

Short Note [Nota Corta]



**REPRODUCCIÓN Y CULTIVO LARVARIO DEL PEZ PAYASO
MARRÓN (*Premnas biaculeatus*) BAJO CONDICIONES
CONTROLADAS †**

**[REPRODUCTION AND LARVAL CULTURE OF THE BROWN
CLOWNFISH (*Premnas biaculeatus*) UNDER CONTROLLED
CONDITIONS]**

**Luz Estela Rodríguez-Ibarra, María Isabel Abdo-de la Parra*,
Gabriela Velasco-Blanco and Juan Manuel Martínez-Brown**

*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad
Mazatlán. Av. Sábalo Cerritos s/n. C.P. 82112. Mazatlán, Sinaloa,
México. Email: abdo@ciad.mx.*

**Corresponding author*

SUMMARY

Background: Interest in ornamental marine fish, especially species associated with coral reefs, is rapidly growing. Most of the fish traded come from the wild, and collection methods harm coral reefs and cause massive mortalities in non-target species. To make the activity sustainable, it is necessary to develop aquaculture biotechnologies to reduce the collection of wild organisms and lessen the pressure on their natural environment. **Objective:** To develop protocols for the reproduction and larval rearing of the maroon clownfish (*Premnas biaculeatus*) for the sustained production of juveniles in captivity. **Methodology:** Two pairs of *P. biaculeatus* were placed in two aquariums of a recirculating system with filtered seawater. The obtained eggs were incubated in 100 L tanks. The larvae were fed with rotifers *Brachionus rotundiformis*, *Artemia* sp. nauplii, and weaned onto a commercial diet. The larvae were measured at hatching and every four days until weaning. **Results:** The clownfish pairs began spawning 4-5 months after being placed in the recirculating system and continued spawning every 15-20 days. The eggs hatched 6-7 days after fertilization (DAF), and the hatched larvae measured 3.4 ± 0.06 mm in total length (TL). At 19 days after hatching (DAH), after completing weaning, they measured between 9.8 to 11.5 mm in TL; at 26 DAH, they measured between 10.8 to 13.1 mm. After one month, between 800 to 1,000 juveniles were obtained for commercialization. **Implications:** The reproduction and larval rearing protocols of the maroon clownfish *P. biaculeatus* described in this work can be used to obtain juveniles in captivity for commercialization; additionally, they can serve as a basis for developing other protocols for obtaining juveniles of other ornamental marine fish species for commercialization, contributing to the protection of their natural environment. **Conclusion:** The results obtained demonstrated the viability of maintaining *P. biaculeatus* breeders in captivity and achieving their natural reproduction, larval rearing, and mass production of juveniles throughout the year.

Key words: ornamental marine fish; *Premnas biaculeatus*; juvenile production.

RESUMEN

Antecedentes: El interés por los peces marinos de ornato, principalmente de las especies asociadas a los arrecifes de coral, está creciendo rápidamente. La mayoría de los peces comercializados provienen del medio natural y los métodos de colecta dañan a los arrecifes de coral y provocan mortalidades masivas en especies no objetivo. Para lograr que la actividad sea sustentable es necesario desarrollar las biotecnologías de cultivo para reducir la colecta de organismos silvestres y disminuir la presión ejercida en su medio natural. **Objetivo:** Desarrollar protocolos para la reproducción y cultivo larvario del pez payaso marrón (*Premnas biaculeatus*), para la producción sostenida de juveniles, en condiciones de cautiverio. **Metodología:** En dos acuarios de un sistema de recirculación con agua marina filtrada se colocaron dos parejas de *P. biaculeatus*. Los huevos obtenidos se incubaron en tanques de 100 L. Las larvas se alimentaron con rotíferos *Brachionus rotundiformis*, nauplios de *Artemia* spp. y se destetaron

† Submitted April 26, 2024 – Accepted August 27, 2024. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5602>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
ISSN: 1870-0462.

ORCID = Luz Estela Rodríguez-Ibarra: <http://orcid.org/0000-0001-8369-1000>; **María Isabel Abdo-de la Parra:** <http://orcid.org/0000-0003-2148-9661>; **Gabriela Velasco-Blanco:** <http://orcid.org/0000-0002-0288-8141>; **Juan Manuel Martínez-Brown:** <http://orcid.org/0000-0002-9647-7481>

