

# Bases fisiológicas del desarrollo de larvas de *Atractosteus spatula* y perspectivas para su cultivo

Roberto Mendoza,\* Carlos Aguilera\*

**E**l catán es la especie de agua dulce de mayor tamaño que se encuentra en México, puede alcanzar los 2 metros de largo y es fácilmente reconocido por la forma alargada del hocico y las duras escamas romboideas que cubren su cuerpo, lo que le da una apariencia semejante a un lagarto, por lo cual también es conocido con el nombre de *pejelagarto* en el Sureste de México. Estos peces han sido capturados tradicionalmente en las aguas continentales cercanas al Golfo de México, en donde son apreciados por la calidad de su carne y por su tamaño. Se comercializan enteros, fileteados, procesados en forma de chicharrón o ahumados.<sup>1,2</sup> Al mismo tiempo, estos peces son objeto de la pesca deportiva, ya que su tamaño los convierte en un atractivo trofeo. Sin embargo, en la actualidad no existen normas que regulen su captura, lo cual ha provocado una explotación desmedida. Por otra parte, las evidentes alteraciones que han venido sufriendo los ecosistemas acuáticos en que habitan, producto de la contaminación, la reducción de los volúmenes de agua, al ser ésta desviada hacia las ciudades o hacia los cultivos agrícolas, y las modificaciones del entorno físico, originadas por la construcción de presas y canales, representan factores que de manera definitiva han afectado las poblaciones del catán.

Lo anterior se ha visto claramente reflejado en los registros estadísticos de pesca de los últimos diez años en el estado de Tamaulipas. Así, mientras que en 1988 se capturaban 13.2 toneladas, este volumen se redujo a 5.7 toneladas en 1990 y para 1997 sólo se lograron obtener 1.1 toneladas (Estadística pesquera CRIP-Tampico). Ante esta situación, la SEMARNAP, a través del *Centro Acuicola Tancol de la Subsecretaría de Pesca* en Tamaulipas, desde 1982

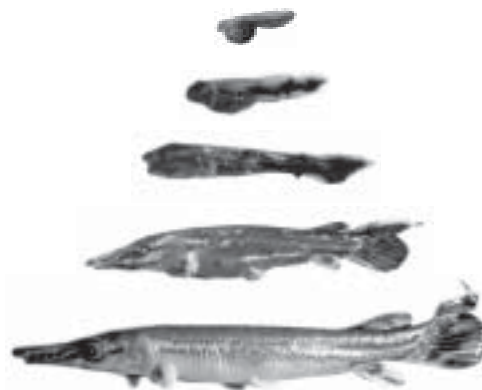


Fig. 1. Estadios de desarrollo larval del catán.

centró sus esfuerzos en la producción de crías de catán (*Atractosteus spatula*), con miras a incrementar las poblaciones naturales, preservar la especie y apoyar su acuicultura. Hasta el momento, el Centro ha llegado a producir hasta 415,000 crías de catán por año, destinando la producción total a programas de repoblación para intentar atender las necesidades de la pesca comercial y deportiva. Sin embargo, el principal problema que se ha presentado, como consecuencia del acelerado crecimiento del catán, es la alimentación de las crías. En efecto, éstas dependen en sus primeras etapas exclusivamente de presas vivas, lo que implica que en caso de un abastecimiento insuficiente esto se traduzca en diferencias de tallas, lo que a su vez propicia un fuerte canibalismo. Como consecuencia final ha sido necesario recurrir a la liberación de las crías a una edad temprana, quedando así interrumpido el ciclo

\* Grupo Ecofisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

de cultivo. Estos factores repercuten de manera directa, tanto en la cantidad como en la calidad de las crías obtenidas en cada época de reproducción, y al mismo tiempo hacen que las posibilidades de sobrevivencia en el medio natural sean muy reducidas.

## Objetivos

Gracias a un acercamiento entre el Centro Acuícola Tancol y el *Grupo Ecofisiología* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL se planteó la necesidad de iniciar el *Programa para la recuperación de la pesquería del catán*, cuyos objetivos principales están dirigidos hacia la caracterización de las diferentes fases del desarrollo larvario de esta especie y el conocimiento de la fisiología digestiva de las crías, con el fin de adecuar una dieta artificial para su cultivo.

