

Nota de Investigación/Research Note

Efectos del palmitato de vitamina A, el β -caroteno y el ácido retinoico en el crecimiento e incidencia de deformidades en larvas de pargo rojo *Chrysophrys major*

Effects of vitamin A palmitate, β -carotene and retinoic acid on the growth and incidence of deformities in larvae of red sea bream *Chrysophrys major*

LH Hernández-H.^{1*}, S Teshima¹, S Koshio², M Ishikawa², FJ Gallardo-Cigarroa³, MS Alam⁴, O Uyan²

¹ Laboratorio de Producción Acuicola, UNAM Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México 54090, México. * E-mail: luish3@yahoo.com

² Laboratory of Aquatic Animal Nutrition, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, Shimoarata 4-50-20, Kagoshima 890-0056, Japan

³ Yamaha Nutreco Aquatech Co. Ltd., Suite 702 Abundant'95, Hakataekihigashi 3-12-1, Fukuoka 812-0013, Japan

⁴ Center for Marine Science, Aquaculture Program, University of North Carolina at Wilmington, 7205 Wrightsville Ave., Wilmington, NC, 28403, USA

Resumen

Se examinaron los efectos del palmitato de vitamina A (VAP; 2.7, 27 y 165 mg/100 g dieta), el β -caroteno (β C; 1, 9 y 50 mg/100 g dieta) y el ácido retinoico (RA; 2.8, 28 y 166 mg/100 g dieta) en la incidencia de deformidades de larvas de pargo rojo (*Chrysophrys major*) utilizando micro dietas con zeína durante 15 días. Crecimiento (peso final, ganancia en peso y longitud total) e índice de supervivencia fueron afectados por el incremento en la suplementación de esos compuestos. Las anomalías observadas en las larvas fueron compresión o fusión aparente de los segmentos de la notocorda y deformidades en la boca. La compresión/fusión aparente de los segmentos se detectó principalmente en las vértebras de la zona hemal, afectando la longitud total de las larvas. La incidencia de estas deformidades se incrementó con el aumento de los niveles de VAP, β C y RA en las dietas, pero se observó un porcentaje significativamente más alto de vértebras afectadas en las larvas alimentadas con las dietas con RA. El efecto del β C no fue claro en el presente estudio, ya que sólo la concentración más alta provocó una incidencia de deformidades significativa. Los resultados del presente estudio muestran que la vitamina A en la dieta podría estar vinculada a las deformidades vertebrales en larvas del pargo rojo.

Palabras clave: *Chrysophrys major*, deformidades vertebrales, vitamina A, ácido retinoico, larva.

Abstract

The effects of vitamin A palmitate (VAP; 2.7, 27 and 165 mg/100 g diet), β -carotene (β C; 1, 9 and 50 mg/100 g diet) and retinoic acid (RA; 2.8, 28 and 166 mg/100 g diet) on the incidence of deformities in red sea bream (*Chrysophrys major*) larvae were examined using zein-based micro-bound diets during 15 days. Growth (final body weight, weight gain and total length) and survival rate were affected by the increasing supplementation of these compounds. The abnormalities observed in the larvae included the compression or apparent fusion of the segments in the notochord and mouth deformities. Compression/apparent fusion of the segments was detected mainly in vertebrae of the hemal zone, affecting the total length of larvae. Incidence of these deformities increased with increasing levels of VAP, β C and RA in the diets, but a significantly higher percentage of affected vertebrae was observed in the larvae fed the diets containing RA. The effect of β C was unclear in the present experiment, since only the highest concentration caused significant incidence. The results of this study show that dietary vitamin A may be related to the vertebral deformities in red sea bream larvae.

Key words: *Chrysophrys major*, vertebral deformities, vitamin A, retinoic acid, larvae.

Introducción

Las deformidades del cuerpo son un problema fundamental en la producción de peces marinos (Koumoundouros *et al.* 1997) y a menudo están asociadas con la depresión del crecimiento, altas tasas de mortalidad, susceptibilidad a estrés y enfermedades (Andrades *et al.* 1996, Boglione *et al.* 2001). Además, las deformidades del cuerpo afectan la calidad y el

Introduction

Body deformities are a fundamental problem in the production of marine fish (Koumoundouros *et al.* 1997) and are often associated with growth depression, high mortality rates, susceptibility to stress and diseases (Andrades *et al.* 1996, Boglione *et al.* 2001). In addition, body deformities affect the quality and the commercial value of fish (Koumoundouros

valor comercial de los peces (Koumoundourous *et al.* 2001). En su mayoría, las deformidades ocurren en el esqueleto (vértebras y mandíbulas) durante los estadios larval y juvenil (Koumoundourous *et al.* 1997). Durante algunos años, se ha supuesto que la vitamina A (vit A) produce algunas malformaciones en el esqueleto de larvas producidas en criaderos (Cahu *et al.* 2003). El exceso de vit A en la dieta se ha sugerido como responsable de las deformidades vertebrales en las larvas del lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* (Takeuchi *et al.* 1995, Dedi *et al.* 1995, Dedi *et al.* 1997, Takeuchi *et al.* 1998), del turbot *Scophthalmus maximus* (Estevez y Kanazawa 1995), del halibut del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* (Hamre *et al.* 2005) y el salmón del Atlántico *Salmo salar* (Ørnsrud *et al.* 2002, Ørnsrud *et al.* 2004). El efecto de la vit A de la dieta en las deformaciones de las vértebras es mediado por su derivado, el ácido retinoico (RA). Durante el desarrollo larvario, el RA regula la actividad de los genes homeobox (Means y Gudas 1995), que están a cargo de la organización del patrón de desarrollo de eje central de cuerpo (Ross *et al.* 2000). El exceso de RA interrumpe la expresión normal de estos genes, originando las deformidades en las vértebras (Takeuchi *et al.* 1998).

La producción por acuicultura del pargo rojo *Chrysophrys major* es la segunda más grande en Japón (Koshio 2002), pero los peces de esta especie criados artificialmente muestran una gran incidencia de deformidades en el cuerpo, particularmente en las vértebras (Takashima 1978, Matsuoka 1987), y es posible que la vit A de la dieta pueda afectar el desarrollo normal de estadio tempranos de esta especie. Ogata y Oku (2001) no encontraron ninguna diferencia significativa en el crecimiento de juveniles de pargo rojo alimentados con 100 mg de RA kg⁻¹ de dieta cuando se comparó con juveniles alimentados con una dieta comercial. Asimismo, Hernández *et al.* (2004) reportaron que juveniles de pargo rojo no mostraron ninguna deformidad en el esqueleto cuando se alimentaron con una dieta suplementada con 100,000 unidades internacionales (IU) de vit A kg⁻¹ (1 IU = 0.3 de all-*trans*-retinol). Por ello, el desarrollo de deformidades en las vértebras parece estar relacionado con el estadio larvario de esta especie y, hasta el momento, no existen reportes de cómo la vit A puede afectar el desarrollo normal de su estadio larvario. El propósito del presente estudio, por tanto, fue el de examinar los efectos de vit A, RA y β -caroteno (β C) en el desarrollo normal del estadio larvario temprano del pargo rojo.

