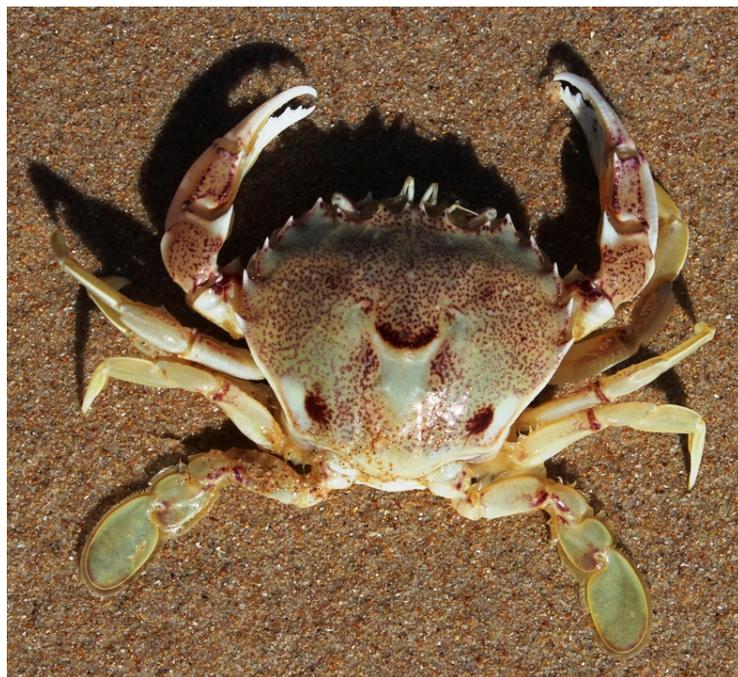




Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

Evaluación del desarrollo de las etapas tempranas del ciclo de vida del cangrejo nadador, *Ovalipes trimaculatus* (de Hann 1833) y su aplicación en acuicultura



Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Año 2018

Licenciada Antonela Martelli

Director del Doctorado: Dr. Pedro José Barón

Co-Director del Doctorado: Dr. Federico Tapella

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
PREFACIO	10
CAPÍTULO 1	12
INTRODUCCIÓN GENERAL	12
Pesquería y acuicultura de Crustáceos.....	13
Biología de crustáceos.....	14
<i>Ovalipes trimaculatus</i>	15
Objetivo general	22
CAPÍTULO 2	23
METODOLOGÍA GENERAL	23
Área de muestreo	23
Recolección de muestras.....	27
Parámetros de medición de la calidad de agua	29
Registro de datos morfométricos	29
Análisis estadísticos	31
CAPÍTULO 3	32
EMBRIONES	32
Introducción	32
Objetivos específicos	35

Hipótesis generales de trabajo	35
Materiales y Métodos	36
Recolección de muestras.....	36
Caracterización del desarrollo embrionario.....	36
Mediciones y cálculos realizados.....	38
Optimización del desarrollo embrionario	41
Resultados	45
Caracterización del desarrollo embrionario.....	46
Optimización del cultivo en la etapa de desarrollo embrionario	56
Discusión	70
CAPÍTULO 4.....	77
LARVAS.....	77
Introducción.....	77
Objetivos específicos	83
Hipótesis generales de trabajo	83
Materiales y Métodos	84
Recolección de hembras ovígeras.....	84
Condiciones de cultivo larval y cultivos accesorios.....	84
Medición de variables respuesta de las zoeas de <i>O. trimaculatus</i>	86
Diseño experimental	90
Experimento I: Suministro de <i>Artemia</i> enriquecida con diferentes cepas microalgales.....	91
Experimento II: Suministro de probióticos.....	97
Experimento III: Frecuencia de suministro alimentario.....	99
Experimento IV: Condiciones ambientales.....	102
Análisis estadístico.....	104
Resultados	106
Experimento I: Suministro de <i>Artemia</i> enriquecida con diferentes cepas microalgales.....	106
Experimento II: Suministro de probióticos.....	118
Experimento III: Frecuencia de suministro alimentario.....	121
Experimento IV: Condiciones ambientales.....	126

Discusión	130
CAPÍTULO 5	142
JUVENILES	142
Introducción.....	142
Objetivos específicos	145
Hipótesis generales de trabajo	145
Materiales y Métodos	146
Diseño experimental	149
Experimento I: Diferentes dietas	149
Experimento II: Condiciones ambientales	150
Resultados	154
Experimento I: Diferentes dietas	154
Experimento II: Condiciones ambientales	158
Discusión	166
CAPÍTULO 6	170
CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.....	170
Situación inicial	170
Situación actual.....	171
Proyecciones	173
BIBLIOGRAFÍA	176

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas CONICET, y mediante al mismo al CCT CONICET-CENPAT, por haberme otorgado una beca doctoral para dedicarme exclusivamente a mis tareas de investigación, tanto como un lugar de trabajo para desarrollarlas.

También, quiero agradecer a la Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, por haberme permitido estudiar de manera gratuita en la facultad a distancia.

Quiero agradecer a mis directores de Tesis: director Dr. Pedro J. Barón, y codirector Dr. Federico Tapella, quienes sin conocerme previamente, confiaron en mi para llevar adelante el tema de investigación de esta tesis. Agradezco la confianza y libertad que me brindaron para recorrer el camino de la ciencia sin limitaciones.

A mis profesores de cursos de posgrado: los cuales me han enseñado muchísimo, no solo con los contenidos académicos de sus cursos, sino también con las charlas en recreos o fuera de hora, las cuales han continuado algunas veces en mails y han sido clarificantes para mi.

A los jurados de la tesis: por haberla corregido con tanta dedicación, guiándome para valorizar la información obtenida de esta tesis. De ellos aprendí mucho.

A mis compañeros del Laboratorio de Oceanografía Biológica “LOBio”: que han sido consejeros, motivadores y hasta jueces sobretodo en el último año de esta tesis. En especial, agradecer a Ele y Rodri con los cuales compartimos oficina y me han bancado en las buenas y malas.

A mis compañeros de buceo: Al servicio de Náutica del Cenpat: Bebo, Néstor, Fabi y Facu. Gracias por enseñarme a encontrar a los cangrejos en el fondo del mar y por acompañarme a buscarlos, A Rodri, por las tantas veces que compartimos muestreos. Todos ellos hicieron que mis campañas de muestreo sean días acuáticos muy divertidos.

A mis amigos y amigas: A los que tenía y conservo y a los que gané gracias a este hermoso trabajo. También a los que perdí en el camino, porque, aunque la vida nos aleja, los tengo en el mejor lugar de mis recuerdos. Y en especial a mis amigos y amigas del Cenpat, que me han escuchado, aconsejado, y, mates de por medio, han sido críticos en discusiones estadísticas, científicas y hasta gramaticales! Todos me han ayudado mucho a lo largo de la tesis!! Se pasaron ☺.

A mi familia: a mis padres, a mis hermanos, a mis sobrinos y a Fer. A los cuales les agradezco por haberme acompañado y motivado desde que comencé a dar los primeros pasos en la Biología, hasta ahora en cada etapa de mi tesis doctoral.

A todos ellos dedico lo que hago, y agradezco en especial a mis padres por haberme enseñado con el ejemplo la dedicación y respeto por el trabajo, y por sobretodo la perseverancia y empeño, a seguir siempre a pesar de todo, mirando hacia adelante tanto cuando el camino fuera fácil, como cuando no lo sea tanto.

Y por último a Fer, mi bastón, que me acompañó en el día a día, con todas las variabilidades que tiene trabajar en ciencia, con mis viajes, con mis experimentos eternos, mis muestreos, siempre alentando y dandome el consejo justo.

¡A todos ellos, GRACIAS!!

**"Mira profundamente en la naturaleza
y entonces comprenderás todo mejor"**

Albert Einstein

Resumen

Esta tesis aporta nuevo conocimiento sobre la biología de las etapas tempranas del ciclo de vida del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus*, probando distintas condiciones de cultivo con el objetivo de optimizar el crecimiento y la supervivencia de hembras ovígeras, y estadios tempranos de larvas y juveniles. Se tomaron en cuenta aspectos alimentarios, como su calidad, frecuencia de suministro y uso de inóculos probióticos en la alimentación de larvas Zoea I y juveniles (C5, C6, C7), así como también condiciones ambientales de temperatura y salinidad que optimicen el desarrollo de embriones en hembras ovígeras, y estadios tempranos de larvas y juveniles. Dentro de los hallazgos más relevantes encontramos que el período de incubación embrionaria duró entre 19 y 48 días, dependiendo del tratamiento termo-halino aplicado. En términos generales, dicho período se redujo significativamente en la medida que incrementaba la temperatura o descendía la salinidad, siendo la condición óptima por encima de los 18 °C y a 30 ‰ de salinidad. Este patrón también se encontró evaluando la duración del ciclo de muda de larvas Zoeas I y en juveniles de instars 5 a 7. En estos últimos se observó también un incremento en el tamaño obtenido, en términos de masa y talla, generando mayor biomasa neta producida. Respecto de la alimentación de larvas, una dieta basada en mix de cepas microalgales conjuntamente con su inoculación mediante el uso de nauplius de *Artemia* de 24 h de vida como *carrier*, y el uso de cepas probióticas provenientes del género *Bacillus sp*, propiciaron las mejores condiciones para el crecimiento y desarrollo de las zoeas I de *O. trimaculatus*, así como también una mayor supervivencia. Del mismo modo, la alimentación a base de diferentes especies marinas regionales (i. e. invertebrados y vertebrados), favoreció el crecimiento y desarrollo de juveniles del cangrejo nadador. Los resultados obtenidos aportan conocimiento biológico de la especie y serán de utilidad como punto de partida para diagramar las

condiciones para su acuicultura, ya sea destinada a la producción de carne o para repoblamiento de este recurso pesquero de alto valor comercial.

Palabras claves: cangrejo nadador, embriones, larvas, juveniles, acuicultura, recurso pesquero

Abstract

This thesis provides new knowledge about the biology of the early life cycle of the swimming crab *Ovalipes trimaculatus*, testing different culture conditions to improve growth and survival of ovigerous females and early stages of larvae and juveniles. Food aspects were considered, such as its quality, rate of supply and the use of probiotic inoculum to feed Zoea I and juvenile (C5, C6, C7). Moreover, different temperature and salinity conditions were tested to optimize the development of embryos in ovigerous females until hatching, and early stages of larvae and juveniles. Most relevant results we found were that the period of embryo incubation period lasted between 19 and 48 days and depending on the thermo-haline treatment applied. In general, that period was significantly reduced as the temperature was higher and the salinity was lower; being the optimal condition above 18 °C and 30 ‰ of salinity. This pattern was also found testing the duration of the molting cycle in Zoeas I larvae and instars C5 to C7 of juveniles. In juveniles there was also an increase in size, in terms of weight and size, producing higher net biomass. Regarding the feeding of larvae, a diet based on a microalgae mix and this with its inoculation by using *Artemia* nauplius of 24 h enriched, and the use of probiotic inocula from the genus *Bacillus* sp in the water of culture, provided the best conditions for the growth and development of Zoeas I of *O. trimaculatus*, as well as greater survival. In the same way, feeding based on different origins of meat (e.g. invertebrates and vertebrates) of regional species, favored the growth and development of juvenile swimming crab. The results obtained provide biological knowledge of the species and will be useful as a

starting point to diagram the conditions for its aquaculture, either for the production of meat or for repopulation of this highly commercial fishing resource.

Key words: Swimming crab, embryo, larvae, juvenile, aquaculture, fishery resource

Prefacio

Esta tesis se organiza en secciones que abordan el cultivo de diferentes etapas tempranas del ciclo de vida de *Ovalipes trimaculatus*, en las cuales se contrasta la hipótesis biológica que implica que los diferentes estadios tempranos del ciclo de vida de la especie se desarrollarán y crecerán de modo óptimo bajo un conjunto definido de condiciones ambientales y de alimentación. El primer capítulo contiene una introducción general donde se plantea la problemática actual de la acuicultura y los recursos pesqueros a nivel mundial, nacional y regional; describe el objeto de estudio y su hábitat, y establece los objetivos generales y específicos propuestos y las hipótesis de trabajo planteadas. El segundo capítulo incluye una presentación de la metodología general. Los tres capítulos siguientes incluyen secciones de introducción, metodología, resultados y discusión específicas. El tercer capítulo aborda el estudio del desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* y la evaluación de tratamientos experimentales que permiten optimizar la producción durante dicha etapa del ciclo de vida. El cuarto capítulo se enfoca sobre la optimización experimental de la dieta y las condiciones ambientales para la producción de Zoea I. El quinto capítulo aborda el desarrollo de técnicas de cultivo que permitan optimizar el crecimiento de los cangrejos en las etapas tempranas de juvenil (C5-C6-C7). Por último, el sexto capítulo plantea una discusión general y conclusiones para el desarrollo integral del cultivo de la especie. Se espera de esta forma contribuir a la generación de información científica de base, que aporte no solo conocimiento sobre la especie, sino que también brinde a largo plazo herramientas

e incentivos para la acuicultura regional, empleando la especie como modelo para la producción comercial o con fines de repoblamiento.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL



El subphylum Crustacea, con alrededor de 67.000 especies conocidas, es uno de los grupos zoológicos con mayor éxito biológico, tanto por el número de especies vivientes como por la diversidad de hábitat que colonizan (Boschi 1997, Lange y Schram 1999, Lefébure *et al.* 2006). Entre los crustáceos, se reconocen numerosos recursos pesqueros con un elevado valor comercial en Argentina y otras regiones del mundo (Boschi 1997, Orensanz y Jamieson 1998, Smith y Addison 2003, Tully *et al.* 2003, Bondad Reantaso *et al.* 2012), con capturas anuales que superan los 6 millones de toneladas, lo cual representa más del 28,6% del total de las capturas pesqueras (FAO 2016).

En Argentina los decápodos capturados a nivel comercial son los anomuros *Lithodes santolla* (centolla) y *Paralomis granulosa* (centollón), los peneidos: *Pleoticus muelleri* (langostino) y *Artemesia longinaris* (camarón) y el braquiuro: *Ovalipes trimaculatus* (cangrejo nadador) (http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/pesca_maritima/desembarques/). En particular, la industria pesquera de la región patagónica se ha desarrollado de manera creciente con la captura y el procesamiento de un conjunto tradicional de peces y mariscos desde principios del siglo XX. Especialmente en los últimos años, y como consecuencia de la disminución de los recursos tradicionales, ha surgido interés por recursos con posibilidades de mercado aún no aprovechadas, como por ejemplo las almejas *Panopea* y Navaja (Lasta *et al.* 1998, Barón *et al.* 2004), el alga invasora *Undaria pinnatifida* (Casas y Piriz 1996) y en la última década el cangrejo nadador (Wyngaard *et al.* 2001, Leal *et al.* 2008, Dima *et al.* 2009). Este último es capturado por embarcaciones de pesca de pequeña escala mediante buceo autónomo o bien resulta parte del *by catch* de las pesquerías

tradicionales que operan en Argentina sobre el langostino, el camarón y peces de fondo pescados con redes de arrastre en zonas de sustrato blando arenoso (Boschi 1997, Orenzanz *et al.* 2005). No existe ninguna reglamentación vigente para la extracción de este recurso natural, por lo que sus desembarques dependen del esfuerzo pesquero y de las variaciones de mercado. Es decir, no hay medidas preventivas para preservar el potencial reproductivo de sus poblaciones.

Pesquería y acuicultura de Crustáceos

Los cangrejos braquiuros tienen un alto valor comercial y son explotados a nivel industrial en muchas regiones del mundo. Entre éstos, los pertenecientes a la familia Portunidae se destacan por ser altamente valorados para la pesca y la acuicultura debido a su potencial de exportación y a su alto valor nutricional (Josileen 2011). Dado que las capturas pesqueras mundiales superan las expectativas cada año, con valores en el orden de varios millones de toneladas (FAO 2016), la pesca de cangrejos en particular ha generado una sobreexplotación de algunas especies en muchas áreas del mundo, en especial en Asia (FAO 2001) en los géneros *Scylla* y *Portunus*, cuya demanda insatisfecha está siendo suplida mediante la generación de inversión en investigación sobre técnicas de mejoramiento para repoblar las zonas sobreexplotadas y para mejorar la producción a través de la acuicultura (Heasman y Fielder 1983, Allan y Fielder 2004, Davis *et al.* 2004, Lindner 2005, entre otros). Mientras que China, Indonesia y Estados Unidos reportan las capturas más altas en todo el mundo (FAO 2016), India, Micronesia, Filipinas y Vietnam son pilares de la industria de la acuicultura de cangrejos, donde los criaderos han logrado un gran desarrollo y crecimiento (Catacutan *et al.* 2003, Lindner 2005). Esta actividad puede tener como objetivo a largo plazo cultivar organismos de interés comercial para luego liberarlos y repoblar el ambiente natural, como es el caso de *Callinectes sapidus* (Davis *et al.* 2004, Zmora *et al.* 2005), o fines de producción comercial, como es el caso de *Scylla serrata* en el Sur de Asia y Australia (Allan y Fielder 2004), varias especies

del género *Scylla* en Filipinas e India (Catacutan *et al.* 2003, Quintio 2009) y *S. paramamosain* en Vietnam (Lindner 2005), donde el control de los parámetros físicos, sistema de circulación y alimentación condicionan la producción de carne.

La acuicultura de crustáceos involucra a 62 especies a nivel mundial, con una producción registrada en crecimiento constante y hasta exponencial desde 1985, que alcanzó 6,9 millones de toneladas en 2014, de las cuales 2,7 millones correspondieron a la acuicultura continental y 4,1 millones a la acuicultura marina costera. En total, la recaudación en concepto de ventas de productos acuícolas basados en crustáceos fue en 2014 de 36.200 millones de U\$S (FAO 2016). En 2014, la pesca y acuicultura de crustáceos a nivel mundial emplearon aproximadamente a 56,6 millones de personas (FAO 2016). Tras una larga tendencia ascendente, estos valores de empleados vinculados a la pesca se han mantenido relativamente estables desde 2010, mientras que la proporción de trabajadores vinculados a la acuicultura aumentó un 16% en las últimas tres décadas (FAO 2016). No sólo la industria de la acuicultura genera nuevas fuentes de trabajo, sino que también reemplaza la presión extractiva de la pesca sobre los recursos marinos.

Biología de crustáceos

Los cangrejos, como todos los crustáceos, crecen externamente de modo discontinuo, mediante mudas en las que la exocutícula rígida vieja es reemplazada por una nueva más delgada y blanda, momento en el cual se produce el crecimiento en dimensiones externas. El aumento de tamaño por muda y la frecuencia de muda varían según la edad, el sexo, la alimentación, la temperatura y la estructura poblacional, entre otras variables ambientales y poblacionales (Kobayashi 2012, Viswanathan *et al.* 2016). Durante este proceso los individuos en crecimiento compensan su nuevo volumen corporal con la incorporación de agua, mientras progresa el desarrollo muscular y la calcificación del nuevo exoesqueleto. Es por ello que el suministro de una dieta óptima y la manipulación de los parámetros ambientales en acuicultura resultan claves para reducir la

duración del proceso de muda y aumentar su crecimiento (Collins 2001, Leal *et al.* 2008).

Los braquiuros, también conocidos como cangrejos verdaderos, incluyen alrededor de 7000 especies descritas, habitando ambientes marinos, dulceacuícolas y terrestres (Ng *et al.* 2008, Ahyong *et al.* 2007, Tsang *et al.* 2014). Están caracterizados por la compresión corporal dorso-ventral y por el cuidado parental de los embriones hasta la eclosión, con la consecuente liberación de larvas planctónicas de tipo zoea, generalmente planctotróficas. La duración de la etapa larval oscila desde varias semanas hasta 2 meses, dependiendo de la especie y las condiciones ambientales (Anger 2001). Durante esta etapa se producen varios eventos de muda con subsecuente crecimiento hasta la metamorfosis al último estadio larval conocido como megalopa. La siguiente muda da lugar al primer juvenil, de hábitos bentónicos (Botsford 1991).

Debido a sus elevadas tasas de crecimiento, su adaptabilidad para el cultivo (e.g., resistencia a la manipulación, elevadas capacidades de carga en cautiverio) y su alta fecundidad, muchas especies de braquiuros, incluidos dentro de la familia Portunidae, han sido sujetos a la producción acuícola (FAO 2012). Dentro de esta familia, *Ovalipes trimaculatus* (de Haan 1833), es el único portúnido de porte comercial y mercado sostenido con distribución en aguas argentinas, lo cual lo convierte en la especie con potencial acuícola.

Ovalipes trimaculatus

La especie habita fondos arenosos y poco profundos, y posee hábitos bentónicos en su etapa adulta, encontrándose comúnmente enterrada en el sedimento arenoso, protegido del acecho de sus presas. Para divisarlo, es habitual encontrar el rastro que deja al enterrarse, o bien en juveniles suele observarse además el par de ojos pedunculados sobresaliendo del nivel superficial de sedimento.

Taxonómicamente, el cangrejo nadador es un crustáceo que se encuentra ubicado dentro de la Clase Malacostraca, Orden Decapoda y Familia Polybiidae (Rathbun 1898). Su distribución geográfica es amplia y discontinua. La misma abarca áreas del Océano Pacífico Sudeste, Atlántico Sudoeste, África del Sur y Océano Índico. En Sudamérica la especie se distribuye en latitudes medias (25° - 45°), que van desde San Pablo (Brasil) hasta el Golfo San Jorge en la costa atlántica, y desde Bahía Independencia (Perú) hasta Canal Trinidad en Chile en la costa pacífica. (Melo 1985, Spivak 1997, Vinuesa 2005) (Figura 1.1). Sus zoeas (8 estadios) han sido descritas para las poblaciones de Sudáfrica (Schoeman y Cockcroft 1996) y actualmente se está llevando a cabo la descripción de la megalopa para aguas de Argentina y Chile (Barón *et al.* en preparación). En la actualidad, se conoce el ciclo reproductivo, maduración sexual y fecundidad (Fenucci y Boschi 1975, Dellatorre 2009, Vallina *et al.* 2014), el potencial pesquero (Fenucci y Boschi 1975, Morsan 2000, Narvarte *et al.* 2007), la dinámica de las larvas zoea (Dellatorre 2009), la alimentación de adultos (Fenucci y Boschi 1975), los ciclos de muda (Álvarez *et al.* 2009) y los principales parámetros de calidad de su carne (Dima *et al.* 2014).

Su caparazón es más ancho que largo, no posee rugosidades muy acentuadas, y presenta dos depresiones centrales, con una mancha oscura en cada región metabranquial. Sus apéndices torácicos son grandes, principalmente sus quelas (pinzas) de igual tamaño (i.e. presentan isoquelia) y con palmas con crestas finas en el dactilopodito y propodito. Las pinzas son una de las partes comestibles más importantes y el cangrejo las usa para la alimentación, defensa, y el apareamiento (Rosemberg 2001). El dactilopodito del último par de patas es aplanado en forma de paleta que le permite la natación (Stephenson y Rees 1968, Fenucci y Boschi 1975) dando lugar al nombre vulgar “cangrejo nadador”. El cuerpo está formado por un cefalotórax muy desarrollado, sobre el cual se repliega el abdomen.

El cangrejo nadador presenta un marcado dimorfismo sexual (Figura 1.2), donde los machos alcanzan tallas máximas superiores a las hembras (Fenucci y Boschi 1975). Asimismo, las quelas de los machos son levemente más largas que las de hembras de igual talla y, al igual que la mayoría de las especies de cangrejo, el abdomen es más ancho y globoso en las hembras. Esta conformación permite

albergar a la masa ovígera en época reproductiva. Los juveniles sólo se diferencian por la forma del abdomen debido a que las demás características morfológicas son evidenciadas una vez lograda la maduración sexual (Vallina *et al.* 2014).

El apareamiento de los reproductores comienza en invierno, encontrándose en ésta época parejas en cópula (Figura 1.2A), ya sea enterradas o sobre el fondo marino (observaciones personales). El abrazo de cópula puede durar horas y hasta días debido a que el mismo es sincrónico con la muda de la hembra, por lo cual la especie se encuentra entre las que realizan la “cópula con el exoesqueleto blando” (i.e., *soft shell mating system*) como sucede con todas las especies pertenecientes a la familia Portunidae (Molina-Ocampo *et al.* 2006). Este proceso es prolongado debido a que primeramente el macho asiste a la hembra en la muda para luego copular, extendiendo el abrazo hasta que su nuevo caparazón comienza a calcificar. Posteriormente, en los meses primaverales, los ovocitos de la hembra descienden desde el ovario hacia los receptáculos seminales, donde son fecundados con el esperma almacenado de la cópula precedente, a través de delgados oviductos, y posteriormente desde los receptáculos seminales hacia los gonoporos, a través de la vagina, siendo finalmente liberados al medio externo. Una vez que se hallan fuera del tracto reproductivo, los embriones son retenidos en el exterior del cuerpo materno en una cámara incubatriz externa formada por el abdomen replegado sobre el esterno, adheridos mediante prolongaciones de la envoltura coriónica (i.e., funículos) a las setas de los pleópodos maternos.

Aunque el desarrollo embrionario inicia al momento de la fecundación en el interior de los receptáculos seminales, su evolución puede ser evaluada integralmente mediante la observación de los huevos embrionados adheridos a los pleópodos, generalmente durante el transcurso de los meses primaverales y de principios del verano, periodo en el cual es habitual encontrar hembras ovígeras en la naturaleza (Dellatorre 2009, Martelli *et al.* 2016). Durante este proceso embriogenético, la hembra pasa su mayor parte del tiempo enterrada más profundamente en el sedimento marino y su actividad se reduce al cuidado de su progenie. El desarrollo embrionario puede durar entre 19 y 56 días, según la temperatura del agua de mar

(ver capítulo 3) y si bien se registra un desove por ciclo reproductivo, se cree de manera teórica que podría existir un pulso de desove de menor intensidad al finalizar la temporada (Dellatorre 2009). Periódicamente, la hembra bate su abdomen rítmicamente, que junto con el movimiento de sus pereiópodos permiten oxigenar la masa ovígera y limpiarla de desechos y/o embriones muertos (Brante *et al.* 2004). Una vez concluido el desarrollo embrionario, la hembra bate enérgicamente su abdomen, lo que provoca el desprendimiento de los huevos y ruptura del corion o membrana externa para la eclosión de las larvas.

El desarrollo larvario de *O. trimaculatus* fue descrito por Schoemann y Cockcroft (1996) para la población sudafricana, reportándose 7 u 8 estadios de zoea con el consecuente estadio metamórfico a megalopa, siendo la duración del desarrollo larvario de 67 días a 17,5°C de temperatura. Durante toda la etapa larvaria el hábito de vida es planctónico, por lo que todos los Brachyura sufren una dispersión de la progenie asociada a su transporte por procesos hidrodinámicos (Dellatorre 2009, Dellatorre *et al.* 2014). De esta manera se pueden desacoplar espacialmente la fase planctónica de la bentónica (Franco *et al.* 2015). Como ocurre en otros crustáceos con desarrollo larvario planctónico, la dispersión de las larvas está sujeta a fuertes presiones ambientales que condicionan niveles de mortalidad ampliamente variables. Esto determina que las poblaciones de decápodos en general sean demográficamente abiertas, es decir que la fase larvaria dispersiva esté desacoplada espacialmente de los adultos, con lo cual la reproducción y el reclutamiento pueden darse a grandes distancias (Olive 1995, Caley *et al.* 1996, Gove y Paula 2000, Dellatorre 2009).

Al finalizar el invierno - principios de primavera, las Megalopas (i.e., último estadio larval) se asientan en el Golfo Nuevo sobre fondos blandos, y cambian el hábito de vida a bentónico, el que se conservará por el resto del ciclo de vida. Este estadio sufre una metamorfosis que culminará con el desarrollo del primer estadio o instar postlarvario del cangrejo, a partir del cual la alimentación pasa a ser carnívora generalista (Fenucci y Boschi 1975). Durante esta etapa de juvenil, *O. trimaculatus* crece con una frecuencia de mudas elevada (Vallina *et al.* 2014) tal como lo reportado para otros crustáceos. Una vez alcanzada la talla de madurez sexual, el

crecimiento se desacelera, con menores incrementos relativos de peso y talla (Vallina *et al.* 2014) y una mayor inversión energética en el desarrollo reproductivo. En la madurez, los caracteres sexuales secundarios alcanzan mayor grado de diferenciación, haciéndose notorio el dimorfismo sexual antes descrito (Figura 3B y 3C).

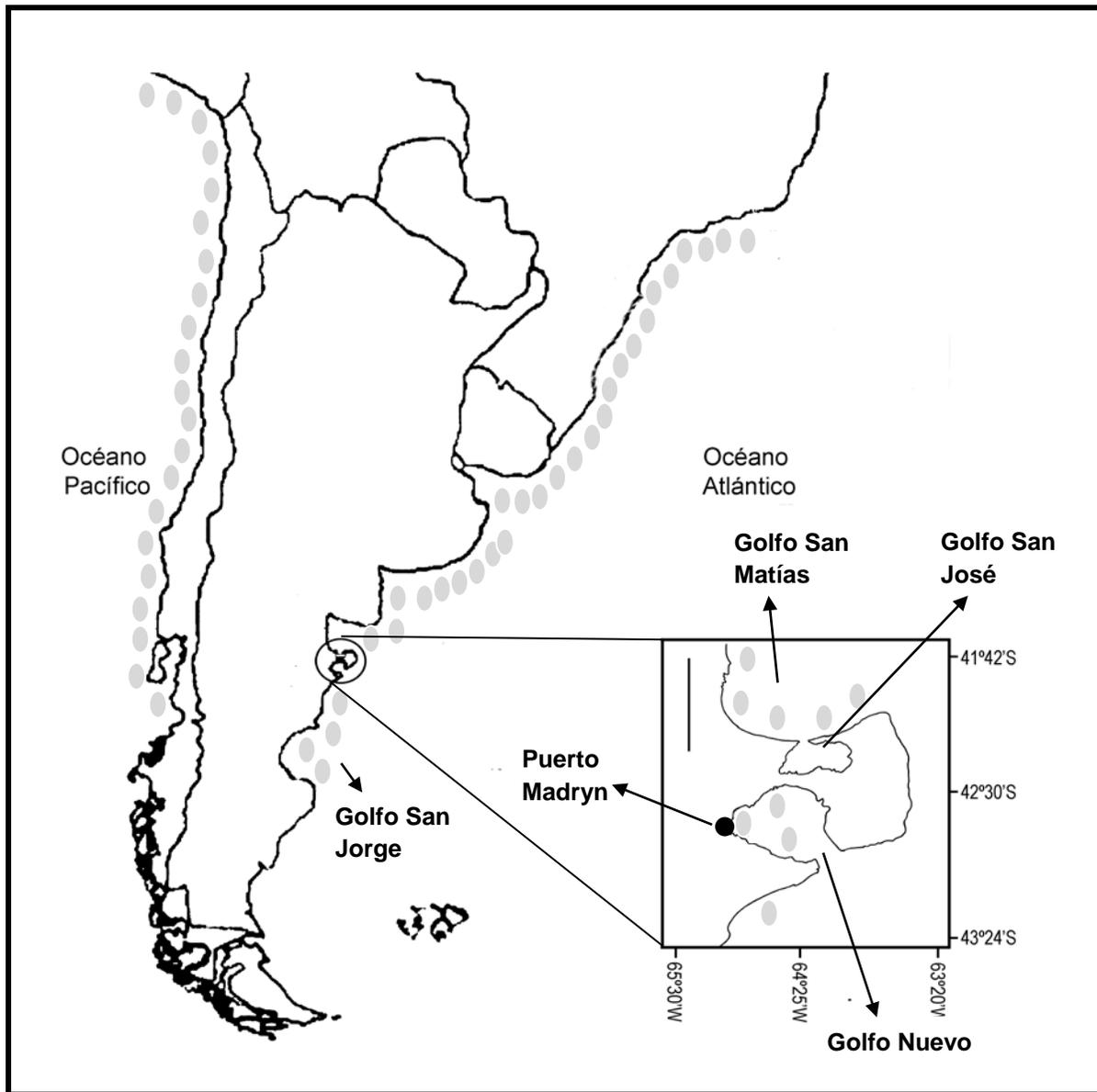


Figura 1.1. Distribución latitudinal del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus* en Sudamérica marcado con color gris. En el recuadro se puede ver el área de muestreo marcada con color negro.

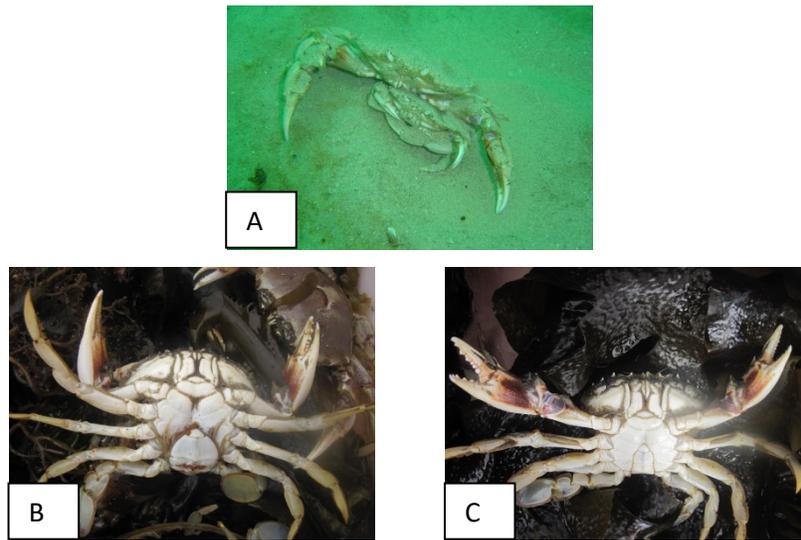


Figura 1.2. Dimorfismo sexual en *Ovalipes trimaculatus*. A: Pareja en cópula; B: Vista ventral de hembra; C: Vista ventral de macho.

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es estudiar experimentalmente el desarrollo y supervivencia de las etapas tempranas del ciclo de vida de *Ovalipes trimaculatus* en respuesta a variaciones en condiciones ambientales relevantes como la temperatura, la salinidad y el tipo de alimento para su futura aplicación en acuicultura.

Capítulo 2

METODOLOGÍA GENERAL

Área de muestreo

Los cangrejos empleados para los estudios experimentales de la presente investigación fueron colectados en el golfo Nuevo, situado en el margen oriental de la región norpatagónica (42°56´S, 64°22´O) (Figura 1.1). Sus aguas tienen una baja dinámica y son caracterizadas por corrientes débiles (Lanfredi 1974) cuyos principales forzantes son la marea y el viento (Krepper y Rivas 1979). La salinidad de aproximadamente 34 ‰ es relativamente constante (Figura 2.1) y la temperatura superficial del agua varía a lo largo del año entre 9 °C y 19 °C (Rivas y Ripa 1989) (Figura 2.2, 2.3). La porción noroccidental está incluida en el Área Natural Protegida de Península Valdés, la cual es preservada desde 1972 con la Ley Provincial n° 999 y desde 1999 declarada Patrimonio Natural Mundial por la UNESCO. Sus fondos presentan facies dominantes de roca calcárea, fango y arena, constituyendo la última el hábitat del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus* en las etapas bentónicas del ciclo de vida.

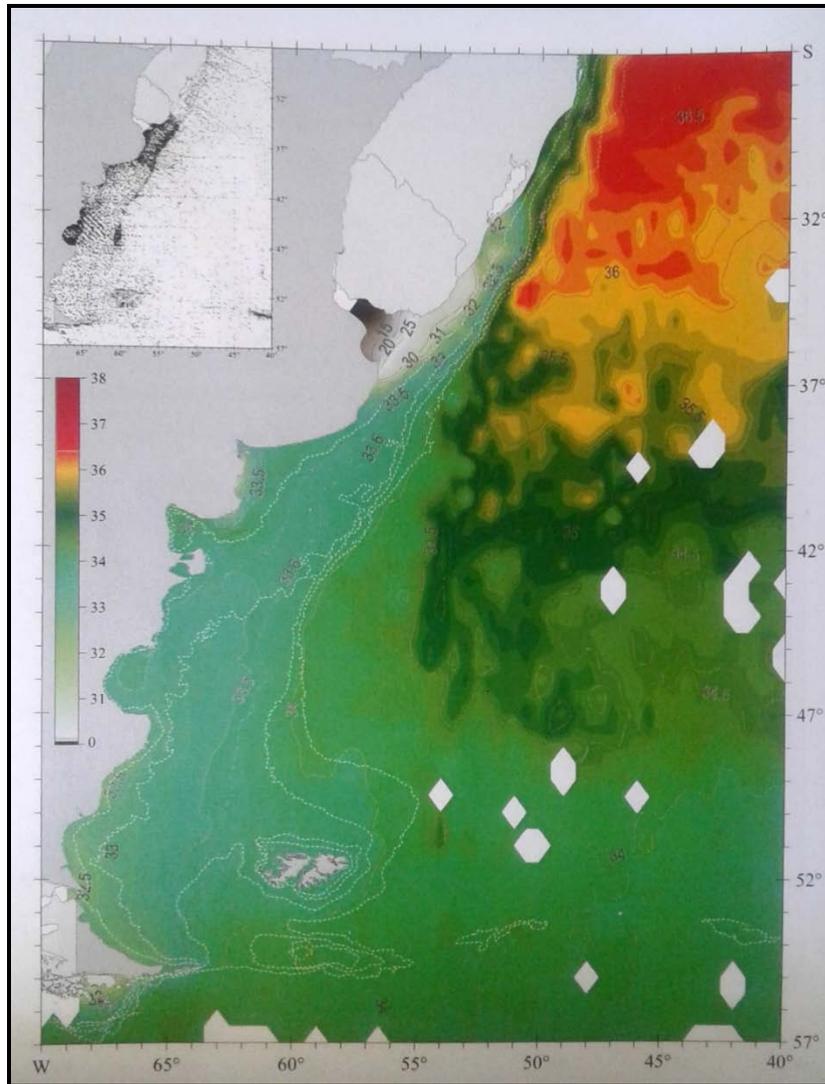


Figura 2.1. Distribución horizontal de la salinidad a 10 m de profundidad. En línea punteada se representan las isobatas de 50, 100, 200 y 1000 m. Extraído de Bandoni *et al.* 2015.

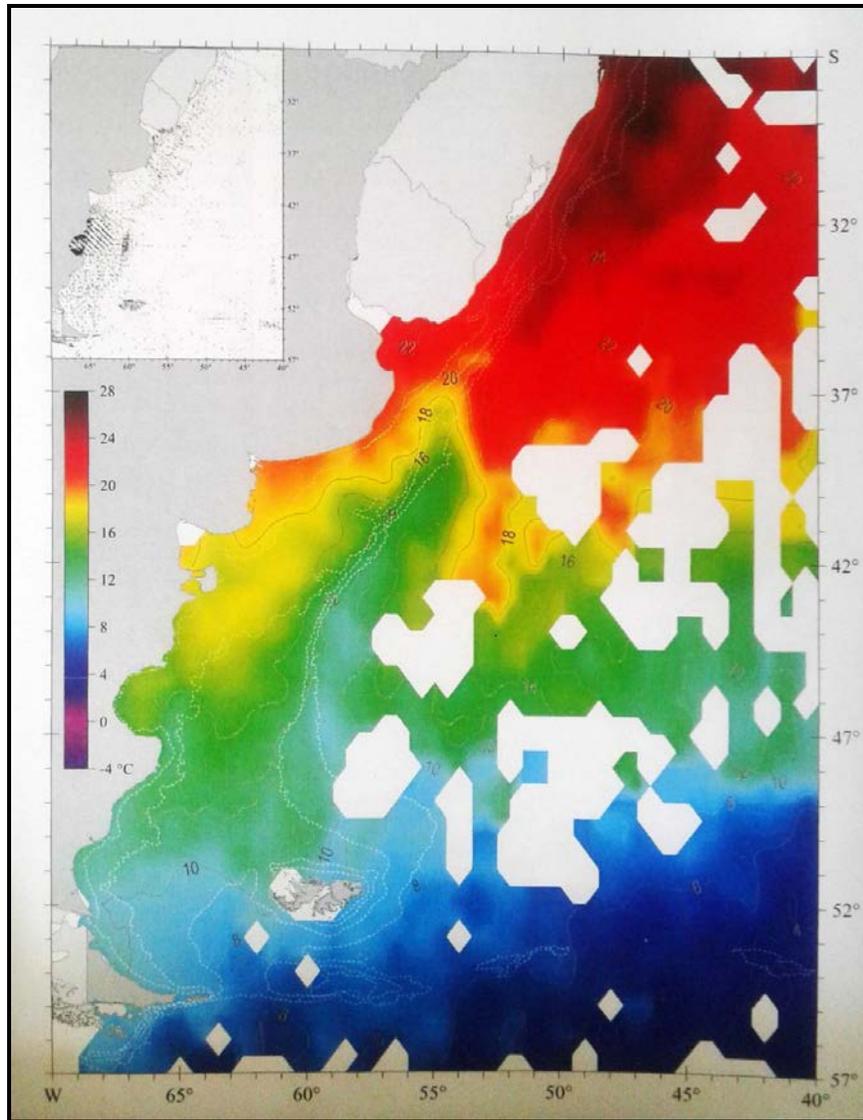


Figura 2.2. Distribución horizontal de la temperatura a 10 m de profundidad durante el período cálido (primavera-verano). En línea punteada se representan las isobatas de 50, 100, 200 y 1000 m. Extraído de Bandoni *et al.* 2015.

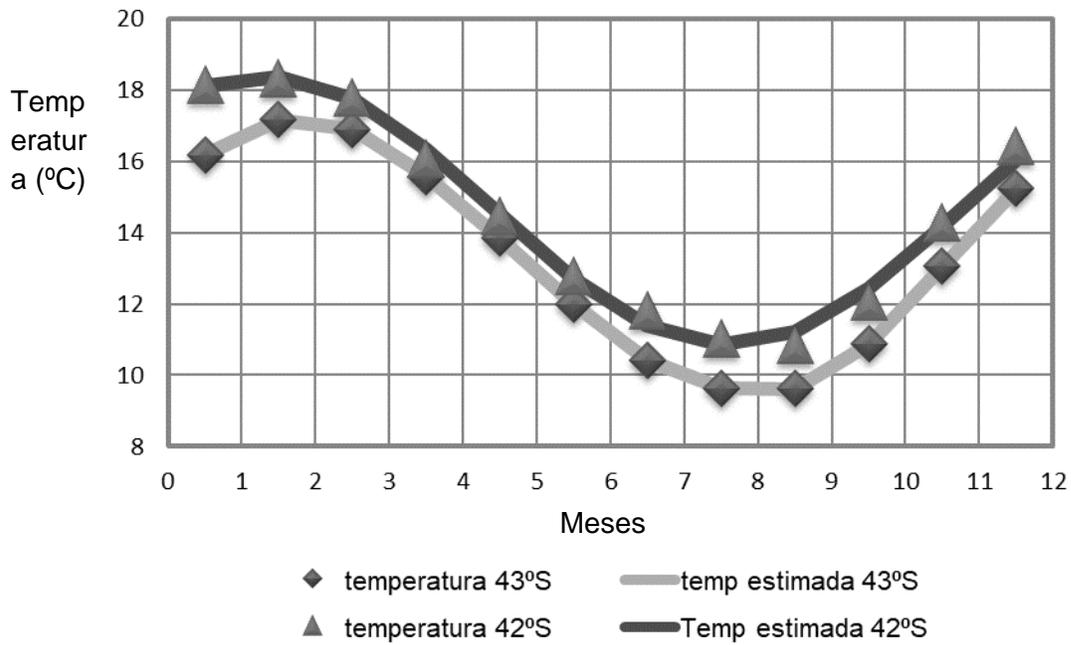


Figura 2.3. Medias mensuales de la temperatura superficial del agua de mar registradas en los 42° y 43° S sobre la costa atlántica patagónica. Las líneas de tendencia marcan la temperatura estimada. Los números del eje X corresponden a los meses del año, empezando por Enero. Datos NOAA/NASA AVHRR Pathfinder promediados para el periodo 1987-1998.

Recolección de muestras

Ejemplares de *O. trimaculatus* fueron obtenidos en el submareal somero de las playas cercanas a la ciudad de Puerto Madryn (Figura 1.1, 2.6A) entre 2013 y 2017. Las hembras ovígeras fueron recolectadas durante la primavera y comienzos de verano y los juveniles en otoño tomando en cuenta lo reportado por Barón *et al.* (2002) y Dellatorre (2009). Todos los ejemplares fueron capturados manualmente mediante buceo autónomo a una profundidad de 2-9 m, y colocados en salabardos de tamaño de malla variable, según su talla. Para extraer los cangrejos del sedimento evitando lesiones y potenciales daños al buzo debido a la agresividad de los individuos, se utilizó una herramienta sencilla consistente en un palo de madera corto (Figura 2.4C-E). Una vez terminada la recolección, los cangrejos fueron transportados al acuario de experimentación del CCT CONICET-CENPAT en recipientes térmicos con agua de mar a temperatura controlada (aproximadamente 14 °C) e inmersos en colchones algales para evitar el estrés térmico y agresiones entre individuos. (Figura 2.4D).

Los ejemplares capturados fueron acondicionados en el acuario experimental en recipientes de 60 L con fondo de arena y suministro de aire constante. Durante 48 h se mantuvo a los animales bajo condiciones ambientales similares a las del medio natural (temperatura: 12 °C, salinidad: 34 ‰, fotoperiodo: 12 : 12 h luz : oscuridad) en grupos de a 4 ejemplares, tanto hembras ovígeras como juveniles, reduciendo el estrés de la captura (Figura 2.4F). En cada recipiente se pusieron diversos elementos (i. e. cilindros de PVC de 110 mm de diámetro, recortes de malla) que actuaron como refugios de los individuos. Luego de 48 h de aclimatación, los ejemplares fueron reubicados en los acuarios de experimentación y sujetos a tratamientos particulares según los objetivos planteados. En todos los casos se realizó un control diario de los individuos, se alimentó y posteriormente se realizó un recambio de agua del 50%, con su posterior control de todos los parámetros de cultivo.



Figura 2.4. Secuencia de muestreo y establecimiento del acuario experimental. A) Vehículo institucional en área de muestreo; B) bote semirrígido; C) operación de buceo; D) cangrejos recolectados; E) arte de pesca: salabardo; F) cámara de cultivo en acuarios de experimentación.

