presas vivas. La primera alimentación de los estadios larvales tempranos es el cuello de botella para la acuicultura marina (Agh y Sorgeloos, 2005; Faleiro y Narciso, 2009), debido al tamaño de boca de las larvas y su sistema digestivo incipiente. Desde hace algunas décadas, las presas vivas más ampliamente utilizadas en el mundo para este propósito son la *Artemia* (Léger et al., 1987; Sorgeloos et al., 2001) y los rotíferos (género *Brachionus* principalmente) (Valencia-Betancourt et al., 2004; Faleiro y Narciso, 2009). Ambos toleran amplios intervalos de condiciones ambientales, se pueden obtener altas densidades y pueden ser enriquecidos con suplementos alimenticios, probióticos y/o antibióticos (Faleiro y Narciso, 2009). Sin embargo, se requiere alimentar a los rotíferos con microalgas, por lo que su uso requiere de sistema de cultivo de microalgas. Por este motivo, el uso de rotíferos se ha limitado a las etapas iniciales, en las que muchas larvas de peces marinos tienen que consumirlos por su menor tamaño.

La *Artemia* es un filtrador no selectivo y se alimenta tanto de materia orgánica particulada (ej. detritos biológicos procedentes de aguas de manglares) como de organismos vivos de tamaño apropiado (microalgas y bacterias) (Narciso, 2000). Los nauplios de *Artemia* se usan extensivamente para cultivo de larvas con bocas pequeñas; se pueden producir a partir de quistes por lo que no requiere un cultivo adicional de microalgas. Tanto el adulto como el nauplio se puede mejorar nutricionalmente (enriquecer) aportando los nutrientes requeridos en forma adecuada en el medio de cultivo (Figuereido et al., 2009). Sin embargo, la *Artemia* no es un alimento natural de los peces marinos, y estudios que analizan su perfil nutricional han

establecido que, por lo general, no es el adecuado para un correcto desarrollo de estos organismos, en especial en etapas críticas del ciclo de vida como es la reproducción y las etapas larvales. Una de las principales razones de esto es que *Artemia* posee un bajo contenido de 20:5n-3 (EPA) y un contenido prácticamente nulo de 22:6n-3 (DHA), ambos HUFA que son esenciales para la mayor parte de peces marinos estudiados a la fecha (Rainuzzo et al., 1997; Copeman et al., 2002; Sargent et al., 2002; Conceição et al., 2010).

El nivel de cada ácido graso en nauplios de *Artemia* enriquecida varía como una función del protocolo de enriquecimiento (Han et al., 2000; 2001). Durante el enriquecimiento de ácidos grasos, la composición lipídica de *Artemia* se ve modificada debido al proceso de ingestión, catabolismo y síntesis de ácidos grasos (Figuereido et al., 2009). El modelo de enriquecimiento ideal debería tomar en cuenta la concentración de cada ácido graso en el producto de enriquecimiento y su tasa de oxidación (McEvoy et al., 1995), la tasa de filtración de los nauplios de *Artemia* (el cual podría variar durante su desarrollo), y las conversiones de los ácidos grasos una vez ingeridos (anabolismo y catabolismo) (Navarro et al., 1999). Sin embargo, las dificultades técnicas impiden conocer con precisión estos datos, ya que es difícil saber que está sucediendo metabólicamente en los nauplios, es decir, distinguir entre los procesos de ingestión, anabolismo, catabolismo y excreción (Figuereido et al., 2009). Por lo tanto, al proceso de enriquecimiento también se le ha denominado “bioencapsulación” o “incorporación de ácidos grasos”, englobando los citados procesos sin diferenciarlos (Figuereido et al., 2009).

Para cada ácido graso la cantidad ingerida por *Artemia* está directamente relacionada con su abundancia en el medio de enriquecimiento. Sin embargo el perfil de ácidos grasos en los lípidos de *Artemia* no siempre corresponde con el del medio de enriquecimiento. Se ha supuesto (con cierta evidencia) que la modificación de la composición nutricional de *Artemia* utilizando

alimentos con altos niveles de ciertos ácidos grasos se vuelve más difícil para moléculas de ácidos grasos con números crecientes de átomos de carbono (Navarro et al., 1999). Los bajos niveles de 22:6n-3 frecuentemente encontrados en *Artemia* no pueden ser adscritos a la discriminación de este HUFA durante el proceso de ingestión, digestión y absorción (McEvoy et al., 1995). Este ácido graso presenta un decremento en *Artemia* si se somete ésta a un tiempo de inanición, lo cual puede indicar una oxidación preferencial de este ácido graso y puede contribuir a la ineficiencia del enriquecimiento de HUFA, en particular DHA, observada empíricamente (Navarro et al., 1999; Han et al., 2001).

McEvoy et al. (1995) mostraron que nauplios de *Artemia* enriquecidos durante 18 hrs con una dieta conteniendo 75% de los lípidos totales como etil ésteres, no contienen etil ésteres pero muestran un remarcable incremento en su contenido de triacilglicéridos. Esto sugiere que los nauplios no actúan como meros vehículos y que, en cambio, pueden modificar activamente los etil ésteres de la dieta. Navarro et al. (1999) dan evidencia de la transformación de etil ésteres a otras clases de lípidos durante el proceso de enriquecimiento utilizando substratos radiactivos y prueban que el incremento en el contenido de lípidos de *Artemia* enriquecida no es simplemente debida a la retención de etil ésteres no digeridos en el tracto digestivo, sino que reflejan una asimilación definida de ácidos grasos exógenos en lípidos de los tejidos. Durante un periodo de 24 hrs de inanición se observa un patrón claro en el cual se da un decremento general en las proporciones de ácidos grasos en triacilglicéridos acoplado con un aumento de éstos en ácidos grasos libres y fosfolípidos. Estos cambios son consistentes con la movilización de ácidos grasos de lípidos neutros (e.g. triacilglicéridos) de reserva para su uso como substratos, tanto para producción de energía como para la conservación de la estructura de membranas lipídicas.

Dada la amplia utilización en la alimentación de larvas de peces de nauplios de *Artemia*, la mayor parte de los trabajos de enriquecimiento de lípidos que existen, evalúan la composición de ácidos grasos de nauplios enriquecidos de *Artemia*. Sin embargo, el caballito de mar, en su etapa adulta, consume adultos de *Artemia*, sobre los cuales no hay trabajos a la fecha donde se describan los resultados de enriquecimiento con ácidos grasos. Este trabajo es uno de los primeros intentos por enriquecer *Artemia* adulta y comparar su composición con la de nauplios, utilizando productos con diferente composición de ácidos grasos para el enriquecimiento.

IV.2 Materiales y métodos

Enriquecimiento de nauplios de *Artemia* sp.

Se utilizaron quistes desencapsulados de *Artemia* (*A. franciscana*) que fueron incubados (2 g/L) en tanques cilindrocónicos de 5 L con agua a 25‰, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con iluminación (60 watts) y aireación constante durante 24 horas. Después de 24 horas a partir de la eclosión los nauplios fueron sometidos al enriquecimiento. Se utilizaron cinco diferentes productos para el enriquecimiento de los nauplios, todos con diferente composición de ácidos grasos (Tabla 8). Se eligieron estos productos por tener todos ellos diferente composición de HUFA. El aceite de canola carece de HUFA, lo cual puede servir como un control, y de las otras 4 emulsiones, dos de ellas presentan una composición mayor de EPA que de DHA y las otras dos es a la inversa, lo cual se puede ver en la razones DHA/EPA (Tabla 8).

E1 = Epax 4510TG

E2 = Epax 1050TG

E3 = Epax 3

E4 = Selco

E5 = Aceite de Canola

Se colocaron 200 mil nauplios en 1 L de agua a 25-27°C, 25 % con aireación constante. Se agregaron 0.3 ml de emulsión (tiempo 0) al inicio y 0.3 ml a las 22 hrs (Fig. 16A) y se cosecharon los nauplios a las 24 hrs.

El aceite de canola y las tres emulsiones EPAX se emulsificaron utilizando una licuadora en el mismo litro de agua a 25 %. El producto Selco, se utilizó directamente del frasco de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La cosecha de la *Artemia* consistió en la filtración de los organismos con un tamiz de 100 µm, lavándolos por unos segundos con agua de mar. Se retiró el exceso de agua utilizando una toalla absorbente y se tomó alrededor de 0.1 g de muestra (Balanza OHAUS ± 0.0001) que se colocaron en tubos de vidrio con tapas de teflón y a las cuales se les adicionó 1mL de solución Folch (Cloroformo:Metanol; 2:1), con 0.01% de Butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante y 5 µl de 23:0 como estándar interno (Sigma, Bellefonte, PA, USA) para el análisis de ácidos grasos

Tabla 8. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de los lípidos presentes en los enriquecedores utilizados para el experimento: EPAX 4510TG; EPAX 1050TG; EPAX 3; DHA Protein Selco; E5: Aceite de Canola.

	Epax 1	Epax 2	Epax 3	Selco	Canola
18:2n-6	1.4	0.2	1.1	--	20.3
18:3n-3	0.9	--	0.6	--	9.3
20:4n-6 (ARA)	4.15	9.9	0.2	0.7	--
20:5n-3 (EPA)	47.8	18.2	27.6	7.2	--
22:6n-3 (DHA)	12.7	63.3	17.3	14.4	--
DHA/EPA	0.3	3.4	0.6	2.0	--
Σ SAT	7.4	3.5	25.6	33.3	7.1
Σ MUFA	20.5	4.1	21.8	26.4	58.9
Σ PUFA	70.7	92.2	50.4	40.3	29.6
22:6n-3/20:5n-3	0.27	3.48	0.62	2.0	-

Los tubos se guardaron a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento. El enriquecimiento con cada emulsión se realizó por triplicado, en días consecutivos, utilizando el mismo lote de *Artemia* y de enriquecedores.

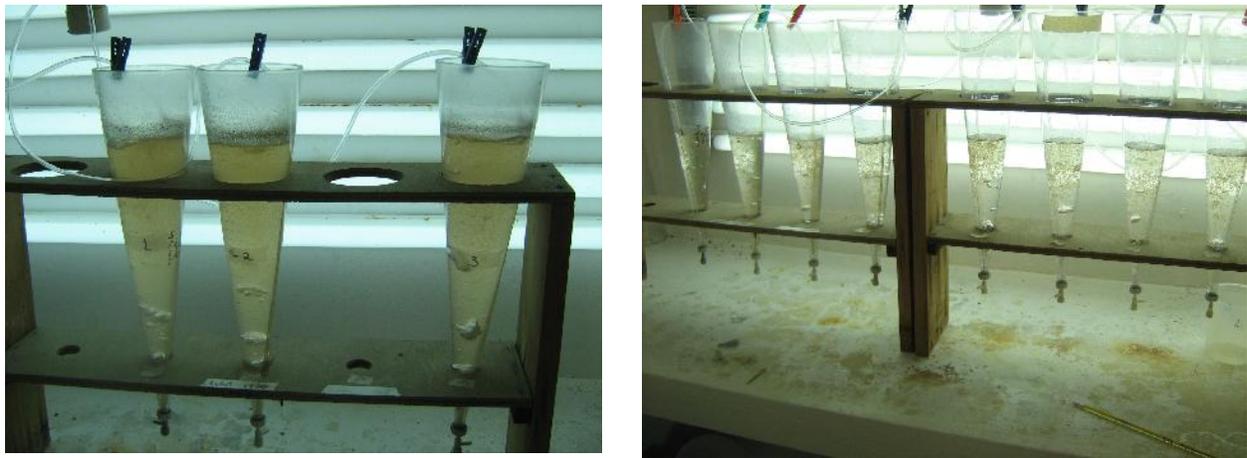


Figura 16. (A) Recipientes cónicos con nauplios y (B) con adultos de *Artemia* y diferentes emulsiones utilizadas para su enriquecimiento.

Enriquecimiento de adultos de *Artemia* sp.

Se utilizaron adultos de *Artemia* cultivados de manera semi-natural en Celestún, Yucatán. Se dice de manera semi-natural ya que el cultivo se realiza en estanques de tierra a cielo abierto, con agua hipersalina ($>40\text{ ‰}$) donde únicamente se siembra la *Artemia* y se alimenta con las microalgas presentes en el sistema de forma natural. Los adultos de *Artemia* fueron puestos a un periodo de 12 horas de ayuno previo al enriquecimiento. Se utilizaron recipientes cónicos de 1 L a los cuales se agregó 333 mL de agua a 30 ‰ , 4 g de *Artemia* adulta, 0.3 mL de emulsión al comienzo (tiempo 0) y 0.3 mL a las 22 horas, cosechando a las 24 horas. Durante el enriquecimiento, la temperatura se mantuvo entre $25\text{-}27^{\circ}\text{C}$ y la aireación y luz fueron

constantes. Los adultos se enriquecieron con las emulsiones E1, E2 y E3 por triplicado (Fig. 16B). La *Artemia* se cosechó utilizando un tamiz de 500 μm , se le retiró el exceso de agua con una toalla absorbente y se tomaron aprox. 0.1 g muestra (Balanza OHAUS \pm 0.0001) que fueron procesadas como se describe para nauplios.

Análisis de ácidos grasos.

Los ácidos grasos fueron analizados utilizando la metodología descrita por Palacios et al. (2007) como se describe en el Anexo 1.

Análisis estadístico.

Debido a que los datos no presentaron la normalidad como requisito para ANOVA, se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis basadas en rangos, utilizando como variables dependientes la concentración relativa de los principales grupos de ácidos grasos saturados (SAT), monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA) y altamente insaturados (HUFA), así como la concentración relativa de los ácidos grasos altamente insaturados esenciales 20:4n-6 (ARA), 20:5n-3 (EPA) y 22:6n-3 (DHA), y como variable independiente a los diferentes tratamientos (*Artemia* enriquecida). Los datos de nauplios y adultos fueron analizados por separado.

En caso de encontrar diferencias significativas se aplicaron pruebas de comparaciones múltiples no paramétricas. Los análisis se realizaron utilizando el programa Statistica 8.0 y en todos los casos utilizando un nivel de significancia de 0.05.

IV.3 Resultados.

Enriquecimiento de nauplios de *Artemia* sp.

En la Tabla 9 se puede observar el porcentaje total de ácidos grasos que componen los lípidos de los nauplios sin enriquecimiento, y con los cinco enriquecedores utilizados. Se obtuvieron diferencias significativas en todos estos grupos de ácidos grasos con respecto a los tratamientos de enriquecimiento, a excepción del 18:3n-3. En relación con los SAT su concentración varió de 14.3 % en los nauplios enriquecidos con aceite de Canola a 21.4 % en la Epax3 ($F = 13.8$, $P < 0.05$). La concentración de MUFA tuvo intervalos de variación mucho mayores ($F = 57.7$, $P < 0.05$), de 27.1 % en los nauplios enriquecidos con Epax2 (sin diferencias con los de Epax1 y Epax3), hasta 47.7 % en los nauplios enriquecidos con aceite de Canola. Por el contrario, los PUFA presentaron su menor concentración en los nauplios con Canola (38.0 %), distintos de todos los demás, y la mayor concentración en los enriquecidos con Epax2 (56.4 %) ($F = 27.3$, $P < 0.05$).

En relación con los HUFA, que son el principal objeto de este experimento, las pruebas de comparaciones múltiples resultaron en dos grupos estadísticamente distintos, uno formado por el tratamiento de aceite de Canola 3.0 %; y el otro grupo formado por el resto de los tratamientos con concentraciones de 20.4 a 24.5 %.

La proporción de ácido docosahexaenóico (DHA) en los nauplios presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de enriquecimiento ($F = 22.8$, $P < 0.05$). Se distinguen cuatro grupos estadísticamente distintos, el primero conformado por el tratamiento Canola con 0.2 %, el siguiente con Epax1 con 2.8 %, posteriormente Epax3 con 6.5 %, y finalmente un grupo conformado por Selco y Epax2 con 13.6 y 12.9 %.

En relación al ácido eicosapentaenóico (EPA), la proporción en el tratamiento de aceite de Canola (1.8 %), resultó menor que en los todos los demás tratamientos. Los tratamientos Epax2, Epax3 y Selco presentaron valores intermedios no diferentes estadísticamente entre sí (9.7, 10.9, 13.1 %, respectivamente), y el tratamiento Epax1 (17.5 %) presento los valores más altos ($F = 25.9, P < 0.05$). Se encontraron diferencias significativas para la proporción de ácido araquidónico (ARA) entre los tratamientos ($F = 3.2, P < 0.05$), pero en todos los casos el ARA fue menor a 2%.

Tabla 9. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de los nauplios de *Artemia* enriquecidos utilizando EPAX 4510TG; EPAX 1050TG; EPAX 3; DHA Protein Selco; E5: Aceite de Canola. Letras distintas en el mismo renglón denotan diferencias significativas.

	Epax 1	Epax 2	Epax 3	Selco	Canola
16:0	8.4 ± 1.4 ^{ab}	7.8 ± 1.0 ^{ab}	12.2 ± 0.9 ^c	9.8 ± 0.7 ^b	7.3 ± 0.7 ^a
18:0	6.6 ± 0.6 ^b	5.4 ± 0.8 ^{ab}	5.7 ± 0.3 ^b	4.8 ± 0.4 ^a	5.2 ± 0.6 ^{ab}
16:1n-7	2.1 ± 0.2 ^a	1.8 ± 0.2 ^a	4.6 ± 0.1 ^c	3.3 ± 0.1 ^b	1.5 ± 0.2 ^a
18:1n-9	16.9 ± 1.1 ^a	15.8 ± 1.5 ^a	16.4 ± 0.5 ^a	19.3 ± 0.7 ^b	36.9 ± 4.1 ^c
18:1n-7	7.2 ± 0.2 ^c	6.4 ± 0.9 ^{abc}	6.2 ± 0.5 ^{ab}	5.6 ± 0.4 ^a	7.0 ± 0.7 ^{bc}
18:2n-6	4.7 ± 0.8 ^a	4.7 ± 0.7 ^a	4.3 ± 0.4 ^a	7.3 ± 0.3 ^b	11.4 ± 1.1 ^c
18:3n-3	23.2 ± 4.3	23.1 ± 4.3	20.0 ± 2.2	17.3 ± 2.8	21.8 ± 3.5
20:4n-6	1.1 ± 0.8 ^{ab}	1.1 ± 0.5 ^{ab}	0.8 ± 0.6 ^a	1.9 ± 0.2 ^b	1.0 ± 0.5 ^{ab}
20:5n-3	17.5 ± 6.3 ^c	10.9 ± 3.0 ^b	13.1 ± 1.9 ^b	9.7 ± 0.8 ^b	1.8 ± 0.3 ^a
22:6n-3	2.8 ± 1.0 ^b	13.6 ± 5.4 ^d	6.5 ± 0.5 ^c	12.9 ± 2.6 ^d	0.2 ± 0.1 ^a
∑ SAT	16.9 ± 2.1 ^{ab}	16.2 ± 1.1 ^{ab}	21.4 ± 1.7 ^c	17.5 ± 1.2 ^b	14.3 ± 1.5 ^a
∑ MUFA	29.2 ± 1.3 ^{ab}	27.1 ± 2.3 ^a	29.0 ± 0.9 ^{ab}	31.7 ± 1.0 ^b	47.7 ± 3.7 ^c
∑ PUFA	53.1 ± 3.5 ^{bc}	56.4 ± 3.4 ^c	48.5 ± 1.3 ^b	50.8 ± 2.1 ^{bc}	38.0 ± 2.9 ^a
∑ HUFA	21.4 ± 8.1 ^b	25.5 ± 8.9 ^b	20.4 ± 2.9 ^b	24.5 ± 3.6 ^b	3.0 ± 0.9 ^a
∑ n-6	7.9 ± 0.1 ^b	7.1 ± 0.8 ^{ab}	6.9 ± 0.2 ^a	10.1 ± 0.4 ^c	13.3 ± 0.7 ^d
∑ n-3	45.2 ± 3.4 ^{bc}	49.1 ± 3.9 ^c	41.6 ± 1.2 ^b	40.6 ± 2.3 ^b	24.7 ± 3.4 ^a
n-3/n-6	5.7 ± 0.4 ^c	7.1 ± 1.3 ^c	6.0 ± 0.1 ^c	4.0 ± 0.3 ^b	1.9 ± 0.3 ^a
22:6/20:5	0.2 ± 0.0 ^a	1.2 ± 0.3 ^b	0.5 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.2 ^b	0.1 ± 0.0 ^a

Enriquecimiento de adultos de *Artemia* sp.

En la Tabla 10 se presentan las concentraciones relativas de los ácidos grasos presentes en *Artemia* adulta sin enriquecimiento y sometida al enriquecimiento con las emulsiones E1, E2 y E3.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de los adultos de *Artemia* enriquecidos utilizando EPAX 4510TG; EPAX 1050TG; EPAX 3; y sin enriquecimiento.

	Epax 1	Epax 2	Epax 3	Sin E
16:0	9.1 ± 0.4 ^a	8.3 ± 1.5 ^a	15.1 ± 0.8 ^b	10.7
18:0	10.9 ± 0.3 ^b	8.5 ± 2.0 ^a	7.3 ± 1.1 ^a	11.2
16:1n-7	7.7 ± 0.8 ^a	7.8 ± 1.5 ^a	10.0 ± 0.4 ^b	13.4
18:1n-9	13.7 ± 0.7 ^a	10.4 ± 2.1 ^a	12.3 ± 0.3 ^a	9.9
18:1n-7	14.4 ± 1.0 ^b	12.3 ± 3.2 ^b	9.7 ± 1.5 ^a	15.7
18:2n-6	4.6 ± 0.3	4.3 ± 1.0	3.3 ± 0.6	5.4
18:3n-3	2.6 ± 0.2	2.5 ± 0.5	2.0 ± 0.3	3.4
20:4n-6	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.2 ± 0.4	2.5
20:5n-3	23.6 ± 2.3 ^b	17.9 ± 0.4 ^a	19.3 ± 0.6 ^{ab}	18.4
22:6n-3	2.4 ± 1.0 ^a	14.8 ± 10.6 ^b	7.7 ± 1.3 ^b	0.2
∑ SAT	23.7 ± 0.9 ^{ab}	20.9 ± 3.9 ^a	28.8 ± 0.6 ^b	28.0
∑ MUFA	38.2 ± 2.4	33.8 ± 6.3	34.0 ± 1.5	39.9
∑ PUFA	37.5 ± 3.3	44.6 ± 10.2	36.4 ± 1.5	31.4
∑ HUFA	29.4 ± 3.4	36.9 ± 11.9	30.2 ± 2.2	21.5
∑ n-6	7.9 ± 0.1	7.0 ± 1.4	5.8 ± 0.7	8.9
∑ n-3	29.6 ± 3.3	37.6 ± 11.6	30.6 ± 1.8	22.5
n-3/n-6	3.8 ± 0.5	5.7 ± 2.9	5.3 ± 0.9	2.5
22:6/20:5	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.6	0.4 ± 0.1	0.0

Del tratamiento control, es decir de la *Artemia* sin enriquecimiento, sólo se tomó una muestra, por lo que quedó excluida de los análisis de varianza no paramétricos (Kruskal-Wallis). Dentro

de estos análisis se obtuvo diferencia estadísticamente significativa para la concentración de SAT entre los tratamientos E2 (20.9 %) y E3 (28.8 %) ($F = 6.4$; $P < 0.05$). Para los ácidos grasos MUFA ($F = 1.19$; $P = 0.4$), PUFA ($F = 1.5$; $P = 0.3$), HUFA ($F = 1.3$; $P = 0.4$), no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos Epax1, Epax2 y Epax3.

En el caso de los adultos, no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de ácido araquidónico (ARA), siendo en todos los tratamientos (incluido el control) menor a 3 %. En cambio sí se obtuvo diferencia significativa en para la concentración de los otros dos HUFA de importancia: EPA y DHA. En lo que respecta al primero de estos la concentración relativa osciló entre 17.9 y 23.6 %, para los tratamientos Epax2 y Epax1, respectivamente, con diferencias significativas entre los extremos. Por su parte la concentración relativa de DHA en los adultos de *Artemia* resultó de 0.2 % en el tratamiento sin enriquecimiento, de 2.4 % en Epax1, de 7.7 % en Epax3 y de 14.8 % en Epax2, con diferencias significativas entre Epax1 y los otros dos (Tabla 10).

IV.4 Discusión y conclusiones.

Tanto los adultos como los nauplios de *Artemia* presentaron poca variación con respecto al 20:4n-6 (ARA) entre los tratamientos, en todos los casos siendo menor a 3%. Esta concentración de ARA, corresponde con la baja concentración de este ácido graso en todas las emulsiones utilizadas (con excepción de la emulsión Epax2). Incluso, es notable que utilizando la Epax2, con un contenido de ARA de 9.9% (Tabla 8), el contenido de este ácido graso en los nauplios enriquecidos con esta emulsión resultó igualmente bajo. Este bajo contenido de ARA corresponde con lo encontrado en otros procedimientos de enriquecimiento de nauplios de

Artemia (Figuereido et al., 2009; Haché y Plante, 2011) y posiblemente indique una estricta regulación de este ácido graso en *Artemia*.

En relación con el EPA, se encontró una diferencia importante entre los nauplios y los adultos sin enriquecer (Fig. 17), la cual puede ser debida a la previa alimentación de *Artemia* adulta en los estanques naturales donde fue criada. En los nauplios sin enriquecimiento la concentración de EPA resultó menor a 3 % (ver capítulo V de experimento de dietas), pero en los nauplios enriquecidos su concentración aumentó significativamente, de manera proporcional al contenido de EPA en los diferentes productos enriquecedores. Así, en los nauplios enriquecidos con aceite de Canola (que carece de EPA), el contenido de EPA no varió de manera significativa al de los nauplios sin enriquecimiento, y la mayor concentración de este ácido en los nauplios se presentó en el tratamiento E1, cuya emulsión tiene el contenido más elevado de EPA (Tabla 9).

Por otro lado, el enriquecimiento de adultos con EPA únicamente se vio reflejado en el tratamiento Epax1, ya que en los otros dos tratamientos (Epax2 y Epax3) su concentración no fue distinta al tratamiento control (Fig. 17), lo cual refleja que se necesitan concentraciones elevadas de este ácido graso en los enriquecedores (cerca al 50 %) con el fin de aumentar su concentración en adultos de *Artemia*.

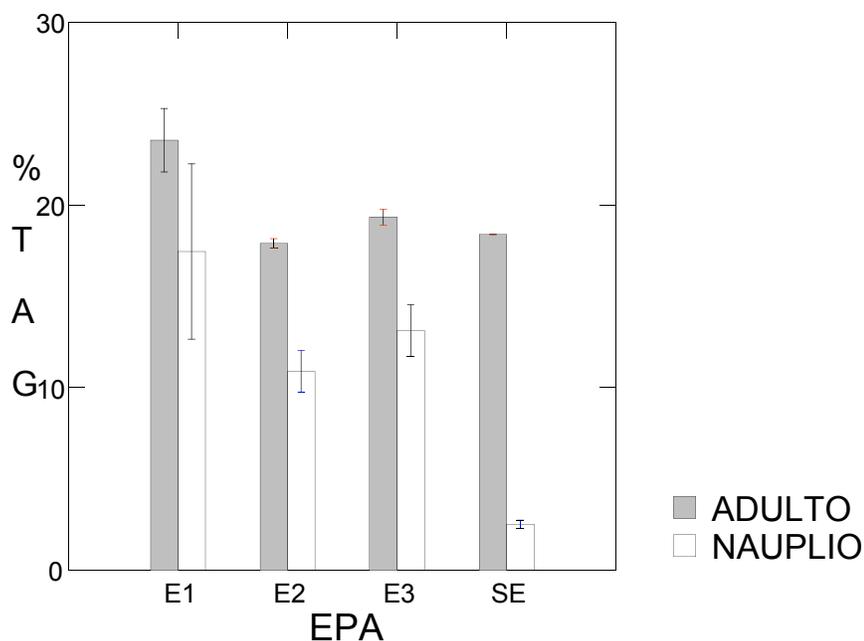


Figura 17. Composición relativa de EPA en adultos y nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento y sometidos a 3 diferentes enriquecedores (E1: EPAX 4510TG; E2: EPAX 1050TG; E3: Epax 3) (media + E.S.).

El DHA presentó variaciones importantes en los resultados de enriquecimiento utilizando los diferentes productos. Como se ha mencionado anteriormente, en este trabajo se comprueba que el contenido de este ácido graso en nauplios de *Artemia* es prácticamente nulo de manera natural, y se determina que lo mismo sucede con adultos que se puede decir que han tenido una alimentación natural. En cuanto a las emulsiones Epax1, Epax2 y Epax3, los resultados de enriquecimiento son más o menos proporcionales con las concentraciones en las mismas emulsiones, presentándose el menor contenido en los nauplios de Epax1 y la mayor en los de Epax2 (Tabla 9). Es interesante destacar que para estas tres emulsiones los resultados de enriquecimiento de DHA son muy similares entre adultos y nauplios, lo que podría hacer pensar

que los procesos metabólicos que involucran a este ácido graso son similares entre las diferentes etapas de desarrollo de *Artemia* (Fig. 18).

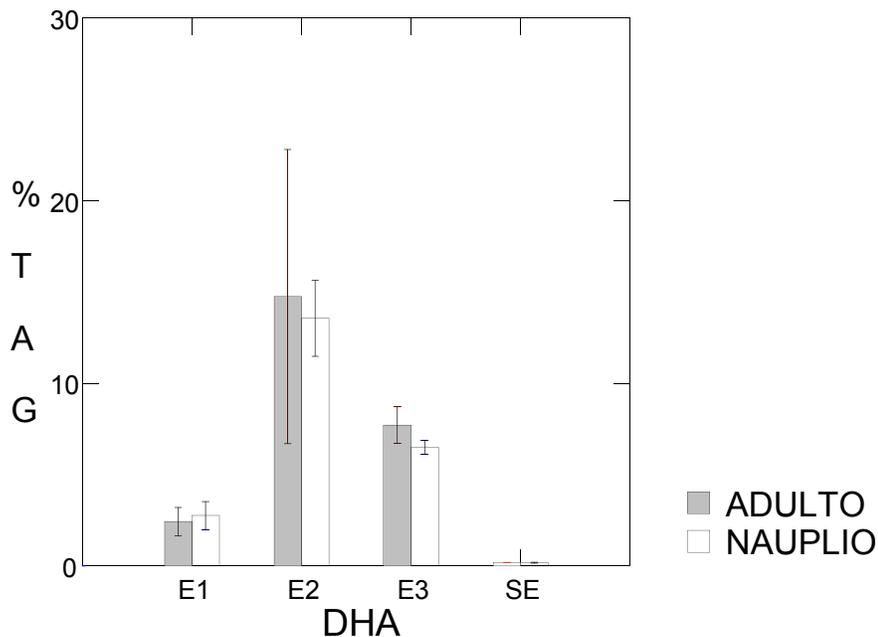


Figura 18. Composición relativa de DHA en adultos y nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento (SE) y sometidos a 3 diferentes enriquecedores (E1: EPAX 4510TG; E2: EPAX 1050TG; E3: Epax 3) (media + E.S.)

Otro resultado que debe destacarse es que con la Epax2 (Epax1050TG) cuyo contenido de DHA se encuentra entre 61 y 65% se obtuvo un enriquecimiento de DHA en nauplios muy similar al obtenido con la emulsión E4 (DHA Protein Selco) cuyo contenido de este ácido es de apenas 14.4%. Esto puede ser debido, por un lado, al tipo de presentación en la que vienen los ácidos grasos en los productos, las emulsiones de la marca comercial EPAX en este caso vienen como triglicéridos, los cuales se ha visto que son menos digeribles para *Artemia* que los metil esterés a

los cuales viene unido el DHA normalmente en emulsiones para enriquecimiento (Navarro et al., 1999), como DHA Protein Selco.

Por otro lado también puede ser importante la razón de las concentraciones de DHA/EPA en las emulsiones, por la posible interferencia metabólica que se ha visto que existe entre estos ácidos grasos, principalmente en los que respecta a las enzimas que los esterifican en las estructuras base de los fosfolípidos en algunos peces (Sargent et al, 1999; Izquierdo et al., 2001; Copeman et al., 2002; Haché y Plante, 2011). Una competencia similar puede ocurrir en *Artemia*, y mayores razones DHA/EPA pueden facilitar la incorporación de DHA durante el proceso de enriquecimiento, ya que en el presente trabajo la razón DHA/EPA fue de 3.5 en Epax2 y de 2.0 en Selco, valores muy superiores a los encontrados en Epax1 y Epax3 (0.3 y 0.6 , respectivamente) (Tabla 9).