Materiales y métodos

Cría de las larvas y dietas

Se obtuvieron huevos fertilizados de pargo rojo *C. major* de una granja de crianza privada en la Prefectura de Kumamoto (Japón), que fueron transportados al Laboratorio de Producción Marina Kamoike (Facultad de Pesquerías, Universidad de Kagoshima). Los huevos se colocaron en un tanque de 500 L, con aireación continua, un flujo de agua de 100–120 mL min⁻¹ y temperatura del agua de 17–18°C, hasta que eclosionaron. A

et al. 2001). Deformities usually occur in the skeleton (jaws and vertebrae) during the larval and juvenile stages (Koumoundourous *et al.* 1997). It has been assumed for some years now that vitamin A (vit A) produces some skeletal malformations in hatchery-reared larvae (Cahu *et al.* 2003). An excess of vit A in diets has been considered to be responsible for vertebral deformities in larvae of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Dedi *et al.* 1995, Takeuchi *et al.* 1995, Dedi *et al.* 1997, Takeuchi *et al.* 1998, Takeuchi 2001), turbot *Scophthalmus maximus* (Estevez and Kanazawa 1995), Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Hamre *et al.* 2005) and Atlantic salmon *Salmo salar* (Ørnsrud *et al.* 2002, Ørnsrud *et al.* 2004). The effect of dietary vit A on vertebral deformation is mediated by its derivative, retinoic acid (RA). During larval development, RA regulates the activity of homeobox genes (Means and Gudas 1995), which are in charge of the organization of the central body axis development pattern (Ross *et al.* 2000). An excess of RA disturbs the normal expression of these genes, leading to vertebral deformity (Takeuchi *et al.* 1998).

The aquacultural production of red sea bream, *Chrysophrys major*, is the second largest in Japan (Koshio 2002); however, artificially-reared fish of this species have shown a high incidence of body deformities, particularly in the vertebrae (Takashima 1978, Matsuoka 1987), and it is possible that dietary vit A may affect the normal development of early stages of this species. Ogata and Oku (2001) did not find any significant difference in growth of red sea bream juveniles fed on 100 mg of RA kg⁻¹ of diet when compared with juveniles fed a commercial diet. Likewise, Hernández *et al.* (2004) reported that red sea bream juveniles did not show any skeletal deformity when fed a diet with supplementation of 100,000 international units (IU) of vit A kg⁻¹ (1 IU = 0.3 μ g of all-*trans*-retinol). Thus, the development of skeletal deformities seems to be related to the larval stage in this species, but there are no reports on how dietary vit A might affect the normal development of the larval stage. The present study therefore aims to examine the effects of vit A, RA and β -carotene (β C) on the normal development of early larvae of red sea bream.

Material and methods

Larval rearing and test diets

Fertilized eggs of the red sea bream *C. major* were obtained from a private hatchery in Kumamoto Prefecture (Japan) and transported to the Kamoike Marine Production Laboratory (Faculty of Fisheries, Kagoshima University). Eggs were stocked in a 500-L tank with continuous aeration, water flow of 100–120 mL min⁻¹ and water temperature of 17–18°C until hatching. From the third day after hatching to the start of the experiment, larvae were fed three times a day on the rotifer *Brachionus plicatilis* (100–250 μ m in lorica length). The rotifers were maintained on concentrated *Chlorella* (Fresh *Chlorella* V-12, Chlorella Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan).

partir de los tres días después de eclosionar y hasta el inicio del experimento, las larvas se alimentaron tres veces al día con el rotífero *Brachionus plicatilis* (longitud de la lóricas de 100–150 μm). Los rotíferos se mantuvieron en *Chlorella* concentrada (Fresh *Chlorella* V-12, Chlorella Industry Co. Ltd., Tokyo, Japón). Antes de ser añadidos a las larvas, los rotíferos se enriquecieron de 6 a 8 horas con ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) utilizando Aqualene (Takeda-Kagaku-shiroyo, Tokyo, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La composición basal de las micro dietas aglutinadas (MBD) consistió de 25% (w/w) caseína libre de vitaminas (Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japón), 10% harina de pescado, 10% de harina de krill y 10% de harina de calamar (todas de Nippon Suisan Kaisha Ltd., Tokyo, Japón). Los lípidos de las harinas fueron eliminados con dietiléter utilizando un extractor Soxhlet. Se agregó aceite de hígado de calamar (Riken Vitamin, Tokyo, Japón) al 5%, lecitina de frijol de soya (Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japón) al 3% y n-3 HUFA al 1%. Se agregó dextrina (Kanto Chemical Co., Tokyo, Japón) al 6.7%, mientras que las mezclas de vitaminas y minerales (Hernández *et al.* 2004) se agregaron al 5% cada una. También se utilizó una mezcla de atrayentes (0.2% de betaina y 0.1% de inosin-5'-monofosfato), así como zeína (Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japón) como aglutinante al 8%, y se agregó un relleno (α -celulosa 11%, Sigma Chemical Co., St. Louis USA) para ajustar las dietas al 100%. En total se prepararon nueve dietas diferentes, que fueron suplementadas con palmitato de vit A (VAP), RA y βC . Se agregó VAP (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japón) hasta proveer concentraciones de 2.7, 27 y 165 mg/100 g de dieta (270, 2,700 y 16,500 IU vit A/100 g dieta, respectivamente); βC (Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japón) a razón de 1, 9 y 50 mg/100 g dieta, mientras que el all-*trans*-RA (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) se agregó a razón de 2.8, 28 y 166 mg/100 g dieta. Las concentraciones analizadas se muestran en la tabla 1. Las MBD se prepararon de acuerdo con Teshima *et al.* (1982) y Kanazawa *et al.* (1989) y, después de prepararlas, se pulverizaron y cernieron en partículas con un rango de entre 125 y 180 μm . Las dietas se almacenaron a -24°C hasta su uso.

Prueba de alimentación

Al inicio de la prueba de alimentación, se transfirieron larvas de cinco días después de eclosionar con una longitud total (TL) de 3.11 ± 0.25 mm (promedio $\pm$ error estándar) y un peso seco medio de 20 ± 0.1 μg del tanque stock a los tanques experimentales (tanques circulares de polietileno de 30 L de capacidad conteniendo 25 L). En cada tanque se colocaron quinientas larvas y cada MBD se administró a un grupo triplicado de tanques. También se montó un grupo control alimentado exclusivamente con rotíferos. Las dietas (0.6 mg larva $^{-1}$ día $^{-1}$) se dieron 15 veces por día, cada 30 min durante la mañana (de las 7:30 a las 12:00 h) y cada hora durante la tarde (de las 13:00 a las 17:00). Cada tanque recibió rotíferos como suplemento

Before being supplied to the larvae, rotifers were enriched for 6–8 h with highly unsaturated fatty acids (HUFA), using Aqualene (Takeda-Kagaku-shiroyo, Tokyo) according to the manufacturer's recommendations.

