



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
(BIOLOGIA MARINA)

**EFFECTO DEL TIPO DE ALIMENTO EN EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE
HEMBRAS DE *Octopus maya* Y SUS CONSECUENCIAS EN LA CALIDAD DE
LA PROGENIE**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
CLAUDIA PATRICIA CAAMAL MONSREAL

TUTOR PRINCIPAL
DR. CARLOS ROSAS VAZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. MARIA TERESA VIANA CASTILLON
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
M. EN C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. MARCIAL ARELLANO MARTINEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA

MÉXICO, D. F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México

**EFFECTO DEL TIPO DE ALIMENTO EN EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE
HEMBRAS DE *Octopus maya* Y SUS CONSECUENCIAS EN LA
CALIDAD DE LA PROGENIE**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias

(Biología Marina)

Presenta

Claudia Patricia Caamal Monsreal

Director de Tesis: Dr. Carlos Rosas Vázquez

Comité Tutorial:

Dra. Maria Teresa Viana Castellón

M. en C. Santiago Capella Vizcaino

Dr. Edgar Zenteno

Dr. Marcial Arrellano Martínez

MÉXICO D.F. OCTUBRE 2014

Se agradece el apoyo y asistencia brindada de los técnicos académicos **MC. Korynthia López, la Dra. Elsa Noreña-Barroso** y el **Dr. Sergio Rodríguez** durante el análisis de las muestras biológicas. Así mismo se extiende un agradecimiento especial a la **Dra. Maite Mascaró** por la orientación y las cátedras de estadística que fueron necesarias para la adecuada interpretación de los resultados obtenidos en el presente estudio. Al **Dr. Pedro Gallardo** por sus aportes en la discusión de los aspectos nutricionales de los resultados obtenidos.

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de docencia e Investigación, Facultad de Ciencias UNAM, Sisal Yucatán, bajo la dirección del Dr. Carlos Rosas Vázquez y con los apoyos del Proyecto **CONACYT-BASICO 2010-01 150810** intitulado “**Los procesos fisiológicos, bioquímicos y genéticos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del pulpo *Octopus maya***” bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Rosas Vázquez y el Proyecto **PAPIIT IT200713-3** intitulado “**Desempeño reproductivo y efecto del tipo de alimento en la progenie del pulpo rojo *Octopus maya* y el pulpo patón *Octopus vulgaris* en condiciones de cautiverio**” bajo la responsabilidad del Dr. Pedro Gallardo Espinosa.

“El éxito no es final, el fracaso no es la ruina, el coraje de continuar es lo que cuenta”

(Winstan Churchill)

DEDICATORIAS

Decidado a mi hijo Adolfo Antonio que con su llegada cambio mi existencia.

A mis padres y hermanos por toda la paciencia y el apoyo incondicional que me brindan.

A todo aquel que hago el uso debido de este escrito.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias de Mar y Limnología por permitirme ser una alumna más y a todas la personas que colaborar en cada unos de los procesos administrativos que se llevaron a cabo durante todo el curso.

A mi director de Tesis el Dr. Carlos Rosas Vazquez por todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo por transmitir cada uno de sus conocimientos de una manera muy especial, la cual nos guía hacia los caminos de las ciencia.

A los integrantes de mi comite tutorial la Dra. Maria Teresa Viana Castellón, Dr. Pedro Pablo Gallardo Espinosa, Dr. Unai Marcaida, M. en C. Santiago Capella Vizcaino, Dr. Edgar Zenteno y Dr. Marcial Arrellano Martínez por los comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este estudio.

Al Ing. Luis Yan e Ivan Hernandez por el apoyo brindado durante el desarrollo de los experimentos por su constancia y dedicación.

A mis compañeros de clase Lety, Ester, Lenin, Maria Jose, Nancy, Nico y Enmanuel por todos los gratos momentos y otros no tanto por los que atravesamos durante el curso.

A Roberto por su cariño y amistad sincera, consejos y apoyo sin igual.

A mis amigas Nancy y Zulemy que me acompañan en cada etapa de mi vida a pesar de las distancias.

A mis parceros de laboratorio y/o cubil mi queridísima Estefany, Fernando, Lupita, Viri, Miri, Stephy, Karen, Sol, Ariadna, Erika, Jose, Arturo por su amistad sincera (eso creo , ehh!!!), las risas, porras y cada uno de los momentos agradables compartidos al final de este escrito. Estudiantes llegan y se van, pero Ustedes siempre estaran presentes en Mi. Gracias Chicos pulpito.