## Material y métodos

Las diferentes fases de la investigación comprenden estudios morfológicos, histológicos, enzimáticos y endocrinológicos, para los cuales fueron utilizados huevos y larvas de catán recuperados del Centro Acuícola Tancol, entre 1997 y el 2000, a partir de un lote de 25 reproductores.

Para determinar la evolución morfológica e histológica del desarrollo, las larvas fueron fijadas en líquido de Bouin, a partir de la eclosión y hasta 15 días después de la eclosión (DDE). Para la descripción del desarrollo morfológico se consideraron 20 características morfométricas y 5 merísticas para cada espécimen, siguiendo la metodología utilizada para larvas de lepisosteidos.<sup>3,4</sup> Por otra parte, se mantuvo un lote de larvas en inanición, el cual fue comparado con larvas alimentadas mediante un análisis discriminante por el método Stepwise, con la finalidad de identificar las características morfológicas que pudieran indicar la condición nutricional de las larvas.

Para analizar las características estructurales del desarrollo del tracto digestivo, y establecer un factor de condición basado en la altura de las células intestinales,<sup>5</sup> se realizaron cortes histológicos de un espesor de 7  $\mu\text{m}$ , los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina.

El funcionamiento del tracto digestivo en las diferentes etapas de desarrollo fue seguido mediante la determinación de la actividad enzimática de ex-

tractos de larvas. Diariamente, a partir del 3 DDE, se tomaron muestras de 100 larvas y el tracto di-

Tabla I. Distribución de los tratamientos y concentraciones diarias y totales aplicadas

Tratamiento hormonal	Concentración diaria	Concentración total
3,3',5-triiodo-L-tironina (T <sub>3</sub> )	0.1 ppm de T <sub>3</sub>	0.323 ppm de T <sub>3</sub>
L-tiroxina (T <sub>4</sub> )	0.1 ppm de T <sub>4</sub>	0.323 ppm de T <sub>4</sub>
Tiourea (TU)	30 ppm de TU	97.17 ppm de TU
Hidrocortisona (HC)	0.1 ppm de HC	0.323 ppm de HC
Testigo sin hormona (T)	Testigo sin hormona	Testigo sin hormona

gestivo de las larvas de cada muestra fue homogeneizado en agua destilada en una proporción 1:5 (p/v) a una temperatura de 4 °C para ser utilizado como extracto enzimático. De esta forma se determinó la actividad proteolítica ácida y alcalina, utilizando como sustrato hemoglobina<sup>6</sup> y azocaseína,<sup>7</sup> respectivamente. Estas actividades fueron corroboradas mediante electroforesis utilizando el método de Sustrato-PAGE.<sup>8</sup> La actividad de tipo tripsina, quimiotripsina, leucina-aminopeptidasa y fosfatasa fueron determinadas con sustratos específicos sintéticos (BAPNA, GPNA, LNA y p-nitrofenil-fosfato).<sup>9,10</sup> La actividad de tipo  $\alpha$ -amilasa y esterasa fueron determinadas utilizando almidón y p-nitrofenil-acetato como sustrato.<sup>10</sup>

Por otra parte, considerando el efecto de las hormonas tiroideas y los corticosteroides sobre el desarrollo,<sup>11</sup> las hormonas tri-iodotironina (T<sub>3</sub>), tiroxina (T<sub>4</sub>), hidrocortisona (HC) y el goitrógeno tiourea (TU) fueron administradas disueltas en el medio para evaluar su efecto en la aceptación y digestión de las dietas artificiales. Para la realización de los bioensayos se colocaron 30 larvas de 3 DDE por acuario (45 L), utilizando cuatro acuarios por tratamiento de acuerdo a la Tabla I. Las hormonas fueron previamente disueltas en agua y aplicadas diariamente repitiendo la dosis inicial mediante un recambio de agua del 30 % del volumen total.

