

DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Pagrus pagrus* BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE SALINIDAD Y TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN*†

M. MERCEDES BERRUETA¹, JULIETA SUÁREZ y EDDIE ARISTIZABAL
Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP),
Paseo Victoria Ocampo N° 1, Escollera Norte, B7602HSA - Mar del Plata, Argentina
¹correo electrónico: mberrueta@inidep.edu.ar

RESUMEN. *Pagrus pagrus* es una especie demersal de amplia distribución en el Mediterráneo y las costas oriental y occidental del Océano Atlántico. En la Argentina se distribuye naturalmente a lo largo de las costas de la Provincia de Buenos Aires entre los 10 y 50 m de profundidad. La estimación de la calidad de los huevos durante los estadios iniciales del desarrollo embrionario constituye un criterio predictivo útil para evaluar el potencial de la especie de producir juveniles. El objetivo del presente estudio fue describir en detalle los estadios del desarrollo embrionario y el tiempo de eclosión de las larvas bajo distintas condiciones de salinidad y temperatura. Los huevos fertilizados obtenidos por desove natural se incubaron a 15, 30 y 40 niveles de salinidad combinados con 14 y 18 °C de temperatura. En los distintos ensayos se microfotografiaron los estadios embrionarios y se describieron las estructuras. El desarrollo de los huevos se completó en todos los ensayos realizados. A 18 °C el embrión completamente formado eclosionó a las 40 h postfertilización; a 14 °C la eclosión se produjo 73 h después. El efecto de la salinidad sobre el desarrollo embrionario se vio reflejado en un crecimiento irregular de los blastómeros durante los estadios de clivaje a 15 y 40 de salinidad con un posterior desarrollo anormal de la región caudal en las larvas incubadas a dichos niveles. Conocer los estadios embrionarios, la secuencia de segmentación, el tiempo de formación de los órganos y la duración del desarrollo embrionario hasta la eclosión es un requisito básico para evaluar la calidad de las camadas de huevos destinadas a la producción masiva de larvas.

Palabras clave: *Pagrus pagrus*, organogénesis, calidad de huevos, salinidad, temperatura.

EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *Pagrus pagrus* UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF INCUBATION SALINITY AND TEMPERATURE

SUMMARY. *Pagrus pagrus* is a demersal species widely distributed in the Mediterranean and the eastern and western shores of the Atlantic Ocean. In Argentina it distributes naturally along the coast of the Buenos Aires Province between 10 and 50 m depth. The estimate of egg quality during the early stages of embryonic development is a useful predictive criterion to evaluate the potential of the species to produce juveniles. The aim of this study was to describe in detail the stages of embryonic development and larval hatching time under different conditions of salinity and temperature. The fertilized eggs obtained from natural spawning were incubated at 15, 30 and 40 salinity levels combined with 14 and 18 °C temperature. In the different experiments the embryonic stages were photomicrographed and structures described. Egg development was completed in all experiments made. At 18 °C the fully formed embryo hatched at 40 h postfertilization; at 14 °C hatching occurred 73 h after. The effect of salinity on embryonic development was

*Contribución INIDEP N° 2029

†Este trabajo es parte del Seminario de Licenciatura de M. M. Berrueta.

reflected in an irregular growth of blastomeres during the cleavage stages at 15 and 40 salinity with a subsequent abnormal development of the caudal region in larvae incubated at said levels. Knowing the embryonic stages, sequence of segmentation, time of organ formation and duration of embryonic development until hatching is a basic requirement to evaluate the quality of egg batches devoted to mass larvae production.

Key words: *Pagrus pagrus*, organogenesis, egg quality, salinity, temperature.

INTRODUCCIÓN

El besugo *Pagrus pagrus* (Linné), perteneciente a la Familia Sparidae, es una especie de amplia distribución en el Mediterráneo y en las costas oriental y occidental del Océano Atlántico (Manoach, 1976). Dentro del Atlántico sudoccidental se encuentra naturalmente distribuido a lo largo de las costas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, entre los 10 y 50 m de profundidad (Cotrina, 1989). Es una especie demersal que muestra a lo largo de la costa bonaerense una preferencia por los fondos rocosos, conformando un importante recurso pesquero. Se reconocen dos áreas de distribución bien definidas: una entre los 35° S y los 38° S (región norte) y otra entre los 39° S y los 41° S (región sur), siendo consideradas las mismas como dos poblaciones diferentes (Cotrina, 1989). En cuanto a la temperatura del agua en sus zonas de distribución, Cotrina (1989) halló valores entre 14,64 a 19,96 °C en los meses de otoño y 10,90 a 13,84 °C en los meses de primavera. García (2012) determinó el rango de temperatura para ejemplares provenientes de la región norte del Ecosistema Costero Bonaerense (ECB) hallando valores entre los 10,7 a 18,8 °C en verano.

En relación con los valores de salinidad a lo largo del ECB, García y Molinari (2013) determinaron que *P. pagrus* se distribuye aguas adentro de la isohalina de 33,7 y el límite interno varió entre los 28 en la región norte y 33,2 en la región sur. Los mismos autores observaron que los besugos se distribuían cerca del frente salino en la región norte en los períodos de primavera y verano, cuando esa zona recibe un gran aporte de

aguas diluidas provenientes del Río de la Plata hacia la plataforma. Esta distribución coincide temporalmente con los meses que conforman la temporada reproductiva de esta especie y podría esperarse que el besugo utilice estas áreas retentivas para evitar la dispersión de huevos y larvas (García y Molinari, 2013).

Las investigaciones realizadas en *P. pagrus* en la Argentina comprenden estudios biológico-pesqueros en su ambiente natural, tales como distribución de tallas, relación talla-edad, proporción de sexos (Cotrina, 1986), determinación de la edad y crecimiento por lectura de escamas (Cotrina, 1977), alimentación (Capitoli y Haimovici, 1993), desove y desarrollo natural (Ciechomski y Weiss, 1973), reproducción en cautiverio, larvicultura y engorde (Aristizabal, 2003; Aristizabal *et al.*, 2007) y desarrollo embrionario bajo distintas temperaturas (Radonic *et al.*, 2005). Los efectos de las variables salinidad y temperatura en forma combinada sobre los primeros estadios de desarrollo aún no han sido descriptos para esta especie.

El estudio del desarrollo embrionario de los peces es de importancia para comprender los factores que operan durante los primeros estadios de vida, tanto para ayudar a mejorar las técnicas de acuicultura (Ishibashi *et al.*, 1992; Phil *et al.*, 1992) como para brindar información útil aplicable a la explotación y manejo de la pesquería (Tanaka, 1985; Wu, 2002). Durante la producción de juveniles de *P. pagrus* en cautiverio, es normal que se presenten fluctuaciones en los porcentajes de viabilidad de los huevos, las cuales necesitan ser estudiadas con mayor nivel de detalle para incrementar la eficiencia de producción en la larvicultura controlada de besugo (Aristizabal y Suárez, 2006; Aristizabal *et al.*, 2009).

La temperatura y la salinidad son factores ambientales dominantes que afectan a huevos y larvas de muchas especies de peces marinos (Holliday, 1969), incidiendo de manera significativa sobre el desarrollo, crecimiento y supervivencia en estadios tempranos (Ostrowski *et al.*, 2011). Las etapas tempranas del desarrollo embrionario (etapas de clivaje) son sensibles a los cambios físicos y químicos del medio de incubación como la salinidad, baja concentración de oxígeno disuelto y contaminantes (Kjørsvik *et al.*, 1990; Shields *et al.*, 1997; Hattori *et al.*, 2004). El desarrollo de los huevos de *P. pagrus* es mero-blástico (Balinsky, 1978).

Los efectos de la salinidad sobre los huevos son el resultado de uno o varios factores, tales como la concentración osmótica total, la incidencia y concentración de iones particulares, la disponibilidad de oxígeno y la flotabilidad (Holliday, 1969). Las estructuras internas de las larvas marinas se ven afectadas frente a condiciones de salinidad no óptimas (Holliday, 1969). En trabajos experimentales con *Chrysophrys major*, Woo y Murat (1981) han sugerido que la especie adopta distintos patrones metabólicos según la salinidad, e indican la posibilidad de reducción de la utilización de las reservas energéticas cuando el medio es isosmótico. En general, existe una relación inversa entre la salinidad y la mortalidad en huevos de peces pelágicos marinos (Bunn *et al.*, 2000).