Parámetros de medición de la calidad de agua

Con el fin de lograr óptimas condiciones de calidad del agua de cultivo se proporcionó aireación constante impulsada por soplador a través de difusores ubicados en todos los recipientes y se realizó un recambio diario del 50% del volumen de agua de mar. Las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato fueron controladas diariamente con una sonda multiparamétrica marca OAKTON 600 Series y mediante test de acuario marca Sera® mantenido en concentraciones de: $\text{NH}_4 < 0,5 \text{ mg/l}$; $\text{NO}_2 < 0,5 \text{ mg/l}$; $\text{NO}_3 < 10 \text{ mg/l}$.

Según el objetivo de cada experimento se alimentó a los individuos con diferente periodicidad (ver capítulos 3, 4 y 5). Para todos los casos, después de alimentar, se extrajeron los productos de desecho donde, las heces fueron eliminadas mediante la limpieza del fondo y la orina haciendo recambios de agua.

Registro de datos morfométricos

El ancho del caparazón (AC), medido entre las puntas de las quintas espinas anterolaterales izquierda y derecha fue registrado tanto en hembras ovígeras como en juveniles de *O. trimaculatus*. Asimismo, el ancho del abdomen (AA) fue registrado en hembras ovígeras, medido como máxima distancia entre los bordes laterales del cuarto artejo del pleon (Figura 2.5). Ambas variables fueron registradas mediante el uso de calibre digital de 0,01 mm. Para todos los ejemplares capturados (hembras ovígeras y juveniles) se registró el peso total una balanza de 0,001 gramos.

A



B



Figura 2.5. Dimensiones morfométricas registradas sobre *Ovalipes trimaculatus*. Con línea blanca se muestran, A) Ancho de caparazón (AC); B) Ancho de abdomen (AA).

Análisis estadísticos

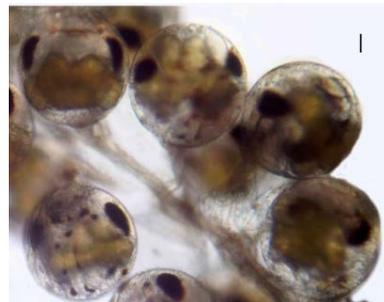
Los datos obtenidos en cada uno de los tratamientos experimentales fueron analizados con el programa InfoStat versión estudiantil (Di Rienzo *et al.* 2011). En los casos en que se aplicaron estadísticas paramétricas, se analizó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y el supuesto de homoscedasticidad mediante la prueba de Fisher. En casos en que estos no se cumplieron, se probaron diferentes tipos de transformación de los datos a fin de lograr su cumplimiento.

A fin de comparar los datos obtenidos en los diferentes tratamientos se llevaron a cabo análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías según el diseño experimental. Dependiendo de los resultados, los ANOVA fueron complementados con comparaciones *a posteriori* entre pares con pruebas de Tukey o Duncan. Cuando los supuestos de normalidad y homoscedasticidad no fueron cumplidos, se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis con su respectiva prueba *a posteriori* de Dunn (Sokal y Rohlf 1981). Para relacionar variables continuas se utilizó el test de correlación de Spearman (Zar 1984).

En todos los casos las variables categóricas fueron la salinidad, la temperatura o la dieta a tratar y las variables respuesta fueron los parámetros de crecimiento, supervivencia y condición de los distintos estadios del ciclo de vida de los cangrejos.

Capítulo 3

EMBRIONES



Introducción

En la mayoría de las especies el desarrollo embrionario es una de las fases del ciclo de vida más sensibles a los factores de estrés ambiental (MacDonald *et al.* 1988, Lee *et al.* 1996). El conocimiento de esta parte de la ontogenia no es sólo de interés científico, sino también un requisito para desarrollar prácticas de acuicultura (Davis *et al.* 2004, Zmora *et al.* 2005, Quintio 2009) y para pronosticar los patrones temporales de producción de larvas con fines de ordenamiento de la actividad pesquera (Cinti 2002, Stevens *et al.* 2008).

Los crustáceos muestran variabilidad en las etapas y duración de su desarrollo embrionario, producto de las adaptaciones evolutivas y de la modulación fisiológica ejercida por variables ambientales tales como la temperatura y salinidad (Scholtz y Dohle 1996, Dohle *et al.* 2004, Scholtz y Wolff 2013). Estas variables físicas pueden actuar acelerando o retardando el proceso y regulando el tamaño y supervivencia de la progenie (Anger 2001). La salinidad experimentada durante el desarrollo embrionario puede condicionar el tamaño de las primeras larvas, provocando adaptaciones locales de poblaciones distribuidas a diferentes latitudes (Bas *et al.* 2008) mientras que en conjunto con la temperatura pueden afectar la supervivencia. En cambio, la temperatura es un factor regulador de la velocidad del proceso de desarrollo embrionario (Hamasaki 2003). La evaluación experimental de sus efectos sobre las fases tempranas del desarrollo de los organismos marinos ha sido aplicada en modelos predictivos del éxito de reclutamiento larvario (Barón 2002, Cinti 2002, Crespi-Abril y Barón 2012). Aún así, dado que las condiciones ambientales no actúan en todos los niveles de la ontogenia en forma independiente, sino que suelen provocar un efecto de arrastre

(e.g., entre el desarrollo embrionario y la etapa larvaria), las mismas pueden resultar en patrones complejos de supervivencia y desarrollo (Bas *et al.* 2008).

La caracterización del desarrollo embrionario es un prerequisite para comprender el efecto de las variables ambientales sobre dicho proceso. A los fines de la producción acuícola, no sólo es relevante conocer los valores de parámetros ambientales que optimicen la supervivencia durante el desarrollo embrionario sino también la calidad bioquímica de la progenie resultante (Li *et al.* 2012). Aunque la embriogénesis en los cangrejos es un proceso continuo, la partición en etapas o estadios de desarrollo, definida por los cambios morfológicos más relevantes, es una herramienta útil para su caracterización (Moriyasu y Lanteigne 1998). Estos incluyen tanto cambios en forma como en tamaño (Hines 1982), pudiendo ser esféricos o elípticos, o bien intercambiando ambas variantes desde una a otra a lo largo del desarrollo embrionario (García-Guerrero y Hendrickx 2004). En estudios realizados sobre portúnidos, la esfericidad de los huevos se mantiene a través del desarrollo, excepto para algunas especies donde se observa una ligera elipticidad al inicio de la formación ocular (Samuel y Soundarapandían 2009, Ates *et al.* 2012).

Respecto del tamaño de los huevos, en algunos portúnidos se observó una correlación positiva con el tamaño de la hembra ovígera progenitora, pero esto no es una regla general (Haddon 1994, Samuel y Soundarapandían 2009, Ravi y Manisseri 2013). Por otro lado, el incremento del tamaño del huevo es un proceso ontogenético intrínseco que ocurre gradualmente a través de la embriogénesis y culmina a un ritmo más rápido al final del desarrollo (Churchill 2003, Josileen 2011).

Aunque existe información detallada sobre algunos aspectos del ciclo de vida de *O. trimaculatus* (Fenucci y Boschi 1975, Dellatorre *et al.* 2014, Vallina *et al.* 2014), todavía existe una brecha de conocimiento en la fase de desarrollo temprano en general y de la embriogénesis en particular. El objetivo de este capítulo es caracterizar el desarrollo embrionario de *O. trimaculatus*, así como también determinar experimentalmente los efectos de distintas combinaciones térmicas y

salinas en la supervivencia y duración de la embriogénesis. En este sentido, el estudio prevé encontrar la combinación de variables que aumenten la velocidad de desarrollo, incrementando también la supervivencia y tamaño. Se espera que los resultados sean útiles no sólo para complementar la información disponible sobre su ciclo de vida, lo que permitirá comparar los rasgos de la historia de vida con otras especies relacionadas, sino que también proporcionen conocimientos relevantes para el diseño de prácticas de acuicultura.

Objetivos específicos

- Conocer la duración y la cronología del desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* en una condición ambiental de referencia.
- Determinar experimentalmente los efectos combinados de las condiciones de salinidad y temperatura sobre el desarrollo embrionario de *O. trimaculatus*, considerando su duración y supervivencia.

Hipótesis generales de trabajo

- La supervivencia y el desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* es óptima en una combinación de condiciones de térmicas y salinas dentro del rango de su distribución espacial.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras

Durante la temporada reproductiva de 2014 se recolectaron 112 hembras ovígeras de *O. trimaculatus* mediante buceo autónomo en fondos de arena submareales del Golfo Nuevo y en playas cercanas a la ciudad de Puerto Madryn. Las hembras fueron transportadas al Acuario Experimental del Centro Nacional Patagónico (CCT CONICET-CENPAT) donde se seleccionaron aquellas con su masa ovígera en la primera etapa de desarrollo (es decir, mórula en la primera o segunda división celular). Todas las hembras fueron marcadas con bandas de goma coloreadas para su identificación, las cuales fueron colocadas alrededor del cefalotórax entre los quelípedos y el primer par de pereiópodos, de manera tal que no puedan ser removidas. Se tomaron las medidas corporales: ancho de caparazón (AC) = 82,27: 99,2-63,1mm (media: máx-mín) y ancho abdominal (AA) = 25,02: 36,29-17,2 mm (media: máx-mín). Posteriormente, las hembras fueron ubicadas en grupos de a cuatro, en acuarios con agua de mar filtrada y aireación continua, para su aclimatación durante 48 h.

Caracterización del desarrollo embrionario

Los cambios ontogenéticos que sufre el embrión a lo largo de su desarrollo fueron estudiados en hembras que estuvieron bajo una condición fija de temperatura y salinidad. Así, los embriones fueron incubados a 13 ± 1 °C (media \pm sd) que se corresponde con la temperatura del agua de mar al momento de la recolección de las hembras ovígeras y a la temperatura promedio del agua de mar durante la estación reproductiva (Dellatorre 2009). La salinidad se mantuvo a 33 ± 1 ‰ (media \pm sd), cercana a los valores típicos de las aguas del Golfo Nuevo (Rivas y Ripa 1989), mientras que el fotoperíodo fue fijado a 14 : 10 h luz : oscuridad, emulando el ciclo de luz natural en el momento de la experimentación.

Las hembras progenitoras se distribuyeron al azar en tres grupos. En cada uno de estos se tomaron muestras de embriones de cada hembra con diferentes frecuencias: 1) tres veces por semana (n = 10 hembras); 2) semanalmente (n = 10 hembras); y 3) una única vez, luego de la puesta (descenso de los huevos embrionados) (control; n = 6 hembras). Este último grupo se utilizó para determinar la duración total del desarrollo embrionario sin causar estrés en condiciones de laboratorio. Este experimento piloto permitió evaluar la frecuencia óptima de muestreo que reflejará los cambios morfológicos característicos del proceso de embriogénesis permitiendo su clasificación en estadios. La duración en días para cada estadio de desarrollo y la duración total de la embriogénesis fue registrada para todas las hembras ovígeras.

Teniendo en cuenta que las diferencias en la tasa de suministro de oxígeno a los embriones podrían tener efectos sobre la supervivencia y sobre la duración de la embriogénesis (Fernández y Brante 2003), tres muestras de aproximadamente 10 de huevos cada una fueron cuidadosamente tomadas en cada muestreo en tres diferentes posiciones de la masa ovígera: 1) del interior de la masa ovígera (i.e., cerca de las bases de los pleópodos), 2) del exterior de la masa ovígera (i.e., de la superficie de la masa ovígera) y 3) de un nivel intermedio entre la posición 1 y 2. Los huevos fueron manipulados usando un fórceps o pinza quirúrgica fina y colocados en un portaobjetos excavado con agua de mar y examinados *in vivo* bajo un microscopio Olympus con una ampliación de 100x. A partir de cambios morfológicos como el contenido de vitelo (%), desarrollo de apéndices, cromatóforos y pigmentación ocular, así como también cambios fisiológicos como los movimientos y latidos cardíacos, se definieron cinco etapas para caracterizar el desarrollo embrionario. Para medir la frecuencia cardíaca de los embriones en fase avanzada de desarrollo, se contó el número de batidos del corazón en 10 embriones durante un minuto y luego se promediaron.

Las características morfológicas representativas de cada una de las etapas de desarrollo se fotografiaron utilizando una cámara digital Nikon D3000.

Mediciones y cálculos realizados

Dado que las observaciones preliminares mostraron una contracción y una deformación significativas de los huevos conservados en soluciones de fijación, todas las mediciones se hicieron sobre muestras frescas. Para las mediciones se utilizaron cincuenta huevos de cada etapa de desarrollo, tomando en cuenta la clasificación macroscópica del desarrollo embrionario utilizada por Dellatorre (2009). Los huevos fueron extraídos de diferentes hembras de cada uno de los tratamientos (descritos en la sección a continuación) y separados con pinzas bajo estereomicroscopio de disección (Olympus CH30) con una ampliación total de 100X para poder ser fotografiados individualmente con una cámara digital Nikon D3000. A partir de las imágenes resultantes se obtuvieron medidas de los tres ejes ortogonales de los huevos utilizando el programa de procesamiento y análisis de imágenes ImageJ. Exceptuando la etapa de desarrollo más temprana, de mórula a gástrula, estos correspondieron a los ejes del cuerpo de los embriones: Diámetro I (DI; eje antero-posterior); Diámetro II (DII, eje ventro-dorsal) y Diámetro III (DIII, eje latero-lateral). Además, en el último estadio de desarrollo se midió el Distancia interocular externa (Doe) como indicador de medida de crecimiento embrionario (Figura 3.1). Sobre la base de estas dimensiones se calcularon otras variables morfométricas del huevo, incluyendo el volumen (V), la elipticidad (e) y la elongación (E) según lo definido por Stevens (2006):

$$V = 1/6\pi D^3$$

donde D es el diámetro medio del huevo;

$$e = \frac{DI}{DII}$$

$$E = \frac{(DI - DII)}{(DI + DII)}$$

Asimismo, con el fin de generar una variable que indique el crecimiento embrionario se relativizó la variable Doe respecto del Diámetro laero-lateral (DIII) con el objetivo de evaluar la relación entre ambas longitudes; generando así una nueva variable de crecimiento embrionario: Diámetro ocular relativo (Dor)

$$Dor = \frac{Doe}{DIII}$$

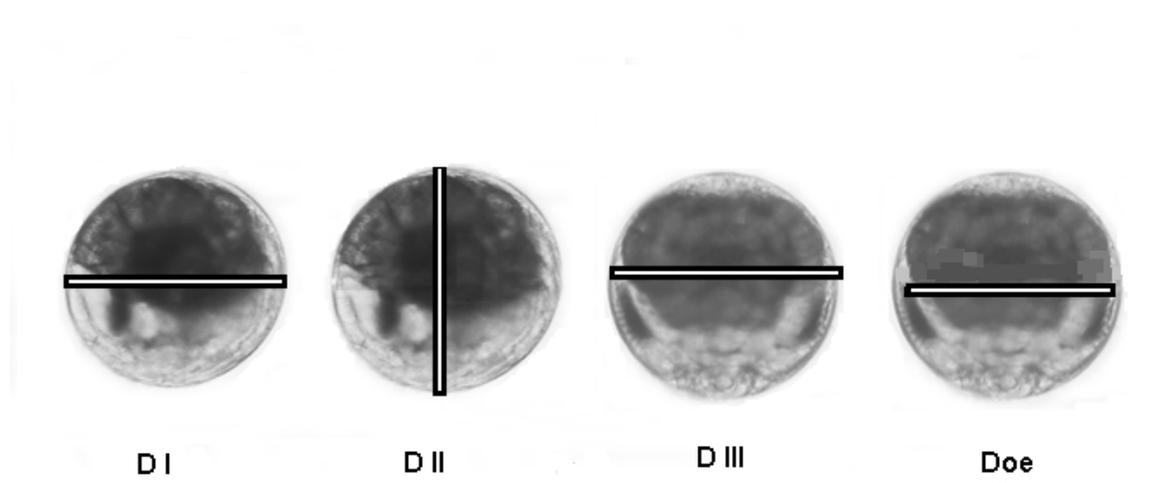


Figura 3.1. Diámetro I (DI: eje antero-posterior); Diámetro II (DII: eje ventro-dorsal) y Diámetro III (DIII: eje latero-lateral) correspondientes a los tres ejes de medición tomados en huevos embrionados y Doe (Distancia interocular externa) para los embriones de *Ovalipes trimaculatus*.

El color estándar de los embriones vivos se determinó siguiendo la Guía de Fórmulas de Color Pantone® (Pantone Inc., Carldtadt, Estados Unidos) con la actualización del año 2014 y se registró como "P" seguido por el número que representa el código de dicha escala.

Puesto que se ha reportado que *O. trimaculatus* sufre una pérdida sustancial de huevos durante el desarrollo embrionario y considerando que en muchas especies de crustáceos la limpieza de los huevos resulta en el desprendimiento no selectivo de embriones de la masa de huevos (Brante *et al.* 2004), la estimación de la

mortalidad embrionaria se estimó basado en la suposición de que los embriones permanecen unidos a la masa del huevo durante períodos breves después de muertos, por lo tanto se definió la variable "mortalidad embrionaria instantánea" al final de la etapa "i" (M_i) como:

$$M_i = 100X \frac{D_i}{T},$$

donde " D_i " es el número de embriones muertos en una muestra de la masa de huevo tomada al final de la etapa "i" y T es el número total de huevos en la misma muestra, incluyendo embriones vivos y muertos. Los embriones se consideraron muertos cuando el vitelo mostró un color o textura diferente a los de sus vecinos. Del mismo modo, la mortalidad instantánea desde el final de la última etapa del desarrollo embrionario hasta el final de la eclosión (M_e) se estimó como:

$$M_e = 100X \frac{M_i}{T},$$

donde " M_i " es el número de embriones muertos encontrados en las muestras de la masa de huevo y T es el número total de huevos, incluyendo las cápsulas vacías que permanecen unidas a los pleópodos después de la eclosión.

Optimización del desarrollo embrionario

Con el objetivo de hallar experimentalmente la condición termohalina optimizada, la cual será evaluada mediante la aceleración del proceso de embriogénesis, junto con una alta supervivencia tanto de los embriones como de las madres progenitoras, se realizaron pruebas de desarrollo embrionario en dos bloques:

- Experimento I: Efectos conjuntos de temperatura y salinidad sobre el desarrollo embrionario
- Experimento II: Efectos de la salinidad sobre el desarrollo embrionario

Debido a limitaciones de espacio en la cámara termocontrolada de experimentación, no fue posible realizar un único experimento matricial que combine todo el rango térmico y salino propuesto, razón por la cual se decidió particionar los tratamientos de cultivo en dos bloques de experimentación como se describió.

El primero consistió en una matriz factorial con ocho tratamientos térmicos y dos salinos (Tabla 3.1). Los valores de salinidad empleados en el bloque 1 de experimentos correspondieron a los valores de salinidad medidos en el agua de mar a 10m de profundidad, dentro del rango latitudinal de la distribución geográfica de la especie para Sudamérica (Figura 2.1) (Baldoni *et al.* 2015).

El rango de temperatura seleccionada corresponde a valores térmicos del agua de mar a 10 m de profundidad, dentro del rango latitudinal de la distribución geográfica de la especie para Sudamérica (Figura 2.2) (Baldoni *et al.* 2015), que incluye desde el sur de la costa de Brasil hasta el golfo San Jorge en la costa argentina (Melo 1985, Vinuesa 2005). Además, se tomaron 2 valores por fuera de los extremos (6 y 24 °C).

Tabla 3.1. Diseño del Experimento I de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* bajo combinaciones de dos regímenes salinos y ocho térmicos. Los números dentro de la tabla indican la cantidad de réplicas (i.e., hembras ovígeras) utilizadas en cada tratamiento termohalino.

		Temperatura (°C)							
		6.5	9.0	12	13	15	18	22	24
Salinidad (‰)	30	7	8	7	7	7	8	6	6
	33	7	8	7	9	7	7	6	6

El segundo bloque de experimentos fue establecido para evaluar específicamente el efecto del estrés salino sobre el desarrollo embrionario, e incluyó la combinación de una condición térmica y cuatro condiciones salinas, ampliando el rango de las empleadas en el primer bloque (Tabla 2).

Tabla 3.2: Diseño del Experimento II de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* bajo combinaciones de cuatro regímenes salinos y uno térmico. Los números dentro de la tabla indican la cantidad de réplicas (i.e., hembras ovígeras) utilizadas en cada tratamiento termohalino.

		Temperatura (°C)
		13
Salinidad (‰)	37	7
	33	9
	30	7
	26	7

En ambas matrices experimentales, los parámetros ambientales fueron modificados gradualmente (1 unidad por día) hasta lograr el valor establecido, evitando así choques térmicos o halinos que pudieran ocasionar la muerte tanto materna como de los embriones por causa de desbalance térmico o por causa de desequilibrios osmóticos irreversibles (Giménez y Anger 2001).

En ambos bloques de experimentos se registraron variables morfométricas, incluyendo el diámetro medio, área y volumen de los huevos embrionados, así como también la supervivencia embrionaria y materna.

Asimismo, se tomaron datos de la duración de cada estadio con una clasificación en 5 estadios de desarrollo embrionario, de acuerdo a lo propuesto por Dellatorre (2009). Esta escala permitió además distinguir los estadios macroscópicamente considerando la coloración de la masa embrionaria (Tabla 3), lo cual la convierte en una herramienta versátil de identificación del estado de desarrollo embrionario, que permite estimar el momento de eclosión y liberación larvaria. Así, esta escala resultaría de utilidad en potenciales establecimientos acuícolas. Todos estos parámetros fueron descritos con detalle en la sección precedente.

Se registró la duración en días de los estadios de desarrollo y la duración total de la embriogénesis para todas las hembras ovígeras. Además, la duración acumulada fue medida mediante el índice: TAE: Temperatura acumulada efectiva definida como la cantidad total de días multiplicado por la temperatura en la cual transcurrió el desarrollo embrionario.

Para todos los experimentos realizados, las hembras ovígeras fueron alimentadas *ad libitum* con carne de pescado (cantidad superior al 20% del peso corporal) una vez por semana, en tanto que el 20% del volumen de los tanques fue renovado diariamente con agua de mar con las mismas características físicas del tratamiento correspondiente

Para el análisis de las variables continuas se realizaron regresiones y correlaciones de Pearson y Spearman con el objetivo de identificar una relación entre el AA y AC materno y el diámetro de los huevos embrionados.

Previo el análisis con estadísticas paramétricas de las variables discretas, se comprobaron los supuestos de homocedacia (Prueba de Fisher) y normalidad (Prueba de Kolmogorof) (Zar 1984). Cuando los supuestos no pudieron ser comprobados, los datos fueron transformados con raíz cuadrada. Posteriormente, los datos obtenidos de la descripción del desarrollo embrionario fueron analizados mediante ANOVA de una vía donde la variable categórica fue el estadio de desarrollo. También se usó esta herramienta de análisis para la información recabada del experimento halino tomando la condición salina como variable de clasificación.

Cuando los datos no cumplieron los supuestos de homocedacia y normalidad, aun cuando fueron transformados, se aplicaron análisis no paramétricos de Kruskal Wallis.

Los datos obtenidos en el Experimento I (experimentación termohalina) fueron analizados mediante ANOVA de dos vías tomando a la salinidad y a la temperatura como variables categóricas. En cambio, los datos obtenidos en el Experimento II (experimentación con diferentes concentraciones de salinidad) fueron analizados con ANOVA de una vía tomando la salinidad como variable categórica.

Resultados

En todos los tratamientos experimentales realizados se logró completar el desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus*.

Las hembras ovígeras colectadas midieron $82,27 \pm 6,85$ mm (media \pm SD) de AC y $25,02 \pm 3,02$ mm (media \pm SD) de AA. Los resultados del análisis de correlación de Pearson mostraron que no existe relación entre AC de las hembras ovígeras y el diámetro de los huevos que incubaba, tanto luego del desove de los mismos ($\rho = 0,15$, $n = 26$ hembras ovígeras) como previo a la eclosión de larvas ($\rho = 0,44$, $n = 26$ hembras ovígeras). Por lo tanto, los datos morfométricos de los huevos de todas las hembras dentro de cada tratamiento fueron considerados como un único conjunto para todas las comparaciones entre las etapas embrionarias.

Caracterización del desarrollo embrionario

La frecuencia óptima de toma de muestras para detectar cambios relevantes durante la embriogénesis fue de tres veces a la semana, debido a que esta frecuencia permitió ver el inicio, progreso y finalización de cada estadio de desarrollo y caracterizarlo. Por el contrario, la frecuencia de toma de muestras de una vez por semana fue demasiado espaciada, no permitiendo la detección de todo el proceso de desarrollo, impidiendo ver los cambios de estadios especialmente en etapas avanzadas de la embriogénesis.

La duración media de la embriogénesis fue de $35,7 \pm 2,11$ días ($n = 24$) desde los primeros estadios de desarrollo (es decir, mórula de 2 ó 4 células) hasta la eclosión.

La posición relativa de los embriones en la masa de huevos (interna, media o externa) no afectó significativamente la duración del desarrollo embrionario (ANOVA, $p = 0,8727$).

Las observaciones realizadas en forma cuantitativa y cualitativa durante la experimentación permitieron establecer una escala con cinco estadios de desarrollo embrionario para *O. trimaculatus* a saber:

Estadio I

Luego de la fecundación los huevos son esféricos, de $309,76 \pm 7,13$ μm de diámetro medio y de intenso color naranja (P123 Escala de Color Pantone®) (Figura 3.2A1-A2). Dos membranas transparentes, interna y externa cubren el huevo (Figura 3.2A1), cuyo volumen está completamente ocupado por el vitelo. La cubierta externa del huevo es pegajosa y se proyecta en un funículo que conecta al huevo con las setas de los pleópodos de la hembra. Cuando el huevo no está fertilizado, ambas cubiertas no están en contacto (Figura 3.2A1). Después del inicio de la división celular (Figura 3.2A2), delicadas ranuras delimitan áreas

poligonales en la superficie del huevo y el cigoto centrolecítico se transforma progresivamente en mórula (Figura 3.2A3), blástula y posteriormente en gástrula. No se observan estructuras de órganos en esta etapa embrionaria y su duración promedio es de $9,65 \pm 1,01$ días, representando el $26,76 \pm 2,58\%$ del desarrollo total del embrión (Tabla 3.3).

Estadio II

Los huevos son esféricos, de $326,99 \pm 11,17$ μm de diámetro medio y de color naranja (P. 157 Escala de Color Pantone®) (Figura 3.2B1-B2). El primordio embrionario se hace evidente como una protuberancia translúcida en la superficie del huevo en el polo animal (Figura 3.2B1) que representa la región ventral del embrión en desarrollo. Los rudimentos de algunos apéndices embrionarios se hacen visibles a medida que un par largo de estructuras preorales emergen a lo largo del eje antero-posterior, siendo las anténulas las primeras en aparecer, seguido de un par de antenas más cortas (Figura 3.2B3). Ambos apéndices son unirramosos y alargados. La placa toracoabdominal posterior presenta una proyección corta y ancha con su extremidad distal bifurcada en los dos lóbulos del telson de formación (Figura 3.2B3). El contenido de vitelo representa aproximadamente el 90% del volumen de huevo. La duración de este estadio es de $8,10 \pm 0,94$ días, lo que representa el $22,36 \pm 2,76\%$ del desarrollo total del embrión (Tabla 3.3).

Estadio III

Los huevos son esféricos, de $331,98 \pm 18,38$ μm de diámetro medio y de color rojo oscuro (P. 484 Escala de Color Pantone®) (Figura 3.2C1-C2). La etapa comienza cuando se forman los tres primeros pares de apéndices (i.e., antena, anténulas y mandíbula) (Figura 3.2C3). Las estructuras en desarrollo representan aproximadamente el 40-50% del volumen del huevo, el resto es vitelo. La anténula y la antena son estructuras en forma de tubo sin setas, que crecen paralelas entre sí, mientras que las mandíbulas son más pequeñas (Figura 3.2C3). A medida que

esta etapa avanza, se forman somitos abdominales y rudimentos alargados del resto de los apéndices. En el extremo distal del abdomen, el telson es bifurcado, todavía sin setas. Posteriormente, se forman maxílulas, maxilas y primeros y segundos maxilípedios mientras que en la parte anterior del cefalotórax aparecen rudimentos de caparazón en forma de media luna. El telson tiene cuatro setas terminales cortas en cada lóbulo. La etapa dura $7,83 \pm 0,90$ días, lo que representa un $22,38 \pm 2,10\%$ del desarrollo total del embrión (Tabla 3.3).

Estadio IV

Los huevos son esféricos, de $367,56 \pm 16,69 \mu\text{m}$ de diámetro medio y de color marrón (P. 464 Escala de Color Pantone®). La pigmentación en los ojos es la característica que representa el inicio de este estadio. (Figura 3.2D1-D2). Las anténulas son unirramosas y más largas que las antenas, exhibiendo dos setas terminales largas. Las antenas son unirramosas y con dos setas terminales. La maxílula y maxila son unirramosas. Los lóbulos ópticos están bien desarrollados, mostrando un patrón de pigmentación que consiste en una línea curva oscura (Figura 3.2D42-D3). Los primeros y segundos maxilipedios tienen tres setas terminales al final de los endópodos (Figura 3.2D3). El abdomen crece continuamente incorporando segmentos. En el telson bifurcado, cuatro pares de setas son visibles en cada lóbulo (Figura 3.2D3). Al final, las reservas de vitelo se reducen significativamente hasta aproximadamente el 30 y el 40% del volumen de huevo. La duración de esta etapa es de $5,59 \pm 0,66$ días, lo que representa un $16,19 \pm 1,75\%$ de la duración total (Tabla 3.3).

Estadio V

Los huevos son esféricos, de $372,24 \pm 16,32 \mu\text{m}$ de diámetro medio y de color marrón oscuro-gris (P. 469 Escala de Color Pantone®) (Figura 3.2E1-E2). El vitelo se reduce a unas gotas en la parte dorsal del embrión y su volumen se reduce progresivamente durante la etapa mientras el embrión crece (Figura 3.2E1). Los latidos del corazón y la espina dorsal se hacen notorios y se observan

movimientos corporales. Los cromatóforos pigmentados parecidos a puntos aparecen en las bases de las mandíbulas, maxilipedios y en cada segmento abdominal (Figura 3.2E2). La pigmentación en el globo ocular se expande y aumenta mientras que el ojo compuesto se agranda. Una línea pigmentada transversal aparece en la boca. En el medio de esta etapa los ojos están completamente formados y pigmentados (Figura 3.2E2,-E4-E6). La anténula unirramosa muestra dos setas terminales. La antena birramosa tiene un endopodito corto y ancho con una seta y un exopodito con dos setas. La boca tiene un cromatóforo grande con forma de herradura y manchas de pigmentos en cada lado de la boca. El primer maxilipedio presenta un cromatóforo en la coxa larga; su endopodito y su exopodito tienen dos y cuatro setas terminales respectivamente. El segundo maxilipedio muestra un cromatóforo en la coxa. El exopodito tiene cuatro setas terminales. El abdomen tiene cinco segmentos, con el sexto fusionado con el telson (Figura 3.2E3). Todos estos segmentos tienen cromatóforos en cada lado. El telson bifurcado tiene seis setas terminales en cada lóbulo. Se pueden observar movimientos esporádicos de los apéndices y del abdomen, haciéndose más frecuentes en el momento de la eclosión. La frecuencia cardíaca es de $180 \pm 3,3$ latidos por minuto. Esta etapa termina justo antes de la eclosión, y dura $4,76 \pm 0,42$ días, lo que representa el $13,3 \pm 1,29\%$ del desarrollo total del embrión (Tabla 3.3).

La eclosión de las larvas comienza con la rotura del corion de los huevos en la zona anterior, por encima de la parte cefálica de los embriones. La eclosión de toda la progenie se produce en un sólo pulso que comienza a la noche y se extiende durante las primeras horas de la mañana siguiente. Las membranas coriónicas o cápsulas de huevos vacíos permanecen adheridas a los pleópodos hasta la siguiente muda.

Como lo muestran los índices de elongación (E) y elípticidad (e), los huevos son esféricos y conservan su forma a través de todas las etapas de desarrollo (Figura 3.3, Tabla 3.3). Se observaron incrementos en el volumen (V) a través del

desarrollo embrionario, pero las diferencias de diámetros del huevo fueron significativas sólo en la transición del estadio I al II y del estadio III al IV.

Asimismo, no se observó una relación significativa entre la supervivencia embrionaria y el ancho de caparazón (ANOVA, $p = 0,99$, $n = 26$ hembras ovígeras) o el ancho del abdomen (ANOVA, $p = 0,24$, $n = 26$ hembras ovígeras) de las hembras progenitoras.

La mortalidad embrionaria fue significativamente diferente entre los estadios (Kruskal Wallis, $H = 50,59$, $p < 0,01$, $n = 10$ huevos embrionados), y las comparaciones *a posteriori* (prueba de Tukey) revelaron que M_i es mayor en la eclosión que al final de cada una de las etapas del desarrollo embrionario, y que la posición de los huevos en la masa del huevo no afecta la supervivencia de los embriones.

La supervivencia de las hembras ovígeras ($n = 26$) al final del experimento control para la caracterización del desarrollo embrionario fue del 95%. Se encontraron diferencias significativas (Kruskal Wallis, $H = 50,59$, $p < 0,01$), las comparaciones *a posteriori* (prueba de Dunn) revelaron que M_i es mayor en la eclosión que al final de cada una de las etapas del desarrollo embrionario, y que la posición de los huevos en la masa del huevo no afecta la supervivencia de los embriones a 13 °C (Tabla 3.4).

Tabla 3.3. – Resultados de los ANOVA para las variables morfométricas de los huevos entre estadios de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus*.

	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV	Estadio V	ANOVA
DRE (%)	26,76 ± 2,58	22,36 ± 2,76	22,38 ± 2,10	16,19 ± 1,75	13,3 ± 1,29	p < 0,01
V	165,54 ± 3,73	174,56 ± 5,85	175,29 ± 6,89	195,80 ± 8,74	197,15 ± 6,29	p < 0,001
E	0,008 ± 0,016	0,008 ± 0,017	0,004 ± 0,017	0,007 ± 0,013	0,010 ± 0,016	p = 0,4308
e	1,016 ± 0,033	1,017 ± 0,036	1,009 ± 0,035	1,016 ± 0,028	1,021 ± 0,034	p = 0,4458
Color	P123	P157	P484	P464	P469	
n	50	50	50	50	50	

Referencia: RDE: Duración relativa del estadio de desarrollo; V: volumen; E: elongación y e: elipticidad. Los valores muestran la media ± desviación estándar; n = número de huevos analizados. Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3.4. – Mortalidad instantánea de embriones (Mi) de *Ovalipes trimaculatus* para todos los estadios de desarrollo embrionario y para el momento de nacimiento de larvas.

Estadios de desarrollo embrionario (<i>i</i>)	Mi_{s-i} (%)			n
	Interior	Medio	Exterior	
I	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	20
II	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	20
III	1,00 ± 2,61 ^a	1,42 ± 3,63 ^a	1,45 ± 2,75 ^{a b}	20
IV	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	20
V	0,25 ± 1,12 ^a	0,00 ^a	0,42 ± 2,04 ^a	20
H	3,50 ^b	3,50 ^b	3,50 ^b	10

Referencia: H: Ruptura de la cápsula coriónica y liberación de larvas Zoea I (hatching). Las distintas letras muestran diferencias significativas en comparación de a pares mediante la Prueba de Tukey para cada estadio de desarrollo. Los valores muestran la media ± desviación estándar; n = número de huevos muestreados (por cada muestra).

Tabla 3.5. – Comparación de los estadios de la embriogénesis en diferentes especies de portúnidos.

Desarrollo embrionario y diámetros medios				
Especies	Blástula-Clivage- Gástrula (diámetro medio)	Primordio embrionario- Placa ocular	Organogénesis- Aparición de pigmentos	Aparición de cromatóforos-Latido de corazón
	F E	F E	F E	F E
<i>Charybdis feriata</i> ^{1 2}	0,298 - 0,36	0,40	0,42	0,369 - 0,45
	F E	F E		F E
<i>Portunus pelagicus</i> ^{3 4}	0,27 - 0,344	0,347 ±0,425		0,363 - 0,429
	F E	F E	F E	F EI 0,57-0,64
<i>P. sanguinolentus</i> ⁵	0,34	0,41	0,48	Posteriormente F E 0,73
				F EI 0,65, posteriormente
<i>Scylla serrata</i> ^{5 6}	F E 0,34 0,40	F E 0,41 0,52	F E 0,48 0,60	F E 0,73
				F EI 0,65, posteriormente
<i>S. tranquebarica</i> and <i>S. olivacea</i> ^{5 6}	F E 0,40	F E 0,52	F E 0,60	F E 0,73
<i>Ovalipes trimaculatus</i> ⁷	F E 0,40	F E 0,52	F E 0,60	F E 0,65, posteriormente 0,73
Esta tesis	F E 0,309 - 0,347	F E 0,326	F E 0,367	F E 0,372 - 0,378

Referencias: F E: Forma esférica; F EI: forma elíptica. Las medidas son expresadas en milímetros; ¹Sundarapandían *et al.* 2013; ²Josileen 2011; ³IKhwanuddin *et al.* 2012; ⁴Ravi 2013; ⁵Samuel y Soundarapandían 2009; ⁶Ates *et al.* 2012; ⁷Du Preez y Mcachlan 1984.

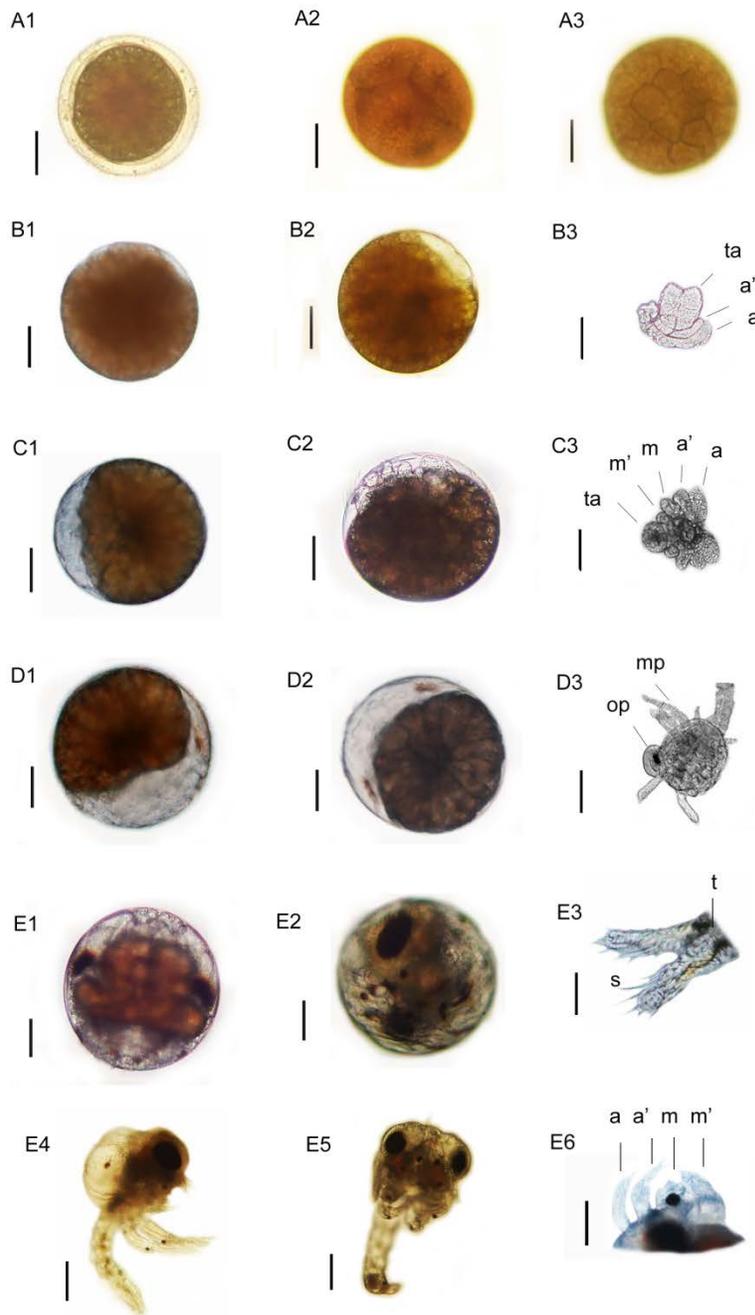


Figura 3.2. Cambios morfológicos en los huevos y embriones de *Ovalipes trimaculatus* durante los estadios de desarrollo embrionario (Estadio I: A1-A5; Estadio II: B1-B3; Estadio III: C1-C4; Estadio IV: D1-D5; Estadio IV: E1-E8). Escala = 100 μm (A1 a D2; D4; E1; E2; E5 y E6). Escala = 50 μm (D3; D5; E3; E4; E6).

Referencias: antena (a'); antenula (a); chromatoforo (ct); membrana externa (ec); ojo (o); corazón formado (c); Membrana interna (ic); maxila (m'); maxillipedio (mp); maxilula (m); globo optico (op); Estructuras primordiales (p); setas (s); telson (t); bulbo toraco-abdominal (ta); vitelo (y).

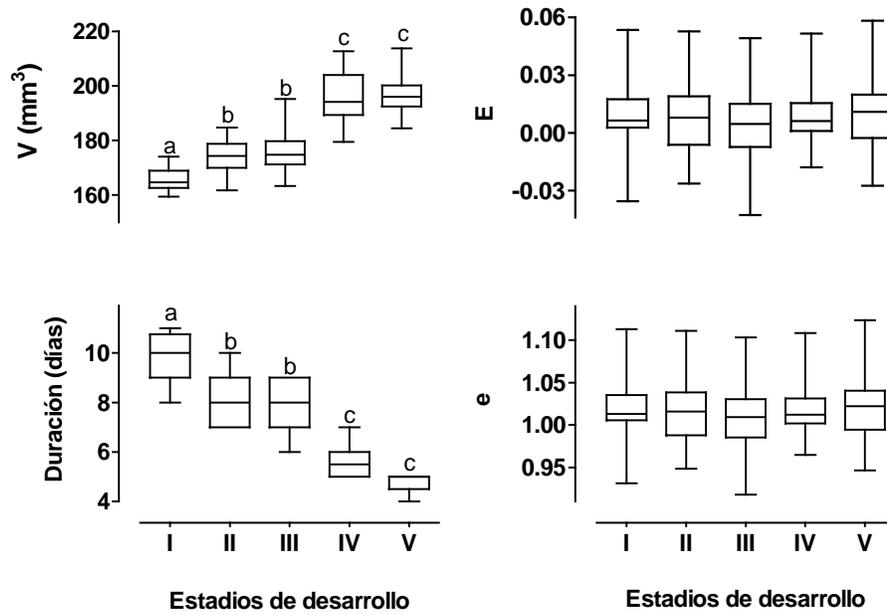


Figura 3.3. - Gráficos de cajas de los índices tomados para evaluar la forma de lo huevos durante los sucesivos estadios de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* y de su duración por estadios. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Tukey. Referencias: V. volumen; E. elongación y e. elipticidad.

Optimización del cultivo en la etapa de desarrollo embrionario

Experimento I: Efectos conjuntos de temperatura y salinidad sobre el desarrollo embrionario de *O. trimaculatus*

Tomando en cuenta que la temperatura y la salinidad son dos variables ambientales clave usualmente manipuladas en los establecimientos de acuicultura, se realizaron experimentos con varias combinaciones de ambas variables con el fin de hallar la mejor combinación para promover el crecimiento y supervivencia embrionaria de *O. trimaculatus*. La duración total y por estadios del desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* está relacionada con la concentración salina y la temperatura. Dependiendo de la combinación termohalina, la duración total del desarrollo embrionario se extendió entre 19 y 56 días ($n = 104$ hembras ovígeras). En todos los tratamientos se evidenció el mismo patrón de desarrollo ontogenético descrito en la Figura 3.2. En términos generales, se observó que para los tratamientos contrastados a mayor temperatura o menor salinidad el tiempo de desarrollo embrionario es menor (Figura 3.3, 3.4, Tabla 3.7). En los primeros estadios las diferencias más importantes de duración están en las temperaturas más bajas, en tanto que en los estadios más avanzados en las temperaturas más altas (Figura 3.5). Particularmente cuando la temperatura se encuentra por encima de los $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó una reducción en la duración en el proceso para todos los estadios de desarrollo (ANOVA, temperatura $p < 0,001$; salinidad $p = 0,02$, interacción $p = 0,03$, Tabla 3.7). Si bien la temperatura y salinidad influyeron en el tiempo de desarrollo embrionario (Figura 3.4 y 3.5), sólo se detectó interacción de estas variables con la duración total del desarrollo embrionario (Figura 3.5, Tabla 3.7).

La duración de la embriogénesis expresada en términos de “temperatura acumulada efectiva” fue de $437 \pm 64\text{ }^{\circ}\text{C días}$ (media \pm desvío estándar) (ver sección metodológica) (Tabla 3.8). Esta variable acumulada es equivalente a la cantidad en días de cultivo a una temperatura determinada que deben ser

acumulados desde la fecundación hasta lograr la eclosión larvaria (Barón 2002, Goldstein y Watson III 2015).

A diferencia de lo observado con la duración del desarrollo embrionario, se encontró interacción entre las variables temperatura y salinidad cuando la variable respuesta considerada fue la supervivencia embrionaria para cada estadio, por lo cual fue necesario estudiar el comportamiento de supervivencia de cada combinación de dichas variables (Tabla 3.6 y 3.7). Sólo se encontraron diferencias significativas en los últimos estadios de desarrollo embrionario (Estadios III, IV y V en $n = 104$ hembras ovígeras), donde los tratamientos por encima de los $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ tuvieron un descenso significativo en la supervivencia, no sólo de los embriones sino también de las hembras ovígeras (ANOVA, $p < 0,001$, Tabla 3.6 y 3.7).

Respecto del tamaño de los huevos embrionados, se halló interacción entre las dos variables ambientales estudiadas. Para todos los estadios de desarrollo, los huevos de mayor diámetro medio fueron los del experimento a 18°C -30 ‰ y 13°C -30 ‰ (ANOVA, $p < 0,001$, Tabla 3.7, Figura 3.6, $n = 104$ hembras ovígeras). Acompañando estos resultados, el índice *Dor* no mostró diferencias significativas para todos los tratamientos de temperatura y salinidad testeados (Tabla 3.7). Por lo tanto, el diámetro ocular externo (Doe) del embrión creció en longitud conforme creció el diámetro latero-lateral del huevo.