The basal composition of the micro-bound diets (MBDs) consisted of 25% (w/w) free-vitamin casein (Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japan), 10% brown fish meal, 10% krill meal and 10% squid meal (all from Nippon Suisan Kaisha Ltd., Tokyo). Meals were defatted with diethyl ether using a Soxhlet extractor. Squid liver oil (Riken Vitamin, Tokyo) was added at 5%, soybean lecithin (Wako Pure Chemical Ind., Osaka) at 3% and n-3 HUFA at 1%. Dextrin (Kanto Chemical Co., Tokyo) was added at 6.7%, while the vitamin and mineral mixes (Hernández *et al.* 2004) were added at 5% each one. A mix of attractants (0.2% betaine and 0.1% inosin-5'-monophosphate) was also used. Zein (Wako Pure Chemical Ind., Osaka) was used as binder at 8% and a filler (α -cellulose 11%, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) was added to adjust the diets to 100%. Nine different MBDs were prepared and supplemented with either vit A palmitate (VAP), RA or βC : VAP (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) was added to provide concentrations of 2.7, 27 and 165 mg/100 g diet (270, 2,700 and 16,500 IU vit A/100 g diet, respectively); βC (Wako Pure Chemical Ind., Osaka) was added at 1, 9 and 50 mg/100 g diet; and all-*trans*-RA (Sigma Chemical Co., St. Louis) was added at 2.8, 28 and 166 mg/100 g diet. The concentrations analyzed are shown in table 1. The MBDs were prepared according to Teshima *et al.* (1982) and Kanazawa *et al.* (1989), and then ground and sieved into particles ranging from 125 to 180 μm . The diets were stored at -24°C until being used.

Feeding trial

At the beginning of the feeding trial, 5-day-old larvae of 3.11 ± 0.25 mm (mean $\pm$ standard error) total length and 20 ± 0.1 μg mean body dry weight were transferred from the stock tank to the experimental tanks (30-L circular, polyethylene tanks, containing 25 L). Five hundred larvae were stocked per tank and each test MBD was fed to three replicate groups of larvae. A control group fed exclusively on rotifers was also set up. Diets (0.6 mg larvae $^{-1}$ day $^{-1}$) were given 15 times per day, every 30 min during the morning (from 7:30 to 12:00) and every hour during the afternoon (from 13:00 to 17:00). Each tank received supplemental rotifers (about 200 rotifers larvae $^{-1}$ day $^{-1}$) reared exclusively on *Chlorella*, every morning (7:00) and afternoon (17:00); vit A was not detected in the samples of these rotifers. The rotifers used to feed the control group were enriched with AQUALENE during 6–8 h before being offered. Rotifers (900–1000 rotifers larvae $^{-1}$ day $^{-1}$) were added to each tank three times per day (7:00, 12:30 and 17:00). The vit A (as total retinol) content in these rotifers was 55 ± 3.5 IU g $^{-1}$ of dry matter.

Throughout the feeding trial, water was pumped from Kagoshima Bay, Kagoshima (Japan), passed through a sand filter, and passed again through 100- and 30- μm cartridge filters

Tabla 1. Valores agregados y analizados de vitamina A palmitato (VAP), β -carotene (β C) y ácido retinoico (RA) de las dieta micro aglutinadas utilizadas para la cría de larvas de pargo rojo por 15 días.**Table 1.** Added and analyzed values of vitamin A palmitate (VAP), β -carotene (β C) and retinoic acid (RA) in the micro-bound diets used for rearing red sea bream larvae for 15 days.

Compound	Experimental group	Added values (mg/100 g diet)	Analyzed values (mg/100 g diet) ^a
Vitamin A palmitate	VAP-1	2.7 ^b	2.9 $\pm$ 0.3
	VAP-2	27 ^c	27.5 $\pm$ 3.0
	VAP-3	165 ^d	172.3 $\pm$ 5.3
β -Carotene	β C-1	1	1 $\pm$ 0.03
	β C-2	9	10 $\pm$ 0.5
	β C-3	50	50 $\pm$ 1.0
Retinoic acid	RA-1	2.8	3.2 $\pm$ 0.5
	RA-2	28	29 $\pm$ 1.3
	RA-3	166	164 $\pm$ 5.5

^a Values are means $\pm$ standard error. ^b Equivalent to 270 international units (IU)/100 g diet.^c Equivalent to 2,700 IU/100 g diet. ^d Equivalent to 16,500 IU/100 g diet.

(aproximadamente 200 rotíferos larva⁻¹ día⁻¹) alimentados exclusivamente con *Chlorella* cada mañana (7:00) y tarde (17:00). Vit A no fue detectada en las muestras de estos rotíferos. Los rotíferos utilizados para alimentar el grupo control fueron enriquecidos con Aqualene durante 6–8 h antes de alimentar a las larvas. Los rotíferos (900–1000 rotíferos larva⁻¹ día⁻¹) se suministraron a cada tanque tres veces por día a las 7:00, 12:30 y 17:00 h. El contenido de vit A (como retinol total) en estos rotíferos fue de 55 $\pm$ 3.5 IU g⁻¹ en base seca.

Durante la prueba de alimentación, el agua bombeada desde la Bahía de Kagoshima, Kagoshima (Japón), se pasó a través de un filtro de grava y antes de agregarse a los tanques, se filtró de nuevo a través de filtros de cartucho de 100 y 30 μ m (Tocel, Advantec Inc., Tokyo, Japón). El flujo de agua en cada tanque fue de 100–120 mL min⁻¹, con aireación continua (100 mL de aire min⁻¹). La temperatura del agua fue de 20.0 $\pm$ 0.7°C (promedio $\pm$ SD), el pH de 8.0 $\pm$ 0.1, la salinidad de 34 $\pm$ 0.5‰ y el oxígeno disuelto de 5.9 $\pm$ 0.1 mg L⁻¹. Todos los tanques se mantuvieron en ciclos de 11 h luz y 13 h oscuridad. Diariamente se sifoneó el fondo de los tanques y se contó el número de larvas muertas, ajustando la cantidad de MBD en consecuencia. La prueba de alimentación se realizó por un periodo de 15 días.