La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en la tasa de desarrollo de los huevos (Herzig y Winkler, 1986). En los peces, como en todos los organismos de sangre fría, el aumento de la temperatura dentro de un rango óptimo da como resultado un desarrollo embriológico más rápido (Saka *et al.*, 2005). El rango óptimo de temperatura depende de las características biológicas y ecológicas de las especies (Bunn *et al.*, 2000). Sin embargo, es sabido que los peces aclimatados al cautiverio presentan amplias variaciones de sus características y parámetros reproductivos (Mihelakakis *et*

al., 2001; Mylonas *et al.*, 2004; Aristizabal, 2006 b). Por lo tanto, la intención de este ensayo es describir el efecto de ambas variables mencionadas en forma combinada sobre el desarrollo embrionario del besugo, con la finalidad de obtener información tendiente a establecer la combinación de salinidad y temperatura de incubación más eficiente que garantice la mejor calidad de larvas de besugo en cautiverio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron huevos de besugo (*P. pagrus*) producidos por el stock de reproductores mantenidos en un sistema de recirculación en el Programa de Maricultura y Biología Experimental del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP).

Los peces reproductores fueron expuestos a un fotoperíodo 12 L: 12 O en un rango de temperatura entre 13-19 °C, siguiendo la metodología descrita en Aristizabal (2003).

Desde el comienzo de la temporada de reproducción los desoves ocurrieron de forma natural en el horario entre las 13-16 h. Durante ese tiempo los reproductores realizaban movimientos vigorosos sobre la superficie del agua denominados *splash*. Pocos minutos después de los *splash*, se revisó el colector de huevos (malla 300 µm) ubicado por debajo de la salida del rebosadero del tanque. Posteriormente, los huevos fueron lavados y se colocaron en un recipiente de 3l durante unos 10-15 min, hasta que se segregaron en dos capas distintas: una capa superior de huevos flotantes (viables) y una capa inferior de huevos con flotabilidad negativa (no viables). Los huevos viables se desinfectaron con yodo povidona al 10% por 5 min.

Los huevos flotantes recolectados fueron considerados como tiempo 0 y se incubaron en vasos de precipitado de 500 ml a una densidad inicial de 100 huevos l⁻¹, sin aireación artificial ni agita-

ción, no se efectuó reposición de agua. Los vasos de precipitado se taparon con papel film para evitar la evaporación del agua. Se utilizó un fotoperíodo 24 horas luz.

Para poner a prueba el efecto de la salinidad y la temperatura sobre el desarrollo embrionario, se trabajó por duplicado con tres salinidades: 15, 30 y 40, en combinación con dos temperaturas: 14 y 18 °C (Tabla 1). Se seleccionó este rango de salinidades a los efectos de contemplar los ambientes propicios para el cultivo de *P. pagrus*, considerando salinidades que incluyan el punto isomóti-co determinado para varias larvas de peces marinos entre salinidades 10-15 (Aristizabal, 2003; Arjona *et al.*, 2007). Las temperaturas elegidas corresponden al rango habitual de desove de la especie en la Estación Experimental de Maricultura (Aristizabal, 2006 a).

Las diferentes salinidades se prepararon por dilución de agua de mar con agua destilada o por evaporación del agua de mar, según corresponda, y se midieron con un refractómetro manual. La temperatura se controló colocando los vasos de

Tabla 1. Condiciones de salinidad y temperatura para los distintos ensayos.

Table 1. Conditions of salinity and temperature for the different experiments.

Ensayos	Temperatura (°C)	Salinidad
1	14	15
1 (réplica)	14	15
2	14	30
2 (réplica)	14	30
3	14	40
3 (réplica)	14	40
4	18	15
4 (réplica)	18	15
5	18	30
5 (réplica)	18	30
6	18	40
6 (réplica)	18	40

precipitado en una incubadora (EYELA múltiples Termo Incubadora MTI-202).

Después de la fertilización, se observaron varias divisiones celulares en el polo animal del huevo a partir de las cuales se determinaron los diferentes estadios de desarrollo. La ontogenia de *P. pagrus* fue dividida en cuatro estadios principales: clivaje, blástula, gástrula y embrión, cada estadio fue subdividido dependiendo del número de divisiones celulares que ocurren o la aparición de los diferentes órganos de acuerdo con Oozeki y Hirano (1985) para el espárido *Sillago japonica*.

Los huevos fecundados se fotografiaron cada 20 minutos hasta la etapa de mórula, y luego cada 1 h hasta la eclosión de las larvas. Las fotografías se tomaron con un microscopio Nikon E600 y un analizador de imagen (Digital de Alta Definición de la microscopía, Keyence, VH-7000C).

Para evaluar la tasa de eclosión (TE) de los diferentes lotes, se contaron las larvas vivas y muertas y los huevos sin eclosionar al día 0. La misma fue calculada según la siguiente ecuación:

$$TE (\%) = \frac{N^{\circ} \text{ larvas vivas}}{N^{\circ} \text{ larvas vivas} + N^{\circ} \text{ larvas muertas} + N^{\circ} \text{ huevos sin eclosionar}} \times 100$$

Los resultados (TE) se trataron estadísticamente por técnicas de ANOVA con un 5% de significación (Zar, 1984).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción inicial de los huevos

La morfología del huevo tiene cierta utilidad como primera herramienta para caracterizar las camadas de huevos que serán utilizados para una larvicultura (Giménez *et al.*, 2006). Los criterios de calidad más utilizados como identificación inicial están relacionados con la forma y diámetro de los huevos, número y distribución de gotas

oleosas, transparencia y homogeneidad del vitelo, y apariencia del corion (Álvarez-Lajonchere, 2006). En este ensayo, las características iniciales observadas en los huevos viables de *P. pagrus* concuerdan con las mencionadas por Ciechomski y Weiss (1973), Machiandarena *et al.* (2003) y Aristizabal (2006 b) para la misma especie.

Los huevos viables obtenidos del desove espontáneo fueron esféricos, transparentes, con flotabilidad positiva, con vitelo uniforme, no coloreados y telolecíticos, con un corion grueso y liso, cuyo diámetro promedio previo a ser colocados en los distintos tratamientos fue de $0,91 \pm 0,01$ mm. Todos presentaron internamente una sola gota oleosa central (Figura 1 A). En los huevos no viables (flotabilidad negativa) se observó una superficie opaca, con pequeñas manchas negras y abolladuras; con vitelo reducido, rugoso y con deformaciones, se hace visible una única gota oleosa y su diámetro promedio fue de $0,89 \pm 0,01$ mm (Figura 1 B).

Flotabilidad

Desde el punto de vista de la producción acuícola, la flotabilidad es uno de los métodos más sen-

cillos para estimar la viabilidad de una camada de huevos. Los huevos no viables son fundamentalmente los no fecundados y son los que se hunden y descartan (Álvarez-Lajonchere, 2006). Este criterio de selección puede repetirse en varias etapas del manejo de los huevos, incluso durante la propia incubación del embrión. En el presente ensayo, los huevos de *P. pagrus* presentaron flotabilidad positiva en salinidades 30 y 40, ubicándose por debajo de la superficie del agua. Para la salinidad 15, los huevos comenzaron a hundirse hasta llegar al fondo del vaso de precipitado, dicha condición se observó de manera inmediata luego de ser transferidos a esta salinidad. En estudios realizados sobre otras especies como *Rhombosolea tapirina*, los huevos perdieron flotabilidad por debajo de una concentración salina igual a 28 (Hart y Purser, 1995) y en *Paralichthys lethostigma* se hundieron por debajo de 29 de salinidad (Smith *et al.*, 1999). Estas diferencias en la flotabilidad se deberían a la cantidad de agua en los huevos de teleósteos marinos (Gracia-López *et al.*, 2004). Alrededor del 90% de la flotabilidad de dichos huevos es causada por su alto contenido acuoso, el 10% restante lo aportarían los lípidos.