Haché y Plante (2011) mencionan que el nivel de DHA en *Artemia* es particularmente difícil de incrementar a través del uso de cualquier proceso de enriquecimiento. Esto puede ser explicado por los siguientes factores: 1) *Artemia* naturalmente contiene un elevado contenido de lípidos y en particular, de triglicéridos; 2) los ácidos grasos estructurales de *Artemia* tienen un pobre valor nutricional; 3) los nauplios no enriquecidos tienen un contenido relativamente elevado de EPA; y probablemente la causa más importante de todas 4) ocurre una rápida retroconversión oxidativa de DHA en EPA por parte de *Artemia* (Navarro et al., 1999; Han et al., 2001; Haché y Plante, 2011). Esto concuerda con los resultados obtenidos aquí en relación al bajo enriquecimiento con DHA (incluso con una emulsión con más del 60% de este ácido graso), posiblemente por retroconversión a EPA en caso de Epax 2, y de una mejor acumulación de DHA en forma de metil ésteres (en el caso de Selco), que no requieren ser hidrolizados enzimáticamente en el tracto digestivo, a diferencia de los triglicéridos, por lo que pueden ser acumulados más

rápidamente en los tejidos. Asimismo, estos dos procesos concuerdan con un metabolismo de lípidos en la *Artemia* y no con la acumulación simple de emulsión en el tracto digestivo (usar a la *Artemia* como bioencapsulante) o la impregnación externa de la *Artemia*. Por otro lado, la similitud que presentan los adultos y los nauplios de *Artemia* en relación al enriquecimiento nos indica una capacidad metabólica de lípidos desde la etapa de nauplios en esta especie. A nivel práctico, este estudio nos proporciona una base de enriquecimiento usando *Artemia* para lograr incrementar los HUFA en los caballitos, siempre y cuando se use una emulsión rica en DHA y en particular, con una proporción dos veces mayor de DHA que de EPA.

V. DESEMPEÑO DE JUVENILES DE *Hippocampus erectus*, PERRY, 1810, ALIMENTADOS CON DIETAS CON DIFERENTE COMPOSICIÓN DE HUFA.

V.1 Introducción.

Los caballitos de mar tienen una baja fertilidad, estructuras sociales definidas (monogamia estricta demostrada en muchas especies), baja movilidad, reducidos rangos de hogar, distribución limitada, y una estrecha asociación con el hábitat, características que causan que sus poblaciones sean muy vulnerables al impacto humano en la zona costera que ellos habitan (Foster y Vincent, 2004; Vincent et al., 2005). Las poblaciones de *H. erectus* en el Golfo de México se encuentran afectadas principalmente por la pesca incidental (Baum et al., 2003), pero también por la degradación del hábitat y su captura para comercio. Entre las medidas de protección propuestas se encuentran su restricción para el comercio de especímenes silvestres (incluidos en CITES: Convención Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre, Apéndice II), establecimiento de zonas de protección, educación ambiental para despertar el interés de la población de zonas costeras, y más recientemente, la implementación de proyectos de acuicultura. El cultivo de caballito de mar puede ser una solución parcial para reemplazar la captura de animales silvestres y proveer de una oportunidad de actividad económica a pobladores de la zona costera en países en desarrollo (Payne y Ripplingale, 2000; Job et al., 2006; Koldewey y Martin-Smith, 2010). Se han llevado a cabo esfuerzos sustanciales para desarrollar una tecnología adecuada para cultivar diferentes especies de caballito de mar en diferentes partes del mundo (Wilson y Vincent, 1998; Woods, 2000; Job et al., 2006; Lin et al., 2008; Planas et al., 2008). Sin embargo, uno de los cuellos de botella para el desarrollo de la industria del cultivo de caballito de mar es todavía la baja sobrevivencia de juveniles, frecuentemente atribuida a una inadecuada nutrición de los reproductores y los mismos juveniles.

Los caballitos de mar son gestados por el padre. Dentro del marsupio del macho se desarrolla el estadio larval, por lo que, cuando los caballitos nacen, son una réplica en miniatura de un adulto. Esto representa una considerable ventaja para la acuicultura, debido a que, contrariamente de la mayoría de las especies de peces marinos cultivados, los caballitos recién nacidos tienen una boca relativamente grande; en el caso de *H. erectus*, los juveniles pueden ser alimentados con metanauplios de *Artemia*, evitando la necesidad de otras presas vivas. Una ventaja adicional del uso de metanauplios de *Artemia* es que éstos pueden ser fácilmente enriquecidos utilizando aceites enriquecidos y emulsiones (Leger et al., 1986). El enriquecimiento de *Artemia* para alimentar caballitos de mar juveniles es importante, debido a que no se sabe si los caballitos de mar juveniles pueden sintetizar ácidos grasos altamente insaturados de cadenas larga (HUFA) a partir de precursores de cadena más corta (PUFA). La mayoría de los peces marinos estudiados hasta la fecha no pueden sintetizar HUFA, y los peces dulceacuícolas que pueden, no son capaces de hacerlo en los estadios tempranos del desarrollo larvario (Sargent et al., 2002). Reproductores de *H. hippocampus* alimentados con una dieta carente de DHA (22:6n-3) producen recién nacidos que tienen 7% de DHA, comparado con 16% en los recién nacidos provenientes de reproductores alimentados con misidáceos, que tienen más DHA (Otero-Ferrer et al., 2012).

Los caballitos de mar recién nacidos tienen elevados niveles de HUFA, particularmente DHA, con niveles por encima del 20% relativo a los ácidos grasos totales en *H. kuda* (Saavedra et al., 2013) y niveles de 16-17% para *H. guttulatus* (Faleiro y Narciso, 2001, 2013) (ver también Capítulo III). Estos elevados niveles de DHA decrecen conforme los juveniles crecen si se les proporciona una dieta con niveles bajos de DHA, como es el caso de los nauplios de *Artemia* no enriquecida, y este decremento ha sido asociado con un decremento en la sobrevivencia (Chang y

Southgate, 2001; Shapawi y Purser, 2003; Wong y Benzie, 2003), con excepción de los juveniles de *H. guttulatus*, los cuales parece que no van bien cuando son alimentados con metanauplios de *Artemia* enriquecida (Palma et al., 2011). Consecuentemente la mayoría de los estudios utilizan metanauplios de *Artemia* enriquecida como un estándar para el cultivo de juveniles de caballito de mar. (Chang y Southgate, 2001; Lin et al., 2008; Olivotto et al., 2008; Hora y Joyeux, 2009; Otero-Ferrer et al., 2010). Woods (2003) encontró un crecimiento y sobrevivencia significativamente mejores en *H. abdominalis* alimentados con dietas conteniendo 13 y 8 % de DHA (concentración relativa) comparado con una dieta con 4% de DHA. Chang y Southgate (2001) encontraron que juveniles crecen mejor cuando son alimentados con metanauplios de *Artemia* enriquecidos con 8% de DHA, comparados con dietas con 4 y 6% de DHA. No se han realizado estudios nutricionales en *H. erectus*, sin embargo si al apreocer entre mayor es el contenido de DHA en la dieta, mejor es el desempeño de juveniles de otras especies, aquí se probó una emulsión que tiene un exceso de DHA y se comparó con una emulsión comercial estándar para peces. También se incluyó un tratamiento isolipídico pero sin DHA para probar si el efecto positivo de la emulsión no es el resultado de una ingesta incrementada en calorías, y finalmente, se usó una dieta a base de los tradicionales metanauplios de *Artemia* no enriquecidos para fines de comparación, con este y otros estudios.

V.2 Materiales y métodos.

Origen de los juveniles.

Se capturaron tres machos silvestres preñados (*Hippocampus erectus*) en la Laguna de Chelem, Yucatán, México, entre los 21°15'-21°17'N y los 89°39'-89°48'W (bajo permiso oficial de SEMARNAT "SGPA/DGVS/03153/10"). Los caballitos de mar fueron transferidos (no más de dos horas después de su captura) a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación,

UNAM, Sisal, Yucatán, México. Hasta el momento del parto (1-5 días), los caballito de mar preñados fueron mantenidos en acuarios de vidrio de 100 L (70x50x30 cm) conectados en un sistema de recirculación. La temperatura fue mantenida a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, la salinidad a 33-36 ppm, el pH a 8.1-8.3, $\text{NO}_2^- < 0.3 \text{ mg/L}$, $\text{NO}_3^- < 5 \text{ mg/L}$, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+ < 0.1 \text{ mg/L}$, y fotoperiodo 12:12. Los acuarios fueron limpiados diariamente. Dentro de los tanques se colocaron estructuras de malla plástica para facilitar el anclaje de los caballitos. Los adultos fueron alimentados *ad libitum* dos veces al día con *Artemia* adulta viva, con una composición típica de ácidos grasos: alto en ácido eicosapentaenólico (EPA) (18.4 %), 18:1n-7 (15.7%), 16:1n-7 (13.4%), 18:0 (11.0%), 16:0 (10.7%), 18:2n-6 (5.4%), 18:3n-3 (3.4%), y ácido araquidónico (ARA) (2.5%), sin DHA.

Se utilizaron tres camadas provenientes de los tres machos preñados (370 juveniles por camada en promedio), nacidos con una diferencia de tres días entre la primera y la tercera camada. Al tiempo del nacimiento los juveniles midieron $11.3 \pm 0.2 \text{ mm}$ (altura) y su composición relativa de ácidos grasos fue (solo se muestran valores por arriba de 1%): 16:0 = 11.9 ± 0.82 , 18:0 = 9.0 ± 0.6 , 16:1n-7 = 2.4 ± 0.3 , 18:1n-9 = 6.0 ± 2.9 , 18:1n-7 = 4.3 ± 0.3 , 18:2n-6 = 1.6 ± 0.3 , ARA = 8.8 ± 0.6 , EPA = 7.1 ± 1.1 and DHA = 22.9 ± 2.7 . Total de ácidos grasos saturados (SFA) = 28.9 ± 1.2 , ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) = 21.1 ± 2.1 , y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) = 48.7 ± 1.4 . La razón n-3/n-6 fue = 2.6 y la razón DHA/EPA fue = 3.3.

Diseño experimental

Para el experimento se utilizaron tres tratamientos y un control para probar la sobrevivencia y el crecimiento durante dos meses. Es bien sabido que aunque los niveles de DHA sean altos en las emulsiones, éstos tienden a decrecer en los metanauplios enriquecidos, probablemente debido a la retroconversión de ácidos grasos (Navarro et al., 1999; Han et al., 2001; Palacios et al., 2004).

Debido a que se pretendía incrementar los niveles de DHA suministrados a los juveniles de caballito de mar, se utilizó una emulsión comercial diseñada para el consumo humano conteniendo más de 60% de DHA, comparado con 10-15% de DHA generalmente presente en las emulsiones diseñadas para peces. El tratamiento control consistió en metanauplios de *Artemia* sin enriquecimiento. De esta manera, se utilizaron dos emulsiones comerciales ricas en HUFA con diferente concentración de DHA. Una de ellas es desarrollada para el enriquecimiento de presas vivas para peces marinos (DHA-ProteinSelco® INVE, Belgium), que en lo subsecuente se denominará simplemente Selco (ARA = 0.7%, EPA = 7.2%, DHA = 14.4%), y la otra recomendada para incrementar omega-3 en humanos (EPAX 1050TG-EPAX Norway, AS), la cual se nombrará como Epax (ARA = 9.2%, EPA = 18.2%, DHA = 63.3%). Estas dos emulsiones con un contenido de DHA/EPA > 2 (Tabla 8), fueron las que mejores resultados dieron en el capítulo anterior, donde se enriquecieron nauplios de *Artemia*, lográndose un enriquecimiento de 13 % de DHA y de 10 % de EPA. Un tercer tratamiento consistió en aceite de canola, rico en PUFA omega-3, específicamente 18:2n-6 = 20% y 18:3n-3 = 9%, pero carente de HUFA omega-3, el cual se utilizó para tener un control isolipídico en relación a las emulsiones, pero sin HUFA. El aceite de canola y EPAX fueron emulsificados en agua marina utilizando una licuadora; Selco es comercializado listo para ser utilizado en agua de mar. Los nauplios de *Artemia* fueron enriquecidos dos veces, la primera de ellas 24 hrs después de la eclosión y la segunda de ellas 24 hrs después de la primera, los nauplios fueron cosechados 2 hrs después, es decir 26 hrs después del primer enriquecimiento. Este doble enriquecimiento se determinó, en observaciones previas, que fue el más adecuado para elevar los niveles de HUFA en los nauplios. La composición bioquímica y de ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento y después de éste, fueron analizados en el Centro de Investigaciones Biológicas

del Noroeste, CIBNOR, La Paz, B.C.S., México, utilizando la metodología propuesta por Palacios et al. (2007), y los resultados se presentan en las tablas 1 y 2.

Juveniles de *H. erectus* (n=720) (7-11 días de edad), provenientes de tres machos silvestres (240 caballitos por camada) fueron distribuidos en 12 acuarios de la siguiente manera: 60 caballitos por acuario, tres acuarios por cada tratamiento isolipídico (3 tratamientos y el control). Es decir que cada uno de los 4 tratamientos de dietas (incluyendo el control) se aplicó a cada una de las tres camadas por separado.

Control (TC): nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento.

T1: nauplios de *Artemia* con aceite de canola emulsificada.

T2: nauplios de *Artemia* enriquecidos con Selco.

T3: nauplios de *Artemia* enriquecidos con EPAX.

Los acuarios de vidrio de 100 L (70A x 50L x 30A cm) se encontraban conectados a un sistema de recirculación de 6 acuarios, y cada uno de los dos sistemas se encontraba conectado a un reservorio de 150 L con filtración física, química y biológica (Fig. 19). Los parámetros fisicoquímicos en el agua de los acuarios fueron los siguientes: temperatura: $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, salinidad: 33-36 ‰, pH: 8.1-8.3, $\text{NO}_2^- < 0.3\text{mg/L}$, $\text{NO}_3^- < 5\text{mg/L}$, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+ < 0.1\text{mg/L}$.

Los juveniles bajo experimentación fueron alimentados con las dietas dos veces al día a las 10:00 y 17:00 horas a razón de 1 nauplio/mL. Dos horas después de la alimentación, el alimento restante y las heces fueron retiradas del acuario mediante sifón. La mortalidad de caballitos fue registrada diariamente. Previo al experimento, a una muestra de 20 caballitos de cada camada se le registró su peso y altura, lo mismo se hizo con muestras de 20 caballitos por acuario a los 15, 30 y 60 días de experimento. Considerando las mediciones provistas por Foseter y Vincent

(2004), se eligió la altura (HT) en lugar de la longitud estándar para minimizar el estrés en los peces. Se calculó el índice de condición de Fulton K como sigue:

$$K = 100 \times WW \text{ (g)} / HT \text{ (cm}^3\text{)} \text{ (Zhang et al., 2011).}$$



Figura 19. Juveniles de *H. erectus* dentro de uno de los acuarios donde se realizó el experimento.

Análisis bioquímico y de ácidos grasos.

Para los análisis bioquímicos y de ácidos grasos, se muestrearon 10 caballitos por camada antes del experimento, y 10 caballitos por acuario a los 30 y 60 días, manteniendo las muestras a -80°C hasta que los análisis fueron realizados en el CIBNOR. El experimento concluyó después de 60 días.

Los análisis de proteínas totales, carbohidratos totales, y lípidos totales, fueron realizados en muestras liofilizadas, utilizando para ello 0.1 g de muestra fresca. Para alcanzar este peso, en las muestras tomadas antes del experimento se agruparon 3-4 organismos por muestra. Los juveniles muestreados a los 30 y 60 días fueron analizados individualmente. Las muestras liofilizadas fueron homogenizadas en 1.0 mL de solución salina (NaCl 35%) utilizando un Polytron. Los

carbohidratos totales fueron analizados a 620 nm con el método de antrona (Van Handel, 1965), utilizando dextrosa como estándar.

Los ácidos grasos fueron determinados utilizando el método descrito para peces por Palacios et al. (2007), con ciertas modificaciones para caballito de mar, como se detalla en el Anexo 1.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza anidado (ANOVA) para evaluar las diferencias en el crecimiento (mm), peso (mg), la composición bioquímica (carbohidratos, lípidos y proteínas: $\text{mg g}^{-1}\text{dw}$) y de ácidos grasos (5 del total de ácidos grasos) entre los tratamientos de dietas (factor fijo con 4 niveles) y el tiempo (factor fijo con 3 niveles), y usando las tres diferentes camadas anidadas en el tratamiento de dieta. Los datos obtenidos como porcentaje fueron transformados a arcoseno para el análisis, pero se presentan únicamente los datos no transformados, para favorecer la interpretación de los mismos en términos biológicos. Cuando se presentaron diferencias significativas, se aplicó una prueba de Tukey de comparaciones de medias. El intervalo de confianza utilizado para todas las pruebas estadísticas fue 0.95. Todos los resultados son expresados como media \pm error estándar. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando StatisticaTM v. 6.0.

V.3 Resultados.

Sobrevivencia y crecimiento de juveniles.

La sobrevivencia de los juveniles alimentados con los 4 tratamientos de dietas durante 60 días se presenta en la Fig. 20. Una alta mortalidad se presentó desde la segunda semana en el tratamiento con aceite de canola (Fig. 20A). Un decremento más gradual se presentó para el tratamiento control (nauplios no enriquecidos) y el enriquecido con EPAX.

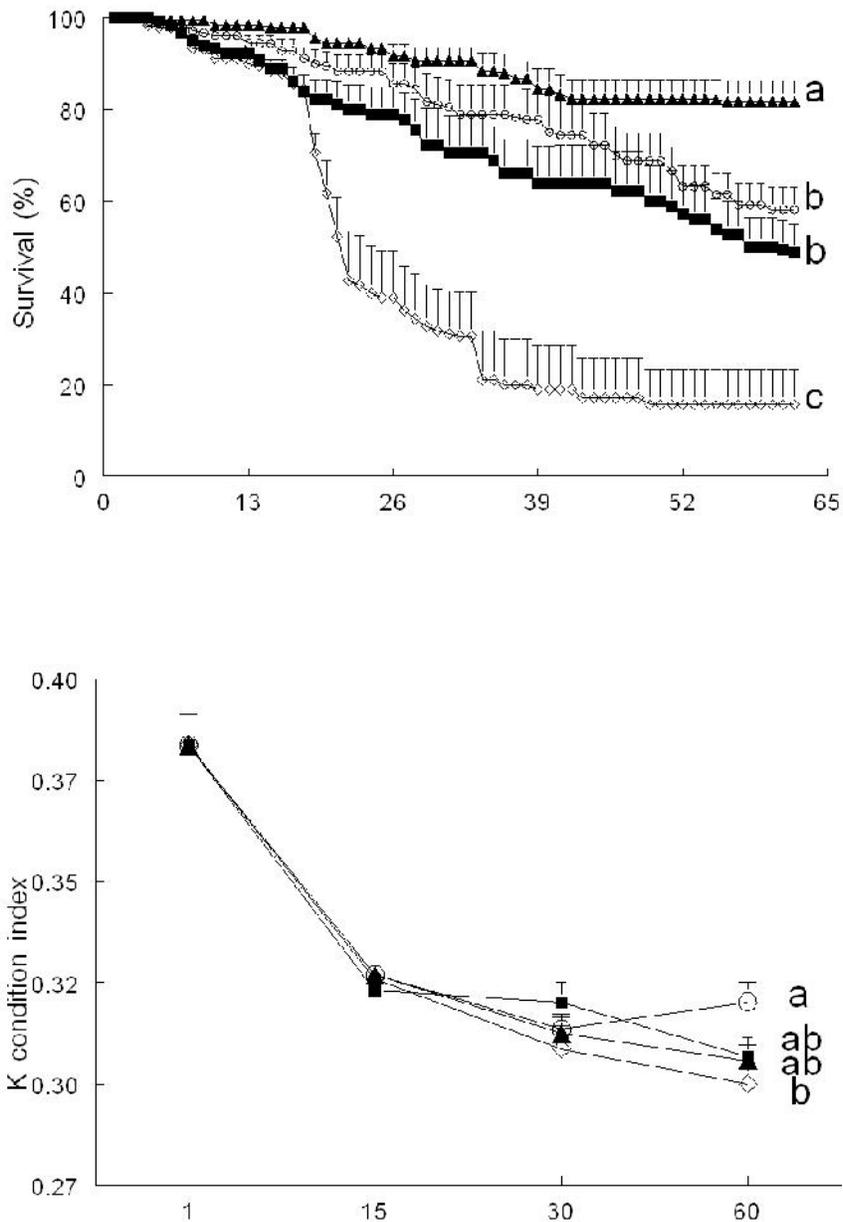


Figura 20. A. Sobrevivencia diaria (%) de juveniles de *H. erectus* durante los 60 días de experimento. B. Índice de condición de Fulton K en juveniles de *H. erectus* durante los tratamientos. Cuadrados negros = *Artemia* sin enriquecimiento (TC); Rombos blancos = *Artemia*+Aceite de Canola; Triángulos blancos = *Artemia*+Selco; Círculos blancos = *Artemia*+EPAX.11B. Barras negras = 0 días; barras grises = 30 días; barras blancas = 60 días. Letras diferentes indican diferencia entre los tratamientos y días de cultivo.

No se presentaron diferencias en la sobrevivencia entre los caballitos del tratamiento control, Selco y EPAX, después de 30 días de tratamiento, pero los de canola tuvieron una sobrevivencia significativamente menor comparada con Selco. Después de 60 días, la mayor sobrevivencia se presentó en los caballitos del tratamiento con Selco (82%), seguidos por los del EPAX (58%), posteriormente los del tratamiento de metanauplios sin enriquecimiento(49%), y la sobrevivencia más baja se presentó en los enriquecidos con canola (16%) (Fig. 20B).

El índice de condición resultó más alto en los caballitos al inicio del experimento (0.38), finalizando, después de 60 días, con 0.32 en el tratamiento de EPAX y un mínimo de 0.30 en caballitos alimentados con el tratamiento de Canola (Fig. 20B).

El crecimiento de los caballitos de mar juveniles se vio significativamente afectado por los tratamientos después de 60 días (Fig. 21A). El peso fue similar entre tratamientos al inicio del experimento, pero después de 30 días, los caballitos alimentados con aceite de canola ganaron algo de peso (41 mg), pero resultaron menores que los caballitos del TC (69 mg), EPAX (91 mg) y Selco (106 mg). Al final del experimento (60 días), el peso fue mucho menor en el tratamiento con canola (108 g), similar al peso alcanzado por los caballitos alimentados con el Selco en la mitad del tiempo (30 días), el peso en TC fue de 141 mg, en EPAX fue de 231 mg y en Selco de 249 mg.

La altura siguió una tendencia similar a la del peso; con diferencias comenzando a los 30 días siendo los caballitos de canola menores (24 mm) que los del TC (28 mm), y ambos siendo menores que EPAX (31 mm) y Selco (32 mm), estos dos últimos siendo similares entre sí. Después de 60 días de tratamiento, los caballitos del TC alcanzaron 36 mm y los de canola 33 mm, ambos significativamente distintos de Selco con 43 mm y EPAX con 42 mm (Fig. 21B). Así, la tasa de crecimiento después de 60 días de tratamiento fue mayor en dietas ricas en HUFA

(Selco = 0.47 ± 0.15 mm/día y EPAX = 0.43 ± 0.15 mm/día, en comparación con las dietas deficientes en HUFA (CT = 0.32 ± 0.13 mm/día y canola = 0.24 ± 0.09 mm/día).

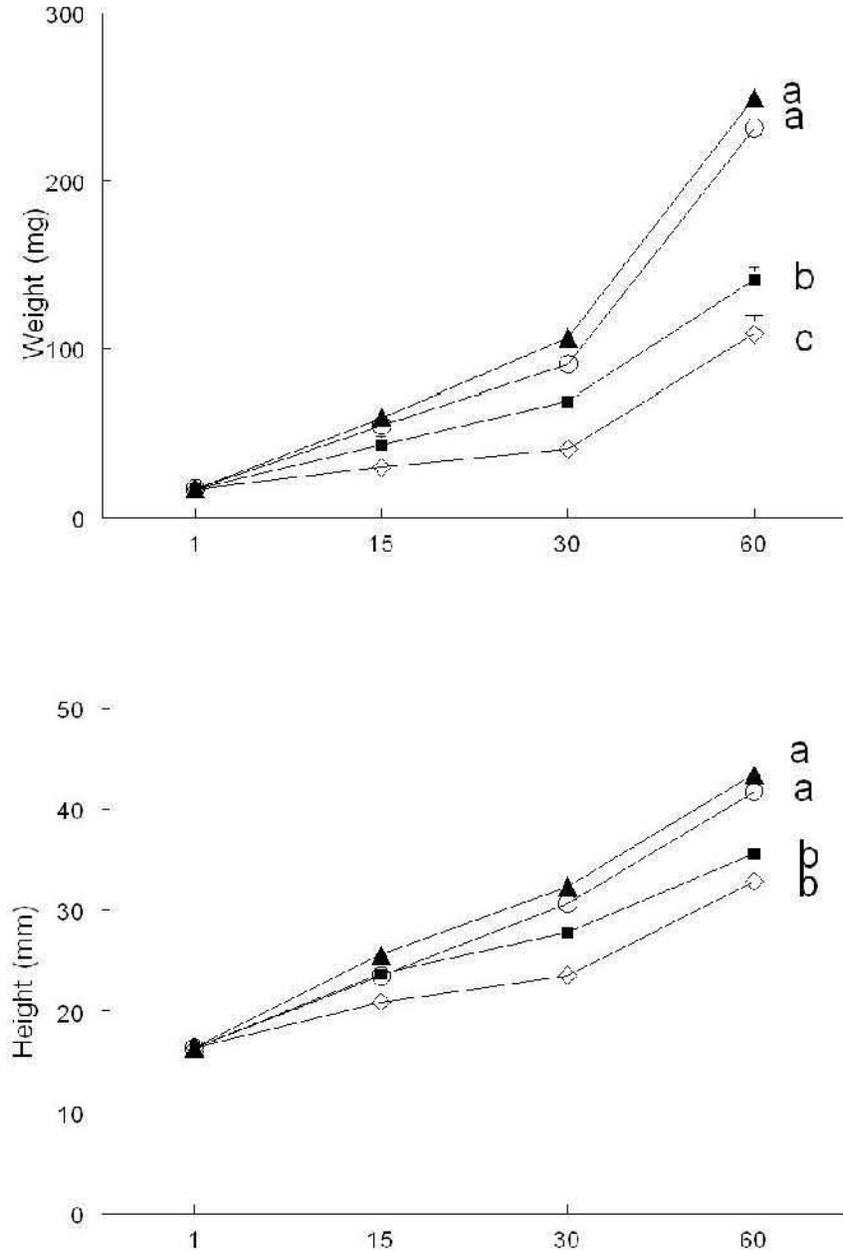


Figura 21. Crecimiento de juveniles de *H. erectus* en peso (A) y longitud (B) después de 15, 30 y 60 días de tratamiento. TC=*Artemia* sin enriquecimiento (cuadrados negros); T1=*Artemia*+Aceite de Canola (rombos blancos); T2=*Artemia*+Selco (triángulos negros); T3=*Artemia*+EPAX (círculos blancos).

Composición bioquímica.

La concentración de proteínas totales en los nauplios de *Artemia* fue máxima en el tratamiento sin enriquecimiento, y mínima en Selco, con valores intermedios para EPAX y Canola (Tabla 11). La concentración de carbohidratos también fue más elevada en metanauplios no enriquecidos, con los niveles más bajos en EPAX. Los lípidos totales fueron significativamente menores en TC, como se esperaba de los nauplios no enriquecidos.

Los juveniles de caballito de mar al inicio del experimento tuvieron niveles de proteína similar comparados con los nauplios de *Artemia* (Tabla 12). Después de 30 y 60 días de tratamiento, los niveles de proteína fueron similares entre los tratamientos, aunque menores que en los mismos caballitos al inicio del experimento (Tabla 12).

Tabla 11. Niveles bioquímicos ($\text{mg g}^{-1}\text{dw}$) (media \pm error estándar) en nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento y enriquecida con aceite de canola Selco y EPAX. Los nauplios de *Artemia* fueron analizado utilizando un ANOVA de una vía. Letras distintas en el mismo renglón denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) en nauplios, analizados por pruebas de Tukey *a posteriori*.

	S/E	Canola	Selco	EPAX
Carbohidratos	31.9 \pm 10.9 b	21.8 \pm 4.4 ab	20.2 \pm 8.5 ab	17.9 \pm 6.3 a
Proteínas	393 \pm 60.7 b	315 \pm 37.8 ab	305 \pm 54.5 a	338 \pm 45.3 ab
Lípidos	191 \pm 48.4 a	234 \pm 71.9 bc	298 \pm 88.7 c	218 \pm 62.8 bc

Los lípidos en los caballitos al inicio del experimento fueron al menos la mitad de la concentración que en nauplios de *Artemia* (Tabla 11 y 12). Los lípidos alcanzaron un pico a los 30 días en el tratamiento con aceite de canola, pero después de 60 días no se presentaron diferencias entre los tratamientos (Tabla 13).

Tabla 12. Niveles bioquímicos (mg g⁻¹dw) (media ± error estándar) en juveniles de *H. erectus* provenientes de 3 camadas. Se aplicó un ANOVA de una vía para determinar diferencias. La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas.

	Camada A	Camada B	Camada C
Carbohidratos	3.00 ± 0.32	2.70 ± 0.22	3.38 ± 0.48
Proteínas	263.2 ± 6.60	378.7 ± 38.4	331.0 ± 51.4
Lípidos	74.9 ± 4.71	64.9 ± 3.98	70.9 ± 0.89

Los niveles de carbohidratos en los caballitos fueron de 6 a 10 veces menores que en los nauplios de *Artemia* al inicio del experimento. Después de 30 días aumentaron en los caballitos del tratamiento EPAX, pero posteriormente decrecen a los mismos niveles que en tratamiento sin enriquecimiento. Después de 60 días, los carbohidratos presentaron un pico en Selco (Tabla 13).

Tabla 13. Niveles bioquímicos (mg g⁻¹ww) en 3 camadas de *H. erectus* después de comer *Artemia* enriquecida por 30 y 60 días. Se utilizó un ANOVA de dos vías anidado para analizar diferencias entre día (D), camadas anidadas en los tratamientos (B), y tratamientos (T).

	D	CT=NEA	T1=Canola	T2=Selco	T3=EPAX	ANOVA
Carbohidratos	30	5.0 ± 0.5 a	6.1 ± 0.4 ab	6.6 ± 0.7 ab	12.0 ± 1.1 c	D < 0.01
	60	4.8 ± 0.5 a	4.2 ± 0.6 a	8.8 ± 1.0 bc	5.8 ± 0.5 ab	B = NS T < 0.01
Proteínas	30	223.7 ± 24.6	265.3 ± 22.3	184.6 ± 12.2	192.4 ± 14.5	D = NS
	60	222.0 ± 17.3	176.6 ± 20.1	176.6 ± 12.5	191.0 ± 11.8	B < 0.05 T = NS
Lípidos	30	67.1 ± 3.7	90.8 ± 10.5 b	64.0 ± 4.0	64.5 ± 6.0	D = NS
	60	63.5 ± 8.3	58.6 ± 11.8	74.9 ± 8.0	63.3 ± 4.3	B = NS T = NS

Ácidos grasos.

Los nauplios no enriquecidos (TC) y los enriquecidos con aceite de canola presentaron trazas de DHA como se esperaba (Tabla 14), mientras que en los nauplios de Selco y EPAX la proporción de este ácido graso fue similar 9 % y 13.2 % (respectivamente). En los nauplios de TC y canola la proporción de EPA fue menor a 2%, en Selco fue de 7.7% y en EPAX de 10.9%. La razón DHA/EPA más alta resultó en Selco y Epax (1.0-1.1) comparado con TC y canola (0.1). Los

nauplios de Canola presentaron la menor proporción de ARA (0.8% ARA), mientras que la mayor se presentó en Selco (1.6%).

Se esperaba que los niveles de 18:1n-9, 18:2n-6, y 18:3n-3 fueran elevados en Canola, lo cual resultó verdad para 18:1n-9 (36.7 %), casi el doble que en los otros tres tratamientos. El nivel de 18:2n-6 fue también el más elevado en Canola doblando los niveles en EPAX. Sin embargo, el nivel de 18:3n-3 resultó más elevado en los metanauplios no enriquecidos (29.8 % comparado con 19.3 % en Canola) (Tabla 14).

Tabla 14. Niveles ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) (media \pm error estándar) en metanauplios de *Artemia* sin enriquecimiento y enriquecida con aceite de canola Selco y EPAX. Ver tabla 13 para análisis estadístico.