Después de diez días de tratamiento se determinó la concentración de T<sub>3</sub> y cortisol en las larvas mediante un radioinmunoensayo (RIA).<sup>12, 13</sup> Por otra

parte, se evaluó el desarrollo larvario en base a la formación del hocico, la altura de las células intestinales y la actividad de las enzimas digestivas, según lo descrito anteriormente.

Humedad	12% Máximo
Proteína	50% Mínimo
Grasa	15% Mínimo
Fibra cruda	4% Máximo
Cenizas	12% Máximo
Calcio	2% Mínimo
Fósforo	1.2% Mínimo
ELN	7% por diferencia

Con la finalidad de determinar la aceptación de dietas artificiales se realizaron dos bioensayos, los cuales fueron iniciados con larvas de 3 DDE y fueron evaluados después de 13 días (15 DDE). En el primer bioensayo se probaron tres tratamientos:

- Nauplios de *Artemia* salina como control positivo.
- Una dieta peletizada no flotante.
- Un tratamiento combinando los dos alimentos anteriores en proporciones equivalentes.

En el segundo bioensayo los tratamientos experimentales fueron similares, pero en lugar de utilizar una dieta peletizada se utilizó una dieta extruida 50% flotante y 50% de lenta sedimentación. Para cada tratamiento se utilizaron cuatro acuarios (45 L) con 30 larvas c/u. Ambas dietas artificiales fueron proporcionadas por Purina S.A. de C.V. (Tabla II).

A las dietas se les agregó 0.2 % (p/v) de un atrayente alimenticio (*Lagobuds*<sup>TM</sup>). Las dietas fueron proporcionadas en tres raciones diarias, para que las larvas se alimentaran *ad libitum*, iniciando al 4 DDE. Al finalizar los bioensayos fueron evaluados mediante sobrevivencia, crecimiento en peso y longitud total y actividad proteolítica total, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

## Resultados

### *Estudios morfológicos*

El esquema general del desarrollo larvario se puede resumir de la siguiente manera. La eclosión de las larvas inicia a las 50 h, cuando los huevos son incu-

bados a 28 °C. Las larvas recién eclosionadas presentan una longitud promedio de 7.2 mm y permanecen adheridas a la vegetación hasta el 5° día, cuando tienen una longitud de 17.7 mm y en este momento comienzan a alimentarse de zooplancton. Si existe un suministro adecuado de este alimento, para el 10° día las larvas llegan a medir 23 mm, adquiriendo la forma alargada característica de los adultos. A partir de este momento, la velocidad de crecimiento se acelera y para el 15 DDE las crías llegan a medir 48 mm. Sin embargo, aquellas larvas que no recibieron alimento presentan un crecimiento significativamente menor, alcanzando apenas 21.2 mm para el 15 DDE. Esto las convierte en presas fáciles para las larvas más grandes, por lo que no llegan a sobrevivir.

Mediante un estudio comparativo del desarrollo de larvas de catán (*A. spatula*) y pejelarto (*A. tropicus*), se lograron caracterizar seis estadios larvales, para las dos especies, basados en 25 características morfológicas, de las cuales fue posible seleccionar, mediante un análisis discriminante (método Stepwise), la longitud del hocico y a la altura pre-anal, como los principales indicadores del desarrollo y de la condición nutricional, respectivamente. Asimismo, se observó una mayor tasa de crecimiento en las larvas de catán, la cual pasa de 1.55 mm/día, durante los primeros 10 días a 5.06 mm/día en los días subsecuentes. Esto contrasta con el crecimiento que exhibe el pejelagarto, el cual se mantiene estable en 1 mm/día, durante los primeros 30 días. Por otra parte, también fue evidente un desarrollo más rápido del hocico en las larvas de catán, lo cual viene a explicar que se presente un mayor canibalismo en etapas más tempranas, en comparación con las larvas de pejelagarto.