Tabla 3.6. Tabla de datos para las variables respuesta supervivencia embrionaria de las hembras ovígeras para cada estadio de desarrollo embrionario (I a V) de *Ovalipes trimaculatus* en función de diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Estadios de desarrollo embrionario						Hembra ovígera
		I	II	III	IV	V	H	
6	30	100	100	100	100	97,78 ± 2,5	92 ± 9,27	91,25 ± 2,5
	33	100	100	98,33 ± 4,08	96,67 ± 5,16	96,67 ± 5,77	96 ± 2,55	97 ± 4,47
10	30	100	100	92,5 ± 9,57	93 ± 13	92,5 ± 9,57		91,25 ± 2,5
	33	100	100	100	100	98,75 ± 2,5	89 ± 4,47	100
12	30	100	100	100	100	100	100	100
	33	100	100	98,33 ± 2,58	99,22 ± 1,88	98,75 ± 5	100	100
13	30	100	100	100	100	96,67 ± 5,77	100	96,6±2,88
	33	100	100	98,33 ± 2,58	100	100	93,82 ± 4,85	95 ± 4,77
15	30	100	100	100	100	100	95 ± 2,58	100
	33	100	100	100	100	100	93 ± 2,5	94 4 ± 4,48
18	30	100	100	100	100	100	97 ± 4,47	96 ± 2,55
	33	100	100	100,0	100	97,7 ± 4,41	95 ± 2,58	100
22	30	100	100	98,75 ± 2,50	97,5 ± 5	97,5 ± 5	92 ± 11,5	100
	33	100	95	95	95	88,5 ± 5	88 ± 10,77	93,75 ± 4,78
24	30	100	98,75 ± 2,5	95 ± 10	97,5 ± 5	97,5 ± 5	91 ± 11,5	86,66 ± 5,77
	33	100	97,5±5	97,5 ± 5	92 ± 1,15	82,75 ± 19,66	80	82,75 ± 4,78

Tabla 3.7. Resultados de los ANOVA de dos vías para las variables respuesta medidas en los huevos entre estadios de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* en función de diferentes combinaciones de temperatura y salinidad.

	F.V.	SC	GL	CM	F	p
Supervivencia						
Estadio I		0	13	0	-	-
Supervivencia	Temp	44,29	7	6,33	1,18	0,3285
Estadio II	Sal	9,13	1	9,13	1,7	0,1971
	Temp*Sal	40,87	5	8,17	1,53	0,1966
Supervivencia	Temp	271,48	7	38,78	2,11	0,0558
Estadio III	Sal	55,96	1	55,96	3,04	0,0861
	Temp*Sal	917,74	5	183,55	9,98	0,0001
Supervivencia	Temp	4368,99	7	624,14	1,48	0,1907
Estadio IV	Sal	852,1	1	852,1	2,02	0,1601
	Temp*Sal	940,96	5	188,19	0,45	0,8144
Supervivencia	Temp	2841,17	7	405,88	26,88	0,0001
Estadio V	Sal	8,13	1	8,13	0,54	0,466
	Temp*Sal	499,74	5	99,95	6,62	0,0001
Duración	Temp	914,02	7	64,71	104,91	<0,0001
Estadio I	Sal	6,53	1	6,53	5,25	0,0255
	Temp*Sal	7,81	7	1,12	0,9	0,5154
Duración	Temp	811,14	7	115,88	90,32	<0,0001
Estadio II	Sal	6,28	1	6,28	4,89	0,0305
	Temp*Sal	8,61	7	1,23	0,96	0,469

Continuación Tabla 3.7

Duración	Temp	680,46	7	97,21	75,01	<0,0001
Estadio III	Sal	0,43	1	0,43	0,33	0,5681
	Temp*Sal	8,63	7	1,23	0,95	0,3692
Duración	Temp	350,41	7	50,06	68,6	<0,0001
Estadio IV	Sal	1,64	1	1,64	2,25	0,1391
	Temp*Sal	23,3	7	3,33	4,56	0,004
Duración	Temp	293,84	7	41,98	30,02	<0,0001
Estadio V	Sal	0,06	1	0,06	0,09	0,7691
	Temp*Sal	2,78	7	0,4	0,57	0,7797
Duración total	Temp	10357,1	7	1479,58	458,22	<0,0001
	Sal	17,96	1	17,96	5,56	0,0226
	Temp*Sal	82,62	7	11,8	3,66	0,031
D I	Temp	16,8	15	1,12	8,09	<0,0001
	Sal	2,19	1	2,19	15,84	0,0001
	Temp*Sal	5,12	7	0,73	5,29	<0,0001
D II	Temp	8,11	7	1,16	7,97	<0,0001
	Sal	1,15	1	1,15	7,92	0,0053
	Temp*Sal	13,36	7	1,91	13,13	<0,0001
D III	Temp	5,41	7	0,77	9,38	<0,0001
	Sal	1,5	1	1,5	18,2	<0,0001
	Temp*Sal	0,47	7	0,07	0,82	0,5732
D IV	Temp	5,7	7	0,81	10,96	<0,0001
	Sal	3,35	1	3,35	45,03	<0,0001

	Temp*Sal	5,49	7	0,78	10,55	<0,0001
D V	Temp	4,71	7	0,67	6,51	<0,0001
	Sal	2,93	1	2,93	28,3	<0,0001
	Temp*Sal	4,77	7	0,68	6,59	<0,0001
Dor	Temp	1,1x10 ⁻³	8	1,3x10 ⁻⁴	0,88	0,5348
	Sal	3,0x10 ⁻⁴	1	3,0x10 ⁻⁴	2,01	0,1607
	Temp*Sal	7,9x10 ⁻⁴	6	1,3x10 ⁻⁴	0,88	0,5179

Referencia: Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3.8. Temperatura acumulada efectiva (TA) (grados • día) para el desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* en función de todas las temperaturas contrastadas.

Temperatura de cultivo (°C)	Temperatura acumulada efectiva TAE (grados-día)
6	340,1
10	444,7
12	543,9
13	451,4
15	360
18	429
22	456,5
24	472,1

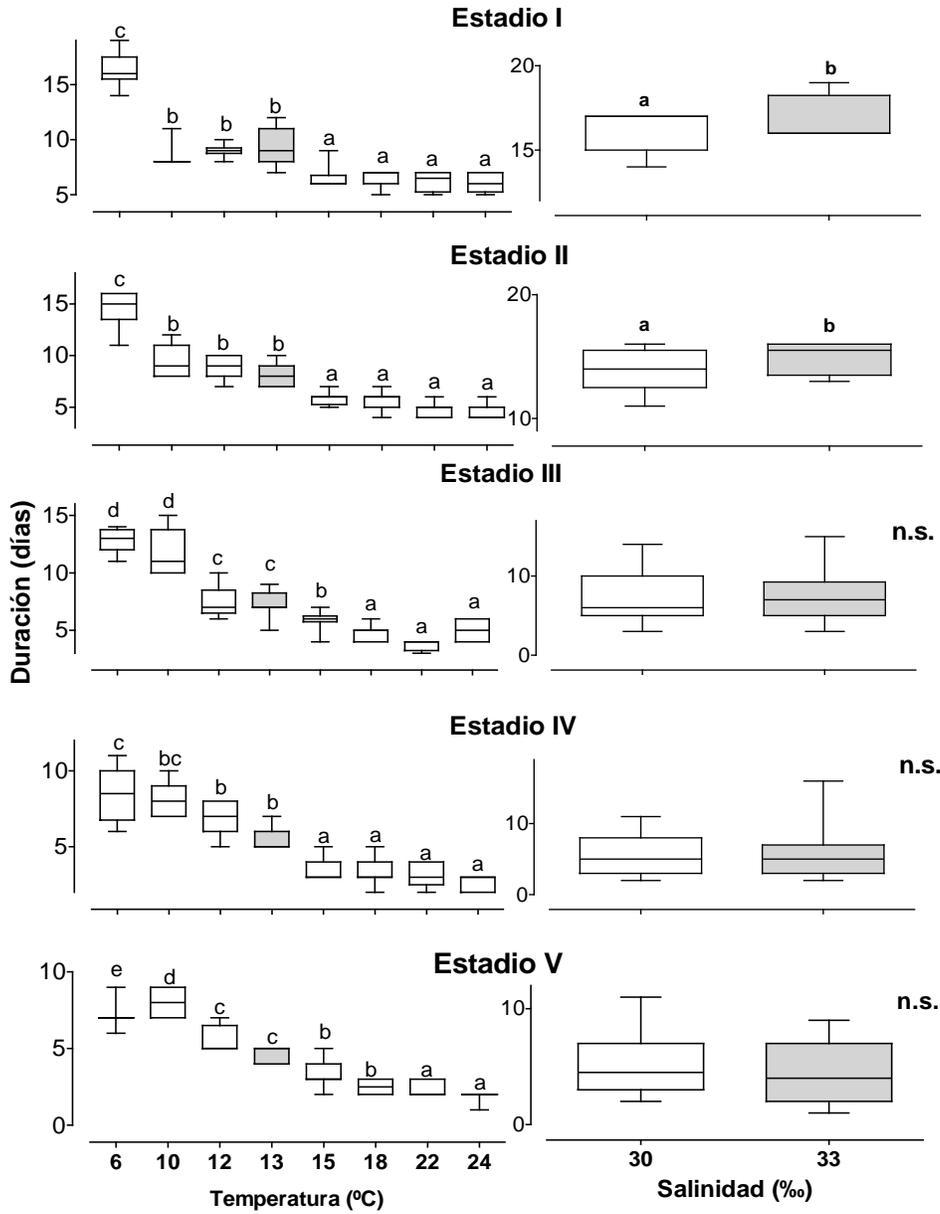


Figura 3.4. Gráficos de caja de la duración de cada estadio de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* en incubaciones bajo diferentes condiciones termohalinas. La temperatura (izquierda) y salinidad (derecha) se representan en gráficos separados debido a que no presentan interacción significativa. Las letras diferentes denotan diferencias significativas y las siglas n.s. corresponden a “no significativo” en referencia a tratamientos según contrastes *a posteriori* empleando la prueba de Tukey. El color gris corresponde al tratamiento control.

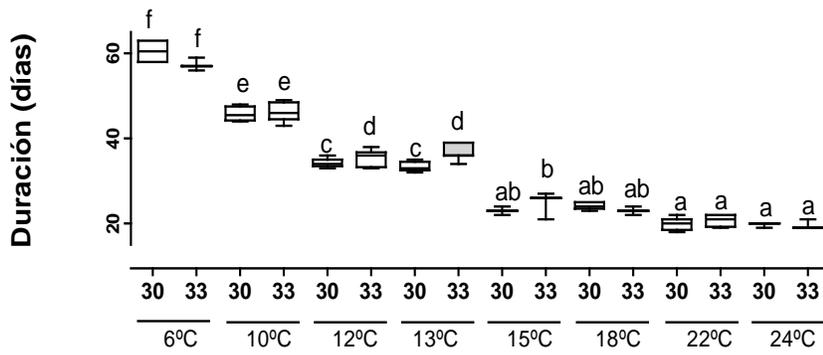


Figura 3.5. Gráficos de caja para la duración total del desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* en incubaciones bajo diferentes condiciones termohalinas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas en referencia entre tratamientos según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Tukey. El color gris corresponde a tratamientos control.

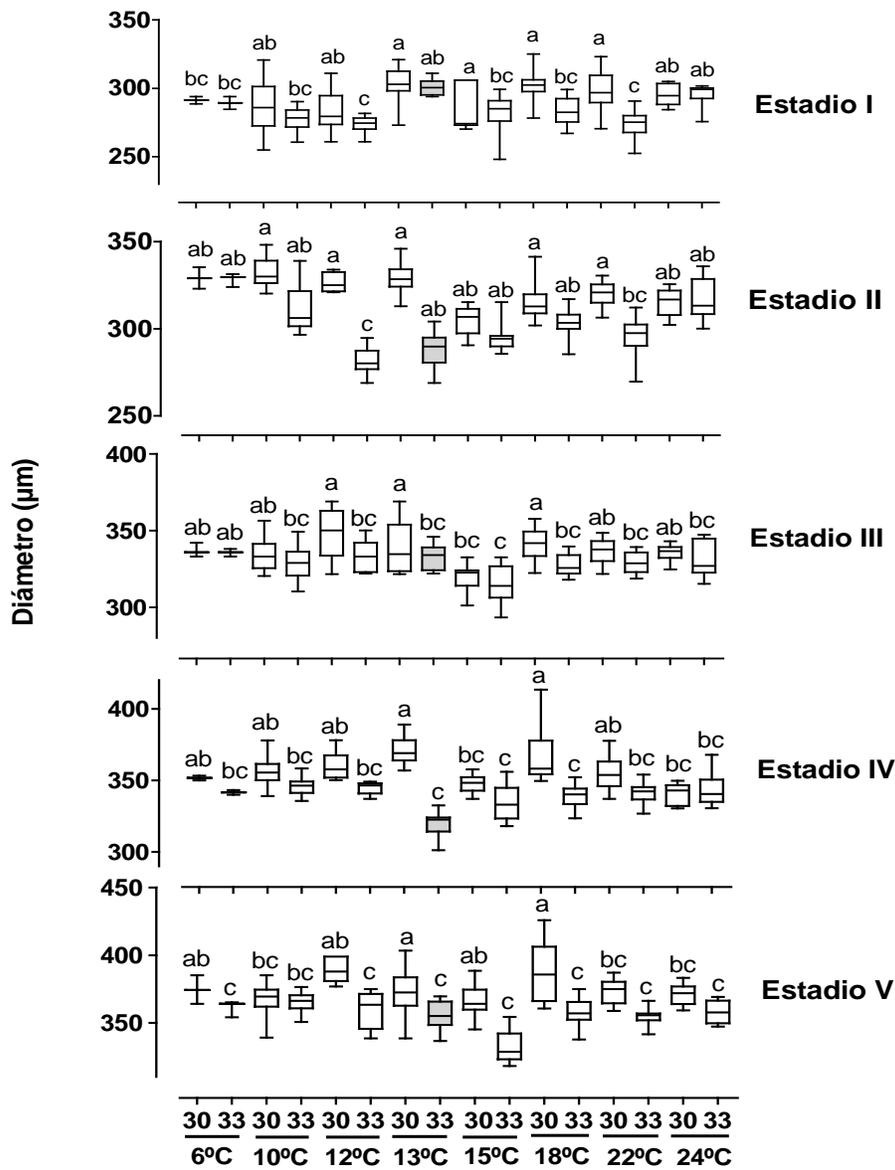


Figura 3.6. Gráficos de caja del diámetro medio de huevos en estadios sucesivos del desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* para todas las combinaciones termohalinas contrastadas. La temperatura y la salinidad se prepresentan en el mismo gráfico debido a que presentan interacción significativa entre ellas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Tukey. El relleno gris representa el tratamiento control.

Experimento II: Efectos de la salinidad sobre el desarrollo embrionario de *O. trimaculatus*

Los resultados reflejan que hay un efecto de la salinidad en el desarrollo embrionario en términos de tamaño del huevo (*D*) y supervivencia (*S*), siendo el tratamiento de salinidad 30 ‰ el que obtuvo conjuntamente *D* y *S* mayores (Figura 3.7, Tabla 3.9). El aumento significativo del tamaño del huevo es acompañado con la variable *Dor*, la cual no mostró diferencias significativas para los tratamientos salinos testeados (ANOVA, $p = 0,8286$). Este resultado muestra que el crecimiento en ancho ocular del embrión incrementa conforme crece en diámetro anterolateral el huevo, en una relación constante que no muestra diferencias estadísticamente comprobables. Aunque los embriones completaron su desarrollo en salinidades de 37 y 26 ‰, estas condiciones mostraron valores más altos de mortalidad embrionaria que a 30 y 33 ‰ (ANOVA, $p = 0,004$, Tabla 3.10, $n = 30$ hembras ovígeras).

La duración de los estadios de desarrollo no mostró diferencias significativas en función de los tratamientos salinos aplicados (ANOVA, $p = 0,90$, Tabla 3.10). Por el contrario, el diámetro de los huevos embrionados fue significativamente mayor en el tratamiento de 30 ‰ de salinidad a lo largo de toda la embriogénesis. (ANOVA, $p < 0,0001$, Tabla 3.10, Figura 3.7).

Tabla 3.9. Resultados de datos de supervivencia embrionaria para cada estadio de desarrollo y de las hembras ovígeras de *Ovalipes trimaculatus* en función de la salinidad

Salinidad (‰)	Estadios de desarrollo embrionario						Hembra ovígera
	I	II	III	IV	V	H	
37	100	100	100	92 ± 4,88	88,5 ± 5	66 ± 10	85 ± 3,78
33	100	100	98,33 ± 2,58	100	100	93,82 ± 4,85	95 ± 4,77
30	100	100	100	100	96,67 ± 5,77	100	96,6 ± 2,88
26	100	98±4,47	82 ± 15	88±10	88 ± 4,47	72 ± 10	86 ± 5,47

Tabla 3.10. Resultados de los ANOVA para las variables respuesta medidas en los huevos entre estadios de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* en función de la salinidad

F.V.	SC	GL	CM	F	p
S I	83,81	3	27,94	1,98	0,1554
S II	107,97	3	35,99	2,41	0,0984
S III	1345,24	3	448,41	6,63	0,0036
S IV	1919,64	3	639,88	6,94	0,0022
S V	490,24	3	163,41	6,46	0,0045
Duración I	14,19	3	4,73	3,08	0,0555
Duración II	10,22	3	3,41	2,89	0,0583
Duración III	8,11	3	2,7	2,85	0,0576
Duración IV	1,73	3	0,58	0,79	0,5113
Duración V	0,35	3	0,12	0,19	0,9016
Duración total	1,16	3	0,39	0,61	0,3182
D I	7,01	3	2,34	21,05	<0,0001
D II	13,86	3	4,62	43,82	0,0001
D III	20,68	3	6,89	45,65	<0,0001
D IV	4,08	3	1,36	10,67	<0,0001
D V	1,37	3	0,46	4,61	0,0061
Dor	8,6x10 ⁻⁵	3	2,9x10 ⁻⁵	0,29	0,8286

Referencia: S: Supervivencia; D: diámetros medios; Dor: Diámetro ocular relativo para huevos embrionados de *O. trimaculatus*. Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

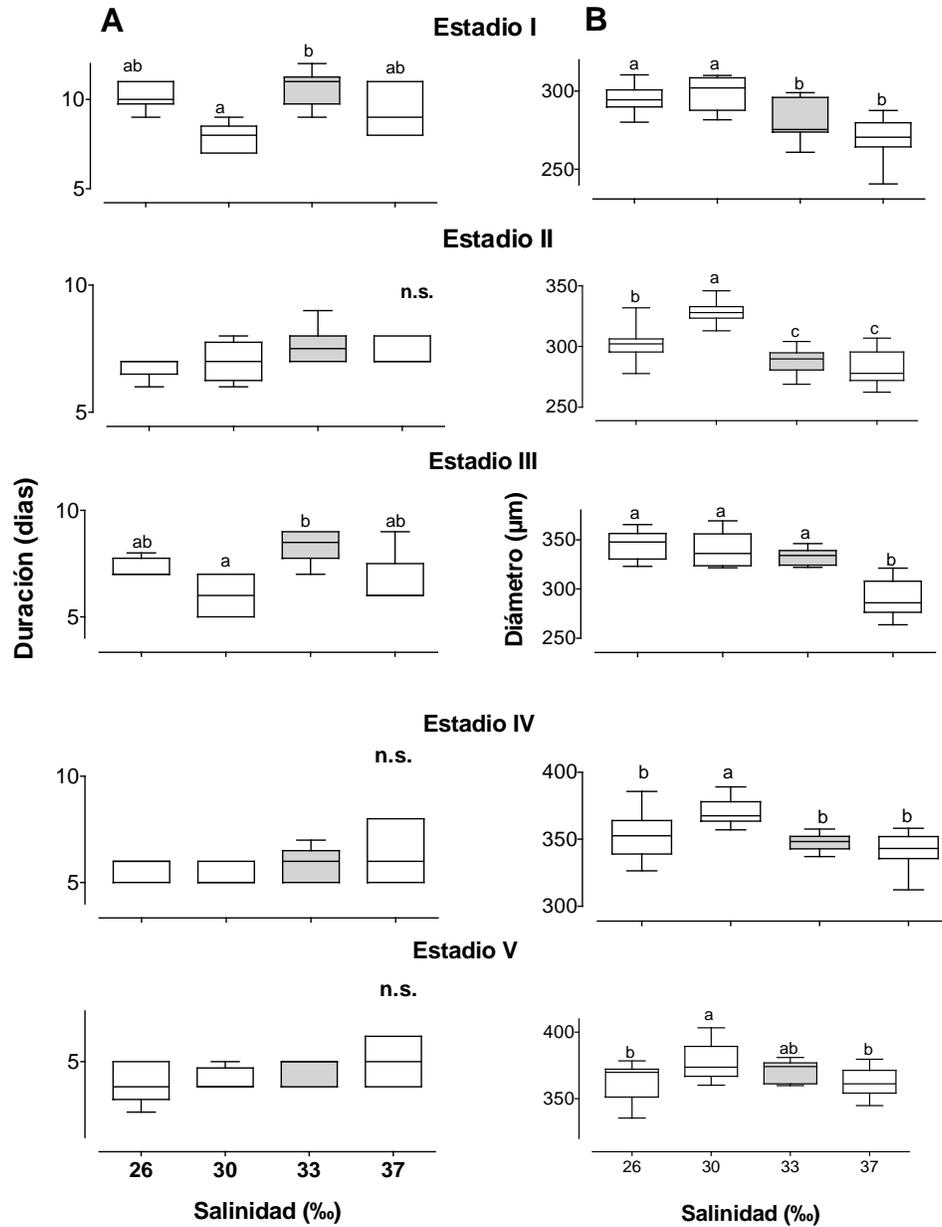


Figura 3.7. Gráficos de caja de las duraciones de cada estadio (A) y diámetros medio de los huevos embrionados (B) para cada estadio de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* bajo las diferentes condiciones de salinidad. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos y n. s. representa “no significativo” según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Tukey. El relleno gris representa el tratamiento control.

Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo permitieron realizar una caracterización macroscópica del desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* en 5 etapas de desarrollo que son fácilmente distinguibles y que resultan de utilidad en estudios poblacionales de la especie y/o potenciales emprendimientos acuícolas. Esta caracterización macroscópica es acompañada con un detalle microscópico que aporta a la comprensión del proceso en términos biológicos.

Si bien el desarrollo embrionario puede categorizarse en mayor o menor cantidad de estadios, en este trabajo se apuntó a contar con una escala que permita la caracterización en etapas de distinción rápida y a simple vista, teniendo en cuenta el cambio de coloración de los huevos estandarizado a una escala objetiva. De esta manera, dicha escala podrá ser utilizada durante estudios de campo poblacional o durante las labores de acuicultura. Además, se describen cambios microscópicos representativos de los estadios de desarrollo que transcurren en simultáneo al cambio en la coloración externa y que se basan en criterios generales comúnmente utilizados en Decápodos (Felder *et al.* 1985).

En el comienzo del desarrollo embrionario de los crustáceos, la diferenciación celular comienza poco después de la gastrulación y requiere un enorme gasto de energía (Soundarapandían *et al.* 2013). Algunos autores consideran que los principales acontecimientos del desarrollo embrionario ocurren desde el inicio de la fertilización hasta la formación de gástrula (Nagao *et al.* 1999, Müller *et al.* 2003), pero los cambios producidos durante este período son difíciles de observar en huevos vivos sin técnicas especiales. Después de la migración hacia el interior del blastodermo por la proliferación celular en la masa de vitelo (Adiyodi 1988), las estructuras primordiales comienzan a crecer y extenderse ventralmente, siendo fáciles de observar y describir en huevos vivos. Por lo tanto, las etapas de desarrollo embrionario de los crustáceos se definen generalmente sobre la base de características morfológicas externas distintivas, que cambian la coloración del

huevo conforme se reduce la proporción de vitelo relativo al volumen embrionario total y aparecen pigmentaciones del globo ocular y cromatófotos. Simultáneamente, y con herramientas microscópicas, se pueden observar el crecimiento del embrión y el desarrollo los apéndices, sumado a la iniciación del latido del corazón (Nagao *et al.* 1999).

En *O. trimaculatus* la secuencia general de los cambios ontogénicos observados durante la embriogénesis y el aumento de tamaño y complejidad de los procesos abdominales y oculares son similares a los reportados para otros portúnidos (Tabla 3.5). Sin embargo, los tamaños de los huevos son significativamente menores en la población de Norpatagonia estudiada, respecto de las poblaciones sudafricanas para esta misma especie (Du Preez y Mcachlan 1984), incrementándose esta diferencia conforme avanza la embriogénesis.

El desarrollo embrionario es sincrónico para toda la masa embrionaria, independientemente de su localización dentro de la misma, tal como se observa en otros portúnidos (Ates *et al.* 2012, Ikhwanuddin *et al.* 2012, Soundarapandian *et al.* 2013). Este patrón podría reflejar una distribución homogénea de oxígeno a los embriones en desarrollo, resultante de la ventilación de las masas de huevos a través del abanicado abdominal de las hembras ovígeras según lo informado por Fernández *et al.* (2002) para la especie. Respecto de la forma, la esfericidad de los huevos embrionados de *O. trimaculatus* se mantuvo a lo largo de todo el desarrollo embrionario, característica compartida también con otros portúnidos (Josileen 2011, IKhwanuddin *et al.* 2012, Ravi y Manisseri 2013, Soundarapandian *et al.* 2013)

Integrando los resultados obtenidos de la modulación de la temperatura y salinidad sobre el cultivo embrionario, es posible destacar los efectos de las distintas combinaciones termohalinas sobre el diámetro de los huevos, la duración de la embriogénesis medida en días y la supervivencia, no sólo de los embriones sino también de las madres. En términos generales las combinaciones 18 °C-30 ‰ y 22 °C-30 ‰ resultaron las más propicias (Tabla 3.7), siendo estas condiciones las que optimizan su cultivo. En la naturaleza, estos dos parámetros son los más

importantes moduladores del crecimiento y supervivencia de los invertebrados marinos (Kinne 1971, Warwick 1993), por lo tanto estudiar a los individuos bajo condiciones controladas de cultivo con la aplicación conjunta de ambas variables refleja más claramente su comportamiento en la naturaleza (Vázquez *et al.* 2016). Por un lado, la temperatura produce el efecto más notable en los desarrollos embrionarios reduciendo los tiempos de desarrollo, siendo la salinidad la responsable de cambios en el tamaño y supervivencia (Giménez y Anger 2001). Este efecto radica en que las tasas bioquímicas metabólicas y fisiológicas en los procesos de desarrollo dependen de la temperatura, con lo cual influyen en la tasa de crecimiento y periodos de intermuda (Hartnoll 1978). La temperatura que experimentan los embriones durante su desarrollo tiene efectos directos sobre el tamaño de los huevos (i.e., el tamaño de sus cápsulas coriónicas), la tasa de eclosión, la duración de la embriogénesis y la supervivencia larvaria tras la eclosión (Sainz-Hernández *et al.* 2016).

En cuanto a la temperatura diaria acumulada efectiva requerida por los embriones para completar su desarrollo, cabe mencionar que, aunque se observó cierta dispersión (rango *TAE*: 340-540 °C día, Tabla 3.8), la mayoría de los valores obtenidos fueron cercanos a 450°C día. Este parámetro será de gran utilidad para pronosticar mediante la extrapolación de los datos, la duración total del desarrollo embrionario en otras áreas geográficas con diferentes temperaturas. Dado la amplia latitud costera en la cual se distribuye *O. trimaculatus* en la naturaleza, el desarrollo de los embriones está expuesto a diferentes regímenes de temperatura que dan como resultado diferentes longitudes de la fase embrionaria en diferentes lugares. Estas fluctuaciones térmicas espacio-temporales generan un efecto en los embriones que se desarrollan durante diferentes meses del año a diferentes latitudes, siendo sus extremos los puntos críticos donde por fuera de los mismos podría ser detenido el desarrollo afectando hasta su supervivencia. Estos cambios generarían patrones de reclutamiento larvario que condicionan la distribución de la especie. Analizando el índice *TAE* no solo podemos comprender la distribución de la especie, sino que es una herramienta de utilidad en especies de interés

pesquero para anticipar el cronograma de liberación de larvas (Dellatorre 2009, Dellatorre *et al.* 2014, Pereira *et al.* 2014).

El aumento en el tamaño de los huevos producto del efecto de la salinidad sobre el desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* se debe a que se producen cambios en la presión osmótica sobre las membranas del huevo, así como también sobre el embrión. Este aumento puede generar un efecto en el tamaño larval resultante, como en el caso del cangrejo *Neoelice (ex Chasmagnatus) granulata* (Bas *et al.* 2007). La capacidad de osmoregular depende de la presencia y actividad de la enzima ATPasa que regula las concentraciones de Na⁺ y K⁺, así como también las enzimas HCO₃-CL ATPasa y anhidrasa carbónica (Chamantier 1998, Bas y Spivak 2000, Fukuda *et al.* 2017). Algunos autores sostienen que existe una osmorregulación neuroendocrina localizada en la glándula del pedúnculo ocular desde las fases postembrionarias, mientras que otros asumen que la regulación intracelular comienza desde las fases larvales (Chamantier 1998) siendo los embriones osmoconformes (Charmantier y Charmantier-Daures 2001). Las membranas que envuelven el huevo, tanto la externa como la interna junto con la membrana embrionaria, sirven de barreras físicas, pero también algunos autores sugieren que pueden tener una capacidad variable de osmoregular según la especie (Stevens 2006). En cualquier caso, la capacidad de osmoregular es una característica evolutiva que requiere una presión ambiental de estrés salino. En este sentido, muchas especies obtienen esta capacidad de tolerar rangos de temperatura y salinidad con el avance de sus etapas de vida aumentando a lo largo de la ontogenia, y otras adquieren estas capacidades desde las etapas tempranas de la embriogénesis (Charmantier *et al.* 1988, Miller *et al.* 2013, Vázquez *et al.* 2016). Para *O. trimaculatus*, en salinidades donde no se ve afectada la capacidad de osmoregulación, una disminución en la salinidad del agua de cultivo (30 ‰) incrementa el tamaño de sus huevos embrionados, pero la relación entre el diámetro ocular externo del embrión respecto del diámetro laterolateral del huevo (índice *Dor*) no tuvo diferencias significativas. Por tanto, existe un crecimiento conjunto del embrión (*Doe*) y del huevo (*DIII*), al menos en ese eje (latero-lateral) probado en estadios avanzados del desarrollo embrionario.

Esto, sumado a la esfericidad de los huevos comprobada para todos los estadios de su desarrollo, nos permite apoyar la hipótesis de que el embrión crece conforme crece el huevo, por tanto podemos estimar que las larvas que eclosionen de huevos de mayor tamaño serían de mayor tamaño también. Si bien se debe corroborar empíricamente esta teoría, la condición salinidad 30 ‰ durante el desarrollo embrionario representa un potencial interés para la obtención de larvas de mayor tamaño.

Hasta la realización de este estudio no se contaba con información sobre los rangos térmicos, salinos y termohalinos dentro de los cuales el desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* es viable. Debido a su amplia distribución latitudinal y su modo de vida estrictamente marino, los valores experimentales de temperatura y salinidad fueron seleccionados sobre la base de la hipótesis que la fase de desarrollo embrionario de la especie es euritérmica y estenohalina (Melo 1985, Vinuesa 2005). De acuerdo a lo previsto, los resultados muestran que al menos la población del cangrejo nadador de Norpatagonia es capaz de completar su desarrollo embrionario en todo el rango de amplitud térmico experimentado (6-24 °C), abarcando todas las condiciones térmicas contrastadas, aunque el rango térmico óptimo para el cultivo en esta etapa es de 18-22 °C. Dentro de dicho rango, los tiempos de desarrollo se reducen considerablemente (aproximadamente un 39%, Figura 3.5) respecto de la condición control (13 °C) sin afectar la supervivencia embrionaria. Este rango térmico es considerablemente amplio para la acuicultura, por lo cual el cultivo de la especie resulta versátil. Por sobre este valor, se logró completar el desarrollo embrionario a menos tiempo pero en desmedro de la supervivencia tanto materna como embrionaria, así como también de la calidad de agua, encontrándose signos de contaminación en el agua y en la periferia de los huevos en forma de colonias bacterianas y/o micelos fúngicos. La duración del desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* varió entre 19 (24 °C) y 56 (6°C) días. Otros portúnidos muestran patrones similares, tal como en los casos de *Scylla serrata*, en la que la duración del desarrollo embrionario disminuye exponencialmente con el aumento de la temperatura (Hamasaki 2003), o *Necora puber*, en la que varía de 17,6 días (a 25 °C) a 76 días (a 10 °C) (Valdés *et al.*

1991). No obstante, el desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* tanto a condiciones control (salinidad 33 ‰) como optimizadas (salinidad 30 ‰) fue notablemente más largo que el reportado para la mayoría de los portúnidos de interés acuícola, que son principalmente de distribución geográfica tropical, tales como *Portunus sanguinolentus* (8-11 días a 28-31 °C) (Samuel y Soundarapandían 2009), *P. pelagicus* (6-7 días a 28-31°C) (Soundarapandían y Tamizhazhagan 2009), *S. serrata* (7-9 días a 27-30°C) (Churchill 2003), *S. tranquebarica* ($8,7 \pm 0,6$ días a $28,2 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) y *S. olivacea* ($8,6 \pm 0,2$ días a $28,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) (Ates *et al.* 2012) y *Arenaeus cribarius* ($13,5 \pm 2,1$ días a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) (Pinheiro y Franzoso 2002).

En términos de salinidad, en *O. trimaculatus* el desarrollo embrionario se completó en todas las condiciones salinas experimentales contrastadas entre 26 y 37 ‰, aunque la condición de 30 ‰ fue la que mejores resultados arrojó en términos de supervivencia y de duración del desarrollo. Respecto del tamaño del huevo se observó el mismo patrón que en el experimento previo, mostrando un incremento significativo del tamaño del huevo para salinidades de 30 ‰, en contraste con la carencia de significancia cuando la variable medida fue “Diámetro ocular relativo” *D_{or}* (*D_{oe}*/*D_{III}*) en huevos en estadio avanzado de desarrollo, para todo el experimento. A la luz de esta información analizada en conjunto podemos estimar que el embrión crece conforme crece el tamaño del huevo, al menos en el plano laterolateral, permitiendo predecir de esta manera que las larvas eclosionadas serán de mayor tamaño en los tratamientos salinos donde los huevos tengan mayor tamaño (30 ‰). Por debajo de este valor de salinidad (i.e., a 26 de salinidad) la supervivencia y el tamaño de los huevos fue significativamente inferior que en la condición óptima y la duración de la embriogénesis mayor. Estos resultados coinciden parcialmente con los observados en otros portúnidos. Los embriones de *Portunus pelagicus* incubados bajo condiciones salinas en el rango de 5-45 ‰ sólo completan el desarrollo embrionario entre 25 y 45 ‰, pero con supervivencias superiores al 80% sólo a salinidades de 30 y 35 ‰ (Noorhuludha *et al.* 2016). En contraste, en *Portunus sanguinolentus* y *Callinectes sapidus* el desarrollo embrionario es más breve a salinidades marcadamente inferiores a los

valores normales del agua oceánica (Campbell y Fielder 1987). Asimismo, en *O. trimaculatus* la supervivencia embrionaria y el tamaño de los huevos fue significativamente inferior, y la duración de la embriogénesis mas larga a 26 ‰ que a 30 ‰. Esto sugiere que su capacidad de osmoregular es reducida y que al menos en la etapa de desarrollo embrionario este cangrejo es osmoconforme estenohalino. Esta observación se condice con la distribución exclusivamente marina de *O. trimaculatus* en su ambiente natural, aunque existen casos excepcionales donde se lo encontraron adultos en zonas de desembocadura de ríos (Lezcano comunicación personal).

En *O. trimaculatus* la modulación de la temperatura y la salinidad no afectaron el patrón cronológico del desarrollo embrionario para ninguna de las combinaciones contrastadas, lo cual refleja una ontogenia conservadora y robusta. Los resultados obtenidos no sólo contribuyen al diseño de prácticas de cultivo combinando variables ambientales para *O. trimaculatus*, sino que aportan elementos de base para la comprensión del ciclo de vida, así como también permiten pronosticar límites biogeográficos de la distribución de la especie al menos en la supervivencia embrionaria. En este sentido, la predicción de la duración del desarrollo embrionario bajo diferentes condiciones termohalinas, junto con el periodo de desove, posibilitan establecer la duración de vedas reproductivas a la pesca extractiva.

Capítulo 4

LARVAS



Introducción

La fase larvaria de los crustáceos decápodos puede incluir uno o varios estadios de desarrollo. La larva más primitiva es la nauplius, una forma rudimentaria con modo de vida planctónico, caracterizada por la presencia de tres pares de apéndices cefálicos, ojos simples y sin somitos torácicos (Dahms 2000). Esta se encuentra presente en los entomostracos (i.e., el grupo de crustáceos más primitivos), pero está ausente en el ciclo de vida de la mayoría de los malacostracos, en los cuales la embriogénesis se ha prolongado a lo largo de la evolución para dar lugar a una larva con mayor grado de desarrollo. Aun así, la secuencia de eventos del desarrollo de la nauplius ha sido retenida dentro del desarrollo embrionario de las especies de malacostracos que no poseen esta larva (Scholtz 2000). La primera larva planctónica presente en los demás grupos de decápodos es la zoea, una forma que usualmente presenta ojos compuestos y apéndices torácicos que cambian de funcionalidad, de sensorial a locomotora, a través del desarrollo (Anger 2001). En los braquiuros, las zoeas crecen a través de sucesivas mudas de crecimiento (i.e., instars larvarios) incrementando en el proceso su tamaño corporal y cantidad de apéndices hasta llegar al último estadio larvario llamado Megalopa. Esta forma, caracterizada por tener apéndices torácicos y abdomen con apéndices desarrollados (pleópodos), sufre una metamorfosis a la forma juvenil de hábito de vida generalmente bentónico (Anger 2001, Medellín-Mora *et al.* 2009).

Durante la ontogenia de los crustáceos marinos, el rango de tolerancia a las variables ambientales aumenta conforme avanza el desarrollo, siendo este más acotado en larvas que en adultos (Charmantier 1998). En la etapa larval es

habitual que los organismos queden expuestos a condiciones ambientales variables, tales como cambios en la temperatura y la salinidad así como a cambios en la disponibilidad de alimento, producto del modo de vida planctónico (Lerczak *et al.* 2001, Turner 2004, Schiffer *et al.* 2014). Como consecuencia, estas variables ambientales suelen determinar la distribución espaciotemporal de las especies (Kinne 1971, Olive 1995, Dellatorre *et al.* 2014).

La duración de los estadios de crecimiento (instars) de las zoeas decrece conforme la temperatura se aproxima a un valor óptimo (Hamasaki 2003, Luppi *et al.* 2003, Gong *et al.* 2015, Ikhwannudin *et al.* 2016). Esta aceleración en la duración puede afectar el crecimiento de la zoea debido a que conforme se reduce el tiempo de desarrollo también lo hace la biomasa acumulada en cada instar (Anger 2001). La salinidad también influye en la tasa de desarrollo y la supervivencia larvaria en la medida que las condiciones se aproximan o alejan del valor óptimo (Kinne 1971, Anger 1991, Luppi *et al.* 2003, Castejón *et al.* 2015, Ikhwannudin *et al.* 2016). Asimismo, los cambios de esta variable pueden provocar una respuesta fisiológica de las larvas, tal como la incorporación o eliminación de agua para compensar la diferencia de concentración de sales en los tejidos respecto del medio externo, lo cual puede condicionar su tamaño (Charmantier 1998, Bas y Spivak 2000).

La manipulación de los parámetros ambientales durante la incubación embrionaria y la cría larvaria y juvenil es una práctica habitual en los establecimientos acuícolas, cuyo objeto es acelerar el proceso de muda, incrementar la supervivencia y optimizar la condición de los organismos (Keenan y Blackshaw 1999, Allan y Fielder 2004, Costejón *et al.* 2015, Gong *et al.* 2015, Rahman *et al.* 2017). Previo al desarrollo de técnicas de cultivo para las larvas de una especie determinada, es necesario conocer el rango termohalino que toleran, y dentro de éste, la combinación óptima que brinde mejores resultados en términos de crecimiento y supervivencia. Para *Ovalipes trimaculatus* en particular, dado que el rango latitudinal de distribución geográfica en la costa atlántica de Sudamérica es conocido (sur de Brasil hasta cercanías de la boca de la Ría de Puerto Deseado; Melo 1985), es posible establecer predicciones aproximadas del rango de

tolerancia térmica de sus larvas sobre la base de registros ambientales *in situ* y/o de sensores remotos. Sin embargo, la determinación de las condiciones óptimas de temperatura para el cultivo larvario requiere de la realización de experimentos. Por otro lado, aunque se ha reportado que la especie posee una distribución estrictamente marina (Fenucci y Boschi 1975), datos no publicados sugieren que al menos los adultos cuentan con capacidad para tolerar condiciones estuarinas, encontrándose adultos en la playa estuarial Los Molinos, Valdivia (Pardo comunicación personal) y en un estuario de Uruguay (Lezcano comunicación personal).

En los crustáceos decápodos las etapas larvarias pueden ser lecitotróficas o planctotróficas, dependiendo de la estrategia reproductiva de cada especie (Mercier *et al.* 2013). Las larvas que suplen sus requerimientos alimentarios con reservas de vitelo materno disponibles desde el comienzo del desarrollo embrionario pertenecen al primer grupo, mientras que las que agotan sus requerimientos vitelinos tan pronto ocurre la eclosión, y que por lo tanto deben alimentarse de diferentes componentes del plancton para poder crecer y desarrollarse, forman el segundo grupo (Anger 2001, Mercier *et al.* 2013, Anger *et al.* 2015, Anger 2016). El cultivo de estas últimas requiere evaluar la calidad y la frecuencia de consumo del alimento a fin de optimizar la supervivencia, la frecuencia de mudas, la duración del desarrollo larvario, y la condición fisiológica (Anger *et al.* 1981, Baylon 2009, Calvo *et al.* 2011). Durante la etapa de cultivo de larvas planctotróficas, el productor debe mantener en forma coordinada los cultivos secundarios para producir las presas que servirán de alimento, lo cual representa un verdadero desafío y el cuello de botella en los sistemas de producción (Strathmann 2014, Azra e Ikhwanuddin 2015). Este es el caso de *O. trimaculatus*, así como de todos los cangrejos de la familia *Portunidae*, cuyas larvas poseen típicamente hábitos alimentarios planctotróficos.

En cuanto a la composición de la dieta a ofertar, *Artemia spp.* es ampliamente utilizada como alimento en acuicultura de cangrejos debido a su disponibilidad y aceptación por un gran número de especies (Lavens y Sorgeloos 2000, Sorgeloos *et al.* 2001, Dan *et al.* 2016). Sin embargo, *Artemia* es una fuente de alimento

incompleta debido a su escasez de elementos esenciales, tales como los ácidos grasos poliinsaturados n3 y n6 (AGPI), araquidónico, docosahexaenoico y eicopentanoico, generalmente necesarios para el desarrollo exitoso de larvas de crustáceos (Coutteau y Mourente 1997, Sorgeloos *et al.* 2001). Estos compuestos son esenciales para la acuicultura de crustáceos y deben ser suministrados en alimento vivo. Para mejorar el valor nutricional de *Artemia*, y aprovechando la versatilidad de su cultivo y su alimentación generalista (Sorgeloos *et al.* 2001), numerosos autores han desarrollado una serie de técnicas de enriquecimiento. Estas consisten en aumentar su calidad nutricional a través del suministro de compuestos de interés en su dieta y/o por contacto directo, utilizándola como portador de ácidos grasos, vitaminas, microalgas, antimicrobianos, vacunas y/o inóculos probióticos (Ziaei-Nejad *et al.* 2006, Azimirad *et al.* 2016). Una vez logrado el enriquecimiento, *Artemia* es ofrecida como alimento para las larvas en los establecimientos de cría (Sorgeloos 1980). Las microalgas proporcionan una alta calidad de ácidos grasos polinsaturados (PUFAs), vitaminas, pigmentos, y en la etapa exponencial del crecimiento contienen 30 a 40% de proteínas, 10 a 20% de lípidos y 5 a 15% de carbohidratos (Renaud *et al.* 1999, Brown 2002, Becker 2013). El valor nutricional de las microalgas depende principalmente de su composición química y estructura celular, y la versatilidad de su cultivo proporciona energía renovable con una elevada relación costo/beneficio (Mohebbi *et al.* 2016). Por otro lado, los probióticos en acuicultura se pueden definir como "microorganismos vivos, o una mezcla de ellos, que producen un efecto beneficioso sobre el hospedador, modificando la comunidad microbiana relacionada con él o con el ambiente en el que se desarrolla, a través de una mejora en: a) su valor nutricional, b) la respuesta del hospedador a las enfermedades, y/o c) la calidad del ambiente" (Verschuere *et al.* 2000). En las últimas décadas se ha incrementado la búsqueda de microorganismos probióticos a los fines de mejorar los rendimientos en el cultivo de organismos acuáticos, y estos han sido empleados con éxito en un amplio espectro de especies (Riquelme *et al.* 1997, Gómez-Gil *et al.* 2000, Riquelme *et al.* 2000, Vaseeharan y Ramasamy 2003, Li *et al.* 2006). Los probióticos, además de minimizar las enfermedades

ocasionadas por patógenos, han demostrado incrementar la supervivencia y biomasa de los organismos cultivados (Phianphak *et al.* 1999), y han producido efectos altamente positivos sobre la supervivencia de larvas de cangrejos portúnidos alimentadas con dietas que los incluyen (Talpur *et al.* 2012, 2013). El modelo de enriquecimiento de *Artemia*, mediante microalgas y/o inóculos probióticos, permite potenciar su valor nutricional. Por lo tanto, encontrar una buena combinación dietética de microalgas como suplemento alimenticio de *Artemia* es crucial para la optimización de su valor nutritivo, garantizando su calidad y transferencia a lo largo de la cadena trófica, lo cual permite evitar enfermedades o mejorar la supervivencia larvaria (Talpur *et al.* 2013).