	Control	Canola	Selco	EPAX
14:0	0.7 \pm 0.01 b	0.5 \pm 0.01 c	1.3 \pm 0.02 a	0.6 \pm 0.01 c
16:0	12.3 \pm 0.08 a	9.1 \pm 0.20 b	11.9 \pm 0.19 a	9.0 \pm 0.06 b
17:0	0.8 \pm 0.01 a	0.6 \pm 0.02 b	0.8 \pm 0.01 a	0.8 \pm 0.01 a
18:0	7.7 \pm 0.24 a	6.4 \pm 0.21 b	5.8 \pm 0.13 b	6.2 \pm 0.21 b
20:0	0.2 \pm 0.01 b	0.3 \pm 0.02 a	0.2 \pm 0.01 b	0.3 \pm 0.01 a
22:0	0.2 \pm 0.02 b	0.3 \pm 0.03 b	0.1 \pm 0.02 c	0.4 \pm 0.01 a
24:0	0.1 \pm 0.02 c	0.1 \pm 0.02 c	0.7 \pm 0.04 b	2.7 \pm 0.04 a
16:1n-7	2.4 \pm 0.06 b	1.7 \pm 0.06 d	4.0 \pm 0.04 a	2.0 \pm 0.04 c
18:1n-9	22.2 \pm 0.23 b	36.7 \pm 0.66 a	21.6 \pm 0.08 b	16.9 \pm 0.15 c
18:1n-7	8.6 \pm 0.07 a	7.6 \pm 0.21 b	6.2 \pm 0.15 d	6.8 \pm 0.11 c
20:1n-9	0.9 \pm 0.04 d	1.1 \pm 0.02 c	2.0 \pm 0.07 a	1.3 \pm 0.02 b
18:2n-6	6.8 \pm 0.04 c	10.5 \pm 0.24 a	7.5 \pm 0.04 b	4.5 \pm 0.07 d
18:3n-6	0.5 \pm 0.02 a	0.3 \pm 0.02 b	0.3 \pm 0.02 b	0.3 \pm 0.02 b
18:3n-3	29.8 \pm 0.31 a	19.3 \pm 0.57 b	15.9 \pm 0.44 c	18.5 \pm 0.39 b
20:3n-3	1.1 \pm 0.02 a	0.7 \pm 0.02 c	0.7 \pm 0.01 c	0.8 \pm 0.01 b
20:4n-6	0.9 \pm 0.13 b	0.8 \pm 0.14 b	1.6 \pm 0.08 a	1.1 \pm 0.09 b
20:5n-3	1.7 \pm 0.09 c	1.4 \pm 0.08 c	7.7 \pm 0.17 b	10.9 \pm 0.28 a
22:6n-3	0.1 \pm 0.01 c	0.1 \pm 0.04 c	9.0 \pm 0.43 b	13.2 \pm 0.17 a
Σ SAT	22.1 \pm 0.27 a	17.4 \pm 0.44 c	20.8 \pm 0.31 b	19.9 \pm 0.21 b
Σ MUFA	35.1 \pm 0.30 b	48.0 \pm 0.45 a	34.7 \pm 0.16 b	28.8 \pm 0.20 c
Σ PUFA	41.3 \pm 0.09 c	33.3 \pm 0.43 d	42.8 \pm 0.42 b	49.7 \pm 0.18 a
n-3/n-6	3.9 \pm 0.10 b	1.8 \pm 0.05 d	3.5 \pm 0.03 c	7.2 \pm 0.12 a
DHA/EPA	0.1 \pm 0.01 b	0.1 \pm 0.02 b	1.2 \pm 0.06 a	1.2 \pm 0.04 a

Al comienzo del periodo experimental, el perfil de ácidos grasos varió entre las tres diferentes camadas analizadas (Tabla 15), pero el ácido graso más abundante fue el 22:6n-3 (18-22%), seguido por 18:1n-9 (11-15%) y por 18:0 (8-9.5%).

La proporción de 20:5n-3 fue baja (3-4.5%) y no presentó diferencia estadística entre las camadas, siendo menor a la proporción de 20:4n-6 (4-5%). Además de los ácidos grasos típicos del perfil de los peces, los juveniles de caballitos de mar tienen varios ácidos grasos ramificados a bajas proporciones que suman alrededor del 2%.

Tabla 15. Niveles de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) (media \pm error estándar) en juveniles de *H. erectus* provenientes de 3 camadas. Se aplicó un ANOVA de una vía para determinar diferencias; letras distintas en el mismo renglón denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) en caballitos de mar, analizadas por pruebas de Tukey *a posteriori*; La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas.

	Camada A	Camada B	Camada C
14:0	0.31 \pm 0.01ab	0.30 \pm 0.01 a	0.34 \pm 0.01 b
16:0	7.3 \pm 0.11	7.49 \pm 0.04	7.73 \pm 0.28
17:0	0.75 \pm 0.02	0.92 \pm 0.04	1.07 \pm 0.05
18:0	8.09 \pm 0.05	9.18 \pm 0.34	8.37 \pm 0.39
24:0	1.91 \pm 0.03 a	2.35 \pm 0.06 b	2.80 \pm 0.09 c
16:1n-7	0.99 \pm 0.01	0.88 \pm 0.05	1.01 \pm 0.04
18:1n-9	14.3 \pm 0.24 b	12.2 \pm 0.13 a	12.1 \pm 0.32 a
18:1n-7	5.31 \pm 0.07 b	4.71 \pm 0.05 a	4.70 \pm 0.08 a
20:1n-9	0.80 \pm 0.01 b	0.66 \pm 0.04 a	0.57 \pm 0.04 a
24:1n-9	4.16 \pm 0.14	4.67 \pm 0.12	4.37 \pm 0.23
18:2n-6	5.36 \pm 0.08 b	4.26 \pm 0.03 a	4.23 \pm 0.23 a
18:3n-3	7.62 \pm 0.20 b	4.90 \pm 0.06 a	6.18 \pm 0.55ab
18:4n-3	1.30 \pm 0.04 b	0.79 \pm 0.06 a	1.06 \pm 0.11ab
20:3n-3	0.66 \pm 0.02	0.55 \pm 0.01	0.54 \pm 0.02
20:4n-6	4.05 \pm 0.03 a	4.48 \pm 0.18ab	4.84 \pm 0.22 b
20:5n-3	4.18 \pm 0.18	3.24 \pm 0.15	3.49 \pm 0.36
22:6n-3	18.6 \pm 0.54 a	21.8 \pm 0.62 b	20.0 \pm 0.69ab
Σ SAT	19.3 \pm 0.12	21.2 \pm 0.32	21.3 \pm 0.67

Σ MUFA	28.2 \pm 0.26	28.9 \pm 0.34	29.4 \pm 0.45
Σ PUFA	47.0 \pm 0.37	47.5 \pm 0.53	48.1 \pm 1.06
Σ Ramificados	2.12 \pm 0.03 b	1.96 \pm 0.03 a	2.03 \pm 0.03ab

Todos los ácidos grasos de los caballitos de mar juveniles vieron modificada su concentración por los tratamientos durante y al final del periodo experimental (Tabla 16). Un comportamiento particular se presentó para el EPA (20:5n-3), el cual, después de 30 días de tratamiento, fue mínimo en caballitos del tratamiento control (2.4%), seguidos de canola (2.8%), y por el de Selco (5.1%), presentándose la mayor proporción en EPAX (5.8%). Después de 60 días, los niveles permanecieron bajos en TC (3%) y canola (2%), pero en los otros dos tratamientos la concentración aumentó, siendo significativamente mayor en juveniles de EPAX (7%) en comparación con los de Selco (5%) (Tabla 16).

Los niveles de DHA en los juveniles se vieron afectados por los tratamientos de dietas, con valores relativamente muy elevados en los tratamientos de Selco y EPAX (más del 20%), y con niveles bajos en tratamiento control y canola. Después de 30 días de tratamiento, los juveniles que se alimentaron con *Artemia* no enriquecida tuvieron 4.7% de DHA, concentración que permaneció sin muchas variaciones hasta los 60 días. Los caballitos alimentados con canola tuvieron 8.4% de DHA después de 30 días, pero esta concentración decreció hasta 4.4% después de 60 días. En contraste, los caballitos en Selco y EPAX tuvieron similares niveles de DHA, desde el comienzo del experimento, y después de 30 y 60 días (Tabla 16). La razón DHA/EPA fue significativamente mayor en juveniles alimentados con Selco (4.8), seguido por los juveniles de EPAX (3.4), con una razón mucho menor para los otros dos tratamientos (2.1). Los elevados niveles de DHA y EPA afectan los niveles totales de PUFA, los cuales alcanzan más de la mitad

del total de ácidos grasos, y la razón n-3/n-6, la cual fue cuatro veces mayor en juveniles alimentados con Selco y EPAX comparado con los otros dos tratamientos.

Tabla 16. Niveles de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) (media \pm ES) en 3 camadas de *H. erectus* después de comer *Artemia* enriquecida por 60 días. Ver tabla 13 para análisis estadístico.

	Inicial (0 day)	Final (60 días de tratamiento)			
		Control	Canola	Selco	EPAX
14:0	0.32 \pm 0.01	0.32 \pm 0.03 b	0.30 \pm 0.02 b	0.42 \pm 0.03 a	0.29 \pm 0.01 b
16:0	7.51 \pm 0.11	8.67 \pm 0.10 a	7.69 \pm 0.07 b	6.85 \pm 0.06 c	6.78 \pm 0.13 c
17:0	0.91 \pm 0.05	0.62 \pm 0.00 a	0.53 \pm 0.01 a	0.14 \pm 0.09 b	0.62 \pm 0.01 a
18:0	8.55 \pm 0.22	9.67 \pm 0.30 a	8.20 \pm 0.44 b	6.19 \pm 0.15 c	6.64 \pm 0.19 c
20:0	0.30 \pm 0.01	0.42 \pm 0.02 a	0.38 \pm 0.03 a	0.20 \pm 0.01 b	0.23 \pm 0.01 b
22:0	0.36 \pm 0.02	0.46 \pm 0.01 a	0.42 \pm 0.01 ab	0.20 \pm 0.05 c	0.33 \pm 0.01 b
24:0	2.35 \pm 0.13	1.65 \pm 0.15 b	1.41 \pm 0.17 b	1.41 \pm 0.03 b	2.52 \pm 0.04 a
16:1n-7	0.96 \pm 0.03	1.07 \pm 0.08 b	0.98 \pm 0.06 b	1.44 \pm 0.09 a	1.10 \pm 0.03 b
18:1n-9	12.87 \pm 0.37	15.61 \pm 0.50 b	20.65 \pm 1.06 a	13.28 \pm 0.24 bc	12.62 \pm 0.22 c
18:1n-7	4.91 \pm 0.11	5.66 \pm 0.36 a	6.31 \pm 0.30 a	4.48 \pm 0.11 b	5.51 \pm 0.06 a
20:1n-9	0.68 \pm 0.04	0.60 \pm 0.08 c	0.93 \pm 0.03 a	0.87 \pm 0.03 ab	0.74 \pm 0.02 bc
18:2n-6	4.62 \pm 0.20	7.96 \pm 0.37 b	9.99 \pm 0.36 a	5.55 \pm 0.13 c	4.12 \pm 0.06 d
18:3n-6	0.22 \pm 0.01	0.29 \pm 0.03 ab	0.25 \pm 0.02 a	0.19 \pm 0.01 b	0.18 \pm 0.00 b
18:3n-3	6.24 \pm 0.43	11.86 \pm 1.19 a	10.80 \pm 1.16 a	8.42 \pm 0.69 a	10.98 \pm 0.45 a
20:4n-6	4.46 \pm 0.14	3.20 \pm 0.24 a	2.41 \pm 0.21 bc	3.07 \pm 0.08 ab	2.03 \pm 0.05 c
20:5n-3	3.64 \pm 0.19	2.56 \pm 0.07 c	2.05 \pm 0.04 c	5.35 \pm 0.20 b	6.95 \pm 0.17 a
22:6n-3	20.13 \pm 0.55	5.29 \pm 0.92 b	4.40 \pm 0.71 b	25.74 \pm 1.04 a	23.24 \pm 0.79 a
Σ SAT	20.62 \pm 0.39	22.16 \pm 0.39 a	19.24 \pm 0.65 b	15.65 \pm 0.17 c	17.62 \pm 0.35 b
Σ MUFA	28.85 \pm 0.25	33.05 \pm 0.36 b	37.72 \pm 0.45 a	26.03 \pm 0.37 c	25.38 \pm 0.42 c
Σ PUFA	47.54 \pm 0.40	41.29 \pm 0.28 b	39.65 \pm 0.17 b	55.08 \pm 0.42 a	53.91 \pm 0.69 a
n-3/n-6	22.07 \pm 0.62	8.79 \pm 0.87 b	8.08 \pm 0.47 b	31.89 \pm 1.75 a	33.27 \pm 6.21 a
DHA/EPA	5.68 \pm 0.37	2.09 \pm 0.40 c	2.15 \pm 0.35 bc	4.84 \pm 0.27 a	3.35 \pm 0.13 b

Después de 30 días de tratamiento, la proporción más elevada de ARA se presentó en los caballitos de Selco y TC (3.3%), seguidos por los del Canola (3.0%), con los niveles más bajos en los caballitos del EPAX (2.6%). Los niveles de ARA después de 60 días fueron menores en EPAX (2%), y los mayores en juveniles del tratamiento de no enriquecimiento (3.2%). Los juveniles alimentados en el tratamiento de Canola tuvieron niveles significativamente mayores de 18:1n-9 y 18:2n-6, comparados con los otros tratamientos. El elevado valor de 18:1n-9 se refleja también en la concentración total de MUFA (ácidos grasos monoinsaturados) para este tratamiento. Los juveniles alimentados con metanauplios no enriquecidos tuvieron significativamente mayores niveles de 16:0 y 18:0 y, por tanto, los mayores niveles de ácidos grasos saturados (SAT) (Tabla 16).

Los ácidos grasos ramificados totales tuvieron su mayor concentración en TC después de 30 y 60 días, y su menor concentración en Selco después de 30 días. Éstos permanecieron bajos en Selco y EPAX después de 60 días.

V.4. Discusión y conclusiones.

El propósito de este trabajo fue probar el desempeño (sobrevivencia y crecimiento) de caballitos de mar juveniles proporcionándoles diferentes niveles de HUFA, particularmente DHA. Selco, con 14% de DHA (de acuerdo con nuestro análisis), generalmente se utiliza para el enriquecimiento de metanauplios, por lo tanto, para incrementar los valores de DHA, en este trabajo se utilizó un aceite comercial producido a partir de pescado peruano y destinado para el consumo humano, con más de 60% de DHA, el cual fue emulsificado y proporcionado a los metanauplios de *Artemia*. El aceite de Canola fue utilizado como un tratamiento isolipídico para enriquecer los metanauplios, pero carente de HUFA.

Contrariamente a nuestras expectativas, el nivel de DHA en los metanauplios no resultó mucho mayor enriqueciendo con EPAX (13%) comparado con Selco (9%), aunque existe una diferencia significativa entre éstos. La concentración de DHA es particularmente difícil de incrementar en los metanauplios de *Artemia* como ha sido previamente reportado. Por ejemplo, Faleiro y Narciso (2011) utilizan la emulsión Algamac 200, con 27% de DHA, y alcanzan únicamente un 4% de DHA en metanauplios de *Artemia*. Este bajo enriquecimiento de DHA en metanauplios de *Artemia* puede ser el resultado de la retroconversión metabólica de DHA a EPA, la cual ha sido reportada previamente para *Artemia* (Navarro *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001). Sin embargo, esto puede ser el resultado de la línea genética de *Artemia* utilizada, ya que diferentes líneas pueden presentar diferentes capacidades de retroconversión; o bien el resultado de diferentes metodologías para el enriquecimiento, tales como enriquecimiento doble, lavado después del enriquecimiento, luz y temperatura, etc. Utilizando doble enriquecimiento y una emulsión ICES con 9% de DHA, se ha obtenido previamente metanauplios con 13% de DHA (Palacios *et al.*, 2004). Parte del DHA en EPAX puede ser perdido por la oxidación durante la emulsificación y el enriquecimiento, ya que no es un aceite diseñado comercialmente para ser disuelto en agua. De cualquier forma, se comenzó con una concentración 4 veces mayor de DHA en EPAX que en Selco, y en los metanauplios se tuvo solo el 50% más en los de EPAX que en los de Selco. Como se esperaba, los metanauplios enriquecidos con Canola y los no enriquecidos presentaron trazas de DHA y menos de 2% de EPA, pero los tres tratamientos con enriquecimiento tuvieron niveles similares de lípidos.

Cuando se comparó el desempeño con la composición bioquímica y de ácidos grasos, se encontró que si bien hay diferencias en la concentración de DHA en metanauplios de los tratamientos Selco y EPAX, los juveniles de ambos tratamientos presentaron niveles

similares de este ácido graso en sus tejidos (23-26). Interesantemente, 23% de DHA fue la concentración que se obtuvo de los tejidos de caballitos recién nacidos, antes de su primera alimentación (ver la metodología). Es posible que sea regulado el nivel superior de la concentración de DHA en juveniles del caballito de mar *H. erectus*, ya que el DHA no se acumula más cuando se dá una concentración extra de este ácido graso en la dieta. Por contraste, en los caballitos alimentados con la dieta sin enriquecimiento y la de Canola, el nivel de DHA presentó un marcado decremento (más de 80%), hasta alcanzar 4-5% del total de ácidos grasos. Faleiro y Narciso (2011) encontraron niveles similares de DHA en juveniles de *H. guttulatus* al comienzo de su experimento (17%) comparados con los valores encontrados en este para *H. erectus* (20%); los niveles de DHA en *H. guttulatus* decrecieron, después de 30 días, hasta 3-7% alimentados con metanauplios enriquecidos con Algamac, con 4% de DHA.

Bajos niveles de HUFA n-3 pueden afectar el crecimiento, ya que los juveniles de los tratamientos de Canola y sin enriquecimiento fueron significativamente más pequeños al final del periodo experimental; esto es apoyado por una correlación significativa entre los niveles de DHA en los tejidos de juveniles y su peso ($r^2 = 89$) y una menor, pero significativa, correlación entre los niveles de EPA en tejidos y el peso ($r^2 = 0.78$). Otros estudios también han concluido que un mayor contenido de DHA tiene un efecto positivo en el desempeño de peces marinos durante sus estadíos tempranos (Mourente *et al.*, 1993; Olivotto *et al.*, 2011; Trushenski *et al.*, 2012). En estos estadíos hay una gran demanda de energía debido al rápido crecimiento de los peces. El DHA promueve un mejor desarrollo y función de las mitocondrias, así como una mayor producción de enzimas y coenzimas con una posición central en el metabolismo (Olivotto *et al.*, 2011; Yin y Tang, 2012).

En relación con la sobrevivencia, se encontró que juveniles alimentados con el tratamiento de Canola, que finalizaron con 4% de DHA en sus tejidos, comenzaron a morir alrededor de la segunda semana, y al final del experimento presentaron la mayor mortalidad, consistente con el menor índice de condición. La menor sobrevivencia para los juveniles alimentados con Canola se pudo observar desde la segunda semana de cultivo, lo cual es consistente con los resultados obtenidos con *Morone saxatilis*, donde una mortalidad masiva se presentó después de dos a tres semanas de cultivo, pero únicamente en organismos alimentados con dietas con bajos niveles de HUFA (Tuncer y Harrell, 1992). Sin embargo, los juveniles alimentados con metanauplios no enriquecidos también fueron carentes de HUFA, y su contenido de DHA cayó hasta 5% después de 60 días, y a pesar de ello su sobrevivencia fue similar a la que presentaron los caballitos del tratamiento de EPAX, con 23% de DHA en sus tejidos. Es posible que el aceite de canola tenga algunos factores antinutricionales en su composición (Manajan *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2009), los cuales no únicamente menguan el crecimiento, sino también la sobrevivencia, a pesar de la eliminación de la mayoría de los componentes antinutricionales en el proceso comercial del aceite de canola.

En contraste con el crecimiento, la sobrevivencia no estuvo tan fuertemente correlacionada con los niveles de DHA en los juveniles ($r^2 = 0.44$; $F = 7.9$; $P < 0.05$), y no se encontró ninguna otra correlación con algún otro ácido graso o componente bioquímico en los tejidos de caballitos de mar. Los juveniles alimentados con Selco presentaron una sobrevivencia excelente a pesar de tener niveles similares de DHA (25%) que los caballitos del tratamiento de EPAX (23%). Debe hacerse notar que Selco no únicamente está compuesto de ácidos grasos, también es enriquecido con vitamina C, aminoácidos, y fosfolípidos (de acuerdo con el fabricante), lo cual no es el caso de EPAX.

Los juveniles del tratamiento de Selco tuvieron más ARA (tanto en la dieta como en los tejidos), más carbohidratos y una razón DHA/EPA más elevada, comparados con los juveniles del tratamiento de EPAX, lo cual pudo haber tenido algunos efectos en la sobrevivencia. En larvas de *Sparus aurata*, un incremento en los niveles de ARA de 0.1 a 1% en las dietas, mejora de manera significativa la sobrevivencia (Bessonart *et al.*, 1999). Ha sido discutida la importancia de ARA junto con DHA y EPA por Sargent *et al.* (2002), quienes proponen que, en dietas, la razón DHA/EPA debe además considerar los niveles de ARA, y estar en el orden de 8:1 EPA:ARA, lo cual es muy similar a la razón encontrada en el tratamiento de Selco. Ara es un precursor de la síntesis de eicosanoides a través de las enzimas COX y LOX. Éstas enzimas también usan EPA como sustrato para producir otros eicosanoides, por lo tanto, si los niveles de ARA son bajos en comparación con los niveles de EPA, la síntesis de ciertas prostaglandinas puede ser inhibida y desviada a favor de eicosanoides derivados de EPA, con una actividad biológica reducida (Bransden *et al.*, 2004). En este experimento la razón EPA/ARA más elevada, para el tejido de los juveniles de caballito de mar ocurrió en el tratamiento EPAX y esto pudo ser detrimental para su sobrevivencia.

Así, juveniles del caballito de mar *H. erectus*, que tienen arriba de 20% de DHA en sus tejidos, se espera que tengan un mejor desempeño durante su cultivo, particularmente en referencia con el crecimiento. Esta concentración relativa en los tejidos puede ser alcanzada con aproximadamente 10% de DHA en la dieta a base de metanauplos de *Artemia*. La sobrevivencia es menos dependiente de los niveles de DHA y mucho menos dependiente de los niveles de EPA en los tejidos. En esta investigación, el trabajo se centró en el papel del DHA, debido a que parece ser el ácido graso más importante para los estadios tempranos

del ciclo de vida de los peces; se recomienda uinvestigación posterior tomando en cuenta el papel de la razón EPA/ARA en el desempeño de crianza de caballitos de mar.

VI. DISCUSION GENERAL.

En el presente trabajo, se planteó como parte de la hipótesis, que el caballito *H. erectus* no presentaría preferencia por *Artemia* o un anfípodo, dado su similar tamaño. Aun si se trata de presas de tamaño similar, los factores que probablemente influenciaron en la elección de una presa u otra fue la forma y el tipo de desplazamiento. Como se discutió en el capítulo II, y contrariamente a lo que se había esperado, los caballitos mantenidos en cautiverio por algunos meses, alimentados únicamente con *Artemia*, presentaron una preferencia por anfípodos cuando ambas presas fueron presentadas. Sin embargo, en este trabajo queda demostrado que es posible alimentar caballitos de mar utilizando como alimento vivo a *Artemia*. Esto debido a que, por un lado, a pesar de no ser una presa natural, es aceptada de buena manera por los caballitos, y se pueden adaptar las diferentes etapas de crecimiento del caballito a las diferentes etapas del ciclo de vida de *Artemia*, con el objetivo de proveer de presas de tamaño adecuado a estos depredadores.

Dejando de lado la capacidad de captura y disposición por parte de *H. erectus* a la ingestión de *Artemia*, permanece el problema de la calidad nutricia de la *Artemia* para los caballitos de mar. Se ha reportado que esta especie de caballito puede sobrevivir alimentándose exclusivamente de nauplios de *Artemia* no enriquecidos durante las primeras dos semanas (Lin *et al.*, 2008b), pero la sobrevivencia y el crecimiento pueden presentar una fuerte variación que puede ser el resultado de la composición de *Artemia*, la condición de los reproductores y/o huevos, condiciones de cultivo, y otras variables no controladas. En varias especies de peces, se ha demostrado que una nutrición no adecuada de los reproductores, afecta la cantidad de huevos que se producen; esta estrategia reproductiva permite que los huevos producidos sean de buena calidad y presenten un buen desempeño a nivel de sobrevivencia y crecimiento. Por ejemplo, se ha observado que hembras de mayor

tamaño, producen mayor cantidad de huevos, y esto se ha asociado a mayor cantidad de reservas en contraste con las hembras más pequeñas. Sin embargo, el caso de los caballitos representa un reto; mientras que los machos sí muestran preferencia por hembras más grandes, es el macho el que incuba los huevos durante su desarrollo embrionario, por lo que la posible correlación con la cantidad de huevos y el tamaño de la hembra es difícil de probar. Al respecto y en condiciones de acuicultura de caballitos, algunas camadas presentan una elevada sobrevivencia y otras camadas bajo las mismas condiciones no corren con la misma suerte; generalmente, camadas con un menor desempeño presentan una mayor variabilidad en tamaño que aquellas camadas que sobreviven y crecen mejor. Esta variabilidad que posiblemente sea causada por diferencias a nivel del desarrollo embrionario, y tal vez incluso en huevos, aparentemente disminuye si la dieta es mejorada. Así, se ha reportado que miembros de la familia syngnathidae son capaces de sacrificar parte, pero no necesariamente todos, los embriones (Paczolt y Jones, 2010). No se sabe si hay algún mecanismo de selección de embriones por parte del macho, si es resultado del estrés, o este mecanismo es al azar.

Independientemente de la calidad de los juveniles al nacer, una estrategia a nivel de cultivo sería ofrecer una dieta que permita incrementar el desempeño y viabilidad de los caballitos al tomar estos los nutrientes que les hagan falta. Sin embargo, antes es necesario saber cuáles son los niveles de ácidos grasos en caballitos recién nacidos en condiciones naturales, asumiendo que estos niveles son los más adecuados para un buen desempeño de esta especie. Así que la siguiente hipótesis planteada fue que los juveniles de *H. erectus* recién nacidos provenientes de padres silvestres presentarían niveles altos y relativamente constantes de DHA y EPA, como ocurre en gran parte de los peces carnívoros marinos, pero con menores concentraciones de DHA en comparación con peces de aguas frías o

templadas. Lo que se observó fueron niveles de DHA más altos de lo esperado en una especie tropical, y niveles más bajos de EPA de lo esperado. Así, los ácidos grasos más abundantes, resultaron ser: 22:6n-3 o DHA (20-30%), 16:0 (11-12%), 18:0 (9-10%), 20:4n-6 o ARA (7-9%), 18:1n-9 (6-10%), 20:5n-3 o EPA (4-7%), 24:0 (3.5-4.8%), 18:1n-7 (3.5-4.5%), y 24:1n-9 (3.6-4.2%). En la mayoría de los peces marinos, la regla de oro es que a mayores niveles de DHA dentro de cada especie, mejor será la calidad de la larva, ya que una gran cantidad de este ácido graso es requerida para el desarrollo de los sistemas visuales y nerviosos, y la mayoría de las larvas tienen que capturar presas vivas cuando se acaban las reservas vitelinas, o en caso de los caballitos de mar, desde que nacen. Esta regla concuerda en este trabajo, ya que los juveniles no viables, abortados por uno de los machos, fueron los que presentaron la menor concentración de DHA (17.7%). Aparentemente, elevados valores de DHA, en detrimento de EPA, son necesarios para producir juveniles del caballito tropical *H. erectus* que pueden ser considerados de “mejor calidad”. Para propósitos prácticos, una dieta para juveniles y adultos de presas vivas, y particularmente *Artemia*, puede ser enriquecida con DHA, para incrementar el crecimiento y la sobrevivencia en cautiverio.

Con estas concentraciones se puede inferir la utilización de los diferentes ácidos grasos por parte de los caballitos de mar recién nacidos, y se puede entender el porqué de la importancia de sus concentraciones relativas. En general, los ácidos grasos saturados (SAT) y monoinsaturados (MUFA), y en particular con mayor frecuencia el 16:0 y el 18:1n-9, constituyen buena parte de los triglicéridos que son selectivamente catabolizados por los peces para obtener energía. Los HUFA, por su parte, generalmente son constituyentes de fosfolípidos, y los altos niveles de DHA se encuentran comúnmente contenidos en fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, junto con SAT y MUFA, siendo comunes las

especies moleculares 16:0/22:6n-3, 18:0/22:6n-3 y 18:1n-9/22:6n-3. El fosfatidilinositol tiene una preferencia selectiva hacia HUFA C₂₀, presentando la mayor abundancia de 20:4n-6 (generalmente asociado al 18:0), que compite por los sitios activos con 20:5n-3 y 20:3n-6, siendo todos ellos fuertemente influenciados por los niveles de ellos mismos en la dieta (Izquierdo et al., 2001; Sargent et al., 2002). En fosfolípidos en general se da una competencia también entre HUFA C₂₀ y C₂₂, debido a que acilasas y transacilasas que esterifican los ácidos grasos a los distintos fosfolípidos demuestran preferencias por algunos ácidos grasos (Izquierdo et al., 2001).

Un resultado inesperado fue que los niveles totales de ácidos grasos presentaron variaciones importantes entre juveniles nacidos en 2009 y 2010, con valores intermedios en los juveniles abortados. Así, una comparación sencilla de los niveles totales de ácidos grasos puede no ser suficiente para determinar la calidad de caballitos de mar juveniles, y más que abortar los embriones de menor calidad dentro de una camada, se podría plantear que los embriones son abortados por un estrés sufrido por el macho. No se encontraron diferencias en la talla de los machos reproductores entre años, pero las camadas fueron menos numerosas en 2009, y la camada más grande fue abortada, pero los machos más grandes tienden a parir más rápido después de su captura que los machos de menor talla ($r=0.77$; $P<0.01$). Los juveniles provenientes de padres más experimentados también tuvieron una mayor sobrevivencia después del nacimiento (90% comparado con 50% a las siete semanas), en comparación con juveniles provenientes de padres menores. Esto demuestra que hay una ventaja al aparearse con machos mayores y de mayor experiencia. Se ha observado, además, que padres menores producen menos juveniles por camada (Dzyuba et al., 2006), y parece ser que esto es un efecto de la carencia de experiencia de los padres y probablemente estrés en caballitos de menor edad, más que debido a la talla del marsupio.

Los caballitos de mar adultos aparentemente toleran la manipulación y el confinamiento prolongado, ya que aparentemente no presentan una respuesta aguda al estrés, tal como la exposición al aire durante un minuto, lo cual ha sido concluido basándose en las concentraciones de cortisol y glucosa en la sangre (Wright et al., 2007). Esto puede ser un resultado de su inhabilidad para huir o defenderse de depredadores. Si la inexperiencia para la reproducción en caballitos adultos jóvenes es trasladada a un estrés crónico, esto podría afectar los niveles circulantes de cortisona en el macho lo cual a su vez puede afectar los niveles de cortisona y prostaglandina en juveniles, una relación que ha sido encontrada en otros peces (Evans, 2002). Aquí se encontró que la talla de los machos adultos presentó una correlación positiva con $20:4n-6$ ($r = 0.56$; $P < 0.001$), y tienden a parir antes después de su captura, que machos de menor talla ($r = 0.77$; $P < 0.001$). No se encontró ninguna otra correlación entre la talla de los machos y algún otro HUFAs. El principal substrato para la prostaglandina es $20:4n-6$ o ARA, lo cual podría estar provocando un parto más pronto en machos mayores. En cualquier caso, la mayoría de los machos no mostraron signos de estrés por la captura, transferencia y condiciones de cultivo, ya que únicamente uno presentó expulsión de embriones antes de que estuvieran maduros. Pero los niveles de $20:4n-6$ en juveniles abortados fueron los mayores (9.3%), en comparación con los niveles en 2010 y 2009 (9.2 vs. 7.2%).

Esperábamos que los ácidos grasos indicaran la calidad del huevo dado por la madre, dado que las células epidérmicas dentro del marsupio de los machos pueden tener función osmoregulatoria, y la dermis vascularizada del marsupio sirve para proveer de oxígeno y iones a los huevos en gestación (Azzarello, 1991; Carcupino et al., 2002; Monteiro et al., 2005), pero aparentemente no hay transferencia de nutrientes. Sin embargo, en estudios recientes se ha descrito que en otros miembros de la familia Syngnathidae ocurre una

transferencia de nutrientes del padre preñado a los huevos/embriones (Ripley y Foran, 2009; Kvarnemo et al., 2011) e incluso de los embriones al padre (Sagebakken et al., 2010). Por lo tanto una posibilidad es que éstos ácidos grasos indiquen directamente el consumo de alimento o el nivel del estrés del padre durante el tiempo de gestación, como en el caso del 20:4n-6. No es probable que los ácidos grasos varíen en relación a cambios de, por ejemplo, bacterias en el ambiente fuera del marsupio dado que los huevos se encuentran completamente aislados del medio externo, y se ha reportado que una entrada accidental de agua dentro del marsupio del hipocampo macho puede matar a los embriones (Carcupino et al., 2002).