### *Estudios histológicos*

Debido a que las larvas de peces no presentan un tracto digestivo desarrollado, lo cual limita la posibilidad de utilizar dietas artificiales,<sup>11</sup> fue necesario seguir la formación del mismo para determinar el momento en que su sistema digestivo estuviera completamente formado. A este respecto, se pudo observar que a los 3 DDE las larvas aún presentaban un intestino recto, formado por epitelio simple, cuya diferenciación se inicia en el intestino posterior. Para el 6 DDE, ya fue posible apreciar el estómago, la válvula espiral y tejido pancreático diferenciados, a

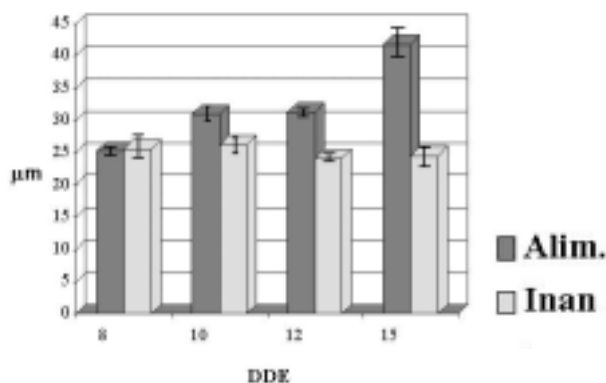


Fig. 2. Altura celular de enterocitos de larvas alimentadas y en inanición a diferentes días después de la eclosión (DDE).

pesar de contar todavía con reservas de vitelo. Al mismo tiempo, durante la formación del tracto digestivo se presentaron diferencias significativas con respecto a la altura de las células intestinales entre cada estadio ( $F = 2280$ ;  $P = 0.000$ ;  $gl = 140,3$ ), incrementándose la altura con la edad de las larvas. De la misma manera, se presentaron diferencias significativas en la altura de las células intestinales de larvas alimentadas y en inanición ( $t = -1.28$ ;  $P = 0.211$ ;  $gl = 34$ ) a partir del 10 DDE ( $t = 15.07$ ;  $P = 0.000$ ;  $gl = 34$ ), y se acentuaron a los 12 DDE ( $t = 13.48$ ;  $P = 0.000$ ;  $gl = 34$ ) y 15 DDE ( $t = 25.95$ ;  $P = 0.000$ ;  $gl = 34$ ) (figura 2).

#### Estudios enzimáticos

Dentro de este contexto, a nivel fisiológico, el equipamiento con las enzimas digestivas necesarias para aprovechar las dietas es definitivo.

En el caso de las larvas de catán, se pudo detectar actividad proteolítica ácida desde el inicio de la alimentación exógena, en el 5 DDE, antes de la absorción completa del saco vitelino. Mientras que la actividad proteolítica alcalina, la cual reposa principalmente en serina proteasas (tripsina y quimotripsina, así como una elevada actividad de tipo aminopeptidasa) se eleva gradualmente del 2 al 9 DDE. Lo anterior fue confirmado mediante el método de Sustrato-PAGE, lo que permitió a su vez observar la secuencia en la aparición de las diferentes proteasas en el tracto digestivo (figura 3).

Por otra parte, se detectó un elevado nivel de actividad lipásica, con una mayor actividad en larvas de 3 a 8 DDE. De la misma forma, la actividad

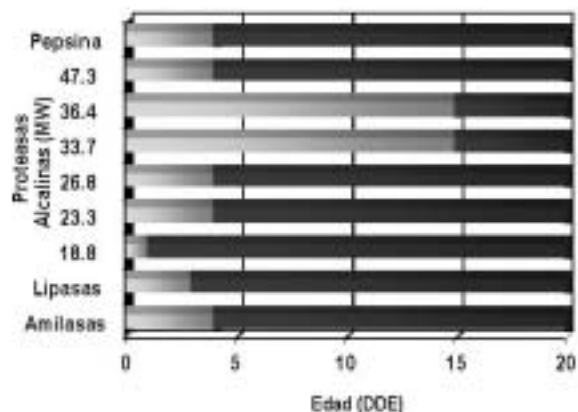


Fig. 3. Ontogénesis de las proteasas detectadas mediante electroforesis de acuerdo a su peso molecular MW(KDa).