CONTENIDO

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I ANTECEDENTES	2
1.1 Reproducción	4
1.2 Nutrición y Crecimiento	6
1.3 Alimentación en reproductores de Cefalópodos	9
1.4 Desarrollo embrionario	10
II HIPOTESIS GENERAL	11
III OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo general	12
3.2 Objetivos específicos	12

CAPITULO II

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE CUATRO POSIBLES INSUMOS EN AL DIETA DE REPRODUCTORES DE *Octopus maya*

I INTRODUCCIÓN	14
II MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 Caracterización química de las dietas experimentales: jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>), manto de calamar (<i>Dosidicus gigas</i>), mejillón (<i>Perna canalicus</i>) y cabezas de pescado (<i>Epinephelus morio</i>)	16

2.2. Determinación químico proximal en dietas experimentales.....	16
2.2.1 <i>Determinación del perfil de aminoácidos en dietas experimentales</i>	17
2.2.2 <i>Determinación del perfil de ácidos grasos en dietas experimentales</i>	18
2.3 Análisis estadístico	19
III RESULTADOS	19
3.1 Análisis bromatológico de los alimentos experimentales	19
3.2 Perfil de aminoácidos	21
3.3 Perfil de ácidos grasos.....	22
IV DISCUSIÓN	28
V CONCLUSIONES	31

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN ZOOTÉCNICA DE LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA DE HEMBRAS DE *Octopus maya* CON DIFERENTES DIETAS

I INTRODUCCIÓN	33
II MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1 Captura y selección de reproductores de <i>Octopus maya</i>	36
2.2 Alimentación y mantenimiento de los reproductores	37
2.3 Tasa de ingestión (TI; % día ⁻¹)	38
2.4 .Manejo del desove	39

2.5 Análisis estadístico	40
III RESULTADOS	40
3.1 Días para el desove	40
3.2 Número de huevos desovados	41
3.3 Número de huevos por racimo	42
3.4 .Número de crías totales por desove	42
3.5 Número de crías vivas y porcentaje de eclosión.....	42
3.6 Número de crías muertas	42
3.7 Peso de las crías después de la eclosión	42
3.8 Supervivencia al periodo de ayuno de 10 días	43
IV DISCUSIÓN	45
V CONCLUSIÓN	48

CAPITULO IV

EFFECTO DEL TIPO DE ALIMENTO EN LA CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA Y BIOQUIMICA DEL HUEVO Y LOS EMBRIONES DE *Octopus maya*

I INTRODUCCIÓN	51
II MATERIALES Y METODOS	53
2.1 Obtención de muestra	53
2.2 Medidas morfométricas de los huevos	53

2.3 Medidas morfométricas en embriones	54
2.4 Obtención de muestras para análisis químico	54
2.5 Peso de crías eclosionadas	54
2.6 Prueba de ayuno	54
2.7 Análisis químicos de vitelo y líquido perivitelino en huevos de <i>O. maya</i>	55
2.7.1 Determinación de lípidos totales	55
2.7.2 Proteína soluble	56
2.7.3 Perfil de ácidos grasos	56
2.7.4 Perfil de aminoácidos	56
2.8 Análisis estadístico	56
III RESULTADOS	58
3.1 Análisis químico del vitelo en los huevos de <i>O. maya</i> producidos con las dietas experimentales	58
3.1.1 Lípidos en el vitelo	58
3.1.2 Proteína soluble en líquido perivitelino de huevos de pulpo <i>O. maya</i>	59
3.1.3 Perfil de ácidos grasos en el vitelo de huevos de <i>O. maya</i>	59
3.2 Características morfométricas de los huevos en relación a la concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)	64
3.2.1 Peso y largo de huevos	64
3.2.1 Volumen de vitelo	65

3.3 Características morfométricas de los embriones	66
3.4 Perfil de aminoácidos en el vitelo de huevos de <i>O. maya</i>	67
IV DISCUSIÓN	73
V CONCLUSIÓN	76

CAPITULO V

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES GENERALES Y REFERENCIAS

I DISCUSIÓN GENERAL	78
I CONCLUSIONES GENERALES	83
III REFERENCIAS	84
IV ARTICULO SOMETIDO PARA SU PUBLICACIÓN	97

TABLAS

Tabla 1. Factores que afectan la reproducción en peces según Fernández-Palacios, <i>et al.</i> , (2005).....	4
Tabla 2. Composición químico proximal (base seca) de los insumos y las dietas elaboradas para la alimentación de las hembras reproductoras de <i>O. maya</i> . Valores como promedio \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos a $P < 0.05$	20
Tabla 3. Contenido total de aminoácidos en los insumos y en las dietas ofrecidas a las hembras en reproducción de <i>O. maya</i> . Valores como g/100g proteína. Promedios \pm	

desviación estándar. Datos para las dietas calculados tomando en consideración una proporción de 70% para la carne de jaiba y 30% para el complemento de las diferentes dietas.....24

Tabla 4. Composición de ácidos grasos (% área) de los insumos y las dietas elaboradas para las hembras en reproducción de *O. maya*. Valores como promedio \pm desviación estándar, muestras por triplicado26

Tabla 5. Etograma de *O. maya* durante la cópula y transferencia espermática (Lira, 2013).....34