Se esperaba, como se planteo en la hipótesis, que existiera mayor sobrevivencia de juveniles de caballito de mar en organismos alimentados con dietas ricas en HUFA (DHA y EPA), con respecto a las dietas con bajas o nulas concentraciones de estos ácidos grasos, pero una disminución del crecimiento a mayores niveles de HUFA. Para lograr esto, se requirieron algunas pruebas preliminares donde se comparó el enriquecimiento de nauplio y adulto de *Artemia* con distintos tipos de emulsiones y aceites. Lo que se observó fue que en ambos e independientemente del enriquecimiento, se presentó poca variación con respecto al 20:4n-6 (menor a 3%). aun usando una emulsión con 10% de 20:4n-6 y posiblemente indique una estricta regulación de este ácido graso en *Artemia*. Estos niveles constantes de 20:4n-6 contrastan con la variación para el 20:5n-3 y el 22:6n-3. En los nauplios sin enriquecimiento la concentración de 20:5n-3 resultó menor a 3%, pero aumentó proporcionalmente al contenido en los diferentes enriquecedores, lo cual no fue el caso en adultos. El 22:6n-3, casi nulo en nauplios y adultos de *Artemia*, puede ser modificado por las emulsiones pero sin sobrepasar un límite superior.

Una vez establecido el enriquecimiento de la *Artemia*, se procedió a probar su efecto en el desempeño de los caballitos. Como en otros peces, aquí se probó si la sobrevivencia y el crecimiento de juveniles de caballito de mar pueden verse mejorados (disminuyendo dicha variabilidad) utilizando *Artemia* enriquecida con HUFA para alimentar a los caballitos.

Después de 60 días de experimento con dietas, la composición de ácidos grasos en los caballitos refleja el efecto de la dieta sobre ésta, siendo particularmente interesante la disminución (de más del 60 %) de DHA en aquellos caballitos alimentados con dietas carentes de este ácido graso, mientras que en caballitos alimentados con dietas ricas en DHA, su concentración en los tejidos se mantuvo en niveles entre 20 y 30%, siendo aún el ácido graso más abundante. Otros cambios importantes en los tejidos de los caballitos, como efecto de la administración de los tratamientos de dietas, son el aumento en la concentración de 18:1n-9 y 18:3n-3, la disminución general de ARA y la acumulación que puede darse de EPA si se administra en concentraciones elevadas.

La sobrevivencia temprana de las larvas de peces se ha correlacionado con el perfil de ácidos grasos de huevos y larvas, y una concentración elevada de HUFA n-3, y en particular de DHA, parece ser un indicador de larvas y juveniles más aptos para sobrevivir a su nueva vida con alimentación exógena (Mourente et al., 1993; Izquierdo et al., 2001; Copeman et al., 2002; Olivotto et al., 2011; Trushenski et al., 2012).

El contenido de ácidos grasos con el que nacen los juveniles de *H. erectus* resultó adecuado, o dicho de otro modo, no fue un impedimento, para que hubiera una sobrevivencia prácticamente de 100% en las 3 camadas desde su nacimiento hasta el inicio del experimento (7-11 días), siendo éstas alimentadas desde el primer día con nauplios de *Artemia* enriquecidos con Selco. González et al., (2006) obtuvieron también sobrevivencias del 100% en sus tratamientos de dietas con *H. erectus* recién nacidos. Se ha mencionado

que los primeros 5 días de vida es cuando se da una mayor mortalidad en caballitos de mar, considerándolo el cuello de botella para el cultivo de algunas especies (Demerval et al., 2003; Otero-Ferrer et al., 2010). Sin embargo, esto parece aplicar para especies que nacen con menores tallas como *H. hippocampus* (5-9.3 mm de altura) (Foster y Vincent, 2004; Otero-Ferrer et al., 2010), *H. reidi* (5-7 mm) (Foster y Vincent, 2004; Giacometti y Loebmann, 2009), *H. trimaculatus* (6.1 mm) e *H. kuda* (7.0 mm) (Foster y Vincent, 2004), y que por tanto deben ser alimentadas con rotíferos u otras presas de menor tamaño, y/o menor calidad nutricional, durante este periodo. En este trabajo *H. erectus* nació con un promedio de 11.5 mm tomando en cuenta once diferentes camadas cuyos machos fueron colectados en una misma área geográfica, Lin et al. (2008b) obtuvieron juveniles recién nacidos de la misma especie de 10.0 mm provenientes de 6 machos nacidos a su vez en cautiverio. Estas diferencias pueden ser debidas a la latitud y otras variables de su historia de vida, tales como la temperatura y fotoperiodo, su alimentación, genética, etc.

Si se parte del supuesto de que a mayores niveles de DHA mayor será la calidad de la larva, y por tanto su desempeño (crecimiento y reproducción) se puede pensar que el alto contenido de DHA en caballitos recién nacidos (> 20% siendo el ácido graso más abundante), junto con su adición en la dieta durante los días previos al experimento, permitieron que la sobrevivencia durante los primeros 20 días de experimento fuera de más de 80%, incluso en aquellos tratamientos de dieta en los que la concentración de DHA fue casi nula. Después de este tiempo es posible que el abatimiento de las reservas de este ácido graso (al mes había disminuido entre 60 y 80 % su concentración en tratamientos sin HUFA) tengan una relación directa con el aumento drástico de la mortalidad principalmente en el tratamiento de aceite de canola (carente de HUFA). Este mismo aumento drástico en la mortalidad a partir de los 20 días fue encontrado por Chang y

Southgate en su tratamiento de *Artemia* sin enriquecimiento, y Faleiro y Narciso (2011) dan cuenta de un abatimiento de las reservas de DHA a los 30 días de cultivo en juveniles alimentados con una baja concentración de este ácido graso.

Tomando en cuenta los resultados mencionados, parecería que en relación con el DHA el cuello de botella podría estar entre las dos semanas y el mes de vida, que es cuando se ven abatidas las reservas de DHA en caso de no ser administradas en la dieta. Pero contrariamente a esto, existen trabajos en los que se alcanza una elevada sobrevivencia en caballitos alimentados con nauplios de *Artemia* sin enriquecimiento en tiempos superiores a 60 días (Shapawi y Purser, 2003; González et al., 2006; Lin et al., 2008b). Desgraciadamente en esos trabajos no se puso énfasis en el análisis de ácidos grasos, ni de las dietas ni de los caballitos, por lo que no se puede concluir que la concentración de HUFA, y en particular de DHA, no tenga un efecto directo en la sobrevivencia de juveniles de caballito de mar. De acuerdo con la evidencia presentada aquí, y en los trabajos mencionados que toman en cuenta los ácidos grasos, al parecer si la tiene.

En relación con el crecimiento, en este trabajo queda evidenciada una relación directa entre esta variable y la concentración de DHA en la dieta, y por tanto, en los tejidos. Ya desde los 15 días se observó una disminución en la tasa de crecimiento en aquellos caballitos alimentados con dietas carentes de HUFA, y este decremento se ve acompañado por la disminución de las reservas de estos ácidos grasos en los tejidos. Parece concluyente que el factor determinante para un mayor crecimiento para juveniles de *H. erectus*, es la concentración de HUFA n-3 en la dieta, y particularmente de DHA.

Uno de los aportes principales de este trabajo, para la práctica del cultivo de juveniles de caballito de mar, es el evidenciar la necesidad de utilizar dietas ricas en HUFA, pero no únicamente enriquecer alimento vivo con cualquier producto comercial rico en HUFA,

siguiendo las instrucciones de fabricante, sino que deben tomarse en cuenta tanto las concentraciones de los enriquecedores, como el resultado final del enriquecimiento, es decir, comprobar, y hasta dónde se pueda controlar, las concentraciones de HUFA que se administran, cuidando que en el caso del DHA, no sean menores al 8% del total de ácidos grasos.

La concentración de DHA en crías recién nacidas de *H. erectus*, así como de juveniles en crecimiento, puede utilizarse como un indicador de calidad relacionándolo con las variables de crecimiento y sobrevivencia. El presente trabajo puede servir de base para, por un lado, realizar futuras comparaciones por ejemplo con crías provenientes de padres alimentados en cautiverio, y por otro lado es una aportación importante para el entendimiento de la dinámica metabólica de los ácidos grasos en estos organismos y en peces en general.

VI.1 Conclusiones generales

- Es posible alimentar a *H. erectus* con *Artemia* durante todo su ciclo de vida, obteniendo mejores resultados en su desempeño enriqueciendo la *Artemia* con HUFA, y en particular con DHA.
- Existe un efecto directo de la concentración de ácidos grasos en la dieta sobre la concentración de estos mismos compuestos en los tejidos, y la composición relativa de ácidos grasos en los lípidos tiene un efecto sobre el crecimiento y la sobrevivencia de *H. erectus*, lo cual debe tomarse en cuenta como uno de los aspectos principales al momento de establecer dietas y protocolos de alimentación para estos organismos.
- También con estos resultados aparentemente queda evidenciada una incapacidad de *H. erectus* para sintetizar HUFA, como ocurre en los peces marinos carnívoros que han sido estudiados. Por todo ello, el utilizar dietas ricas en HUFA y sobre todo en DHA parece ser un paso indispensable en cualquier intento por cultivar con éxito a *H. erectus*. Es importante proporcionar dietas a los juveniles de *H. erectus* con al menos 8 % de DHA, cuidando que el radio DHA/EPA sea de al menos 2.0.

VI.2 Referencias

- Agh, N., Sorgeloos, P. 2005. Handbook of Protocols and Guidelines for Culture and Enrichment of Live Food for Use in Larviculture. Artemia & Aquatic Animals Research Center, Urmia University, Urmia. 60 pp.
- Ali S., Anwar F., Ashraf S., Talpur F.N., Ashraf M. 2009. Evaluation of canola seeds of different cultivars with special emphasis on the quantification of erucic acid and glucosinolates. *Grasas y Aceites* 60: 89–95.
- Azzarello, M.Y. 1991. Some questions concerning the Syngnathidae brood pouch. *Bulletin of Marine Sciences* 49: 741–747.
- Bagarinao, T., Chua, T.E. 1986. Egg size and larval size among teleosts: implications to survival potential. In The First Asian Fisheries Forum (Maclean, J. L., Dizon, L. B. & Hosillos, L. V., eds), pp. 651–656. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society.
- Barnes H., Blackstock J. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovainilin method for total lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 12: 103–108.
- Baum, J.K., Meeuwig, J.J., Vincent, A.C.J. 2003. Bycatch of lined seahorses (*Hippocampus erectus*) in a Gulf of Mexico shrimp trawl fishery. *Fishery Bulletin* 101(4): 721–731.
- Bell, M.V., Henderson R.J., Sargent J.R. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 83B: 711–719.
- Bell, E., Lockyear, J., McPherson, J., Marsden, A.D., Vincent, A.C.J. 2003. First field studies of an Endangered South African seahorse, *Hippocampus capensis*. *Environmental Biology of Fishes* 67: 35–46.

- Bell, J.G., Sargent, J.R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218: 515–528.
- Bergert, B.A., Wainwright, P.C. 1997. Morphology and kinematics of prey capture in the syngnathid fishes *Hippocampus erectus* and *Syngnathus floridae*. *Marine Biology* 127: 563–570.
- Bessonart, M., Izquierdo, M., Salhi, M., Hernández- Cruz, C., González, M., Fernández-Palacios, H. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*, 179: 265–275.
- Boujard, T., Leatherland, F. 1992. Circadian rhythms and feeding time in fish. *Environmental Biology of Fishes* 35: 109–131.
- Bradford M.M. 1976. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brandsen M.P., Cobcroft J.M., Battaglione S.C., Dunstan G.A., Nichols P.D., Bell, J.G., 2004. Dietary arachidonic acid alters tissue fatty acid profile, whole body eicosanoid production and resistance to hypersaline challenge in larvae of the temperate marine fish, striped trumpeter (*Latris lineata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 30: 241–256.
- Bres, M. 1986. A new look at optimal foraging behaviour; rule of thumb in the rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 29: 25–36.
- Budge, S.M., Parrish CC, McKenzie, C.H. 2001. Fatty acid composition of phytoplankton, settling particulate matter and sediments at a sheltered bivalve aquaculture site. *Marine Chemistry* 76: 285–303.
- Carcupino, M., Baldacci, A., Mazzini, M., Franzoi, P. 2002. Functional significance of the male brood pouch in the reproductive strategies of pipefishes and seahorses: a

- morphological and ultrastructural comparative study on three anatomically different pouches. *Journal of Fish Biology* 61: 1465–1480.
- Casey, S.P., Hall, H.J., Stanley, H.F., Vincent, A.C.J. 2004. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 261–272.
- Castro, A.L.C., Diniz, A.F., Martins, I.Z., Vendel, A.L., Oliveira, T.P., Rosa, I.M.L. 2008. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) as a study-case. *Neotropical Ichthyology*, 6(4): 637–644.
- Cejas, J.R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Felipe, B., Lorenzo, A. 2004, Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139B: 209–216.
- Chang M., Southgate S. E. 2001. Effects of varying dietary fatty acid composition on growth and survival of seahorse, *Hippocampus* spp., juveniles. *Aquarium Sciences and Conservation* 3: 205–214.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210: 285–304.
- Curtis, J.M.R., Vincent, A.C.J. 2006. Life history of an unusual marine fish: survival, growth and movement patterns of *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829. *J. Fish Biol.* 68: 707–733.

- Czesny S., Kolkovski S., Dabrowski K., Culver D. 1999. Growth, survival, and quality of juvenile walleye *Stizostedion vitreum* influenced by n-3 HUFA enriched *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 178: 103–115.
- Damerval M., Détienne J., Détienne C., Vincent T. 2003. Données sur l'élevage en aquarium des deux espèces d'hippocampes européens: *Hippocampus hippocampus* (Linné, 1758) et *Hippocampus ramulosus* (Leach, 1814). *Bulletin de la Société Géologique de Normandie et des amis du Muséum du Havre* 90: 45–52.
- Dzyuba, B., Van Look, K.J.W., Cliffe, A., Koldewey, H.J., Holt, W.V. 2006. Effect of parental age and associated size on fecundity, growth and survival in the yellow seahorse *Hippocampus kuda*. *Journal of Experimental Biology* 209: 3055–3061.
- Evans, D.H. 2002. Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 293: 336–347.
- Faleiro, F., Narciso, L., Vicente, L. 2008. Seahorse behaviour and aquaculture: how to improve *Hippocampus guttulatus* husbandry and reproduction? *Aquaculture* 282: 33–40.
- Faleiro, S., Narciso, L. 2009. *Brachionus* vs *Artemia* duel: Optimizing first feeding of *Upogebia pusilla* (Decapoda: Thalassinidea) larvae. *Aquaculture* 295: 205–208.
- Faleiro, F., Narciso, L. 2010. Lipid dynamics during early development of *Hippocampus guttulatus* seahorses: Searching for clues on fatty acid requirements. *Aquaculture* 307: 56–64.
- Faleiro, F., Narciso, L. 2011. Prey–predator dynamics in seahorses (*Hippocampus guttulatus*): deciphering fatty acid clues. *Aquaculture Research* 2011: 1–16.
- Figueredo, J., Woesik, R., Lin, J., Narciso, L. 2009. *Artemia franciscana* enrichment model — How to keep them small, rich and alive? *Aquaculture* 294: 212–220.

- Folch, J., Lees, M., Sloane-Sanlez, G-H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.
- Foster, S., Vincent, A.C.J. 2004. The life history and ecology of seahorses, *Hippocampus* spp.: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology* 65: 1–61.
- Foster, S. Wiswedel, S., Vincent, A.C.J. 2014. Opportunities and challenges for analysis of wildlife trade using CITES data – seahorses as a case study. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* DOI: 10.1002/aqc.2493.
- Franzoi, P., Maccagnani, R., Rossi, R., Ceccherelli, V. U. 1993. Life cycles and feeding habits of *Syngnathus taenionotus* and *S. abaster* (Pisces, Syngnathidae) in a brackish bay of the Po River delta (Adriatic Sea). *Marine Ecology Progress Series* 97: 71–81.
- Freret-Meurer, N.V., Andreatta, J.V. 2008. Field studies of a Brazilian seahorse population, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51: 743–751.
- Fritzsche RA, 1980. Revision of the eastern Pacific Syngnathidae (Pisces: Syngnathiformes), including both recent and fossil forms. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 42: 181–227.
- Fritzsche, R.A., Vincent, A. 2002. Family Syngnathidae. In: K. Carpenter (ed.) FAO Species Identification Sheets for Fishery Purposes. The living marine resources of the Western Central Atlantic. FAO, United Nations. Rome. Pp. 1221–1225.
- Froese, R., Pauly, D. 2004. Fishbase. A global information system on fishes. [On-line]. Available from: <<http://www.fishbase.org>>

- Ghioni, C., Porter, A.E.A., Sadler, I.H., Tocher, D.R., Sargent, J.R. 2001. Cultured Fish cells metabolize octadecapentaenoic acid (all-*cis* Δ 3,6,9,12,15-18:5) to octadecatetraenoic acid (all-*cis* Δ 6,9,12,15-18:4) via its 2-*trans* intermediate (*trans* Δ 2, all-*cis* Δ 6,9,12,15-18:5). *Lipids* 36: 145–152.
- Giacometti M., A., Loebmann, D. 2009. Size and number of newborn juveniles in wild *Hippocampus reidi* broods. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4(2): 154–157.
- González H., E., Piloto C., Y., Chevalier M., P., Rivero, N. 2006. Efectos de la *Artemia* enriquecida, sobre el crecimiento del Caballito de Mar (*Hippocampus erectus* Perry, 1810). IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 8 pp.
- Goodwin, N.B., Dulvy, N.K., Reynolds, J.D. 2002. Life-history correlates of the evolution of live bearing in fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 357: 259–267.
- Haché, R., Plante, S., 2011. The relationship between enrichment, fatty acid profiles and bacterial load in cultured rotifers (*Brachionus plicatilis* L-strain) and *Artemia* (*Artemia salina* strain *Franciscana*). *Aquaculture* 311: 201–208.
- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183: 335–347.
- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P. 2001. Fatty acid changes in enriched and subsequently starved *Artemia franciscana* nauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture* 199: 93–105.

- Hilomen-Garcia, G.V., Delos Reyes, R., Garcia, C.M. 2003. Tolerance of seahorse *Hippocampus kuda* (Bleeker) juveniles to various salinities. *J. Appl. Ichthyol.* 19: 94–98.
- Hoang, D.H., Sy, T.S., Hoa, H.T. 1998. Feeding behaviour and food of seahorses in Vietnam. *Marine Biology of the South China* 458–464.
- Hora, M.S.C., Joyeux, J.C. 2009. Closing the reproductive cycle: growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292: 37–41.
- Hood, W.G. 2004. Indirect environmental effects of dikes on estuarine tidal channels: thinking outside of the dike for habitat restoration and monitoring. *Estuaries* 27: 273-282.
- Hurtado, M.A., Racotta, I.S., Arcos, F., Morales-Bojórquez, E., Moal, J., Soudant, P., Palacios, E. 2012. Seasonal biochemical composition, fatty acids, and sterols in female *Crassostrea corteziensis* oysters in relation to the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 63B: 172–183.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197: 25–42.
- IUCN, 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4
- James, P. L. J., Heck, K. L. 2004. The effects of habitat complexity and light intensity on ambush predation within a simulated seagrass habitat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 176: 187–200.
- Job, S.D., Do, H.H., Meeuwig, J.J., Hall, H.J. 2002. Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda*. *Aquaculture* 214: 333–341.

- Job, S.D., Buu, D., Vincent, A.C.J. 2006. Growth and survival of the tiger tail seahorse, *Hippocampus comes*. *Journal of the World Aquaculture Society* 37: 322–327.
- Kaneda, T. 1991. *Iso-* and *anteiso-* fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiology Reviews* 55: 288–302.
- Kanou, K., Kohno, H. 2001. Early life history of a seahorse, *Hippocampus mohnikei*, in Tokyo Bay, Japan. *Ichthyological Research* 48: 361–368.
- Kelly, J.R., Scheibling, R.E. 2012. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Marine Ecology Progress Series* 446: 1–22.
- Kendrick, A.J., Hyndes, G.A. 2005. Variations in the dietary compositions of morphologically diverse syngnathid fishes. *Environmental Biology of Fishes* 72: 415–427.
- Kitsos, M.S., Tzomos, T., Anagnostopoulou, L., Koukouras, A. 2008. Diet composition of the seahorses, *Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1829 and *Hippocampus hippocampus* (L., 1758) (Teleostei, Syngnathidae) in the Aegean Sea. *Journal of Fish Biology* 72: 1259–1267.
- Koldewey, H. (Ed.). 2005. Seahorse Husbandry in Public Aquariums: 2005 Manual, with Chapters Contributed by Members of the Syngnathid Discussion Group. ZSL, London, UK. 137 pp.
- Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M. 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302: 131–152.
- Kolm, N., Ahnesjö, I. 2005. Do egg size and parental care coevolve in fishes? *Journal of Fish Biology* 66: 1499–1515.
- Kuiter, R.H. 2000. Seahorses, Pipefishes and their relatives. A comprehensive guide to Syngnathiformes. TMC Publishing, Chorleywood, UK. 240 p.

- Kvarnemo, C., Moore, G. I., Jones, A. G., Nelson, W. S., Avise, J. C. 2000. Monogamous pair bonds and mate switching in the Western Australian seahorse *Hippocampus subelongatus*. *Journal of Evol. Biology* 13: 882–888.
- Kvarnemo, C., Mobley, K. B., Partridge, C., Jones, A. G., Ahnesjo, I. 2011. Evidence of paternal nutrient provisioning to embryos in broad-nosed pipefish *Syngnathus typhle*. *Journal of Fish Biology* 78: 1725–1737.
- Leger P., Bengtson D.A., Simpson K.L. & Sorgeloos P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 24: 521–623.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Sorgeloos, P., Simpson, K.L., Beck, A.D. 1987. The nutritional value of *Artemia*: a review. In: Sogeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia* Research and its Applications. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universal Press, Wetteren, pp. 357–372.
- Lin, Q., Lu, J., Gao, Y., Shen, L., Cai, J., Luo, J. 2006. The effect of temperature on gonad, embryonic development and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus kuda*. *Aquaculture* 254 (1): 701–713.
- Lin, Q., Gao, Y., Sheng, J., Chen, Q., Zhang, B., Lu, J. 2007. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 262 (2): 481–492.
- Lin, Q., Lin, J., Lu J., Li B., 2008a. Biochemical Composition of Six Seahorse Species, *Hippocampus* sp., from the Chinese Coast. *Journal of the World Aquaculture Society* 39 (2): 225–234.
- Lin, Q., Lin, J., Zhang, D; 2008b. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 277: 287–292.

- Lin, Q., Lin, J. D., Zhang, D., Wang, Y. 2009a. Weaning of juvenile seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810 from live to frozen food. *Aquaculture* 291: 224–229.
- Lin, Q., Zhang, D., Lin, J. 2009b. Effects of light intensity, stocking density, feeding frequency and salinity on the growth of sub-adult seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 292: 111–116.
- Lin, Q., Lin, J., Huang, L. 2009c. Effects of substrate color, light intensity and temperature on survival and skin color change of juvenile seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 298: 157–161.
- Lin, Q., Lin, J., Wang, C. 2009d. Biochemical composition of the wild and cultured seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker and *Hippocampus trimaculatus* Leach. *Aquaculture Research* 40: 710–719.
- Lin, Q., Lin, J., Huang, L. 2010. Effects of light intensity, stocking density and temperature on the air-bubble disease, survivorship and growth of early juvenile seahorse *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture Research* 42: 91–98.
- Linton, J.R., Soloff, B.L. 1964. The Physiology of the Brood Pouch of the Male Sea Horse *Hippocampus erectus*. *Bulletin of Marine Sciences* 14: 45–61.
- Lourie, S.A., Vincent, A.C.J., Hall, H.J. 1999. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse. 214 p.
- Lourie, S.A., Foster, S.J., Cooper, E.W., Vincent, A.C.J., 2004. A guide to identification of seahorses. Project Seahorse and TRAFFIC North America. 114 p.
- Manajan A., Otja S., Bhaidwi S., 1997. Imbibition induced changes in antinutritional constituents and functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. toria) meal. *FASEB Journal* 11: 1104.

- Mancera, J.M., Pérez-Fígares, J.M., Fernández-Llebrez, P. 1994. Effect of cortisol on brackish water adaptation in the euryhaline gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* A107: 397–402.
- Martin-Smith, K.M., Vincent, A.C.J. 2005. Seahorse declines in the Derwent estuary, Tasmania, in the absence of fishing pressure. *Biol. Cons.* 123: 533–545.
- Masonjones, H.D., Lewis, S.M. 2000. Differences in potential reproductive rates of male and female seahorses related to courtship roles. *Animal Behaviour* 59: 11-20.
- Masonjones, H.D., 2001. The effect of social context and reproductive status on the metabolic rates of dwarf seahorses (*Hippocampus zosterae*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 129 (2-3): 541–555.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R. 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134: 101–112.
- Meeuwig, J.J., Do, H.H., Truong, S.K., Job, S.D., Vincent, A.C.J. 2006. Quantifying nontarget seahorse fisheries in central Vietnam. *Fish. Res.* 81: 149–157.
- Mi, P.T., Kornienko, E.S., Drozdov, A.L. 1998. Embryonic and larval development of the seahorse *Hippocampus kuda*. *Russian Journal of Marine Biology* 24: 325–329.
- Monteiro, N.M., Almada, V.C., Santos, A.M., Vieira, M.N. 2001. The breeding ecology of the pipefish *Nerophis lumbriciformis* and its relation to latitude and water temperature. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81: 1031–1033.
- Monteiro, N.M., Almada, V.C., Vieira, N.M. 2005. Implications of different brood pouch structures in syngnathid reproduction. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 1235–1241.

- Morgan, S.K., Vincent, A.C.J. 2007. The ontogeny of habitat associations in the tropical tiger tail seahorse *Hippocampus comes* Cantor, 1850. *Journal of Fish Biology* 71: 701–724.
- Mourente G., Tocher D.R., Sargent J.R. 1991. Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. *Lipids* 26: 871–877.
- Mourente, G., Rodriguez, A., Sargent, J.R. 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid composition and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112: 79–98.
- Mourente G., Rodríguez A., Grau A., Pastor E. 1999. Utilization of lipids by *Dentex dentex* L. (Osteichthyes, Sparidae) larvae during lecithotrophia and subsequent starvation. *Fish Physiology and Biochemistry* 21: 45–58.
- Narciso, L. 2000. Biologia e Cultivo de *Artemia* sp. (Crustacea, Branchiopoda): sua Utilização em Aquacultura. Prémio do Mar Rei D. Carlos 1998. Câmara Municipal de Cascais. 94pp.
- Navarro J.C., Amat E, Sargent J.R. 1991. A study of the variations in lipid levels, lipid class composition and fatty acid composition in the first stages of *Artemia* sp. *Marine Biology* 111: 461-465.
- Navarro, J. C., Henderson, R. J., McEvoy, L. A., Bell, M. V., Amat, F. 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174: 155–166.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc Natl Acad Sci.* 106(36): 15103-10.

- Olivotto, I., Avella, M.A., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro Ruiz, P., Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: rearing and feeding studies. *Aquaculture* 283: 92–96.
- Olivotto, I., Di Stefano, M., Rosetti, S., Cossignani, L., Pugnali, A., Giantomassi, F., Carnevali, O. 2011. Live prey enrichment, with particular emphasis on HUFAs, as limiting factor in false percula clownfish (*Amphiprion ocellaris*, Pomacentridae) larval development and metamorphosis: molecular and biochemical implications. *Comp. Biochem. Physiol.* 159: 207–218.
- Ortega-Salas, A., Reyes-Bustamante, H. 2006. Fecundity, survival, and growth of the seahorse *Hippocampus ingens* (Pisces: Syngnathidae) under semi-controlled conditions. *Rev. Biol. Trop.* 54 (4): 1099–1102.
- Otero-Ferrer, F., Molina, L., Socorro, J., Herrera, R., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. 2010. Live prey first feeding regimes for short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture Research* 41: 8–19.
- Paczolt, K. A., Jones, A. G. 2010. Post-copulatory sexual selection and sexual conflict in the evolution of male pregnancy. *Nature* 464: 401–404.
- Palacios, E., Bonilla, A., Luna, D. and Racotta. 2004. Survival, Na⁺/K⁺-ATPase and lipid response to salinity challenge in fed and starved white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture* 234(1-4): 497–511
- Palacios, E., Racotta, I.S., Aparicio, B., Arjona, O., Martínez-Palacios, C. 2007. Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. *Fish Physiology and Biochemistry* 33: 81–91.

- Pauly, D. 1998. Tropical fishes: patterns and propensities. *Journal of Fish Biology* 53: 1–17.
- Payne, M.F., Rippingale, R.J., Longmore, R.B. 1998. Growth and survival of juvenile pipefish *Stigmatopora argus* fed live copepods with high and low HUFA content. *Aquaculture* 167: 237–245.
- Payne, M.F., Rippingale, R.J. 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture*, 188 (3): 353-361.
- Perante, N.C., Pajaro, M.G., Meeuwig, J.J., Vincent, A.C.J. 2002. Biology of a seahorse species *Hippocampus comes* in the central Philippines. *Journal of Fish Biology* 60: 821–837.
- Perry, A.L., Lunn, K.E., Vincent, A.C.J. 2010. Fisheries, large-scale trade, and conservation of seahorses in Malaysia and Thailand. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 20: 464–475.
- Planas, M., Chamorro, A., Quintas, P., Vilar, A. 2008. Establishment and maintenance of threatened long-snouted seahorse, *Hippocampus guttulatus*, broodstock in captivity. *Aquaculture* 283: 19–28.
- Planas, M., Quintas, P., Chamorro, A., Silva, C. 2010. Female maturation, egg characteristics and fatty acids profile in the seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Animal Reproduction Science* 122: 66–73.
- Poortenaar, C.W., Woods, C.M.C., James, P.J., Giambartolomei, F.M., Lokman, P.M. 2004. Reproductive biology of female big-bellied seahorses. *J. Fish Biol.* 64: 717–725.

- Rainuzzo, J.R., H.I. Reitan, Y. Olsen. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*. 155: 103-115 p.
- Reuss N., Poulsen L.K. 2002. Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland. *Mar Biol*. 141: 423–434.
- Ripley, J. L., Foran, C. M. 2009. Direct evidence for embryonic uptake of paternally derived nutrients in two pipefishes (Syngnathidae: *Syngnathus* spp.). *Journal of Comparative Physiology* 179: 325–333.
- Roman, J., Palumbi, S.R. 2003. Whales before whaling in the North Atlantic. *Science* 301: 508–510.
- Rosa, I.M.L., Alves, R., Bonifácio, K., Mourao, J., Osorio, F., Oliveira, T., Nottingham, M. 2005. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 1 (12): 1-15.
- Rupp-Armstrong, S., Nicholls, R.J. 2007. Coastal and Estuarine Retreat: A Comparison of the Application of Managed Realignment in England and Germany. *Journal of Coastal Research* 23: 1418-1430.
- Russell, I. A. 1994. Mass mortality of marine and estuarine fish in the Swartvlei and Wilderness Lake Systems, Southern Cape. *South African Journal of Aquatic Sciences* 20: 93–96.
- Sagebakken, G., Ahnesjo, I., Mobley, K. B., Braga Goncalves, I., Kvarnemo, C. 2010. Brooding fathers, not siblings, take up nutrients from embryos. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 971–977.