con un alimento comercial. Las larvas se midieron al momento de la eclosión y cada cuatro días hasta el destete. **Resultados:** Las parejas de pez payaso empezaron a desovar a los 4-5 meses después de colocarlos en el sistema de recirculación y continuaron desovando cada 15-20 días. Los huevos eclosionaron 6-7 días después de la fertilización (DDF) y las larvas eclosionadas midieron 3.4 ± 0.06 mm de longitud total (LT). A los 19 días después de la eclosión (DDE), al completar el destete midieron entre 9.8 a 11.5 mm de LT, a los 26 DDE midieron entre 10.8 a 13.1 mm. Al mes se obtuvieron entre 800 a 1000 juveniles para su comercialización. **Implicaciones:** Los protocolos de reproducción y cultivo larvario del pez payaso marrón *P. biaculeatus* descritos en el presente trabajo pueden ser empleados para obtener juveniles en cautiverio para su comercialización; además, pueden servir como base para desarrollar otros protocolos para la obtención de juveniles de otras especies de peces marinos de ornato para su comercialización y coadyuvar a proteger su entorno natural. **Conclusión:** Los resultados obtenidos demostraron la viabilidad de mantener reproductores de *P. biaculeatus* en cautiverio y lograr su reproducción natural, cultivo larvario y producción masiva de juveniles a lo largo del año. **Palabras clave:** pez marino ornamental; *Premnas biaculeatus*; producción de juveniles.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la acuarofilia es uno de los pasatiempos más populares, y el interés por los peces de ornato, principalmente los asociados con el arrecife de coral, ha crecido rápidamente (Anzeer *et al.*, 2019). La acuarofilia es una industria multimillonaria (Biondo y Burki, 2019), se estima que cada año se comercializan alrededor de 46 millones de peces e invertebrados marinos de ornato (Palmtag, 2017) y en el 2020 se obtuvieron más 300 millones de dólares de su comercialización (Cañedo-Orihuela *et al.*, 2023). Desafortunadamente, entre el 96 y 99 % de los organismos comercializados provienen del medio natural, colectados principalmente en arrecifes coralinos del Caribe e Indo Pacífico (Anil *et al.*, 2022).

En algunas regiones, para coleccionar a los organismos se sigue utilizando el cianuro como sedante, que se ha demostrado que blanquea los corales, provoca mortalidad masiva de especies no objetivo, además de impactos sociales y económicos negativos en las comunidades costeras rurales (Palmtag, 2017; Carvalho *et al.*, 2022). Los métodos de manejo y venta provocan altas mortalidades en los organismos colectados; se ha reportado que el 73% de lo colectado, muere durante el transporte (Biondo y Burki, 2019). Para lograr que la actividad sea sustentable, es necesario desarrollar las biotecnologías de cultivo para reducir la colecta de organismos silvestres e implementar estrategias de gestión sobre la normatividad y el comercio de especies marinas de ornato (Lango-Reynoso *et al.*, 2012).

El cultivo comercial de peces marinos de ornato, podría incidir en el desarrollo socioeconómico de los países en desarrollo como lo es México; generando empleos y divisas, ya que se ha reportado que los organismos de cultivo, tienen mayor demanda y costo al de los peces silvestres (Job, 2011;

Calado, 2017; Morcom *et al.*, 2018), porque son menos susceptibles a enfermedades, están adaptados al cautiverio y por lo tanto presentan mayor supervivencia (Madhu *et al.*, 2012). Las especies de peces payaso son las que presentan mayor demanda; *Premnas biaculeatus* se encuentra entre las 15 especies más solicitadas (Rhyne *et al.*, 2012) y aunque ya se cuentan con algunas biotecnologías de producción de juveniles en cautiverio (Madhu *et al.*, 2012), la mayoría de los protocolos de cultivo no son públicos o no están estandarizados (Job, 2011; Anil *et al.*, 2022). Una de las principales claves para que el cultivo de peces marinos de ornato se expanda, es justamente, que los protocolos de cultivo estén disponibles. En este sentido, el grupo de investigación sobre el cultivo de peces marinos de ornato del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Mazatlán, se ha dedicado a desarrollar biotecnologías de cultivo de varias especies de pez payaso (Abdo-de la Parra *et al.*, 2013; Velasco-Blanco *et al.*, 2016).

El pez payaso marrón (*P. biaculeatus*) es el único pez payaso que no forma parte del género *Amphiprion* y cuenta con una sola especie (Allen, 1972). Los adultos son de color rojo marrón y presentan bandas amarillo dorado y los juveniles presentan bandas blancas. Los machos son más pequeños (6-7 cm) que las hembras (16 cm) (Fautin y Allen, 1992). Es un pez sedentario que habita en los arrecifes de coral en simbiosis con anémonas de las especies *Eutacmaea quadricolor* y *Heractis magnífica* a una profundidad de 1 a 15 m (Fautin y Allen, 1992; Hayashi *et al.*, 2022). Son hermafroditas secuenciales protándricos, y se pueden reproducir todo el año, dependiendo de la temperatura (Beldade *et al.*, 2022); son ovíparos, los huevos son demersales y se adhieren a un sustrato, con cuidado parental hasta la eclosión (Olivotto *et al.*, 2003; Olivotto y Geffroy, 2017). Esta especie es una de las más solicitadas por el contraste de su color rojo brillante y sus líneas amarillo-doradas (Madhu

et al., 2012; Cañedo-Orihuela et al., 2023). El presente trabajo describe los protocolos de reproducción y cultivo larvario para la producción masiva de juveniles de pez payaso marrón (*P. biaculeatus*), en condiciones de cautiverio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Manejo de reproductores

En el interior de un laboratorio climatizado de la Planta Piloto para la Producción de Peces Marinos del CIAD, se montó un sistema de recirculación con nueve acuarios de vidrio de 40 L cada uno. El sistema consta de filtros de cartucho de 10, 5 y 1 μm y una lámpara de luz ultravioleta. El agua de salida de cada pecera se concentra en un tanque sedimentador con conchas de ostión que opera como filtro biológico. Dos parejas de pez payaso marrón *P. biaculeatus* procedentes de una tienda de acuarios fueron mantenidos en cuarentena y aclimatados a las condiciones del laboratorio. Las dos parejas se separaron en dos acuarios del sistema.