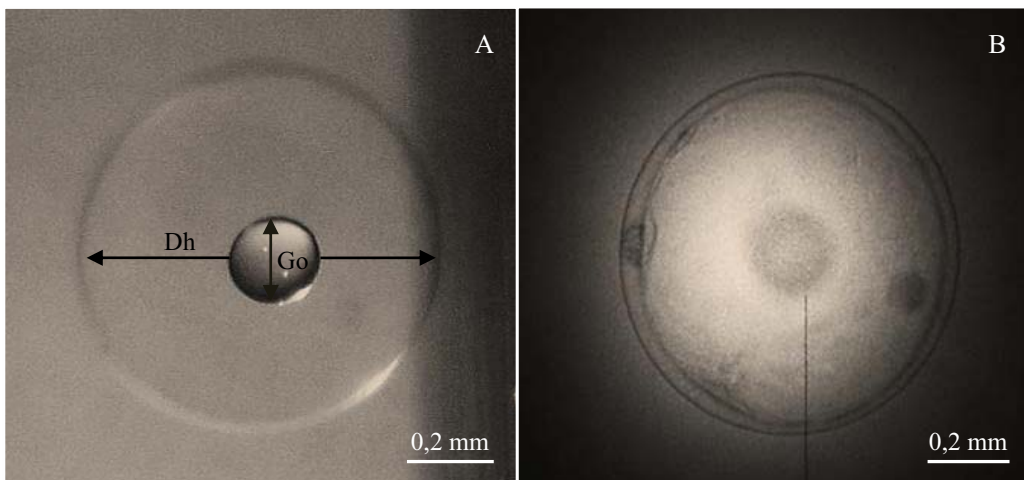


Figura 1. A) Ovocito fecundado (huevo) viable de *Pagrus pagrus*. Dh: diámetro del huevo. Go: diámetro de la gota oleosa. B) Huevo inviable de *P. pagrus*.

Figure 1. A) *Pagrus pagrus* viable fertilized oocyte (egg). Dh: egg diameter. Go: oily drop diameter. B) *P. pagrus* inviable egg.

Adlandsvik *et al.* (2001) describieron que los huevos de *Micromesistius poutassou* presentaban flotabilidad positiva en salinidades por encima de 34 hasta 40 y encontraron indicios de una estabilidad relativa de la flotabilidad o disminución de la misma durante las etapas correspondientes al cierre del blastoporo. De acuerdo con las mediciones de la flotabilidad según los mismos autores, los huevos de *M. poutassou* presentaron una densidad media de $1,0298 \text{ g cm}^{-3}$ equivalente a una salinidad de 38, es por esto que en salinidades altas los huevos tendrían flotabilidad positiva y en salinidades más bajas su flotabilidad se vería disminuida debido a que el huevo presentaría mayor densidad que el agua marina ($1,0267 \text{ g cm}^{-3}$).

Desarrollo embrionario

El desarrollo de los huevos de *P. pagrus* se completó en todos los ensayos realizados. Como era de esperar, en la temperatura más alta (18°C) el desarrollo del embrión fue más rápido, alcanzando 40 h; mientras que a 14°C el desarrollo embrionario se completó en 73 h después de la fertilización (Tabla 2).

Cronología del desarrollo embrionario a 18°C

Estadio de clivaje

Este estadio está dividido en siete subestadios de acuerdo con el número de células visibles (Oozeki y Hirano, 1985):

- 1) Una célula (Figura 2 A): se observa el espacio perivitelino debido a la separación entre el corion y la membrana celular del huevo.
- 2) Dos células (Figura 2 B): primera división celular, se distinguen dos células o blastómeros en el polo animal, ambas presentan gran tamaño y forma regular en todos los ensayos.
- 3) Cuatro células (Figura 2 B-D): segunda división celular, se observan cuatro células en el polo animal. El desarrollo de los blastómeros fue uniforme en los ensayos pertenecientes a

Tabla 2. Cronología del desarrollo embrionario de huevos de *Pagrus pagrus* a dos niveles de temperatura de incubación.

Table 2. Chronology of the embryonic development of *Pagrus pagrus* eggs at two incubation temperature levels.

Estadios de desarrollo	Temperatura	
	14°C	18°C
Desove	0:00	0:00
Estadio de clivaje		
1 célula	20 min	10 min
2 células	40 min	20 min
4 células	1 h 20 min	40 min
8 células	2 h 20 min	1 h
16 células	3 h	1 h 20 min
32 células	3 h 40 min	1 h 40 min
Mórula	4 h 20 min	2 h
Estadio de blástula		
Blástula temprana	6 h 20 min	2 h 40 min
Estadio de gástrula		
Gástrula temprana	20 h 40 min	6 h 20 min
Estadio de embrión		
Embrión incipiente	27 h 20 min	14 h 20 min
Vesícula de Kuppfer	36 h	16 h
Elongación de la cola	58 h	24 h 40 min
Embrión listo para eclosionar	73 h	40 h

las salinidades 30 y 40, sin embargo en la salinidad 15 se observaron células irregulares.

- 4) Ocho células (Figura 2 E y F): tercer división celular, como resultado se formaron ocho blastómeros. En la salinidad 15 se observó un mayor tamaño de los blastómeros y un desarrollo asimétrico de los mismos. En la salinidad 40 los blastómeros también presentaron asimetrías pero las células eran de menor tamaño.

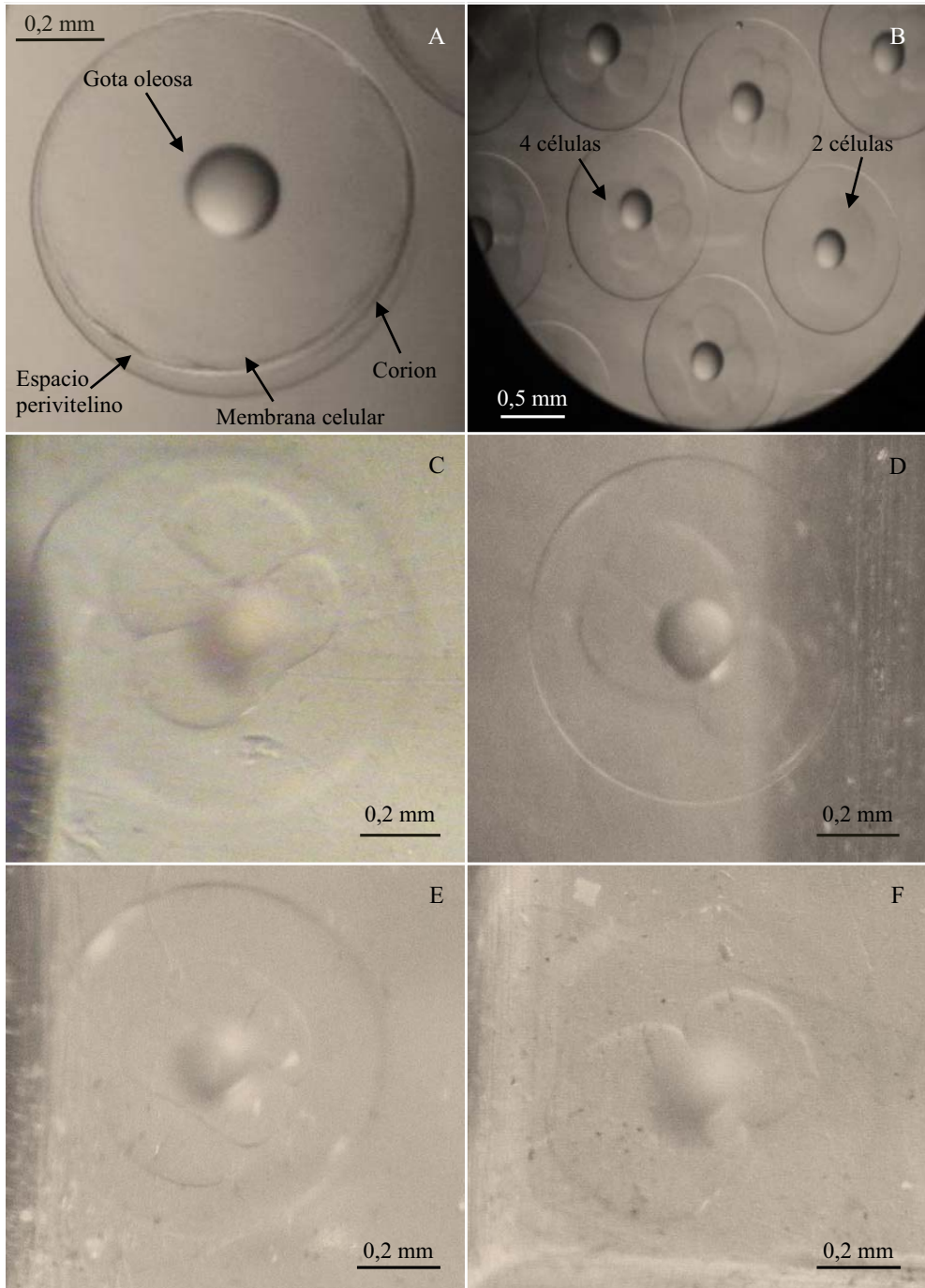


Figura 2. Imágenes del estadio de clivaje en el desarrollo embrionario de *Pagrus pagrus*. Salinidad 30: 1 célula (A), 2 y 4 células (B) y 8 células (E). Salinidad 15: 4 células (C y D) y 8 células (F).