- Sandoval-Muy, M.I. 2006. Efecto de la dieta congelada sobre la reproducción y la calidad de los juveniles del caballito de mar del Pacífico *Hippocampus ingens* (Girard, 1859) en México. Tesis de Doctorado. CICESE, Ensenada, México. 146 p.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155: 117–127.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., McEvoy, L.A., Tocher, D., Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177: 191-199.
- Sargent, J., L., Tocher, Bell, G., 2002. The Lipids. In Halver, J.E. and Hardy R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Third Edition.
- Schindler, D. E., Scheuerell, M. D., Moore, J. W., Gende, S. M., Francis, T. B., Palen, W. J. 2003. Pacific salmon and the ecology of coastal ecosystems. *Frontiers Ecol. Env.* 1 (1): 31–37.
- Selman, K., Wallace, R.A., Player, D. 1991. Ovary of seahorse, *Hippocampus erectus*. *Journal of Morphology* 209: 285–304.
- Shapawi R., Purser G.J. 2003. The value of enriched *Artemia* in supporting growth and survival of juvenile pot-bellied seahorses *Hippocampus abdominalis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34: 533–541.
- Sheng, J.Q., Lin, Q., Chen, Q.X., Gao, Y., Shen, L., Lu, J.Y. 2006. Effects of food, temperature and light intensity on the feeding behavior of three-spot juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach. *Aquaculture* 256: 596–607.
- Sheng, J.Q., Lin, Q., Chen, Q.X., Shen, L., Lu, J.Y. 2007. Effect of starvation on the initiation of feeding, growth and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach and *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 271: 469–478.

- Shokri, M.R., Gladstone, W., Jelbart, J. 2009. The effectiveness of seahorses and pipefish (Pisces: Syngnathidae) as a flagship group to evaluate the conservation value of estuarine seagrass beds. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 19: 588–595.
- Sogabe, A., Matsumoto, K., Ohashi, M. Watanabe, A., Takata, H., Murakami, Y., Omori, K., Yanagisawa, Y. 2008. A monogamous pipefish has the same type of ovary as observed in monogamous seahorses. *Biology Letters* 4: 362–365.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200: 147–159.
- Spieler, R.E. 1992. Feeding-entrained circadian rhythms in fishes. In: Ali, M.A. (Ed.), *Rhythms in Fishes*, pp. 137–146.
- Storero, L.P, González, R. 2008. Prey Selectivity and Trophic Behavior of the Patagonian Seahorse, *Hippocampus patagonicus*, in Captivity. *J. World Aquaculture Society* 40(3): 394– 401.
- Tapia, F.U., Herrera-Silveira, J.A., Aguirre-Macedo, M.L. 2008. Water quality variability and eutrophic trends in karstic tropical coastal lagoons of the Yucatán Peninsula. *Est. Coast. Shelf Sci.* 76: 418–430.
- Teixeira, R.L., Musick, J.A. 2001. Reproduction and food habits of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Teleostei: Syngnathidae) of Chesapeake Bay, Virginia. *Rev. Brasil. Biol.* 61(1): 79–90.
- Teske, P.R., Beheregaray, L.B. 2009. Evolution of seahorses' upright posture was linked to Oligocene expansion of seagrass habitats. *Biology Letters* 5: 521–523.
- Tocher, D.R., Agaba, M., Hastings, N., Teale, A.J. 2003. Biochemical and molecular studies of the polyunsaturated fatty acid desaturation pathway in fish. pp. 211-227 In: Browman, H. I. and Berit S., A (Eds.), *The Big Fish Bang*. Proceedings of the

- 26th Annual Larval Fish Conference. Institute of Marine Research, Bergen, Norway. 211–227.
- Trushenski J., Schwarz M., Bergman A., Rombenso A., Delbos B. 2012. DHA is essential, EPA appears largely expendable, in meeting the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid requirements of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 326: 81–89.
- Tuncer H., Harrell R. M. 1992. Essential fatty acid nutrition of larval striped bass *Morone saxatilis* and palmetto bass (*M. Saxatilis* x *M. Chrysops*). *Aquaculture* 101: 105–121.
- Valdés-Lozano, D.S., Ceja-Moreno, V., Zapata-Pérez, O., Real de León, E. 1994. Comportamiento de salinidad de la laguna de Chelem, Yucatán. *Oceanología*, 2: 61–75.
- Valencia-Betancourt, R., Mendez-Carranco, T. Aparicio-Simon, B., Martínez-Palacios, C. A., Palacios, E., Racotta, I. 2004. Influence of rotifer enrichment on growth and survival of White fish (*Chirostomaestor*) larvae from Patzcuaro lake (Mexico). *Aquaculture Europe*, 2004.
- Van Anholt R.D., Koven W.M., Lutzky S.E., Bonga, W. 2004. Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparusaurata*) larvae. *Aquaculture* 238: 369–383.
- Van Handel E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry* 11: 256–265.
- Vincent, A.C.J. 1994. Operational sex ration in seahorses. *Behaviour* 128 (1-2): 153-167.
- Vincent, A.C.J., Sadler, L.M. 1995. Faithful pairbonds in wild seahorses, *Hippocampus whitei*. *Animal Behaviour* 50: 1557–1569.

- Vincent, A.C. J., Giles, B. G. 2003. Correlates of reproductive success in a wild population of *Hippocampus whitei*. *Journal of Fish Biology* 63: 344–355.
- Vincent, A.C.J., Evans, K. L., Marsden, A.D. 2005. Home range behaviour of the monogamous Australian seahorse, *Hippocampus whitei*. *Environmental Biology of Fishes* 72: 1–12.
- Vite-García, N., Alexandre, D., Martínez, G., Mascaró, M., Simoes, N. 2009. First feeding captive seahorse *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) using *Artemia* and freshwater amphipods. World Aquaculture Society, Book of Abstracts, World Aquaculture 2009, Veracruz (México), September 25–29. p. 330
- Vite-García, N., Simoes, N., Arjona, O., Mascaró, M., Palacios, E. 2014. Growth and survival of *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) juveniles fed on *Artemia* with different HUFA levels. *Lat Am J Aquat Res.* 42: 150–159.
- Vite-García N., Arjona O., Morales-Bojorquez E., Mascaró M., Simoes N., Palacios E., 2014. Assessment of lipid classes and fatty acid levels in wild newborn seahorses (*Hippocampus erectus*) (Perry 1810): implications for survival and growth in aquarium culture. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology.* 47(6): 401–413.
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *Journal of World Aquaculture Society*, 24(2): 152–161.
- Whitfield, A. K. 1995. Threatened fishes of the world: *Hippocampus capensis* Boulenger, 1990 (Syngnathidae). *Environmental Biology of Fishes* 44: 362.
- Willadino, L., Souza-Santos, L., Mélo, R., Brito, A.P., Barros, N., Araújo-Castro, C., Galvão, D., Gouveia, A., Regis, C., Cavalli, R. 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture* 360-361: 10–16.

- Wilson, M.J., Vincent, A.C.J. 1998. Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity. *Aquarium Sciences and Conservation* 2: 179–196.
- Wilson, Z., Carter, C.G., Purser, G.J. 2006. Nitrogen budgets for juvenile big-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis* fed *Artemia*, mysids or pelleted feeds. *Aquaculture*, 255 (1): 233–241.
- Wong, J.M, Benzie, J.A.H. 2003. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture* 228 (1): 107–121.
- Woods, C.M.C. 2000. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). *Aquaculture* 190 (3): 377–388.
- Woods, C.M.C. 2003a. Growth and survival of juvenile seahorse *Hippocampus abdominalis* reared on live, frozen and artificial foods. *Aquaculture* 220: 287–298
- Woods, C.M.C. 2003b. Effects of varying *Artemia* enrichment on growth and survival of juvenile seahorses, *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture* 220: 537–548.
- Woods, C.M.C. 2003c. Effect of stocking density and gender segregation in the seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture* 218: 167–176.
- Wootton, R. J. 1990. Ecology of Teleost Fishes. Chapman & Hall: London, U.K.
- Wright, K.A., Woods, C.M.C., Gray, B.E., Lokman, P.M. 2007. Recovery from acute, chronic and transport stress in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Journal of Fish Biology* 70: 1447–1457.

- Yin, F., Tang, B. 2012. Lipid metabolic response, peroxidation, and antioxidant defence status of juvenile lined seahorse, *Hippocampus erectus*, fed with highly unsaturated fatty acids enriched *Artemia metanauplii*. *J. World Aquacult. Soc.* 43: 716–726.
- Zheng F., Takeuchi T., Yoseda K., Kobayashi M., Hirokawa J., Watanabe T. 1996. Requirement of larval cod for arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, and docosahexaenoic acid using by their enriched *Artemia* nauplii. *Nippon Suisan Gakkaishi* 62: 669–676.

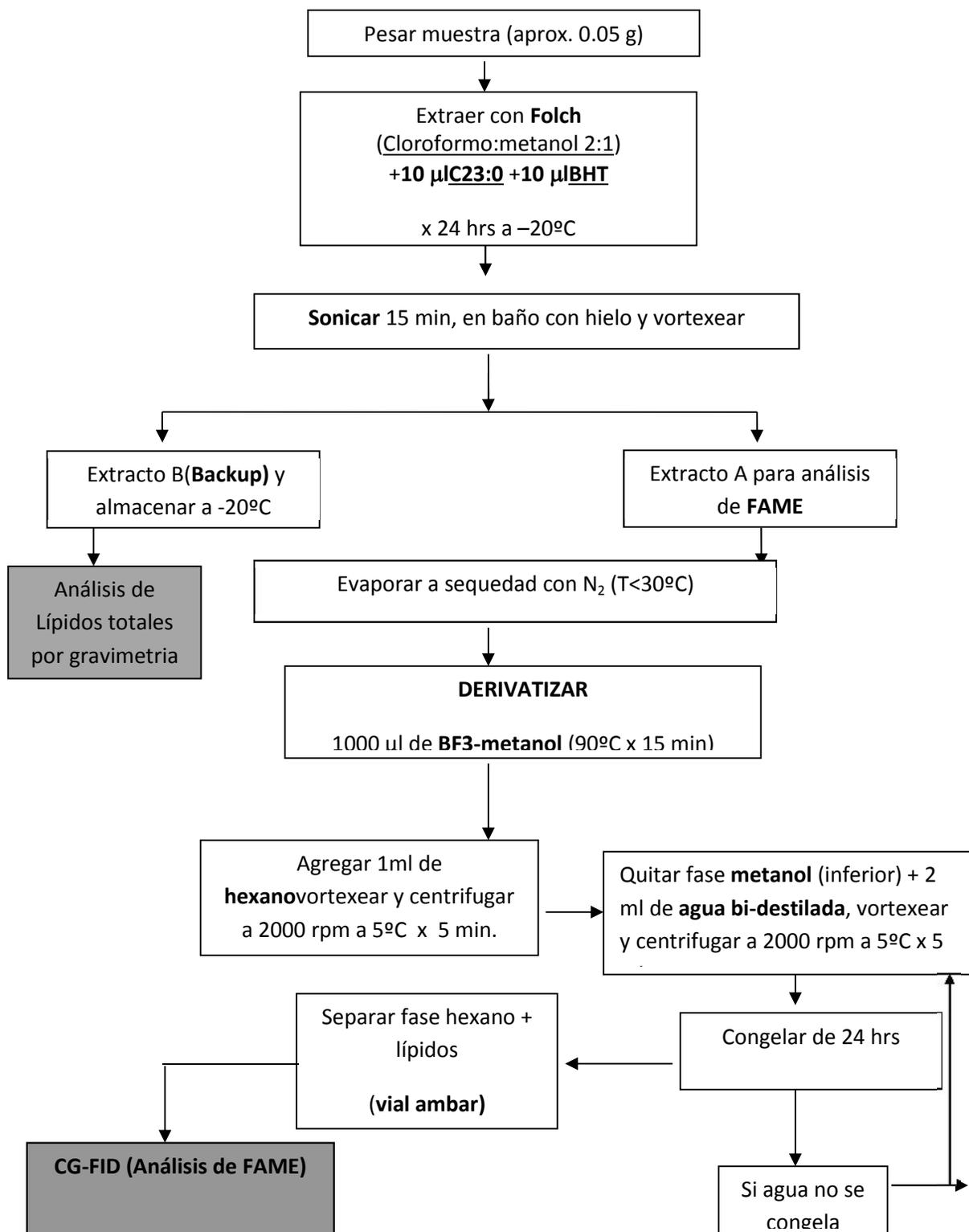
ANEXO I: ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

Los ácidos grasos fueron determinados utilizando el método descrito para peces por Palacios et al. (2007), con algunas modificaciones tomando en cuenta las placas óseas de los caballitos como se describe a continuación: los caballitos fueron abiertos longitudinalmente y cortados en 4 segmentos transversales con un bisturí, y fueron puestos en viales de vidrio y se agregó 6 ml de Cloroformo:Metanol, BHT, y 23:0, en las mismas concentraciones mencionadas anteriormente. Los segmentos fueron macerados directamente en el solvente utilizando un mortero de vidrio; los viales fueron sellados con N₂ y fueron dejados por 24 hrs para su extracción.

Una porción de este extracto fue utilizada para el análisis de ácidos grasos como se describe en Palacios et al. (2007), utilizando trifloruro de boro (14% BF₃ metanol, Supelco) para la derivatización, y un cromatógrafo de gases (G890N, Agilent Technologies, Shanghai, China), equipado con una columna de sílice DB-23 (30 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de grosor de la capa), un detector de ionización de flama con helio como gas portador (0.7 ml/min), y una rampa de temperatura de 110 a 220°C para la separación de los ácidos grasos metil ésteres.

Los ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención con una mezcla de 37 estándares (Sigma, Bellefonte, PA, USA), y los estándares individuales para ácidos grasos ramificados y de bacterias (Matreya LLC, Pleasant Gap, PA, USA), 22:5n-3, (Sigma, Bellefonte, PA, USA), y 18:5n-3 identificado de *Isochrysis galbana* (T-Iso). La cuantificación fue realizada calculando la pérdida de una cantidad conocida de un estándar interno.

DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS METIL ESTERIFICADOS



MÉTODO FAME-EPM.M

6890 GC METHOD

OVEN

Initial temp: 110 °C

Initial time: 3.30 min

Maximum temp: 250°C

Equilibration time: 2.00 min

Ramps:

#	Rate (°C)	Final temp (°C)	Final time
1	30	165	2.00
2	1.40	220	10

Post temp: 50°C

Post time: 0.00 min

Run time: 56.42

FRONT INLET

Mode: Splitless

Initial temp: 260°C (On)

Pressure: 12.97 psi (On)

Purge flow: 20.1 mL/min

Purge time: 0.70 min

Total flow: 24.1 mL/min

Gas saver: On

Saver flow: 15.0 mL/min

Saver time: 2.00 min

Gas type: Helium

COLUMN 1

Capillary column

Model Number: J & W Scientific (Agilent) 122-2332

DB23 (50% cyanopropyl-methylpolysiloxane)

Max temperatura: 250°C

Nominal length: 30.0 m

Nominal diameter: 250 µm

Nominal film thickness: 0.25 µm

Mode: Constant flow

Initial flow: 0.8 mL/min

Nominal initial pressure: 12.99 psi

Average velocity: 24.0 cm/sec

Inlet: Front Inlet

Outlet: Front detector

Outlet: pressure: ambient

FRONT DETECTOR (FID)

Temperature: 280°C (On)
Hydrogen flow: 40.0 mL/min (On)
Air flow: 380.0 mL/min
Mode: Constant column + makeup flow
Combined flow: 45.0 mL/min
Make flow: On
Makeup Gas Type: Nitrogen
Flame: On
Electrometer: On
Lit offset: 2.0

CG INJECTOR

Front Injector:
Sample Washes 2
Sample Pumps 2
Injection Volume 1.0 microliters
Syringe Size 10.0 microliters
Post Inj Solvent A Washes 3
Post Inj Solvent B Washes 2
Viscosity Delay 0 seconds
Plunger Speed Fast
Pre Injection Dwell 0.00 minutes
Post Injection Dwell 0.00 minutes

Tabla A. Composición y contenido de estándares externos FAME-37 (Sigma)

	FAME	Conc. µg/ml
1	4:0	20
2	6:0	20
3	8:0	20
4	10:0	20
5	11:0	10
6	12:0	20
7	13:0	10
8	14:0	20
9	14:1	10
10	15:0	10
11	15:1	10
12	16:0	30
13	16:1	10
14	17:0	10
15	17:1	10
16	18:0	20
17	18:1n-9 <i>trans</i>	10
18	18:1n-9 <i>cis</i>	20
19	18:2n-6 <i>trans</i>	10
20	18:2n-6 <i>cis</i>	10
21	20:0	20
22	18:3n-6	10
23	20:1	10
24	18:3n-3	10
25	21:0	10
26	20:2	10
27	22:0	20
28	20:3n-6	10
29	22:1n-9	10
30	20:3n-3	10
31	20:4n-6	10
32	23:0	10
33	22:2	10
34	24:0	20
35	20:5n-3	10
36	24:1	10
37	22:6n-3	10

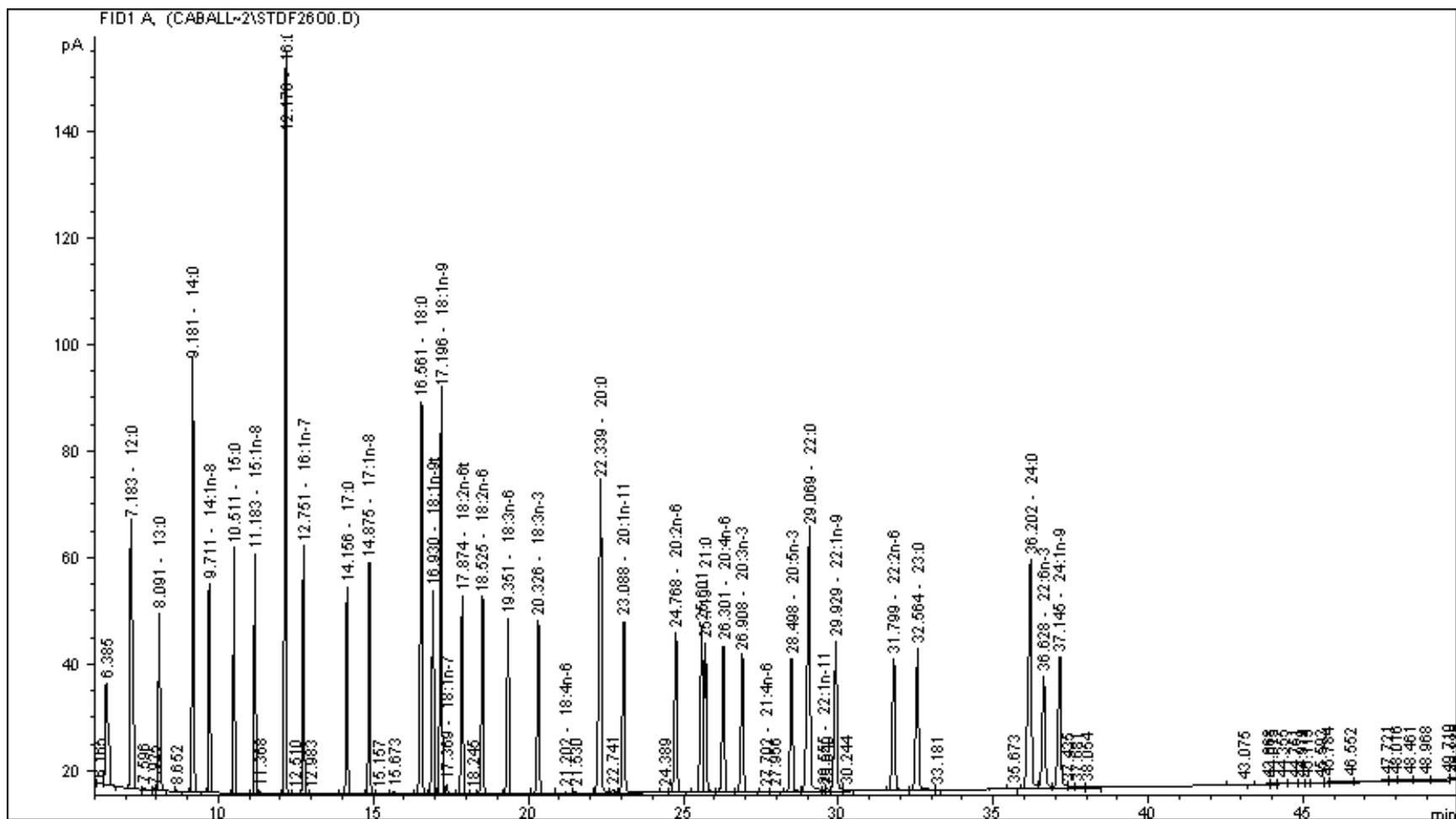


Fig.A. Cromatograma de los tiempos de retención del estándar externo FAME-37 (Sigma)

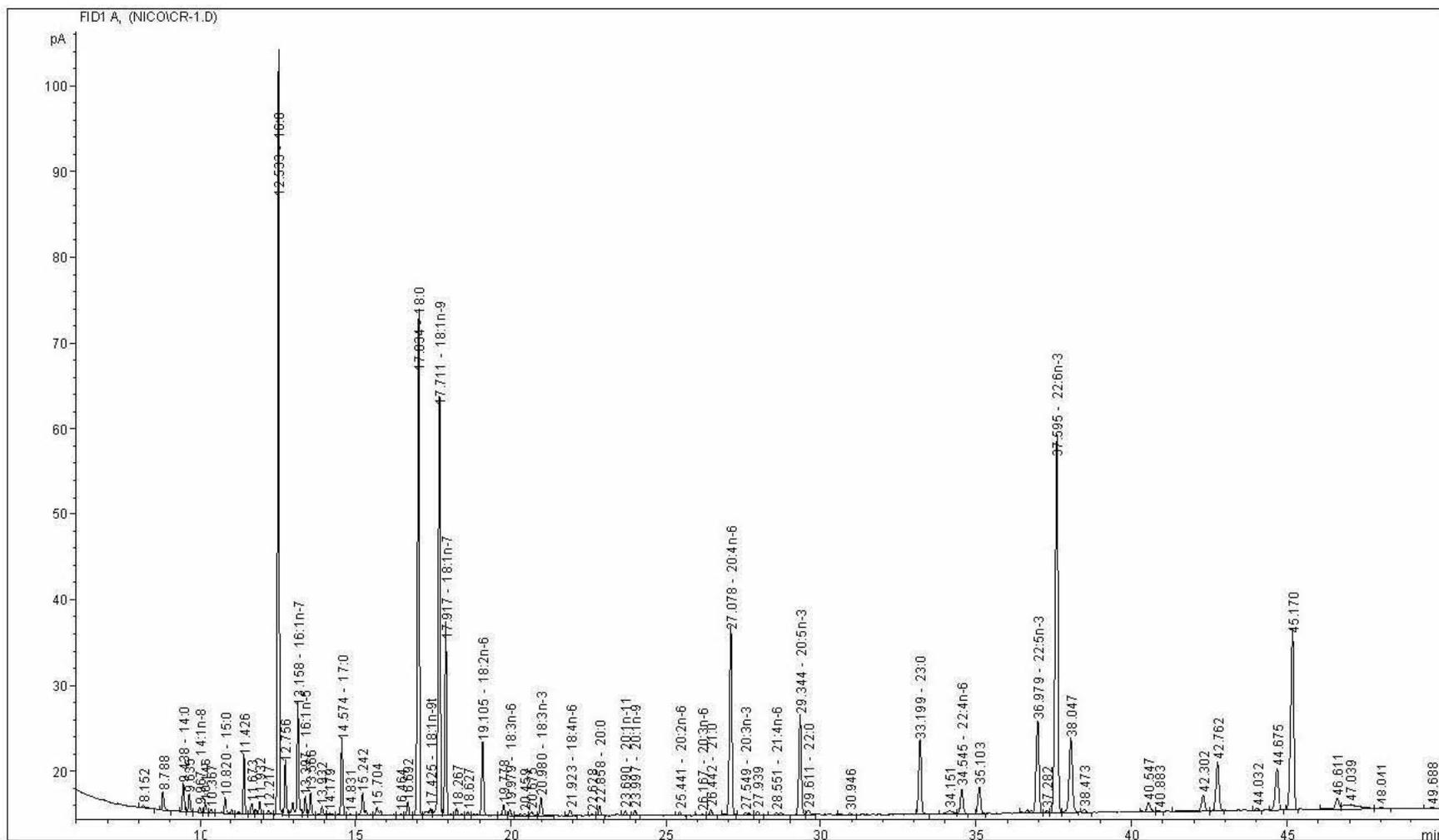


Fig.B. Cromatograma de los tiempos de retención de una muestra de juvenil de caballo

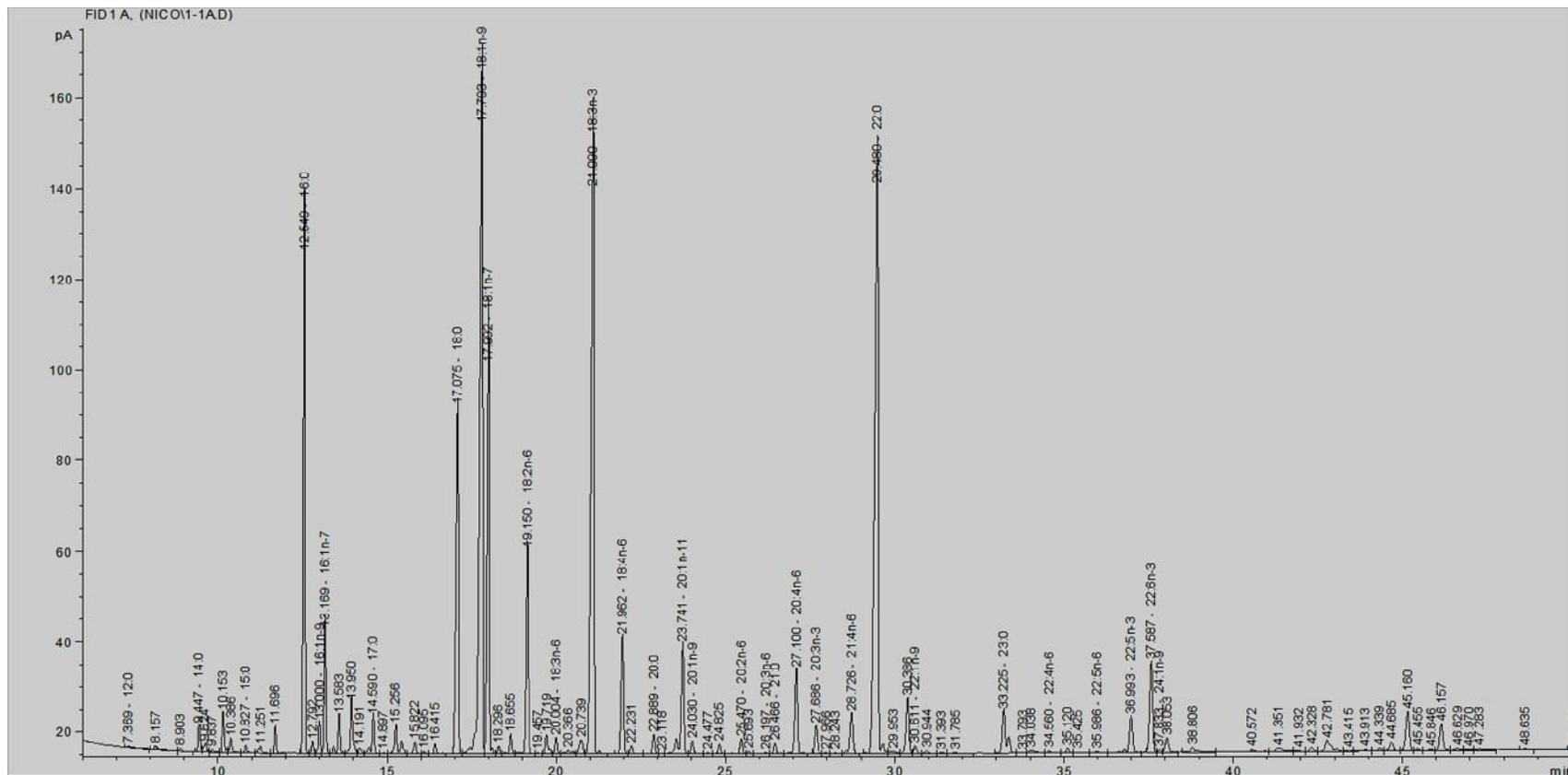


Fig.C. Cromatograma de los tiempos de retención de una muestra de *Artemia*

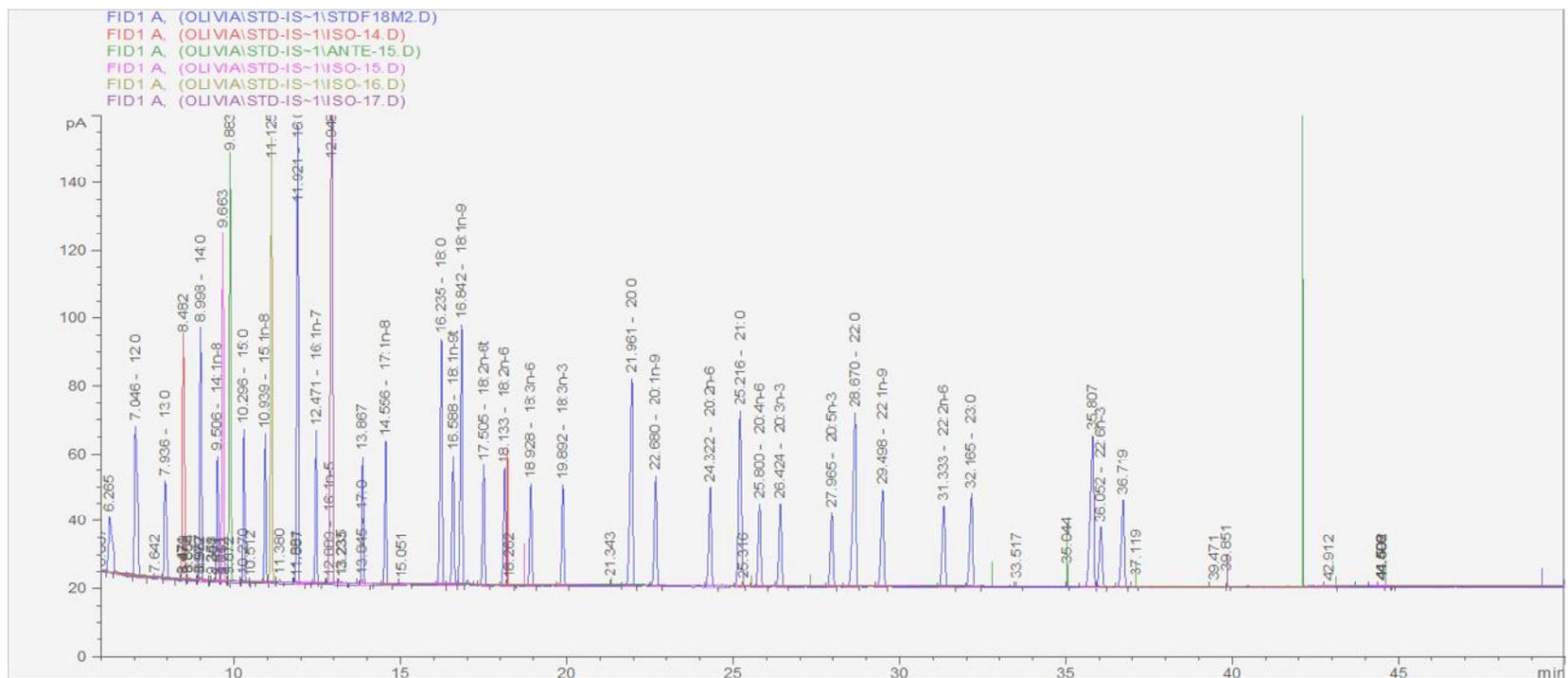


Fig. D. Cromatograma de los tiempos de retención de estándares de ácidos grasos con configuración iso/anteiso

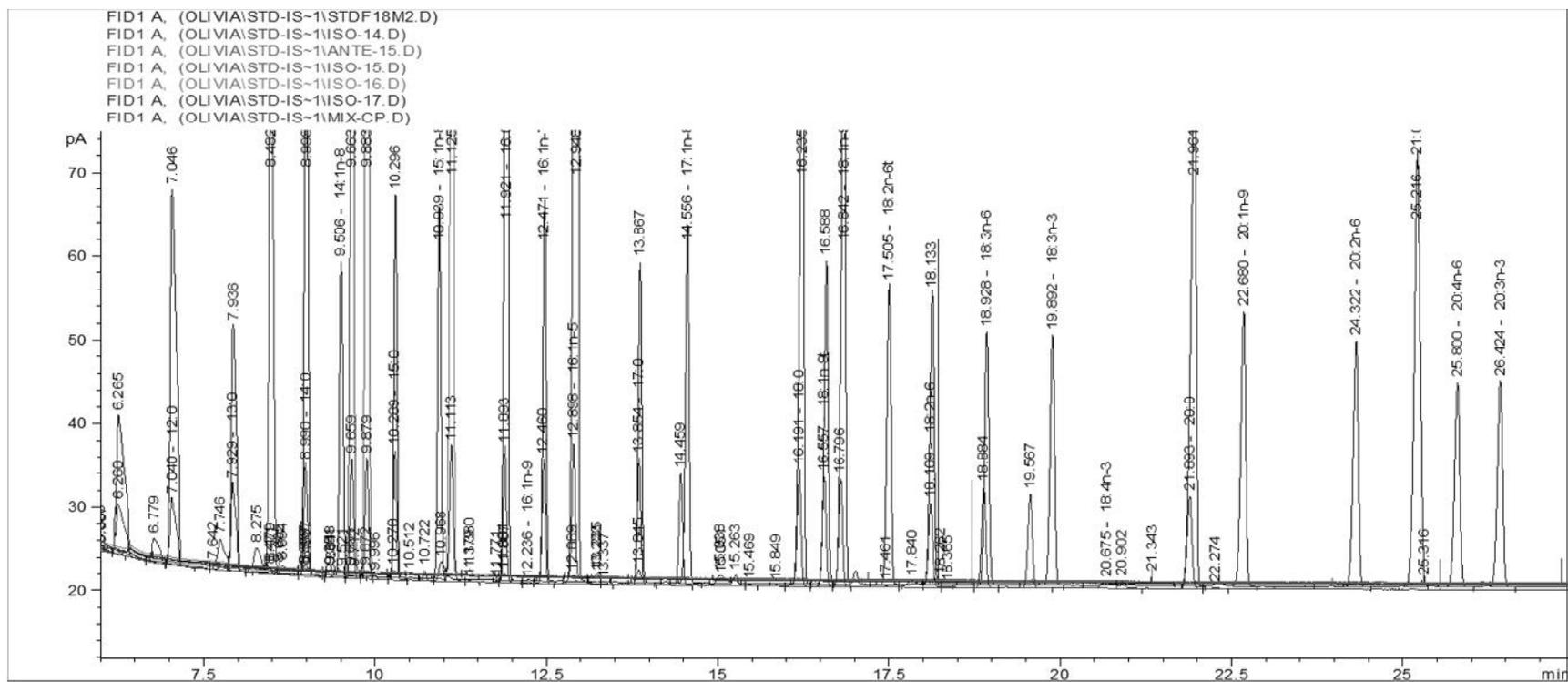


Fig. E. Cromatograma de los tiempos de retención de estándares de ácidos grasos con configuración iso/anteiso.