En cada uno de los acuarios el sustrato de desove consistió en un tubo de PVC hidráulico de 7.6 de diámetro por 15 cm de longitud (Gopakumar et al., 2009). Los peces se alimentaron 5 o 6 veces al día (Olivotto y Geffroy, 2017), con alimento comercial MadMac-MS de Bio-Marine Inc, para estimular la maduración gonadal. Diariamente se tomaron parámetros ambientales, se observó el comportamiento de los peces y se revisaron los tubos de PVC para observar presencia de huevos. Los acuarios se limpiaron mediante sifoneo dos veces por semana, recuperando el nivel con agua de mar previamente filtrada. La temperatura del agua se mantuvo alrededor de 28 ± 0.3 °C y la salinidad a 35 ± 0.6 ppm (Madhu et al. 2013).

Incubación y eclosión de huevos

Los tubos de PVC con los huevos adheridos se mantuvieron en los acuarios con los reproductores hasta el quinto día después de la fertilización (DF) y posteriormente, se transfirieron a tanques cilíndricos de fibra de vidrio de 100 L con agua de mar previamente filtrada y desinfectada con radiación UV (Fig. 2b). La transferencia se realizó cuidando de exponer al mínimo el tubo durante el transporte a la luz brillante y al aire. Se proporcionó aireación leve cerca de los huevos para oxigenarlos y facilitar la eclosión de las larvas. Dentro de cada tanque de incubación se colocó un termostato para mantener la temperatura a

28 ± 0.3 °C. Los tanques fueron cubiertos con plástico negro para proporcionar completa oscuridad, ya que larvas eclosionan en oscuridad (Madhu et al., 2012).

Cultivo de alimento vivo

La metodología para el cultivo de alimento vivo se llevó a cabo según los protocolos ya establecidos en el CIAD (Velasco-Blanco et al., 2013). Las microalgas *Nannochloropsis oculata* se cultivan en el área de alimento vivo de la planta piloto para la producción de juveniles de peces marinos del CIAD-Mazatlán, por medio de inóculos sucesivos. La cepa se inocula en tubos de ensayo con medio F/2 (Guillard, 1975) esterilizado previamente en autoclave, agregando de 5 a 10 gotas de inóculo. A partir de los tubos de ensayo se escalona el cultivo a matraces de 250 mL, posteriormente a matraces de 2 L para pasar a garrafrones de plástico de 20 L, para finalizar en columnas transparentes de 80 L.

En otra área del laboratorio se mantiene una cepa del rotífero *B. rotundiformis*, a 25 ± 1 °C alimentados con la microalga *N. oculata* de 15 a 20×10^6 células mL^{-1} , a una densidad de 40 rotíferos mL^{-1} , en matraces de 1 L haciendo conteos y recambios cada tercer día. Al hacer los recambios, los rotíferos se tamizan por una malla de $35\mu\text{m}$ y los que pasan a través del tamiz se siembran en garrafrones de 20 L con microalgas; posteriormente se colocan en tanques de 1500 L con *N. oculata*, 10 a 15×10^6 células mL^{-1} . Para obtener los nauplios de *Artemia* sp., se descapsulan los quistes y se incuban según las indicaciones del proveedor.

Cultivo larvario

La metodología para el cultivo larvario del pez payaso *Amphiprion ocellaris* (Abdo-de la Parra et al., 2013; Velasco-Blanco et al., 2016). Las larvas se cultivaron en el mismo tanque donde se incubaron los huevos. A partir de la eclosión y hasta el noveno día después de la eclosión (DE) el cultivo se llevó a cabo sin flujo de agua, y cada tercer día se recambiaron aproximadamente 30 L de agua sifoneando el fondo de los tanques. El flujo continuo de agua inició a partir del décimo día DE. El agua de mar se bombeó a las instalaciones del CIAD desde playa las brujas, Mazatlán, Sinaloa y se pasó a través de filtros de arena y de cartuchos de 16 micrómetros de retención relativa. La aireación fue aumentando conforme el crecimiento de las larvas. La temperatura se mantuvo constante a 28 ± 0.5 °C, la salinidad a