Figure 2. Images of the cleavage stage in *Pagrus pagrus* embryonic development. Salinity 30: 1 cell (A), 2 and 4 cells (B) and 8 cells (E). Salinity 15: 4 cells (C and D) and 8 cells (F).

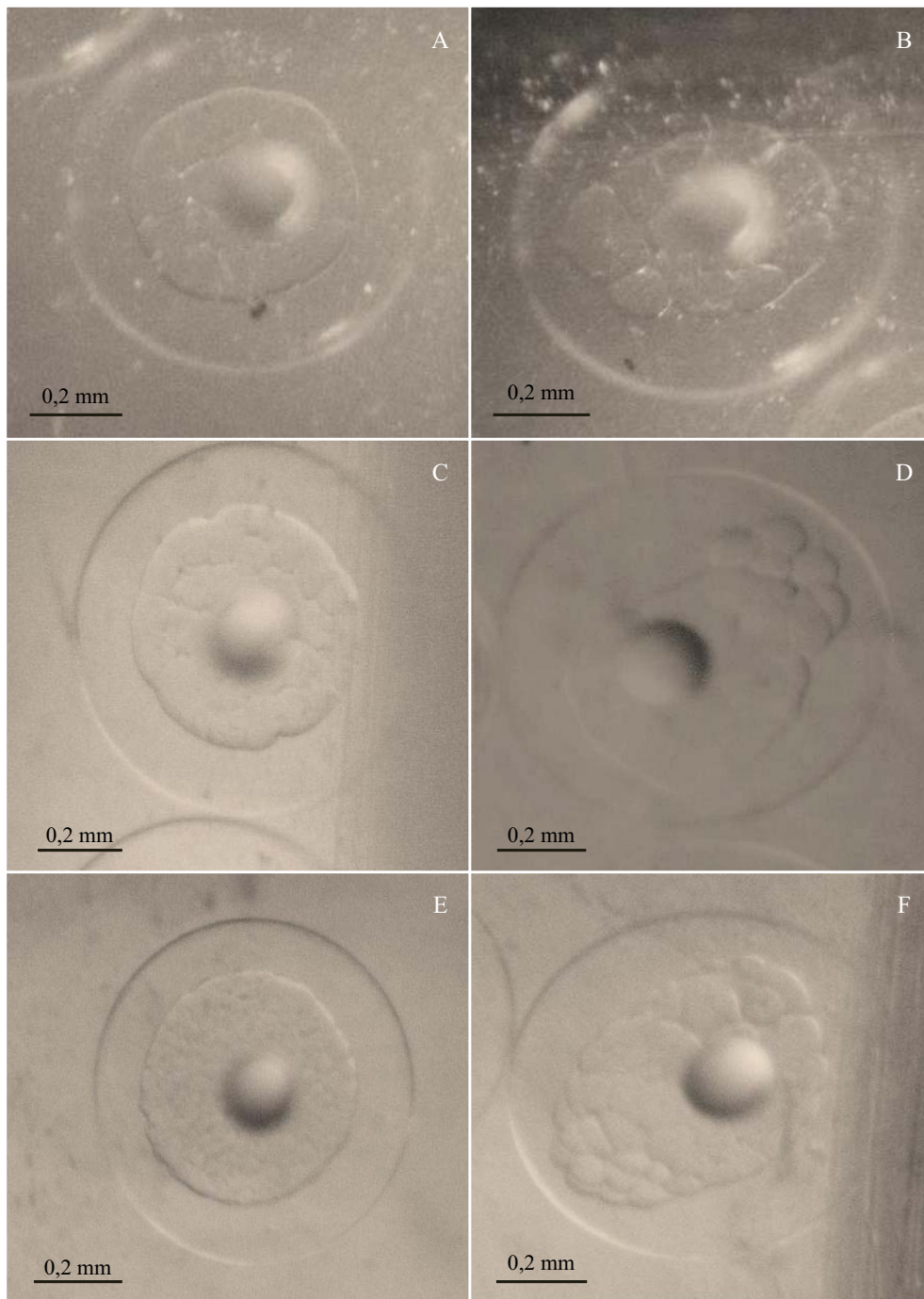


Figura 3. Imágenes del estadio de clivaje en el desarrollo embrionario de *Pagrus pagrus*. Salinidad 30: 16 células (A), 32 células (C) y mórula (E). Salinidad 15: 16 células (B). Salinidad 40: 32 células (D) y mórula (F).

Figure 3. Images of the cleavage stage in *Pagrus pagrus* embryonic development. Salinity 30: 16 cells (A), 32 cells (C) and morula (E). Salinity 15: 16 cells (B). Salinity 40: 32 cells (D) and morula (F).

- 5) Dieciséis células (Figura 3 A y B): la cuarta división celular dividió las dos filas de blastómeros en cuatro blastómeros cada una, formándose 16 células. Se observan divisiones celulares irregulares en las salinidades 15 y 40.
- 6) Treinta y dos células (Figura 3 C y D): la quinta división celular, da origen a 32 células. Se observan células irregulares en la salinidad 15 y 40.
- 7) Mórula (Figura 3 E y F): luego de la sexta división celular se observan 64 pequeños blastómeros; el embrión adquiere el aspecto característico de una mora. En las salinidades 15 y 40 se observaron mórulas con blastómeros de gran tamaño (Figura 4 A y B).

Estadio de blástula

Los blastómeros se dispusieron en una capa, y se originó la cavidad llamada blastocele, dispuesta internamente entre la capa germinal y el vitelo. A medida que la segmentación progresó, la capa epitelial de células englobó al blastocele, y el embrión se convirtió en una esfera hueca, cuyas paredes estaban formadas por una capa epitelial de células denominada blastodermo, formándose la blástula. No se observaron diferencias durante el desarrollo de este estadio dentro de los diferentes ensayos (Figura 4 C-F).

Estadio de gástrula

Durante este estadio el blastodermo se expandió sobre la superficie del vitelo por epibolia, la cual se caracteriza por un crecimiento y multiplicación rápida de las células que formaron el blastodisco sin que hubiera un aumento apreciable en su masa. Las células empezaron a extenderse superficialmente sobre la zona vegetativa del huevo, englobándolo. A consecuencia de ello el blastodisco cubrió el vitelo, hasta que sus bordes convergieron y se cerraron en el extremo posterior de la blástula formando el tapón vitelino (Figura 5 A y B). Durante este estadio no se observó diferencia entre los diferentes ensayos.