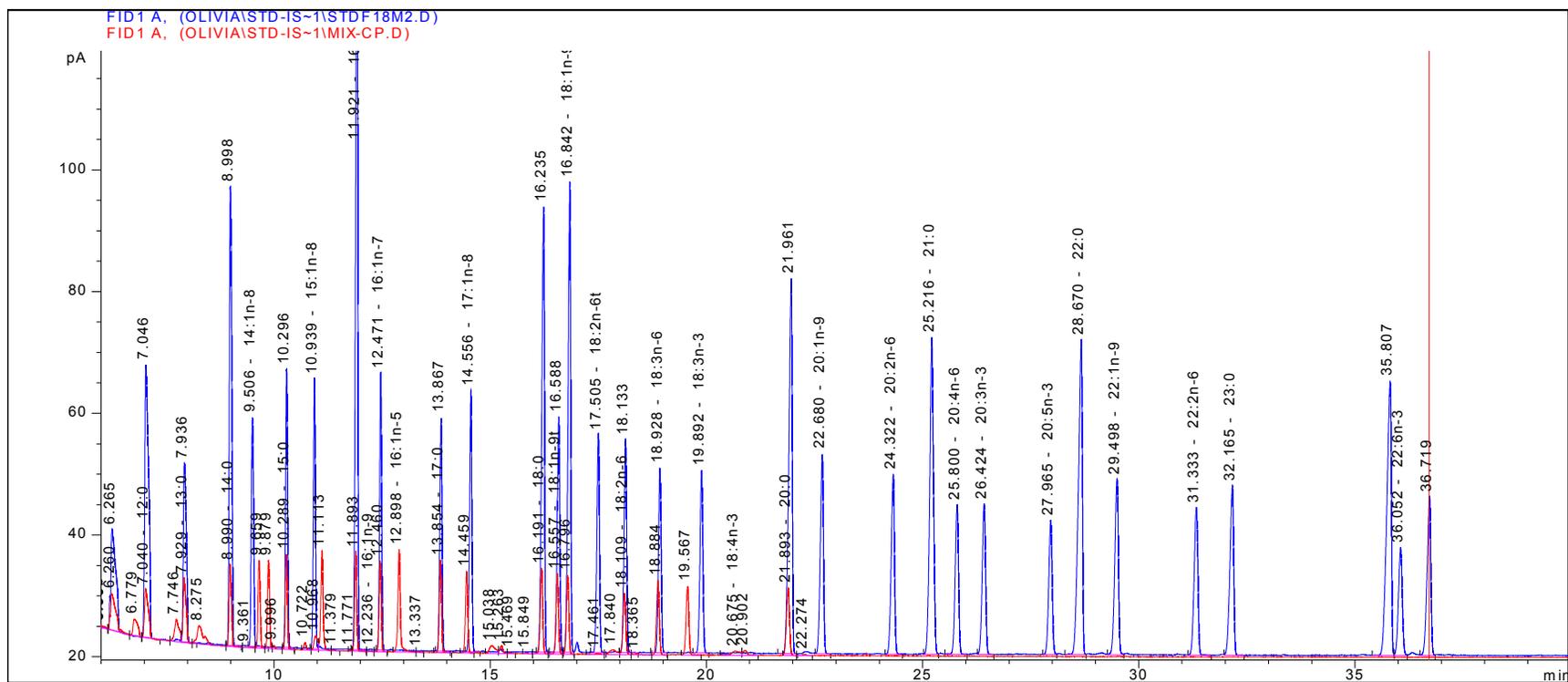


Fig. F. Cromatograma de los tiempos de retención de una mezcla de estándares de ácidos grasos con configuración iso/anteiso.

Research Article

Growth and survival of *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) juveniles fed on *Artemia* with different HUFA levels

**Nicolás Vite-García^{1,2,4}, Nuno Simoes², Olivia Arjona³
Maite Mascaro² & Elena Palacios³**

¹Programa de Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México

²Programa de Investigación en Ecología y Cultivo de Especies Marinas de Ornato (PIECEMO)

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, Yucatán, México

³Programa de Acuicultura, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, BCS, C.P. 23096 México

⁴Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Agropecuarias

Villahermosa, Tabasco, C.P. 86280, México

ABSTRACT. Survival during first months after birth is one of the bottlenecks for consolidating the seahorse farming industry. In this work, *Artemia* metanauplii enriched with two highly unsaturated fatty acids (HUFA) rich commercial emulsions with different docosahexaenoic acid (DHA) levels (63% and 14% of total lipids), a vegetable oil with no DHA, and non-enriched *Artemia* as control, were used to feed 5-day-old juvenile *Hippocampus erectus* for 60 days. Enriched *Artemia* had similar levels of DHA (13% and 9%), despite great differences of DHA in the emulsions, with traces of DHA in non-enriched and vegetable oil enriched *Artemia*. More than 20% of DHA was found in 24 h starved juveniles fed both DHA-enriched treatments, similar to values in newly born juveniles, but those fed vegetable oil enriched *Artemia* or non-enriched *Artemia* had 5% of DHA. Total lipid and protein levels were similar in juveniles from the four treatments. The n-3/n-6 ratio was almost four-fold higher in seahorses fed DHA-enriched treatments compared to juveniles fed the non-enriched treatments. Survival of seahorses only partially reflected the DHA levels: it was lower in the vegetable oil treatment, similar in the seahorses fed *Artemia* with higher DHA and in the control treatment, and higher in seahorses fed the HUFA-enriched *Artemia* with lower DHA levels, although growth was similar in the two DHA-enriched *Artemia* treatments. Juvenile *H. erectus* seahorses perform better when they have at least 20% of DHA in their tissues, and these levels can be attained with no more than 14% of DHA in emulsions, eliminating the need for more expensive emulsions with higher DHA levels.

Keywords: *Hippocampus erectus*, seahorse, DHA, growth, fatty acids, survival, aquaculture.

Crecimiento y sobrevivencia de juveniles de *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) alimentados con *Artemia* con diferentes niveles de HUFA

RESUMEN. La sobrevivencia durante los primeros meses de vida es uno de los cuellos de botella para la consolidación de la industria del cultivo del caballito de mar (*Hippocampus erectus*). En este trabajo se utilizaron metanauplios enriquecidos con dos emulsiones comerciales, con diferentes niveles de ácido docosahexaenóico (DHA) (63% y 14%), con aceite vegetal sin DHA, y metanauplios sin enriquecimiento como control, para alimentar caballitos de mar de 5 días de vida durante 60 días. La *Artemia* enriquecida tuvo niveles similares de DHA (13% y 9%), a pesar de las grandes diferencias en las emulsiones, con trazas de DHA en la *Artemia* no enriquecida y la enriquecida con aceite vegetal. Se obtuvo más de 20% de DHA en juveniles, muestreados con 24 h de ayuno, de los tratamientos con enriquecimiento de DHA, con valores similares a los de caballitos recién nacidos, pero los caballitos que se alimentaron con *Artemia* enriquecida con aceite vegetal y con *Artemia* no enriquecida tuvieron 5% de DHA. Los lípidos y proteínas totales fueron similares en los caballitos de los cuatro tratamientos. La razón n-3/n-6 fue casi cuatro veces mayor en caballitos alimentados con los tratamientos ricos en DHA comparados con los otros dos tratamientos. La sobrevivencia de caballitos de mar estuvo reflejada parcialmente por los niveles de DHA: fue mínima en caballitos del tratamiento de aceite vegetal, intermedia y similar en caballitos del tratamiento control y en los del tratamiento con enriquecimiento de HUFA (ácidos grasos altamente insaturados) con mayores niveles de DHA, y resultó máxima en caballitos del tratamiento enriquecido con HUFA con menores niveles de DHA.

Juveniles de *H. erectus* tienen un mejor desempeño cuando tienen en sus tejidos 20% de DHA, y estos niveles pueden ser alcanzados con no más de 14% de DHA en las emulsiones, eliminando la necesidad de utilizar emulsiones con mayores niveles de este ácido graso, que tienen un precio más elevado.

Palabras clave: *Hippocampus erectus*, caballito de mar, DHA, ácidos grasos, crecimiento, sobrevivencia, acuicultura.

Corresponding author: Nicolás Vite (nic.vite@gmail.com)

INTRODUCTION

Seahorses have low fertility, defined social structures (strict monogamy in many species), low mobility, small home ranges, limited distribution, and close association with habitat, traits that cause their populations to be highly vulnerable to human impact on the coastal zone they inhabit (Foster & Vincent, 2004; Vincent *et al.*, 2005). *Hippocampus erectus* populations in the Gulf of Mexico are affected mainly by-catch (Baum *et al.*, 2003), but also by habitat degradation, and capture for trade. Among the protective measures proposed for seahorse protection are trade restriction of wild specimens (included in Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna CITES appendix II), establishment of protection zones, environmental education for raising awareness of populations in coastal areas, and more recently, implementation of aquaculture programs. Seahorse culture can be a partial solution to replace wild animal capture and provide alternative economic opportunities to fishermen in developing countries (Payne & Rippingale, 2000; Job *et al.*, 2006; Koldewey & Martin-Smith, 2010). Substantial efforts have been made to develop a suitable technology to culture different species of seahorses worldwide (Wilson & Vincent, 1998; Woods, 2000; Job *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Planas *et al.*, 2008), but one of the biggest bottlenecks for the development of the seahorse culture industry is still low survival of young seahorses, frequently attributed to inadequate nutrition of broodstock and brood.

Seahorses are gestated by the male. When they are born, they are referred to as juveniles and are an exact replica of the adult, which is a considerable advantage, because, contrary to most other cultured fish, newborn seahorses have a relatively large mouth; in the case of *H. erectus*, juveniles can be fed on *Artemia* metanauplii, avoiding the need of other live prey (Vite-García *et al.*, 2009). An additional advantage of *Artemia* metanauplii is that they can be easily enriched using oils and emulsions (Leger *et al.*, 1986). Enrichment of *Artemia* to feed juvenile seahorses is

important, because it is not known if juvenile seahorses can synthesize long-chained highly unsaturated fatty acids (HUFA) from shorter precursors (PUFA: polyunsaturated fatty acids). Most marine fish studied so far cannot synthesize HUFA, and freshwater fish that can, are not able to in early stages of larval development (Sargent *et al.*, 2002). *H. hippocampus* broodstock fed a docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) depleted diet produce newborns that have 7% of DHA, compared to 16% in broodstock fed mysids with more DHA (Otero-Ferrer *et al.*, 2012). Newly born seahorse have high levels of HUFA, particularly DHA with levels above 20% relative to total fatty acids in *H. kuda* (Saavedra *et al.*, 2013) and levels of 16-17% for *H. guttulatus* (Faleiro & Narciso, 2011, 2013). These high DHA levels decrease as juveniles grow if given a DHA-depleted diet, as is the case with non-enriched *Artemia* nauplii, and this decrease has been associated to a decrease in survival (Chang & Southgate, 2001; Shapawi & Purser, 2003; Wong & Benzie, 2003), with the exception of juvenile *H. guttulatus*, which did worse when fed with enriched *Artemia* nauplii (Palma *et al.*, 2011). Consequently, most studies use enriched *Artemia* metanauplii as a standard for seahorse juvenile culture (Chang & Southgate, 2001; Lin *et al.*, 2008; Olivotto *et al.*, 2008; Hora & Joyeux, 2009; Otero-Ferrer *et al.*, 2010). Woods (2003) found a significant better growth and survival in *H. abdominalis* fed diets containing 13 and 8% of DHA (relative concentration) compared with a diet having 4% of DHA. Chang & Southgate (2001) found juveniles grew more when fed *Artemia* metanauplii enriched with 8% of DHA, compared to 4 or 6% of DHA. No nutritional studies have been done for *H. erectus*, but since apparently the higher the DHA content in the emulsions used to enrich the *Artemia* metanauplii, the better the survival of juvenile seahorses of other species, we here tested an emulsion that has an excess DHA content and compared it to a standard commercial emulsion for fish. We also included an isolipidic treatment with no DHA to test if the positive effect of the emulsion was not a result of an increased caloric intake, and the traditions non-enriched *Artemia* metanauplii for comparison purposes to other studies.

MATERIALS AND METHODS

Origin of juveniles

Three wild pregnant male seahorses (*Hippocampus erectus*) were captured in Laguna de Chelem, Yucatán, México, (21°15′-21°17′N, 89°39′-89°48′W) (under scientific license granted in official letter “SGPA/DGVS/03153/10” from SEMARNAT, Mexican Ministry of the Environment and Natural Resources). The seahorses were transferred (no more than 2 h after capture) to Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UNAM), Sisal, Yucatán, México. Until the time of parturition (1-5 days), pregnant seahorses were kept in 100-L glass aquaria (70H×50L×30W cm) with a recirculation system. Temperature was maintained at 26 ± 2°C, salinity at 33-36, pH at 8.1-8.3, NO₂⁻ < 0.3 mg L⁻¹, NO₃⁻ < 5 mg L⁻¹, NH₃/NH₄⁺ < 0.1 mg L⁻¹, and 12:12 photoperiod. Aquaria were cleaned daily. Inside the tanks, a polypropylene rope structure was provided for seahorse attachment. Adults were fed *ad libitum* twice a day on live adult *Artemia* with a typical fatty acid composition, high in eicosapentaenoic acid (EPA) (18.4%), 18:1n-7 (15.7%), 16:1n-7 (13.4%), 18:0 (11.0%), 16:0 (10.7%), 18:2n-6 (5.4%), 18:3n-3 (3.4%), and arachidonic acid (ARA) (2.5%), and no DHA.

Three broods (average 370 juveniles per brood) from three males (average height = 141.3 ± 5.75 mm) were used, born with a 3-day difference between the first and the last brood. At the time of birth juveniles were 11.3 ± 0.2 mm (height), and the relative fatty acid composition at birth was (only values above 1% are shown): 16:0 = 11.9 ± 0.82, 18:0 = 9.0 ± 0.6, 16:1n-7 = 2.4 ± 0.3, 18:1n-9 = 6.0 ± 2.9, 18:1n-7 = 4.3 ± 0.3, 18:2n-6 = 1.6 ± 0.3, ARA = 8.8 ± 0.6, EPA = 7.1 ± 1.1, and DHA = 22.9 ± 2.7. Total saturated fatty acids (SFA) = 28.9 ± 1.2, monounsaturated fatty acids (MUFA) = 21.1 ± 2.1, and polyunsaturated fatty acids (PUFA) = 48.7 ± 1.4. The n-3/n-6 ratio was = 2.6 and DHA/EPA ratio was = 3.3. No differences between newly-born juveniles sampled from the three broods were obtained for individual fatty acid composition.

Each brood was placed individually in 100-L tanks with the same conditions as described for the broodstock. From birth until the beginning of the experiment (4-7 days), juveniles were given enriched *Artemia* metanauplii with Selco emulsion (see below) three times a day; survival of the three broods was over 90% from birth until the beginning of the experiment.

Experimental design

For the experiment three dietary treatments and a control were used to test survival and growth of juvenile seahorses. It is well known that although

DHA levels were high in the emulsions, they tended to decrease in the enriched metanauplii, probably a due to fatty acid retroconversion (Navarro *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2004). Since we wanted to further increase DHA levels supplied to juvenile seahorses, we used commercial oil designed for human consumption containing more than 60% of DHA, compared to 10-15% of DHA generally present in the emulsions designed for fish. The control treatment consisted on *Artemia* metanauplii without enrichment. Two high-HUFA commercial emulsions with different DHA levels were used for metanauplii enrichment on treatments, and one more emulsion without HUFA was used: (1) DHA Protein Selco® INVE, Belgium (developed for marine fish), hereinafter referred to as Selco, which had: ARA = 0.7%, EPA = 7.2%, DHA = 14.4%; (2) EPAX1050TG EPAX® Norway, AS (designed to increase omega 3 in humans), hereinafter referred to as EPAX which had: ARA = 9.2%, EPA = 18.2%, DHA = 63.3%; (3) A treatment consisting in canola oil, rich in omega 3 and 6 PUFA, specifically 18:2n-6 = 20% and 18:3n-3 = 9% but no omega 3-HUFA, hereinafter referred to as Canola. Canola oil and EPAX were emulsified in seawater using a blender. *Artemia* metanauplii were enriched twice (24 h after hatching and 24 h later) and harvested at 26 h. This double enrichment was found to be the best in order to retain HUFA in metanauplii in preliminary tests where several enrichment times were compared. *Artemia* samples from the four diets were taken for biochemical and fatty acid analyses every week during the experiment.

For the experiment, two interconnected systems with six-100 L tanks each were used (total 12 tanks). Aquarium conditions were the same as described for the broodstock. From each brood (n = 3), 240 juvenile seahorses were distributed in four tanks (60 seahorses each) with a different dietary treatment; thus, the three broods were taken as replicates of each dietary treatment. Seahorses were fed twice a day at 10:00 and 17:00 h, with 10 metanauplii mL⁻¹. Leftover food and feces were collected daily with a siphon. Dead juveniles were registered daily. A sample of 20 juveniles from each brood was measured (height and weight) prior to the experiment, and then a sample of 20 seahorses were measured after 15 and 30 days; all surviving seahorses were measured at 60 days. Considering measurements provided by Foster & Vincent (2004), height (HT) was chosen to use instead of the standard length to minimize stress on the fishes. The Fulton's condition index K was calculated as follows: $K = 100 \times WW \text{ (g)} / HT \text{ (cm)}^3$ (Zhang *et al.*, 2011).

For fatty acid and biochemical analyses, 30 juveniles from each brood were sampled prior the experiment, and five juveniles from each treatment and brood were sampled at the end of the experiment (4 diets \times 3 broods = 12 individual samples of 5 seahorses), and then kept at -80°C until the biochemical and fatty acid analyses were performed. Before being sampled, seahorses were starved for 24 h to make sure they had their guts empty. The experiment was concluded after 60 days. The initial fatty acid composition (day 0) is shown in Table 3. No differences between juveniles sampled from the three broods were obtained for individual fatty acid composition.

Biochemical and fatty acid analyses

The biochemical and fatty acid analyses of *Artemia* metanauplii and juvenile seahorses were done at CIBNOR-La Paz, México. Both biochemical and fatty acid analyses, juveniles sampled at the start of the experiment were analyzed pooling five juveniles in a sample, in order to attain an adequate weight for the tests; juveniles after 60 days were analyzed individually. Total proteins, carbohydrates, and lipid analyses were performed in lyophilized samples, and data are referred to as mg g^{-1} dw. These analyses were done according with the methodology described in Palacios *et al.* (2000) and Vite-García & Saucedo (2008).

For fatty acid analyses frozen seahorses were opened longitudinally and cut into four transversal segments with a scalpel, placed in a glass vial, 6 mL Chloroform:methanol (2:1 v/v), 10 μL antioxidant (BHT), and 10 μL of 23:0 as internal standard were added to each sample. The segments were macerated directly in the solvent using a glass mortar. All the lipids were transesterified using boron-trifluoride methanol (BF₃ 14% methanol, Supelco, Bellefonte, PA, USA), and analyzed in a Hewlett-Packard CG 6890-N gas chromatography equipped with a DB-23 (30 min length \times 0.25 mm inner diameter, 0.25 μm -thick-film) fused silica capillary column (J. & WScientific, Folsom, CA, USA), flame ionization detector (FID) at 280°C , helium as a carrier gas and a temperature gradient $110\text{--}220^{\circ}\text{C}$ at $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$. The identification of FAME was made by comparison to retention time of standards (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (Palacios *et al.*, 2007).

Statistical analyses

For final survival (%), growth (mm), weight (mg), biochemical (lipids, proteins, carbohydrates, mg g^{-1} dw) and fatty acid (% of total fatty acids) composition of juveniles and *Artemia* metanauplii, one-way ANOVA

was used to test significant differences among the four dietary treatments and a Tukey test for mean comparisons was performed when significant differences were found. All statistical analyses were made using StatisticaTM v. 6.0.

RESULTS

Survival and growth of juvenile seahorses

Survival of juvenile seahorses fed the four treatments for 60 days is depicted in Figure 1a. A higher mortality was observed in the Canola treatment from the second week. A more gradual decrease was found for juveniles fed non-enriched metanauplii and EPAX treated metanauplii. The final survival after 60 days was significantly higher ($F = 5.22$; $P < 0.05$) for juveniles fed Selco (82%), followed by EPAX-enriched metanauplii (58%) and juveniles fed non-enriched metanauplii (49%), and the lowest for the Canola-enriched metanauplii (16%).

Condition index was higher in seahorses at the start of the experiment (0.38), ending after 60 days with 0.32 at the EPAX treatment and a minimum of 0.30 in seahorses fed Canola treatment (Fig. 1b). Seahorses' weight (Fig. 2a) at the start of the experiment was 17 ± 5 mg for all treatments, but weight was significantly different ($F = 106.3$; $P < 0.001$) by the end of the experiment with bigger juveniles fed Selco (249 ± 53 mg) and EPAX (231 ± 55 mg), followed by juveniles fed non-enriched metanauplii (141 ± 50 mg), and the smallest juveniles were obtained when fed Canola (109 ± 39 mg).

Height (Fig. 2b) followed a similar behavior with initial values of 16.4 ± 1.8 mm for all treatments, then significantly bigger juveniles were obtained by the end of the experiment when fed Selco (43.4 ± 0.2 mm) or EPAX (41.6 ± 0.6 mm) compared to significantly ($F = 76.45$; $P < 0.001$) smaller juveniles fed non-enriched metanauplii (35.4 ± 0.4 mm) and still smaller juveniles fed Canola (32.9 ± 0.1 mm).

Biochemical and fatty acid composition of metanauplii in the four treatments

Total protein in *Artemia* metanauplii was higher in non-enriched metanauplii and lower in Selco, with intermediate values for EPAX and Canola. Total carbohydrates were also higher in non-enriched metanauplii, with lower levels in EPAX, and intermediate levels in Selco and Canola. There were no significant differences between the total lipid content in Selco, Epax and Canola, but in the non-enriched metanauplii were significantly lower (Table 1).

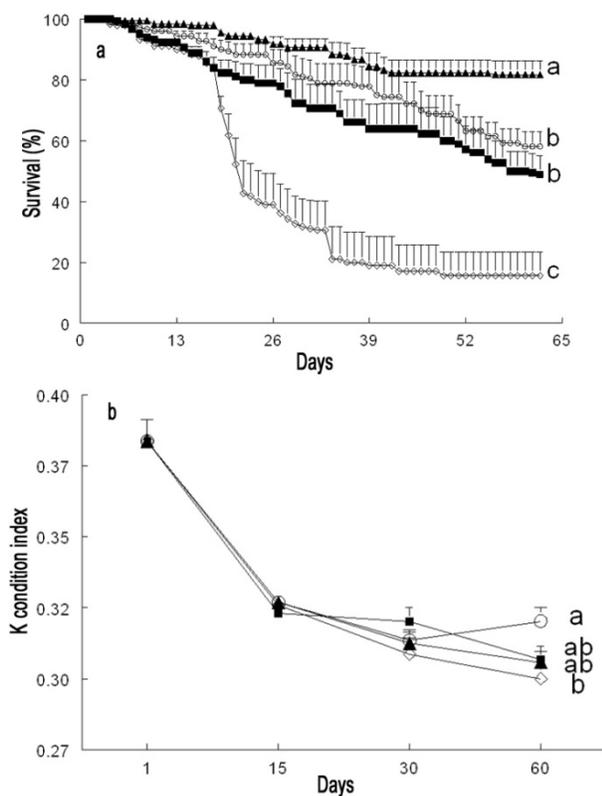


Figure 1. a) Survival (%), b) K condition index of *H. erectus* juveniles during treatment. Black squares: *Artemia* without enrichment; white rectangles: *Artemia* + Canola oil; black triangles: *Artemia* + Selco; white circles: *Artemia* + EPAX. Different letters are significantly different at 60 days ($P < 0.05$).

One of the work objectives to enrich *Artemia* metanauplii with DHA to levels above those reached with Selco enrichment was attained, as the EPAX had significantly higher levels of DHA (13.2%) compared to Selco (9%). Nevertheless, we expected the enrichment to be more pronounced, considering the very high levels of DHA in the EPAX oil (63% vs 14% in Selco). Canola and non-enriched metanauplii had traces of DHA (Table 2).

The EPA level was also higher in the EPAX (10.9%) compared to Selco (7.7%), and both were higher than in Canola (1.7%) or non-enriched metanauplii (1.4%). The level of ARA was significantly higher in Selco (1.6%) than in any other treatment (0.8-1.1%).

We expected the levels of 18:1n-9, 18:2n-6 and 18:3n-3 to be higher in the Canola, which was true for the 18:1n-9 (36.7%), almost double than that of the other treatments. The level of 18:2n-6 was also higher in the Canola and doubled the levels in the EPAX. However, the level of 18:3n-3 was higher in the non-

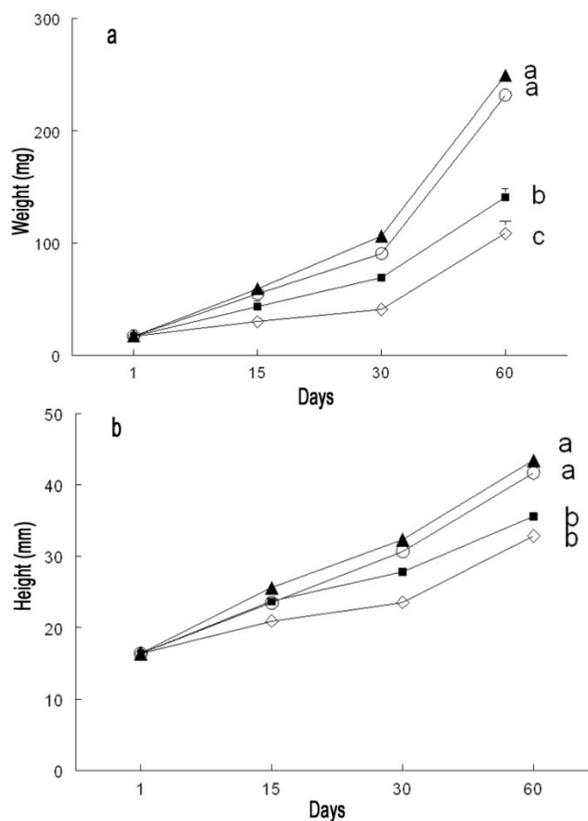


Figure 2. a) Weight (mg), b) height (mm) gain during treatment. Black squares: *Artemia* without enrichment, white rectangles: *Artemia* + Canola oil, black triangles: *Artemia* + Selco, white circles: *Artemia* + EPAX. Different letters are significantly different at 60 days ($P < 0.05$).

enriched metanauplii (29.8% compared to 19.3% in Canola).

Biochemical and fatty acids composition of juveniles after 60-days treatment

After the 60 day-treatment, total protein and lipid levels in juveniles were not significantly different among treatments regardless of differences among enriched and non-enriched metanauplii (Table 1). However, total carbohydrates were significantly higher in the juveniles fed the Selco followed by the EPAX. The lowest carbohydrate levels were found in juveniles fed the non-enriched and the Canola.

All fatty acids analyzed in juvenile seahorses were affected by treatments at the end of the experimental period (Table 3). The level of DHA was four-fivefold higher in juveniles fed Selco and EPAX, compared to juveniles fed Canola or non-enriched metanauplii. In juveniles fed EPAX, EPA was significantly higher (7%) in comparison to the juveniles fed the Selco

Table 1. Biochemical (mg g⁻¹ dw) levels (mean ± SE) in non-enriched and enriched *Artemia metanauplii* with canola oil, Selco, and EPAX (n = 9 samples per treatment), in juveniles at the start of the experiment, and in juveniles at the end of the experiment. Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) in metanauplii.

	Control	Canola	Selco	EPAX
<i>Artemia metanauplii</i>				
Carbohydrates	31.9 ± 10.9 a	21.8 ± 4.4 ab	20.2 ± 8.5 ab	17.9 ± 6.3 b
Proteins	393 ± 60.7 a	315 ± 37.8 ab	305 ± 54.5 b	338 ± 45.3 ab
Lipids	191 ± 48.4 b	234 ± 71.9 a	278 ± 88.7 a	218 ± 62.8 a
Juveniles initial (0 days)				
Carbohydrates	3.0 ± 0.2			
Proteins	324.3 ± 25.0			
Lipids	70.2 ± 2.3			
Juveniles final (60-days)				
Carbohydrates	4.8 ± 0.5 c	4.2 ± 0.6 c	8.8 ± 1.0 a	5.8 ± 0.5 b
Proteins	222.0 ± 17.3 a	176.6 ± 20.1 a	176.6 ± 12.5 a	191.0 ± 11.8 a
Lipids	63.5 ± 8.3 a	58.6 ± 11.8 a	74.9 ± 8.0 a	63.3 ± 4.3 a

Table 2. Fatty acid (% of total fatty acids) levels (mean ± SE) in non-enriched and enriched *Artemia metanauplii* with canola oil, Selco, and EPAX (n = 9 samples per treatment). Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) in metanauplii.