35±0.6 ppm y el fotoperiodo fue de 12 horas luz-12 horas oscuridad (Tabla 1). Las larvas se cultivaron mediante la técnica de agua verde; 12 horas después de la eclosión (DE) hasta el día 9 DE se añadió a cada tanque 500,000 cel mL⁻¹ de *N. oculata* y 10 rotíferos mL⁻¹ *B. rotundiformis* previamente enriquecidos con microalgas hasta el día 6 DE; a partir del día 7 al 9 DE se disminuyó el número de rotíferos a 5 organismos mL⁻¹ y se añadió a los tanques nauplios de *Artemia* spp., iniciando con 3 nauplios mL⁻¹. El día DE 9 ya no se añadieron rotíferos y se aumentó la cantidad de nauplios de *Artemia* sp. a 6 mL⁻¹, el día 14 DE se disminuyó la cantidad de nauplios de *Artemia* sp. a 3 mL⁻¹ y se inició el destete con un alimento comercial para peces de arrecife TDO Chroma BOOST. El alimento vivo se otorgó dos veces al día, ajustando la dosis requerida. El día 19 DE se completó el destete de los juveniles otorgando el alimento a saciedad tres veces al día, y el tamaño de partícula se aumentó de acuerdo al crecimiento de los juveniles (Tabla 1).

Para evaluar el crecimiento, al momento de la eclosión y cada 4 días hasta el destete, se tomó una muestra de larvas, las cuales se anestesiaron con esencia de clavo para obtener la longitud total (LT) mediante un estereoscopio Olympus® SZ equipado con una reglilla y una cámara Olympus® SP-350 para fotografiar las larvas. Los juveniles destetados se cuentan y se transfieren a tanques de fibra de vidrio circulares colocados en el exterior, donde se preengordan hasta su comercialización.

RESULTADOS

Reproductores

Después de cuatro meses, una de las parejas inició con el comportamiento de cortejo (Fig. 1a); tal como limpieza del nido, cortejo y

desove (Fig. 1b). La segunda pareja se reprodujo un mes después. Las hembras depositaron los huevos en el tubo de PVC y el macho los fertilizó inmediatamente, a medida que la hembra desovaba. Generalmente los desoves ocurrieron en las primeras horas de la mañana con una duración aproximada entre 60 y 90 minutos. A partir de la primera puesta, ambas parejas continuaron con las puestas con una periodicidad promedio de 15 días, durante ocho meses consecutivos; tiempo tras el cual se optó por colocar un vidrio en medio de las peceras para separarlos y evitar se siguieran reproduciendo. Después de un periodo de cuatro meses, el vidrio se retiró de cada pecera con el fin de que los peces reiniciarán su reproducción. Ambas parejas de reproductores presentaron cuidados parentales, actividad realizada casi exclusivamente por el macho. En promedio, cada pareja puede desovar dos veces por mes y el número de huevos por puesta es variable.

Incubación y eclosión

Los huevos fertilizados presentaron una forma cilíndrica de color amarillo-naranja y se adhirieron al tubo de PVC por medio de la ligadura llamada *manubrium*. Los huevos midieron entre 2.9-3.0 mm de longitud y entre 1.1-1.4 mm de ancho (Fig. 2a). Los huevos cambiaron a un color más oscuro a medida que los embriones se fueron desarrollando. Antes de la eclosión los ojos se pigmentaron y se observaron de color plateado. Las larvas eclosionaron a los 6 o 7 días después de la fertilización (DDF). La eclosión ocurrió en la oscuridad. Las larvas a la eclosión midieron 3.4±0.6 mm de LT, su cuerpo fue transparente, presentando ojos pigmentados, un pequeño saco vitelino oscuro y la boca y poro anal abiertos (Fig. 3) y se observaron en la superficie del agua, sin mucho movimiento. A las 12 horas después de la eclosión (HDE) presentaron mayor actividad.

Tabla 1. Protocolo de manejo de la calidad de agua y alimentación en el cultivo larvario de *P. biaculeatus*.

Días después de la eclosión (DDE)	1-6	7-9	10-13	14-19	20-34	35
Flujo de agua (vol día ⁻¹)	-	-	0.2	0.5-1	1-3	3
Flujo de aire (L min ⁻¹)	0.5	0.5	0.5	1	2	2
Fotoperiodo (HL-HO)	12-12	12-12	12-12	12-12	12-12	12-12
<i>Nanochloropsis oculata</i> cel mL ⁻¹	500,000	500,000				
Rotíferos mL ⁻¹	10	5				
Nauplios de <i>Artemia</i> spp. mL ⁻¹		3	6	3		
Alimento balanceado (µm) a saciedad				580-840	840-1410	1700

HL: horas luz, HO: horas oscuridad



Figura 1. a) Pareja de reproductores de pez payaso marrón en cortejo, b) desove dentro de un tubo PVC. (Foto: Luz Estela Rodríguez-Ibarra).