de fosfatasa ácida se detectó en niveles elevados hasta el 8 DDE, disminuyendo progresivamente a partir de esta edad. El momento en que inicia la disminución de las lipasas y fosfatasa ácida concuerda con el agotamiento de las reservas de vitelo, según las observaciones morfológicas e histológicas, por lo cual éstas fueron relacionadas con su degradación. Mientras que la actividad de las fosfatasa alcalinas presentó un incremento a partir del 8 DDE, concomitante con el aumento en la altura de las células intestinales, por lo cual esta actividad resulta indicativa de la maduración de las células intestinales. Por otra parte, cabe hacer notar que de acuerdo a otras investigaciones relacionadas, se ha considerado que la actividad proteolítica ácida, es un indicador de la maduración del tracto digestivo y el momento en el que se detecta esta actividad resulta el más apropiado para iniciar la alimentación de las larvas con dietas artificiales.<sup>14,15</sup> En función de lo anterior, se puede considerar que el funcionamiento del sistema digestivo al iniciar la alimentación exógena de las larvas de catán es más completo que el de la mayoría de las larvas de peces, lo cual hace factible su alimentación con dietas artificiales desde sus primeras etapas.<sup>16</sup>

#### Estudios endocrinológicos

Un factor que ha sido igualmente considerado como determinante para el desarrollo de las larvas de peces, es el control ejercido por las hormonas tiroideas y los corticosteroides sobre la maduración del sistema digestivo.<sup>17,18</sup> Tomando en cuenta esta

premisa, se llevaron a cabo una serie de bioensayos, a partir de los cuales se pudo observar que las larvas, al ser sometidas a un tratamiento por inmersión, con hormonas tiroidianas (T3, T4), goitrógenos (Tiourea) y corticosteroides (Hidrocortisona) presentaban diferencias marcadas en el desarrollo.

Las tasas de sobrevivencia fueron cercanas al 100%, a excepción del grupo tratado con T3, el cual mostró, altas mortalidades (80%). La menor sobrevivencia y la presencia de algunas deformaciones en este último grupo pudieron estar relacionadas con los altos niveles endógenos de T3 y cortisol que presentaron las larvas (tres veces más elevados en el grupo tratado con T3 que en el resto de los tratamientos, figura 4). Los mayores valores de ganancia en peso y longitud total fueron observados en el grupo tratado con TU, así como en el grupo control (C). El menor peso se registró en las larvas expuestas a la T3, lo cual puede ser explicado en función de la energía invertida en el proceso de metamorfosis, el cual fue más acelerado que en el resto de los grupos experimentales. La longitud del hocico se vio significativamente reducida en el grupo tratado con TU, mientras que el mayor desarrollo se presentó en los grupos tratado con T4 y T3 ( $F=16.67$ ;  $P=0.0002$ ;  $gl=10,4$ ).

Las larvas de los tratamientos control y TU presentaron la mayor altura preanal, seguidas de aquellas de los tratamientos con T4, T3 e HC ( $F=15.51$ ;  $P=0.0003$ ;  $gl=10,4$ ). De la misma forma, se presentaron diferencias en la actividad proteolítica ácida y alcalina, siendo mayor en las larvas expuestas a T3 y TU. La mayor altura de las células intestinales se registró en el tratamiento HC, ( $F=223.94$ ;

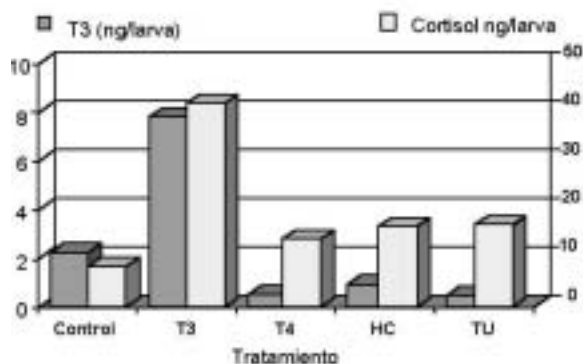


Fig. 4. Concentración de T3 y Cortisol (ng/larva) en larvas de catán sometidas a diferentes hormonas.