	Control	Canola	Selco	EPAX
14:00	0.7 ± 0.01 b	0.5 ± 0.01 c	1.3 ± 0.02 a	0.6 ± 0.01 c
16:00	12.3 ± 0.08 a	9.1 ± 0.20 b	11.9 ± 0.19 a	9.0 ± 0.06 b
17:00	0.8 ± 0.01 a	0.6 ± 0.02 b	0.8 ± 0.01 a	0.8 ± 0.01 a
18:00	7.7 ± 0.24 a	6.4 ± 0.21 b	5.8 ± 0.13 b	6.2 ± 0.21 b
20:00	0.2 ± 0.01 b	0.3 ± 0.02 a	0.2 ± 0.01 b	0.3 ± 0.01 a
22:00	0.2 ± 0.02 b	0.3 ± 0.03 b	0.1 ± 0.02 c	0.4 ± 0.01 a
24:00:00	0.1 ± 0.02 c	0.1 ± 0.02 c	0.7 ± 0.04 b	2.7 ± 0.04 a
16:1n-7	2.4 ± 0.06 b	1.7 ± 0.06 d	4.0 ± 0.04 a	2.0 ± 0.04 c
18:1n-9	22.2 ± 0.23 b	36.7 ± 0.66 a	21.6 ± 0.08 b	16.9 ± 0.15 c
18:1n-7	8.6 ± 0.07 a	7.6 ± 0.21 b	6.2 ± 0.15 d	6.8 ± 0.11 c
20:1n-9	0.9 ± 0.04 d	1.1 ± 0.02 c	2.0 ± 0.07 a	1.3 ± 0.02 b
18:2n-6	6.8 ± 0.04 c	10.5 ± 0.24 a	7.5 ± 0.04 b	4.5 ± 0.07 d
18:3n-6	0.5 ± 0.02 a	0.3 ± 0.02 b	0.3 ± 0.02 b	0.3 ± 0.02 b
18:3n-3	29.8 ± 0.31 a	19.3 ± 0.57 b	15.9 ± 0.44 c	18.5 ± 0.39 b
20:3n-3	1.1 ± 0.02 a	0.7 ± 0.02 c	0.7 ± 0.01 c	0.8 ± 0.01 b
20:4n-6	0.9 ± 0.13 b	0.8 ± 0.14 b	1.6 ± 0.08 a	1.1 ± 0.09 b
20:5n-3	1.7 ± 0.09 c	1.4 ± 0.08 c	7.7 ± 0.17 b	10.9 ± 0.28 a
22:6n-3	0.1 ± 0.01 c	0.1 ± 0.04 c	9.0 ± 0.43 b	13.2 ± 0.17 a
∑ SAT	22.1 ± 0.27 a	17.4 ± 0.44 c	20.8 ± 0.31 b	19.9 ± 0.21 b
∑ MUFA	35.1 ± 0.30 b	48.0 ± 0.45 a	34.7 ± 0.16 b	28.8 ± 0.20 c
∑ PUFA	41.3 ± 0.09 c	33.3 ± 0.43 d	42.8 ± 0.42 b	49.7 ± 0.18 a
n-3/n-6	3.9 ± 0.10 b	1.8 ± 0.05 d	3.5 ± 0.03 c	7.2 ± 0.12 a
DHA/EPA	0.1 ± 0.01 b	0.1 ± 0.02 b	1.2 ± 0.06 a	1.2 ± 0.04 a

(5%), and these levels were significantly higher compared to the juveniles from Canola (2%) or non-enriched metanauplii (3%). Hence, the DHA/EPA ratio was significantly higher in juveniles fed the Selco (4.8), followed by juveniles fed EPAX (3.4), with a much lower ratio for the other two treatments (2.1). The high DHA and EPA levels affected the total

PUFA levels, which reached more than half of the total fatty acids, and the n-3/n-6 ratio, which was four-fold higher in juveniles fed the Selco and EPAX compared to the other two treatments.

In all treatments ARA relative concentration decreased at 60 days. Starting with 4.6% the lowest concentration occurred in EPAX (2%) and the highest

Table 3. Fatty acid (% of total fatty acids) levels (mean \pm SE) in juvenile seahorses (n = 15 organisms per treatment) fed non-enriched and enriched *Artemia metanauplii* for 60 days. Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments.

	Initial (0 day)	Final (60 day-treatment)			
		Control	Canola	Selco	EPAX
14:00	0.32 \pm 0.01	0.32 \pm 0.03 b	0.30 \pm 0.02 b	0.42 \pm 0.03 a	0.29 \pm 0.01 b
16:00	7.51 \pm 0.11	8.67 \pm 0.10 a	7.69 \pm 0.07 b	6.85 \pm 0.06 c	6.78 \pm 0.13 c
17:00	0.91 \pm 0.05	0.62 \pm 0.00 a	0.53 \pm 0.01 a	0.14 \pm 0.09 b	0.62 \pm 0.01 a
18:00	8.55 \pm 0.22	9.67 \pm 0.30 a	8.20 \pm 0.44 b	6.19 \pm 0.15 c	6.64 \pm 0.19 c
20:00	0.30 \pm 0.01	0.42 \pm 0.02 a	0.38 \pm 0.03 a	0.20 \pm 0.01 b	0.23 \pm 0.01 b
22:00	0.36 \pm 0.02	0.46 \pm 0.01 a	0.42 \pm 0.01 ab	0.20 \pm 0.05 c	0.33 \pm 0.01 b
24:00:00	2.35 \pm 0.13	1.65 \pm 0.15 b	1.41 \pm 0.17 b	1.41 \pm 0.03 b	2.52 \pm 0.04 a
16:1n-7	0.96 \pm 0.03	1.07 \pm 0.08 b	0.98 \pm 0.06 b	1.44 \pm 0.09 a	1.10 \pm 0.03 b
18:1n-9	12.87 \pm 0.37	15.61 \pm 0.50 b	20.65 \pm 1.06 a	13.28 \pm 0.24 bc	12.62 \pm 0.22 c
18:1n-7	4.91 \pm 0.11	5.66 \pm 0.36 a	6.31 \pm 0.30 a	4.48 \pm 0.11 b	5.51 \pm 0.06 a
20:1n-9	0.68 \pm 0.04	0.60 \pm 0.08 c	0.93 \pm 0.03 a	0.87 \pm 0.03 ab	0.74 \pm 0.02 bc
18:2n-6	4.62 \pm 0.20	7.96 \pm 0.37 b	9.99 \pm 0.36 a	5.55 \pm 0.13 c	4.12 \pm 0.06 d
18:3n-6	0.22 \pm 0.01	0.29 \pm 0.03 ab	0.25 \pm 0.02 a	0.19 \pm 0.01 b	0.18 \pm 0.00 b
18:3n-3	6.24 \pm 0.43	11.86 \pm 1.19 a	10.80 \pm 1.16 a	8.42 \pm 0.69 a	10.98 \pm 0.45 a
20:4n-6	4.46 \pm 0.14	3.20 \pm 0.24 a	2.41 \pm 0.21 bc	3.07 \pm 0.08 ab	2.03 \pm 0.05 c
20:5n-3	3.64 \pm 0.19	2.56 \pm 0.07 c	2.05 \pm 0.04 c	5.35 \pm 0.20 b	6.95 \pm 0.17 a
22:6n-3	20.13 \pm 0.55	5.29 \pm 0.92 b	4.40 \pm 0.71 b	25.74 \pm 1.04 a	23.24 \pm 0.79 a
Σ Sat.	20.62 \pm 0.39	22.16 \pm 0.39 a	19.24 \pm 0.65 b	15.65 \pm 0.17 c	17.62 \pm 0.35 b
Σ MUFA	28.85 \pm 0.25	33.05 \pm 0.36 b	37.72 \pm 0.45 a	26.03 \pm 0.37 c	25.38 \pm 0.42 c
Σ PUFA	47.54 \pm 0.40	41.29 \pm 0.28 b	39.65 \pm 0.17 b	55.08 \pm 0.42 a	53.91 \pm 0.69 a
n-3/n-6	22.07 \pm 0.62	8.79 \pm 0.87 b	8.08 \pm 0.47 b	31.89 \pm 1.75 a	33.27 \pm 6.21 a
DHA/EPA	5.68 \pm 0.37	2.09 \pm 0.40 c	2.15 \pm 0.35 bc	4.84 \pm 0.27 a	3.35 \pm 0.13 b

in juveniles from non-enriched treatment (3.2%). Juveniles fed the Canola treatment had significantly higher levels of 18:1n-9 and 18:2n-6, compared to the other treatments. The highest values of 18:1n-9 was also reflected in the total MUFA content in this treatment. Juveniles fed the non-enriched metanauplii had significantly higher levels of 16:0 and 18:0 and, therefore, higher levels of total saturated fatty acids (Table 3).

DISCUSSION

The objective of this work was to test the rearing performance (survival and growth) of juvenile seahorses by giving them different HUFA levels, particularly DHA. We usually use Selco emulsion with 14% of DHA (according to our analysis) for *Artemia metanauplii* enrichment, so to increase DHA levels we used EPAX, a commercial oil produced from raw Peruvian fish for human consumption with more than 60% of DHA, which was emulsified and given to *Artemia metanauplii*. Canola oil was used as an isolipidic treatment to enrich metanauplii, but devoid of HUFA. Contrary to our expectations, the

DHA level in the metanauplii was not much higher when using EPAX (13%) compared to Selco (9%), although there was a significant difference between both. DHA is particularly difficult to increase in *Artemia metanauplii* as it has been previously reported; for example, Faleiro & Narciso (2011) managed to increase DHA levels in *Artemia metanauplii* to 4% when using Algamac 2000 emulsion containing 27% of DHA. This decrease of DHA in enriched *Artemia metanauplii* can be a result of retroconversion from DHA to EPA, which has been proposed before in *Artemia* (Navarro *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001). However, it could also be a result of the *Artemia* strain used, since different strains might present different retroconversion capacities, and of different enrichment methodologies, such as enriching twice, washing after the enrichment, light and temperature, etc. Using double enrichment and ICES emulsions with 9% DHA, we had previously obtained 13% of DHA in *Artemia metanauplii* (Palacios *et al.*, 2004). Part of the DHA in EPAX could have been lost by oxidation during emulsification and enrichment, since it is not designed as commercial emulsion to be used dissolved in water. In any case, we started with a

4-fold DHA in EPAX compared to Selco, and ended with 50% increase in DHA levels in metanauplii. As expected, Canola-enriched and non-enriched metanauplii had traces of DHA and less than 2% of EPA, but the three treatments with enriched metanauplii had similar lipid levels.

When comparing performance to biochemical and fatty acid composition of juveniles, we found that even if there were differences in the DHA proportion in metanauplii between Selco and EPAX, juveniles had similar DHA levels in their tissues in both treatments (23-26%). Interestingly, 23% of DHA was also what we found the newborn juveniles had before first feeding (see methodology). It is possible that DHA upper levels are regulated in juvenile *H. erectus* seahorse, as DHA is not further accumulated when given extra DHA in the diet. By contrast, in seahorses fed non-enriched metanauplii and Canola, DHA content had a strong decrease (more than 80%), till reaching 4-5% of total fatty acids. Faleiro & Narciso (2011) found similar levels of DHA in *H. guttulatus* juveniles at the beginning of the experiment (17%) compared to our levels in *H. erectus* (20%) in this study; DHA levels in *H. guttulatus* fell to 3-7% feeding Algamac-enriched *Artemia* with 4% of DHA after 30 days of experiment.

Lower levels of n-3 HUFA might be affecting growth, as juveniles fed non-enriched metanauplii or Canola were smaller; this is further supported by a significant correlation between DHA tissue levels of juveniles and weight ($r = 0.89$) and a lower correlation of EPA in tissues and weight ($r = 0.78$). Other studies have also concluded that higher DHA content has a positive effect on fish performance during early stages (Mourente *et al.*, 1993; Olivotto *et al.*, 2011; Trushenski *et al.*, 2012). On these stages there is a great energy demand because the rapid growth of fishes. DHA promotes a better development and function of mitochondria, and a higher production of enzymes and coenzymes with a central position in the metabolism (Olivotto *et al.*, 2011; Yin & Tang, 2012).

In relation to survival, we found juveniles fed Canola that had 4% DHA started dying by the second week, and end of the experiment had the highest mortality, consistent with the lower condition index. The lowest survival for juveniles fed the Canola treatment could be observed from the second week of culture, which is consistent with the results for *Morone saxatilis*, where a mass mortality after two or three weeks of culture was observed but only in organisms fed low levels of HUFA in diets (Tuncer & Harrell, 1992). However, the juveniles fed non-enriched metanauplii also lacked HUFA, and juveniles were left with 5% of DHA after 60 days of treatment;

nonetheless, survival was similar to the juveniles from the EPAX, that had 23% DHA. Therefore it is possible that Canola oil might have anti-nutritional factors that not only hamper growth (Manajan *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2009) but also survival, in spite of the loss of most anti-nutritional factors during canola oil commercial processing.

In contrast to growth, survival was not so strongly associated to DHA levels in juveniles ($r^2 = 0.44$; $F = 7.9$; $P < 0.05$) and no correlation was found to any other fatty acid or to the general biochemical composition of seahorse tissues. Juveniles fed Selco had excellent survival rates in spite of similar DHA levels (25%) with EPAX treated juveniles (23%). It should be pointed out that Selco is not solely composed of fatty acids, it is also enriched in vitamin C, amino acids, and phospholipids (according to the manufacturer), which is not the case of EPAX.

Selco-treated juveniles had more ARA (both in the diet and in the tissues), more carbohydrates and a higher DHA/EPA ratio compared to EPAX-treated juveniles that could account for some differences in survival. In *Sparus aurata* larvae, increasing levels of ARA from 0.1 to 1% in diets significantly improves survival (Bessonart *et al.*, 1999). Has been discussed the importance of ARA with DHA and EPA by Sargent *et al.* (2002), who proposed that, in diets, the ratio DHA/EPA should also consider ARA levels, and be on the order of 8:1 EPA/ARA, which is very similar to that occurring in the Selco treatment. ARA can be a precursor for the synthesis of eicosanoids through the COX and LOX enzymes. These enzymes also used EPA as substrate to produce other eicosanoids, therefore, if ARA levels are too low in comparison with those of EPA, the synthesis of certain prostaglandins may be inhibited and biased in favor of eicosanoids derived from EPA, with reduced biological activity (Bransden *et al.*, 2004). In this experiment the highest EPA/ARA ratio occurred in EPAX and this may have been detrimental to their survival.

Thus, juvenile *H. erectus* seahorses, which have above 20% of DHA in tissues, are expected to perform better during culture, particularly in reference to growth. This relative concentration in tissues could be attained with approximately 10% of DHA in *Artemia* metanauplii used as diet. Survival is less dependent on DHA levels and less dependent on EPA levels in tissues. In this research, the work was focused on the DHA role, because seems to be the most important HUFA for fish in early stages, further research is recommended regarding the role of EPA/ARA ratio in performance of seahorses rearing.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to M.Sc. Gemma Martínez M., technician in charge of Area Experimental de Ecología y Conducta, UMDI Sisal, where seahorses were maintained and cultured and to Diana Dorantes for English editing. This research was funded by projects PAPIIT No. IN208009 and SEP-CONACYT No. 101610 granted to M. Mascaró and SEP-CONACYT No. 4081 granted to Elena Palacios. Nicolas Vite-García is a doctoral CONACYT fellowship recipient, No. 42594.

REFERENCES

- Ali, S., F. Anwar, S. Ashraf, F. Talpur & M. Ashraf. 2009. Evaluation of canola seeds of different cultivars with special emphasis on the quantification of erucic acid and glucosinolates. *Grasas Aceites*, 60: 89-95.
- Baum, J.K., J. Meeuwig & A. Vincent. 2003. Bycatch of lined seahorses (*Hippocampus erectus*) in a Gulf of Mexico shrimp trawl fishery. *Fish. Bull.*, 101: 121-131.
- Bessonart, M., M. Izquierdo, M. Salhi, C. Hernández-Cruz, M. González & H. Fernández-Palacios. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*, 179: 265-275.
- Brandsen, M.P., J. Cobcroft, S. Battaglione, G. Dunstan, P. Nichols & J. Bell. 2004. Dietary arachidonic acid alters tissue fatty acid profile, whole body eicosanoid production and resistance to hypersaline challenge in larvae of the temperate marine fish, striped trumpeter (*Latris lineata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 30: 241-256.
- Chang, M. & S. Southgate. 2001. Effects of varying dietary fatty acid composition on growth and survival of seahorse, *Hippocampus* spp., juveniles. *Aquar. Sci. Conserv.*, 3: 205-214.
- Faleiro, F. & L. Narciso. 2011. Prey-predator dynamics in seahorses (*Hippocampus guttulatus*): deciphering fatty acid clues. *Aquacult. Res.*, 2011: 1-16.
- Faleiro, F. & L. Narciso. 2013. The disadvantages of mating outside home: How breeding in captivity affects the reproductive success of seahorses? *J. Sea Res.*, 78: 85-90.
- Foster, S.J. & A. Vincent. 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J. Fish Biol.*, 65: 1-61.
- Han, K., I. Geurden & P. Sorgeloos. 2001. Fatty acid changes in enriched and subsequently starved *Artemia franciscana* metanauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture*, 199: 93-105.
- Hora, M.S. & J. Joyeux. 2009. Closing the reproductive cycle: growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture*, 292: 37-41.
- Job, S.D., D. Buu & A. Vincent. 2006. Growth and survival of the tiger tail seahorse, *Hippocampus comes*. *J. World Aquacult. Soc.*, 37: 322-327.
- Koldewey, H.J. & K. Martin-Smith. 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*, 302: 131-152.
- Leger, P., D. Bengtson, K. Simpson & P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24: 521-623.
- Lin, Q., J. Lin & D. Zhang. 2008. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, 277: 287-292.
- Manajan, A., S. Otja & S. Bhaidwi. 1997. Imbibition induced changes in antinutritional constituents and functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. *toria*) meal. *FASEB J.*, 11: 1104.
- Mourente, G., A. Rodriguez & J. Sargent. 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid composition and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture*, 112: 79-98.
- Navarro, J.C., R. Henderson, L. McEvoy, M. Bell & F. Amat. 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture*, 174: 155-166.
- Olivotto, I., M. Avella, G. Sampaolesi, C. Piccinetti, R. Navarro & O. Carnevali. 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: rearing and feeding studies. *Aquaculture*, 283: 92-96.
- Olivotto, I., M. Di Stefano, S. Rosetti, L. Cossignani, A. Pugnali, F. Giantomassi & O. Carnevali. 2011. Live prey enrichment, with particular emphasis on HUFAs, as limiting factor in false percula clownfish (*Amphiprion ocellaris*, Pomacentridae) larval development and metamorphosis: molecular and biochemical implications. *Comp. Biochem. Physiol.*, 159: 207-218.
- Otero-Ferrer, F., L. Molina, J. Socorro, R. Herrera, H. Fernández-Palacios & M. Izquierdo. 2010. Live prey first feeding regimes for short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquacult. Res.*, 41: e8-e19.
- Otero-Ferrer, F., L. Molina, J. Socorro, H. Fernández-Palacios & M. Izquierdo. 2012. Effect of different live prey on spawning quality of short-snouted seahorse, *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758). *J. World Aquacult. Soc.*, 43: 174-186.

- Palacios, E., A.M. Ibarra & I.S. Racotta. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 185: 353-371.
- Palacios, E., A. Bonilla, A. Pérez, I.S. Racotta & R. Civera. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 299: 201-215.
- Palacios, E., I.S. Racotta, B. Aparicio, O. Arjona & C. Martínez-Palacios. 2007. Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estorestor*) from Pátzcuaro Lake. *Fish Physiol. Biochem.*, 33: 81-91.
- Palma, J., D. Bureau & J. Andrade. 2011. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture*, 318: 439-443.
- Payne, M.F. & R.J. Rippingale. 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, and juveniles on copepod metanauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture*, 188: 353-361.
- Planas, M., A. Chamorro, P. Quintas & A. Vilar. 2008. Establishment and maintenance of threatened long-snouted seahorse, *Hippocampus guttulatus*, broodstock in captivity. *Aquaculture*, 283: 19-28.
- Saavedra, M., M. Masdeu, P. Hale & W. Holt. 2013. Dietary fatty acid enrichment increases egg size and quality of yellow seahorse *Hippocampus kuda*. *Anim. Reprod. Sci.* (in press).
- Sargent, J.R., D. Tocher & J. Bell. 2002. The lipids. In: J. Halver & R. Hardy (eds.). *Fish nutrition*. Elsevier Science, New York, pp. 182-246.
- Shapawi, R. & G.J. Purser. 2003. The value of enriched *Artemia* in supporting growth and survival of juvenile pot-bellied seahorses *Hippocampus abdominalis*. *J. World Aquacult. Soc.*, 34: 533-541.
- Trushenski, J., M. Schwarz, A. Bergman, A. Rombenso & B. Delbos. 2012. DHA is essential, EPA appears largely expendable, in meeting the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid requirements of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 326: 81-89.
- Tuncer, H. & R. Harrell. 1992. Essential fatty acid nutrition of larval striped bass *Morone saxatilis* and palmetto bass (*M. saxatilis* x *M. chrysops*). *Aquaculture*, 101: 105-121.
- Vincent, A., K. Evans & A. Marsden. 2005. Home range behaviour of the monogamous Australian seahorse, *Hippocampus whitei*. *Environ. Biol. Fish.*, 72: 1-12.
- Vite-García, N. & P. Saucedo. 2008. Energy storage and allocation during reproduction of Pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* at Bahía de la Paz, Baja California Sur, Mexico. *J. Shellf. Res.*, 27: 375-383.
- Vite-García, N., D. Alexandre, G. Martínez, M. Mascaró & N. Simoes. 2009. First feeding captive seahorse *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) using *Artemia* and freshwater amphipods. WAS, Book of Abstracts, World Aquaculture. Veracruz, 25-29: 330 pp.
- Wilson, M.J. & A. Vincent. 1998. Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity. *Aquar. Sci. Conserv.*, 2: 179-196.
- Wong, J.M. & J.A. Benzie. 2003. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture*, 228: 107-121.
- Woods, C.M. 2000. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). *Aquaculture*, 190: 377-388.
- Woods, C.M. 2003. Effects of varying *Artemia* enrichment on growth and survival of juvenile seahorses, *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture*, 220: 537-548.
- Yin, F. & B. Tang. 2012. Lipid metabolic response, peroxidation, and antioxidant defence status of juvenile lined seahorse, *Hippocampus erectus*, fed with highly unsaturated fatty acids enriched *Artemia* metanauplii. *J. World Aquacult. Soc.*, 43: 716-726.
- Zhang, D., F. Yin & J. Lin. 2011. Criteria for assessing juvenile quality of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*. *Aquaculture*, 322-323: 255-258.

Received: 1 August 2013; Accepted: 18 December 2013

Assessment of lipid classes and fatty acid levels in wild newborn seahorses (*Hippocampus erectus*) (Perry 1810): implications for survival and growth in aquarium culture

Nicolás Vite-García^{a,b}, Olivia Arjona^c, Enrique Morales-Bojorquez^c, Maite Mascaró^b, Nuno Simoes^b and Elena Palacios^{c*}

^aDivisión Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, México; ^bFacultad de Ciencias, Programa de Investigación en Ecología y Cultivo de Especies Marinas de Ornato (PIECEMO), UNAM-Sisal, Yucatán, México; ^cCentro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, México

(Received 7 May 2014; accepted 21 August 2014)

There is a worldwide interest in seahorse culture to protect wild populations from human predation for aquaria and to establish an industry in developing countries. This study was undertaken to gather information on the lipid and fatty acid status of wild caught seahorses to inform the development of aquarium diets. Brood size, lipid classes, fatty acids, and pigments were analyzed in newborn *Hippocampus erectus* juveniles from recently captured pregnant wild males during January–March 2009–2010. The lipids of newborn seahorses are composed of phospholipids (mean 75–80%), free cholesterol (8–10%), cholesterol esters (4–9%), and acylglycerides (3–11%). The main pigments were total carotenoids (mean 58–79 µg/g). The most abundant fatty acids in newborn seahorses were 22:6n-3 (21–27%) and 20:4n-6 (7–9%). Both were higher than levels reported in other seahorses. A factor analysis showed that PC1 (48.7% of variation) was composed of the three main highly unsaturated fatty acids: 20:4n-6, 20:5n-3 and a negative contribution of 22:6n-3. PC2 contributed 18:5n-3 and several branched fatty acids. PC3 contributed 18:2n-6 and 18:3n-3. Each of these three components correlated with different environmental factors. The results suggested that high levels of 22:6n-3 rather than 20:5n-3 could increase juvenile survival and assist them to tolerate salinity changes better. The results also suggest that a diet of live prey enriched with 22:6n-3 would be likely to increase the growth and survival in captivity, at least for this species.

Keywords: acylglycerides; ARA; DHA; EPA; depth; reproduction

Introduction

The spotted or lined seahorse (*Hippocampus erectus*) is a tropical and subtropical marine teleost found in coastal waters from Nova Scotia to Uruguay of the southeastern of Mexico where it usually lives attached to *Thalassia* sp. (Linton & Soloff 1964; Teixeira & Musick 2001; Lourie et al. 2004). Several attempts to grow seahorses in captivity have been made worldwide as a partial solution to replace wild animal capture and provide alternative economic opportunities to fishermen in developing countries (Payne &

*Corresponding author. Email: epalacio@cibnor.mx

Rippingale 2000; Job et al. 2006; Koldewey & Martin-Smith 2010). Seahorses have a distinctive life cycle in which eggs are transferred from the female to the male pouch. Larval development occurs there and then juveniles that are morphologically similar to adults are born from the pouch (Foster & Vincent 2004). Sampling the eggs, is therefore, rather difficult without disturbing either the females or the brooding males. Egg sampling is used in mariculture to determine the nutrients that are needed for lecithotrophic and early larval development, and the biochemical composition of eggs has been used as a basis for feed formulation of larvae during first feeding and for a maturation diet for broodstock.

Some of the most important nutrients for marine fishes, especially in their early stages of life, are essential fatty acids which cannot be synthesized. For most marine fish studied, these are highly unsaturated fatty acids (HUFA): docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA), eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA), and arachidonic acid (20:4n-6, ARA). In addition, these fatty acids have distinctive physiological functions (Sargent et al. 2002). The HUFA composition of adult seahorses has been described for *H. kuda* and *H. trimaculatus* (Lin et al. 2009). Improvements in zootechnical reproduction variables resulting from changes in the fatty acid profile of the diet fed to adult broodstock has, however, been demonstrated for *H. hippocampus* (Otero-Ferrer et al. 2012) and for *H. kuda* (Saavedra et al. 2014). Differences in fatty acid composition have been found in eggs and juveniles from seahorses of different species sampled at different geographical locations (Sandoval 2006; Lin et al. 2009; Faleiro & Narciso 2010; Planas et al. 2010). The importance of DHA-enriched *Artemia* for feeding juvenile *H. erectus* during growth has also been analyzed (Vite-García et al. 2014).

In the present study, we analyzed lipid classes and the fatty acid composition of newborn juveniles from wild pregnant males of *H. erectus*. To obtain a preliminary idea of the variation in the values for this species over time, we used principal component analysis to examined juveniles from the same site collected a year apart. The results provide a basis for developing an adequate diet for juveniles and broodstock of this species grown in captivity.

Materials and methods

Wild seahorses (*H. erectus*) were captured in Laguna de Chelem, Yucatán, México, between 21° 15' to 21° 17' N and 89° 39' to 89° 48' W, from January to March in 2009 and during the same period in 2010 (Collection and handling license "Oficio SGPA/DGVS/03153/10," from Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT). This lagoon has an elongated shape oriented parallel to the shoreline and a permanent tidal connection with the sea through an artificial channel of 1.2 × 0.1 km in its center (Figure 1). There is an urban development, and industrial facilities for the region's major fishing harbor (Yucalpeten) on its northern border. Its southern border is a mangrove area affected by hydrological changes produced by the artificial inlet of the Yucalpeten harbor (Tapia et al. 2008). During the two years of sampling for this work, the lowest water temperature was 18 °C in February of 2009 and the highest was 31 °C in July and August of 2009 and 2010. Salinity showed a marine pattern (range was 34–38 ppt). The depth of the lagoon at the sampling site was between 70 and 90 cm. The submerged vegetation was dominated by *Thalassia testudinum*, *Laurencia microcladia*, *Ruppia maritima*, and *Halodule wrightii*, which represent the complex habitat of seahorses.

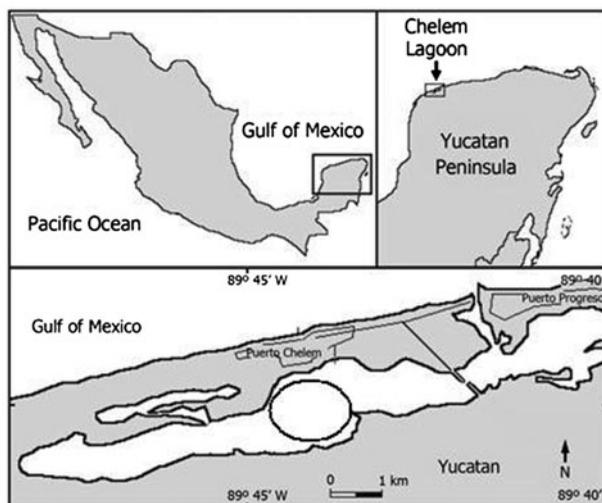


Figure 1. Map of Laguna de Chelem in circle shows the approximate area of catching parent seahorses (modified from Escamilla et al. 2011).

Laguna de Chelem is a shallow lagoon (average depth 1 m) thus, permitting the localization of seahorses from a boat. When a seahorse was found, a hand net was used to catch and examine it. Pregnant males were placed in individual plastic bags with aerated seawater and transported to Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Sisal, Yucatán, México, a journey of not more than 2 h. They were kept in 100 L glass aquaria (70H × 50L × 30 W cm) with a recirculation system. The water temperature was maintained at 26 ± 2 °C, salinity at 33–36 ppt, pH at 8.1–8.3, $\text{NO}_2^- < 0.3 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{NO}_3^- < 5 \text{ mg L}^{-1}$, and $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+ < 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ under a natural photoperiod. Aquaria were cleaned daily. A polypropylene rope structure was provided for seahorse attachment. Adults were fed ad libitum twice a day on live adult *Artemia* (purchased from producers of *Artemia* in natural conditions in Celestún, Yucatán, México) with a fatty acid composition of 20:5n-3 (18.4%), 18:1n-7 (15.7%), 16:1n-7 (13.4%), 18:0 (11.0%), 16 (10.7%), 18:2n-6 (5.4%), 18:3n-3 (3.4%), 20:4n-6 (2.5%), and with no 22:6n-3. Males spent between 4 and 9 days in captivity prior to the birth of their young. All juveniles of each brood were counted and sampled within a 2-h period of birth and prior to feeding. Approximately, 15 organisms per brood were measured under a stereo microscope (0.1 mm). Males were also measured to the nearest 0.5 mm after expulsion of their juveniles using a Vernier calliper. Length was determined as the length from the coronet to the tip of the tail (Lourie 2003).

A sample of six juveniles per brood were weighed and placed in glass vials with Chloroform: Methanol (2:1 v/v), 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT) and 5 µl of 23:0 as internal standard (Sigma, Bellefonte, PA, USA). They were then packed in ice and shipped to Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, (CIBNOR) La Paz, B.C.S., México, where lipid, fatty acid, and pigment analyses were done.

Total lipid samples were run on thin layer chromatography coupled to detection by flame ionization (Iatroscan TLC/FID MK-5 analyzer), using chromarods S-III, which were previously brought to a constant humidity in a hydration chamber (Palacios et al. 2007). Neutral lipid classes were developed for 30 min in a mobile phase of

hexane: ethyl acetate: diethyl ether: formic acid (90:7:3:1). Rods were scanned at a hydrogen flow rate of 160 mL/min, airflow of 2000-mL/min, and a scanning speed of 30-mm/min. Lipid classes were identified by comparison of retention times against appropriate external standards (Sigma, St. Louis, USA), and the concentration was calculated based on the peak areas of these external standards.

Fatty acids were determined using the method described for fish by Palacios et al. (2007), with some modifications to account for the bone plates, as follows: frozen seahorses were opened longitudinally and cut into four transversal segments with a scalpel, placed in a glass vial and to each seahorse 6 ml Chloroform: Methanol (2:1 v/v), BHT, and 23:0 were added at the same concentrations as above. The segments were macerated directly in the solvent using a glass mortar; the vial was sealed under N₂ and left for 24 h for extraction. A portion of this extract was used for fatty acid analyses using boron trifluoride (10% BF₃ methanol, Supelco for derivatization, and a gas chromatograph (6890N, Agilent Technologies, Shanghai, China), equipped with a silica column DB-23 (30 m × 0.25 mm of internal diameter × 0.25 μm layer thickness), a flame ionization detector with helium as a carrier gas (0.7 ml min⁻¹), and a temperature ramp of 110–220 °C for fatty acid methyl ester separation. Fatty acids were identified by comparing retention times with a 37 standard mixture (Sigma, Bellefonte, PA, USA) and individual standards for branched fatty acids and bacterial fatty acids (Matreya LLC, Pleasant Gap, PA, USA), 22:5n-3, (Sigma, Bellefonte, PA, USA), and 18:5n-3 identified from *Isochrysis galbana* (T-Iso). Quantification was done in relation to each fatty acid and in comparison with the internal standard.

Pigments were analyzed according to Wellburn (1994): Chlorophyll *a* = 15.68 (Abs 666) – 7.34 (Abs 653) ug/ml; Chlorophyll *b* = 27.05 (Abs 653) – 11.21 (Abs 666) ug/ml; Total Carotenoids = 1000 (Abs 470) – 2.86 (chl *a*) – 129.2 (chl *b*) ug/ml.

One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to assess differences in fatty acid among broods from 2009 and 2010. Data obtained as percentage were transformed to arc sin for the analysis, but only untransformed data are presented. The confidence interval used for all statistical tests was 0.95. All results are expressed as means ± standard error.