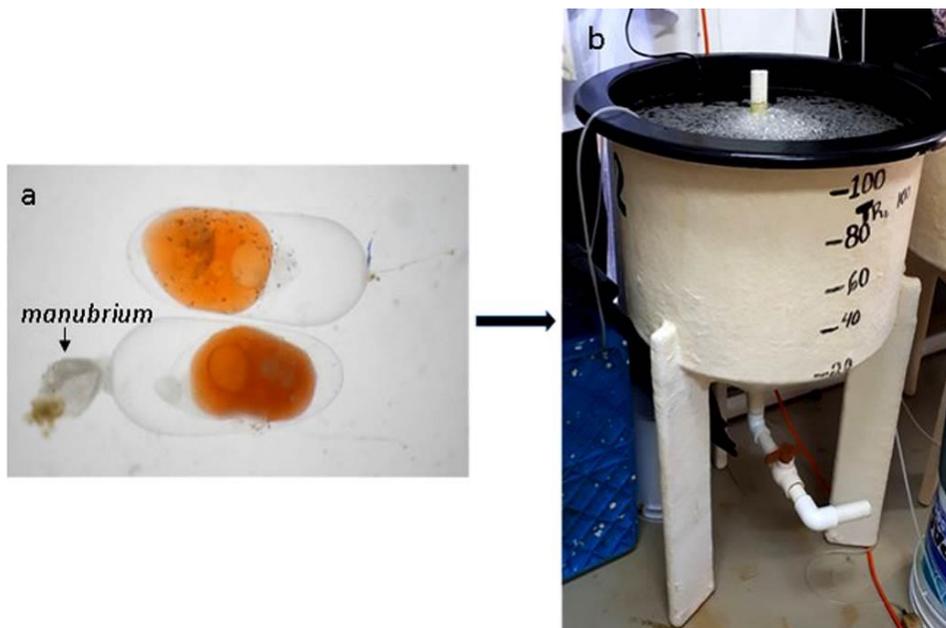


Figura 2. a) Huevos fertilizados de pez payaso marrón (*P. biaculeatus*) b) tanques de incubación. (Foto: Luz Estela Rodríguez-Ibarra).



Figura 3. Larva recién eclosionada de pez payaso marrón (*P. biaculeatus*). (Foto: Luz Estela Rodríguez-Ibarra).

Larvas

El saco vitelino se reabsorbió entre las 12 y 14 HDE. A los 2 DDE, las larvas se observaron alimentándose activamente y midieron entre 3.6 a 3.8 mm de LT. A los 4 DDE, las larvas midieron 4.1 ± 0.3 mm. A los 6 DDE se empiezan a observar las líneas blancas características de la especie y miden alrededor de 5.0 mm de LT. A los 14 DDE, cuando inició el destete midieron entre 8.5 a 10.3 mm de LT

(Fig. 4) y aceptaron el alimento balanceado, el cual fue otorgado junto con la dosis ración de *Artemia* sp. A los 19 DDE, al completar el destete, midieron entre 9.8 a 11.5 mm de LT (Fig. 5). A los 26 DDE midieron entre 10.8 y 13.1 mm (Fig. 6) Se obtuvo el $85.0 \pm 7.3\%$ de supervivencia desde la primera alimentación hasta finalizar el destete. Mensualmente se pueden obtener alrededor de 800 a 1000 juveniles para su comercialización.



Figura 4. Larva de pez payaso marrón de 14 DDE al iniciar el destete. (Foto: Luz Estela Rodríguez-Ibarra).



Figura 5. Pez payaso marrón de 19 DDE. (Foto: Luz Estela Rodríguez-Ibarra).



Figura 6. Juvenil de pez payaso marrón 26 DDE. (Foto: Luz Estela Rodríguez Ibarra).

DISCUSIÓN

Reproductores

Los resultados del presente trabajo representan un avance para la producción de juveniles de *P. biaculeatus* en cautiverio. La maduración sexual en cautiverio de los peces marinos es un factor limitante en la producción de juveniles de calidad (Olivotto *et al.*, 2011; Cañedo-Orihuela *et al.*, 2023). En el presente estudio, al inicio las parejas de peces tuvieron el mismo tamaño, pero cuatro meses después y al comenzar los desoves las hembras mostraron un tamaño corporal mayor que los machos. Moorhead y Zeng (2010) mencionan que el tamaño de los reproductores influye en la interacción social y el comportamiento reproductivo. Los peces payaso son hermafroditas protándricas, monógamos y viven en parejas o grupos organizados con dominación estructurada por el tamaño corporal. Al principio de la fase reproductiva los organismos maduran como machos y posteriormente el pez dominante se transforma en hembra. Por lo tanto, la hembra es más grande que el macho (Gopakumar *et al.*, 2009; 2011; Madhu *et al.*, 2012; Casas *et al.*, 2023), lo cual, se debe considerar al seleccionar los reproductores de los peces payaso.

Olivotto y Geffroy (2017) mencionan que unas horas antes del desove, la pareja de pez payaso realiza intensas actividades de limpieza del nido o sustrato e inicia el cortejo. Se ha reportado que los desoves de *P. biaculeatus* ocurren siempre en la mañana (Madhu *et al.*, 2012; Anil *et al.*, 2022). En el presente estudio se observó el mismo comportamiento. Gopakumar *et al.* (2009) reportaron que los desoves del pez payaso marrón en cautiverio se presentan cada 15 a 20 días, tal y como se observó en el presente trabajo. En otras especies, como *A. ocellaris*, el desove ocurre entre 10 y 32 días, en *A. frenatus* entre 11 y 26 días y en *A. clarkii* entre 9 y 13 días (Anil *et al.*, 2022). La temperatura es un factor clave en la reproducción de los peces (Belade *et al.*, 2022; Cañedo-Orihuela *et al.*, 2023). En la naturaleza, los peces payaso desovan todo el año y se ha observado un aumento en la fecundidad durante el verano cuando las temperaturas son más altas, por lo que se sugiere mantener a los reproductores a 28-30 °C (Chen *et al.*, 2020).