El desempeño de las larvas con cada MBD se valoró por peso final (FBW), ganancia en peso (WG), longitud total (TL) e incidencia de deformidades. Por tanto, al final de la prueba de alimentación, las larvas fueron anestesiadas con 10 mg L⁻¹ de Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol, Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japón). Se seleccionaron 30 larvas de cada tanque al azar para la medición de TL, utilizando un proyector de imagen (Profile Projector PJ-250, Mitsutoyo, Tokyo, Japón) junto con un calibrador digital (tipo CD-15C, Mitsutoyo, Tokyo, Japón), y después se fijaron en formol amortiguado al 10%

(Tocel, Advantec Inc., Tokyo) before being introduced into the tanks. The water flow rate in each tank was 100–120 mL min⁻¹ and continuous aeration was provided (100 mL air min⁻¹). Water temperature was 20.0 $\pm$ 0.7°C (mean $\pm$ SD), pH was 8.0 $\pm$ 0.1, salinity was 34 $\pm$ 0.5‰ and dissolved oxygen was 5.9 $\pm$ 0.1 mg L⁻¹. All tanks were maintained under a photoperiod of 11 h light and 13 h dark. The bottom of the tanks was siphoned daily and the number of dead larvae was counted; the quantity of MBD was adjusted accordingly. The feeding trial was conducted over a period of 15 days.

Performance of test larvae fed the MBDs was assessed based on final body weight, weight gain, total length and incidence of deformities. At the end of the feeding trial, the larvae were anesthetized with 10 mg L⁻¹ of Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol, Wako Pure Chemical Ind., Osaka). Thirty larvae were randomly selected from each tank for the measurement of total length using an image projector (Profile Projector PJ-250, Mitsutoyo, Tokyo) and a digital caliper (type CD-15C, Mitsutoyo, Tokyo), and then fixed in buffered formalin (10%) for later staining. The remaining larvae were pooled and freeze-dried to measure the body weights using an electronic microbalance (Shimadzu PMB-1, Kyoto), and for RA content analysis.

Staining technique and body deformities

Larvae were stained following the technique of double staining with alcian blue and alizarin red for bone and cartilage (Kawamura and Hosoya 1991). During the inspection of the body, the descriptions of Matsuoka (1985, 1987) were used to determine the stage of development and number of vertebrae. The vertebral column was divided into four regions based on distinct morphological features of the vertebrae (Boglione *et*

para su posterior tinción. Las larvas remanentes se juntaron y se liofilizaron para medir el peso corporal (BW) con una microbalanza electrónica (Shimadzu PMB-1, Kyoto, Japón) y para los análisis de RA.

Técnica de tinción y deformidades del cuerpo

Las larvas se tiñeron utilizando la técnica de doble tinción con azul alcian y rojo de alizarina para hueso y cartílago (Kawamura y Hosoya 1991). Durante la inspección del cuerpo se utilizaron las descripciones de Matsuoka (1985, 1987) para determinar el estadio de desarrollo y número de vértebras. La columna vertebral se dividió en cuatro regiones con base en los caracteres morfológicos distintivos de las vértebras (Boglione *et al.* 2001): dos cefálicas (1ra y 2da), ocho pre-hemales (3ra a 10a), once hemales (11a a 21a) y tres caudales (22da a 24ta). El número de vértebras se determinó por el número de segmentos en las notocordas y los arcos. El tamaño de las vértebras o segmentos se evaluaron midiendo éstas y la distancia entre los arcos. Las deformidades se determinaron de acuerdo con las descripciones de Takashima (1978) y Boglione *et al.* (2001).

Análisis químicos

Los contenidos de proteína cruda y cenizas de las dietas se analizaron con los métodos de la AOAC (1990), el de lípidos con el método de Bligh y Dyer (1959), y los de vit A (cuantificado como retinol total), RA y β C, mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) con reactivos de grado HPLC. El retinol total en las dietas se extrajo con la técnica de saponificación con KOH etanólico y se cuantificó con los métodos reportados por Estevez y Kanazawa (1995). El sistema HPLC consistió de una bomba (LC-3A Shimadzu Corp. Tokyo, Japón), un detector UV en 325 nm (SPD-6A, Shimadzu Corp. Tokyo, Japón), un procesador de datos (Chromatopac C-R7Ae-plus, Shimadzu Corp. Tokyo, Japón) y una columna (Shim-pack CLC-SIL 4.6 $\times$ 150 mm, Shimadzu Corp., Tokyo, Japón) de sílica (diámetro de partícula = 5 μ m). Se utilizó hexano-isopropanol (95:5) como fase móvil (1 mL/min y all-*trans*-retinol, 95%, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) como estándar externo. El β C en las dietas se extrajo y cuantificó con los métodos reportados por Eitenmiller y Landen (1999). El sistema HPLC fue similar al utilizado para el retinol total, pero el detector de UV se utilizó en 436 nm, y se usó también una columna Cosmosil SC18-MS (Nacalai Tesque Inc., Tokyo, Japón). Se utilizó un flujo de 2 mL min⁻¹ de acetronil: metanol:etil acetato (88:10:2) como fase móvil y β -caroteno (80%, Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japón) como estándar externo. El RA en las dietas y larvas se extrajo con etanol, como lo reportan Eitenmiller y Landen (1999). El sistema HPLC fue el mismo utilizado para el β C, pero con el detector en 370 nm y una fase móvil de hexano:isopropanol (95:5). Se usó el all-*trans*-ácido retinoico (97%, Wako Pure chemicals Ind., Osaka, Japón) como estándar externo. Debido al tamaño de la muestra, el contenido de RA se determinó sólo en el cuerpo de las larvas.

al. 2001): two cephalic (1st and 2nd vertebrae), eight pre-hemal (3rd to 10th), eleven hemal (11th to 21st) and three caudal (22nd to 24th). The number of vertebrae was determined by the number of segments in the notochord and arches. The size of the vertebrae or segments was evaluated by measuring them and the distance between the arches. Body deformities were determined based on the descriptions of Takashima (1978) and Boglione *et al.* (2001).

Chemical analysis

Crude protein and ash contents of the diets were analyzed by AOAC (1990) methods, and lipid content was determined following Bligh and Dyer's (1959) method. The contents of vit A (quantified as total retinol), RA and β C were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using HPLC-grade reagents. Total retinol in the diets was extracted following the technique of saponification with ethanolic KOH and quantified based on the methods described by Estevez and Kanazawa (1995). The HPLC system consisted of a pump (LC-3A, Shimadzu Corp., Tokyo), a UV detector at 325 nm (SPD-6A, Shimadzu Corp., Tokyo), a data processor (Chromatopac C-R7Ae-plus, Shimadzu Corp., Tokyo), and a silica (5- μ m particle diameter) column (Shim-pack CLC-SIL 4.6 $\times$ 150 mm, Shimadzu Corp., Tokyo). Hexane-isopropanol (95:5) was used as mobile phase (1 mL/min) and all-*trans*-retinol (95%, Sigma Chemical Co., St. Louis) was used as external standard. The β C in the diets was extracted by saponification and hexane (Eitenmiller and Landen 1999). The HPLC system was similar to that used for total retinol, but the UV detector was set at 436 nm and a Cosmosil SC18-MS (Nacalai Tesque Inc., Tokyo) column was used. The mobile phase used was acetonitrile:methanol:ethyl acetate (88:10:2) at a speed of 2 mL/min, employing β C (80%, Wako Pure Chemicals Ind., Osaka) as external standard. The RA in the diets and larvae was extracted by ethanol, as reported by Eitenmiller and Landen (1999). The HPLC system was the same as that used for β C with the detector set at 370 nm and a mobile phase of hexane:isopropanol (95:5). All-*trans*-RA (97%, Wako Pure Chemicals Ind., Osaka) was used as external standard. The RA content analysis was only performed on the whole body of the larvae because of the limited size of the sample.