Este estadio dura desde la aparición del

embrión hasta el momento previo a la eclosión. Según Oozeki y Hirano (1985), está dividido en cuatro subestadios según el proceso de organogénesis:

- 1) Embrión incipiente (Figura 6 A): se distinguió el cuerpo embrionario mediante la característica forma de T. A partir de este momento se observó una mayor pigmentación del embrión y comenzó la formación de los órganos. En todos los ensayos propuestos se observó el mismo embrión incipiente sin alteraciones en su tamaño ni forma.
- 2) Aparición de la vesícula de Kuppfer (Figura 6 B): se visualizó la vesícula de Kuppfer en la posición extrema caudal del embrión. En este subestadio ya pueden reconocerse claramente las cápsulas ópticas y óticas, los primeros siete somitos en la zona dorsal del embrión también se hacen visibles y la pigmentación se incrementa a lo largo de todo el cuerpo embrionario.
- 3) Elongación de la cola (Figura 6 C): durante el período que duró la elongación de la cola, se observaron los primeros latidos del corazón y la vesícula de Kuppfer desaparece. En el ensayo de salinidad 15 se observaron embriones con poco desarrollo de la zona caudal.
- 4) Embrión listo para eclosionar (Figura 6 D): se observan movimiento del embrión, y su longitud es de 2/3 el perímetro del huevo. Tanto en el embrión como en la gota oleosa, se observaron zonas con mayor presencia de melanóforos y xantóforos. En los ensayos con salinidad 15, los embriones presentaron poca movilidad, su longitud no superó los 2/3 del perímetro del huevo y su pigmentación fue escasa.

El desarrollo de los huevos de *P. pagrus* se completó en todos los ensayos realizados. Como era de esperar, en la temperatura más alta (18 °C) el desarrollo del embrión fue más rápido, de 40 h; mientras que a 14°C el desarrollo embrionario se completó 73 h después de la fecundación (Figura 7). Ciechowski y Weiss (1973) describieron por

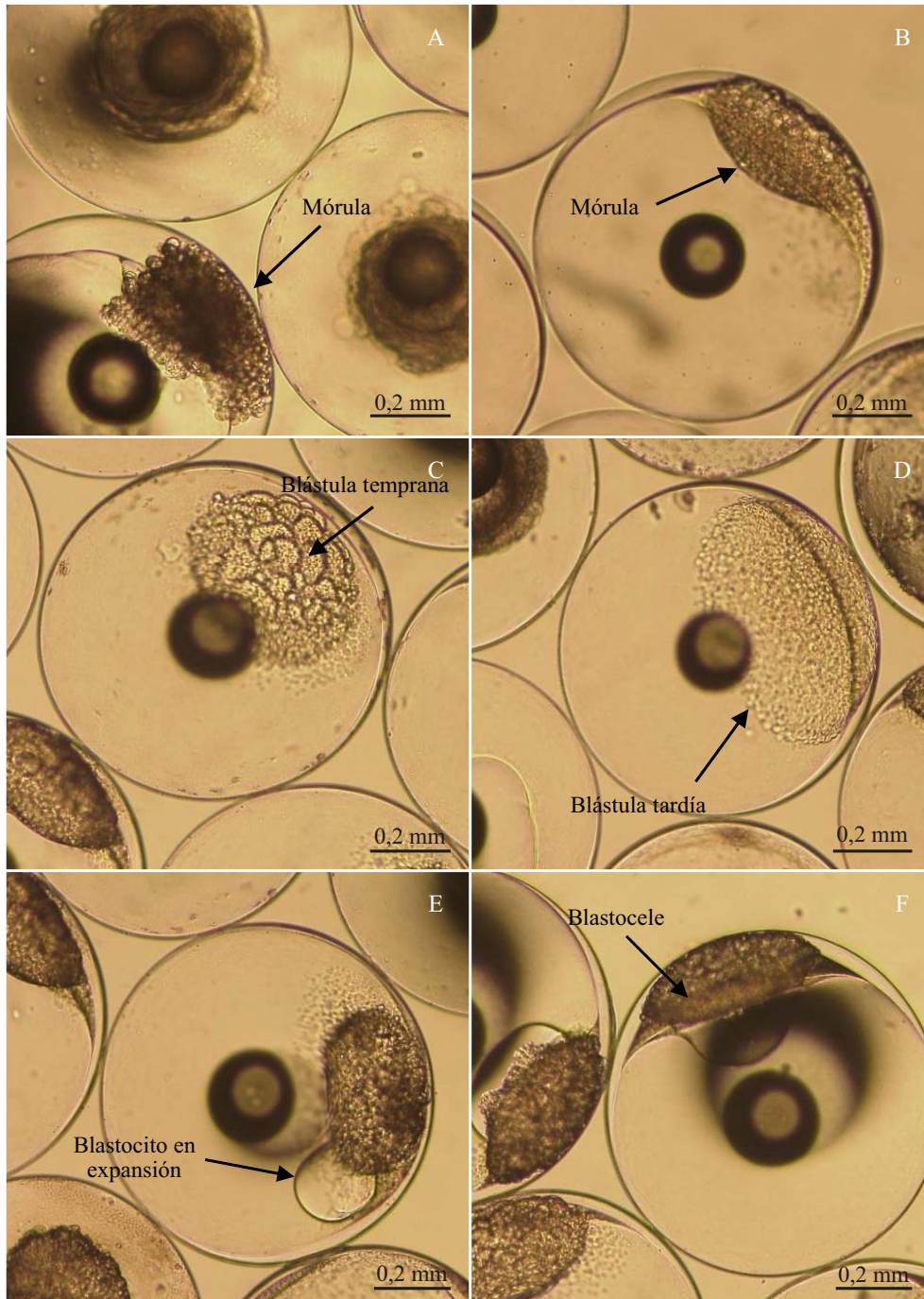


Figura 4. Imágenes del estadio de blástula en el desarrollo embrionario de *Pagrus pagrus*. Salinidad 40: mórula (A). Salinidad 30: mórula (B), blástula temprana (C), blástula tardía (D), blastocito en expansión (E) y blastocele (F).

Figure 4. Images of the blastula stage in *Pagrus pagrus* embryonic development. Salinity 40: morula (A). Salinity 30: morula (B), early blastula (C), late blastula (D), expanding blastocyte (E) and blastocoele (F).

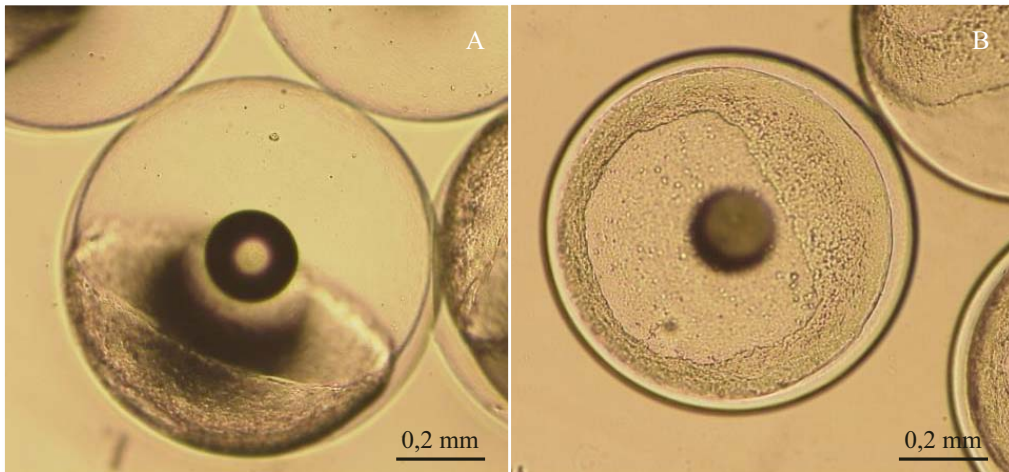


Figura 5. Imágenes del estadio de gástrula en el desarrollo embrionario de *Pagrus pagrus*. A) Gástrula temprana. B) Gástrula tardía.

Figure 5. Images of the gastrula stage in *Pagrus pagrus* embryonic development. A) Early gastrula. B) Late gastrula.

primera vez el desarrollo embrionario para *P. pagrus*, cuya duración fue de 38 h en huevos incubados a 21-22,5 °C. Machinandiarena *et al.* (2003) mencionaron que los tiempos de eclosión para la misma especie fueron de 59, 51 y 48 h, para las temperaturas 16, 18 y 20 °C, respectivamente, mientras que Radonic *et al.* (2005) obtuvieron tiempos de incubación de 65, 43 y 29 h a 15, 20 y 25 °C (Figura 7). En otros espáridos, como *Sparus aurata* la eclosión ocurrió 70 h después de la fecundación a una temperatura de 16 °C (Bedier *et al.*, 1984). Los tiempos de incubación en este estudio son coherentes con los rangos establecidos por los autores mencionados anteriormente para espáridos.