Dentro del desarrollo de prácticas alimentarias, no sólo es de importancia encontrar la dieta óptima en términos de calidad, sino también es fundamental conocer la frecuencia adecuada de suministro de alimento a las larvas, tanto para mejorar su crecimiento y supervivencia como también para lograr un buen manejo de los costos requeridos para la producción, así como para evitar contaminación posterior por sobre-alimentación en los establecimientos de cría (Bosma y Verdegem 2011). En este sentido, determinar la frecuencia óptima de oferta alimentaria ayudará a entender aspectos biológicos de la especie y su flexibilidad nutricional, brindando también herramientas que garantizan el cultivo al menor costo si se está desarrollando la cría. Por estas razones, comprender la capacidad de las larvas de *O. trimaculatus* para soportar ayuno es clave para establecer una adecuada frecuencia de suministro de alimento (Dan *et al.* 2016). A partir de esta consideración, se fundamentan dos conceptos que permiten entender la flexibilidad alimentaria de las larvas a través de la experimentación. Por un lado, se define como el punto de saturación de reservas (PSR) al período mínimo de alimentación inicial requerido para acumular reservas energéticas que permitan completar el ciclo de muda de un estadio larvario a otro. Superado este tiempo, la absorción de alimentos ya no es esencial para su posterior desarrollo y muda al siguiente estadio larvario (Anger *et al.* 1981, Anger 2001). Este punto ocurre durante la transición entre las etapas de intermuda (C) y la premuda temprana (D0) del ciclo de muda, por lo cual fue denominado como "umbral D0" (Anger

1987, Anger y Spindler 1987). Por otro lado, el punto de no retorno (PNR) es el máximo período en ayuno inicial de la larva que le permite lograr el ciclo de muda (Blaxter y Hempel 1963). Superado este umbral de tiempo de ayuno, las reservas alimentarias no permitirán que las larvas muden al siguiente instar, aun cuando se les suministre alimento.

Integrando los conceptos previamente mencionados que condicionan el crecimiento y desarrollo de las larvas, el presente capítulo aborda diferentes aspectos necesarios para el conocimiento de los requerimientos de cultivo larvario, tanto en condiciones ambientales, en calidad y frecuencia alimentaria, así como también en la incorporación de inóculos probióticos para las zoeas I de *O. trimaculatus*. Los resultados, medidos en términos de crecimiento, supervivencia y vitalidad larvaria, constituirán la base de conocimiento requerido para obtener la condición más conveniente para el cultivo masivo de la primer etapa de desarrollo de las larvas de la especie.

Objetivos específicos

- Determinar experimentalmente los efectos combinados de las condiciones de salinidad y temperatura sobre la supervivencia de larvas Zoea I de *Ovalipes trimaculatus*.
- Evaluar el efecto de diferentes dietas naturales y enriquecidas con bacterias probióticas, sobre el crecimiento y la supervivencia de las larvas Zoea I de la especie.

Hipótesis generales de trabajo

- La supervivencia y el desarrollo de Zoeas I de *Ovalipes trimaculatus* será óptima en una combinación de condiciones térmicas y salinas dentro del rango de su distribución espacial.
- La supervivencia y duración de las Zoeas I se verá optimizada al incorporar una dieta enriquecida con probióticos o basada en una mezcla de microalgas.

Materiales y Métodos

Recolección de hembras ovígeras

A principios de la temporada reproductiva (octubre-diciembre) de 2015 y 2016 se colectaron 12 hembras ovígeras de *O. trimaculatus* con embriones en la última etapa de desarrollo mediante buceo autónomo sobre el submareal arenoso del golfo Nuevo, en playas cercanas a la ciudad de Puerto Madryn. Las hembras fueron transportadas al Acuario Experimental del Centro Nacional Patagónico (CCT CONICET-CENPAT). Todas las hembras fueron marcadas con bandas de goma coloreadas para su identificación, las cuales fueron colocadas alrededor del cefalotórax entre los quelípedos y el primer par de pereiópodos, de manera tal que no puedan ser removidas. Se tomaron las medidas corporales: Ancho de caparazón (AC) = 80,73: 89,9-71,3 mm (media: máx-mín). Posteriormente, las hembras fueron ubicadas individualmente, en acuarios con agua de mar filtrada y aireación continua hasta la eclosión y liberación de las Zoea I. Estas fueron luego colectadas con una pipeta de vidrio estéril y colocadas en los recipientes de cultivo larvario según el experimento previsto.

Condiciones de cultivo larval y cultivos accesorios

*Cultivo de larvas de *Ovalipes trimaculatus**

Para cada tratamiento experimental de cultivo de larvas se utilizaron recipientes plásticos estancos de 2 L de capacidad, que fueron llenados con agua filtrada a 1 µm y esterilizada mediante rayos UV. En cada uno se colocaron 100 larvas Zoea I recién eclosionadas provenientes de la misma hembra ovígera. Diariamente, las larvas de cangrejo se transfirieron a recipientes de cultivo de iguales características con agua de mar nueva y alimento utilizando una pipeta de 5 ml. El fotoperíodo de la cámara de cultivo se mantuvo en 12 : 12 h luz : oscuridad para todos los experimentos (Figura 4.1F).

Simultáneamente, se realizaron y mantuvieron en cultivo *Artemia* y cepas microalgales para su utilización como dieta de las zoeas de *O. trimaculatus*.

Cultivo de *Artemia* sp.

Para la producción de alimento se utilizaron quistes de *Artemia salina* (Biosima®). Los mismos se desinfectaron durante 10 minutos con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 5 mg / L de cloro activo y posteriormente se lavaron enérgicamente con agua dulce para eliminar cualquier resto del químico. Para el cultivo se utilizaron recipientes cilindrocónicos (“artemieros”) de 1 L de capacidad, en los que se colocaron 4 g de quistes desinfectados y agua de mar estéril a 35 °C y salinidad 15 ‰ bajo aireación e iluminación continua de 2000 lux (Lavens y Sorgeloos 1996). Luego de 20 h, tras la eclosión, los nauplius de *Artemia* se recogieron usando una malla de 250 µm de poro y se transfirieron a otro recipiente de iguales características y capacidad, con agua de mar estéril a 26 °C, salinidad 33 ‰ y fotoperiodo (12:12 h) controlado. Se contó con un set de 8 recipientes de cultivo, que producían continua y diariamente nauplius de *Artemia* hasta su utilización como alimento presa de las larvas de *O. trimaculatus* para todos los experimentos que se detallarán a continuación (Figura 4.1B).

Cultivo de microalgas

Se mantuvieron en cultivo cepas monoespecíficas de las microalgas marinas *Nannochloropsis* sp, *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros* sp. Todas ellas son cepas habitualmente usadas en acuicultura y fueron proporcionadas por la Estación de Fotobiología de Playa Unión, Rawson. Los cultivos se realizaron en el Acuario Experimental del CCT CENPAT-CONICET, para los cuales se utilizaron como recipientes botellas de vidrio con agua de mar esterilizada ajustada a una salinidad final de 30 ‰ y enriquecida con el medio de nutrientes f / 2 (Guillard y Ryther 1962). Para el cultivo de *Chaetoceros* sp. se suplementó adicionalmente una solución de silicato (30 mg • l⁻¹) al medio f / 2. Los recipientes fueron ubicados dentro de una cámara de cultivo

con temperatura controlada a 22 ± 1 °C, iluminación continua y aireación leve y constante. Periódicamente se registró el número de células usando una cámara de Neubauer y una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial (cinco días desde el inicio) con aproximadamente 10^5 - 10^6 células por mililitro. Estos cultivos se utilizaron como alimento tanto de las larvas de *O. trimaculatus* como de *Artemia* (Figura 4.1 A y C).

Tanto los procedimientos del cultivo de *Artemia* como los cultivos de las cepas microalgales fueron tareas realizadas por la tesista, así como también la ejecución de todos los experimentos realizados llevados a cabo en el Acuario Experimental del CCT CONICET-CENPAT.

Medición de variables respuesta de las zoeas de *O. trimaculatus*

Para evaluar la efectividad de todos los tratamientos realizados en los 4 experimentos larvarios (ver más abajo), se registró la supervivencia, la duración (en días) que tarda en mudar al siguiente estadio (Zoea II), la cantidad de Zoeas II obtenidas, y la motilidad como variables respuesta.

La supervivencia se determinó diariamente como el número de larvas vivas respecto del número de larvas totales al inicio del experimento ($n = 100$) mediante la siguiente fórmula:

$$S = 100 \times \frac{V}{T}$$

donde "S" es el porcentaje de larvas vivas en el recipiente de cultivo, "V" es el número de larvas vivas y "T" es el número total de larvas en el recipiente, incluyendo larvas vivas y muertas. Las larvas fueron consideradas muertas cuando no se observaron movimientos corporales ni pulsos intestinales peristálticos bajo estereomicroscopio.

Esta variable se midió diariamente, desde el día 1 de Zoea I hasta la muda al siguiente estadio, o bien hasta que haya muerto la larva.

Además, se reportará el éxito de mudas E definido como:

$$E = 100X \frac{V}{T}$$

donde E es el porcentaje de larvas Zoea II vivas al segundo día de vida, respecto de las Zoeas II obtenidas en el recipiente de cultivo, “V” es el número de larvas Zoea II vivas y “T” es el número total de larvas Zoea II en el recipiente, incluyendo larvas vivas y muertas.

Si bien muchas larvas Zoeas II lograron mudar con éxito y sobrevivida, luego de varios días murieron sin lograr obtener Zoeas III. Es por eso que todos los experimentos a continuación realizados fueron acotados y terminados cuando la zoeas murieron o cuando tuvieron 1 día de vida en Zoea II.

Diariamente también se inspeccionó cada larva para obtener la cantidad de Zoeas II obtenidas por cada tratamiento: n_{ZII} , y

La duración media (en días) de la intermuda hasta obtener la ZII = D .

El estadio de desarrollo fue determinado a simple vista y con una fuente de luz cercana o con estereomicroscopio, observando la longitud total fácilmente estimada en comparación a las demás larvas y características morfológicas, siguiendo la clasificación de los estadios larvarios para *O. trimaculatus* propuesta por Schoeman y Cochroft (1996) la cual muestra que la Zoea II es significativamente mayor en tamaño y los ojos se vuelven pedunculados. Una vez alcanzado el estadio Zoea II, al siguiente día las larvas fueron retiradas de los recipientes de cultivo, concluyendo el experimento.

La motilidad larvaria se midió en términos de desplazamiento de las Zoeas I en respuesta al estímulo lumínico, teniendo en cuenta el fototaxismo positivo que presentan durante este instar larvario. Para ello, al quinto día de cada experimento, se seleccionaron aleatoriamente 10 larvas Zoea I (muestra de cada

tratamiento) y se colocaron en un vaso de vidrio rectangular (15 × 10 × 1 cm, alto x largo x ancho) grillado con 150 ml de agua de mar esterilizada. El recipiente de vidrio se colocó en el interior de una caja de 30 x 30 cm iluminada con luz difusa y tenue. Por encima del recipiente se adosó una lámpara led apagada (Figura 4.1D). Las zoeas se colocaron en el fondo del recipiente, se encendió la lámpara led y se registró el tiempo (en segundos) que demoraron en desplazarse desde la parte inferior hacia la parte superior del vaso grillado. Luego, se calculó el tiempo de desplazamiento vertical D_v como el tiempo en segundos que demora la Zoea I en recorrer un centímetro en dirección vertical. Cuando las larvas demoraron más de 180 segundos (3 minutos) en llegar a la parte superior del vaso y su desplazamiento fue aleatorio, se descartó la medición.

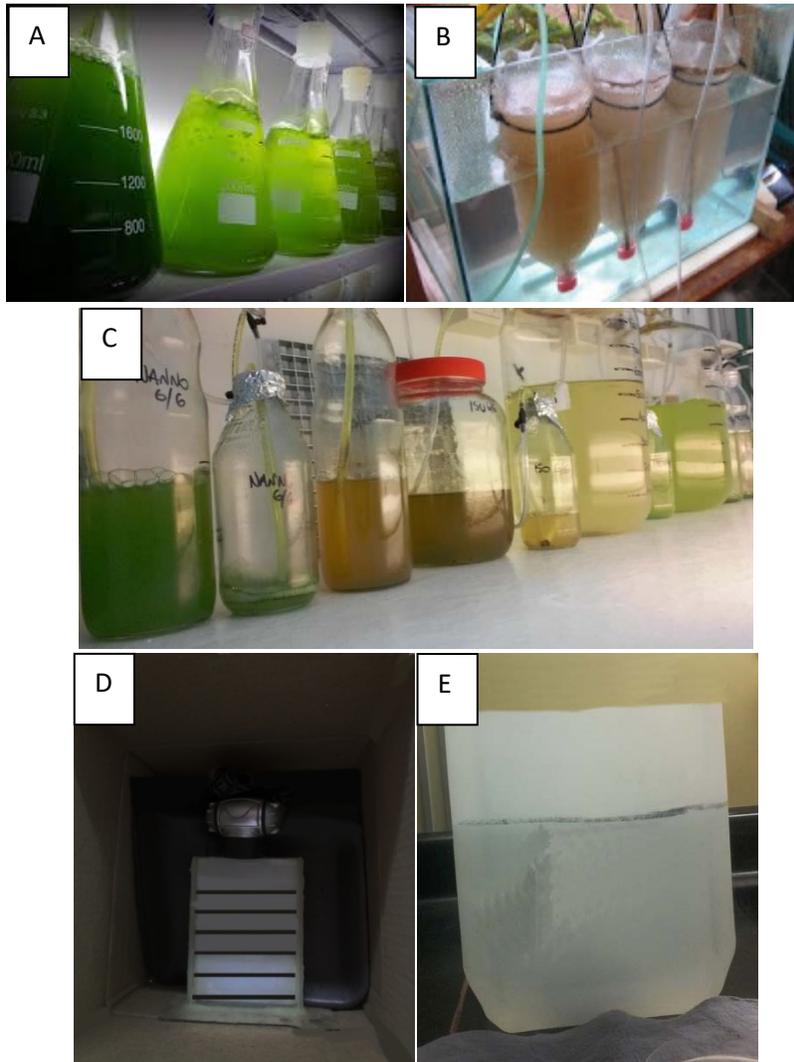


Figura 4.1. Cultivos larvario y accesorios. A: cepario de microalgas; B: Artemieros; C: Cultivo de microalgas; D: Cámara de medición de motilidad de larvas. Longitud vertical 10 cm. y E: Recipientes de cultivo de larvas de *O. trimaculatus* (4 L).

Diseño experimental

Con el objetivo de hallar experimentalmente las mejores condiciones para el cultivo de las larvas de *Ovalipes trimaculatus*, se diseñaron cuatro grupos de experimentos utilizando como objeto de estudio el primer estadio de Zoea (I):

- Suministro de *Artemia* enriquecida con diferentes cepas microalgales
- Suministro de probióticos
- Frecuencia de alimentación
- Regulación de condiciones termohalinas

Todos los tratamientos de los cuatro experimentos mencionados fueron aplicados a un total de 300 Zoeas I, las cuales fueron ubicadas en grupos de a 100 Zoeas I por recipiente (2 L). Cada uno de los recipientes contenía Zoeas I originarias de la misma hembra ovígera. De esta forma, cada tratamiento cuenta con $n = 100$, por triplicado, provenientes de diferente descendencia, tal como figura en la Tabla a continuación:

Experimento i		
Tratamiento i_1		
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
$n = 100$	$n = 100$	$n = 100$

Donde "i" corresponde al tipo de experimento a realizar, dentro del cual hay una cantidad variable de tratamientos " $i_{1..x}$ ".

Experimento I: Suministro de *Artemia* enriquecida con diferentes cepas microalgales

Con el fin de generar diferentes tipos de alimento para las Zoea I de *O. trimaculatus*, se realizaron “experimentos de enriquecimiento” de nauplius de *Artemia*. Estos fueron alimentados con diferentes cepas de microalgas con el propósito de evaluar efectos sobre la tasa de ingesta, crecimiento, desarrollo y composición bioquímica.

I a. Enriquecimiento de nauplius de Artemia

Se fijaron seis tratamientos alimenticios (por duplicado), cinco de ellos constituidos por cultivos microalgales monoespecíficos y uno multiespecífico conformado por cantidades iguales (en ml) de todas las cepas microalgales cultivadas. (Tabla 4.1). Los nauplius de *Artemia* recién nacidos se transfirieron a recipientes de cultivo cilindro-cónicos de 1 L de capacidad, con agua de mar estéril (Figura 4.1B), colocados en un baño de agua a 26 °C usando dos termostatos sumergidos. Cada recipiente contó con aireación continua y con una densidad de aproximadamente 40 nauplius / ml de acuerdo a lo propuesto por Schoeman y Cockcroft (1996) para las zoeas de *O. trimaculatus*. La densidad de microalgas ofertadas como alimento a los nauplius de *Artemia* se mantuvo constante en el orden de 10^6 células / ml durante todo el experimento (Wickins 1972, Chakraborty *et al.* 2007), tanto para los tratamientos dietarios monoalgales como para el tratamiento MIX conformado por partes iguales (1/6 parte de cada cultivo monoalgal) proporcionando de esta manera el mismo volumen final de alimento en todos los tratamientos.

Tabla 4.1. Tratamientos dietarios para *nauplius* de *Artemia*

Tipos de dieta	Abreviatura
Tratamiento 1: <i>Nannochloropsis sp.</i>	Nanno
Tratamiento 2: <i>Chaetoceros sp.</i>	Chaeto
Tratamiento 3: <i>Dunaliella salina</i>	Duna
Tratamiento 4: <i>Isochrysis galbana</i>	Iso
Tratamiento 5: <i>Tetraselmis suecica</i>	Tetra
Tratamiento 6: MIX microalgal	Mix

Para evaluar la calidad nutritiva de las artemias bajo los diferentes regímenes dietarios, se tomaron muestras de *Artemia* enriquecida en los seis tratamientos (Tabla 4.1) con una malla de 150 μm desde el inicio del experimento (Tabla 4.2). Las muestras fueron pesadas con una balanza analítica de 0,001 g de precisión, secadas bajo estufa a 65 °C durante 48 h hasta llegar a peso constante (AOAC 1990), y pesadas nuevamente luego del secado a fin de determinar el contenido de humedad. El contenido de proteína bruta se determinó por el método colorimétrico (Lowry *et al.* 1951); el de lípidos se determinó utilizando el método de extracción Bligh Dyer (Bligh y Dyer 1959); el de cenizas se obtuvo calcinando las muestras en el horno a 550 °C durante 8 h (AOAC 1990) comparando los valores de pesos previo y posteriores al calcinado, y los carbohidratos se determinaron por diferencia entre el peso total y el de los demás componentes bioquímicos.

Tabla 4.2. Cronograma de muestreo de nauplius de *Artemia* sujetas a diferentes tratamientos de enriquecimiento para las determinaciones morfométricas y bioquímicas.

Hora	Alimentación	Toma de muestra
0:00	X	X
0:15		X
0:30		X
...		...
12:00		X
12:15		X
12:30		X
...		...
24:00	X	X
24:15		X
24:30		X
...		...
36:00		X
48:00		X

Referencia: Hora: indica el tiempo de vida de las *Artemias*; Las cruces “X” indican en “Alimentación”: los momentos donde se enriqueció a las artemias; y en “Toma de muestra” indican todos los momentos donde se extrajo una muestra para analizar el crecimiento mediante medidas morfométricas y la calidad mediante estudios bioquímicos.

Para medir el crecimiento de los nauplius y determinar la tasa de ingesta en cada uno de los tratamientos en cada tiempo de muestreo, se tomaron 10 nauplius por tratamiento (Tablas 4.1 y 4.2). Las muestras fueron preservadas en solución de alcohol al 70% en agua de mar. Posteriormente, los nauplius se individualizaron con fórceps bajo estereomicroscopio de disección Leica (modelo DM2500) con un aumento total de 50X. Sobre la base de las dimensiones corporales en μm : Longitud total L_t , longitud total del tracto digestivo L_{td} , y longitud de tracto digestivo con alimento L_{tda} medidas con el programa Leica Application Suite (V 4.5) se calculó la tasa de ingesta TI de acuerdo a la fórmula:

$$TI = \frac{L_{tda}}{L_{td}} \times 100$$

Este índice funciona como un indicador de la capacidad portadora (capacidad *carrier*) de los nauplius de *Artemia* para transportar un componente nutricional adicional en su intestino.

Los estadios de crecimiento (instars) de los nauplius se determinaron en las mismas muestras tomando en cuenta la longitud total y la aparición de los apéndices, de acuerdo a la metodología propuesta por Cohen *et al.* (1999).

I b. Suministro de nauplius de Artemia en la dieta de las Zoea I de O. trimaculatus

A fin de determinar el crecimiento y la condición de las Zoea I de *O. trimaculatus* alimentadas con nauplius de *Artemia* enriquecidas, 100 larvas de *O. trimaculatus* fueron seleccionadas al azar (por triplicado) para los nueve tratamientos dietarios (Tabla 4.3). Las larvas fueron colocadas en recipientes de 2 L de capacidad con agua de mar previamente filtrada. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado (Total 300 Zoea I por tratamiento). En todos los casos, los nauplius fueron cultivados como lo explicado anteriormente y se mantuvieron enriquecidos durante 24 h antes de ofrecerlos a las Zoea I de *O. trimaculatus* como alimento.

Tabla 4.3. Régimen dietario de las Zoea I de *O. trimaculatus*

Tratamiento	Abreviatura
1. <i>Artemia</i> nauplius sin enriquecer (s / e)	Art s/e
2. MIX microalgal sólo	Sólo Mix
3. <i>Artemia</i> enriquecida 24 h con <i>Nannochloropsis</i> sp.	Nanno
4. <i>Artemia</i> enriquecida 24 h con <i>Chaetoceros</i> sp.	Chaeto
5. <i>Artemia</i> enriquecida 24 h con <i>Dunaliella salina</i>	Duna
6. <i>Artemia</i> enriquecida 24 h con <i>Isochrysis galbana</i>	Iso
7. <i>Artemia</i> enriquecida 24 h con <i>Tetraselmis suecica</i>	Tetra
8. <i>Artemia</i> enriquecida 24 h con Mix microalgal	Mix
9. Sin suministro de alimento	Ay

Referencia: Para cada uno de los 12 tratamientos se asignaron 100 Zoeas I (por triplicado) aleatoriamente.

Diariamente, se realizó el recambio del 100% del agua de mar filtrada y se suministró a las Zoea I el alimento correspondiente a cada tratamiento (Tabla 4.3), el cual provenía de los cultivos microalgales y de artemias descritos anteriormente. La densidad final de los nauplius de *Artemia* fue de 2 a 4 individuos / ml. En todos los tratamientos, exceptuando el tratamiento 9 “Ay” (sin suministro de alimento) se adicionó MIX microalgal, conformado por partes iguales de cultivos monoalgales con el objetivo en el tratamiento “Solo MIX” de evaluar el efecto de la dieta conformada exclusivamente por microalgas, y en los demás experimentos para complementar al enriquecimiento de las artemias y que no existan variaciones por las tasas de ingesta *TI* variable de alimento en los intestinos de los nauplius de *Artemia* que se evidenciaron en el experimento 1.a. Además, información previa en experimentos piloto han evidenciado que sin suministro microalgal en la dieta, las larvas prácticamente no mudaban al próximo instar.

La densidad de microalgas ofertadas como alimento a los nauplius de *Artemia* se mantuvo constante durante el experimento (Wickins 1972, Chakraborty 2007) la cual fue aproximadamente en el orden de 10^6 células / ml. El MIX microalgal fue

conformado por partes iguales (1/6 parte de cada cultivo monoalgal previamente detallado).

Durante el recambio diario de agua se registró la supervivencia (S), crecimiento según D y $nZII$, y el día 5 de experimentación se midió la motilidad según el desplazamiento vertical Dv (cm/seg). Todos los experimentos se realizaron a $13 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ y salinidad $33 \pm 1 \text{ }_{\text{‰}}$. El fotoperiodo se fijó en 12 : 12 h luz : oscuridad.

Experimento II: Suministro de probióticos

Con el objetivo de evaluar el efecto que producen las bacterias probióticas en la condición fisiológica de las Zoea I de *O. trimaculatus* se suministraron 2 cepas, tanto bioencapsuladas dentro de nauplius de *Artemia* como inoculadas directamente en el agua de cultivo. Ambas cepas fueron aisladas previamente del ambiente marino de la región Patagónica y pertenecen a los géneros *Lactococcus* (cepa P2-TW34) y *Bacillus* (cepa P1-T39). De esta forma, se aplicaron 5 tratamientos, cada uno con tres réplicas (Tabla 4.4). Los probióticos fueron cultivados por el Laboratorio de Biotecnología del CESIMAR-CONICET. Las concentraciones de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizadas y resultantes en el agua de cultivo fueron las siguientes:

- TW34 bioencapsulada en *Artemia sp*: $2,42E+02$ UFC/nauplius, quedando en dilución en el recipiente de cultivo larvario $1,14E+06$ UFC/nauplius;
- T39 bioencapsulada en *Artemia sp*: $3,28E+03$ UFC/nauplius, quedando en dilución en el recipiente de cultivo larvario $1,02E+05$ UFC/nauplius.

En todos los tratamientos experimentales, tanto el agua de cultivo de las Zoea I como la utilizada para el cultivo de *Artemia* fue filtrada a $1\ \mu\text{m}$ y esterilizada con rayos UV para asegurar que sólo el inóculo bacteriano probiótico esté presente en cada experimento. Los nauplius de *Artemia* fueron cultivados bajo condiciones extremas de esterilidad, pero siguiendo el método detallado en el experimento previo, manteniendo 15 ‰ de salinidad / 30°C de temperatura durante la eclosión y 33 ‰ de salinidad / 26°C luego de la eclosión y tras el inóculo probiótico durante 24 h para asegurar su incorporación. Una vez incorporados los probióticos, se suministró *Artemia* viva a las larvas de *O. trimaculatus*.

Todos los tratamientos se llevaron a cabo en recipientes de 2 L de capacidad conteniendo agua de mar previamente filtrada (1 μm) y esterilizada con UV. En cada una de 3 réplicas se colocaron 100 Zoea I. Diariamente, se cambió el 100% del agua y se suministró el alimento descrito en cada tratamiento (Tabla 4.4). En los tratamientos donde se inoculó el probiótico en el agua de cultivo (Tablas 4.4.3 y 4.4.4) y en los casos donde no se inoculó probiótico (control), se proporcionó nauplius de *Artemia* (s / e) estéril. En todos los tratamientos se adicionó al agua de cultivo MIX microalgal. La metodología para el registro de supervivencia, éxito de muda, crecimiento y motilidad de las Zoea I, así como las condiciones termohalinas durante el cultivo fueron idénticas a las empleadas en la fase de alimentación del experimento I.

Tabla 4.4. Tratamientos del Experimento II: Suministro de probióticos a las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus*

Tratamiento	Abreviatura
1. Probiótico T39 bioencapsulado en <i>Artemia</i>	P1
2. Probiótico TW34 bioencapsulado en <i>Artemia</i>	P2
3. Probiótico T39 inoculado en agua de cultivo	P1 agua
4. Probiótico TW34 inoculado en agua de cultivo	P2 agua
5. Control: <i>Artemia</i> sin probiótico	Control

Referencia: Para cada uno de los 12 tratamientos se asignaron 100 Zoeas I (por triplicado) aleatoriamente.

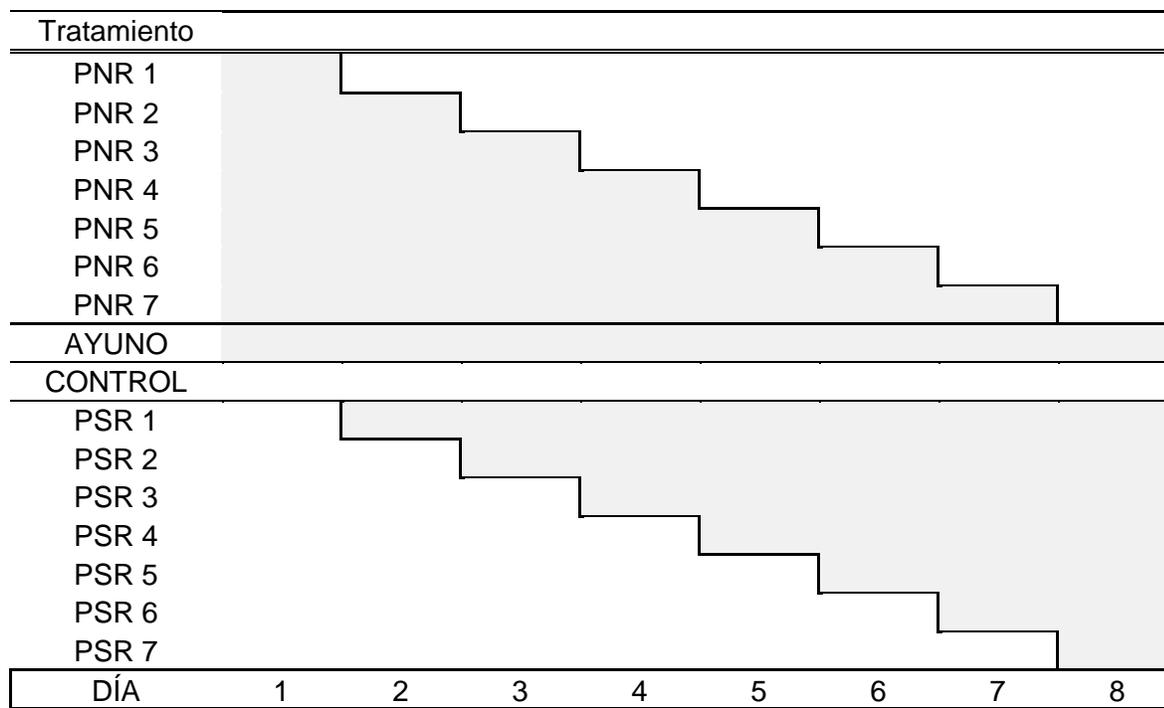
Experimento III: Frecuencia de suministro alimentario

Con el fin de hallar la frecuencia óptima de suministro de alimento para las Zoea I de *O. trimaculatus* que provea los nutrientes necesarios para lograr la muda al siguiente estadio de desarrollo larvario, así como comprender la plasticidad nutricional que tienen estas larvas para soportar períodos de ayuno previo y posterior a la alimentación, se pusieron a prueba tratamientos con varios cronogramas de alimentación (Tabla 4.5). Tal como se describió en la sección de introducción, se emplearon los conceptos de PNR (punto de no retorno) y PSR (punto de saturación de reservas) para la puesta a prueba del experimento. Los experimentos de ayuno (PNR) comprendieron tratamientos donde las larvas fueron expuestas a períodos iniciales variables de inanición (1-7 días), seguidos de períodos de alimentación diaria continua (Tabla 4.5). El experimento de alimentación (PSR), por el contrario, las larvas fueron expuestas en diferentes tratamientos con periodos iniciales de alimentación (1-7 días), seguidos de periodos de ayuno continuo. Asimismo, un tratamiento control (alimentación diaria siempre) y uno de ayuno (inanición siempre) fueron contrastados para conocer el desempeño estándar y la tolerancia máxima de ayuno, respectivamente. Las frecuencias de alimentación en ambos experimentos fueron diarias. Las razones por las cuales se eligió dicha frecuencia pretenden no solo conocer la plasticidad nutricional y tolerancia al ayuno de las zoeas I, sino también aportar información a cronogramas de cultivo en establecimientos de cría, donde la frecuencia diaria implica una practicidad operativa mayor.

En total se contrastaron 16 tratamientos (Tabla 4.5), 7 pertenecientes al experimento de ayuno (PNR), 7 pertenecientes al experimento de alimentación (PSR), 1 perteneciente al tratamiento control y 1 perteneciente al tratamiento de ayuno continuo. Para cada uno de estos, se utilizaron grupos de 100 Zoeas I de *O. trimaculatus* por recipiente de cultivo, por triplicado. Cada triplicado proviene de 1 hembra ovígera diferente ($n = 3$ total), con el objetivo de minimizar el efecto

materno. Las larvas fueron cultivadas en recipientes de 2 L con agua de mar filtrada a 1 μm y esterilizada con UV. Diariamente se realizó el recambio del 100% del agua de mar y se suministraron nauplius de *Artemia* enriquecidas durante 24 h con Mix de microalgas. Además, se incorporó mix microalgal al agua de cultivo como complemento de la alimentación por las razones expresadas en la metodología del precedente experimento. La supervivencia, éxito de muda, crecimiento y motilidad de las larvas fueron determinadas durante cada recambio de agua empleando el mismo método que en los dos experimentos previos. Todos los experimentos se realizaron bajo condiciones constantes de $13\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ de temperatura y 33 ± 1 ‰ de Salinidad. El fotoperiodo se fijó en 12 : 12 h luz : oscuridad.

Tabla 4.5. Régimen alimentario: experimento sobre frecuencia de suministro de alimento en las Zoea I de *O. trimaculacus*.



Referencia: Cuadros en blanco y gris representan días en que se suministró alimento o se mantuvo a las Zoea I en ayuno, respectivamente. Para cada uno de los 12 tratamientos se asignaron 100 Zoeas I (por triplicado) aleatoriamente.

Experimento IV: Condiciones ambientales

Con el objeto de establecer las óptimas condiciones termohalinas para el cultivo larvario en términos de tiempo del desarrollo, crecimiento y supervivencia, se realizó un experimento matricial contrastando combinaciones de 3 condiciones térmicas y 4 salinas (Tabla 4.6). En todos los casos la alimentación de las Zoea I fue a base de *Artemia* enriquecida durante 24 h con Mix microalgal y Mix microalgal en el medio de cultivo.

El rango térmico para la experimentación fue elegido teniendo en cuenta la distribución latitudinal de la especie abarcando desde el sur de la costa de Brasil hasta el golfo San Jorge en la costa Argentina (Melo 1985, Vinuesa 2005). Las combinaciones salinas fueron elegidas según la condición salina del mar, que en el área de muestreo ronda los 33,8 ‰. Para la elección de los valores experimentales de los tratamientos se tomó también en cuenta la información resultante del experimento termohalino realizado para los embriones según se detalla en el capítulo previo. Por lo tanto, la cantidad de tratamientos térmicos fueron menores que en los experimentos embrionarios debido a que se eligieron los valores de temperatura representativos que optimizaron el desarrollo embrionario. Respecto de la salinidad, se utilizó el rango salino usado en el experimento de salinidad de embriones (Tabla 3.2), debido a que se desconocía si las larvas eran capaces de tolerar condiciones de salinidad diferentes a la condición control.

Previo al inicio de los experimentos, los valores de ambas variables fueron modificados gradualmente (1 unidad por día) hasta lograr el valor establecido. Esto evita shocks térmicos o salinos que pudieran sufrir las larvas, los cuales pueden ocasionar la muerte a causa de la liberación de carotenos cuando se desnaturalizan las proteínas ante subas térmicas o bien a causa de desequilibrios osmóticos irreversibles.

Todos los tratamientos contaron con 3 réplicas, y fueron llevados a cabo en recipientes con 2 L de agua de mar conteniendo 100 larvas cada uno. Cada replica provenía de una hembra ovígera diferente.

Tabla 4.6. Diseño matricial de combinaciones termohalinas para el cultivo de larvas Zoea I de *Ovalipes trimaculatus*.

Matriz termo-halina de cultivo de zoeas I de
O. trimaculatus

Temperatura (°C)	Salinidad (‰)
13	26
	30
	33
	37
18	26
	30
	33
	37
22	26
	30
	33
	37

Referencia: Para cada uno de los 12 tratamientos se asignaron 100 Zoeas I (por triplicado) aleatoriamente.

En todos los tratamientos se realizaron recambios diarios del 100% del agua de mar filtrada junto con la alimentación. Durante el recambio diario de agua se tomaron registros de supervivencia, éxito de muda, crecimiento y motilidad de acuerdo a la metodología descrita para los experimentos previos.

Para los 4 experimentos se fijó a un fotoperíodo 12 : 12 h de luz : oscuridad, simulando el ciclo de luz natural al tiempo de experimentación.

Análisis estadístico

En los experimentos 1.b, 2 y 3 los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA de una vía, donde la variable categórica fue el tratamiento alimentario contrastado. Para el análisis de los experimentos 1.a y 4 las variables categóricas “tiempo y dieta” y “temperatura y salinidad” respectivamente, fueron utilizadas en un ANOVA de dos vías. Cuando los supuestos de normalidad y homocedacia no se cumplieron, se aplicaron transformaciones de raíz cuadrada a los datos, y en caso de no verificarse su cumplimiento se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis. Posteriormente, comparaciones a *posteriori* de a pares se realizaron utilizando el test de Tukey.

En el experimento III en particular, con el objetivo de estimar el PSR50 y PNR50, los datos del porcentaje de mudas fueron ajustados usando una curva sigmoidea con la ecuación basada en Gebauer *et al.* (2010)

$$y = \frac{a}{(1 + \exp(\frac{b-x}{c}))}$$

Donde “y” es el porcentaje de mudas al siguiente estadio, en los diferentes tiempos en días de alimentación (Experimento PSR) y días de ayuno (Experimento PNR) representados por “x”, “a” es el mayor porcentaje de mudas obtenido, “b” es la cantidad de días a PSR₅₀ y PNR₅₀ y “c” es la pendiente de la curva.

Una vez estimados los índices PSR₅₀ y PNR₅₀ correspondientes al período en días donde el 50% de las larvas mudaron al siguiente estadio en los experimentos de alimentación (PSR₅₀) y ayuno (PNR₅₀), se calculó el índice de vulnerabilidad nutricional (IVN)

$$NVI = \frac{PSR50}{PNR50}$$

Este índice fue calculado siguiendo a Gebauer *et al.* 2010, quienes explican que valores de $NVI > 1$ indican que la larva tiene dependencia fuerte de alimento externo, mientras que valores < 0.5 reflejan una baja dependencia de alimento externo (Gebauer *et al.* 2010).

Resultados

Experimento I: Suministro de *Artemia* enriquecida con diferentes cepas microalgales

I a. Enriquecimiento de nauplius de *Artemia*

El enriquecimiento de los nauplius de *Artemia* bajo diferentes dietas microalgales varió significativamente según la cepa microalgal utilizada en los seis tratamientos de enriquecimiento durante 48 h. Los datos biométricos de *Artemia* (Figura 4.2) muestran que todos los tratamientos probados fueron suficientemente nutritivos para lograr crecer y mudar a los siguientes estadios de crecimiento (instar) de las nauplius (Figura 4.2A) siguiendo lo reportado por Cohen y colaboradores (1999). En términos generales, el tratamiento MIX microalgal resultó en longitudes (Lt) de nauplius significativamente mayores (ANOVA de dos vías $F = 3,99$; $p < 0,05$), seguido del tratamiento Chaeto y Tetra (Tabla 4.7, Figura 4.2B). Los tratamientos Nanno, Iso y Duna presentaron el Lt más bajo (Tabla 4.7, Figura 4.2B). Estudios preliminares permitieron conocer el largo total (Lt) promedio de las Zoea I de *O. trimaculatus* para el sitio de muestreo, el cual es de aproximadamente $1,9 (\pm 0.19)$ mm). En relación a esto, se observó que existe un "límite de captura" del tamaño de sus presas, el cual no debe superar los 700 μ m aproximadamente. Esta talla es obtenida en gran proporción por las artemias a las 24 h de vida (Figuras 4.2 y 4.3). Superado este tamaño, las presas no podían ser capturadas por las Zoea I. Tomando esto en consideración, resulta relevante señalar que no se encontraron diferencias significativas en el Lt medio de los nauplius de *Artemia* alimentados 24 h bajo diferentes tratamientos, pero si se encontraron diferencias en el Lt al finalizar el experimento, siendo el tratamiento con la cepa *Dunaliella salina* la que tuvo un Lt significativamente inferior. (Tabla 4.7). De todas formas puede observarse un crecimiento menor en las nauplius de *Artemia* enriquecidas con con *Nannochloropsis sp* (Figura 4.2).

Los diferentes tratamientos de enriquecimiento de *Artemia* tuvieron efectos significativos sobre la tasa de ingesta *TI* (%) (Figura 4.3, Tabla 4.7) a lo largo de los tiempos de muestreo de los experimentos. A los 15 minutos luego de la alimentación (0.15 y 24.15 h) (Tabla 4.2) los nauplius de *Artemia* presentaron un alto porcentaje de ingesta (alto *TI*) para todos los tratamientos dietarios. Pero en términos generales, las artemias alimentadas con *Chaetoceros* tuvieron un menor *TI* (%) en el tiempo 0.15 h (Figura 4.3). En los momentos donde los nauplius estuvieron en ayunas (12, 24, 36 y 48 h) el índice *TI* (%) fue estadísticamente diferente entre tratamientos (ANOVA de dos vías; $F = 7,73$, $p < 0,0001$). En $t = 24$ h (ayuno), el índice *TI* (%) presentó valores significativamente altos para los tratamientos de MIX, y Chaeto (59,3, 61%, respectivamente) pero menores para los tratamientos Nanno e Iso (0 y 26%, respectivamente). Quince minutos más tarde ($t = 24:15$ h, Figura 4.3) los nauplius de *Artemia* mostraron valores significativamente mayores para todos los tratamientos. En el tiempo de ayuno 36 h el patrón se repitió, mostrando los valores más altos en el tratamiento Mix (69%) y más bajos en el tratamiento Iso y Tetra (26 y 16%, respectivamente) (Figura 4.3). En términos generales bajo el tratamiento MIX los nauplius de *Artemia* presentaron los valores más altos de *TI* (%). Mediante este índice se evidencia que la alimentación de *Artemia* enriquecida con Iso, Tetra y Nanno resultó en un rápido vaciamiento intestinal en periodo de ayuno (Figura 4.3).

Respecto de la composición bioquímica, se observaron diferencias significativas en las muestras de *Artemia* bajo diferentes tratamientos de enriquecimiento y en distintos tiempos del experimento (Tabla 4.8, Figura 4.4). En general, los tratamientos utilizados para enriquecer los nauplius de *Artemia* aumentaron el contenido porcentual de proteínas y redujeron el de carbohidratos a lo largo del crecimiento (Figura 4.4). El contenido porcentual de cenizas y lípidos presentó comportamientos diferentes a lo largo del experimento dependiendo del tratamiento aplicado (Figura 4.4). El contenido porcentual de ceniza no cambió bajo el tratamiento “Duna”, mientras que en otros tratamientos presentó fluctuaciones, (e.g., “Mix” y “Chaeto”) donde se duplicó a las 24 h. El contenido porcentual de lípidos se mantuvo constante durante todo el experimento de enriquecimiento de *Artemia*, teniendo fluctuaciones leves, siendo el tratamiento “Mix” el que mayor contenido mostró, seguido del tratamiento “Iso”. En contraste, el contenido porcentual de carbohidratos decreció en términos generales, mostrando un pico en el tiempo 24 h en las cepas “Nanno” y “Duna”. Respecto de la proteína, se observó un patrón creciente en todas las cepas, siendo “Mix” y “Duna” las que mayor contenido porcentual obtuvieron, mostrando un pico en el tiempo 24 h, seguido del tratamiento “Chaeto”. (Figura 4.4, Tabla 4.8).

Tabla 4.7. Resultados de los ANOVA de dos vías para las variables respuesta para Largo total (Lt), Instar (I) y Tasa de ingesta (TI) de *Artemia* del experimento de enriquecimiento con diferentes cepas de microalgas.

	F.V.	SC	G		F	p
			L	CM		
Largo total (<i>Lt</i>)	Dieta	448864,61	5	89772,92	19,53	0,0001
	Tempo	3372025,66	8	421503,21	91,69	0,0001
	Tiempo*Dieta	733709,404	40	18342,74	3,99	0,0001
Instar (<i>I</i>)	Dieta	15,78	5	3,16	15,73	0,0001
	Tempo	293,80	8	36,72	183,03	0,0001
	Tiempo*Dieta	30,81	40	00,77	3,84	0,0001
Tasa de Ingesta (<i>TI</i>)	Dieta	342,77	5	68,55	18,33	0,0001
	Tempo	3845,72	8	480,71	128,52	0,0001
	Tiempo*Dieta	1156,89	40	28,92	7,73	<0,0001

Referencia: Los valores de *TI* (%) fueron transformados con raíz cuadrada. Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

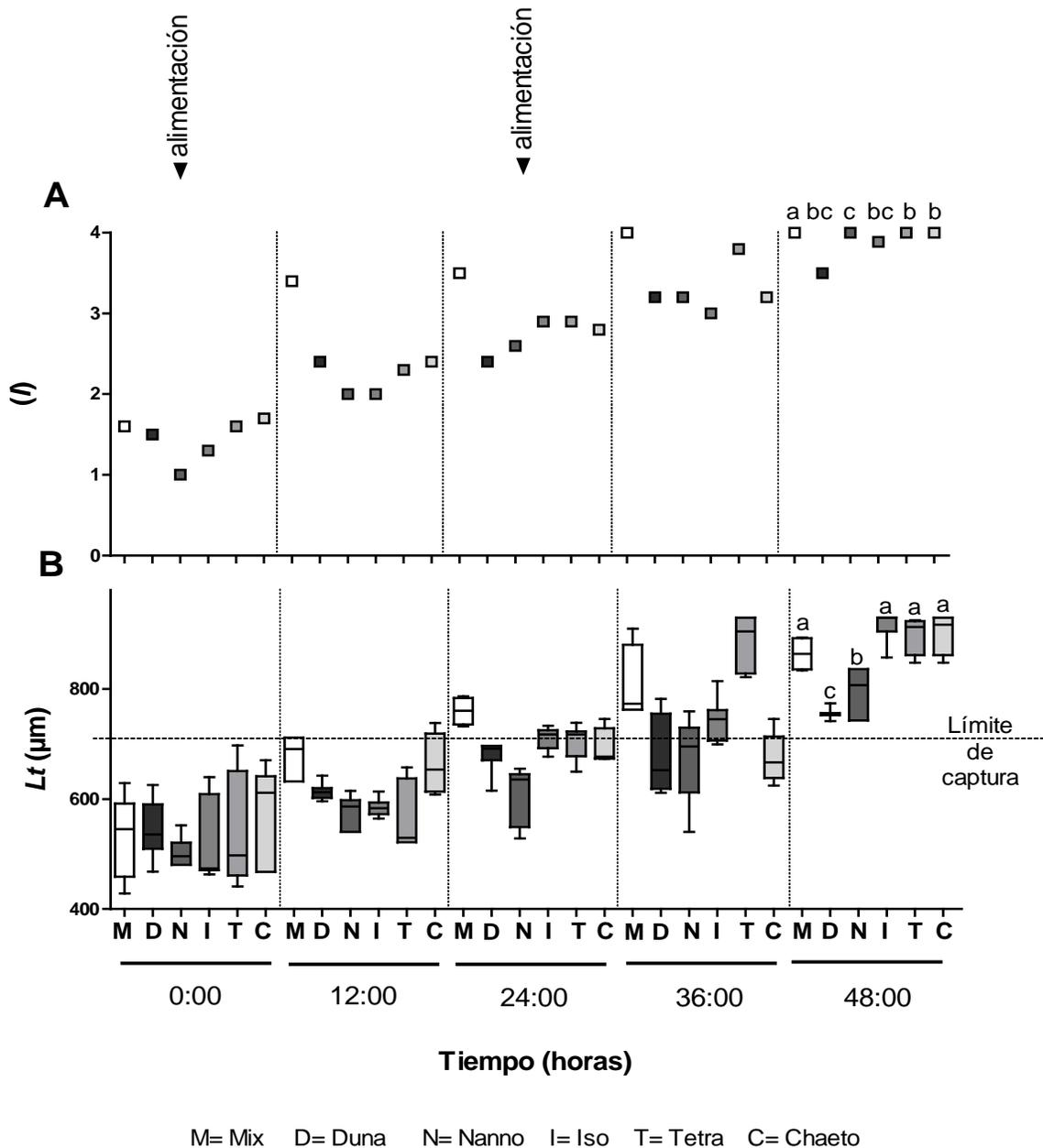


Figura 4.2. Gráfico de cajas de medidas morfométricas de los nauplius de *Artemia* cultivados bajo diferentes tratamientos dietarios: A) Instar (*I*) de *Artemia* y B) Largo total (*Lt*) de *Artemia*. Las letras mayúsculas en el eje X representan las iniciales de cada tratamiento dietario, también representadas mediante escala de grises. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Tukey.