Statistical analysis

Final body weight, weight gain, total length, survival rate, incidence of vertebral deformities, percentage of affected vertebrae in each region and RA content of larvae from the experimental groups were tested using one-way ANOVA (package super-ANOVA, Abacus Concepts, Berkeley, USA). Significant differences were evaluated using Duncan's new multiple range test (Steel and Torrie 1980). The statistically significant differences were determined by setting the error at 5% ($P < 0.05$) for each set of comparisons.

Análisis estadístico

Tanto FBW, WG, TL, tasa de supervivencia, incidencia de deformidades en las vértebras, porcentaje de vértebras afectadas en cada región como contenido de RA en las larvas de los grupos experimentales se evaluaron utilizando ANOVA de una variable (paquete super-ANOVA, Abacus Concepts, Berkeley, USA). Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba nueva de Duncan de rango múltiple (Steel y Torrie 1980), determinando la significancia estadística de las diferencias a un nivel de 5% ($P < 0.05$) para cada grupo de comparaciones.

Resultados

El grupo control mostró FBW y WG significativamente más altos que los grupos experimentales (tabla 2). También el valor más alto de TL se observó en el grupo control, pero sólo se observaron diferencias significativas cuando éste se comparó con los grupos alimentados con las dietas β C-2, β C-3, RA-2 y RA-3. Entre las larvas alimentadas con las MDB hubo una tendencia en la que los niveles altos de suplementación mostraron los valores más bajos de FBW, WG y TL. Particularmente, las larvas que recibieron las MDB RA-3 y β C-3 mostraron valores significativamente más bajos de FBW y WG que los otros grupos. Ambos grupos también mostraron valores más bajos de TL que los otros grupos alimentados con las MBD. La tasa de supervivencia más baja se observó en las larvas alimentadas con la dieta RA-3. La mortalidad en todos los tanques ocurrió durante los últimos días del experimento. Antes de este periodo, en todos los tanques la tasa de mortalidad fue de menos del 10%.

Results

The control group showed a significantly higher final body weight and weight gain than the experimental groups (table 2). The highest value of total length was also recorded for the control group, but significant differences were only observed when it was compared with the groups fed the β C-2, β C-3, RA-2 and RA-3 diets. The final body weight, weight gain and total length values obtained for the larvae fed the MBDs tended to decrease as the levels of supplementation increased. In particular, the larvae fed the RA-3 and β C-3 diets showed significantly lower final body weight and weight gain, as well as lower total length values than the other experimental groups. The control group had a significantly higher survival rate than the groups fed the MBDs. The lowest survival rate was observed in the larvae fed the RA-3 diet. Mortality in all tanks occurred during the last days of the experiment. Before this period, the mortality rate was less than 10% in all the tanks.

During the microscope observations, larvae from the experimental and control groups showed segmentation of the notochord, particularly from the 1st to the 21st vertebrae (from the cephalic to the hemal zones). Only some individuals (27%) from the control group presented segmentation of the vertebrae in the caudal zone. Ossification was not observed in the vertebrae or in the arches.

The abnormalities observed consisted of compression or apparent fusion of the segments in the notochord and mouth deformities. Compression/apparent fusion of the segments mainly affected the vertebrae of the hemal zone and, in severe cases, larvae seemed to be affected by lordosis, their total length thus being affected. Mouth deformities, especially a shortened lower jaw, had a low incidence in all groups.

Tabla 2. Peso final, ganancia en peso ((peso final – peso inicial)/peso inicial), longitud total, tasa de supervivencia y la incidencia de al menos una deformidad observada en las larvas de pargo rojo alimentadas con micro dietas aglutinadas con diferentes suplementaciones de vitamina A palmitato (VAP), β -caroteno (β C) y ácido retinoico (RA) por 15 días. Los valores son el promedio de tres réplicas por grupo $\pm$ el error estándar. Los promedios con diferente letra en la misma columna difieren significativamente ($P < 0.05$).

Table 2. Final body weight, weight gain ((final weight – initial weight)/initial weight), total length, survival rate and incidence of at least one deformity observed in red sea bream larvae fed micro-bound diets with different supplementations of vitamin A palmitate (VAP), β -carotene (β C) and retinoic acid (RA) for 15 days. Values are means of three replicate groups $\pm$ standard error. Means with different letter in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

Treatment	Final body weight (μ g dry weight)	Weight gain (%)	Total length (mm)	Survival rate (%)	Incidence of deformities (%)
VAP-1	48 $\pm$ 1c	140 $\pm$ 3c	3.9 $\pm$ 0.1cd	30 $\pm$ 1c	22.3 $\pm$ 1.4a
VAP-2	45 $\pm$ 1c	127 $\pm$ 4c	3.7 $\pm$ 0.08cd	20 $\pm$ 5abc	25.6 $\pm$ 2.9abc
VAP-3	39 $\pm$ 1b	93 $\pm$ 7b	3.7 $\pm$ 0.2bcd	22 $\pm$ 4abc	31.3 $\pm$ 2.3c
β C-1	44 $\pm$ 2c	122 $\pm$ 9c	3.7 $\pm$ 0.04cd	29 $\pm$ 2bc	24.0 $\pm$ 2.0ab
β C-2	37 $\pm$ 1b	83 $\pm$ 4b	3.5 $\pm$ 0.3abc	12 $\pm$ 1a	26.0 $\pm$ 2.0abc
β C-3	30 $\pm$ 1a	50 $\pm$ 6a	3.2 $\pm$ 0.03ab	12 $\pm$ 1a	49.3 $\pm$ 2.3d
RA-1	47 $\pm$ 1c	133 $\pm$ 6c	3.6 $\pm$ 0.2bcd	16 $\pm$ 7ab	30.3 $\pm$ 2.4bc
RA-2	37 $\pm$ 2b	85 $\pm$ 10b	3.5 $\pm$ 0.2abc	25 $\pm$ 2bc	50.3 $\pm$ 2.3d
RA-3	32 $\pm$ 2a	60 $\pm$ 7a	3.0 $\pm$ 0.1a	8 $\pm$ 3a	60.6 $\pm$ 2.9d
Control	63 $\pm$ 1d	213 $\pm$ 4d	4.1 $\pm$ 0.1d	46 $\pm$ 7d	20.6 $\pm$ 1.2a

Durante las observaciones al microscopio, las larvas de los grupos experimentales y control mostraron segmentación de la notocorda, particularmente de la 1ra a la 21ra vértebra (de las zonas cefálica a la hemal). Sólo algunos individuos (27%) en el grupo control presentaron segmentación de las vértebras en la zona caudal. No se observó osificación en las vértebras o en los arcos.