La morfología de los blastómeros es una herramienta útil para identificar la calidad de las camadas de huevos obtenidos en *hatcheries*, ya que se demostró que la presencia de los blastómeros anormales durante las etapas de clivaje darían como resultado huevos poco viables (Radonic *et al.*, 2005). En este trabajo, los huevos mantenidos a salinidad 15 y 40 presentaron blastómeros asimétricos y de mayor tamaño durante el clivaje, aunque en la última salinidad la asimetría de tamaños de los blastómeros fue menor. Para

Scophthalmus maximus, la calidad de las larvas se ve afectada por la calidad inicial del huevo. Los juveniles pertenecientes a los lotes de huevos con altas tasas de blastómeros anormales tienen significativamente menos éxito en la finalización de la metamorfosis como así también en el desarrollo de un patrón normal de la pigmentación (Kjórsvik *et al.*, 2003). La simetría en las divisiones celulares durante la fase de blástula es considerada un fuerte indicador de la eclosión y el desarrollo normal de larvas en el bacalao (*Gadus morhua*) (Kjórsvik, 1994), en el *Hippoglossus stenolepis* (Shields *et al.*, 1997) y otras especies marinas (Kjórsvik *et al.*, 1990). Estos resultados coinciden con los descritos por Holliday (1965) en *Gadus callaris* y *Pleuronectes platessa*, cuyos blastómeros durante la etapa de clivaje (8-16 células) se hincharon y presentaron formas irregulares en bajas salinidades. Durante las posteriores etapas de clivaje, el mismo autor observó divisiones celulares anormales como resultado de la aglomeración de las células al presentar un volumen mayor. Por el contrario, en altas salinidades, Holliday (1965) encontró que las células se redujeron ligeramente, adquiriendo una forma redondeada con contornos bien definidos. Kinne

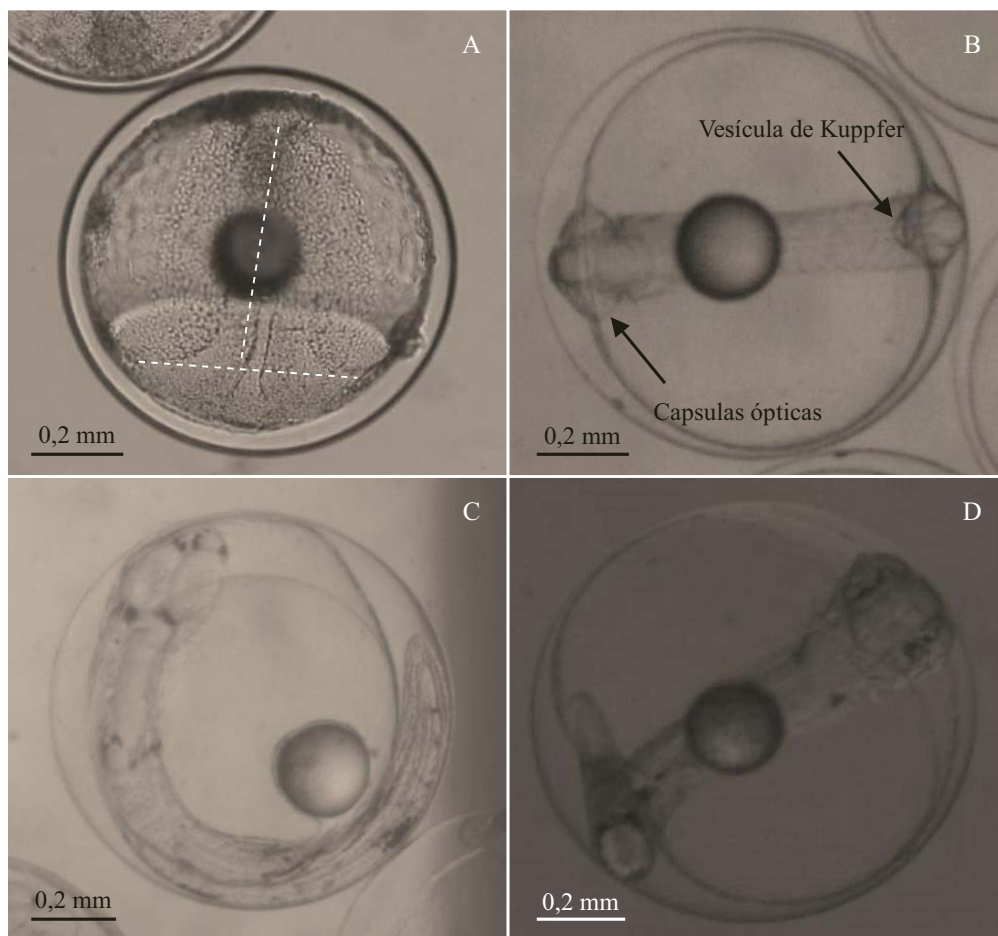


Figura 6. Imágenes del estadio de embrión en el desarrollo embrionario de *Pagrus pagrus*. A) Embrión incipiente (forma de T). B) Aparición de la vesícula de Kupffer. C) Alargamiento de la cola. D) Embrión previo a la eclosión.
 Figure 6. Images of the embryo stage in *Pagrus pagrus* embryonic development. A) Early embryo (T shape). B) Appearance of Kupffer's vesicle. C) Elongation of the tail. D) Embryo ready to hatch.

(1962) encontró divisiones anormales durante el desarrollo temprano de *Cyprionodon macularius* a medida que aumentaba la salinidad. En este caso, el efecto no fue directamente el resultado de la concentración iónico-osmótico del agua sino de la disponibilidad del oxígeno disuelto, la cual disminuye en salinidades altas.

La tolerancia a los cambios de salinidad varía según la etapa de desarrollo en la que se encuentre el huevo, debido a que las distintas etapas poseen diferentes sistemas de regulación (Holliday y Jones, 1967). En esta experiencia, no se observa-

ron diferencias en el desarrollo de los embriones en los distintos ensayos para los estadios de blástula y gástrula, lo que indicaría que *P. pagrus* presentaría una buena tolerancia a los cambios de salinidad desde el estadio de blástula. Algunas especies de peces marinos tienen poca tolerancia a la baja salinidad antes del cierre completo del blastoporo (estadio de gástrula) (Holliday y Jones, 1967). Al finalizar esta etapa, los huevos tendrían mayor tolerancia a los cambios de salinidad que en los estadios previos (estadio de clivaje, estadio de blástula) (Lee y Menú, 1981).

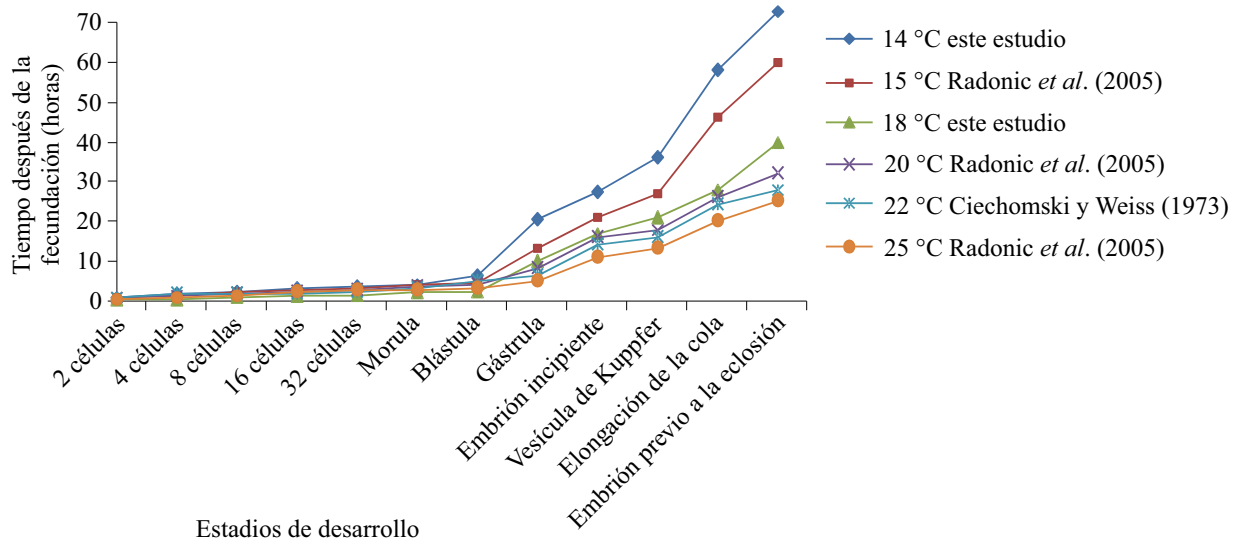


Figura 7. Principales estadios embrionarios en el desarrollo de huevos de *Pagrus pagrus* a distintos niveles de temperatura de incubación.