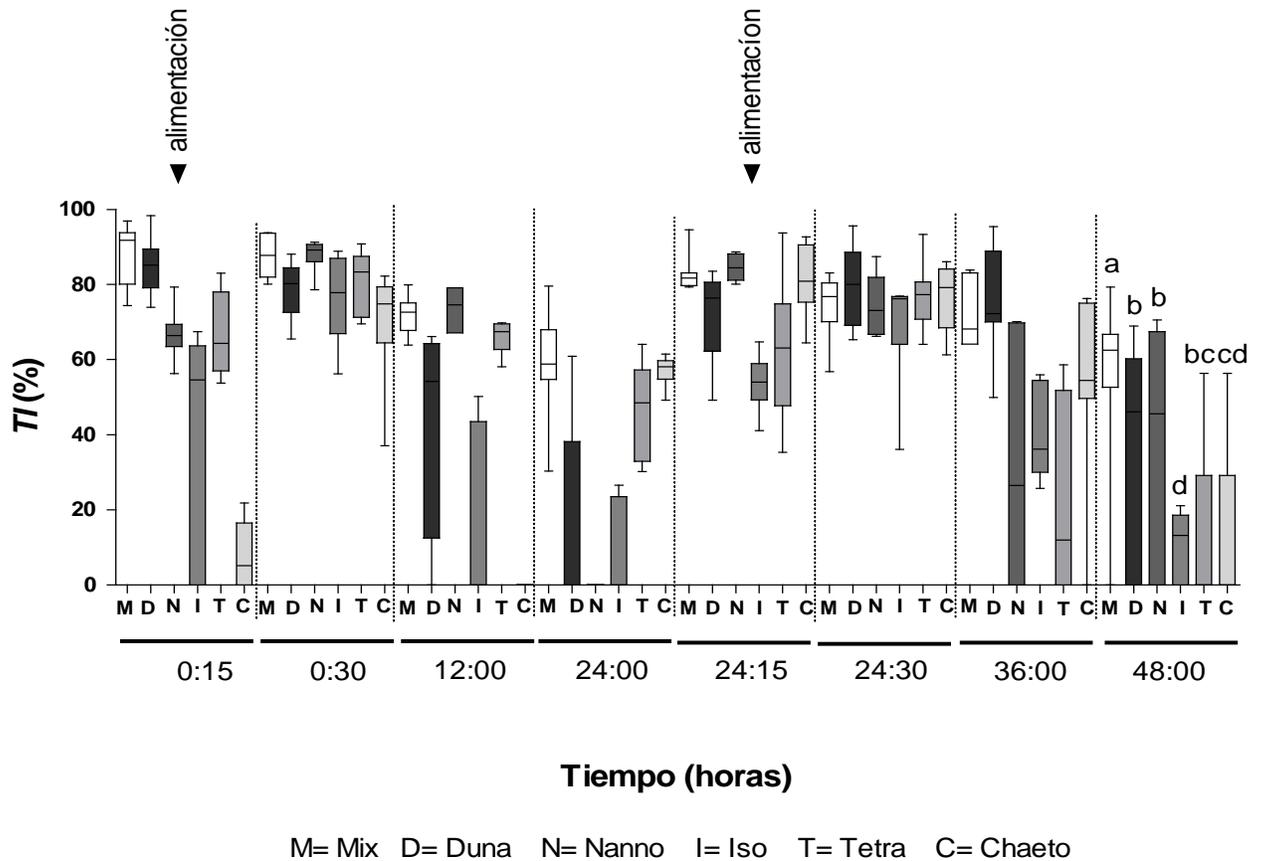


Figura 4.3. Gráfico de cajas de la tasa de ingesta (TI) (%) representando el porcentaje del tracto digestivo de los nauplius de *Artemia* con contenido de microalgas en diferentes tratamientos dietarios. Las letras mayúsculas en el eje X representan las iniciales de cada tratamiento dietario, también representadas mediante escala de grises. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Tukey.

Tabla 4.8. Resultados de los ANOVA de dos vías para la composición bioquímica proximal de los nauplius de *Artemia* enriquecidos bajo seis tratamientos de alimentación con microalgas en distintos tiempos de crecimiento.

Composición proximal (%)	Variables	SC	GL	CM	F	p
Humedad	microalga	407,87	5	81,57	2,4	0,06
	Tiempo	134,32	4	33,58	0,99	0,42
	microalga*tiempo	336,52	20	16,83	0,5	0,94
Cenizas	microalga	8,45	5	1,69	10,22	<0,001
	Tiempo	1,74	4	0,43	2,63	0,054
	microalga*tiempo	6,33	20	0,32	1,91	0,052
Proteínas	microalga	106,82	5	21,36	3	0,026
	Tiempo	301,77	4	75,44	10,59	<0,001
	microalga*tiempo	614,42	20	30,72	4,31	0,0003
Lípidos	microalga	2,27	5	0,45	2,82	0,033
	Tiempo	4,15	4	1,04	6,42	0,007
	microalga*tiempo	16,87	20	0,84	5,22	<0,001
Carbohidratos	microalga	242,17	5	48,43	12,03	<0,001
	Tiempo	326,48	4	81,62	20,28	<0,001
	microalga*tiempo	938,9	20	46,95	11,66	<0,001

Referencia: Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

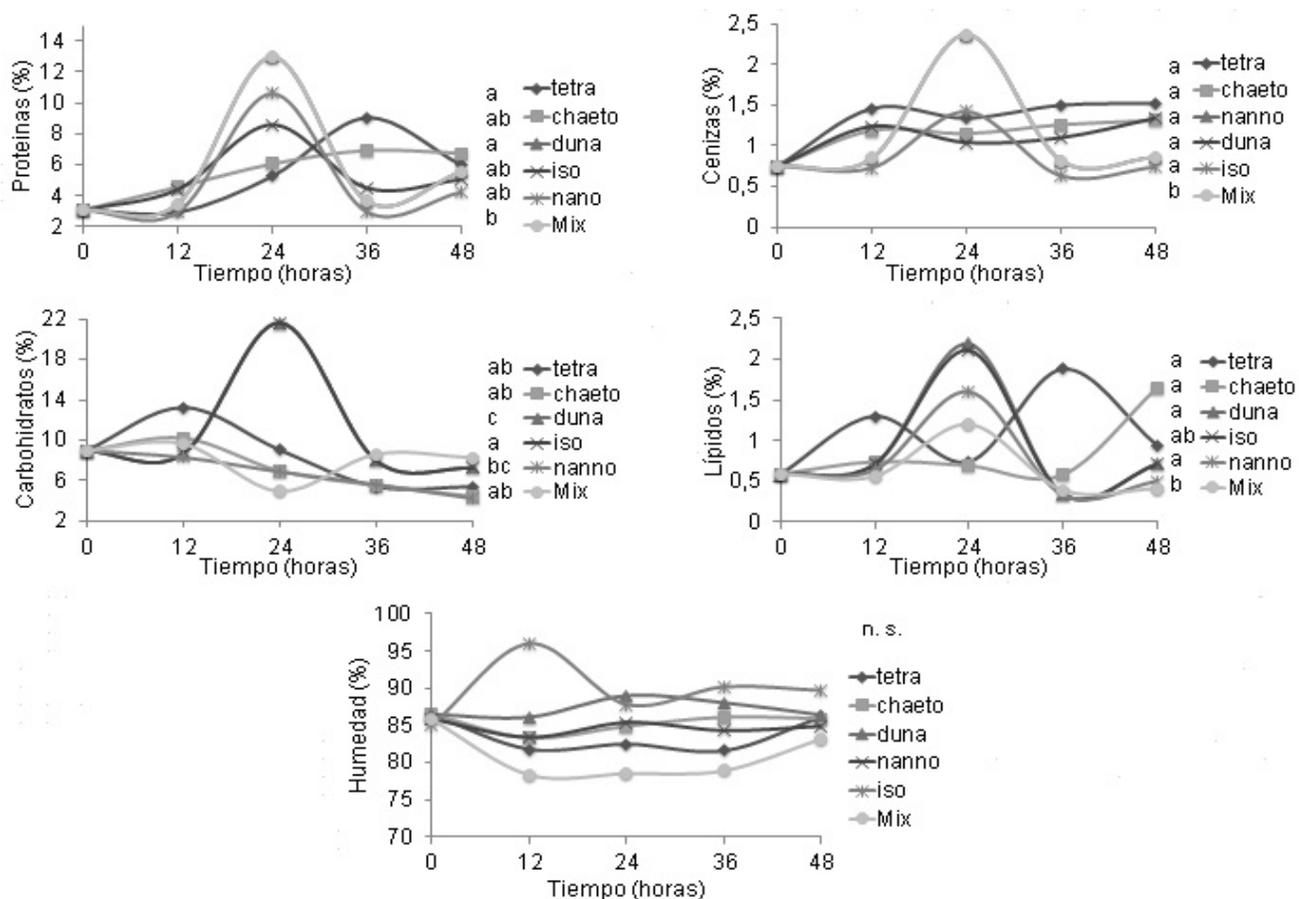


Figura 4.4. Gráfico de dispersión de la composición proximal (%) a lo largo del tiempo para las artemias enriquecidas con diferentes cepas microalgales. Cada grafico representa un componente proximal y cada una de las líneas representa un tratamiento dietario. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos y n.s. representa “no significativo” según contrastes *a posteriori* empleando la prueba de Tukey.

Ib. Suministro de nauplius de *Artemia* en la dieta de las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus*

El crecimiento y el estado fisiológico de las Zoea I de *O. trimaculatus* después de 15 días de cultivo mostraron diferencias en *S* (supervivencia), el desarrollo medido según *nZII* y *D* y la motilidad medida como *Dv* dependiendo del tratamiento aplicado a los nauplius de *Artemia* suministrados como alimento (Figura 4.5, Tabla 4.9). Entre los nueve tratamientos del experimento, las Zoeas alimentadas con *Artemia* enriquecida con MIX (Mix) obtuvieron un éxito de muda *E* mayor, con valores promedio de $96 \pm 5,04\%$, seguidas por las alimentadas con *Artemia* enriquecida con *Nannochloropsis sp.* (Nanno). De todas maneras, todos los tratamientos donde se ofertó alimento *Artemia* enriquecidas con diferentes cepas microalgales tuvieron un *E* alto. Respecto de la supervivencia, los mayores valores también fueron obtenidos en el tratamiento de *Artemia* enriquecido con Mix microalgal, siendo estos también los que obtuvieron mayores cantidades de mudas a Zoea II. Las Zoeas alimentadas sólo con *Artemia* (Art s/e) y las ayunadas (Ay) sólo sobrevivieron 6 días y no lograron mudar al siguiente estadio. Estas diferencias están reflejadas en la prueba de Kruskal Wallis ($H = 67,23$, $p < 0,05$).

El desarrollo, medido como cantidad de mudas al siguiente estadio de crecimiento (*nZII*) y como duración de la intermuda (*D*), mostró el mismo comportamiento que la supervivencia (Figura 4.5; Kruskal Wallis: $H = 33,62$, $p < 0.001$). El porcentaje de mudas al estadio *nZII* fue significativamente mayor (60%) en las Zoea I del tratamiento MIX que en el resto de los tratamientos (Tabla 4.9). En los demás tratamientos el porcentaje de mudas al estadio *nZII* varió dentro del 20-30%, excepto en el tratamiento de “*Artemia* sin enriquecer”, en el que ninguna de las larvas logró mudar.

El desplazamiento vertical (*Dv*), utilizado como un indicador de la condición fisiológica de las Zoea I de *O. trimaculatus*, fue significativamente mayor en el tratamiento MIX (promedio: 1,19 cm / seg) que en el resto de los tratamientos

(Kruskal Wallis: $H = 50,17$, $p < 0,001$). En otros tratamientos Dv fluctuó entre 0,79 y 0,56 cm / seg (Nanno, Duna e Iso). Se alcanzó un Dv muy bajo con Chaeto (0,35 m / s) y Tetra (0,3 m / s), en tanto que sólo se observaron leves movimientos en las Zoea I ayunadas (0,06 m / seg). No se contó con larvas para comprobar la motilidad en el tratamiento de *Artemia* sin enriquecer.

Tabla 4.9. Resultados de las pruebas Kruskal Wallis para la comparación de la supervivencia (S), porcentaje de muda al segundo instar (*nZII*) y desplazamiento vertical (*Dv*) entre tratamientos de alimentación de las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus* con 8 dietas alternativas.

Kruskal Wallis		
Variable	H	p
S (%)	67,23	0,05
D (días)	41,26	0,0001
<i>Dv</i> (cm/seg)	50,17	0,0001
<i>nZII</i>	33,62	0,0001
E (%)	91,22	0,0001

Referencia: Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

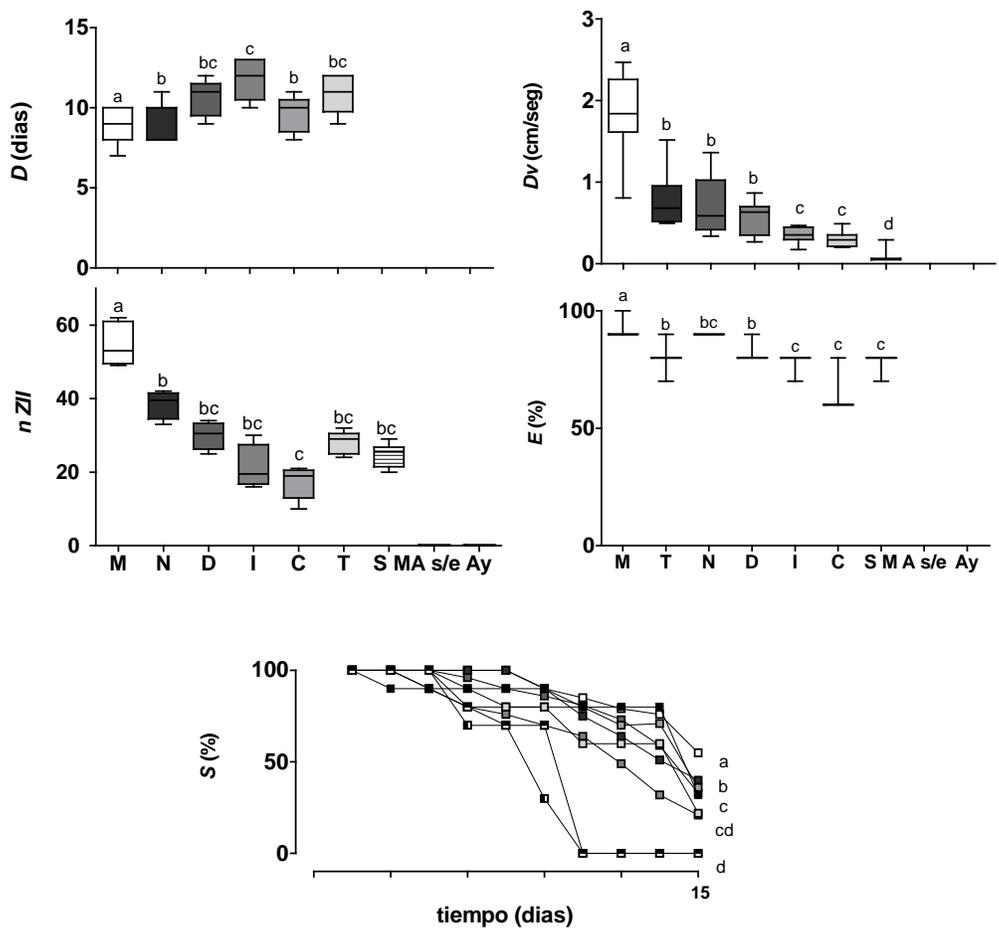


Figura 4.5. Gráficos de caja de la Duración de la primer intermuda (*D*), desplazamiento vertical (*Dv*) de las Zoea I, Éxito de las Zoeas II (*E*) y la Supervivencia (*S*) de Zoeas I de *Ovalipes trimaculatus* en nueve tratamientos de dieta alternativa. M: Mix; N: Nanno; D: Duna; I: Iso; C: Chaeto; T: Tetra; S M: Solo Mix; A s/e; Ay. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes *a posteriori* empleando la prueba de Dunn.

Experimento II: Suministro de probióticos

El suministro de bacterias probióticas en las Zoea I de *O. trimaculatus* mostró diferencias significativas en *S* (%), *D* (días), *Dv*, *nZII* y *E* (%) entre tratamientos tanto proporcionadas en medio de cultivo como encapsuladas en *Artemia* (Tabla 4.10). La inoculación de probióticos en el agua de cultivo resultó en valores promedio de 59,8% de supervivencia, el cual es significativamente superior en comparación con el resto de los tratamientos (ANOVA, $F = 8,91$, $p < 0,001$, Tabla 4.10, Figura 4.6). En el mismo sentido, los tratamientos en los que se inocularon cada una de las cepas de probióticos en agua fueron los únicos en los que la motilidad (*Dv*) resultó significativamente mayor que en el tratamiento control (ANOVA, $F = 5,95$, $p = 0,004$, Tabla 4.10, Figura 4.6). Aunque *n ZII* también fue significativamente mayor en los tratamientos de inoculación en agua, respecto de los de inoculación mediante la incorporación de los nauplius de *Artemia*, los primeros no difirieron significativamente del tratamiento control (Tabla 4.10, Figura 4.6). La inoculación del probiótico T39 en agua de cultivo (tratamiento P1 agua) resultó en una duración de la intermuda (*D*) significativamente menor que en el resto de los tratamientos (ANOVA, $F = 9,48$, $p < 0,001$, Tabla 4.10, Figura 4.6). En comparación, los tratamientos en los que el inóculo probiótico fue encapsulado en *Artemia* no mostraron buenos resultados y en repetidas oportunidades se pudo observar bajo lupa a *Artemia* alimentándose de las Zoea I de *O. trimaculatus* moribundas, siendo esta una observación casual. El Éxito de muda *E* fue para todos los tratamientos elevado, pero sin diferencias significativas según el análisis estadístico. En síntesis, los resultados muestran que el suministro de bacterias probióticas resulta en efectos positivos sobre la supervivencia, crecimiento y condición de las Zoea I de *O. trimaculatus* cuando estas son inoculadas en el agua de cultivo. Dentro de ellas, las bacterias del género *Bacillus* sp. arrojaron mejores resultados en términos de reducción de la duración de la intermuda (*D*) (Tabla 4.10, Figura 4.6).

Tabla 4.10. Resultados de los ANOVA para la supervivencia (S), cantidad de Zoea I que mudan al siguiente estadio de crecimiento (*nZII*), duración de intermuda (D) y desplazamiento vertical (Dv) de Zoeas I de *Ovalipes trimaculatus* bajo el suministro de dos cepas de bacterias probióticas proporcionadas en agua de cultivo o encapsuladas en *Artemia* sobre Las variables S, D y Dv fueron transformadas con raíz cuadrada.

Variable	SC	gl	CM	F	p
S (%)	15634,53	4	3908,63	8,91	<0,0001
D (días)	58,14	4	14,54	9,48	<0,0001
Dv (cm/seg)	0,47	4	0,12	5,95	0,0004
E	11225,9	4	2658,7	1,25	0,22
<i>n ZII</i>	3820,37	4	955,09	5,15	0,0005

Referencia: Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

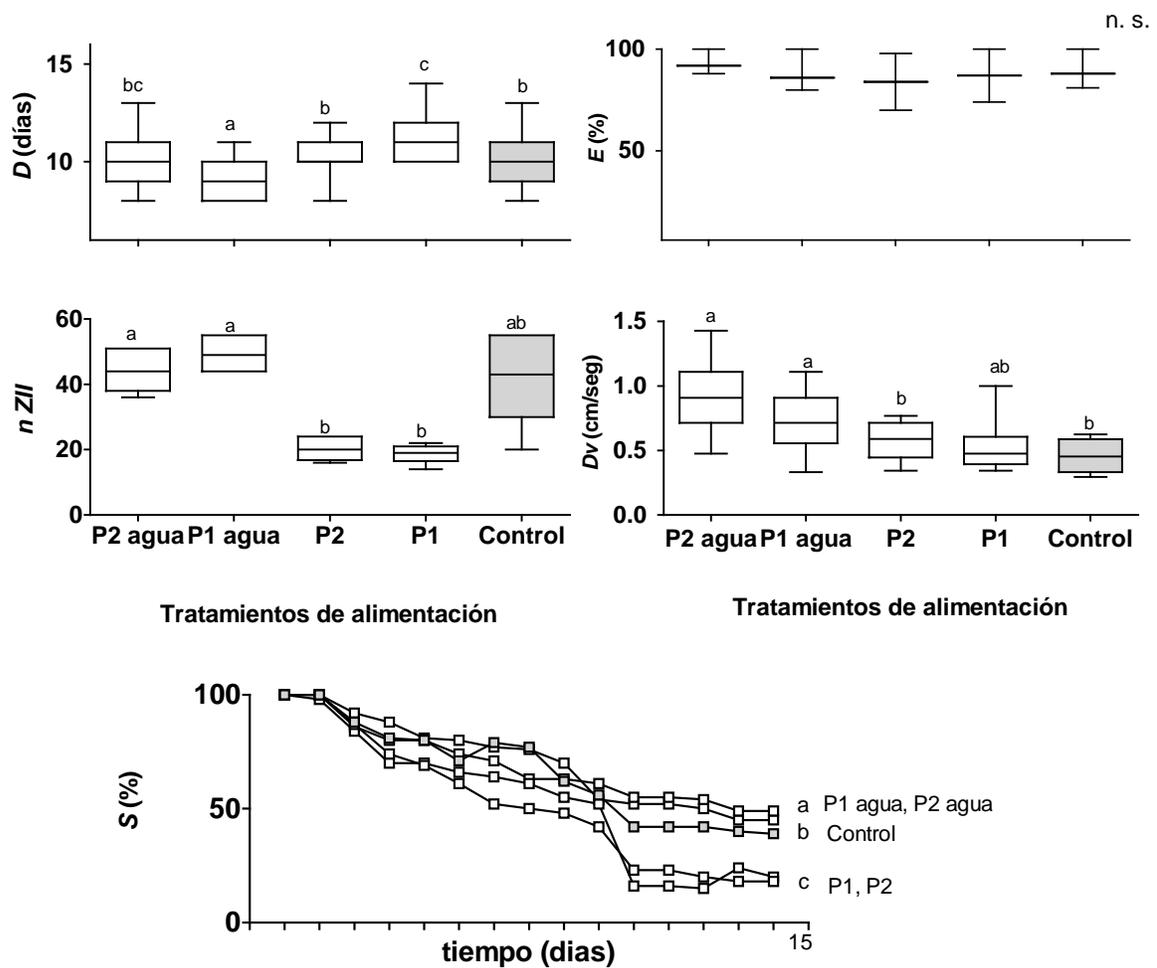


Figura 4.6. Gráfico de cajas de la duración de intermuda (D), supervivencia (S), cantidad de Zoea I que mudan al siguiente estadio de crecimiento ($nZII$) y desplazamiento vertical (Dv) para Zoeas I de *O. trimaculatus* cultivada bajo diferentes tratamientos de suministro de cepas de bacterias probióticas. P1 y P1 agua: probiótico T39 bioencapsulado en *Artemia* o inoculado en agua de cultivo, respectivamente; P2 y P2 agua: probiótico TW34 bioencapsulado en *Artemia* o en agua de cultivo respectivamente. Control: cultivo sin inóculo de bacterias probióticas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos y n. s. representa “no significativo” según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Tukey. El relleno gris representa el tratamiento control.

Experimento III: Frecuencia de suministro alimentario

La supervivencia (S), duración de intermuda (D), la cantidad de mudas de Zoea I de *O. trimaculatus* al siguiente estadio de crecimiento ($n\ ZII$) y el Éxito de muda (E) variaron significativamente dependiendo de la frecuencia con la que se ofertó el alimento y de la duración de los períodos de ayuno (Tabla 4.11). En términos generales, en los tratamientos en que se suministró una alimentación regular diaria al menos durante el primer y segundo día de vida (i.e., tratamientos PSR2) las Zoea I lograron acumular reservas de alimento necesarias para lograr la muda al siguiente estadio de crecimiento, aunque con reducida S , $n\ ZII$ y E (Tabla 4.11, Figura 4.7). Por el contrario, en los tratamientos que incluyeron entre 4 y 7 días de ayuno previo a la primera alimentación (i.e., tratamientos PNR) no se logró completar los requerimientos alimentarios de las Zoea I necesarios para lograr la muda, y estas murieron aún cuando se les ofertó alimentación diaria posteriormente (Figura 4.8, Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Resultados de los ANOVA de comparación entre los efectos de tratamientos con un número variable de días de alimentación previo al ayuno (PSR), y entre tratamientos con un número variable de días de ayuno previo a la alimentación diaria (PNR), sobre la supervivencia (*S*), la duración de la intermuda (*D*), cantidad de mudas al siguiente estadio de crecimiento (*n ZII*) y el éxito de muda (*E*) de las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus*. Las variables *S* y *D* fueron transformadas con raíz cuadrada y \log_{10} respectivamente.

Variable	SC	Gl	CM	F	p
S					
PSR	69333	8	8666,7	7,8	<0,0001
PNR	68824	8	8603	7,5	<0,0001
D					
PSR	187,63	8	23,45	12,66	<0,0001
PNR	426,38	8	53,3	20,1	<0,0001
<i>n ZII</i>					
PSR	635,83	8	79,48	24,8	<0,0001
PNR	533	8	66,63	16,07	<0,0001
E					
PSR	25733	8	3676,2	294,1	<0,0001
PNR	27917	8	3988,1	95,71	<0,0001

Referencia: Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

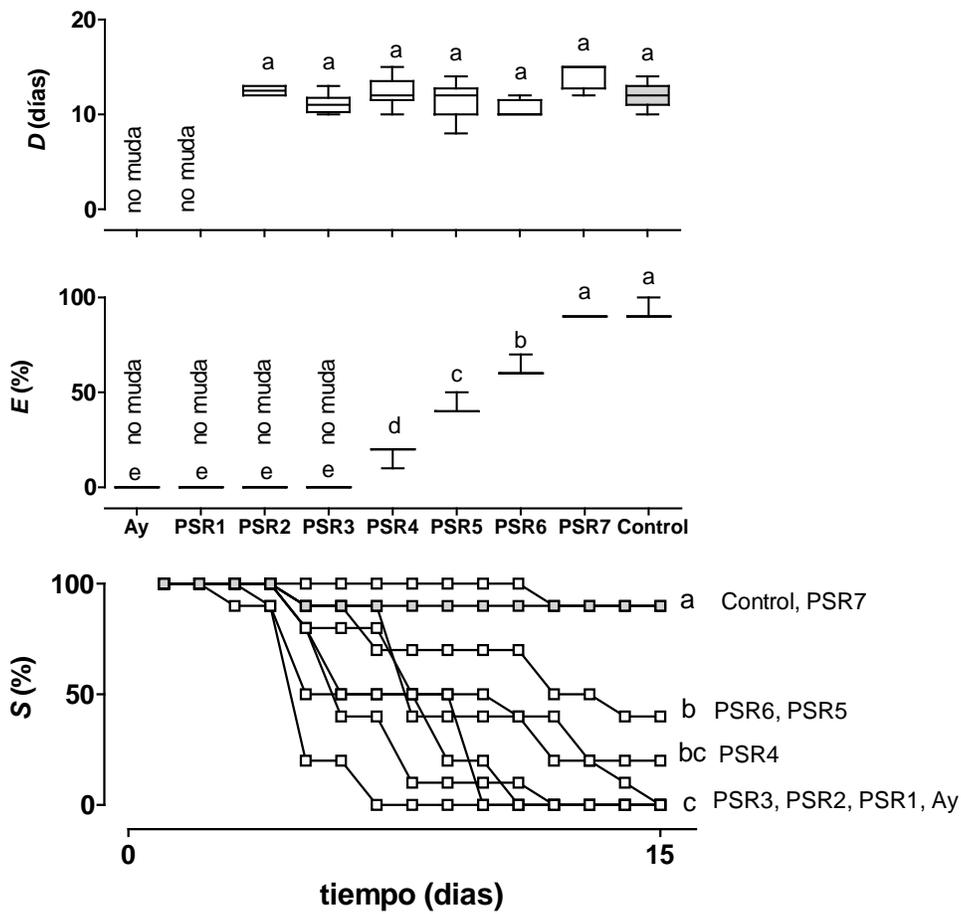


Figura 4.7. Gráfico de cajas de duración de intermuda (D), el éxito de mudas (E) y supervivencia S (%) de las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus* en experimentos en que se suministró alimento por un número variable de días seguido por días de ayuno (Experimento PSR). Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes *a posteriori* empleando la prueba de Tukey. El color gris representa el tratamiento control.

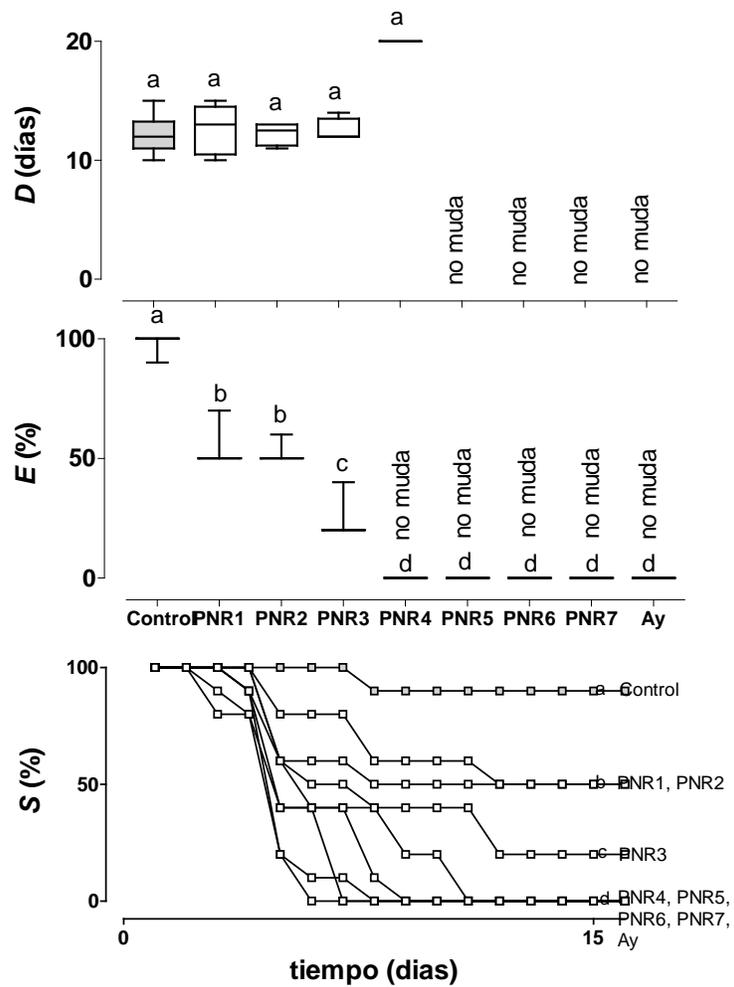


Figura 4.8. Gráficos de cajas de la duración de intermuda (D), el éxito de muda (E) y supervivencia S (%) de las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus* en experimentos donde se mantuvo en ayuno por un número variable de días seguido por días de alimentación diaria (Experimento PNR). Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes *a posteriori* empleando la prueba de Tukey. El color gris representa el tratamiento control.

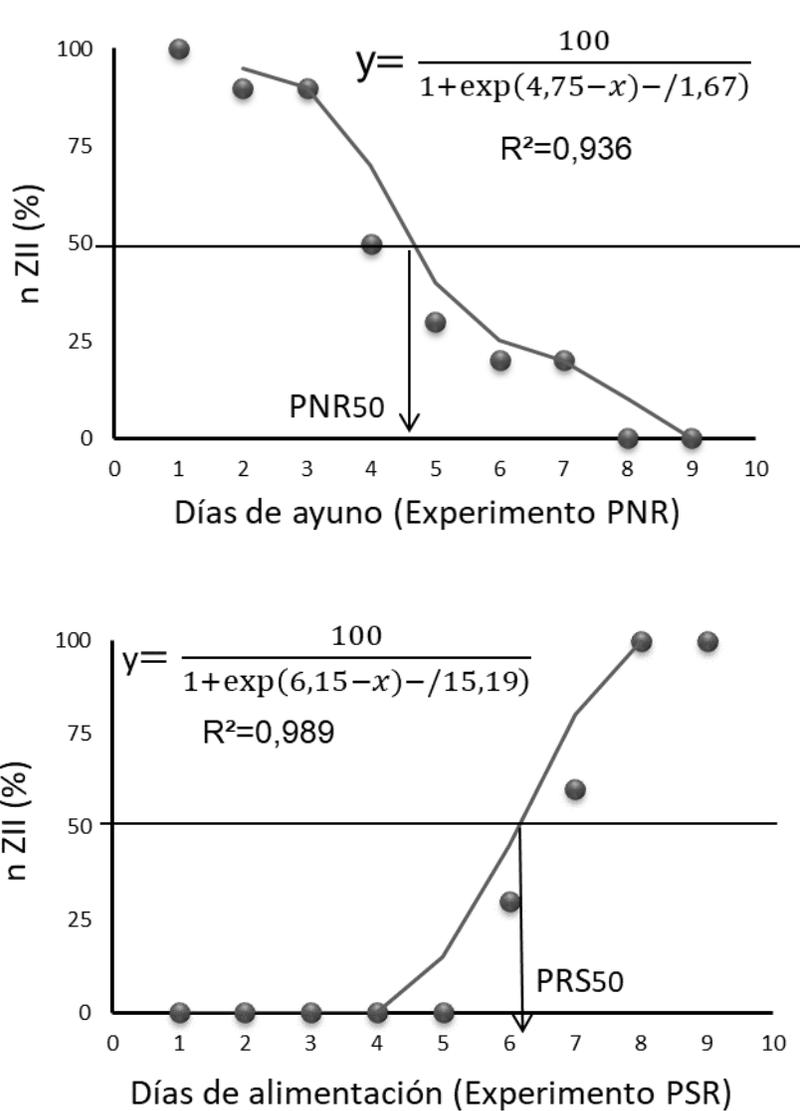


Figura 4.9. Porcentaje de larvas mudadas al siguiente estadio (ZII %) ajustado a una curva sigmoidea para estimar los índices PNR₅₀ y PSR₅₀. R² es el coeficiente de la regresión. La ecuación contiene los parámetros estimados (Ver página 104).

Con los valores estimados de PSR₅₀ y PNR₅₀ se puede calcular el índice de vulnerabilidad nutricional, definido por Gebauer (*et al.* 2010) según la siguiente ecuación:

$$NVI = \frac{PRS50}{PNR50}$$

$$NVI = \frac{6,15}{4,75} = 1.294$$

Experimento IV: Condiciones ambientales

El crecimiento, la supervivencia y la condición fisiológica de las Zoea I de *O. trimaculatus* variaron significativamente dependiendo de las condiciones del cultivo larvario (Tabla 4.12). Las larvas cultivadas a salinidad 30 ‰ mostraron igual o mejor desempeño en todas las variables respuesta (Figura 4.10). El tratamiento de salinidad 30 ‰ y los dos tratamientos de mayor temperatura resultaron en n *ZII* y E significativamente mayores al resto de los tratamientos (Figura 4.10). La supervivencia S fue significativamente mayor en tratamientos de salinidad 30 y 33 ‰, no siendo influenciada por la temperatura (Tabla 4.12, Figura 4.10). Por otro lado, la motilidad (Dv) fue significativamente mayor en el tratamiento de salinidad 30 ‰ y temperaturas 18° y 22°C (Tabla 4.12, Figura 4.10). Respecto de la duración de intermuda D , las variables ambientales mostraron interacción (ANOVA, $F = 13,81$, $p < 0,0001$) con lo cual es necesario analizar cada combinación matricial por separado, donde la combinación 22 °C-30 ‰ representó la condición ambiental donde la duración del ciclo de muda fue menor.

En términos generales, la integración de los resultados obtenidos sugiere que la condición de salinidad 30 ‰ y las temperaturas más elevadas: 18° y 22°C redujeron los tiempos de intermuda en un 32 y 47% respectivamente. Además obtuvieron una mayor cantidad de mudas a Zoea II y con alto Éxito, sin desmedro de la supervivencia y con una condición fisiológica óptima, estimada por la motilidad (Figura 4.10).

Tabla. 4.12. Resultados de los ANOVA de dos vías para las variables supervivencia (S), desplazamiento vertical (*Dv*), duración de intermuda (*D*), Éxito de mudas (*E*) y cantidad de mudas al siguiente estadio de crecimiento (*nZII*), de las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus* en respuesta a diferentes tratamientos termohalinos. Las variables *S*, *Dv*, *D* y *E* fueron transformadas con raíz cuadrada.

Variables	SC	GL	CM	F	p
S					
Temp	94,34	2	47,17	0,08	0,9224
Sal	89996	3	29999	51,38	<0,0001
Temp*Sal	1431,1	6	238,52	0,41	0,8734
<i>Dv</i>					
Temp	1,39	2	0,69	13,87	<0,0001
Sal	6,94	3	2,31	46,27	<0,0001
Temp*Sal	0,49	5	0,1	1,95	0,0908
<i>D</i>					
Temp	1386,8	2	693,38	519,21	<0,0001
Sal	33,69	2	16,84	12,61	<0,0001
Temp*Sal	73,77	4	18,44	13,81	<0,0001
<i>E</i>					
Temp	10,67	2	5,33	0,21	0,8088
Sal	55730	3	18577	745,55	<0,0001
Temp*Sal	36	6	6	0,24	0,9584
<i>nZII</i>					
Temp	3317,9	2	1658,9	10,94	<0,0001
Sal	12780	3	4260,2	28,09	<0,0001
Temp*Sal	1792,9	6	298,82	1,97	0,0685

Referencia: Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

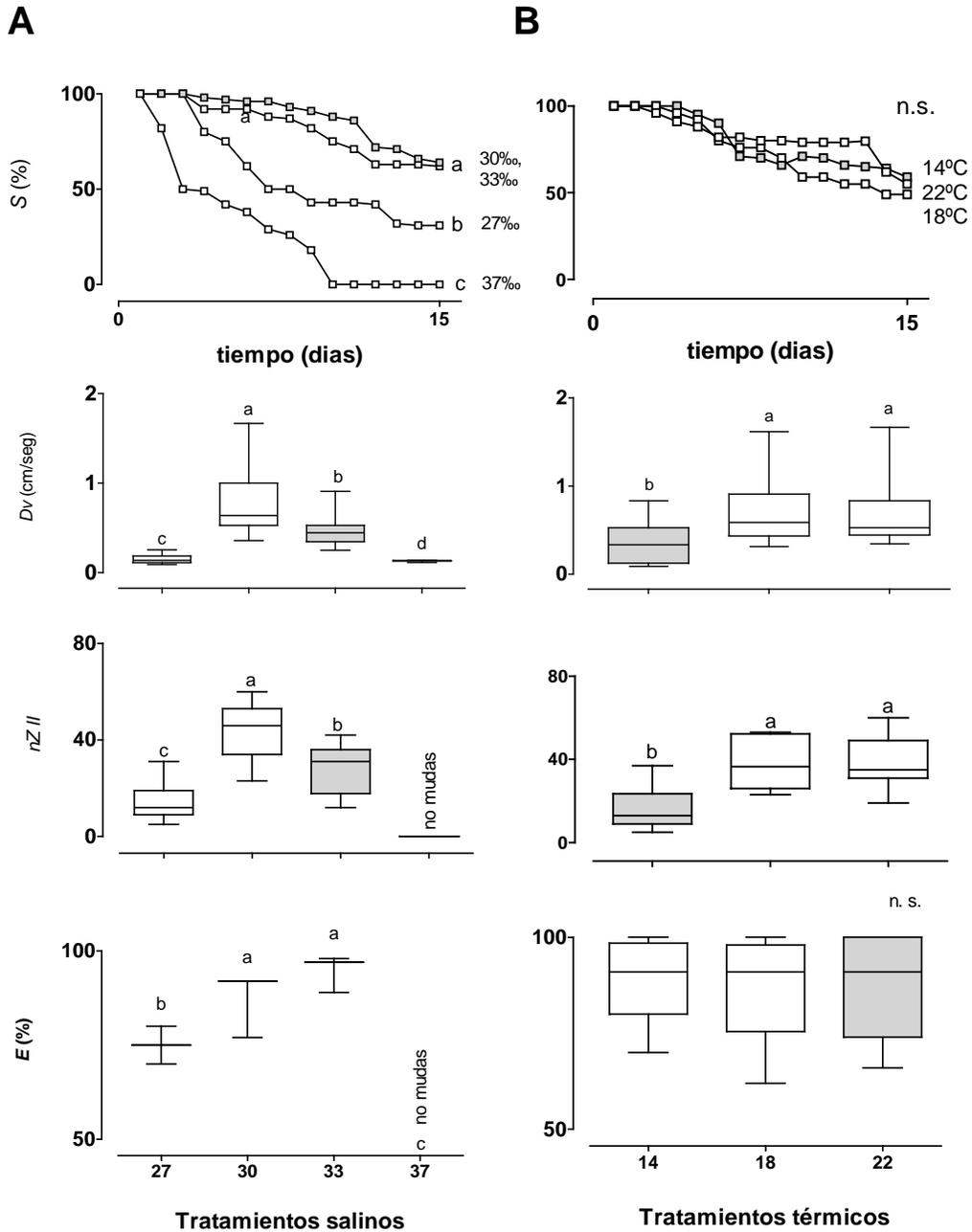


Figura 4.10. Gráfico de cajas del efecto de nueve tratamientos termohalinos sobre la supervivencia (S), desplazamiento vertical (Dv), Éxito de mudas (E) y cantidad de mudas al siguiente estadio de crecimiento ($nZII$), de las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus* en respuesta a: A) diferentes tratamientos salinos y B) diferentes tratamientos térmicos. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos y las siglas n. s. representan “no significativo” según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Tukey. El relleno gris representa el tratamiento control.

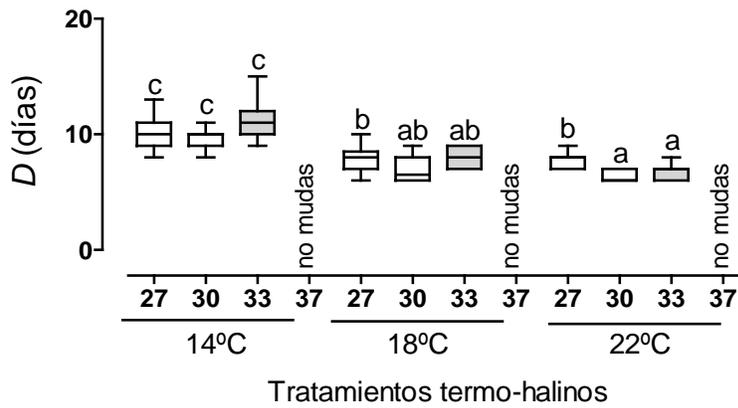


Figura 4.11. Gráfico de cajas del efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre la duración de la intermuda de las Zoea I de *Ovalipes trimaculatus* en respuesta a diferentes tratamientos térmicos. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes *a posteriori* empleando la prueba de Tukey. El relleno gris representa el tratamiento control.

Discusión

La acuicultura de los crustáceos, así como de muchos otros organismos, implica la domesticación de la especie a cultivar y el control de al menos una parte del ciclo de vida, ya sea la manipulación de reproductores, la regulación del crecimiento o el desarrollo de prole en cautiverio (Liao y Huang 2000). En los establecimientos acuícolas, la cría larvaria representa un gran desafío debido a que los requerimientos de calidad y cantidad de alimento (Josileen 2011, Reis *et al.* 2017) y las condiciones ambientales para el cultivo suelen ser muy específicos (Anger 1983, Charmantier 1998, Charmantier y Charmantier-Daures 2001, González-Ortegón y Giménez 2014). Esta etapa representa un cuello de botella para el desarrollo de la acuicultura de crustáceos y es la que conlleva el mayor esfuerzo de investigación y desarrollo de las técnicas, así como de infraestructura y cuidados (Keenan y Blackshaw 1999, Balasubramanian y Gopal 2014, Strathmann 2014).

Apuntando al desarrollo de dietas específicas para el cultivo de diferentes estadios del ciclo de vida de cada especie, área y época del año, los centros de investigación y las empresas acuícolas utilizan nuevos ingredientes de menor costo, diversos aditivos naturales, compuestos promotores de crecimiento, bacterias probióticas, estimuladores inmunológicos y enzimas digestivas que promuevan mayor crecimiento, resistencia a enfermedades y supervivencia, con un menor impacto ambiental (Dan y Hamasaki 2015). En ese sentido, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que existen al menos un número de variables críticas a considerar para la puesta a punto de la cría larvaria de *O. trimaculatus*, incluyendo la calidad, cantidad y frecuencia de suministro de alimento, el suplemento de organismos probióticos y/o las condiciones ambientales aplicadas al cultivo.