Las anomalías observadas fueron la compresión o fusión aparente de los segmentos en la notocorda y deformidades en la boca. La compresión/fusión aparente de los segmentos afectó principalmente las vértebras de la zona hemal y, en casos severos, las larvas parecían estar afectadas por lordosis y, por tanto, afectada su longitud total. Las deformidades en la boca tuvieron una incidencia baja en todos los grupos, especialmente el acortamiento de la mandíbula inferior.

La incidencia de al menos una deformidad en el cuerpo de las larvas de pargo rojo aumentó con el incremento de la concentración de cada compuesto (tabla 2), particularmente en los grupos alimentados con RA. Las larvas alimentadas con las MBD β C-3, RA-2 y RA-3 mostraron una incidencia significativamente más alta de deformidades que los otros grupos. Las vértebras afectadas en cada individuo se incrementaron conforme lo hicieron las concentraciones de VAP, β C y RA en las MBD, afectando principalmente en las zonas prehemal y hemal (tabla 3), mientras que la región cefálica no mostró ninguna deformidad en ninguno de los grupos. Particularmente, las larvas alimentadas con dietas con RA mostraron un alto porcentaje de vértebras afectadas, mientras que las larvas alimentadas con la dieta RA-3 presentaron todas las vértebras de la sección hemal con deformidad. Aun cuando las larvas

The incidence of at least one deformity in the body of red sea bream larvae increased as the concentration of each compound increased (table 2), particularly in the groups offered RA. Larvae fed the β C-3, RA-2 and RA-3 diets showed significantly higher incidence of deformities than the other groups. The number of affected vertebrae in each individual increased as the concentrations of VAP, β C and RA in the MBDs increased, primarily affecting the pre-hemal and hemal regions (table 3); the cephalic region did not show any deformity in all groups. The diets containing RA produced a high percentage of affected vertebrae, and the larvae fed with the RA-3 diet showed all vertebrae in the hemal section with deformity. Though larvae fed the β C-3 diet showed a high incidence of deformities (similar to those observed in larvae supplied RA, table 2), the percentage of affected vertebrae was low (table 3).

The RA content of larvae is shown in table 3. Larvae fed the diets containing VAP and β C showed significantly lower deformity values than those offered RA, which was not detected in the larvae fed rotifers. The RA contents in larvae increased with increasing levels of RA in the diets, and a significantly higher content was observed in larvae fed the RA-3 diet.

Discussion

Growth performance of the larvae in the control group was comparable to that observed in other studies on red sea bream larvae (Kanazawa *et al.* 1989, Teshima *et al.* 2004). Kolkovski *et al.* (1997) and Kolkovski (2001) reported that live feed produced better growth performance than only micro diets or co-feeding.

Tabla 3. Porcentaje de vértebras afectadas en cada región del cuerpo y contenido de ácido retinoico en el cuerpo de larvas de pargo rojo alimentadas con micro dietas aglutinadas con diferentes suplementaciones de vitamina A palmitato (VAP), β -caroteno (β C) y ácido retinoico (RA) por 15 días. Los valores son el promedio de tres replicas por grupo $\pm$ el error estándar. Los promedios con diferente letra en la misma columna difieren significativamente ($P < 0.05$).

Table 3. Percentage of affected vertebrae in each region of the body and retinoic acid content in the whole body of red sea bream larvae fed micro-bound diets with different supplementations of vitamin A palmitate (VAP), β -carotene (β C) and retinoic acid (RA) for 15 days. Values are the means of 30 observations (larvae) $\pm$ standard error. Means with different letter in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

Treatment	Affected vertebrae (%)		Retinoic acid content (μ g/g dry weight)
	Pre-hemal	Hemal	
VAP-1	—	20.6 $\pm$ 1.2cd	0.20 $\pm$ 0.05a
VAP-2	—	24.6 $\pm$ 1.3de	0.26 $\pm$ 0.08a
VAP-3	4.6 $\pm$ 1.2a	25.7 $\pm$ 1.7de	0.53 $\pm$ 0.08
β C-1	—	3.3 $\pm$ 0.8a	0.26 $\pm$ 0.03a
β C-2	—	11.3 $\pm$ 0.8b	0.23 $\pm$ 0.03a
β C-3	—	15.6 $\pm$ 1.2bc	0.66 $\pm$ 0.06ab
RA-1	10.3 $\pm$ 1.4ab	26.3 $\pm$ 1.2e	1.5 $\pm$ 0.28b
RA-2	10.6 $\pm$ 2.3ab	53.0 $\pm$ 4.6f	2.8 $\pm$ 0.44c
RA-3	16.3 $\pm$ 2.0b	100.0 $\pm$ 0.0	5.4 $\pm$ 0.66d
Control	—	3.3 $\pm$ 0.9a	Not detected

alimentadas con la dieta β C-3 mostraron una alta incidencia de deformidades (similar a las presentadas en las larvas alimentadas con RA, tabla 2), el porcentaje de vértebras afectadas fue bajo (tabla 3).

El contenido de RA de las larvas se muestra en la tabla 3. Las larvas alimentadas con VAP y β C mostraron significativamente menos deformidades las larvas alimentadas con RA. No se detectó RA en las larvas alimentadas con rotíferos. Los contenidos de RA en las larvas se incrementaron con el incremento en los niveles de RA en las dietas, observándose un contenido significativamente más alto en las larvas alimentadas con la dieta RA-3.

Discusión

El rendimiento del crecimiento de las larvas en el grupo control fue comparable a los reportados en otros estudios con larvas de pargo rojo (Kanazawa *et al.* 1989, Teshima *et al.* 2004). Tal como lo reportaron Kolkovski *et al.* (1997) y Kolkovski (2001), el alimento vivo resulta en mejor crecimiento que únicamente las micro dietas o una alimentación combinada.

La compresión o fusión aparente de los segmentos en la notocorda observada en las larvas alimentadas con RA es similar a las reportadas en larvas de pargo rojo criadas en granjas (Takashima 1978, Matsuoka 1987, Ogata y Oku 2001), por lo que es posible que la vit A de la dieta juegue un papel importante en producir este tipo de anomalías. De acuerdo con Takashima (1978), la compresión de las vértebras durante la etapa larval es la causa de la condición lordótica en los juveniles de pargo rojo producidos en granjas. Este tipo de anomalías ha sido asociado con altos niveles de vit A en la dietas de otras especies de peces (Ørnsrud *et al.* 2002, Cahu *et al.* 2003).