Figure 7. Main embryonic stages in the development of *Pagrus pagrus* eggs at different incubation temperature levels.

Los estadios más avanzados son críticos en el desarrollo de los huevos de los espáridos (Lahnsteiner y Patarnello, 2004). En este trabajo, durante el estadio de embrión de *P. pagrus* no se observaron anomalías dentro de los subestadios de embrión incipiente y aparición de vesícula de Kupffer para ninguno de los ensayos propuestos, pero luego de finalizado el subestadio de elongación de la cola, los embriones de los ensayos a salinidad 15 presentaron menor longitud que el resto, ocupando menos de 2/3 del perímetro del huevo. Se observó además poca pigmentación y escasa movilidad. Battle (1930) obtuvo un incremento en la mortalidad de las larvas al momento de eclosión en bajas salinidades como resultado de un pobre desarrollo de la musculatura de la cola del embrión, dificultando la salida de la larva a través del corion y ocasionando así la muerte de las mismas al momento de la eclosión. Lahnsteiner y Patarnello (2004) demostraron que en *S. aurata* y en *P. puntazzo* el porcentaje de supervivencia del embrión avanzado (pre-eclosión) es un indicador de la supervivencia larval post-eclosión. Estos autores mencionaron que la

viabilidad en los estadios iniciales del embrión (primer clivaje a mórula) no se correlacionó con la viabilidad embrionaria en estadios avanzados del desarrollo.

La tasa de eclosión es una medida de la calidad de los huevos (Aristizabal, 2006 a), siendo uno de los parámetros económicos más valiosos en acuicultura (Lahnsteiner y Patarnello, 2004). Los resultados obtenidos indican que la temperatura presentó un efecto significativo ($P < 0,05$) en la tasa de eclosión (TE) de los huevos de *P. pagrus*. Los ensayos a 18 °C registraron las mayores TE con respecto a los ensayos a 14 °C, para las mismas salinidades (Figura 8). La temperatura de incubación tiene un efecto directo sobre el metabolismo del embrionario en desarrollo y por lo tanto determina la tasa de eclosión (Claireaux y Lagardere, 1999; Conides y Glamuzina, 2001). La temperatura óptima de incubación requerida para el desarrollo embrionario de los huevos varía entre las especies. En el caso de *P. pagrus* el rango de temperatura óptima oscila entre 16 a 18 °C, aunque los límites inferior y superior de la eclosión son 14 °C y 22 °C (Saka et al., 2005). En

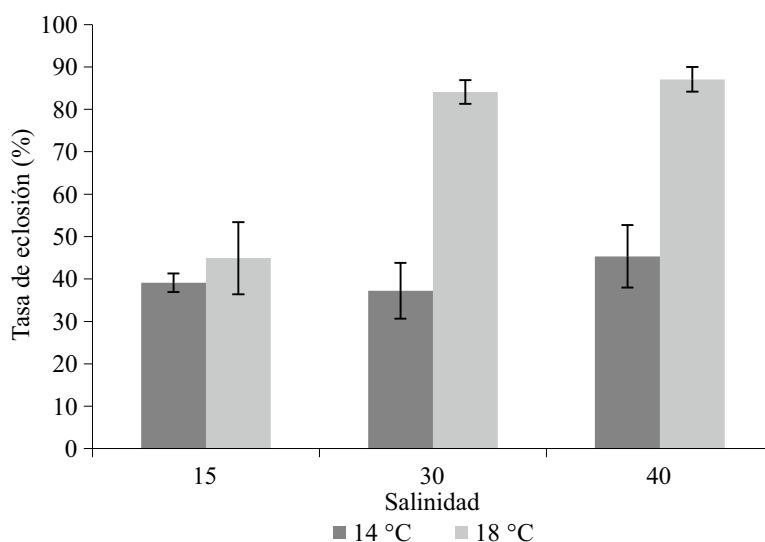


Figura 8. Tasa de eclosión de huevos de *Pagrus pagrus* a 14 y 18 °C.
 Figure 8. Hatching rate of *Pagrus pagrus* eggs at 14 and 18 °C.

el presente trabajo los resultados obtenidos para la temperatura 14 °C estarían afirmando lo indicado en la bibliografía, ya que a esa temperatura se observaron los menores valores de eclosión. El metabolismo del embrión disminuiría a bajas temperaturas afectando de alguna forma el desarrollo del mismo.

Si bien no se hallaron diferencias significativas entre los resultados de los tratamientos de las tres salinidades (Tuckey $p > 0,05$), al comparar las TE a 18 °C pudo observarse que los valores más bajos correspondieron a la salinidad 15.

CONCLUSIONES

En las salinidades 30 y 40 a 18 °C, se desarrollaron embriones normales de *P. pagrus* con menores períodos de incubación. Además, las tasas de eclosión para esta combinación de salinidad y temperatura superaron el 80%. Por ello, se recomienda utilizar el rango de salinidad 30-40 a 18 °C para optimizar la producción de embriones de besugo *P. pagrus* en cautiverio.

BIBLIOGRAFÍA

- ADLANDSVIK, B., COOMBS, S., SUNDBY, S. & TEMPLE, G. 2001. Buoyancy and vertical distribution of eggs and larvae of blue whiting (*Micromesistius poutassou*): observations and modelling. *Fish. Res.*, 50: 59-72.
- ÁLVAREZ-LAJONCHERE, L. 2006. Nutrición de reproductores de peces marinos. En: CRUZ SUAREZ, L.E. & RICQUE MARIE, D. (Eds.) Avances en nutrición acuícola VIII. VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nueva León, Nueva León, 19 pp.
- ARISTIZABAL, E.O. 2003. Bioenergética del besugo *Pagrus pagrus*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, 145 pp.
- ARISTIZABAL, E.O. 2006 a. Desove y calidad de huevos y larvas del besugo *Pagrus pagrus* (L). *INIDEP Inf. Téc.*, 59, 13 pp.
- ARISTIZABAL, E.O. 2006 b. Consumo de oxígeno, crecimiento y utilización del alimento durante