El experimento I, que puso a prueba el efecto de varios tratamientos de enriquecimiento de *Artemia* sobre sus tasas de crecimiento, capacidad portadora

de alimento y su composición bioquímica, reveló que todas las especies de microalgas utilizadas proporcionaron el valor nutricional necesario para un normal crecimiento (Cohen *et al.* 1999). Sin embargo, el tratamiento que brindó los mejores resultados en términos de crecimiento y calidad fue el MIX microalgal. En general, los nauplius de *Artemia* alcanzaron el tamaño óptimo a las 24 h, excepto cuando se alimentaron con *Dunaliella salina* y *Nannochloropsis sp.*, en cuyo caso necesitaron 12 h adicionales para lograrlo. En forma similar a lo reportado por Lora-Vilchis *et al.* (2004) para *Artemia franciscana*, los nauplius de *Artemia* alimentados con *Isochrysis galbana* tuvieron un menor crecimiento que aquellos a los que se les suministró *Chaetoceros sp.*

Los resultados de este estudio evidencian que *Dunaliella salina* presenta un mayor tiempo de permanencia en el intestino de *Artemia*, reflejado en una elevada tasa de ingesta (*TI*) luego de un período de ayuno. Sumado a esto, el contenido de proteína en *Artemia* alimentada con dicha especie de microalga fue elevado en términos absolutos, siendo significativamente superior conjuntamente con el tratamiento alimentado con Mix microalgal. Por otro lado, *Artemia* enriquecida con *Tetraselmis suecica* presentó una proporción moderada de proteínas y lípidos, y los intestinos de los nauplius permanecieron vacíos tras los períodos de ayuno, lo cual podría deberse a que la microalga es asimilada rápidamente. Finalmente, *Artemia* enriquecida con *Chaetoceros sp.* e *I. galbana* mostraron un moderado contenido de proteínas y lípidos, respectivamente (Figura 4.3). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Seixas *et al.* (2008), quienes notaron que el enriquecimiento de *Artemia* con *I. galbana* redundaba en un bajo crecimiento en comparación con el suministro *Tetraselmis suecica* y que la primer especie de microalga desaparece rápidamente del tracto digestivo tras períodos de ayuno.

Por lo tanto, sobre la base del mayor porcentaje de *TI* (%) y del tamaño óptimo capturable por las zoeas I de *O. trimaculatus*, los resultados sugieren que el tiempo óptimo para la cosecha de los nauplius de *Artemia* es de 24 h 15min (i.e., 15 minutos después de la segunda alimentación). Este índice reflejó la capacidad nutricional de las *Artemia* como portador de alimento para ser ofertados a larvas de *O. trimaculatus* y su uso como alimento alternativo en la acuicultura.

La composición bioquímica de *Artemia* alimentada con la mezcla de seis especies de microalgas, sugieren que este fue el mejor tratamiento dietario durante el experimento. Asimismo, estos resultados se suman a la alta capacidad de almacenamiento en el tracto intestinal (alto *TI* %) durante períodos de ayuno. En concordancia con estos resultados, Yúfera y Lubián (1990) mencionan que la calidad nutricional de las artemias enriquecidas con una mezcla de microalgas es mayor al de una dieta monoalgal. Además, los cultivos bialgales suelen ser más equilibrados en términos de composición bioquímica y las interacciones entre especies de microalgas son sinérgicas, compensando deficiencias de calidad de unas con otras (Díaz *et al.* 2006). La mayor parte de la literatura afirma que *Artemia* es de hábito alimentario filtrador no selectivo sobre partículas menores de 50 μm (Brown 1991). Esta versatilidad en la alimentación que le permite ser ofertada como presa, es una ventaja que se contrapone a su bajo contenido en proteína digerible, el cual reduce la energía por unidad de captura que obtienen sus predadores (Léger *et al.* 1987). De acuerdo a lo señalado por Benijts *et al.* (1976), la composición bioquímica de los nauplius de *Artemia* varía entre los instars I a III, reduciendo secuencialmente el contenido de peso seco, calórico, de lípidos totales y ácidos grasos. Por esta razón, la *Artemia* enriquecida no debe crecer más de 24 o 36 horas para ser suministrada como alimento vivo. El largo total de las Zoea I de *O. trimaculatus* en el área de estudio (medida desde el extremo de la espina dorsal hasta el telson) es aproximadamente 1,85 mm (\pm 0.19 mm), lo cual impone restricciones anatómicas relacionadas con su tamaño corporal y el de sus apéndices bucales para la captura y manipulación de presas. Sobre este particular, aunque en este estudio no se realizó una evaluación estricta de las relaciones talla de la presa / talla del depredador, observaciones directas efectuadas durante los experimentos mostraron que las Zoea I de *O. trimaculatus* no son capaces de capturar nauplius de *Artemia* de tallas mayores a 700 μm . Además, se ha observado de manera ocasional que los nauplius enriquecidos de *Artemia* mayores a la talla mencionada depredaron sobre las Zoea I de *O. trimaculatus* que se encontraban debilitadas luego del periodo de ayuno. Aunque Hamasaki (2003) reporta que las Zoea del portúnido *Scylla serrata* son capaces de

alimentarse de fragmentos del cuerpo de *Artemia* enriquecida con MIX microalgal, específicamente la cabeza y los apéndices, las observaciones de este estudio y las de otros autores (Sorgeloos *et al.* 2001) sugieren que no es recomendable ofertar los nauplius de *Artemia* enriquecida que tengan un tiempo de vida mayor a 24 h como alimento a las Zoea I de *O. trimaculatus*.

Numerosos estudios muestran que la dieta ofertada a los nauplius de *Artemia* influye en su crecimiento, desarrollo, ingestión y composición bioquímica, y que estos parámetros repercuten a su vez en el crecimiento, supervivencia y motilidad de sus depredadores (Schoo *et al.* 2014, Lawrence *et al.* 2015, Zupo *et al.* 2015, Dan *et al.* 2016, Reis *et al.* 2017 y otros). En concordancia, este trabajo muestra que existen diferencias significativas en la supervivencia y crecimiento de las Zoea I de *O. trimaculatus* en función de la dieta utilizada para enriquecer los nauplius de *Artemia*. En este sentido, los mejores valores de supervivencia larvaria de *O. trimaculatus* y el mayor éxito de muda al siguiente estadio de crecimiento en términos de *D*, *S*, *Dv* y *E*, fue obtenido en el tratamiento MIX, seguido por el tratamiento "Nanno". En contraste, las Zoea I alimentadas con nauplius sin enriquecimiento presentaron una baja supervivencia y no lograron mudar al siguiente estadio, indicando que estas no obtuvieron todos los nutrientes necesarios para mudar. Tal como señalan Léger *et al.* (1987), *Artemia* por sí sola provee un reducido aporte nutricional. Por el contrario, es la calidad de las microalgas transferidas al siguiente eslabón de la cadena alimentaria la que repercute en mayor medida en la supervivencia y crecimiento de las Zoea I de *O. trimaculatus*, así como en su condición fisiológica reflejada en la motilidad. Sobre la base de los resultados de este trabajo, y lo propuesto para la alimentación de las Zoea de otros portúnidos tales como *Scylla traquebarica* (Baylon 2009), se recomienda que el enriquecimiento de las nauplius de *Artemia* que serán utilizados como presa de las Zoea I de *O. trimaculatus* se realice con MIX microalgal por sobre otras dietas basadas en cultivos microalgales monoespecíficos.

El uso de organismos probióticos en acuicultura surgió ante la necesidad de promover la actividad de enzimas digestivas que estimulen el crecimiento, la respuesta inmunológica como un mecanismo de resistencia a las enfermedades y

el incremento de la supervivencia. Además, estos permiten mejorar la calidad química del agua de cultivo, tal como en el caso de las bacterias nitrificantes *Bacillus sp.* y controlar el desarrollo microbiano patogénico que puede devenir en enfermedades dentro de los centros de cultivo (Kim *et al.* 2004). Las pruebas sobre efectos de probióticos en acuicultura comenzaron hace más de tres décadas a través de estudios como el de la inoculación con una cepa de *Bacillus toyoi*, en los que sus esporas mejoraron la tasa de supervivencia de *Anguilla japonica*, la tasa de crecimiento del jurel *Trachurus murphyi* (Kozasa 1986) y la tasa de crecimiento larvario del pez *Scophthalmus maxima* (Gatesoupe 1997). Posteriormente, otras esporas de *Bacillus sp* fueron probadas dando resultados exitosos en términos de resistencia a la enfermedad ocasionada por el patógeno *Vibrio sp.* (Gatesoupe 1993, Carmona Pérez 2010). Producto de dichos avances, el uso de probióticos empezó a masificarse en los establecimientos acuícolas.

Para el grupo de los portúnidos en particular, pruebas recientes con distintas cepas de bacterias probióticas acidolácticas, inoculadas en nauplius de *Artemia* para ser ofrecidas a larvas Zoea de *Portunus pelagicus*, revelaron que las larvas alimentadas con nauplius enriquecidos con *Lactobacillus plantarum* tuvieron una mayor supervivencia respecto del tratamiento control (Talpur *et al.* 2012). Además, el uso de inóculos probióticos en el agua de cultivo también arrojó resultados positivos tanto en supervivencia como en la medición de la actividad de enzimas proteasas y amilasas en larvas de *P. pelagicus* (Talpur *et al.* 2013).

La permanencia de las cepas probióticas P1-T39 y P2-TW34 utilizadas en este estudio en el intestino de los nauplius de *Artemia*, y su tolerancia y crecimiento en un medio con bilis y a pH bajos fue corroborada previamente en el Laboratorio de Biotecnología del CCT CONICET-CENPAT, luego de su aislamiento desde ambientes naturales patagónicos (Sequeiros *et al.* 2010, Fernández *et al.* 2016). Aunque en trabajos previos se han reportado duraciones óptimas para el encapsulamiento de probióticos en *Artemia* de hasta 48 h (Hai *et al.* 2010), Fernández *et al.* (2016) mostraron que 24 h son suficientes para la bioencapsulación de probióticos en los nauplius. Esto, apoya los resultados

obtenidos en este estudio, indicando que el tiempo óptimo de enriquecimiento de *Artemia* con microalgas para alimento de Zoea I de *O. trimaculatus* es de 24 h.

Los resultados mostraron una mejora significativa en la supervivencia y una reducción en los tiempos de desarrollo larvario con el uso de las cepas probióticas respecto del tratamiento control. Además, contrariamente a lo señalado en otros estudios (Hai y Fotedar 2010), los tratamientos en que se suministraron cepas probióticas en el agua de cultivo presentaron efectos significativamente superiores a aquellos en que los probióticos fueron encapsulados en los nauplius de *Artemia*. Esto representa información crítica para el cultivo larvario de *O. trimaculatus* y a su vez simplifica las tareas de cultivo, debido a que la inoculación de probióticos en los nauplius de *Artemia* enriquecidos requiere de más tiempo y labor en condiciones de extrema esterilidad.

La inoculación de probióticos en el agua de cultivo no sólo puede favorecer a las larvas de *O. trimaculatus* en su crecimiento y desarrollo, sino que puede afectarlas de manera indirecta mejorando la calidad del agua a través de una reducción de la carga microbiana de manera antagónica, particularmente *Vibrios* (Touraki *et al.* 2012). Esta competencia bacteriana ha sido comprobada previamente en experimentos de cultivo de larvas de *Portunus pelagicus* en relación con la reducción de patogenicidad de *Vibrio sp.* (Talpur *et al.* 2012). También se ha verificado un efecto simultáneo de lactobacilos probióticos en eliminar bacterias patógenas y eliminar amoníaco del agua de cultivo (Ma *et al.* 2009).

En las pruebas realizadas, el probiótico T39 (P1 y P1 agua), perteneciente al género *Bacillus*, mostró efectos similares que el TW34 (Lactococcus) (P2 y P2 agua) sobre S (%), *Dv*, *nZII* y *E*. Sin embargo, el probiótico P1 en agua mostró una reducción significativa de la duración de la intermuda (*D*). Trabajos previos han demostrado la capacidad de las bacterias *Bacillus* de superar a otras bacterias por nutrientes y espacio o excluir otras bacterias a través de la producción de antibióticos (Moriarty 1998, Verschuere *et al.* 2000). Posiblemente esta sea una razón del efecto favorable en la duración del proceso de muda de las Zoea I. Además, aunque se detectó que el encapsulamiento de los probióticos en *Artemia*

fue un medio eficaz para transferirlos en dieta viva a las Zoea I de *O. trimaculatus*, la inoculación en el agua de cultivo fue aún más eficaz. No obstante, es probable que la administración de probióticos mediante el encapsulamiento en *Artemia* sea mejor conforme avanza el desarrollo larvario debido a que estadios avanzados de Zoea son mejores captadores de *Artemia* (Venkat *et al.* 2004).

La capacidad de las larvas de braquiuros para crecer y desarrollarse depende en gran medida de su habilidad para captar el alimento y en su resistencia a los períodos de ayuno, lo cual refleja su plasticidad (Howard y Hentschel 2005, Calado *et al.* 2010, Calvo *et al.* 2011, Pantaleão *et al.* 2015). Durante un ciclo de muda, la plasticidad es variable debido a que los requerimientos varían en función de las etapas de dicho ciclo (Fox y Czesak 2000), generalmente caracterizadas como: i) postmuda, ii) intermuda, iii) intermuda tardía y comienzo de premuda, iv) premuda y v) ecdisis (Drach 1939, Alvarez *et al.* 2009). Se ha demostrado que la premuda representa un umbral tras el que la muda se desencadena irreversiblemente (Anger 2001). La evaluación de la plasticidad de alimentación de las larvas de *O. trimaculatus*, permite entender no sólo los requerimientos alimentarios de la especie según el momento del ciclo de muda que se encuentra, sino también permite diseñar un diagrama de alimentación para su utilización en sistemas de producción. En este sentido, el bloque de pruebas incluidas en el experimento III de este capítulo (Experimentos PNR-PSR), en el que se probó la plasticidad de las Zoea I de *O. trimaculatus* para alimentarse y posteriormente soportar ayuno hasta la muda: Experimento PSR: punto de saturación de reservas (Anger *et al.* 1981), mostró que 2 días de alimentación fueron suficientes para lograr completar la muda, pero muy pocas Zoea lo lograron y su supervivencia fue significativamente baja. Por otro lado, a partir de 4 días de alimentación diaria seguidos por ayuno, los valores de supervivencia fueron elevados, pero no óptimos. A partir de 6 días consecutivos de alimentación diaria se obtuvieron altas proporciones de muda al siguiente estadio con un elevado éxito (*E*), en cantidades semejantes al tratamiento control en que se suministró alimentación diaria sin restricción. Estos resultados empíricos están respaldados por la estimación del índice PSR_{50} que refleja que el 50% de las larvas Zoea I requieren de al menos

6,15 días de alimentación para lograr la captación de nutrientes necesarios que suplan las necesidades alimentarias para la ecdisis a una supervivencia y éxito semejante a los valores obtenidos con el tratamiento control.

En el experimento de ayuno y posterior alimentación: Experimento PNR: punto de no retorno (Anger *et al.* 1981), podemos observar las Zoea I de *O. trimaculatus* lograron mudar al siguiente estadio soportando un ayuno de hasta 3 días posteriores a la eclosión, seguidos de alimentación diaria. Un mayor número de días de ayuno afecta negativamente el desarrollo de la larva, provocando una alta mortalidad. La estimación de PNR₅₀ refleja que el 50% de las Zoeas I lograrán mudar al siguiente estadio con un máximo de 4,75 días de ayuno. Esta información se traduce en una dependencia de alimentación externa para mudar, pero sus reservas vitelinas, aunque escasas, son suficientes para al menos 4 días posteriores al nacimiento. Sin embargo, tanto ayuno genera un desmedro significativo de su supervivencia y éxito de muda respecto del tratamiento control. Las lavas que tuvieron sólo un día de ayuno seguido de una alimentación diaria mostraron valores semejantes al tratamiento control.

Analizando ambos experimentos en conjunto, podemos observar que la privación de alimento afecta el desarrollo larvario de *O. trimaculatus*, al menos en el primer instar de crecimiento. Además, la supervivencia y éxito de muda dependen de la cantidad de días con y sin alimentación disponible (Experimento PNR y PSR), siendo el experimento de PNR el que provocó el efecto más fuerte en el ciclo de muda de la Zoea I de *O. trimaculatus* y en su supervivencia. Este efecto diferencial en la oferta de alimento fue evidenciado en un número amplio de larvas de otros crustáceos tales como cangrejos y langostas (Dawris 1984, Paschke *et al.* 2004, Harris y Sulkin 2005, Gebauer *et al.* 2010, Pantaleão *et al.* 2015, Espinosa *et al.* 2016, entre otros). Para poder estudiar este efecto en comparación con las demás especies, es necesaria la incorporación del índice de vulnerabilidad nutricional IVN (Sulkin 1978), el cual fue definido como la relación entre PSR₅₀ y PNR₅₀. Cuando esta relación tiene valores superiores a 1, indican un incremento en la dependencia de las Zoea por el alimento externo, en tanto que valores inferiores a 1 reflejan un grado creciente de plasticidad alimentaria y tolerancia al ayuno.

Valores cercanos a cero indican una independencia al alimento externo (Gebauer *et al.* 2010). El IVN de las Zoeas I de *O. trimaculatus* es de 1.29, lo cual se corresponde con una baja plasticidad. Asimismo, si las larvas se alimentan primero y luego sufren el ayuno durante algún tiempo, el efecto en el desarrollo es mucho más débil que en el orden contrario de los tratamientos.

Estos resultados se condicen con muchas especies de larvas Zoea I de decápodos tales como *Hyas areneus* (Anger y Dawirs 1982), *Sesarma cinereum* (Staton y Sulkin 1991), *Petrolisthes leavigatus* (Gebauer *et al.* 2010), siendo dicha plasticidad reducida una característica estrechamente ligada a desarrollos larvarios prolongados (Gebauer *et al.* 2010).

El conocimiento de los puntos críticos de alimentación puede ayudar a maximizar la supervivencia larvaria y metamorfosis tanto con fines de investigación, como en las aplicaciones de explotación y cultivo. Aún así, si el PSR se alcanza en la intermuda, la muda y ecdisis pueden desarrollarse independiente de la presencia de alimento. Por esta razón el punto de saturación de reservas es llamado "umbral de D", ya que corresponde al estadio D (muda) citado por Drach Tchernigovtzeff (1967). Este umbral D ha sido determinado en numerosas Zoea I de especies de decápodos, incluyendo tanto langostas como cangrejos braquiuros (Kurata 1962, Anger y Dawris 1982, Dawirs 1984, 1986, Anger 1987, Bas *et al.* 2008), y es válida al menos para las larvas de braquiuros (Anger 1984). Conocer los momentos críticos de demanda de alimento y los requerimientos nutricionales que desencadenan el proceso de muda resultan en datos relevantes para la producción de las especies acuícolas. Pero además, permiten generar nuevas hipótesis en relación a la reducida plasticidad alimentaria obtenida. La época de desarrollo larvario de *O. trimaculatus* en la naturaleza transcurre en los meses estivales (Diciembre-Marzo), coincidentemente con los picos elevados estacionales de fitoplancton en la costa Atlántica (Gayoso y Podesta 1996). Esta relación podría ser explicada mediante la hipótesis de que las densidades fitoplanctónicas y sus picos estacionales en el mar argentino serían una fuerza modeladora de la distribución y estacionalidad del desarrollo larvario. Por otro lado, el IVN podría ser utilizado como un indicador de la capacidad de invasión de

nuevos ambientes que tiene una especie (Calvo *et al.* 2011). Por lo tanto, el IVN de las Zoea I de *O. trimaculatus* sugiere una mediana a reducida capacidad de tolerancia al ayuno, indicando una baja capacidad de dispersión y colonización de nuevos ambientes (Boos *et al.* 2011).

Otro aspecto a tener en cuenta para el cultivo larvario de braquiuros son las variables ambientales. Por un lado, la temperatura afecta el tiempo y duración del proceso de desarrollo, mientras que la salinidad afecta la sobrevivencia y el tamaño de las larvas en un gran número de especies (Costlow 1967, Samuel y Soundarapandian 2010, Fowler *et al.* 2011, Swingle *et al.* 2013, Yacamoto *et al.* 2014, 2015). La respuesta de las larvas ante distintas combinaciones de temperatura y salinidad no sólo tiene un interés para la actividad acuícola, sino también puede explicar y predecir su comportamiento y rol ecológico ante estas condiciones en el medio ambiente y su adaptabilidad al mismo. Así, se refleja la capacidad de colonización de las larvas dentro de un rango de variabilidad, y su potencial evolutivo, permitiendo además entender sus patrones de reclutamiento ante las condiciones ambientales imperantes (Caddy 1986, Wahle 2003).

Respecto del experimento IV del presente capítulo, en el que las Zoea I de *O. trimaculatus* se cultivaron bajo diferentes combinaciones termohalinas, los valores de temperatura y salinidad fueron elegidos de manera que coincidan con los límites y rango de valores para la distribución de la especie en su medio natural en la costa atlántica de Sudamérica. La amplitud salina considerada en especial para el segundo experimento contempla la posibilidad de que las larvas puedan dispersarse tanto en ambientes hipohalinos, cercanos a desembocaduras de efluentes de agua dulce continental, como en aguas someras donde el efecto de radiación solar conjuntamente con clima cálido y seco pudiera generar altos grados de evaporación en cuerpos de agua costeros. Respecto de la temperatura, el rango se eligió teniendo en cuenta información previa sobre la supervivencia durante el desarrollo embrionario, descrito en el capítulo 3 de esta tesis (Embriones), y considerando además los regímenes térmicos dentro del rango de distribución geográfica de la especie. En términos generales, se pudo concluir que la salinidad 30 ‰ combinada con temperaturas de 18 y 22°C resultaron las

mejores condiciones para la cría larvaria. El rango óptimo de desarrollo aporta no solo información biológica sino valores de referencia para el desarrollo del cultivo larvario en especies de cangrejos referentes para la acuicultura, tales como los obtenidos para el cultivo de larvas de *Portunus pelagicus* donde se logró la optimización a salinidades 30-35 ‰, y temperaturas de 25-30 °C (Azra y Ikhwanuddin 2015), de larvas de *Chionoecetes opilio* donde la optimización ocurre a 26 ‰ y 16 °C (Yacamoto *et al.* 2014, 2015) y de *Scylla serrata* donde la condición óptima del cultivo larvario es a salinidades 28–35 ‰ y temperaturas en el rango de 27 a 32 °C (Ganesh *et al.* 2015). Respecto de la supervivencia de las Zoea I y el éxito de mudas, no se encontraron diferencias entre las temperaturas contrastadas, pero las salinidades más extremas (27 y 37 ‰) redujeron significativamente los valores de ambas variables. Esto permite concluir que las Zoea I de *O. trimaculatus* tienen una distribución plantónica estrechamente ligada a ambientes marinos, lo cual concuerda con los registros de hallazgo de larvas de *O. trimaculatus* de diferentes instars reportados en la columna de agua del golfo Nuevo (Dellatorre *et al.* 2014).

Haciendo una comparación con el desarrollo embrionario estudiado en el capítulo precedente, el primer estadio larval resultó ser más sensible en lo que respecta a las condiciones hipersalinas contrastadas (37 ‰), donde las Zoea I no lograron mudar al siguiente instar y posteriormente murieron. Sin embargo, es probable que conforme avanza el crecimiento de las larvas de la especie, la tolerancia a condiciones salinas aumente progresivamente (Charmantier y Charmantier-Daures 2001, Vázquez *et al.* 2016).

Respecto de la temperatura, las Zoea I de *O. trimaculatus* toleraron todo el rango probado, con una marcada reducción en la duración de su desarrollo y un aumento de la motilidad conforme aumenta la temperatura, lo cual concuerda con lo reportado para larvas de crustáceos en general (Putro y Fahrian 2015). Aunque durante los meses en que transcurre el desarrollo larvario en la naturaleza la temperatura superficial del agua de mar del golfo Nuevo es de aproximadamente 16-18 °C (Dellatorre *et al.* 2014), las condiciones de los experimentos permiten concluir que las larvas son capaces de tolerar mayores temperaturas (22 °C)

logrando un mejor *fitness* respecto de su supervivencia, de la duración de la intermuda y de su vitalidad. Posiblemente, exista una barrera de temperatura tanto inferior como superior a la estudiada para la cría larvaria y es por esta razón que se eligieron valores dentro del rango en que lograron desarrollarse los embriones bajo moderadas a buenas condiciones de sobrevivencia, con el objetivo de aportar a la optimización del desarrollo larvario. Esta información es de gran utilidad para los productores a fin de reducir la duración del proceso de cría larvaria y los tiempos de labor y costos de producción asociados (Moksnes *et al.* 2015, Quintino 2015).

Capítulo 5

JUVENILES



Introducción

La etapa juvenil de los crustáceos coincide con el período de mayor tasa de crecimiento, donde los eventos de muda suceden en alta frecuencia y con una elevada tasa de incremento en tamaño y en peso hasta llegar a la talla adulta (Du Preez y Mclachlan. 1984). Las condiciones ambientales y la disponibilidad de alimento son los factores externos más importantes que influyen en la tasa de crecimiento de los crustáceos, en especial juveniles, y modulan la frecuencia de muda así como también los incrementos de tamaño resultantes (Anger *et al.* 1981, Quintio *et al.* 2001, Ruscoe *et al.* 2004).

Como se infiere del párrafo previo, el crecimiento es habitualmente estudiado considerando dos componentes: 1) el intervalo entre un evento de muda y el siguiente y 2) el incremento en talla y peso que se produce tras cada muda. Estos dos componentes se comportan diferencialmente en respuesta a factores intrínsecos y extrínsecos (Hartnoll 1982, Li y Hong 2007). Entre los últimos, las condiciones ambientales, en particular temperatura, salinidad y la disponibilidad de alimento, son los que afectan en mayor medida al crecimiento y por lo tanto son comúnmente utilizadas como variables de regulación en establecimientos de cultivo (Romano y Zeng 2006, Cunningham y Darnell 2015 y Gong *et al.* 2015). Tal como fue expuesto en capítulos precedentes, la temperatura influye en la frecuencia de muda y determina las tasas metabólicas, así como también regula las secreciones hormonales (Bortolin *et al.* 2011). La salinidad, por otro lado, determina las condiciones osmóticas que generan respuestas fisiológicas favorables en términos de crecimiento de los juveniles (Jantrarotai 2002), por lo cual constituye una variable importante de regular en la acuicultura de crustáceos

que tienen algún tipo de tolerancia hipohalina en su hábitat natural (Romano y Zeng 2006).

Por otra parte, el conocimiento de los requerimientos nutricionales y el desarrollo de técnicas de alimentación son también prácticas fundamentales por desarrollar en acuicultura de crustáceos (Quinitio 2009, Josileen 2011). Los cangrejos braquiuros pueden ser herbívoros, detritívoros o bien carnívoros, predadores de invertebrados de movimientos lentos tales como moluscos y otros crustáceos. En particular, se conoce que en la naturaleza, los adultos de *O. trimaculatus* son carnívoros generalistas (Fenucci y Boschi 1975).

Para abastecer las necesidades alimentarias en sistemas de producción de crustáceos es habitual el uso de carne de pescado, bivalvos o también el uso de alimentos peletizados, pero la eficacia de su uso es especie-específica y por ello debe ser puesta a prueba para cada especie (Catacutan 2002). Hasta el momento, el desarrollo de dietas para crustáceos ha sido dirigido principalmente a cubrir las demandas nutricionales de camarones peneidos de interés comercial tales como *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *P. indicus*, *P. aztecus*, entre otros (Kanazawa 1985, Tacon *et al.* 2002) y de algunos cangrejos con un desarrollo acuícola bien establecido, tales como *Scylla serrata* (Catacutan 2002, Catacutan *et al.* 2003) y *Portunus pelagicus* (Williams 1981). En contraste, se desconocen los requerimientos nutricionales de otras especies en cautiverio, tales como en el caso de las pertenecientes al género *Ovalipes*, específicamente en sus etapas juveniles, como así también de las condiciones termohalinas para su cría en cautiverio.

Partiendo del conocimiento previo del hábito alimentario de *O. trimaculatus* en la naturaleza, es de interés corroborar si en cautiverio la oferta de diferentes ítems alimentarios en base de carne fresca de presas que se encuentran en su hábitat natural es bien recibido e incorporado, y si esto se manifiesta en un crecimiento de los juveniles en cautiverio. Los resultados obtenidos no sólo aportarán información valiosa para este grupo taxonómico, sino que permitirá formular dietas que favorezcan el crecimiento con respecto a sus pares salvajes (Baron, datos no

publicados) y disminuyan el canibalismo y la mortalidad por déficit nutricional (Mortensen y Damsgard 1995).

Otro aspecto a considerar en la cría de crustáceos a escala de prueba o escala piloto es el control de las condiciones ambientales, donde las variables físicas y biológicas tales como temperatura, salinidad, calidad del agua y disponibilidad de alimento son factibles de manipular. En grandes sistemas de cultivo, estas variables son más difíciles de controlar y comienzan a aparecer nuevas variables a considerar tales como el canibalismo, muy común en cultivos masivos de decápodos (Borisov *et al.* 2007, Long *et al.* 2012). Esto constituye un problema serio a la hora de producir grandes cantidades de juveniles en cautiverio o incluso para su mantenimiento a largo plazo y posterior comercialización. Aunque muchas especies pueden soportar amplios rangos termohalinos, criarlos en la combinación óptima de temperatura y salinidad acelera el crecimiento y aumenta la supervivencia (Waddy *et al.* 1995; Jantrarotai *et al.* 2002; Romano y Zeng 2006; Shock *et al.* 2009). Por lo tanto, encontrar esta combinación es un requisito para el desarrollo de su acuicultura (Baylon 2010; Quintio 2009; Quintio y Estepa 2011).

Tomando en cuenta los conceptos detallados en párrafos previos, el objetivo general de este capítulo es encontrar la combinación de temperatura y salinidad óptimas para la cría de juveniles de *O. trimaculatus* y poner a prueba diferentes tipos de alimento evaluando sus efectos sobre la supervivencia y el crecimiento.

Objetivos específicos

- Determinar experimentalmente los efectos combinados de las condiciones de salinidad y temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de estadios tempranos (C5, C6 y C7) de juveniles de *Ovalipes trimaculatus*.
- Evaluar el efecto de diferentes dietas sobre el crecimiento y la supervivencia de estadios tempranos (C5, C6 y C7) de juveniles de *Ovalipes trimaculatus*.

Hipótesis generales de trabajo

- El crecimiento durante las etapas larvaria y juvenil se incrementa en condiciones de salinidad levemente inferiores a la salinidad típica del agua de mar (33,7 ‰).
- El mayor crecimiento y la menor duración de estadios juveniles se logra mediante la oferta de una dieta compuesta de diversos orígenes de carne fresca animal.

Materiales y Métodos

Un total de 144 juveniles de *O. trimaculatus* en un rango de 22 y 33 mm de ancho de caparazón (AC, definido como la distancia entre las dos espinas laterales principales, Figura 2.5) y 3,76-6,71 g de peso húmedo fueron recolectados manualmente mediante buceo autónomo en fondos del golfo Nuevo durante los meses invernales de junio-julio. Los tamaños de juveniles recogidos coinciden con los de los estadios C5 y C6 en el análisis de distribución de frecuencias de tamaño (Barón, resultados no publicados). Los especímenes fueron transportados al Acuario Experimental del CCT CONICET-CENPAT y aclimatados durante dos días en tanques de plástico conteniendo 40 L con agua de mar filtrada (malla de poro 1µm) a 13 ($\pm 0,1$) °C, 34 (± 1) ‰ salinidad, fotoperiodo 14 : 10 h (luz : oscuridad) y aireación continua, emulando las condiciones ambientales prevalentes en el sitio de captura.

Después de la aclimatación, los juveniles fueron medidos (AC inicial) con un calibre digital de 0,01 mm de precisión y pesados en húmedo (Peso inicial) con una balanza analítica de 0.0001 g de precisión, e individualizados al azar en acuarios de plástico. Los mismos contienen 4 L de agua de mar con una capa de 5 cm de sedimento arenoso en el fondo, aireación continua y sujetos a la misma condición de fotoperiodo utilizada para la aclimatación. Una vez comenzados los experimentos, se tomaron registros diarios de la condición de los ejemplares, se alimentaron *ad libitum* durante 3 horas con una cantidad de alimento superior al 20% de su peso corporal y posteriormente se procedió a la limpieza y recambio del 50% del agua en todos los recipientes de cultivo. Los registros diarios tomados a lo largo de los experimentos incluyeron la mortalidad, fecha de muda y dos días después de cada evento de muda, el AC (AC final) y el peso (Peso final).

El crecimiento se calculó como:

$$IT_i = \frac{(talla_{final} - talla_{inicial})}{talla_{inicial}}$$

y

$$IP_i = \frac{(Peso_{final} - Peso_{inicial})}{Peso_{inicial}},$$

donde IT_i y IP_i corresponden a “Incremento en talla” e “Incremento en peso” respectivamente. La letra i corresponde a cada intervalo de muda “ i ”.

El crecimiento también fue determinado en función del tiempo (en días) mediante el índice: Tasa de crecimiento específico (TCE), tanto en términos de talla (TCE_T) como en peso (TCE_P):

$$TCE = \frac{(\ln T \text{ o } P_{final} - \ln T \text{ o } P_{inicial})}{t} \times 100$$

donde “ $\ln T$ o P ” corresponden al logaritmo natural de la talla o peso, respectivamente.

En relación con los registros de eventos de muda, se asignó a cada individuo un número de éxito de muda (E) que varía desde 0 (es decir, sin eventos de muda) a 3 (es decir, 3 mudas sucesivas). También se midió el intervalo D para todos los eventos de muda “ i ” (D_i , en días) correspondiente al tiempo de intermuda. La supervivencia (S) fue estimada para cada cangrejo como la cantidad en días que permaneció vivo, respecto de la cantidad total de días que duró el experimento

$$S = 100 \times \frac{\text{Días de vida de cada cangrejo}}{\text{Días totales del experimento}}$$

La biomasa relativa (*BR*) fue registrada como la variación total relativa de cada tratamiento expresada como la cantidad en gramos de peso total relativa considerando las ganancias en peso y las pérdidas debido a mortalidad, calculada como:

$$BR = \frac{B_i - B_0}{B_0} \times 100,$$

donde B_0 es la biomasa inicial del lote de cangrejos de cada tratamiento al comienzo del experimento y B_i es la biomasa del lote de cangrejos de cada tratamiento a lo largo del experimento.

Además, dado que el hepatopáncreas es el órgano principal que interviene en la digestión y tiene un papel importante como reservorio de macronutrientes en crustáceos, se calculó un índice hepatosomático (*HS*) al finalizar el experimento como medidor del estado del animal bajo los efectos de los experimentos como:

$$HS = \frac{p \text{ hepatopancreas}}{p \text{ total}}$$

donde p es el peso seco y $total$ representa la suma de los pesos del hepatopáncreas y del resto del cuerpo del cangrejo de acuerdo a lo propuesto por Chu (1999). Para ello, tanto el hepatopáncreas como el resto del cuerpo del cangrejo se secaron por separado en un horno a 60 °C hasta obtener un peso constante (a partir de las 48 h). Dado que los ejemplares utilizados fueron juveniles, en los que las gónadas aún no están desarrolladas, el aporte en peso de ovarios o de testículos con respecto al hepatopáncreas fue insignificante. Es por esto que se incluyó en el peso seco del resto del cuerpo de cada cangrejo.

La duración total de los experimentos fue fijada en función de la disponibilidad de espacio para el cultivo en el acuario experimental del CCT CENPAT-CONICET.

Diseño experimental:

Experimento I: Diferentes dietas

A fin de evaluar el efecto de cuatro dietas sobre el crecimiento y el tiempo de supervivencia de los cangrejos se diseñó un experimento que asignó nueve individuos para cada tratamiento dietario ($n = 9$ réplicas) en forma aleatoria. Los animales fueron mantenidos en recipientes individualizados bajo condiciones ambientales controladas a $13 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$, $33 (\pm 1) \text{‰}$ de salinidad y régimen de fotoperíodo de 12 : 12 h luz : oscuridad. La duración del experimento fue de 48 días.

Los cuatro tratamientos experimentales incluyeron alimentación: 1) sólo a base de carne de pescado *Merluccius hubbsi* (P) (Figura 5.1A), 2) sólo a base de carne de mejillón *Mytilus edulis* desvalvado (M) (Figura 5.1B), 3) peletizada balanceada BottomFish® (B) (Figura 5.1C) y 4) variada (Mix) (Figura 5.1D). El Mix fue definido como la oferta de las diferentes carnes (P y M) en iguales proporciones que los demás tratamientos, pero de forma intercalada (un tipo por vez). Todos los cangrejos se alimentaron *ad libitum* (superior al 20% del peso corporal) durante 3 horas seis veces por semana. Posteriormente, se eliminaron los excesos de alimentos y heces y se renovó la mitad del agua.

La composición proteica y lipídica de las diferentes dietas se detalla en la Tabla 5.1.

El alimento balanceado contiene componentes que generan que el *pellet* descienda al fondo del acuario, formulado para especies de fondo, tales como los juveniles de *O. trimaculatus*.

Tabla 5.1. Composición porcentual de proteínas y lípidos de las carnes frescas de Merluza (*Merluccius hubbsi*), Mejillón (*Mytilus edulis*) y de *pellets* de BottomFish.

Tratamientos dietarios	Composición proximal en peso seco	
	Proteína (%)	Lípidos (%)
Dieta P (<i>Merluccius hubbsi</i>) ¹	14	4,9
Dieta M (<i>Mytilus edulis</i>) ²	44,5	9,39
Dieta B (<i>pellets</i> BottomFish®)	36	3,5

Referencia: ¹ MCndez y Gonzllez 1996, ² Colombo et al. 2016

Experimento II: Condiciones ambientales

Con el propósito de hallar la combinación termohalina que optimice el desarrollo de los juveniles de *O. trimaculatus*, 12 individuos fueron asignados aleatoriamente (n = 12 réplicas) a cada tratamiento aplicado en los experimentos. Los cangrejos se alimentaron *ad libitum* (superior al 20% del peso corporal) durante 3 horas seis veces por semana, con alimentación variada (Mix: definido previamente). Posteriormente, se eliminaron los excesos de alimentos y heces y se renovó la mitad del agua.

Acondicionamiento ambiental: Los efectos combinados de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento, la supervivencia y la condición fisiológica (medido con los índices de crecimiento) de los cangrejos se ensayaron con una matriz factorial 3 x 3 (Tabla 5.2). Se seleccionaron condiciones experimentales de temperatura de 13, 16 y 19 °C ($\pm 0,1$) sobre la base de registros de campo en diferentes épocas del año. Aunque la salinidad del agua de mar de 33,7 ‰ es estable en la región (Rivas y Ripa 1989), se probaron otras dos condiciones de salinidad levemente menor (30 y 27 ‰ $\pm 0,5$) con el objetivo de evaluar si tienen un efecto en el crecimiento y la muda. La temperatura se controló mediante un sistema automático que consistió en calentadores eléctricos independientes

montados dentro de tanques de 40 L de capacidad, en los cuales se dispusieron a modo de baño María 6 contenedores de 4 L con los cangrejos individualizados. La salinidad se registró usando un refractómetro de mano y se realizaron diluciones de agua dulce previamente dechlorada. El fotoperiodo fue de 12 : 12 h luz : oscuridad.

En todos los casos los experimentos comenzaron después del período de aclimatación, con una regulación gradual de la salinidad y temperatura a partir de las condiciones de control (temperatura de 13 °C y salinidad de 33 ‰) hasta alcanzar las establecidas para cada tratamiento. La salinidad se redujo a una tasa de 1 ‰ por día, mientras que la temperatura se modificó 1°C por día. La salinidad se verificó cada mañana y se ajustó cuando fue necesario. El experimento duró 78 días.



A



B



C



D

Figura 5.1. Experimento dietario para juveniles de *Ovalipes trimaculatus*.

Referencia: A) carne de pescado (P); B) alimentación: carne de mejillón desvalvado (M); C) alimentación peletizada balanceada (B); D) Alimentación variada (Mix). Para cada tratamiento se asignaron 9 individuos.

Tabla 5.1. Diseño matricial de combinaciones termo halinas para el cultivo de juveniles de *O. trimaculatus*.

Matriz termo-halina de cultivo de juveniles de <i>O. trimaculatus</i>	
Temperatura (°C)	Salinidad (‰)
13	27
	30
	33
16	27
	30
	33
19	27
	30
	33

Referencia: Para cada uno de los 9 tratamientos se asignaron 12 individuos aleatoriamente.

Los datos obtenidos fueron comparados estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA). Se excluyeron los datos extremos (>1.5 del rango de la distribución normal). La normalidad y la homocedacia fueron comprobadas mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Fisher, respectivamente. Cuando la homocedacia no se cumplió, se usaron las transformaciones \log_{10} (i.e., en los casos de IP_2 , D_1 , y IT) y \ln (i.e., en los casos de TI_2 y IP_1). Respecto al experimento dietario se realizó un ANOVA de una vía con el factor “Tipo de dieta” como categórica, donde se evaluaron las diferencias entre las medias según la alimentación. Respecto el experimento de condiciones ambientales se realizó un ANOVA de dos vías con los factores “Temperatura” y “Salinidad” y la interacción entre ambas. En todos los casos, las diferencias encontradas fueron analizadas mediante la prueba de comparación de a pares a *posteriori* de Duncan con un nivel de significancia del $p < 0.05$ (Zar 1984).

Resultados

Los juveniles de *O. trimaculatus* midieron en promedio $28,81 \pm 3.79$ mm (media \pm SD) de AC y pesaron en promedio $5,95 \pm 2.02$ gramos (media \pm SD), correspondiendo a los de los estadios C5 y C6 de tallas juveniles de la población. Los crecimientos obtenidos tanto en talla como en peso para los dos experimentos estudiados son expuestos en la Tabla 5.3 y 5.5.

Experimento I: Diferentes dietas

En los experimentos de dieta, la supervivencia (*S*) y la duración de la intermuda (*D*) mostraron diferencias significativas entre tratamientos, siendo el tratamiento de suministro de alimentación variada de carnes (Mix) el que mostró mejores resultados en términos de supervivencia *S* e índices de crecimiento. Por el contrario, los cangrejos alimentados a base de alimento peletizado obtuvieron menor *S* (%) (ANOVA, $p < 0,05$, Tabla 5.4, Figura 5.2). Respecto del tratamiento de oferta de alimento a base de mejillón, si bien se puede observar una tendencia de menor *S*, la comparación de a pares a *posteriori* (Duncan) no mostró diferencias entre los demás tratamientos. En el tratamiento de oferta de carne de pescado, los juveniles mostraron índices de crecimiento y *S* altos, semejantes al tratamiento Mix (suministro de variedad de carnes), pero con un éxito de muda *E* significativamente menor (ANOVA, $F = 10,9$, $p < 0,0001$) (Tabla 5.4, Figura 5.2).

Tabla 5.3. Crecimientos promedio (IP_i y IT_i) obtenidos en los diferentes tratamientos de dietas alternativas a los juveniles de *Ovalipes trimaculatus*.

Variables	Experimento I			
	P	M	B	Mix
IT_1	$20,80 \pm 4,8$	$20,50 \pm 5,76$	$12,65 \pm 5,87$	$20,96 \pm 3,71$
IT_2	$13,77 \pm 1,29$	$12,58 \pm 0,5$		$14,56 \pm 1,77$
IP_1	$31,38 \pm 9,06$	$28,31 \pm 7,14$	$14,59 \pm 4,91$	$33,40 \pm 12,48$
IP_2	$41,41 \pm 12,21$	$30,59 \pm 1,75$		$41,49 \pm 10,86$

Referencias: IP_i : Incremento en peso; IT_i : Incremento en talla; i : número de mudas; P: pescado; M: mejillón; B: balanceado y Mix: alimentación variada.

Tabla 5.4. Resultados de los ANOVA para las variables respuesta: IP_i : Incremento en peso; IT_i : Incremento en talla; Duración de intermuda (D), Supervivencia (S) y Éxitos de muda (E) en el experimento de suministro de dietas alternativas a los juveniles de *Ovalipes trimaculatus*. μ : número de mudas.

Variables	SC	GL	CM	F	P
IT_1	174,9	3	58,3	2,5	0,0839
IP_1	944,42	3	314,81	2,31	0,102
D_1	644,08	3	214,69	6,74	0,0019
IT_2	3,73	2	1,86	0,85	0,4517
IT_2	167,97	2	83,98	0,66	0,5363
D_2	30,63	2	15,31	0,86	0,4479
S	695,77	3	231,92	4,07	0,0145
E	11,11	3	3,7	10,9	<0,0001

Referencias: Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

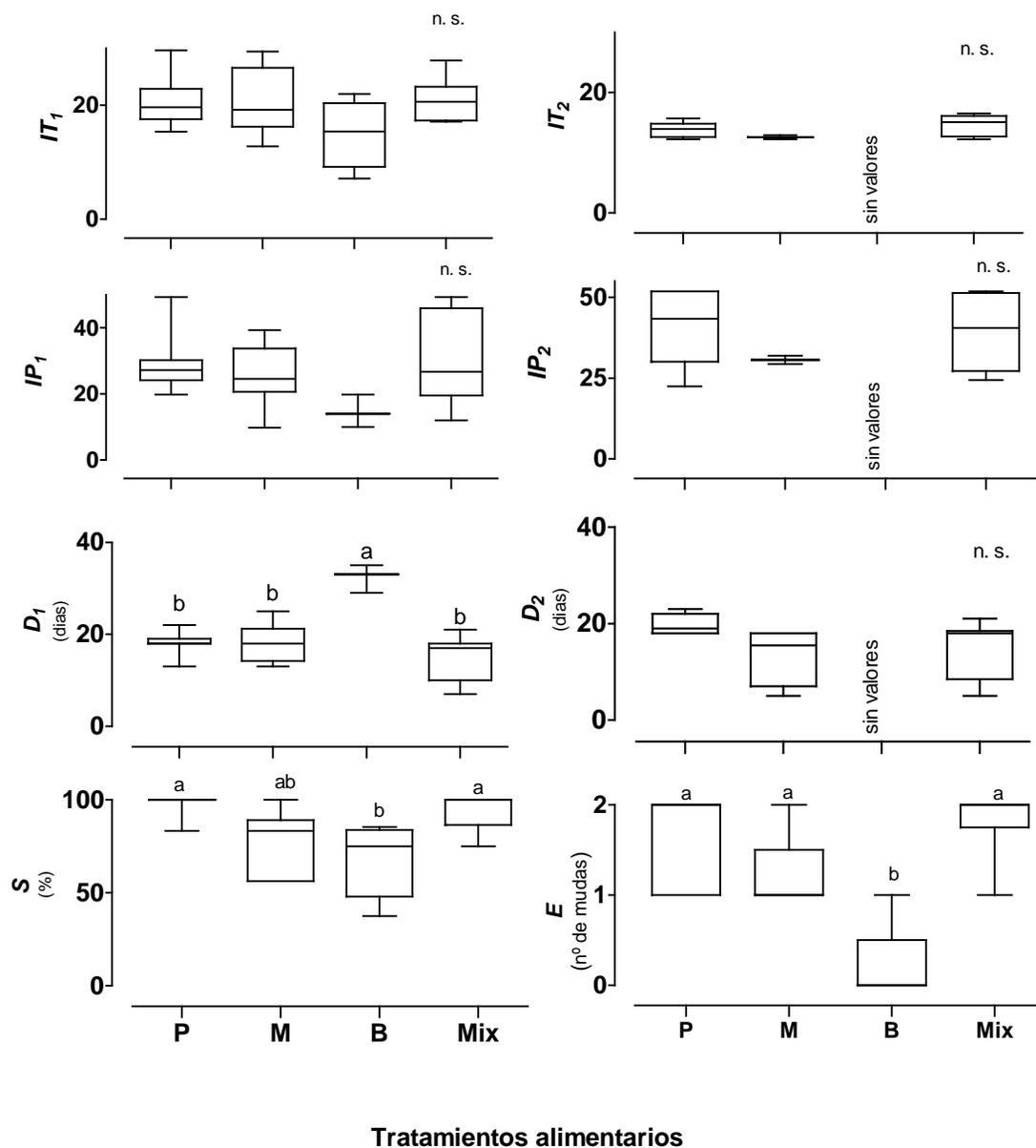


Figura 5.2. Gráficos de caja del Incremento en peso (IP), incremento en talla (IT), duración de intermuda (D), supervivencia (S) y éxitos de muda al siguiente estadio (E) en juveniles de *Ovalipes trimaculatus* alimentados bajo diferentes dietas. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos y las siglas n. s. representan “no significativo” según contrastes *a posteriori* empleando la prueba de Duncan.