Durante este estudio, hubo una relación directa entre la alta incidencia de deformidades y altos contenidos de RA en las larvas. El RA es el producto final de la oxidación del retinol (Ross 1993) y su función más importante durante el desarrollo embrionario es regular la transcripción de genes (Combs 1998). Entre éstos, los genes homeobox están a cargo de la organización del patrón de desarrollo, especialmente del eje del cuerpo y los apéndices durante el estadio de embrión (Ross *et al.* 2000). El exceso de RA interrumpe la expresión normal de estos genes, causando defectos en vértebras, apéndices y cabeza (Means y Gudas 1995). El efecto negativo del exceso de RA durante el desarrollo embrionario en peces ha sido reportado por Takeuchi *et al.* (1998) en las larvas de lenguado japonés, las cuales presentaron una alta ocurrencia de vértebras comprimidas cuando fueron alimentadas con *Artemia* enriquecida con 100 mg de RA en 10 L de medio de enriquecimiento. Haga *et al.* (1999) reportaron que las deformidades en las larvas de lenguado japonés aumentaron con el incremento de los niveles de RA en la *Artemia* suplementada. Estos autores también reportaron una alta incidencia de fusión central en las vértebras 11a–25a (zona hemal), las cuales son muy similares a

The compression or apparent fusion of the segments in the notochord observed in the larvae offered RA is similar to that found to affect hatchery-reared red sea bream (Takashima 1978, Matsuoka 1987, Ogata and Oku 2001), so it is possible that dietary vit A plays an important role in producing that type of abnormalities. According to Takashima (1978), vertebral compression during the larval stage is the cause of the lordotic condition in hatchery-produced red sea bream juveniles. This type of abnormalities has been associated with high levels of vit A in the diet of other fish species (Ørnsrud *et al.* 2002, Cahu *et al.* 2003).

In this study, a direct relationship was found between the high incidence of deformities and high RA contents in the larvae. This acid is the final product of the oxidation retinol (Ross 1993) and its main function during embryonic development is to regulate the transcription of genes (Combs 1998), including the homeobox genes that are in charge of organizing the development pattern, especially of the body axis and limbs (Ross *et al.* 2000). An excess of RA disrupts the normal expression of these genes, causing defects in the head, vertebrae and limbs (Means and Gudas 1995). The negative effect of an excess of RA during the embryonic development in fish has been reported by Takeuchi *et al.* (1998) for Japanese flounder larvae, which presented a high occurrence of compressed vertebrae when fed *Artemia* enriched with 100 mg of RA in 10 L of enrichment medium. Haga *et al.* (1999) reported that vertebral deformity in larval Japanese flounder increased with increasing levels of RA in supplemented *Artemia*. These authors also reported a high incidence of central fusion in the 11th to 25th vertebrae (hemal zone), very similar to the deformities found in red sea bream larvae during this experiment. The development of the red sea bream vertebral column occurs in anterior-posterior direction (Matsuoka 1987) and, normally, the cephalic and pre-hemal regions develop during the days right after hatching. When the MBDs were added five days after hatching, the dietary vit A mainly affected the posterior region of the body (hemal region). This effect of the dietary vit A has already been reported for other vertebrates (Zile 2001).

The effect of VAP on the incidence and severity of body deformities was lower than that of RA. To produce retinol and its subsequent oxidation to yield RA, VAP needs to be hydrolyzed by specific enzymes. Early larvae lack several enzymes and many compounds are difficult to metabolize (Kolkovski 2001), and it is possible that enzymes such as carboxylester lipase and pancreatic triglyceride lipase were not present or in low concentrations during this experiment. Several reports suggest that live foods may contribute with their own digestive enzymes (Kolkovski *et al.* 1993) or help in the assimilation and absorption processes during digestion (Kolkovski *et al.* 1997).

The effect of β C on vertebral deformities was unclear in this experiment, since only the highest concentration caused significant incidence. In fish, the conversion of β C into vit A depends on fish size and vit A status (Torrissen and Christiansen 1995), and β C is one of the best sources of vit A for mammals (Torrissen 1989). Moreover, several reports have

las deformidades encontradas en las larvas de pargo rojo durante este experimento. El desarrollo de la columna vertebral del pargo rojo es de forma antero-posterior (Matsuoka 1987) y normalmente el desarrollo de las regiones cefálica y prehemal ocurre durante los días iniciales después de la eclosión. Con la adición de las MBD a los cinco días después de eclosionar, el efecto de la vit A de la dieta fue en su mayoría en la región posterior del cuerpo (región hemal). Este efecto de la vit A ya ha sido reportado para otros vertebrados (Zile 2001).

El efecto del VAP en la incidencia y severidad de las deformidades del cuerpo fue menor al compararlo con los tratamientos con RA. Para producir retinol y su posterior oxidación para producir RA, el VAP necesita ser hidrolizado por enzimas específicas. Las larvas jóvenes carecen de varias enzimas y muchos compuestos les son difíciles de metabolizar (Kolkovski 2001). Es posible que, durante este experimento, enzimas como la lipasa carboxiléster y la lipasa triglicérica pancreática no estuvieran presentes o lo estuvieran en bajas concentraciones. Varios reportes sugieren que el alimento vivo puede contribuir sus propias enzimas digestivas (Kolkovski *et al.* 1993) o ayudar en la asimilación y proceso de absorción durante la digestión (Kolkovski *et al.* 1997).

El efecto de β C en las deformidades vertebrales no fue claro durante este experimento, pues sólo la concentración más alta causó una incidencia significativa. El β C es una de las mejores fuentes de vit A para mamíferos (Torrisen 1989), y en peces está reportado que la conversión de β C en vit A depende del tamaño del pez y el nivel de la vit A (Torrisen y Christiansen 1995). Además, varios reportes han mostrado que el β C es convertido pobremente en retinol (y por tanto en RA) en el estadio larvario (Takeuchi *et al.* 1995, Rønnestad *et al.* 1998a, b), en comparación con otros carotenoides tales como astaxantina y cantaxantina (Hamre *et al.* 2005).

Las deformidades causadas por el RA de la dieta en las larvas de pargo rojo son similares a las reportadas en peces producidos en granjas, indicando que el exceso de vit A de la dieta juega un papel importante en el origen de aquellas. El efecto del VAP es similar al del RA, particularmente en las concentraciones más altas, probando que utilizar VAP en micro dietas aumenta la incidencia de deformidades en las larvas de pargo rojo. Sin embargo, todavía se requiere más investigación acerca de cómo el VAP es convertido en RA por las larvas y también sobre los efectos del β C, ya que sólo la concentración más alta de éste produjo incidencia significativa de deformidades.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Ministerio de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología (Monbukagakusho) de Japón y el apoyo de la UNAM-FES Iztacala de México para esta investigación. También agradecen a Nippon Suisan Co. Ltd. (Japón) su apoyo en la adquisición del ácido retinoico para preparar las micro dietas y los análisis en el HPLC.

showed that β C is poorly converted into retinol (and thus to RA) in the larval stage (Takeuchi *et al.* 1995, Rønnestad *et al.* 1998a, 1998b), in comparison with other carotenoids such as astaxanthin and canthaxanthin (Hamre *et al.* 2005).