A factor analysis was used to extract the maximum variance from data-sets with each principal component as a linear combinations of individual fatty acids of juvenile seahorses, considering a factor loading ≥0.7 and eigenvalues >1.0. The extracted factors were used as new factors to analyze fatty acid variability and in regression analyses to determine the association with juvenile size and number/brood, as described in Hurtado et al. (2012). This analysis offers a way of identifying patterns in data, and expressing the data in such a way as to highlight their similarities and differences. The other main advantage is that once these patterns have been identified in the data, new data-sets are estimated and expressed as empirical orthogonal functions. In this way, the data are transformed so as to reduce the number of dimensions without much loss of information (Tabachnick & Fidell 1989; Krzanowski 1993; Manly 1994). All statistical analyses were made using StatisticaTM v. 6.0.

Results

Neither males nor juveniles differed significantly in size from 2009 to 2010 (Table 1), but more juveniles per brood were produced in 2010 compared with 2009. The juveniles from the aborted brood did not varied significantly in size to the other broods although the brood number was one of the largest observed (391).

Table 1. Morphometric, lipid, and pigment variables of newborn *H. erectus* juveniles per brood sampled in 2009 and 2010 from wild males. An asterisk denotes significant differences between the juveniles sampled in 2009 and those sampled in 2010. The aborted juveniles from 2010 were not considered for the statistical analysis.

	2009 (<i>n</i> = 3)	2010 (<i>n</i> = 20)	Aborted (<i>n</i> = 1)
Male total length (mm)	143.7 ± 4.98	154.6 ± 3.04	145.0
Juvenile total length (mm)	11.81 ± 0.43	11.39 ± 0.10	11.50
Juveniles/brood	176.7 ± 26.0	344.3 ± 27.9*	391.0
Triglycerides (%)	1.40 ± 0.49	7.30 ± 0.85*	21.6
Diglycerides (%)	1.08 ± 0.20	3.08 ± 1.75	1.27
Monoglycerides (%)	0.75 ± 0.41	1.11 ± 0.22	0.29
Cholesterol esters (%)	8.90 ± 5.24	3.82 ± 1.21	1.13
Free cholesterol (%)	8.03 ± 1.65	9.72 ± 0.65	6.65
Phospholipids (%)	79.8 ± 6.45	75.0 ± 2.07	69.1
Chlorophyll <i>a</i> (µg/g)	0.72 ± 0.55	0.17 ± 0.05*	0.05
Chlorophyll <i>b</i> (µg/g)	1.57 ± 0.13	0.49 ± 0.16	0.10
Carotenoids (µg/g)	78.94 ± 29.8	58.46 ± 5.10	79.56

Lipids of newborn seahorses were mainly composed of phospholipids (an average of 75–80%) and to a lesser extent by free cholesterol (8–10%), cholesterol esters (4–9%), and acylglycerides (3–11%). The juveniles born in 2010 had more total acylglycerides than those born in 2009. The aborted brood had very high levels of tryglicerides, in detriment of cholesterol esters and phospholipids. No differences were found for total phospholipids or for cholesterol between juveniles born in 2009 or in 2010. The main pigments in newborn seahorses were total carotenoids (an average of 58–79 µg/g). Juveniles born in 2009 had more chlorophyll *a* compared with those born in 2010. No differences were found for chlorophyll *b* or total carotenoids (Table 1).

The most abundant fatty acid in newborn seahorses' tissues was 22:6n-3 with levels of 20–30% of total fatty acids (Table 2). The fatty acid proportion of newborn juveniles differed between those collected from males in 2009 and those collected in 2010. Juveniles born in 2009 had higher levels of 18:0 (10.3 vs. 8.9%), 22:6n-3 (26.7 vs. 21.5%), and of several minor fatty acids (16:1n-9, 24:1n-9, 18:2n-4, and branched fatty acids). Juveniles born in 2010 had a higher proportion of 16:0 (12.4% vs. 11.0), 24:0 (4.8 vs. 3.5%), 16:1n-7 (2.7 vs. 1.8%), 18:1n-7 (4.5 vs. 3.6%), 20:4n-6 (9.2 vs. 7.2%), 20:5n-3 (7.4 vs. 3.6%), and several minor fatty acids (14:0, 17:0, 16:1n-5, 20:1n-7, 24:1n-7, 18:3n-6, and 20:2n-6). Total fatty acids were higher in juveniles born in 2009 compared with 2010. No differences in the sum of monounsaturated fatty acids or polyunsaturated fatty acids were found.

A PCA was applied to the fatty acids in juveniles of different broods, and the eigenvalues and cumulative variances are shown in Table 3. The first seven factors had eigenvalues higher than 1 and the first three factors accounted for 71% of the total variability. The PC1 (48.7% of the variation) included high (>0.7) positive contributions of 20:5n-3, and a negative contribution of 22:6n-3 among others. The PC2 (13.5% of the variation) showed a high contribution of 16:1n-9, 18:2n-4, 18:5n-3, iso14:0, iso15:0, anteiso15:0, iso17:0, and iso18:0 and a negative contribution of 24:1n-7. The PC3 (9.1% of the variation) showed a positive contribution of 18:2n-6 and 18:3n-3 (Tables 3 and 4).

Table 2. Fatty acid (% of total fatty acids) of newborn *H. erectus* juveniles sampled in 2009 and 2010 from wild males. An asterisk denotes significant differences between the juveniles sampled in 2009 and those sampled in 2010. The aborted juveniles from 2010 were not considered for the statistical analysis.

	2009 (n = 3)	2010 (n = 20)	Aborted (n = 1)
14:0	0.40 ± 0.01	0.60 ± 0.02*	0.79
15:0	0.29 ± 0.09	0.30 ± 0.01	0.21
16:0	11.0 ± 0.17	12.4 ± 0.18*	13.1
17:0	1.24 ± 0.05	1.72 ± 0.04*	1.90
18:0	10.3 ± 0.09	8.93 ± 0.09*	8.18
20:0	0.26 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.37
21:0	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.21
22:0	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.24
24:0	3.45 ± 0.31	4.83 ± 0.13*	5.17
16:1n-9	0.86 ± 0.02	0.40 ± 0.01*	0.29
16:1n-7	1.76 ± 0.11	2.73 ± 0.11*	3.71
16:1n-5	0.27 ± 0.04	0.36 ± 0.01*	0.42
18:1n-9	9.50 ± 0.75	5.92 ± 0.60*	6.64
18:1n-7	3.56 ± 0.48	4.50 ± 0.07*	4.95
20:1n-9	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.13
20:1n-7	0.20 ± 0.04	0.27 ± 0.04*	0.29
24:1n-9	4.19 ± 0.12	3.65 ± 0.07*	3.19
24:1n-7	0.19 ± 0.02	2.60 ± 0.14*	1.65
18:2n-6	1.70 ± 0.22	1.46 ± 0.04*	1.54
18:2n-4	0.32 ± 0.03	0.07 ± 0.00*	0.08
18:3n-6	0.16 ± 0.01	0.29 ± 0.01*	0.35
18:3n-3	0.50 ± 0.22	0.43 ± 0.08	0.41
18:4n-3	0 ± 0	0.32 ± 0.02	0.44
18:5n-3	0 ± 0	0.36 ± 0.02	0.08
20:2n-6	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.01*	0.22
20:3n-3	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11
20:4n-6	7.20 ± 0.17	9.16 ± 0.11*	9.26
20:5n-3	3.63 ± 0.27	7.44 ± 0.35*	10.0
21:4n-6	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18
22:4n-6	1.56 ± 0.15	1.41 ± 0.13	1.85
22:5n-6	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.01*	0.06
22:6n-3	26.7 ± 1.74	21.5 ± 0.56*	17.7
iso14:0	0.26 ± 0.01	0.12 ± 0.01*	0.09
iso15:0	0.11 ± 0.03	0.03 ± 0.001*	0.03
anteiso15:0	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.001*	0.01
iso17:0	0.36 ± 0.01	0.05 ± 0.001*	0.06
iso18:0	0.29 ± 0.02	0.07 ± 0.001*	0.01
PUI	278 ± 7.70	265 ± 2.10*	255

We used the first three principal components in our analysis that represent 71.3 % of cumulated variance (Table 3) to build a graphic representation of the principal components estimated (Figure 2). We identified three groups in the PCA; the first group “a” shows that the next variables were the best to differentiate among groups, with the following values (minimum and maximum): 14:0 (0.45–0.62) and 20:5n-3 (5.30–7.31). These interval values were opposite to those observed in the second group “b” identified in the PCA. The second group showed the next variables and values: 14:0 (0.63–0.83) and 20:5n-3 (7.52–10.63). A strong overlap was found for 17:0 (1.41–1.95 and 1.46–2.12), 24:0 (3.80–5.57 and 4.60–5.49), 16:1n-9 (0.38–0.49 and 0.26–0.41),

Table 3. Eigenvalues calculated by the factor analysis, the first seven factors had values of eigenvalues >1.0. The first three factors explained 71% of the cumulative variance.

	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative variance %
1	18.03	48.72	48.72
2	4.99	13.49	62.21
3	3.35	9.06	71.27
4	2.81	7.58	78.85
5	1.79	4.83	83.68
6	1.53	4.14	87.82
7	1.38	3.72	91.54
8	0.79	2.13	93.67
9	0.62	1.66	95.33
10	0.51	1.39	96.72
11	0.38	1.03	97.75
12	0.28	0.75	98.50
13	0.18	0.49	98.99
14	0.16	0.44	99.42
15	0.09	0.25	99.67
16	0.03	0.09	99.76
17	0.03	0.08	99.84
18	0.02	0.06	99.90
19	0.01	0.04	99.94

16:1n-5 (0.27–0.37 and 0.33–0.45), and 24:1n-9 (3.66–4.10 and 3.00–3.94). These variables were not useful to separate the groups “a” and “b,” because their intervals were strongly overlapped. The “a” and “b” group estimation has shown a slight overlap in the following variables of the PC1: 16:0 (11.13–12.59 and 12.19–13.90), 16:1n-7 (1.88–2.91 and 2.68–3.80), 18:1n-7 (3.71–4.60 and 4.42–5.12), 18:3n-6 (0.19–0.32 and 0.30–0.36), 20:4n-6 (8.24–9.35 and 9.05–10.41), and 22:6n-3 (20.05–26.57 and 17.13–20.60). Considering the HUFA, group “a” was thus characterized by low 20:5n-3 and 20:4n-6 levels and high 22:6n-3 levels. The group “a” had two broods that tended to separate at the top. These were distinguished by higher levels of 18:3n-3 (1.61–1.62 and 0.16–0.34) and 18:2n-6 (1.91 and 1.18–1.53).

The third group “c” was characterized by high values of 18:2n-4 (0.28–0.30), iso14:0 (0.25–0.27), and iso18:0 (0.25–0.33). Low values of 24:1n-7 (0.16–0.24) compared with values in “a” and “b” of 18:2n-4 (0.04–0.14), iso14:0 (0.08–0.14), and iso18:0 (0.05–0.09) and high values of 24:1n-7 (1.54–4.01). An overlapping occurred for iso15:0 (0.04–0.15), anteiso15:0 (0.05–0.09), and iso17:0 (0.34–0.37). Thus, there were high levels of several branched fatty acids for group “c.”

When the first seven PC were analyzed by ANOVA, only PC1 ($p < 0.05$) and PC2 ($p < 0.001$) were significantly different between 2009 and 2010. When a simple regression was applied to the first three factors, we found that the size of the juveniles was positively correlated with PC1 ($r = 0.47$; $p < 0.05$) and negatively with PC2 ($r = -0.58$; $p < 0.01$). A low positive correlation was also found between juvenile size and the size of males ($r = 0.31$; $p < 0.05$). Negative correlations were found with the temperature of the sampling site and PC2 ($r = -0.62$; $p < 0.01$) and triacylglycerides ($r = -0.38$; $p < 0.05$) and positive with chlorophyll *a* ($r = 0.74$; $p < 0.01$) and chlorophyll *b* ($r = 0.63$; $p < 0.01$). Negative correlations were found with the salinity of the sampling site and PC1 ($r = -0.39$; $p < 0.05$) and PC2 ($r = -0.69$; $p < 0.01$) and

Table 4. Factor scores of each fatty acid, considering a factor loading ≥ 0.7 .

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7
14:0	0.95	-0.20	-0.12	0.05	0.13	0.00	-0.08
15:0	-0.15	-0.09	-0.48	0.44	0.51	-0.11	0.03
16:0	0.86	-0.20	-0.27	-0.06	0.27	-0.01	0.09
17:0	0.78	-0.40	-0.17	-0.01	0.12	0.14	0.26
18:0	-0.60	0.60	-0.06	-0.23	0.38	0.05	0.14
20:0	0.43	-0.68	-0.05	-0.06	0.18	0.10	0.48
21:0	0.30	0.12	-0.27	0.18	-0.02	0.23	-0.23
22:0	0.16	0.13	0.14	0.06	-0.11	0.15	0.16
24:0	0.77	-0.36	0.01	0.03	0.05	0.20	0.03
16:1n-9	-0.65	0.74	0.08	-0.03	0.02	0.00	0.04
16:1n-7	0.95	-0.20	-0.12	0.01	0.03	0.01	0.00
16:1n-5	0.89	-0.25	0.19	-0.06	0.09	0.19	0.10
18:1n-9	-0.32	0.26	0.17	0.06	-0.87	-0.11	-0.04
18:1n-7	0.83	-0.33	0.17	-0.28	0.08	0.10	-0.06
20:1n-9	0.02	0.00	-0.02	0.18	-0.03	0.03	-0.96
20:1n-7	0.35	-0.28	-0.56	0.33	0.29	0.02	-0.37
24:1n-9	-0.76	0.29	0.08	-0.23	0.24	0.04	0.08
24:1n-7	-0.12	-0.85	-0.24	-0.23	0.30	0.12	-0.01
18:2n-6	0.02	0.34	0.90	-0.04	-0.06	0.07	-0.03
18:2n-4	-0.30	0.92	-0.06	0.21	-0.04	-0.08	-0.05
18:3n-6	0.82	-0.48	0.14	0.23	-0.01	0.06	-0.06
18:3n-3	-0.09	-0.03	0.94	0.22	-0.10	0.12	0.00
18:4n-3	0.68	0.13	0.48	0.41	0.06	0.07	0.04
18:5n-3	-0.36	0.91	0.04	0.07	-0.02	-0.08	-0.05
20:2n-6	0.58	-0.39	0.33	0.52	0.06	0.20	-0.02
20:3n-3	-0.05	0.22	0.11	0.89	-0.07	0.00	-0.28
20:4n-6	0.70	-0.53	-0.16	0.00	0.26	-0.07	-0.13
20:5n-3	0.91	-0.32	-0.10	0.07	0.16	0.03	0.02
21:4n-6	0.21	-0.20	0.21	0.02	0.09	0.89	-0.02
22:4n-6	0.00	0.00	-0.01	0.09	-0.10	0.00	0.01
22:5n-6	-0.23	0.52	-0.04	-0.17	-0.06	0.17	0.25
22:6n-3	-0.90	0.27	-0.08	0.05	0.26	-0.06	0.08
iso14:0	-0.62	0.77	0.05	-0.07	0.00	-0.07	-0.07
iso15:0	-0.34	0.73	0.37	-0.32	-0.12	0.03	-0.12
anteiso15:0	-0.28	0.80	0.12	-0.21	0.09	-0.02	0.01
iso17:0	-0.31	0.93	0.04	0.07	-0.10	-0.07	0.10
iso18:0	-0.43	0.87	0.12	-0.04	-0.07	0.00	0.04

positive with PUI ($r = 0.38$; $p < 0.05$), chlorophyll *a* ($r = 0.54$; $p < 0.05$), and chlorophyll *b* ($r = 0.46$; $p < 0.05$). The depth of the Chelem lagoon during sampling was negatively correlated with PC2 ($r = -0.51$; $p < 0.01$) and PC3 ($r = -0.46$; $p < 0.05$).

Discussion

The wild juvenile seahorse fatty acid composition presumably reflects the optimal value driven by selection over generations. This paper takes into account the variation in the concentration of fatty acids in wild sea horses for two successive years, which by no means represents the potential variability for this particular population, but can give us a preliminary indication of which components are subjected to extensive or limited variation from year to year. The data obtained here provide a guide to the fatty acid

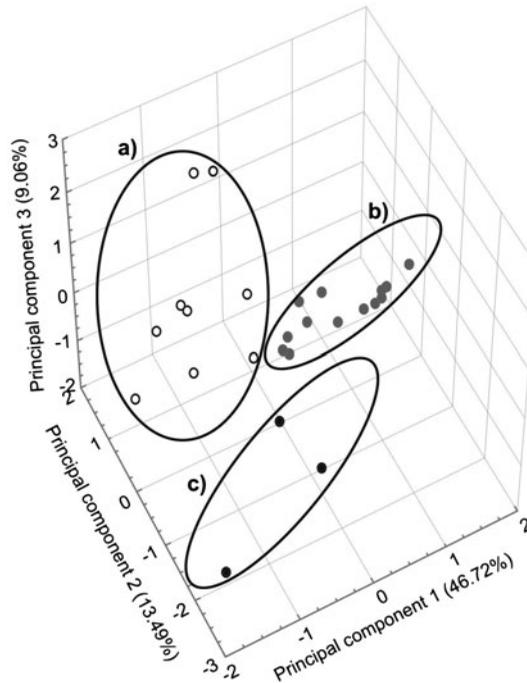


Figure 2. Graphic representation of the first three principal components (71.3% of cumulated variance). PC1 (x), PC2 (y), and PC3 (z), calculated by the loadings of fatty acid proportion in juveniles born in 2009 and 2010. The first group “a” is formed by broods marked in white circles, the second group “b” marked with gray circles, and the group “c” marked with solid black circles.

concentrations that should be targeted for mariculture of this species. It appears that particular attention should be paid to the essential fatty acids 22:6n-3, 20:5n-3, and 20:4n-6 either for a broodstock diet or for newborn juveniles.

We found high levels of 22:6n-3, above 21.5–26.7%, in *H. erectus* juveniles, but these were still in the range of those reported in Portugal for *H. guttulatus* juveniles (Faleiro & Narciso 2011) or in the adults of *H. comes* sampled in Asia (Lin et al. 2008). In contrast, much lower values were reported for *H. ingens* juveniles (7–8%) sampled from the Pacific coast of Mexico (Sandoval 2006). As has been reported in other marine fish species, high 22:6n-3 levels appear to be advantageous in this species in which as nonviable juvenile seahorses aborted by a male had the lowest levels of 22:6n-3 (17.7%).

There was less variation among different species of seahorses of 20:5n-3, another fatty acid regarded as important in fish culture. Here, we found levels of 4% in 2009 and twice as much in 2010. Similar levels (3–5%) were found in *H. ingens* (Sandoval 2006) and in *H. guttulatus* juveniles (Faleiro & Narciso 2010, 2011). Faleiro and Narciso (2010) found that 20:5n-3 decreased during the embryonic development of seahorses and this could explain why there were higher levels of 20:5n-3 in the aborted juveniles (10%). This does not, however, explain the lower levels of 22:6n-3, which tend to be conserved during development. It was more difficult to compare the levels of 20:4n-6 found here to those found in other studies. Lin et al. (2008) did not report 20:4n-6 in their work on adult seahorses. Sandoval (2006) reported 3–4% of 20:4n-6 in

H. ingens or about half the levels reported here. In both their works on newborn seahorses, Faleiro and Narciso (2010, 2011) found less than 1% of 20:4n-6. In the study by Faleiro and Narciso (2010, 2011), however, high levels of 20:4n-3 were reported (3–6%) even though, it is generally considered as a minor fatty acid in fish (Mourete et al. 1993; Cejas et al. 2004; Planas et al. 2010). If the levels of 20:4n-3 and 20:4n-6 are inverted, values of 20:4n-6 would be similar to values reported by Sandoval (2006). Lower levels of 20:4n-6 have been found in fish held in captivity compared with wild fish (Palacios et al. 2007), but, here, levels of 20:4n-6 were likely affected by the sampling year, as they were higher in juveniles born in 2010 compared with juveniles born in 2009 (9.2 vs. 7.2%). The level of 20:4n-6 was highest in the aborted juveniles (9.3%). In agreement with a proposal by Sargent et al. (2002), there appears to be an optimal ratio of 22:6n-3, 20:5n-3, and 20:4n-6 that determines viability in this species.

The size of the seahorse specimens was closely similar between the 2009, 2010 and the aborted juveniles of 2010. No difference in male size was found, but broods were smaller in 2009 and the biggest brood in 2010 was aborted. However, bigger males tended to give birth sooner after capture than small males ($r = 0.77$; $p < 0.01$). Dzyuba et al. (2006) found that lab-kept *H. kuda* juveniles from older parents, i.e. that had more culture experience and were bigger in size, had a higher survival rate and more pronounced growth immediately after birth and also grew faster than juveniles of smaller and less experienced parents during the next 3 weeks. The male that aborted the juveniles was one of the smallest of the 2010 sample. Long-term experience is probably more important than short-term stress in seahorses, since it does not appear to have a response to acute stress, as has been concluded based on circulating cortisol and glucose levels after one minute air exposure, perhaps a consequence of an inability to flight or fight predators (Wright et al. 2007).

The PC analysis revealed that the highly unsaturated fatty acids were grouped in PC1, together with other fatty acids, but the 22:6n-3 had a negative loading and the 20:5n-3 and 20:4n-6 had a positive loading. If the PC1 reflects fatty acids that are selectively accumulated in the gonad of females during maturation, as vitellum, variations in these fatty acids might be indicating the performance of juveniles. For instance, 16:0, 16:1n-7, 18:1n-7, and 20:5n-3, which had positive values and eigenvalue >0.7 , are selectively used during embryogenesis for energetic purposes in several species of fish (Palacios et al. 2007) and even in seahorses (Faleiro & Narciso 2010). Considering the higher levels of 20:5n-3, 16:0, 16:1n-7, and 18:1n-7 in aborted juveniles, lower levels of these fatty acids could indicate more advanced development with more selective consumption of these fatty acids. A negative, albeit low correlation, was found between PC1 and salinity ($r = -0.39$; $p < 0.05$). Because of increasing intrusion of saline water from the sea into the lagoon, nutrients can decrease as salinity increases. Salinity changes can modulate the levels of 22:6n-3 in phospholipids and affect the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase pump (Palacios et al. 2004).

The composition of PC2 was composed, among others, of branched fatty acids, typical of bacteria (Kaneda 1991; Budge et al. 2001; Kelly & Scheibling 2012). Branched fatty acids in similar levels to the ones found here were reported in newborn juveniles by Faleiro and Narciso (2010, 2011). We found significantly more branched fatty acids in juveniles from 2009 than those from 2010 (1.9 and 0.7%, respectively). In the PC2, the 18:5n-3, typical of marine dinoflagellates, was also significant (Reuss & Poulsen 2002). It is probable that this factor was more related to recent consumption than to selective vitellum accumulation. It is highly unlikely that these fatty acids directly indicate the consumption of males (Azzarello 1991), since eggs in the male pouch are

isolated and there is no reported transference of fatty acids (Carcupino et al. 2002; Monteiro et al. 2005). Unless bacteria and algae were already present in the pouch and ingested by the juveniles during birth, the presence of these fatty acids might indicate ingestion by female and transference of nonselective material into the egg. Given that broods were smaller in 2009, if PC2 is indicating higher ingestion of bacteria and lower ingestion of dinoflagellates by the mother, the presence of branched fatty acids at the expense of fatty acids from dinoflagellates could be indicating a less than optimal nutrient availability.

The PC3 was composed mainly of 18:2n-6 and 18:3n-3, which has been associated with seagrass ingestion (Kelly & Scheibling 2012). Seahorses are frequently found in seagrass beds, and artificial seagrass structures are usually placed in aquaria for seahorses to hold on to. Explaining the presence of 18:2n-6 and 18:2n-3 in the juveniles, females could be nibbling on seagrass; although, this has not been reported in seahorses. Alternatively, they could be consuming organisms that readily eat seagrass. The juveniles with high 18:3n-3 and 18:2n-6 tended to separate at the top in the group “a,” since they had higher values in PC3. The use of natural seagrass instead of artificial might, therefore, benefit the welfare of seahorses and is suggested during captivity.

The branched higher fatty acid component in 2009 gave rise to a clear separation of group “c,” from group “a” and “b” sampled in 2010. In contrast, 18:5n-3 was present in very low proportions, but only in juveniles from broods collected in 2010, and not at all in 2009. As demonstrated by Ghioni et al. (2001) in fish cells, 18:5n-3 is converted to 18:4n-3, and can then be elongated and desaturated to 20:5n-3, which may explain the higher levels of 20:5n-3 in 2010.

The separation of group “a,” which is the result of high levels of 22:6n-3 and low levels of 20:5n-3 and 20:4n-6 from group “b” could be a first approximation to the adequate levels that are required by the juveniles during culture. In the “b” group, there are, among others, the aborted spawn and smaller sized juveniles. High levels of 22:6n-3 are apparently needed in the absence of adequate 20:5n-3 to produce juveniles of the tropical seahorse *H. erectus* that would be considered of “better quality” by aquarium culturists. For practical purposes, a diet for adults could be enriched with 22:6n-3 to achieve the levels of this fatty acid observed here in newborn juveniles fresh from the wild and which has been demonstrated as possible by Saavedra et al. (2014). Vite-Garcia et al. (2014) concluded that values close to 20% of 22:6n-3, as the ones obtained in this work for newborns, must be maintained in juveniles to achieve better results in growth and survival during the first two months of life. The values obtained in this work, in terms of lipid classes and fatty acids, can thus be taken as a starting point for levels that should be targeted in the diet of newborn juvenile and adult *H. erectus* in captivity.

Acknowledgement

The authors thank Gemma Martínez from Laboratorio de Ecología, UMDI Sisal, for her help during sample collecting.

Funding

This research was funded by projects CONACyT projects 101610 to M. Mascaro and 4081 to E. Palacios, and fellowship 42594 awarded to Nicolás Vite.

References

- Azzarello MY. 1991. Some questions concerning the Syngnathidae brood pouch. *Bull Mar Sci.* 49:741–747.
- Budge SM, Parrish CC, Mckenzie CH. 2001. Fatty acid composition of phytoplankton, settling particulate matter and sediments at a sheltered bivalve aquaculture site. *Mar Chem.* 76:285–303.
- Carcupino M, Baldacci A, Mazzini M, Franzoi P. 2002. Functional significance of the male brood pouch in the reproductive strategies of pipefishes and seahorses: a morphological and ultra-structural comparative study on three anatomically different pouches. *J Fish Biol.* 61:1465–1480.
- Cejas JR, Almansa E, Jérez S, Bolaños A, Felipe B, Lorenzo A. 2004. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comp Biochem Physiol.* 139:209–216.
- Dzyuba B, Van Look KJW, Cliffe A, Koldewey HJ, Holt WV. 2006. Effect of parental age and associated size on fecundity, growth and survival in the yellow seahorse *Hippocampus kuda*. *J Exp Biol.* 209:3055–3061.
- Escamilla B, Ordoñez-López U, Suárez-Morales E. 2011. Spatial and seasonal variability of *Acartia* (Copepoda) in a tropical coastal lagoon of the southern Gulf of Mexico. *Rev Biol Mar Oceanog.* 46:379–390.
- Faleiro F, Narciso L. 2010. Lipid dynamics during early development of *Hippocampus guttulatus* seahorses: searching for clues on fatty acid requirements. *Aquaculture.* 307:56–64.
- Faleiro F, Narciso L. 2011. Prey–predator dynamics in seahorses (*Hippocampus guttulatus*): deciphering fatty acid clues. *Aquacult Res.* 44:618–633.
- Foster SJ, Vincent ACJ. 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J Fish Biol.* 65:1–61.
- Ghioni C, Porter AEA, Sadler IH, Tocher DR, Sargent JR. 2001. Cultured fish cells metabolize octadecapentaenoic acid (all-cis δ 3,6,9,12,15–18:5) to octadecatetraenoic acid (all-cis δ 6,9,12,15–18:4) via its 2-trans intermediate (trans δ 2, all-cis δ 6,9,12,15–18:5). *Lipids.* 36:145–153.
- Hurtado MA, Racotta IS, Arcos F, Morales-Bojórquez E, Moal J, Soudant P, Palacios E. 2012. Seasonal variations of biochemical, pigment, fatty acid, and sterol compositions in female *Crassostrea corteziensis* oysters in relation to the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol.* 163:172–183.
- Job SD, Buu D, Vincent ACJ. 2006. Growth and survival of the tiger tail seahorse, *Hippocampus comes*. *J World Aquacult Soc.* 37:322–327.
- Kaneda T. 1991. *Iso-* and *anteiso-* fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev.* 55:288–302.
- Kelly JR, Scheibling RE. 2012. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Mar Ecol Prog Ser.* 446:1–22.
- Koldewey H, Martin-Smith KM. 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture.* 302:131–152.
- Krzanowski KJ. 1993. Principles of multivariate analysis. A user's perspective. Oxford: Sciences Publications.
- Lin Q, Lin J, Lu J, Li B. 2008. Biochemical composition of six seahorse species, *Hippocampus* sp., from the Chinese coast. *J World Aquacult Soc.* 39:225–234.
- Lin Q, Lin J, Wang C. 2009. Biochemical composition of the wild and cultured seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker and *Hippocampus trimaculatus* Leach. *Aquacult Res.* 40:710–719.
- Linton JR, Soloff BL. 1964. The physiology of the brood pouch of the male sea horse *Hippocampus erectus*. *Bull Mar Sci.* 14:45–61.
- Lourie S. 2003. Measuring seahorses. Project Seahorse Technical Report No. 4, Version 1.0. Project Seahorse, Vancouver (BC): Fisheries Centre, University of British Columbia. 15 pp.

- Lourie SA, Foster SJ, Cooper EWT, Vincent ACJ. 2004. A guide to the identification of seahorses. Project seahorse and TRAFFIC North America. Washington (DC): University of British Columbia and World Wildlife Fund. 114 p.
- Manly BFJ. 1994. Multivariate statistical methods. London: Chapman and Hall.
- Monteiro NM, Almada VC, Vieira MN. 2005. Implications of different brood pouch structures in Syngnathid reproduction. *J Mar Biol Ass UK*. 85:1235–1241.
- Mourente G, Rodriguez A, Tocher DR. 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n–3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture*. 112:79–98.
- Otero-Ferrer F, Molina L, Socorro J, Fernández-Palacios H, Izquierdo M. 2012. Effect of different live prey on spawning quality of short-snouted seahorse, *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758). *J World Aquacult Soc*. 43:174–186.
- Palacios E, Bonilla A, Luna D, Racotta IS. 2004. Survival, Na⁺/K⁺-ATPase and lipid response to salinity challenge in fed and starved white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*. 234:497–511.
- Palacios E, Racotta IS, Aparicio B, Arjona O, Martínez-Palacios C. 2007. Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. *J Fish Physiol Biochem*. 33:81–91.
- Payne MF, Rippingale RJ. 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. *Aquaculture*. 188:353–361.
- Planas M, Quintas P, Chamorro A, Silva C. 2010. Female maturation, egg characteristics and fatty acids profile in the seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Anim Reprod Sci*. 122:66–73.
- Reuss N, Poulsen LK. 2002. Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland. *Mar Biol*. 141:423–434.
- Saavedra M, Masdeu M, Hale P, Sibbons CM, Holt WV. 2014. Dietary fatty acid enrichment increases egg size and quality of yellow seahorse *Hippocampus kuda*. *Anim Reprod Sci*. 145:54–61.
- Sandoval MI. 2006. Efecto de la dieta congelada sobre la reproducción y la calidad de los juveniles del caballito de mar del Pacífico *Hippocampus ingens* (Girard, 1859) en México [Effect of a frozen diet on the reproduction performance and juveniles quality seahorse of the Pacific *Hippocampus ingens* (Girard, 1859) in Mexico]. [PhD Thesis]. Ensenada, México: CICESE. 146 p.
- Sargent JR, Tocher D, Bell J. 2002. The lipids. In: Halver J, Hardy R, editors. Fish nutrition. New York (NY): Elsevier Science; p. 182–246.
- Tabachnick BG, Fidell LS. 1989. Using multivariate statistics. New York (NY): Harper Collins.
- Tapia FU, Herrera-Silveira JA, Aguirre-Macedo ML. 2008. Water quality variability and eutrophic trends in karstic tropical coastal lagoons of the Yucatán Peninsula. *ECSS*. 76:418–430.
- Teixeira RL, Musick JA. 2001. Reproduction and food habits of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Teleostei: Syngnathidae) of Chesapeake Bay, Virginia. *Rev Bras Biol*. 61:79–90.
- Vite-García N, Simoes N, Arjona O, Mascaró M, Palacios E. 2014. Growth and survival of *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) juveniles fed on *Artemia* with different HUFA levels. *Lat Am J Aquat Res*. 42:150–159.
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*. 144:307–313.
- Wright KA, Woods CMC, Gray BE, Lokman PM. 2007. Recovery from acute, chronic and transport stress in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. *J Fish Biol*. 70:1447–1457.