Experimento II: Condiciones ambientales

En los experimentos de acondicionamiento ambiental, el crecimiento medido en función del incremento en talla (IT_1) a salinidad 30 ‰ fue significativamente mayor que a 27 y 33 ‰ (ANOVA de dos vías, $F = 4,22$, $p = 0,01$, Tabla 5.6). Del mismo modo, la tasa de crecimiento específico en función de la talla ($TCEt$) fue significativamente mayor a 30 ‰ que a salinidades de 27 y 33 ‰. La supervivencia (S) mostró diferencias significativas respecto de la salinidad, donde los juveniles bajo la salinidad 30 ‰ obtuvieron valores significativamente mayores que a los 27 y 33 ‰ (Figura 5.3, Tabla 5.6).

Respecto de la temperatura, los índices IT_1 y IT_2 fueron significativamente mayores a 16°C y 19°C que en el control de 13°C (Figura 5.4, Tabla 5.6). Las TCE a 16°C y 19°C fueron significativamente mayores que las obtenidas a 13°C (Figura 5.4). Para el IP , las diferencias estadísticas entre tratamientos sólo se observaron en la primera muda (IP_1).

Todas las combinaciones de temperatura y salinidad 30 ‰ muestran valores medios más altos en términos de crecimiento (Figuras 5.3, 5.4). La duración de intermuda (D) mostró interacción entre la temperatura y salinidad, con lo cual su interpretación debe ser analizada en conjunto. La combinación de 19 °C (mayor temperatura) con las salinidades más bajas (27 y 30 ‰) redujeron significativamente D_1 en comparación con las combinaciones de salinidad y temperatura 13 °C-27 ‰, 16 °C-33 y 19 °C-33 ‰. De forma similar, las temperaturas más altas (19° y 16°C) y las salinidades más bajas (27 y 30 ‰) redujeron significativamente el periodo de intermuda D_2 en comparación con la combinación de 13 °C-33 ‰, respectivamente (Figura 5.5).

La biomasa relativa (BR) de los juveniles bajo diferentes tratamientos de acondicionamiento ambiental reflejó ganancias y pérdidas combinadas a través del tiempo (Figura 5.6). Se consideró en esta trayectoria, la supervivencia de los individuos, restando su peso en la biomasa acumulada cuando murieron. Las

condiciones ambientales más productivas para *O. trimaculatus* son proporcionadas por combinaciones 30 y 27 ‰ de salinidad con temperaturas altas (19°C) y bajas (13°C) (Figura 5.6). Por el contrario, la condición de mayor salinidad (i.e., 33 ‰) dio como resultado un reducido aumento de biomasa inicial para la temperatura más elevada (19°C).

Tabla 5.5. Crecimientos promedio (IP_i y IT_i) obtenidos en los diferentes tratamientos de condiciones ambientales T-S a los juveniles de *Ovalipes trimaculatus*.

Variables	Experimento II								
	13 °C			16 °C			19 °C		
	27 ‰	30 ‰	33 ‰	27 ‰	30 ‰	33 ‰	27 ‰	30 ‰	33 ‰
IT_1	18,54	23,27	20,06	27,19	32,06	31,69	22,10	31,41	23,64
IT_2	12,01	12,70	10,44	17,07	70,13	23,11	53,56	25,76	16,48
IT_3		12,66		11,08	7,45		13,21	9,25	5,30
IP_1	42,98	70,00	45,55	70,85	70,13	92,81	26,89	75,59	52,91
IP_2	45,52	18,86	39,98	38,19	43,85	35,52		33,82	35,29
IP_3		78,30		51,40	60,92			67,75	59,53

Referencia: IT_i : incremento en talla; IP_i : incremento en peso; i : número de mudas,

Tabla 5.5. Resultados de ANOVA de dos vías para las variables: incremento en talla (IT) y en peso (IP), duración de intermuda (D), supervivencia (S), éxito de muda (E), índice hepatosomático (HS) y tasa de crecimiento específico (TCE) del experimento de condiciones ambientales en juveniles de *Ovalipes trimaculatus*.

Variables	SC	GL	CM	F	P
log10 IT_1					
Temperatura	0,19	2	0,1	6,92	0,01
Salinidad	0,12	2	0,06	4,22	0,02
Temperatura*Salinidad	0,01	4	0,002	0,19	0,94
ln IP_1					
Temperatura	0,97	2	0,49	10,11	0,01
Salinidad	0,64	2	0,32	6,63	0,01
Temperatura*Salinidad	0,51	4	0,13	2,66	0,04
log10 D_1					
Temperatura	0,44	2	0,22	7,40	0,01
Salinidad	0,06	2	0,03	0,96	0,39
Temperatura*Salinidad	0,39	4	0,1	3,29	0,02
ln IT_2					
Temperatura	0,39	2	0,19	4,18	0,02
Salinidad	0,01	2	0,003	0,08	0,92
Temperatura*Salinidad	0,19	4	0,05	1,01	0,41
log10 IP_2					
Temperatura	0,36	2	0,18	2,67	0,08
Salinidad	0,28	2	0,14	2,10	0,13
Temperatura*Salinidad	0,59	4	0,15	2,17	0,09
D_2					
Temperatura	0,25	2	0,13	6,72	0,01
Salinidad	0,003	2	0,002	0,08	0,03
Temperatura*Salinidad	0,09	4	0,02	0,81	0,52
log10 IT_3					
Temperatura	0,09	2	0,03	3,74	0,09
Salinidad	0,15	2	0,02	2,59	0,31
Temperatura*Salinidad	0,08	4	0,03	4,27	0,11
ln IP_3					
Temperatura	0,04	2	0,02	8,16	0,02
Salinidad	0,004	2	0,002	0,91	0,45

Temperatura*Salinidad	0,004	4	0,004	2,03	0,21
-----------------------	-------	---	-------	------	------

Continuación Tabla 5.6

<i>log10 D₃</i>					
Temperatura	0,02	2	0,01	9,41	0,03
Salinidad	0,01	2	0,004	4,12	0,11
Temperatura*Salinidad	0,03	4	0,03	28,64	0,005
<i>HS</i>					
Temperatura	0,004	2	0,002	4,50	0,59
Salinidad	0,01	2	0,01	6,98	0,66
Temperatura*Salinidad	0,04	4	0,01	5,80	0,25
<i>E</i>					
Temperatura	2,32	2	1,16	1,50	0,23
Salinidad	3,24	2	1,62	2,09	0,01
Temperatura*Salinidad	3,65	4	0,91	1,18	0,02
<i>TCE_T</i>					
Temperatura	0,19	2	0,09	9,88	0,01
Salinidad	0,12	2	0,06	6,31	0,01
Temperatura*Salinidad	0,02	4	0,01	0,65	0,63
<i>TCE_P</i>					
Temperatura	1,13	2	6,87	6,87	0,01
Salinidad	0,34	2	2,05	2,05	0,14
Temperatura*Salinidad	0,32	4	0,98	0,98	0,43
<i>S</i>					
Temperatura	1615,12	2	807,56	1,17	0,31
Salinidad	3564,47	2	1782,23	2,60	0,01
Temperatura*Salinidad	8,94,34	4	223,59	0,32	0,86

Referencia: Las letras en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

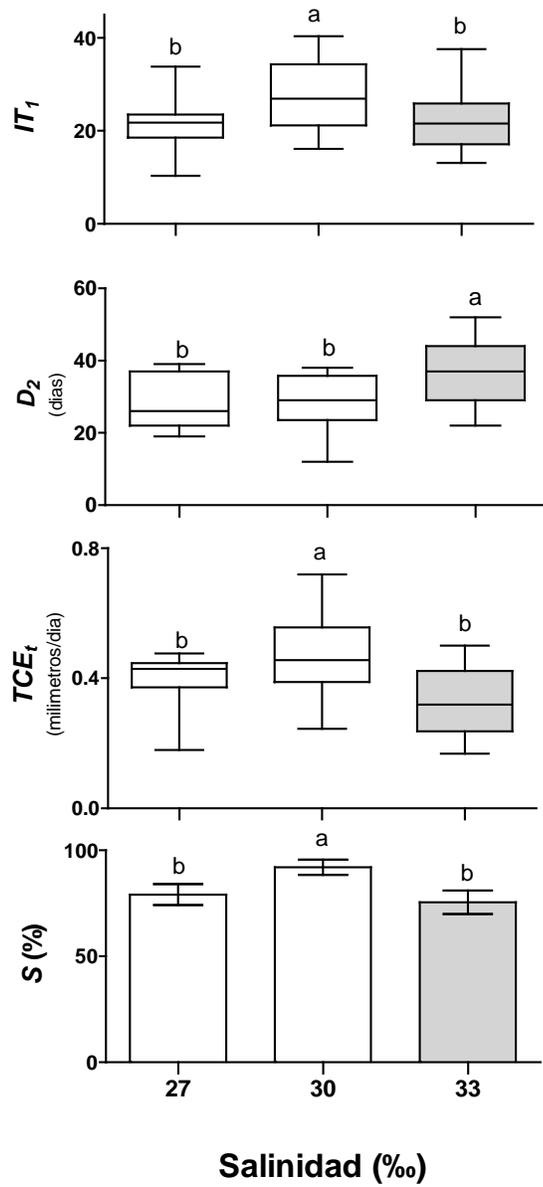


Figura 5.3. Gráficos de caja del Incremento en talla (IT), duración de internuda (D), tasa de crecimiento específico en función de la talla (TCE_t) y supervivencia (S) en juveniles de *Ovalipes trimaculatus* bajo diferentes condiciones de salinidad. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Duncan. El color gris indica el tratamiento control.

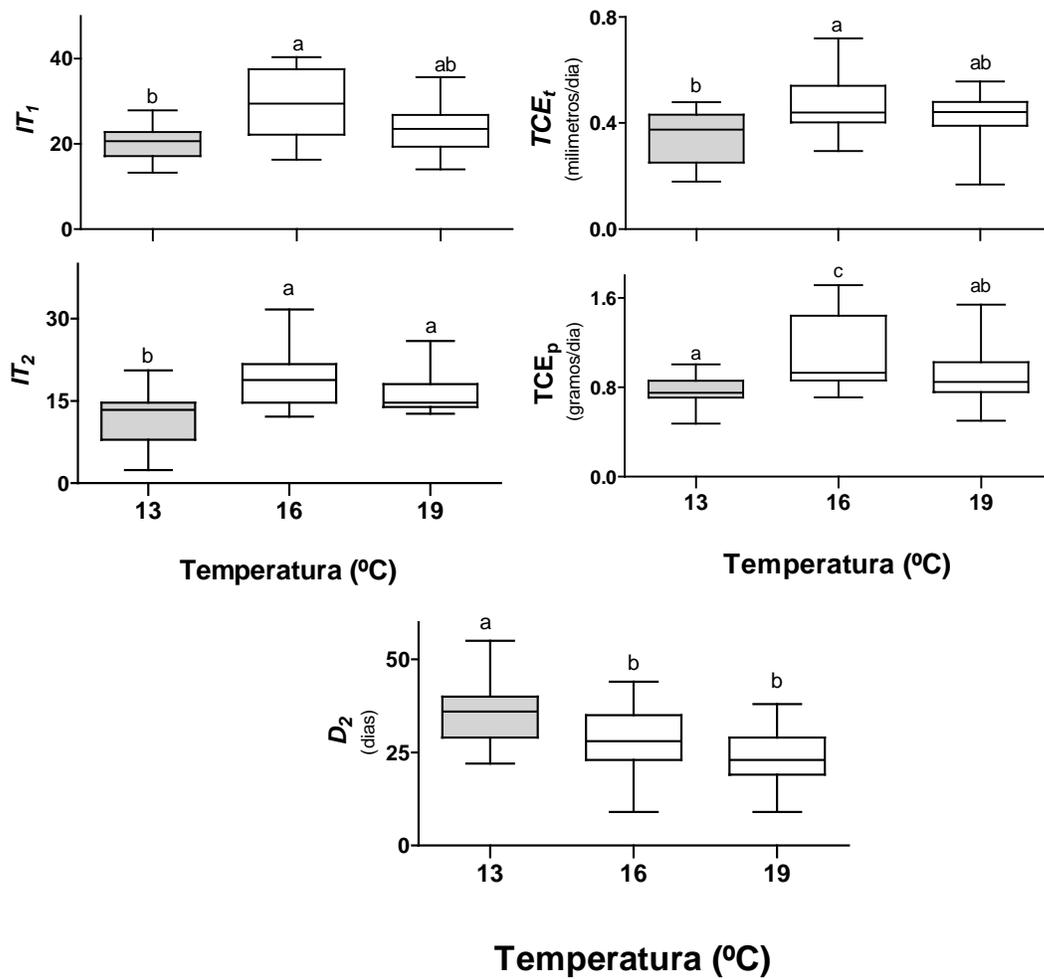


Figura 5.4. Gráficos de caja del incremento en talla (IT) para la primer y segunda muda, tasa de crecimiento específico en función de la talla (TCE_t) y peso (TCE_p) y duración de intermuda (D) en juveniles de *Ovalipes trimaculatus* bajo diferentes condiciones de temperatura. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes a *posteriori* empleando la prueba de Duncan. El color gris indica el tratamiento control.

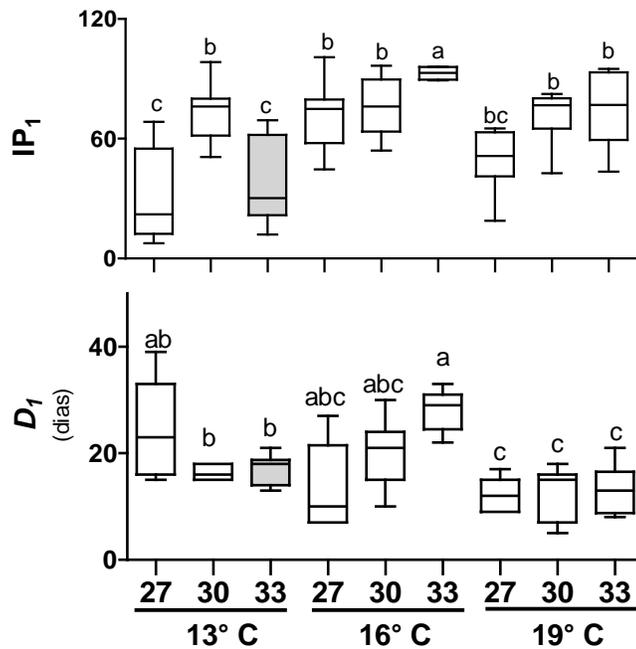


Figura 5.5. Gráficos de caja del incremento en peso (IP_1) y duración de intermuda (D_1) para la primera muda en juveniles de *Ovalipes trimaculatus* bajo el efecto combinado de diferentes condiciones de temperatura y salinidad. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos según contrastes *a posteriori* empleando la prueba de Duncan. El color gris indica el tratamiento control.

La biomasa relativa (BR) mostró fluctuaciones a lo largo del tiempo debido a los incrementos ocasionados por las mudas de los individuos y descensos debido a la mortalidad. Los tratamientos termohalinos 13 °C- 30 ‰ y 19 °C- 30 ‰ fueron los que mayor crecimiento relativo obtuvieron en términos de biomasa producida (Figura 5.6). Contrariamente, la salinidad 33 ‰ con las temperaturas 16 y 19 °C resultaron en bajos incrementos de biomasa.

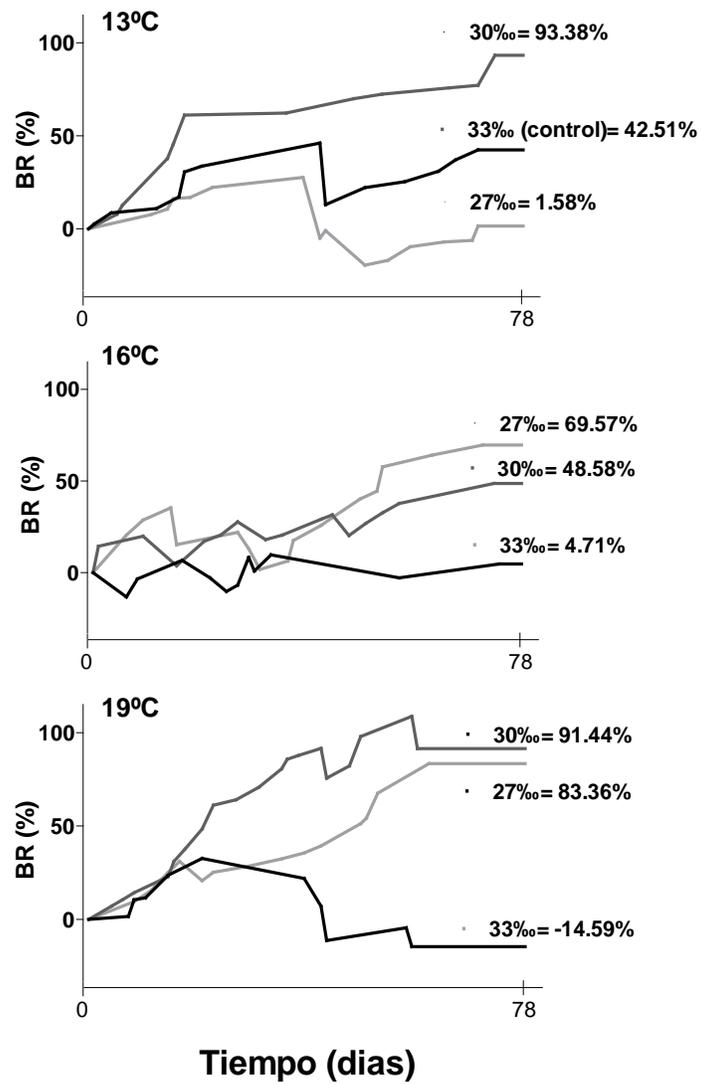


Figura 5.6. Biomasa relativa (%) acumulada a lo largo del tiempo para los juveniles de *Ovalipes trimaculatus* cultivados bajo diferentes condiciones de temperatura y salinidad.

Discusión

En los establecimientos de acuicultura es fundamental el conocimiento y desarrollo de técnicas y programas de alimentación que cumplan con los requerimientos nutricionales de los cangrejos a cultivar. Reconociendo esta necesidad, se ha llevado a cabo un esfuerzo concentrado sobre el desarrollo y utilización de alimentos para la acuicultura de juveniles y adultos de cangrejo, que abarcan desde el uso de ítems alimentarios vivos, restos de carne fresca de especies presa dentro de trama trófica, tanto como la fabricación de alimentos con valor agregado y/o alimentos balanceados industrializados, tanto en el ámbito científico como en la industria (Quinitio *et al.* 2001, Zmora *et al.* 2005, Catacutan *et al.* 2015, Alava *et al.* 2017).

Con el objetivo de generar los primeros pasos de conocimiento acerca de los requerimientos en la alimentación de juveniles de *O. trimaculatus*, los resultados del experimento I concluyeron que el tipo de dieta influye en el crecimiento y supervivencia, aportando información relevante para el fomento de su cría en cautiverio. La alimentación a base de varios tipos de carne fresca de origen animal, ofertadas de manera intercalada (un tipo por vez), revelaron la mejor “receta” dentro de las probadas. Estos resultados indicarían que los juveniles de *O. trimaculatus* presentan un hábito alimentario carnívoro generalista a base de presas comunes en su hábitat, tal como ocurre con sus pares adultos en el ambiente natural (Fenucci y Boschi 1975). Por otra parte, respaldan la generalidad que se observa en acuicultura de cangrejos donde la diversidad en alimentos ofertados proporciona una mayor probabilidad de suplir los requerimientos nutricionales para el normal crecimiento y desarrollo (Williams 1981, Catacutan 2002, Alava *et al.* 2017).

Respecto de la alimentación a base de mejillón, los resultados obtenidos podrían estar aparejados al deterioro de la calidad del agua de cultivo asociado con el suministro de este tipo de alimento. En este sentido, durante los experimentos se

observó que la carne de estos bivalvos sufre una rápida descomposición, liberando componentes al agua, posiblemente de origen lipídico, con un incremento en la turbidez observable a simple vista. Por lo tanto, si bien el crecimiento de los juveniles bajo este tratamiento fue semejante al de los ejemplares alimentados con variedad de carnes suministrada en forma intercalada, se recomienda no utilizar este tipo de alimento o bien utilizarlo con una frecuencia mayor a la propuesta de recambio de agua.

La dieta a base de alimento peletizado utilizada en el presente estudio posibilitó el mantenimiento de los cangrejos, pero sólo en un corto plazo. Los cangrejos con esta dieta sobrevivieron poco y no se obtuvieron mudas. Esto indica que el uso de alimentos balanceados con la formulación utilizada (BottomFish®) no es recomendable para el cultivo de juveniles de *O. trimaculatus*. A pesar de los recaudos tomados al ofrecer los gránulos de *pellet* para que éstos se hidraten lo suficiente, se hundan y queden accesibles para ser consumidos por los cangrejos en el fondo del recipiente, la carencia de estímulo para captar el alimento peletizado, sumado a la muerte de todos los juveniles, indicaría que la dieta peletizada no cumple con las demandas nutricionales básicas para esta especie. Sin embargo, los alimentos peletizados comerciales fueron probados con éxito en otros crustáceos tales como la langosta *Cherax quadricarinatus* (Tropea *et al.* 2010, Calvo *et al.* 2011), la langostilla *Munida gregaria* (Romero 2003) y juveniles de centolla *Lithodes santolla* (Sotelano 2012). Posiblemente, las causas del escaso crecimiento en los ejemplares sumado con una baja supervivencia a largo plazo (48 días) podría deberse a que los *pellets* pierden sus componentes nutritivos en el agua de cultivo, no siendo incorporados mediante la ingesta, como se ha visto previamente en otros cangrejos tales como la centolla (Loyola Rihbein 2009). Una futura evaluación, que debería identificar la composición proximal de las carnes frescas utilizadas (dieta que otorgó mejor supervivencia y crecimiento) y requerimientos nutricionales específicos de los juveniles para formular *pellets* apropiados para la alimentación de la especie, utilizando algún tipo de attractante (Kamio y Derby 2017) podrían ser los lineamientos a seguir para el desarrollo de esta línea de investigación

Los resultados obtenidos en el Experimento II sugieren que la supervivencia y tasa de crecimiento en juveniles de *O. trimaculatus* está estrechamente relacionada con las condiciones ambientales de temperatura y salinidad. En crustáceos, las condiciones ambientales y alimentación óptima para la supervivencia, el desarrollo, el crecimiento y la tolerancia al estrés son especie-específicas y difieren entre las etapas del ciclo vida, entre las poblaciones y entre las estaciones (Kinne 1971, Quintio y Estepa 2001). Por el contrario a lo esperado, en base a la amplia variación estacional de la temperatura del agua de mar a la que la especie se adapta en el área de estudio (Rivas y Ripa 1989) y a lo largo de la amplia distribución latitudinal de los adultos (Fenucci y Boschi 1975) que involucra una gran diversidad de condiciones termohalinas en el hábitat natural, los juveniles de *O. trimaculatus* mostraron diferencias significativas en la supervivencia entre los tratamientos de salinidad. En cuanto al crecimiento, la mayoría de las variables probadas (IT , TCE) revelaron condiciones optimizadas a 30 ‰ de salinidad y los tratamientos de temperatura más alta (16 y 19 °C), excepto para IP_1 que mostraron valores significativamente mayores a la combinación 16 °C-33 ‰. Además, la duración del período de intermuda (D) se redujo en estas condiciones ambientales (30 ‰ -16 y 19 °C) (Figuras 5.3 y 5.4). Todos estos efectos pueden deberse a causas diferentes. Por un lado, la alteración de la salinidad aumenta la demanda fisiológica en muchos organismos marinos debido a que se incrementa la actividad de osmorregulación (Lignot *et al.* 2000). Aun sin producir efectos letales, condiciones de salinidad subóptimas pueden producir una reducción en la eficiencia energética, el consumo de alimentos y el crecimiento. Basándose en trabajos previos sobre la naturaleza estenoalina de *O. trimaculatus* (Du Preez y Mclachlan 1984, Schoemann y Cockcroft 1996), se espera un mayor gasto de reservas de energía para juveniles cultivados con el tratamiento de salinidad más bajo (es decir, 27 ‰). Sin embargo, esta condición hipohalina respecto a la salinidad típica del agua de mar (33,5 ‰) no dió lugar a efectos significativos ni en el índice hepatosomático (HS) ni en la mayoría de las variables fisiológicas medidas, excepto para Incremento en talla para la primer muda (IT_1) y la Tasa de

crecimiento específico (TCE) (Tabla 5.6). Por último, la reducción de la duración de intermuda (D) a temperaturas elevadas (es decir, 16° y 19°C) es un fenómeno normal en crustáceos (Hartnoll 2001) que puede relacionarse con el aumento de la expresión del receptor de ecdysona (EcR) (Shen *et al.* 2013, Gong *et al.* 2015), como se observa en otros cangrejos portúnidos (Hartnoll 2001).

Tomando todos los resultados en conjunto, (Figuras 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6), la combinación de salinidad 30 ‰ y temperatura de 19 °C, conjuntamente con la alimentación a base de suministro de carnes de una variedad de organismos marinos, representa la condición más adecuada para el cultivo de juveniles *O. trimaculatus* al menos en los estadios C5, C6, C7 debido a que proporciona el mayor tiempo de supervivencia en días, mayor cantidad de mudas (E) y mayor crecimiento medido en términos de la tasa de crecimiento específico (TCE) en comparación con otras condiciones termohalinas. Aunque es necesario continuar con las técnicas que optimicen el cultivo de *O. trimaculatus*, este estudio proporciona los primeros pasos en el conocimiento de las condiciones necesarias para un crecimiento juvenil junto con una supervivencia favorable.

Capítulo 6

CONCLUSIONES y CONSIDERACIONES FINALES

A modo de conclusión general, en esta sección final se integran los conocimientos generados en esta tesis sobre las condiciones ambientales para el crecimiento y desarrollo de embriones, Zoea I y primeros estadios de juveniles, tanto como las condiciones alimentarias necesarias para el desarrollo y crecimiento Zoea I y primeros estadios de juveniles de *Ovalipes trimaculatus* a fin de optimizar su condición fisiológica en cautiverio. En este sentido, se compara la situación previa al desarrollo de esta tesis y la actual, y se plantean proyecciones de la línea de investigación iniciada.

Situación inicial

Previo al inicio de este trabajo, el conocimiento sobre la etapa de desarrollo embrionario de *Ovalipes trimaculatus* se limitaba a evaluar el consumo y disponibilidad de oxígeno en diferentes posiciones en la masa ovígera (Fernández y Brante 2003) y sus efectos en la pérdida de embriones (Brante *et al.* 2004). Sin embargo, se desconocía la caracterización detallada de los diferentes estadios embrionarios y el efecto de otras variables ambientales clave, tales como la temperatura y la salinidad en su supervivencia y duración. En cuanto a la etapa de vida larvaria, el conocimiento se limitaba a la descripción fraccionada de los estadios larvales en diferentes lugares de la distribución geográfica de *O. trimaculatus*. Así, existe una descripción de los estadios de las Zoea de las poblaciones de Chile (Guaita 1960) y Sudáfrica (Schoeman y Cockcroft 1996). En cuanto a la etapa juvenil (i.e., previa a la madurez sexual) no se contaba con datos publicados para ninguna de las poblaciones. Tampoco existía información experimental sobre el efecto de variables ambientales y de la dieta de estos

estadios del ciclo de vida que permitiera establecer técnicas para su cultivo y manejo. No obstante, al momento de inicio de esta tesis abundaban las publicaciones de estudios experimentales sobre el cultivo de etapas tempranas del ciclo de vida de otros portúnidos comerciales tales como *Scylla serrata* (Quintio *et al.* 2001, Quintio 2009), especies del género *Portunus sp* (Talpur *et al.* 2013, Samuel y Soundarapandian 2010) y *Callinectes sapidus* (Sandoz y Roger 1944, Zmora *et al.* 2005), entre otros. Asimismo, se contaba con antecedentes concretos sobre la viabilidad del repoblamiento de esta última especie de portúnido a partir de la producción de juveniles en criadero y su posterior dispersión en terreno (Davis *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2011).

Situación actual

A partir de la información brindada en los capítulos, la presente tesis genera avances en el conocimiento integral sobre la biología de *O. trimaculatus* necesarios para explorar el desarrollo de técnicas de cultivo. En primer lugar, se caracterizaron las etapas del desarrollo embrionario, se determinó su duración y se evaluó el efecto de la posición de los embriones dentro de la masa ovígera en su desarrollo (Martelli *et al.* 2016).

Respecto a las condiciones ambientales que optimizan el cultivo, se establecieron los valores de temperatura que aceleran el desarrollo embrionario, el primer estadio de Zoea y los primeros estadios de juvenil, y que además redundan en una mayor supervivencia, tasa de crecimiento y condición fisiológica de las larvas. Asimismo, se determinó que en todas las etapas estudiadas, una salinidad de 30 ‰ fue la que brindó mejores respuestas en términos de supervivencia y crecimiento de embriones, larvas Zoea I y juveniles C5, C6 y C7 en comparación con otro conjunto de condiciones de salinidad. Respecto de la temperatura, conforme aumenta proporciona reducción en los tiempos de crecimiento, dentro del rango de temperaturas probadas.

En cuanto a la puesta a punto de una dieta adecuada para el primer estadio de crecimiento larvario (i.e., Zoea I) para la especie, se probó que la oferta diaria de alimento multi-específico (MIX microalgal) encapsulado en nauplius de *Artemia* de 24 h de vida cubre los requisitos nutricionales y representa la dieta óptima dentro de un conjunto de dietas contrastadas. Más aún, el estudio permitió comprobar que introducir inóculos probióticos del género *Basillus sp*, en el agua de cultivo contribuye favorablemente al desarrollo larvario, al menos en la etapa de Zoea I, en términos de duración de su intermuda, supervivencia y motilidad, variables que sirven como indicadores de la condición fisiológica. Asimismo, se observó que la provisión diaria de alimento durante los primeros 6 días de vida de la Zoea I suplen los requerimientos nutricionales necesarios para lograr la muda al siguiente estadio de crecimiento (i.e., Zoea II). En relación con la determinación de una dieta adecuada para los estadios juveniles C5, C6 y C7, se estableció que el suministro de una mezcla de alimentos basados en carne de mejillón, pescado y langostino resultó en mejores valores de crecimiento y desarrollo en comparación con dietas puras y/o peletizadas.

Respecto del acondicionamiento para el cultivo, ensayos piloto previos a los experimentos de la tesis han permitido sacar conclusiones, dentro de las opciones de recipientes probados, los cuales han demostrado que la capacidad de carga recomendable en los acuarios para el cultivo de las hembras ovígeras de *O. trimaculatus* es de 20 L por individuo, con un recambio diario del 30-50%. Las hembras pueden ser agrupadas en hasta 5 individuos por recipiente con una buena supervivencia, siempre y cuando éste supere los 70 L de capacidad.

Respecto de los juveniles, los ensayos piloto con los individuos agrupados los acuarios mostraron una alta mortalidad, por lo que se trabajó con los juveniles individualizados siendo esta manera la que redujo la mortalidad posiblemente debido al canibalismo. El trabajo experimental desarrollado en el marco de esta tesis se llevó a cabo exitosamente manteniendo una capacidad de carga del cultivo de un juvenil por recipiente de 5 L de agua de mar, con un recambio diario del 50%. Para el cultivo en la etapa de Zoea I, sobre la base de las recomendaciones provistas en la bibliografía de referencia para otros cangrejos

portúnidos y en los experimentos realizados en esta tesis, los cultivos en grupos de 100 larvas por cada recipiente 5 L de agua de mar, fueron la condición de cultivo que mostró resultados de supervivencia favorables, siempre y cuando se haga un recambio de 100% diario.

En síntesis, esta tesis aporta conocimientos sobre los parámetros y métodos de manutención para maximizar supervivencia, crecimiento y condición fisiológica de embriones, larvas Zoea I y primeros estadios de juveniles (C5, C6, C7) de *O. trimaculatus* en cultivos experimentales, en relación con las condiciones ambientales y fórmulas dietarias.

Proyecciones

A pesar de los avances logrados en el conocimiento de la biología de las etapas tempranas del ciclo de vida de *O. trimaculatus*, resulta necesario evaluar varios aspectos para posibilitar la cría integral del cangrejo nadador con fines acuícolas, tanto para generación de productos de consumo como para aplicación de programas de repoblamiento de juveniles en un marco de factibilidad técnica y económica.

Para la optimización del cultivo durante la etapa de desarrollo embrionario de *O. trimaculatus* resta evaluar los efectos de diferentes técnicas para un adecuado acondicionamiento de los reproductores (i.e., hembras ovígeras), incluyendo el efecto de la ablación ocular sobre la extensión del período de desove y el nivel de desarrollo gonadal (Fernandez y Radhakrishnan 2016), así como la aplicación de diferentes concentraciones de químicos tales como solución de formalina o permanganato de potasio para reducir posibles infecciones microbianas sobre los embriones en desarrollo (Soundarapandian y Tamizhazhagan 2009, Talpur *et al.* 2011, Azra e Ikhwanuddin 2015). Cabe mencionar que para *O. trimaculatus* aún no se ha evaluado la relación entre la talla de los reproductores y la fecundidad potencial, disponible para numerosos portúnidos sujetos a acuicultura (Mantelatto y Fransozo 1997, Sukumaran y Neelakantan 1997, Hamasaki *et al.* 2006) así como para otras especies de braquiuros de interés pesquero distribuidos en aguas

patagónicas (Carsen *et al.* 1996). Esta información, así como la relación entre la talla de los reproductores y el tamaño de los huevos, resulta de gran importancia al momento de seleccionar los reproductores y planificar los volúmenes de producción de un criadero (Azra e Ikhwanuddin 2015).

En lo concerniente al cultivo larvario, aún se deben establecer las condiciones ambientales y dietarias óptimas para la cría de estadios de crecimiento posteriores a la Zoea I, incluyendo la Megalopa (Nurdían y Zeng 2007, O'Connor 2007). Entre las últimas cabe mencionar la evaluación del uso de otros cultivos auxiliares (Genodepa y Zeng 2004). Asimismo, se deben evaluar diferentes métodos alternativos de inducción a la metamorfosis y asentamiento del primer juvenil, incluyendo el uso de diferentes sustratos alternativos (Daly *et al.* 2009, Tapella *et al.* 2009, 2012). Por otro lado, deberán considerarse otras variables que no fueron evaluadas en la presente tesis, tales como el efecto del fotoperíodo (Andrés *et al.* 2010), la coloración de las paredes (Azra *et al.* 2012) y la generación de corrientes de circulación en los tanques de cultivo larvario (Rejeki 2007, Azra e Ikhwanuddin 2015) o el pH (Talpur e Ikhwanuddin 2012). En cuanto a las variables respuesta, en estudios futuros deberá determinarse la composición bioquímica de las larvas alimentadas con diferentes dietas o sujetas a distintas condiciones ambientales, con un enfoque similar al empleado para la determinación del método óptimo de enriquecimiento de *Artemia* en el presente estudio.

En cuanto a la etapa de *nursery*, cabe mencionar que en este trabajo sólo se incluyeron juveniles dentro de un rango de tallas de 22-46 mm AC, que corresponden a los instars postlarvales C5, C6, C7 y algunos C8, siendo la talla del primer estadio (C1) de crecimiento juvenil de aproximadamente 6,2 mm AC (Barón, datos no publicados).

Además de hacer extensiva a los diferentes estadios de crecimiento juvenil la puesta a prueba de las condiciones mencionadas para el cultivo larvario, entre los diversos aspectos que restan evaluar cabe mencionar el uso de refugios alternativos para los individuos en los tanques de cultivo (Cerezo 2001), la evaluación de densidades óptimas y el uso de dispositivos tales como las cajas de

red suspendidas o sobre fondos de lagunas o embalses costeros (Rodríguez *et al.* 2001, 2007). Asimismo, la evaluación de la supervivencia y el crecimiento durante esta etapa resultará crucial para una eventual puesta en práctica de planes de repoblamiento (Davis *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2011).

Por último, tomando en cuenta que dependiendo de las condiciones ambientales, las áreas de desove y cría larvaria y postlarvaria temprana de diferentes especies se expanden o retraen de año a año, la información experimental obtenida en esta tesis podrá ser utilizada como base para futuros trabajos de modelado para predecir su extensión y las consecuentes fluctuaciones interanuales en el reclutamiento de *O. trimaculatus* (Sakurai *et al.* 2000, Waluda *et al.* 2001, Cinti 2002, Barón 2003, Crespi-Abril y Barón 2012) en el marco del modelado de nicho ecológico (Carrasco y Barón 2010).

Bibliografía

- Adiyodi R. 1988. Reproduction and development. In: W. Burggren and B. R. McMahon (eds.) Biology of the land crabs. Academic Cambridge, England Press. 139-185.
- Ahyong S. T., Lai J. C., Sharkey D., Colgan D. J., y Ng P. K. 2007. Phylogenetics of the brachyuran crabs (Crustacea: Decápoda): The status of Podotremata based on small subunit nuclear ribosomal RNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 45(2): 576-586.
- Alava V. R., Sumile J. D. y Parado-Esteva F. D. 2017. Nursery culture of mud crab, *Scylla serrata*, using different ratios of natural food to formulated feed. In Philippines: In the forefront of the mud crab industry development: proceedings of the 1st National Mud Crab Congress, 16-18 November 2015, Philippines. 46-51. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Allan G. y Fielder D. 2004. Mud crab aquaculture in Australia and Southeast Asia. Proceedings of a Scoping Study and Workshop. ACIAR. 54.
- Álvarez J., Velíz C. y Meruane J. 2009. Molt cycle stages of the paddle crab *Ovalipes trimaculatus* (de Hann, 1833) based on observations of the external morphology. *Revista Biología Marina y Oceanografía*. 44: 217-225.
- Andrés M., Rotllant G. y Zeng C. 2010. Survival, development and growth of larvae of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, cultured under different photoperiod conditions. *Aquaculture*. 300(1): 218-222.
- Anger K., Dawirs R. R., Anger V. y Costlow J. D. 1981. Effects of early starvation periods on zoeal development of brachyuran crabs. *The Biological Bulletin*. 161(2): 199-212.
- Anger K. y Dawirs R. R. 1982. Elemental composition (C, N, H) and energy in growing and starving larvae of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Fishery Bulletin*. 80(3): 419-433.
- Anger K. 1983. Moults cycle and morphogenesis in *Hyas araneus* larvae (Decapoda, Majidae), reared in the laboratory. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. 36(3): 285.
- Anger K. 1987. The D0 threshold: a critical point in the larval development of decapod crustaceans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 108(1): 15-30.
- Anger K. y Spindler K. D. 1987. Energetics, moult cycle and ecdysteroid titers in spider crab (*Hyas araneus*) larvae starved after the D0 threshold. *Marine Biology*. 94(3): 367-375.
- Anger K. 1991. Effects of temperature and salinity on the larval development of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae). *Marine Ecology progress series*. 103-110.
- Anger K. 2001. The biology of decapod crustacean larvae. 14: 1-420. Lisse: AA Balkema Publishers
- Anger K., Queiroga H. E. y Calado R. 2015. Larval development and behaviour strategies in Brachyura. *The crustacea decapoda: Brachyura*. 317-374.
- Anger K. 2016. Adaptation to Life in Fresh Water by Decapod Crustaceans: Evolutionary Challenges in the Early Life-History Stages. In *A Global Overview of the Conservation of Freshwater Decapod Crustaceans*. 127-168. Springer International Publishing.
- AOAC 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed., vol. 2. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington.

- Ates M. C. D., Quinitio G. F., Quinitio T. y Sanares R. 2012. Comparative study on the embryonic development of three mud crabs *Scylla spp.* Aquaculture Research. 43: 215-225.
- Azimirad M., Meshkini S., Ahmadifard N. y Hoseinifar S. H. 2016. The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). Fish & shellfish immunology. 54: 516-522.
- Azra M. N., Wendy W., Talpur A.D., Abol-Munafi A.B. y Ikhwanuddin, M. 2012. Effects of tank colourations on the survival, growth and development rate of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) larvae. International Journal of Current Research and Review. 4: 117-123.
- Azra M. N., e Ikhwanuddin M. 2015. Larval culture and rearing techniques of commercially important crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): Present status and future prospects. Songklanakarin Journal of Science & Technology. 37(2).
- Balasubramanian C. P. y Gopal C. 2014. Diversification in coastal aquaculture: Mud crabs. training Manual on. 12.
- Baldoni A.; Molinari G.N.; Reta R. y Guerrero R.A. 2015. Atlas de temperatura y salinidad de la plataforma continental del Atlántico Sudoccidental: períodos cálido y frío. Mar del Plata : Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP. 85 p
- Barón P., Parma A. M y Orensanz J. M. 2002. Schedule of relevant life history events of *Ovalipes trimaculatus* in Northern Patagonia. II Congresso Brasileiro sobre Crustáceos, São Pedro (SP) Brasil, 10 a 14 novembro 2002. Livro de Resumos. 153.
- Barón P. J. 2003. Embryonic development of the South American long-fin squid *Loligo sanpaulensis* Brakoniecki, 1984. Journal of Molluscan Studies. 69: 221-227.
- Barón P. J., Real L. E., Ciocco N. F. y Ré M. E. 2004. Morphometry, growth and reproduction of an Atlantic population of the razor clam *Ensis macha* (Molina, 1782). Scientia Marina. 68(2): 211-217.
- Bas C. C. y Spivak E. D. 2000. Effect of salinity on embryos of two southwestern Atlantic estuarine grapsid crab species cultured in vitro. Journal of Crustacean Biology. 20(4): 647-656.
- Bas C. C., Spivak E. D. y Anger K. 2007. Seasonal and interpopulational variability in fecundity, egg size, and elemental composition (CHN) of eggs and larvae in a grapsoid crab, *Chasmagnathus granulatus*. Helgoland Marine Research. 61(4): 225.
- Bas C. C., Spivak E. D. y Anger K. 2008. Variation in early developmental stages in two populations of an intertidal crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. Helgoland Marine Research. 62(4): 393.
- Baylon J. C. 2009. Appropriate food type, feeding schedule and *Artemia* density for the zoea larvae of the mud crab, *Scylla tranquebarica* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). Aquaculture. 288(3): 190-195.
- Baylon J. C. 2010. Effects of salinity and temperature on survival and development of larvae and juveniles of the mud crab, *Scylla serrata* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Journal of the World Aquaculture Society*. 41(6): 858-873.
- Becker E. W. 2013. Microalgae for aquaculture: nutritional aspects. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition. 671-691.
- Blaxter J. H. S. y Hempel G. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus*). ICES Journal of Marine Science. 28(2): 211-240.
- Bligh E. G. y Dyer W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Comparative Biochemistry and Physiology. 37:911-917.

- Benijts F., Vanvoorden E. y Sorgeloos P. 1976. Changes in the biochemical composition of the early larval stages of the brine shrimp, *Artemia salina* L. In Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology. 1: 1-9.
- Bondad-Reantaso M. G., Subasinghe R. P., Josupeit H., Cai J., y Zhou X. 2012. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: past, present and future. *Journal of invertebrate pathology*. 110(2): 158-165.
- Boos K., Ashton G. V. y Cook E. J. 2011. The Japanese skeleton shrimp *Caprella mutica* (Crustacea, Amphipoda): a global invader of coastal waters. In *In the Wrong Place- Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts*. Springer, Dordrecht. 129-156.
- Borisov R. R., Epelbaum A. B., Kryakhova N. V., Tertitskaya A. G. y Kovatcheva N. P. 2007. Cannibalistic Behavior in Red King Crabs Reared Under Artificial Conditions. *Russian Journal of Marine Biology*. 33(4): 227-231.
- Bortolin F., Piulach M. D., Congiu L. y Fusco G. 2011. Cloning and expression pattern of the ecdysone receptor and retinoid X receptor from the centipede *Lithobius peregrinus* (Chilopoda, Lithobiomorpha). *General and comparative endocrinology*. 174(1): 60-69.
- Boschi E. 1997. Las pesquerías de crustáceos decápodos en el litoral de la República Argentina. *Investigaciones Marinas*. Valparaíso. 25: 19-40.
- Bosma R. H. y Verdegem M. C. 2011. Sustainable aquaculture in ponds: principles, practices and limits. *Livestock Science*. 139(1): 58-68.
- Botsford L. W. 1991. Crustacean egg production and fisheries management. *Crustacean egg production*. 7: 379-94.
- Brante A., Cifuentes H. O. P., Wolf A. y Fernández M. 2004. Latitudinal comparisons of reproductive traits in five Brachyuran species along the Chilean coast. *Revista Chilena Historia Natural*. 77: 15-27.
- Brown M. R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 145(1): 79-99.
- Brown M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3: 281-292.
- Caddy J. F. 1986. Modelling stock–recruitment processes in Crustacea: some practical and theoretical perspectives. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 43(11): 2330-2344.
- Calado R., Pimentel T., Pochelon P., Olaguer-Feliú A. O. y Queiroga H. 2010. Effect of food deprivation in late larval development and early benthic life of temperate marine coastal and estuarine caridean shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 384(1): 107-112.
- Caley M. J., Carr M. H., Hixon M. A., Hughes T. P., Jones G. P. y Menge B. A. 1996. Recruitment and the local dynamics of open marine populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 27(1): 477-500.
- Calvo N. S., Stumpf L., Pietrokovsky S. y Greco L. S. L. 2011. Early and late effects of feed restriction on survival, growth and hepatopancreas structure in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*. 319(3): 355-362.
- Campbell G. R. y Fielder D. R. 1987. Occurrence of a prezoaea in two species of commercially exploited portunid crabs (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana*. 52(2): 202-206.
- Carmona Pérez R. 2010. Evaluación de una mezcla de bacterias y alimento inerte como alternativa para el cultivo de *Artemia* (Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).