En este trabajo, los huevos desovados se mantuvieron en las peceras junto con los reproductores y se movieron a los tanques de incubación un día antes de la eclosión. Anil *et al.* (2022) mencionan que los peces payaso presentan cuidados parentales de los embriones, actividad realizada en la mayoría de los casos

por los machos. Los machos abanicaban los huevos con las aletas pectorales y caudales con el fin de oxigenarlos y con la boca retiran los huevos muertos; por lo cual, se recomienda dejarlos desoves al cuidado de la pareja para un desarrollo embrionario adecuado y moverlos un poco antes de la eclosión (Olivotto y Geffroy, 2017). El cambio de color de los huevos durante el desarrollo embrionario observado en este estudio se debe a la presencia de melanóforos en el saco vitelino, principalmente de xantóforos en la parte ventral de troco y posterior al ojo (Madhu *et al.*, 2012; Salis *et al.*, 2023). En el presente trabajo el desarrollo embrionario de *P. biaculeatus* se completó a los 6 DDF, lo cual coincide con lo reportado por Gopakumar *et al.* (2009). El tamaño de los huevos y de las larvas recién eclosionadas en este trabajo fue similar a lo reportado en otros estudios (Madhu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2020; Cañedo-Orihuela *et al.*, 2023).

Otra de las fases críticas en el cultivo larvario de peces marinos es la transición de la alimentación endógena a exógena (Job, 2011). Los estadios tempranos presentan altas demanda de energía, que satisfacen alimentándose de zooplancton (Olivotto *et al.*, 2011). Para lograr el éxito en la larvicultura es necesario optimizar el tipo y la calidad de alimento vivo que se le ofrecerá a las larvas (Olivotto *et al.*, 2003; 2011). La mayoría de las larvas de peces marinos de ornato empiezan a alimentarse 1 DDE (Job, 2011), pues su boca y su tracto digestivo ya son funcionales (Olivotto *et al.*, 2011). En cautiverio es necesario optimizar el tipo y la calidad de alimento vivo que se le ofrece a las larvas; se les alimenta principalmente de rotíferos y *Artemia* spp. hasta que se destetan con un alimento comercial (Olivotto *et al.*, 2006; Job, 2011). El cultivo de larvas de peces payaso generalmente se lleva a cabo con la técnica de agua verde añadiendo microalgas, con la finalidad de mejorar el contraste, la visibilidad de las presas y la calidad de agua (Gopakumar *et al.*, 2009; Cañedo-Orihuela *et al.*, 2023). En el presente estudio se alimentó a las larvas con 10 rotíferos mL⁻¹ y hasta 6 nauplios de *Artemia* mL⁻¹. Madhu *et al.* (2012) recomiendan alimentar a las larvas de *P. biaculeatus* con 10 a 15 rotíferos mL⁻¹ y hasta 5 nauplios de *Artemia* mL⁻¹. Se ha demostrado la importancia de enriquecer el alimento vivo que se otorga a las larvas de peces marinos de ornato para mejorar su desarrollo y supervivencia (Olivotto *et al.*, 2006), por lo que en el presente trabajo se enriqueció a los rotíferos con *N. oculata* con el fin de aumentar su valor nutricional. El crecimiento de las larvas obtenido en este estudio es similar a los reportados en otros estudios para *P. biaculeatus*

(Gopakumar *et al.*, 2009; Madhu *et al.*, 2012; Anil *et al.*, 2022).

Aunque cada especie de la subfamilia Amphiprioninae tiene requerimientos reproductivos y ontogénicos distintos (Moorhead and Zeng, 2010), los métodos descritos en este trabajo pueden servir como base para la producción comercial de juveniles de otras especies de peces payaso y de algunas otras especies de la familia Pomacentridae. Actualmente, muchas de estas especies son capturadas en su hábitat natural para su comercialización en los principales mercados de peces marinos ornamentales del mundo (Anil *et al.*, 2022). El enfoque del presente trabajo promueve una producción acuícola sostenible y ambientalmente amigable, contribuyendo a la protección de las poblaciones silvestres de peces payaso y su entorno natural.

CONCLUSIONES

El protocolo descrito en este trabajo permite la reproducción controlada de *Premnas biaculeatus* a lo largo de todo el año. El escalamiento piloto comercial de este protocolo demuestra la factibilidad técnica para la producción masiva de juveniles, lo cual es necesario para satisfacer las demandas del mercado mexicano de peces payaso.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. J. Huerta por su asistencia técnica durante en el desarrollo de los protocolos de reproducción y cultivo larvario.