The deformities caused by the dietary RA in red sea bream larvae are similar to those reported to affect hatchery-reared fish, indicating that the excess of dietary vit A plays an important role in producing them. The effect of VAP is similar to that of RA, particularly at the highest concentrations, proving that the use of VAP in micro diets increases the incidence of vertebral deformities in larval red sea bream. Nevertheless, further research is necessary on how VAP is converted into RA by larvae and to better determine the effects of β C.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support for this research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (Monbukagakusho), and UNAM-FES Iztacala (Mexico). Thanks are also due to Nippon Suisan Co. Ltd (Japan) for supporting the acquisition of retinoic acid to prepare the micro diets and the HPLC analysis.

Referencias

- Andrades JA, Becerra J, Fernández-Llebrez P. (1996). Skeletal deformities in larval, juveniles and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) Aquaculture 141: 1–11.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC, Arlington, Virginia, 868 pp.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911–917.
- Bogliione C, Gagliardi F, Scardi M, Cataudella S. 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). Aquaculture 192: 1–22.
- Cahu C, Zambonino IJ, Takeuchi T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture 227: 245–258.
- Combs GF. 1998. The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health. 2nd ed. Academic Press, San Diego, California, 618 pp.
- Dedi J, Takeuchi T, Seikai T, Watanabe T. 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. Aquaculture 133: 135–146.
- Dedi J, Takeuchi T, Seikai T, Watanabe T, Hosoya K. 1997. Hypervitaminosis A during vertebral morphogenesis in larval Japanese flounder. Fish. Sci. 63: 466–473.
- Estevez A, Kanazawa A. 1995. Effect of (n-3) PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation success of turbot *Scophthalmus maximus* (L). Aquacult. Nutr. 1: 159–168.
- Eitenmiller RR, Landen WIO. 1999. Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. CRC Press, Boca Raton, Florida, 518 pp.
- Haga Y, Takeuchi T, Seikai T. 1999. Effect of retinoic acid on larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, reared on *Artemia* nauplii. Suisanzoshoku 47: 559–566.

- Hamre K, Moren M, Solbakken J, Opstad I, Pittman, K. 2005. The impact of nutrition on metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture (in press).
- Hernández HLH, Teshima SI, Ishikawa M, Koshio S, Tanaka Y. 2004. Effects of dietary vitamin A on juvenile red sea bream *Chrysophrys major*. J. World Aquacult. Soc. 35: 436–444.
- Kanazawa A, Koshio S, Teshima S. 1989. Growth and survival of larval red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets. J. World Aquacult. Soc. 20: 31–37.
- Kawamura K, Hosoya K. 1991. A modified double staining technique for making a transparent fish-skeletal specimen. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. 20: 11–18 (in Japanese with English abstract).
- Kolkovski S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles: Implications and applications to formulated diets. Aquaculture 200: 181–201.
- Kolkovski S, Tandler S, Kissil G, Gertler A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion assimilation, growth and survival of gilthead seabream *Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus, larvae. Fish Physiol. Biochem. 12: 203–209.
- Kolkovski S, Koven WM, Tandler A. 1997. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiets by gilthead seabream *Sparus aurata*. Aquaculture 155: 313–322.
- Koshio S. 2002. Red sea bream, *Pagrus major*. In: Webster CD, Lim C (eds.), Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. CABI Publ., Wallingford, Oxon, pp. 51–63.
- Koumoundouros G, Gagliardi F, Divanach P, Boglione C, Cataudella S, Kentouri M. 1997. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. Aquaculture 149: 215–226.
- Koumoundouros G, Divanach P, Kentouri M. 2001. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). Aquaculture 200: 285–304.
- Matsuoka M. 1985. Osteological development in the red sea bream, *Pagrus major*. Jap. J. Ichthyol. 32: 35–51.
- Matsuoka M. 1987. Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in the red sea bream. Bull. Seikai Fish. Res. Lab. 65: 1–114.
- Means AL, Gudas LJ. 1995. The roles of retinoids in vertebrate development. Annu. Rev. Biochem. 64: 201–233.
- Ogata HY, Oku H. 2001. The effects of dietary retinoic acid on body lipid deposition in juvenile red sea bream (*Pagrus major*); a preliminary study. Aquaculture 193: 271–279.
- Ørnsrud R, Graff IE, Høie S, Totland GK, Hemre GI. 2002. Hypervitaminosis A in the first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquacult. Nutr. 8: 7–13.
- Ørnsrud R, Wargelius A, Sæle Ø, Pittman K, Waagbø R. 2004. Influence of egg vitamin A status and egg incubation temperature on subsequent development of the early vertebral column in Atlantic salmon fry. J. Fish Biol. 64: 399–417.
- Rønnestad I, Hemre GI, Finn RN, Lie Ø. 1998a. Alternate sources and dynamics of vitamin A and its incorporation into the eyes during the early endotrophic and exotrophic larval stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Comp. Biochem. Physiol. 119A: 787–793.
- Rønnestad I, Helland S, Lie Ø. 1998b. Feeding *Artemia* to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. Aquaculture 165: 159–164.
- Ross AC. 1993. Overview of retinoid metabolism. J. Nutr. 123: 346–350.
- Ross AC, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. 2000. Retinoids in embryonal development. Physiol. Rev. 80: 1021–1054.
- Steel RDG, Torrie JH. 1980. Principles and Procedures of Statistics, a Biometrical Approach. McGraw-Hill, New York, 633 pp.
- Takashima F. 1978. Vertebral malformation in hatchery-reared red sea bream *Chrysophrys major*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44: 435–443 (in Japanese with English abstract).
- Takeuchi T. 2001. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. Aquaculture 200: 203–222.
- Takeuchi T, Dedi J, Ebisawa C, Watanabe T, Seikai T, Hosoya K, Naakazoe JI. 1995. The effect of β -carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. Fish. Sci. 61: 141–148.
- Takeuchi T, Dedi J, Haga Y, Seikai T, Watanabe T. 1998. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 169: 155–165.
- Teshima S, Kanazawa A, Sakamoto M. 1982. Microparticulate diets for the larvae of aquatic animals. Mini Rev. Data File Fish. Res. Kagoshima Univ. 2: 67–87.
- Teshima S, Koshio S, Ishikawa M, Hernández HLH. 2004. Effects of protein and lipid sources on the growth and survival of red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* receiving micro-bound diets during larval and early juvenile stage. Aquacult. Nutr. 10: 279–287.
- Torrissen OJ. 1989. Biological activities of carotenoids in fishes. In: Takeda M, Watanabe T (eds.), The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Proc. Third International Symposium on Feeding and Nutrition of Fish in Toba, Japan, 28 August–1 September. Japan Translation Center, Tokyo, pp. 133–140.
- Torrissen OJ, Christiansen R. 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. J. Appl. Ichthyol. 11: 225–230.
- Zile MH. 2001. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. J. Nutr. 131: 705–708.

Recibido en febrero de 2005;
aceptado en octubre de 2005