$P=0.000$ ;  $gl=55,4$ ).

Estos resultados abren dos nuevas vertientes en una siguiente etapa de investigación: a) la posibilidad de propiciar el consumo de dietas complejas (e.g. dietas artificiales) desde las primeras etapas larvales al utilizar hormonas tiroidianas y corticosteroides y b) la posibilidad de controlar el canibalismo al exponer las larvas a agentes anti-tiroidianos, ya que de esta manera se podrían obtener larvas más grandes pero con el hocico menos desarrollado, lo que impediría el consumo de organismos de su misma talla, pero no así de presas más pequeñas.

### Estudios de alimentación

Un aspecto decisivo para la aceptación de las dietas artificiales es la presentación de las mismas, la cual reposa sobre las características físicas y de atracción que deben tener las partículas alimenticias para las larvas<sup>15</sup>. Para probar esto, se realizó un bioensayo con una dieta no flotante. Sin embargo, esta dieta no fue consumida por las larvas de catán, resultando en una sobrevivencia menor al 20 %, en comparación con un 95 % de sobrevivencia en larvas alimentadas con *Artemia*. Estos resultados se explican en base al comportamiento alimenticio de las larvas de catán, las cuales tienden a alimentarse en la superficie del agua, por lo cual, las partículas de alimento utilizado no fueron consumidas en su totalidad ya que estas se sedimentaban rápidamente.

Considerando estos resultados, en un segundo bioensayo se utilizó una dieta extruida, la cual presentaba partículas flotantes (50%) y de lenta sedi-

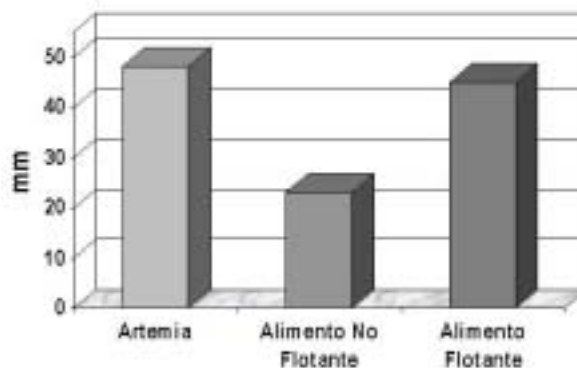


Fig. 5. Crecimiento en longitud (mm) para larvas de catán con diferente alimento (2° bioensayo).

mentación (50%). En este caso se incrementó la sobrevivencia en 80 % y no se presentaron diferencias en cuanto a crecimiento con las larvas alimentadas con *Artemia* (figura 5). Por otra parte, este tipo de dieta permitió adecuar rápidamente el tamaño de la partícula utilizada, a medida que se desarrollaba la forma alargada del hocico y se producía el incremento en longitud. A partir de este experimento, utilizando exclusivamente dietas extruidas ha sido posible obtener juveniles en cultivo de 30 cm de longitud en un periodo de cuatro meses.

### Conclusiones

El estudio morfológico permitió distinguir las fases de desarrollo y de nutrición en las larvas, así como seleccionar indicadores externos de la inanición. Con el seguimiento histológico se determinó que el tracto digestivo se encuentra completamente formado al iniciar la alimentación exógena (5 DDE). Igualmente, fue posible observar el proceso de maduración, confirmar las fases de nutrición y evaluar la condición nutricional de las larvas, mediante la altura celular de los enterocitos. El estudio de las enzimas digestivas permitió comprobar que las estructuras del tracto digestivo son completamente funcionales desde 5 DDE, y que las larvas de catán tienen la capacidad digestiva para utilizar dietas artificiales.

Por otra parte, fue posible establecer que las larvas desarrollan precozmente el eje tiroideo, el cual regula su desarrollo y que la metamorfosis puede ser alterada con fines prácticos mediante la administración exógena de hormonas. Finalmente, mediante la utilización de dietas con las características físicas y de atracción requeridas por el comportamiento de las larvas, fue posible lograr el destete con dietas artificiales y actualmente se ha iniciado la siguiente fase experimental orientada hacia la determinación de los requerimientos nutricionales.