- el desarrollo larval del besugo *Pagrus pagrus* (Linné, 1758) (Pisces: Sparidae). Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 41 (2): 209-220.
- ARISTIZABAL, E.O. & SUÁREZ, J. 2006. Efficiency of co-feeding red porgy (*Pagrus pagrus* L.) larvae with live and compound diet. Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 41 (2): 203-208.
- ARISTIZABAL, E.O., SUÁREZ, J. & VEGA, A. 2007. Evaluación de la calidad de huevos de besugo (*Pagrus pagrus*) durante seis estaciones reproductivas consecutivas. Inf. Téc. Of. INIDEP N° 55/2007, 26 pp.
- ARISTIZABAL, E.O., SUÁREZ, J., VEGA, A. & BARGAS, R. 2009. Egg and larval quality assessment in the Argentinean red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture, 287: 329-334.
- ARJONA, F.J., VARGAS-CHACOFF, L., RUIZ-JARABO, I., MARTÍN DEL RÍO, M.P. & MANCERA, J.M. 2007. Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol., 148: 413-421.
- BALINSKY, B.I. 1978. Introducción a la embriología. Omega, Barcelona, 644 pp.
- BATTLE, H.I. 1930. Effects of extreme temperatures and salinities on the development of *Enchelyopus cimbrius* (L.). Contrib. Can. Biol. Fish. (N.S.), 5: 107-192.
- BEDIER, E., CHATAIN, B., COVES, D. & WEPPE, M. 1984. Contribution a la production intensive de juveniles de dorade *Sparus auratus*. En: BARNABÉ, G. & BILLARD, R. (Eds.). L'aquaculture du bar et des sparidés. INRA Publ., Paris: 223-236.
- BUNN, N.A., FOX, C.J. & WEBB, T. 2000. A literature review of studies on fish egg mortality: implications for the estimation of spawning stock biomass by the annual egg production method. Science Series Technical Report, CEFAS, Lowestoft, 111, 37 pp.
- CAPITOLI, R.R. & HAIMOVICI, M. 1993. Alimentación del besugo (*Pagrus pagrus*) en el extremo sur del Brasil. Frente Marit., 14 (A): 81-86.
- CIECHOMSKI, J.D. DE & WEISS, G. 1973. Desarrollo embrionario y larval del besugo, *Pagrus pagrus* (Linné) en el Mar Argentino (Pisces, Sparidae). Physis (A), 32 (85): 481-487.
- CLAIREAUX, G. & LAGARDERE, J.P. 1999. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. J. Sea Res., 42: 157-168.
- CONIDES, A. & GLAMUZINA, B. 2001. Study on the effects of rearing density, temperature and salinity on hatching performance of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Aquacult. Int., 9: 217-224.
- COTRINA, C. 1977. Interpretación de las escamas de besugo del mar argentino *Pagrus pagrus* (L), en la determinación de edades. Physis (A), 36 (92): 31-40.
- COTRINA, C. 1986. Estudios biológicos sobre peces costeros con datos de dos campañas de investigación realizadas en 1981. V. El besugo, *Sparus pagrus*. Publ. Com. Téc. Mix. Fr. Mar., 1 (1): 53-59.
- COTRINA, C. 1989. Estudio biológico del besugo (*Pagrus pagrus*) del Ecosistema Costero Bonaerense. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 161 pp.
- GARCÍA, S. 2012. La pesquería de besugo (*Pagrus pagrus*). Análisis de las capturas, esfuerzo nominal y estructura de los desembarques 2011. Inf. Téc. Of. INIDEP N° 27/2012, 23 pp.
- GARCÍA, S. & MOLINARI, G. 2013. El besugo (*Pagrus pagrus*) en el Atlántico Sudoccidental. Distribución y densidades. Inf. Invest. INIDEP N° 28/2013, 22 pp.
- GIMÉNEZ, G., ESTEVEZ, A., LAHNSTEINER, F., ZECEVIC, B., BELL, J.G., HENDERSON, R.J., PIÑERO, J.A. & SANCHEZ-PRADO, J.A. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). Aquaculture, 260: 232-243.
- GRACIA-LÓPEZ, V., KIEWEK-MARTÍNEZ, M. & MALDONADO GARCÍA, M. 2004. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper

- Mycteroperca rosacea*. Aquaculture, 237: 485-498.
- HART, R.P. & PURSER, G.J. 1995. Effects of salinity and temperature on eggs and yolk sac larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*, Gunter, 1862). Aquaculture, 136: 221-230.
- HATTORI, M., SAWADA, Y., SUDOU, N., SEOKA, M., HATTORI, N., MIYASHITA, S., MURATA, O. & KUMAI, H. 2004. Oxygen consumption during embryonic development in red sea bream (*Pagrus major*). Suisanzoshoku, 52 (1): 17-22.
- HERZIG, A. & WINKLER, J. 1986. The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama*, *Chalcalburnus chalcoides* and *Vimba vimba*. J. Fish Biol., 28: 171-181.
- HOLLIDAY, F.G.T. 1965. Osmoregulation in marine teleost eggs and larvae. Calif. Coop. Oceanic Fish. Inv. Rep., 10: 89-95.
- HOLLIDAY, F.G.T. 1969. The effects of salinity on the eggs and larvae of teleosts. En: HOAR, W. & RANDALL, R. (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, Nueva York: 293-311.
- HOLLIDAY, F.G.T. & JONES, M.P. 1967. Some effect of salinity on the developing eggs and larvae of the plaice (*Pleuronectes platessa*). Mar. Biol. Assoc. U.K., 47: 39-48.
- ISHIBASHI, Y., KATO, K., IKEDA, S., MURATA, O., NASU, T. & KUMAI, H. 1992. Effect of dietary ascorbic acid on the tolerance for intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. Nippon Suisan Gakkaishi, 58: 2147-2152.
- KINNE, O. 1962. Irreversible non-genetic adaptation. Comp. Biochem. Physiol., 5: 265-282.
- KJØRSVIK, E. 1994. Egg quality in wild and broodstock cod *Gadus morhua* L. J. World Aquacult. Soc., 25: 22-29.
- KJØRSVIK, E., HOEHNE-REITAN, K. & REITAN, K.I. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture: 227: 9-20.
- KJØRSVIK, E., MANGOR-JENSEN, A. & HOLMEFJORD, I. 1990. Egg quality in fishes. Adv. Mar. Biol., 26: 71-113.
- LAHNSTEINER, F.V. & PATARNELLO, P. 2004. Biochemical egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: reproductibility of the method and its application for sharpnout seabream *Puntazzo puntazzo*. Aquaculture, 237: 433-442.
- LEE, C.S. & MENU, B. 1981. Effects of salinity on egg development and hatching in grey mullet (*Mugil cephalus*). J. Fish Biol., 19: 179-188.
- MACHINANDIARENA, L., MÜLLER, M.I. & LÓPEZ, A.V. 2003. Early life stages of development of the red porgy *Pagrus pagrus* (Pisces, Sparidae) in captivity, Argentina. Invest. Mar., 31 (1): 5-13.
- MANOOCH, C.S. 1976. Reproductive cycle, fecundity and sex ratio of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Pisces: Sparidae) in North Carolina. Fish. Bull., 74: 775-781.
- MIHELAKAKIS, A., YOSHIMATSU, T. & TSOLKAS, C. 2001. Spawning in captivity and early life history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. Aquaculture, 199: 333-352.
- MYLONAS, C.C., PAPADAKI, M., PAVLIDIS, M. & DIVANICH, P. 2004. Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. Aquaculture, 232: 637-649.
- OOZEKI, Y. & HIRANO, R. 1985. Effects of temperature changes on the development of eggs of the japanese whiting *Sillago japonica* Temminck and Schlegel. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51 (4): 557-572.
- OSTROWSKI, A.D., WATANABE, W.O., MONTGOMERY, F.P., REZEK, T.C., SHAFER, T.H. & MORRIS J.A. 2011. Effects of salinity and temperature on the growth, survival, whole body osmolality, and expression of Na⁺/K⁺ ATPase mRNA in red porgy (*Pagrus pagrus*) larvae. Aquaculture, 314: 193-201.
- PHILL, S.P., BADEN, R.J. & SCHAFFNER, L.C.

1992. Hypoxia-induced structural changes in the diet of bottom-feeding fish and Crustacea. *Mar. Biol.*, 112: 349-361.
- RADONIC, M., LÓPEZ, A.V., OKA, M. & ARISTIZABAL ABUD, E.O. 2005. Effect of the incubation temperature on the embryonic development y hatching time of eggs of the red porgy *Pagrus pagrus* (Linne, 1758) (Pisces: Sparidae). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 40: 91-99.
- SAKA, S., FIRAT, K., KAMACI, H.O. & BÜKE, E. 2005. The Effect of Temperature on Embryonic Development of the Red Porgy (*Pagrus pagrus*) Eggs. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 22 (1-2): 95-99.
- SHIELDS, R.J, BROWN, N.P. & BROMAGE, N.R. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture*, 155: 1-12.
- SMITH, T.L.J., DENSON, M.R., HEYWARD, L.D., JENKINS, W.E. & CARTER, L.M. 1999. Salinity effects on early stages of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *J. Aquac. Soc.*, 30 (2): 236-244.
- TANAKA, M. 1985. Factors affecting the inshore migration of pelagic larval and demersal juvenile red sea bream *Pagrus major* to a nursery ground. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 114: 471-477.
- WOO, N.Y.S. & MURAT, J.C. 1981. Studies on the Biology of the Red Sea Bream *Crysophrys major*. III. Metabolic Response to Starvation in Different Salinities. *Mar. Biol.*, 61: 255-260.
- WU, R.S.S. 2002. Hypoxia: from molecular response to ecosystem responses. *Mar. Pollut. Bull.*, 45: 35-45.
- ZAR, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, Nueva Jersey, 718 pp.

Recibido: 22-09-2015

Aceptado: 27-04-2016