- Carrasco M. F., y Barón P. J. 2010. Analysis of the potential geographic range of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) based on surface seawater temperature satellite data and climate charts: the coast of South America as a study case. *Biological Invasions*. 12(8); 2597-2607.
- Carsen A. E., Kleinman S. y Scelzo M. A. 1996. Fecundity and relative growth of the crab *Platyxanthus patagonicus* (Brachyura: Platyxanthidae) in Patagonia, Argentina. *Journal of Crustacean Biology*. 16(4): 748-753.
- Casas G. N. y Piriz M. L. 1996. Survey of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. *Hidrobiología*. 326/327: 213-215.
- Castejón D., Rotllant G., Giménez L., Torres G. y Guerao, G. 2015. The effects of temperature and salinity on the survival, growth and duration of the larval development of the common spider crab *Maja brachydactyla* (Balss, 1922) (Brachyura: Majidae). *Journal of Shellfish Research*. 34(3): 1073-1083.
- Catacutan M. R. 2002. Growth and body composition of juvenile mud crab, *Scylla serrata*, fed different dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios. *Aquaculture*. 208(1): 113-123.
- Catacutan M. R., Eusebio P. S. y Teshima S. 2003. Apparent digestibility of selected feedstuffs by mud crab, *Scylla serrata*. *Aquaculture*. 216: 253-261.
- Catacutan M. R., Coloso R. M. y Acosta B. O. (Eds.). 2015. Development and use of alternative ingredients or fish meal substitutes in aquaculture feed formulation: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on Development and Use of Alternative Dietary Ingredients or Fish Meal Substitutes in Aquaculture Feed Formulation. Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Cerezo R. B. 2001. Effect of different types of shelter on the production of mud crab *Scylla serrata* juveniles in concrete nursery tanks. Tesis de Maestría. Iloilo, Philippines. 70.
- Chakraborty R. D., Chakraborty K. y Radhakrishnan E. V. 2007. Variation in fatty acid composition of *Artemia salina* nauplius enriched with microalgae and baker's yeast for use in larviculture. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55(10): 4043-4051.
- Chamantier G., Chamantier-Daures M., Bouricha, N, Thuet P., Aiken D. E. y Trilles J. P. 1988. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans: *Homarus americanus* and *Peneus japonicus*. *The Biological bulletin*. 17: 102-110.
- Charmantier G. 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustacean: a review. *Invertebrate Reproduction and Development*. 33:177-190.
- Charmantier G. y Charmantier-Daures M. 2001. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: the embryonic phase. *American zoologist*. 41(5): 1078-1089.
- Chu K. H. 1999. Morphometric analysis and reproductive biology of the crab *Charybdis affinis* (Decapoda, Brachyura, Portunidae) from the Zhujiang Estuary, China. *Crustaceana*. 72(7): 647-658.
- Churchill G. R. 2003. An Investigation into the captive spawning, egg characteristic and egg quality of the mud crab (*Scylla serrata*) in South Africa. Workshop of mud crab culture, ecology and fisheries, Can Tho University, Vietnam, 8-10 th January.
- Cinti A. 2002. El efecto de factores ambientales en la supervivencia embrionaria del calamar patagónico *Loligo gahi*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Puerto Madryn, Chubut, Argentina.
- Cohen R. G., Amat F., Hontoria F., y Navarro J. C. 1999. Preliminary characterization of some Argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces. *International Journal of Salt Lake Research*. 8(4): 329-340.
- Collins P. A. 2001. Relative growth of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) (Decapoda: Palaemnidae). *Nauplius*. 9(1):53-60.

- Colombo J., Varisco M., Isola T., Crovetto C., Rost E. y Risso S. 2016. Composición química proximal y perfil de ácidos grasos del mejillón *Mytilus edulis* provenientes de cultivos y bancos naturales en el Golfo San Jorge, Argentina. *Revista de biología marina y oceanografía*. 51(2), 293-299.
- Costlow J. D. Jr. 1967. The effect of salinity and temperature on survival and metamorphosis of megalops of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Helgolander wiss. Meeresunters*. 15: 85-97.
- Coutteau P. y Mourente G. 1997. Lipid classes and their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Marine Biology*. 130(1): 81-91.
- Crespi-Abril A. C. y Barón P. J. 2012. Revision of the population structuring of *Illlex argentinus* (Castellanos, 1960) and a new interpretation based on modelling the spatio-temporal environmental suitability for spawning and nursery. *Fisheries Oceanography*. 21(2-3): 199-214.
- Cunningham S. R. y Darnell M. Z. 2015. Temperature-dependent growth and molting in early juvenile blue crabs *Callinectes sapidus*. *Journal of Shellfish Research*. 34(2): 505-510.
- Dahms H. U. 2000. Phylogenetic implications of the crustacean nauplius. *Hydrobiologia*. 417(1): 91-99.
- Daly B., Swingle J. S. y Eckert G. L. 2009. Effects of diet, stocking density, and substrate on survival and growth of hatchery-cultured red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) juveniles in Alaska, USA. *Aquaculture*. 293(1): 68-73.
- Dan S. y Hamasaki K. 2015. Evaluation of the effects of probiotics in controlling bacterial necrosis symptoms in larvae of the mud crab *Scylla serrata* during mass seed production. *Aquaculture international*. 23(1): 277-296.
- Dan S., Oshiro M., Ashidate M. y Hamasaki K. 2016. Starvation of *Artemia* in larval rearing water affects post-larval survival and morphology of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Brachyura, Portunidae). *Aquaculture*. 452: 407-415.
- Davis J. A., Churchill G. J., Hecht T. y Sorgeloos P. 2004. Spawning characteristics of the South African mud crab *Scylla serrata* (Forskål) in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35: 121-131.
- Davis J. L., Young-Williams A. C., Hines A. H. y Zohar Y. 2005. Assessing the potential for stock enhancement in the case of the Chesapeake Bay blue crab (*Callinectes sapidus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 62(1): 109-122.
- Dawirs R. R. 1984. Influence of starvation on larval development of *Carcinus maenas* L. (Decapoda: Portunidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 80(1): 47-66.
- Dawirs R. R. 1986. Influence of limited food supply on growth and elemental composition (C, N, H) of *Carcinus maenas* (Decapoda) larvae, reared in the laboratory. *Marine Ecology Progress Series*. 301-308.
- Dellatorre F. G. 2009. Influencia de factores ambientales sobre la distribución y el asentamiento de larvas de cangrejos braquiuros y anomuros con potencial pesquero en Golfo Nuevo. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Comahue. Bariloche, Argentina. 225.
- Dellatorre F. G., Lovrich G., Rojas L., Milano V., Figueroa N. D. y Barón P. J. 2014. Seasonal abundance and vertical distribution of crab larvae from northern Patagonia (Argentina): implications for their transport in a biogeographic boundary region. *Marine Biology Research*. 10 (1): 37-50.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo Y. C. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>. 8: 195-199.

- Díaz A., Ramírez A., Godínez D. y Gallo G. 2006. Efecto del tamaño de las microalgas sobre la tasa de ingestión en larvas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Zootecnia Tropical*. 24(2): 193-203.
- Dima J. B., De Vido N. A., Leal G. A. y Barón P.J. 2009. Fluctuations in the biochemical composition of the Patagonian stone crab *Platyxanthus patagonicus* A. Milne Edwards, 1879 (Platyxanthidae: Brachyura) throughout its reproductive cycle. *Scientia Marina*. 73(3): 423-430.
- Dima J. B., Barón P. J. y Zaritzky N. E. 2014. Pasteurization conditions and evaluation of quality parameters of frozen packaged crab meat. *Journal of Aquatic Food Production and Technology*. 92: 54-66.
- Dohle W., Gerberding M., Hejzol A. y Scholtz G. 2004. Cell lineage, segment differentiation, and gene expression in crustaceans. In: Scholtz G. (ed) *Evolutionary developmental biology of Crustacea*. 5: 95-133.
- Drach P. 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Institute of Oceanography*. Monaco. 19: 103-391.
- Drach P. y C. Tchernigovtzeff. 1967. Sur le method du determination des stades d'intermude et son application générale aux crustacés. *Vie et Milieu*. 18: 595-617.
- Du Preez y Mclachlan. 1984. Biology of the three spot swimming crab, *Ovalipes punctatus* (De Haan) II. Growth and moulting. *Crustaceana* 47 (2).
- Espinoza C., Guzmán F., Bascur M. y Urzúa Á. 2016. Effect of starvation on the nutritional condition of early zoea larvae of the red squat lobster *Pleuroncodes monodon* (Decapoda, Munididae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 60(2): 152-160.
- FAO. 2001. International Plan of Action to Prevent, Deter and Eliminate IUU Fishing. United Nations Food and Agriculture Organization, Committee on Fisheries, Rome.
- FAO 2012. *FishtatJ*. The state of food insecurity in the world.
- FAO 2016. *FishtatJ*. A Tool for Fishery Statistical Analysis. FAO, Rome.
- Felder D. L., Martin J. W. y Goy J. W. 1985. Patterns in early post-larval development of decapods. In: A.M Wenner (ed), *Larval growth, 2. Crustacean issues*. Balkema Press, Rotterdam, Netherlands. 163-226.
- Fenucci J. L. y Boschi. E. E. 1975. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo comercial de las aguas costeras de la provincia de Buenos Aires, *Ovalipes trimaculatus* (de Haan) (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Physis*. 89: 291-308.
- Fernández M., Pardo L. M. y Baeza J. A. 2002. Patterns of oxygen supply in embryo masses of brachyuran crabs throughout development: the effect of oxygen availability and chemical cues in determining female brooding behavior. *Marine Ecology Progress Series*. 245:181-190.
- Fernández M. y Brante A. 2003. Brood care in Brachyuran crabs: the effect of oxygen provision on reproductive costs. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76(2): 157-168.
- Fernández M., Garcés M. E., Olivera N. L., Cubitto M. A. y Sequeiros C. 2016. Bioencapsulación en *Artemia sp.* y propiedades probióticas de cepas bacterianas aisladas de ambientes acuáticos patagónicos para su uso en acuicultura. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM 2016.
- Fernandez R. y Radhakrishnan E. V. 2016. Effect of bilateral eyestalk ablation on ovarian development and moulting in early and late intermolt stages of female spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Invertebrate Reproduction & Development*. 60(3): 238-242.
- Fowler A. E., Gerner N. V. y Sewell M. A. 2011. Temperature and salinity tolerances of Stage 1 zoeae predict possible range expansion of an introduced portunid crab, *Charybdis japonica*, in New Zealand. *Biological Invasions*. 13(3): 691-699.

- Fox C. W. y Czesak M. E. 2000. Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annual review of entomology*. 45(1): 341-369.
- Franco B. C., Palma E. D. y Tonini, M. H. 2015. Benthic-pelagic uncoupling between the Northern Patagonian Frontal System and Patagonian scallop beds. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 153: 145-155.
- Fukuda B., Bertini G. y Almeida L. C. F. D. 2017. Effect of salinity on the embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda: Palaemonidae). *Invertebrate Reproduction & Development*. 61(1): 1-8.
- Ganesh K., Raj Y. C. T. S., Perumal S., Srinivasan P. y Sethuramalingam A. 2015. Breeding, Larval Rearing and Farming of Mangrove Crab, *Scylla serrata* (Forsk., 1775). In *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*. 163-172. Springer India.
- García-Guerrero M. y Hendrickx M. E. 2004. Embryology of decapod crustaceans I: Complete embryonic development of the mangrove crabs *Goniopsis pulchra* and *Aratus pisonni* (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology*. 24: 666-671.
- Gatesoupe J. 1993. *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. In *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz.
- Gatesoupe F. J. 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources*. 10(4): 239-246.
- Gayoso A. M. y Podesta G. P. 1996. Surface hydrography and phytoplankton of the Brazil-Malvinas currents confluence. *Journal Plankton Research*, 18(6): 941-951
- Gebauer P., Paschke K. y Anger K. 2010. Seasonal variation in the nutritional vulnerability of first-stage larval porcelain crab, *Petrolisthes laevigatus* (Anomura: Porcellanidae) in southern Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 386(1): 103-112.
- Genodepa J. C. y Zeng P. C. 2004. Southgate Preliminary assessment of a microbound diet as an *Artemia* replacement for mud crab, *Scylla serrata*, megalopa Aquaculture. 236: 497-509.
- Giménez L. y Anger K. 2001. Relationships among salinity, egg size, embryonic development, and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 260(2): 241-257.
- Goldstein J. S. y Watson III W. H. 2015. Influence of natural inshore and offshore thermal regimes on egg development and time of hatch in American lobsters, *Homarus americanus*. *The Biological Bulletin*. 228(1): 1-12.
- Gómez-Gil B., Roque A. y Turnbull J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191(1): 259-270.
- Gong J., Yu K., Shu L., Ye H., Li S. y Zeng C. 2015. Evaluating the effects of temperature, salinity, starvation and autotomy on molting success, molting interval and expression of ecdysone receptor in early juvenile mud crabs, *Scylla paramamosain*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 464: 11-17.
- González-Ortegón E. y Giménez L. 2014. Environmentally mediated phenotypic links and performance in larvae of a marine invertebrate. *Marine Ecology Progress Series*. 502: 185-195.
- Gove D. y Paula J. 2000. Rhythmicity of larval release in three species of intertidal brachyuran crabs (Crustacea: Brachyura) from Inhaca Island (Mozambique). *Marine Biology*. 136(4): 685-691.
- Guaita E. F. 1960. Primer estadio larval de cuatro Crustaceos Braquios de la Bahía de Valparaíso. *Revista de Biología marina*. 10 (1-3): 143-154.

- Guillard R. R. y Ryther J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella* Nana Hustedt, and Detonula Confervacea (CLEVE) Gran. Canadian journal of microbiology. 8(2): 229-239.
- Haddon M. 1994. Size-fecundity relationships, mating behavior and larval release in the New Zealand paddle crab, *Ovalipes catharus* (White 1843) (Brachyura: Portunidae). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 28: 329-334.
- Hai N. y Fotedar R. 2010. A review of probiotics in shrimp aquaculture. Journal of Applied Aquaculture. 22(3): 251-266.
- Hai N., Buller N. y Fotedar R. 2010. Encapsulation capacity of Artemia nauplius with customized probiotics for use in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latissulcatus* Kishinouye, 1896). Aquaculture Research. 41: 893-903.
- Hamasaki K. 2003. Effects of temperature on the egg incubation period, survival and developmental period of larvae of the mud crab *Scylla serrata* (Forskål) (Brachyura: Portunidae) reared in the laboratory. Aquaculture. 219(1): 561-572.
- Hamasaki K., Fukunaga K. y Kitada S. 2006. Batch fecundity of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Brachyura: Portunidae). Aquaculture, 253(1): 359-365.
- Harris B. y Sulkin S. 2005. Significance of feeding to the development of postlarval megalopae in the free-living crab *Lophopanopeus bellus* and commensal crab *Fabia subquadrata*. *Marine Ecology Progress Series*. 291: 169-175.
- Hartnoll R. G. 1978. The determination of relative growth in Crustacea. *Crustaceana*, 34 (3): 281-293.
- Hartnoll, R.G., 1982. Growth. In: *The Biology of Crustacea*. Bliss, D.E. Ed. , Embryology, Morphology and Ž . Genetics 2 Academic Press. 111–196.
- Hartnoll R. G. 2001. Growth in Crustacea—twenty years on. In *Advances in decapod Crustacean research*. 111-122.
- Heasman M. P. y Fielder D. R. 1983. Laboratory spawning and mass rearing of the mangrove crab, *Scylla serrata* (Forskål), from first zoea to first crab stage. *Aquaculture*. 34: 303-316.
- Hines A. H. 1982. Allometric constraints and variables of reproductive effort in brachyuran crabs. *Marine Biology*. 69: 309-320.
- Howard S. C. y Hentschel B. T. 2005. Effects of short-term food variability on the plasticity of age and size at metamorphosis of porcelain crab larvae. *Limnology and oceanography*. 50(6): 1960-1971.
- Ikhwanuddin M., Ara M. N., Siti-Aimuni H. y Abol-Munafi A. B. 2012. Fecundity, embryonic and ovarian development of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) in coastal Water of Johor, Malaysia. *Pak. Journal of Biology and Science*. 15(15): 720-728.
- Ikhwanuddin M., Hayimad T., Ghazali A., Halim S. S. A. y Abdullah S. A. 2016. Resistance test at early larval stage of blue swimming crab, *Portunus pelagicus*. *Songklanakarın Journal of Science & Technology*. 38(1).
- Jantrarotai P., Taweechuer K. y Pripanapong S. 2002. Salinity levels on survival rate and development of mud crab (*Scylla olivacea*) from zoea to megalopa and from megalopa to crab stage. *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 36: 278-284.
- Johnson E. G., Young A. C., Hines A. H., Kramer M. A., Bademan M., Goodison M. R. y Aguilar R. 2011. Field comparison of survival and growth of hatchery-reared versus wild blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 402(1): 35-42.
- Josileen J. 2011. Captive spawning, hatching and larval development of crucifix crab, *Charybdis feriatus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Marine Biology Association India*. 53: 35-40.

- Kamio M. y Derby C. D. 2017. Finding food: how marine invertebrates use chemical cues to track and select food. *Natural Product Reports*. 34(5), 514-528.
- Kanazawa A. 1985. Nutrition of penaeid prawns and shrimps. In First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps, 4-7 December 1984, Iloilo City, Philippines. 123-130. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center. Kanazawa.
- Keenan C. P. y Blackshaw A. 1999. Mud Crab Aquaculture and Biology. Proceedings of an international scientific forum held in Darwin, Australia, 21–24 April 1997. *ACIAR Proceedings* 78: 216.
- Kim S., Nonaka L. y Susuki S. 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes tet (M) and tet (S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*. 237:147-156.
- Kinne O. 1971. Salinity-invertebrates. *Marine ecology*.
- Kobayashi, S. 2012. Molting growth patterns of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* (De Haan) under laboratory-reared conditions. *Journal of Crustacean Biology*. 32(5): 753-761.
- Kozasa M. 1986. Toyocerin *Bacillus toyoi* as growth promotor for animal feeding. *Microbiology Aliments Nutrition*. 4: 121–135.
- Krepper C. M. y Rivas A. L. 1979. Análisis de las características oceanográficas de la zona austral de la Plataforma Continental Argentina y aguas adyacentes. *Acta Oceanográfica Argentina*. 2(2): 55-82.
- Kurata H. 1962. Studies on the age and growth of Crustacea. *Bulletin of the Hokkaido Regional Fisheries Research Laboratory*. 24: 1-115.
- Lange S. y Schram F. R. 1999. Evolución y filogenia de los crustáceos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*. 26: 235-254.
- Lanfredi N. W. 1974. Corrientes superficiales en aguas costeras del Golfo Nuevo.
- Lasta M., Ciocco N. F., Bremec C. y Roux A. 1998. Moluscos bivalvos y gasterópodos. En: "El Mar Argentino y sus recursos Pesqueros" 2: 115-142. (Boschi, Ed.), INIDEP, Mar del Plata.
- Lavens P. y Sorgeloos P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture (No. 361). Food and Agriculture Organization (FAO).
- Lavens P. y Sorgeloos P. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*. 181(3): 397-403.
- Lawrence C., James A. y Mobley S. 2015. Successful replacement of *Artemia salina* nauplius with marine rotifers (*Brachionus plicatilis*) in the diet of preadult zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. 12(5): 366-371.
- Leal G. A., Dima J. B., Dellatorre F. G. y Barón P. J. 2008. Schedule of the reproductive events and maturity at size of the Patagonian stone crab *Platyxanthus patagonicus* (Brachyura, Platyxanthidae). *Journal of Crustacean Biology*. 28(2): 262-269.
- Lee R. F., O'Malley K. y Oshima Y. 1996. Effects of toxicants on developing oocytes and embryos of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Environmental Research*. 42 (1–4): 125–128.
- Lefébure T., Douady C. J., Gouy M. y Gibert, J. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular phylogenetics and evolution*. 40(2): 435-447.
- Léger P., Bengtson D. A., Sorgeloos P., Simpson K. L. y Beck A. D. 1987. The nutritional value of *Artemia*: a review. *Artemia research and its applications*. 3:357-372.
- Lerczak J. A., Hendershott M. C. y Winant, C. D. 2001. Observations and modeling of coastal internal waves driven by a diurnal sea breeze, *Journal of Geophysical Research*. 106: 19715–19729.

- Li J., Tan B., Mai K., Ai Q., Zhang W., Xu W., ... y Ma H. 2006. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture*. 253(1): 140-147.
- Li H. Y. y Hong S. Y. 2007. The effect of temperature and salinity on survival and growth of *Crangon uritai* (Decapoda: Crangonidae) larvae reared in the laboratory. *Marine Ecology*. 28(2): 288-295.
- Li S., Cheng Y., Zhou B. y Hines A. H. 2012. Changes in biochemical composition of newly spawned eggs, prehatching embryos and newly hatched larvae of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Shellfish Research*. 31(4): 941-946.
- Liao I. C. y Huang Y. S. 2000. Methodological approach used for the domestication of potential candidates for aquaculture. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. Zaragoza: CIHEAM.
- Lindner B. 2005. Impacts of mud crab hatchery technology in Vietnam. Assessment Series Report N° 36, October 2005. ACIAR projects FIS/1992/017 and FIS/1999/076. Economic Research Associates and School of Agricultural and Resource Economics University of Western Australia. 68.
- Lignot J. H., Spanings-Pierrot C. y Charmantier G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. 191(1): 209-245.
- Long W.C., Popp J., Swiney K.M. y Van Sant S.B. 2012. Cannibalism in red king crab, *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815): Effects of habitat type and predator density on predator functional response. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 422–423(0): 101-106.
- Lora-Vilchis M. C., Cordero-Esquivel B. y Voltolina, D. 2004. Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros muelleri* during its early life stages. *Aquaculture Research*. 35(11): 1086-1091.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265–275
- Loyola Rihbein S. A. 2009. Evaluación de sistemas de cultivo y dietas para juveniles de *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae), y obtención de un indicador fisiológico que permita la identificación de individuos con alta tasa de crecimiento, bajo condiciones de laboratorio". Tesis de grado. Escuela de Acuicultura y Pesquerías. Universidad Austral de Chile, Puerto Montt. 67.
- Luppi T. A., Spivak E. D. y Bas C. C. 2003. The effects of temperature and salinity on larval development of *Armases rubripes* Rathbun, 1897 (Brachyura, Grapsoidea, Sesamidae), and the southern limit of its geographical distribution. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 58(3): 575-585.
- Ma C. W., Cho, Y. S. y Oh K. H. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture*. 287(3): 266-270.
- MacDonald J. M., Shields J. D. y Zimmer-Faust R. K. 1988. Acute toxicities of eleven metals to early life-history stages of the yellow crab *Cancer anthonyi*. *Marine Biology*. 98 (2): 201-207.
- Mantelatto F. L. M., y Fransozo A. 1997. Fecundity of the Crab *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Decapoda, Brachyura, Portunidae) From the Ubatuba Region, São Paulo, Brazil, Fecundity of the Crab *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Decapoda, Brachyura, Portunidae) From the Ubatuba Region, São Paulo, Brazil. *Crustaceana*, 70(2), 214-226.
- Martelli A., Tapella F., González-Pisani X., Dellatorre F. y Barón P. J. 2016. Embryonic development of the southern surf crab *Ovalipes trimaculatus* (Decapoda: Brachyura: Portunoidea). *Scientia Marina*. 80(4): 499-509.

- MCndez E. y Gonzllez R. M. 1997. Seasonal changes in the chemical and lipid composition of fillets of the Southwest Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*). Food Chemisrry, Vol. 59, No. 2, pp. 213-217.
- Medellín-Mora J., Campos N. H., Franco-Herrera A., Jaimes, J. C. e Invemar C. D. P. B. 2009. Taxonomía de larvas zoea de crustáceos decápodos del área nororiental del mar caribe colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras. 38: 55-73.
- Melo G. A. S. 1985 Taxonomía e padroes distribucionais e ecológicos dos Brachyura (Crustacea: Decapoda) do litoral sudeste do Brasil. Tesis Doctoral. Universidade de São Paulo.
- Mercier A., Doncaster E. J. y Hamel J. F. 2013. Contrasting predation rates on planktotrophic and lecithotrophic propagules by marine benthic invertebrates. Journal of experimental marine biology and ecology. 449: 100-110.
- Miller N. A., Paganini A. W. y Stillman, J. H. 2013. Differential thermal tolerance and energetic trajectories during ontogeny in porcelain crabs, genus *Petrolisthes*. Journal of Thermal Biology. 38(2): 79-85.
- Mohebbi F., Hafezieh M., Seidgar M., Hosseinzadeh Sahhafi H., Mohenpour Azari A. y Ahmadi R. 2016. The growth, survival rate and reproductive characteristics of *Artemia urmiana* fed by *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros sp.*, *Chlorella sp.* and *Spirolina sp.* as feeding microalgae. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 15(2): 727-737.
- Moksnes P. O., Mirera D., Lokina R., Ochiewo J., Mahudi H., Jiddawi N., ... y Troell M. 2015. Feasibility of extensive, small-scale mud crab farming (*Scylla serrata*) in East Africa. Western Indian Ocean Journal of Marine Science. 14(1-2): 23-38.
- Molina-Ocampo R. E., J. F. Márquez-Farías y E. Ramírez-Félix. 2006. Jaiba del Golfo de California. 131-155. En: Arreguín Sánchez F., L. Beléndez Moreno, I. M. Gómez-Humarán, R. Solana Sansores y C. Rangel Dávalos (eds.). Sustentabilidad y Pesca Responsables en México: Evaluación y Manejo. 560.
- Moriarty D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture. 164(1): 351-358.
- Moriyasu M. y Lanteigne C. 1998. Embryo development and reproductive cycle in the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Crustacea: Majidae), in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. Canadian Journal of Zoology. 76: 2040-2048.
- Morsan E. M. 2000. Informe preliminar sobre la abundancia del cangrejo *Ovalipes trimaculatus* en la costa norte del Golfo San Matías. San Antonio Oeste, Argentina IBMyP. Technical Report. (01/00). 7.
- Mortensen A. y Damsgard B., 1995. Growth, Mortality, and Food Preference in Laboratory-reared Juvenile King Crab (*Paralithodes camtschaticus*). In: No.96-02, U.o.A.S.G.C.P.R. (Ed.), International Symposium on Biology, Management and Economics of Crabs from High Latitude Habitats Anchorage, Alaska.
- Müller Y. M. R., Nazari E. M. y Simoes-Costa M. S. 2003. Embryonic Stages of the Freshwater Prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology. 23(4): 869-875.
- Nagao J., Munehara H., Shimazaki K. 1999. Embryonic development of the hair crab *Erimacrus isenberckii*. Journal of Crustacean Biology. 19: 77-83.
- Narvarte M., González R., Osovníkar P., Camarero M., Curtolo L. y Reinaldo M. O. 2007. Experimental trap fishery for the crabs *Platyxanthus patagonicus* and *Ovalipes trimaculatus* in the San Matias Gulf, Patagonia, Argentina. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 87(05): 1235-1242.
- Ng P. K. L. Guinot D. y Davie P. J. F. 2008. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant Brachyuran crabs of the world Raffles Bulletin of Zoology Suppl. 17: 1-286.

- Noorulhudha N. F., Ikhwanuddin M., Azra M. N., Siti-Aishah A. y Abol-Munafi, A. B. 2016. Embryonic development and hatching rate of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) under different water salinities. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences .16: 669-677.
- Nurdían R. y Zeng C. 2007. Effects of temperature and salinity on the survival and development of mud crab, *Scylla serrata* (Forsskål), larvae. Aquaculture Research. 38(14): 1529-1538.
- O'Connor N. J. 2007. Stimulation of molting in megalopae of the Asian shore crab *Hemigrapsus sanguineus*: physical and chemical cues. Marine Ecology Progress Series. 352: 1-8.
- Olive P. J. W. 1995. Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. Journal of Thermal Biology: 20:79-90.
- Orensanz J. M. y Jamieson G. S. 1998. The assessment and management of spatially structured stocks: an overview of the North Pacific Symposium on Invertebrate Stock Assessment and Management. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences. 441-459.
- Orensanz J. M., Ana M. Parma, Gabriel Jerez, Nancy Barahona, Mario Montecinos y Ines Elias. 2005. What are the key elements for the sustainability of "S-Fisheries"? Insights from South America. Bulletin of Marine Science. 76(2): 527–556.
- Pantaleão J. A. F. Barros-Alves S. D. P., Tropea C., Alves D. F., Negreiros-Fransozo M. L. y López-Greco L. S. 2015. Nutritional vulnerability in early stages of the freshwater ornamental "red cherry shrimp" *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Caridea: Atyidae). Journal of Crustacean Biology. 35(5): 676-681.
- Paschke K. A., Gebauer P., Buchholz F. y Anger K. 2004. Seasonal variation in starvation resistance of early larval North Sea shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crangonidae). Marine Ecology Progress Series. 279: 183-191.
- Pereira R. T., Teixeira G. M., Bertini G., de Lima P. A., Alencar C. E. y Fransozo V. 2014. Environmental factors influencing the distribution of three species within the genus *Persephona* Leach, 1817 (Crustacea, Decapoda, Leucosiidae) in two regions on the northern coast of São Paulo State, Brazil. Latin American Journal of Aquatic Research. 42(2).
- Phianphak W., Rengpipat S., Piyatiratitivorakul S. y Menasveta P. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus spp.* for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Journal of Scientific Research. 24: 41-51.
- Pinheiro M. y A. Franzoso. 2002. Reproduction of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: Portunidae) on the Brazilian coast near 23°30'S. Journal of Crustacean Biology .22 (2): 416-428.
- Putro S. P. y Fahrian H. H. 2015. Application of Environmental Management on the Farming Practice of Mud Crab *Scylla serrata* at Coastal Area of Ujung Alang, Cilacap, Indonesia: Efforts toward Sustainable Aquaculture. Procedia Environmental Sciences. 23: 297-306.
- Quinitio E. T., Parado-Esteva F. D., Millamena, O. M., Rodriguez E. y Borlongan E. 2001. Seed production of mud crab *Scylla serrata* juveniles. Asian Fisheries Science. 14(2): 161-174.
- Quinitio E. T. 2009. Advances in mud crab hatchery and nursery. Infofish International. 3: 16-18.
- Quinitio, E.T., Esteva, F.D.P., 2011. Survival and growth of mud crab, *Scylla serrata*, juveniles subjected to removal or trimming of chelipeds. Aquaculture 318(1), 229-234.

- Quinitio E. T. 2015. Status of mud crab industry in the Philippines. In Proceedings of the International Seminar-Workshop on Mud Crab Aquaculture and Fisheries Management, 10-12 April 2013, Tamil Nadu, India. 27-35. Rajiv Gandhi Centre for Aquaculture (MPEDA).
- Rahman M. M., Islam M. A., Haque S. M. y Wahab A. 2017. Mud Crab Aquaculture and Fisheries in Coastal Bangladesh. *World Aquaculture*. 47.
- Rathbun M. J. 1898. The Brachyura collected by the U.S. Fish commission steamer Albatross on the voyage from Norfolk, Virginia, to San Francisco, California. *Proceedings of the United States National Museum* 21: 567–616, pls. 41–44.
- Ravi R. y Manisseri. M. K. 2013. Alterations in size, weight and morphology of the eggs of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* Linnaeus, 1758 (Decapoda, Brachyura, Portunidae) during Incubation. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 13: 509-515.
- Reis D. B., Acosta N. G., Almansa E., Navarro J. C., Tocher D. R., Andrade J. P. ... y Rodríguez C. 2017. Comparative study on fatty acid metabolism of early stages of two crustacean species: *Artemia sp.* metanauplius and *Grapsus adscensionis* zoeae, as live prey for marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 204: 53-60.
- Rejeki S. 2007. The effects of different water flow rates on the survival rate of blue crab (*Portunus pelagicus*) zoea IV – megalopa stages. *Journal of Coastal Development*. 10: 197-203.
- Renaud S. M., Thinh L. V. y Parry D. L. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*. 170(2): 147-159.
- Riquelme C., Araya R., Vergara N., Rojas A., Guaita M. y Candía M. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*. 154(1): 17-26.
- Riquelme C., Araya R. y Escribano R. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*. 181(1): 25-36.
- Rivas A. y Ripa P. 1989. Variación estacional de la estructura termo-halina de golfo Nuevo, Argentina. *Revista Geofísica. (Mex)* 28: 3-23.
- Rodríguez E. M., Quinitio E. T., Parado-Estepa F. D. y Millamena O. M. 2001. Culture of *Scylla serrata* megalops in brackishwater ponds. *Asian Fisheries Science*. 14:185–189.
- Rodríguez E. M., Parado-Estepa F. D. y Quinitio E. T. 2007. Extension of nursery culture of *Scylla serrata* (Forsskål) juveniles in net cages and ponds. *Aquaculture Research*. 38(14): 1588-1592.
- Romano N. y Zeng C. 2006. The effects of salinity on the survival, growth and haemolymph osmolality of early juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*. 260(1): 151-162.
- Romero M. C. 2003. Hábitos alimentarios y bioenergética de la langostilla Munida subrugosa (Decapoda: Anomura) del Canal Beagle, Argentina. Tesis. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba. 208.
- Rosenberg M. S. 2001. The systematics and taxonomy of fiddler crabs: a phylogeny of the genus *Uca*. *Journal of Crustacean Biology*. 21(3): 839-869.
- Ruscoe I. M., Shelley C. C. y Williams G. R. 2004. The combined effects of temperature and salinity on growth and survival of juvenile mud crabs (*Scylla serrata* Forskal). *Aquaculture*. 242 (1–4):641–654.
- Sainz-Hernández J. C., Fierro-Coronado J. A., Aguiñaga-Cruz J. A., García-Rodríguez L. D., Barraza-López J. S., Santamaría-Miranda A., ... y Castro-Martínez C. 2016.

- Effect of temperature on the morphometric development of eggs in the prawn *Macrobrachium americanum* (Caridea: Palaemonidae) and larval success under experimental conditions. *Invertebrate Reproduction & Development*. 60(3):194-200.
- Sakurai Y., Kiyofuji H., Saitoh S., Goto T. y Hiyama Y. 2000. Changes in inferred spawning areas of *Todarodes pacificus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) due to changing environmental conditions. *ICES Journal of Marine Science*. 57(1): 24-30.
- Samuel N. J. y Soundarapandían P. 2009. Embryonic development of commercially important portunid crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst). *International Journal of Animal and Veterinary Advances*. 1(2): 32-38.
- Samuel N. J. y Soundarapandían, P. 2010. Effect of Salinity on the growth, survival and development of the commercially important portunid crab larvae of *Portunus sanguinolentus* (Herbst). *Current Research Journal of Biological Sciences*. 2(4): 286-293.
- Sandoz M. y Rogers, R. 1944. The effect of environmental factors on hatching, moulting, and survival of zoea larvae of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *Ecology*. 25(2): 216-228.
- Schiffer M., Harms L., Lucassen M., Mark F. C., Pörtner H. O. y Storch D. 2014. Temperature tolerance of different larval stages of the spider crab *Hyas araneus* exposed to elevated seawater P CO₂. *Frontiers in zoology*. 11(1): 87.
- Schoeman D. S., Cockcroft A. C. 1996. A Description of *Ovalipes trimaculatus* (De Hann 1833) (Brachyura: Portunidae: Polybiinae) zoeae reared in the laboratory. *South African Journal of Marine Science*. 17: 113-134.
- Scholtz G., y Dohle. W. 1996. Cell lineage and cell fate in crustacean embryos - a comparative 625 approach. *International Journal of Development Biology*. 40:211-220.
- Scholtz G. 2000. Evolution of the nauplius stage in malacostracan crustaceans. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 38(3): 175-187.
- Scholtz G. y Wolff. C. 2013. Arthropod embryology: cleavage and germ band development. In: 627 Minelli, A, Boxshall, G., Fusco, G. (eds) *Arthropod Biology and Evolution: Molecules, 628 Development and Evolution*. Springer.
- Schoo K. L., Aberle N., Malzahn A. M., Schmalenbach I. y Boersma, M. 2014. The reaction of European lobster larvae (*Homarus gammarus*) to different quality food: effects of ontogenetic shifts and pre-feeding history. *Oecologia*. 174(2): 581-594.
- Seixas P., Rey-Méndez M., Valente L. M. y Otero A. 2008. Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*. 283(1): 83-91.
- Sequeiros C., Vallejo M., Marguet R. E. y Olivera N. L. 2010. Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. *Archives of Microbiology*. 192: 237-245.
- Shen H., Zhou X., Bai A., Ren X. y Zhang Y. 2013. Ecdysone receptor gene from the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*: identification of different splice variants and sexually dimorphic expression, fluctuation of expression in the molt cycle and effect of eyestalk ablation. *General and comparative endocrinology*. 193: 86-94.
- Shock B. C., Foran C. M. y Stueckle T. A., 2009. Effects of salinity stress on survival, metabolism, limb regeneration, and ecdysis in *Uca pugnax*. *J Crustacean Biol*. 29(3): 293-301.
- Smith M. T. y Addison J. T. 2003. Methods for stock assessment of crustacean fisheries. *Fisheries Research*,.65(1): 231-256.

- Sokal R. R. y Rohlf F. J. 1981. The principles and practice of statistic in biological research. WH Creman, San Francisco. 262-265.
- Sorgeloos P. 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. The brine shrimp *Artemia*. 3: 25-46.
- Sorgeloos P., Dhert P. y Candreva P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200(1): 147-159.
- Sotelano M. P. 2012. Biología de los estadios juveniles tempranos de *Lithodes santolla* del Canal Beagle, Ushuaia, Tierra del Fuego. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Soundarapandian P. y Tamizhazhagan, T. 2009. Embryonic development of commercially important swimming crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus). *Current Research Journal of Biological Sciences*. 1(3): 106-108.
- Soundarapandian P., Ilavarasan N., Varadharajan D., Jaideep K. y Suresh. B. 2013. Embryonic development of commercially important Portunid crab *Charybdis feriata* (Linnaeus). *Journal of Marine Science Research*. 3(120):2.
- Spivak E. D. 1997. Los crustáceos decápodos del Atlántico sudoccidental (25°-55°S): distribución y ciclos de vida. *Investigaciones marinas*. 25: 69-91.
- Staton J. L. y Sulkin S. D. 1991. Nutritional requirements and starvation resistance in larvae of the brachyuran crabs *Sesarma cinereum* (Bosc) and *S. reticulatum* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 152(2), 271-284
- Stephenson W. y Rees, M. A. Y.d 1968. A revision of the genus *Ovalipes* Rathbun, 1898 (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Rec. Australian Museum*. 27- 213.
- Stevens B. G. 2006. Embryo development and morphometry in the blue king crab *Paralithodes platypus* studied by using image and cluster analysis. *Journal of Shellfish Research*. 25(2): 569-576.
- Stevens B. G., Swiney K. M. y Buck L. 2008. Thermal effects on embryonic development and hatching for blue king crab *Paralithodes platypus* (Brandt, 1850) held in the laboratory, and a method for predicting dates of hatching. *Journal of Shellfish Research*. 27(5): 1255-1263.
- Stumpf L., Calvo N. S., Pietrokovsky S. y Greco, L. S. L. 2010. Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 304(1), 34-41.
- Strathmann R. R. 2014. Culturing larvae of marine invertebrates. *Developmental Biology of the Sea Urchin and Other Marine Invertebrates: Methods and Protocols*. 1-25.
- Sukumaran K. K. y Neelakantan B. 1997. Sex ratio, fecundity and reproductive potential in two marine portunid crabs, *Portunus (Portunus) sanguinolentus* (Herbst) and *Portunus (Portunus) pelagicus* (Linnaeus) along the Karnataka coast. *Indian Journal of Marine Sciences*. 26: 43-48.
- Sulkin S. D. 1978. Nutritional requirements during larval development of the portunid crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 34(1), 29-41.
- Swingle J. S., Daly B. y Hetrick J. 2013. Temperature effects on larval survival, larval period, and health of hatchery-reared red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Aquaculture*. 384: 13-18.
- Tacon A. G. J., Cody J. J., Conquest L. D., Divakaran S., Forster I. P. y Decamp O. E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture nutrition*. 8(2): 121-137.
- Talpur A. D., Memon A. J., Khan M. I., Ikhwanuddin M., Daniel M. D. y Abol-Munafi, A. B. 2011. A novel of gut pathogenic bacteria of blue swimming crab *Portunus pelagicus*

- (Linnaeus, 1758) and pathogenicity of *Vibrio harveyi* a transmission agent in larval culture under hatchery conditions. *Journal of Applied Science*. 6: 116-127.
- Talpur A. D. y Ikhwanuddin M. 2012. Effects of stress tests on larvae of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758). *Advances in Environmental Biology*. 1909-1916.
- Talpur A. D., Memon A. J., Khan M. I., Ikhwanuddin M., Daniel M. D. y Abol-Munafi A. B. 2012. Isolation and screening of lactic acid bacteria from the gut of blue swimming crab, *P. pelagicus*, an in vitro inhibition assay and small scale in vivo model for validation of isolates as probiotics. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 7(1): 1.
- Talpur A. D., Ikhwanuddin M., Abdullah M. D. D. y Bolong A. M. A. 2013. Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. *Aquaculture*. 416: 173-178.
- Tapella F., Romero M. C., Stevens B. G. y Buck C. L. 2009. Substrate preferences and redistribution of blue king crab *Paralithodes platypus* glaucothoe and first crab on natural substrates in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 372(1): 31-35.
- Tapella F., Sotelano M. P., Romero M. C. y Lovrich G. A. 2012. Experimental natural substrate preference of southern king crab *Lithodes santolla* larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 411: 70-77.
- Tropea C., Piazza Y. y Greco L. S. L. 2010. Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the “redclaw” crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 302(1), 49-56.
- Tsang L. M., Schubart C. D., Ahyong S. T., Lai J. C., Au, E. Y., Chan T. Y., ... y Chu K. H. 2014. Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. *Molecular Biology and Evolution*, 31(5), 1173-1187.
- Touraki M., Karamanlidou G., Karavida P. y Chrysi K. 2012. Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia nauplius* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(6): 2425-2433.
- Tully O., Freire J. y Addison J. 2003. Crustacean fisheries. *Fisheries Research* 65: 1–2.
- Turner J. T. 2004. The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. *Zoological Studies*. 43(2): 255-266.
- Valdes L., Alvarez-Ossorio M. T. y Gonzalez-Gurriarán E. 1991. Incubation of eggs of *Necora puber* (L., 1767)(Decapoda, Brachyura, Portunidae). Volume and biomass changes in embryonic development. *Crustaceana*, 60(2), 163-177
- Vallina M., Sal Moyano M. P., Cuartas E. I. y Gavio M. A. 2014. Reproductive system and size maturity of the paddle crab *Ovalipes trimaculatus* (Brachyura: Portunidae) along the Argentine coast. *Journal of Crustacean Biology*. 34(3): 357-366.
- Vaseeharan Bk. A. R. P. y Ramasamy P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in applied microbiology*. 36(2): 83-87.
- Vázquez M. G., Bas C. C. y Spivak E. D. 2016. Ontogeny of salinity tolerance in the invasive shrimp *Palaemon macrodactylus* (Caridea: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*. 36(2): 214-219.
- Venkat H. K., Sahu N. P. y Jain K. K. 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*. 35(5): 501-507.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos, P. y Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64(4): 655-671.

- Vinuesa J. 2005. Distribución de crustáceos decápodos y estomatópodos del golfo San Jorge, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 40: 7–21.
- Viswanathan C., Pravinkumar M., Suresh T. V., Elumalai V. y Raffi S. M. 2016. Carapace width-weight relationship, age, growth and longevity of the mud crab *Scylla olivacea* (Herbst, 1796) in the Pichavaram mangroves, south-east India. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(7): 1379-1386.
- Waddy S. L., Aiken D. E., De Klein D. P. V. 1995. Control of growth and reproduction. In J. R. Factor (ed.), *Biology of the lobster *Homarus americanus**. 217–266. Academic Press, San Diego.
- Wahle R. A. 2003. Revealing stock–recruitment relationships in lobsters and crabs: is experimental ecology the key?. *Fisheries Research*. 65(1): 3-32.
- Waluda C., Rodhouse P., Podestá G., Trathan P. y Pierce G. 2001. Surface oceanography of the inferred hatching grounds of *Illex argentinus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) and influences on recruitment variability. *Marine Biology*. 139(4): 671-679.
- Warwick R. M. 1993. Environmental impact studies on marine communities: pragmatical considerations. *Austral Ecology*, 18(1): 63-80.
- Wickins J. F. 1972. The food value of Brine Shrimp, *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 10(2):151-170.
- Williams M. J. 1981. Methods for analysis of natural diet in portunid crabs (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Journal of experimental marine biology and ecology*. 52(1): 103-113.
- Wyngaard J., Iorio M. I. y Boschi E. E. 2001. ¿Es viable el desarrollo de pesquerías de cangrejos en la Argentina. Informe Técnico, 101. 9.
- Yamamoto T., Yamada T., Fujimoto H. y Hamasaki K. 2014. Effects of temperature on snow crab (*Chionoecetes opilio*) larval survival and development under laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research*. 33(1): 19-24.
- Yamamoto T., Yamada T., Fujimoto H. y Hamasaki K. 2015. Effects of salinity on snow crab (*Chionoecetes opilio*) larval survival and development under laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research*. 34(2): 499-504.
- Yúfera M. y L. M. Lubián. 1990. Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. En: Akatsuka, I. (Ed.). *Introduction to Applied Phycology*. SPB The Academic Publishing, The Hague. 209-227.
- Zar H. K. 1984. *Statistical tools for scientific analysis*.
- Ziaei-Nejad S., Rezaei M. H., Takami G. A., Lovett D. L., Mirvaghefi A. R. y Shakouri M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*. 252(2): 516-524.
- Zmora O. A., Findiesen J., Stubblefield V. F. y Zohar. Y. 2005. Large-scale juvenile production of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Aquaculture*. 244:129–139.
- Zupo V., Maibam C., Fink P. y von Elert E. 2015. Effect of storage on the fatty acid content of foods for post-larvae of the crustacean decapod *Hippolyte inermis*. *Invertebrate Reproduction & Development*. 59(2): 4.