La investigación multidisciplinaria realizada en el presente trabajo permitió resaltar las particularidades que presenta el desarrollo larvario del catán, permitiendo así superar el cuello de botella que venía representando su alimentación (figura 6). De esta forma, actualmente es posible visualizar alternativas para realizar el cultivo del catán, con la finalidad de recuperar sus poblaciones naturales, así como para reducir las presiones debidas a la pesca mediante el escalamiento del cultivo a nivel comercial produciendo organismos de talla adecuada.

### Resumen

Ante la explotación desmedida que han venido sufriendo las poblaciones naturales del catán, se emprendió un estudio multidisciplinario para desarro-

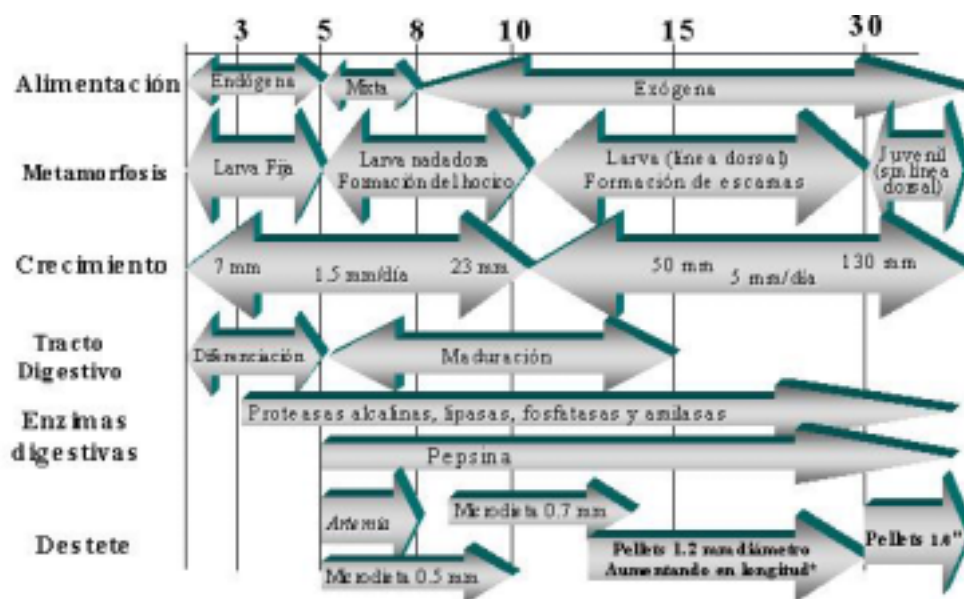


Fig. 6. Esquema general del desarrollo de larvas de catán, días después de la eclosión (DDE) a 28 °C:

llar el cultivo de las larvas. Esta aproximación permitió establecer el momento en el cual se puede iniciar la alimentación con dietas artificiales, conocer la etapa a la cual se deben liberar las larvas para repoblación, producir modificaciones morfológicas (mediante la aplicación de hormonas), para evitar el canibalismo e incrementar la sobrevivencia. Igualmente, se establecieron diferentes índices de condición (morfológicos, histológicos y bioquímicos) para evaluar el estado nutricional de las larvas. Finalmente, se logró establecer una estrategia para llevar a cabo el destete con dietas artificiales y visualizar alternativas para llevar a cabo el cultivo a gran escala del catán con la finalidad de contribuir a la recuperación sus poblaciones naturales.

*Palabras claves:* catán, desarrollo larvario, fisiología de peces, acuicultura.