Funding. This study was financed by the ornamental marine fish Project led by Ms. C. Gabriela Velasco-Blanco

Conflict of interests. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Compliance with ethical standards. General procedure for animal welfare, which were carried out for the sampling of brown clownfish larvae and juveniles to determine the desired variables, based on the Mexican law on animal welfare (NOM-062-ZOO-1999, Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals) does not include aquatic organisms, however, the ethical standards described in the ARRIVE Guidelines: Animal Research Reporting In Vivo Experiments (PLOS Biology <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>) were followed. Before performing the biometrics of juveniles, they were anesthetized with clove oil and the dose was according to the larval stage or juvenile stage (Soto and

Burhanuddin, 1995
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01051-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01051-3)).

Data availability. Data are available with the corresponding author of this publication upon reasonable request.

Author contribution statement (CRediT).

L.E. Rodríguez-Ibarra: Investigation, Methodology, Data curation, Writing-review & editing. **M.I. Abdo-de la Parra:** Conceptualization, Investigation, Supervision, Methodology, Formal analysis, Writing-original draft, review & editing. **G. Velasco-Blanco:** Methodology, Funding acquisition, Writing-review, **J.M. Martínez-Brown:** Investigation, Methodology, Resources, Writing-review & editing.

REFERENCES

- Abdo-de la Parra, M.I., Velasco-Blanco, G., Rodríguez-Ibarra L. E. and García-Aguilar, N., 2013. Cultivo larvario del pez payaso (*Amphiprion ocellaris*) en la planta piloto del CIAD, unidad Mazatlán. *Industria Acuicola*, 7(4), pp. 12-13.
- Allen, G.R., 1972. *The anemonefishes. Their classification and biology*. Neptune city: T.F.H. Publications.
- Anil, M.K., Krishna, M.V.R., Gomathi, P., Surya, S., Gop, A.P., Santhosh, B., Siju, R., Anand, V., Krishnapriya, P.M., Shalini, O., Raju, B., Madhu, K. and Gopalakrishnan, A., 2022. Recent advances in marine ornamental breeding and seed production at Vizhinjam Regional Centre of CMFRI India. *Frontiers in Marine Science*, 9, p. 907568. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2022.907568>
- Anzeer, F., Aneesh, K., Abraham, M., Darsana, S., Santhosh, B., Anil, M., Gopalakrishnan, A., Udayakumar, A., Kingsly, H., Unnikrishnan, C. and Yoyak, G., 2019. Breeding, early development and larval rearing of cloudy damselfish, *Dascyllus carneus* Fischer, 1885. *Aquaculture*, 505, pp. 374-385. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.001>
- Beldade, R., Bernardi, G. and Millis S.C., 2022. Anemonefish behavior and reproduction. *In: V. Laudet and T.*

- Ravasi, eds. *Evolution, Development and Ecology of Anemonefishes*. Boca Raton: CRC Press. pp. 129-142. <https://doi.org/10.1201/9781003125365-16>
- Biondo, M.V. and Burki, R.P., 2019. Monitoring the trade in marine ornamental fishes through the European Trade Control and Expert System TRACES: Challenges and possibilities. *Marine Policy*, 108, p. 103620. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2019.103620>
- Calado, R., 2017. The need for cultured specimens. In: R. Calado, I. Olivotto, M. Planas Oliver and G.J. Holt, eds. *Marine Ornamental Species Aquaculture*, Chichester: John Wiley & Sons. Ltd. pp. 15-22. https://doi.org/10.1002/9781119169147_ch2
- Cañedo-Orihuela, H., González-Félix, M.L. and Pérez-Velázquez, M., 2023. Maturation, reproduction, and larval culture of pomacentrids for the ornamental fish trade: Successes and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 33, pp. 1155-1197. <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-023-09789-0>
- Carvalho, L.M., Mies, M., Inagaki, K.Y., Sanches, E.G., Souza, M.R., Longo, G.O. and Tomas, A.R.G., 2022. The marine ornamental market in Brazil (Southwestern Atlantic) frequently trades prohibited and endangered species, and threatens the ecosystem role of cleaning mutualism. *Marine Policy*, 146, p. 105305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpol.2022.105305>
- Casas, L., Parker, C.G., and Rhodes, J.S., 2022. Sex change from male to female active feminization of the brain, behavior, and gonads in anemonefish. In: V. Laudet and T. Ravasi, eds. *Evolution, Development and Ecology of Anemonefishes*. Boca Raton: CRC Press. pp. 117-125. <https://doi.org/10.1201/9781003125365-15>
- Chen, J.Y., Zeng, C.S., Jerry, D.R. and Cobcroft, J.M., 2020. Recent advances of marine ornamental fish larviculture: broodstock reproduction, live prey and feeding regimes, and comparison between demersal and pelagic spawners, *Reviews in Aquaculture*, 12(3), pp. 1518-1541. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12394>
- Fautin, D., G. and Allen, G.R., 1992. Field guide to anemone fishes and their host sea anemones. Western Australian Museum, Perth, www.keilukans.edu/ebooks/intro.html
Fecha de consulta: 23 de abril de 2024
- Guillard, R.L., 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: W. Smith and M.H. Chanley, eds. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Boston: Springer. pp. 29-70. http://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Gopakumar, G., Ignatius, B., Santhosi, I., Ramamoorthy, N., 2009. Controlled breeding and larval rearing techniques of marine ornamental fishes. *Asian Fisheries Science*, 22, pp. 797-804. <http://doi.org/10.33997/j.afs.2009.22.2.038>
- Gopakumar G., Maduh K., Maduh R., Anil M.K., Ignatius B., 2011. Marine ornamental fish culture package of practices. CMFRI 100, Kochi. Niseema Printers and Publisher.
- Hayashi, K., Tachihara, K., Reimer, J.D. and Laudet, V., 2022. Colour patterns influence symbiosis and competition in the anemonefish-host anemone symbiosis system, *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 289, p. 1576. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2022.1576>
- Job, S., 2011. Marine ornamental fish culture. In: K. R.K. Fotedar and B.F. Phillips, eds. *Recent Advances and New Species in Aquaculture*. Chichester: Blackwell Publishing Ltd. pp. 277-317. https://doi.org/10.1002/9781444341775_ch10
- Lango-Reynoso, F., Castañeda-Chávez, M., Zamora-Castro, J.E., Hernández-Zarate, G., Ramírez-Barragán, M.A. and Solís-Morán, E., 2012. Ornamental marine fishkeeping: a trade of challenges and opportunities. *Latin American Journal of Aquatic Research*,