## Abstract

Natural alligator gar populations have been reduced due to commercial fisheries and sport. Aquaculture represents a short-term alternative to restoring the natural populations, and a first-step in accomplishing culture conditions. Therefore, multidisciplinary research was aimed at describing the major morphophysiological changes that take place during the larval period as a basis for their being weaned onto artificial diets for their culture. A morphological study allowed distinguishing different nutritional stages, as well as to selecting external indicators of starvation. By means of a histological approach it was observed that the digestive tract was completely formed, at the beginning of exogenous feeding. Throughout larval development intestinal maturation was followed and a nutritional indicator based on the midgut cell height was validated. The occurrence of the main digestive enzymes was detected since 5 DAH. The incidence of cannibalism in culture conditions was controlled by reducing the length of the snout when larvae were exposed to anti-thyroid compounds, without affecting growth. Larvae exposed to T4 and T3 showed a faster development, which would be advantageous for the repopulation of the species. Finally, the artificial feeding characteristics providing good acceptability and growth performance were determined. This has allowed for the establishment of a feeding strategy that led to the production of 30 cm juveniles in 4 months.

*Keywords:* alligator gar, larval development, fish physiology, aquaculture.

## Referencias

1. Rosas, M., 1976, Peces dulceacuícolas que se explotan en México y datos sobre su biología. INP/Subsecretaría de Pesca.
2. Rodríguez De La Cruz, M.C., Palacios-Fest, M.R., Cruz-Santabalbina, R. & Dias, 1994, Atlas pesquero de México, SEPES. INP.
3. Simon, T. & R. Wallus, 1989, Contributions to the early life histories of gar (Actynopterygii: Lepisosteidae) in the Ohio and Tennessee river basins with emphasis on larval development. Trans. Ky. Acad.Sci.50(1-2):59-74.
4. Simon, T.P. & E.J. Tyberghein, 1991, Contributions to the early life history of the spotted gar, *Lepisosteus oculatus* Winchell, from the Hatchet Creek, Alabama. Trans. Kentucky Academy of Science, 52, 3-4:124-131.
5. Theilacker, G.H & S.M. Porter, 1994, Condition of larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, in the western Gulf of Alaska assessed with histological and shrinkage indices. Fishery Bulletin, 93(2):333-344.
6. Anson, M.L., 1938, The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol., 22:79-89.
7. Galgani, F. & F. Nagayama, 1986, Characteristic of digestive proteolysis of crabs *Portunus triberculatus*, *Portunus sanguinolentus* and *Charybdis japonica*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 52(12): 2183-2188.
8. García-Carreño, F.L., L.E. Dimes & N.F. Haard, 1993, Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry, 214:65-69.
9. Erlanger, F.E., N. Kokowsky & W. Cohen, 1961, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of biochemistry and Biophysics, 95:271-278.
10. Clark J., K.R. Murray & J.R. Stark, 1986, Protease development in dover sole [*Solea solea* (L.)]. Aquaculture, 53:253-262.
11. Dabrowski, K. & Culver, D., 1991, The physiology of larval fish, digestive tract and formulation of starter diets. Aquaculture Maga-

- zine march/april: 49-61.
12. Kobuke, L. Specker, J. & Berni, H. A. 1987. Thyroxine content of eggs and larvae of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. The Journal of Experimental Zoology. 248:168-176.
  13. De Jesús, E.G., T. Hirano & Y. Inui, 1991, Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. General and Comparative Endocrinology, 82:369-376.
  14. Alliot, E., A. Pastoureaud & J. Trellu, 1977, Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*) variations des proteinogrammes et des zymogrammes. Actes de Colloques du C.N.E.X.O., 4:85-91.
  15. Person-Le Ruyet J., 1989, Early weaning of marine fish larvae onto microdiets. constraints and perspectives. Advances in tropical Aquaculture Aquacop. IFREMER Actes colloque 9, pp. 625-642.
  16. Moyano, F.J., M. Diaz, F.J. Alarcon & M.C. Sarasquete, 1996, Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry, vol. 15, no.2, pp.121-130.
  17. Kumegawa, M., Takuma, T., Hosoda, S., Kunii, S. & Kanda, Y. 1978. Precocious induction of pepsinogen in the stomach of suckling mice by hormones. Biochemica et Biophysica: 543:243-250.
  18. Ayson, F. G. & Lam, T. J. 1993. Thyroxine injection of female rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock: changes in thyroid hormone levels in plasma eggs and yolk-sac larvae and its effects on larval growth and survival. Acuaculture. 190: 83-93.