- 40(1), pp. 12-21.
<http://dx.doi.org/10.3856/vol40-issue1-fulltext-2>
- Madhu, K., Madhu, R. and Retheesh, T., 2012. Broodstock development, breeding, embryonic development and larviculture of spine-cheek anemonefish, *Premnas biaculeatus* (Bloch, 1790). *Indian Journal of Fisheries*, 59(1), pp. 65-75.
<http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJF/article/download/16440/7955>
- Moorhead, J.A. and Zeng, C.S., 2010. Development of captive breeding techniques for marine ornamental Fish: A Review. *Reviews in Fisheries Science*, 18(4), pp. 315-343.
<http://dx.doi.org/10.1080/10641262.2010.516035>
- Morcom, S.M., Yang, D., Pomeroy, R.S. and Anderson, P.A., 2018. Marine ornamental aquaculture in the Northeast US: The state of the industry. *Aquaculture Economics & Management*, 22(1), pp. 49-71.
<http://dx.doi.org/10.1080/13657305.2016.1206994>
- Olivotto, I., Cardinali, M., Barbaresi, L., Maradonna, F. and Carnevali, O., 2003. Coral reef fish breeding: the secrets of each species. *Aquaculture*, 224(1-4), pp. 69-78.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00207-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00207-2)
- Olivotto, I. and Geffroy, B., 2017. Clownfish. In: R. Calado, I. Olivotto, M. Planas Oliver and G.J. Holt, eds. *Marine Ornamental Species Aquaculture*. pp. 177-199.
<http://doi.org/10.1002/9781119169147.ch12>
- Olivotto, I., Planas, M., Simoes, N., Holt, G.J., Avella, M.A. and Calado, R., 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(2), pp. 135-166,
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00453.x>
- Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, M., Tosti, L. and Carnevali, O., 2006. Breeding and rearing the sunrise dottyback *Pseudochromis flavivertex*: the importance of live prey enrichment during larval development. *Aquaculture*, 255(1-4), pp. 480-487.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.007>
- Palmtag, M.R., 2017. The marine ornamental species trade. In: R. Calado, I. Olivotto, M. Planas Oliver and G.J. Holt, eds. *Marine Ornamental Species Aquaculture*, pp. 3-14.
<https://doi.org/10.1002/9781119169147.ch1>
- Rhyne, A.L., Tlusty, M.F., Schofield, P.J., Kaufman, L., Morris, J.A. and Bruckner, A.W., 2012. Revealing the appetite of the marine aquarium fish trade: The volume and biodiversity of fish imported into the United States. *Plos One*, 7(5), p. 35808.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035808>
- Salis, P., Klam, M. and Laudet, V., 2023. Color patterns In: V. Laudet and T. Ravasi, eds. *Evolution, Development and Ecology of Anemonefishes*. Boca Raton: CRC Press. pp. 65-73.
- Velasco Blanco, G., Abdo de la Parra, M.I., Rodríguez Ibarra, L.E., Ibarra Castro, L. and García Aguilar, N. 2013. Cultivo de alimento vivo para la producción de larvas de peces marinos en el CIAD Mazatlán. *Industria Acuicola*, 9, pp. 6-8.
- Velasco-Blanco, G., Abdo-de la Parra, M.I. and Rodríguez-Ibarra, L.E., 2016. Biotecnología para la producción de peces marinos de ornato en CIAD, Unidad Mazatlán. *Panorama Acuicola*, 22(1), pp. 30-32.