Tabla 6. Características zootécnicas de hembras de *O. maya* alimentadas con dietas diferentes. Valores promedio \pm desviación estándar44

Tabla 7. Composición de ácidos grasos (%) en el vitelo de huevos de hembras de *O. maya* alimentadas con diferentes dietas. Valores como promedio \pm desviación estándar.....61

Tabla 8. Calidad de proyección de los componentes del perfil de ácidos grasos del vitelo de los huevos de *O. maya* procedentes de hembras alimentadas con los diferentes tipos de alimentos63

Tabla 9. Contenido total de aminoácidos en el vitelo de huevos de hembras de *O. maya* alimentadas con diferentes dietas. Valores como g/100g proteína, promedios \pm desviación estándar.....69

Tabla 10. Calidad de proyección de los componentes del perfil de AA del vitelo de los huevos de *O. maya* procedentes de hembras alimentadas con los diferentes tipos de alimentos70

FIGURAS

Figura 1. Instrumento utilizado para la extracción de lípidos totales en las dietas experimentales17

Figura 2. Equipo de HPLC utilizado en el análisis de aminoácidos de los insumos que conformaron las dietas para los reproductores de <i>O. maya</i> y en las muestras de vitelo de los huevos producidos por las hembras alimentadas con las diferentes dietas experimentales	18
Figura 3. Distribución de los aminoácidos en los insumos utilizados en las dietas experimentales mediante el análisis de componentes principales (ACP)	22
Figura 4. Distribución de los ácidos grasos en los insumos utilizados en las dietas experimentales mediante el análisis de componentes principales (ACP)	25
Figura 5. Distribución de los grupos de ácidos grasos en las dietas experimentales mediante el análisis de componentes principales (ACP)	25
Figura 6. Producción de huevos y crías en el estudio: A) Ejemplar de hembra de <i>O. maya</i> en proceso de desove y B) Sistema de incubación artificial	38
Fig. 7. Efecto del tipo de alimento en la tasa de ingestión de hembras de <i>O. maya</i> mantenidas en condiciones experimentales por un periodo de entre 8 y 33 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos a $P < 0.05$	41
Figura 8. Porcentaje de lípidos totales en el vitelo de huevos de <i>O. maya</i> obtenidos con las dietas experimentales.	58
Figura 9. Distribución de los grupos de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) en el vitelo de huevos de <i>O. maya</i> producidos con las dietas experimentales mediante el análisis de componentes principales (ACP).....	60
Fig. 10. Relación entre la edad y el peso y la longitud y el ancho de los huevos de <i>O. maya</i> con diferentes contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en el vitelo y a lo largo del desarrollo embrionario. Valores dados como promedio \pm desviación estándar.....	65

Fig. 11. Relación entre la edad y el volumen del vitelo contenido en los huevos de *O. maya* con diferentes contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en el vitelo y a lo largo del desarrollo embrionario. Valores dados como promedio \pm desviación estándar66

Figura 12. Relación entre la edad y las características morfológicas (diámetro del ojo, longitud del manto, la longitud de brazos y longitud total) de los embriones de *O. maya* con distintos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) del vitelo proveniente de las dietas ingeridas por las hembras durante la ovogénesis. Valores dados como promedio \pm desviación estándar67

Figura 13. Distribución de los aminoácidos presentes en el vitelo de huevos de *O. maya* producidos con las dietas experimentales mediante el análisis de componentes principales (ACP).....70

Fig. 14. Relación entre la edad y las características morfológicas (diámetro del ojo, longitud del manto, la longitud de brazos y longitud total) de los embriones de *O. maya* con distintos niveles de His del vitelo proveniente de las dietas ingeridas por las hembras durante la ovogénesis. Valores dados como promedio \pm desviación estándar72

Fig 15. Esquema que sugiere la forma en que los nutrientes del alimento son llevados hasta el ovario en donde las células foliculares son las responsables de la síntesis del vitelo. Los lípidos son transportados por lipoproteínas que, junto con la hemocianina se encargan de llevarlos a través de la hemolinfa hasta el ovario (Heras and Pollero 1990; Heras and Pollero 1992). Ahí las células foliculares son las responsables de la síntesis de vitelo y por tanto de recibir y sintetizar las moléculas que lo conforman (Di Cosmo *et al.*, 2002). Los aminoácidos son transportados por la sangre, destacando, por su participación en la formación de grupos la Hys, Ile, Leu y Lys80

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I ANTECEDENTES

Los moluscos, además de ser uno de los grupos de mayor diversidad, se encuentran entre los más antiguos. Se postula que en los inicios de su evolución los moluscos fueron animales marinos pequeños (menos de un centímetro de longitud) que con el tiempo y producto de la radiación adaptativa se dio origen a una gran diversidad de grupos, los cuales cuentan en la actualidad con aproximadamente 100 000 especies ya descritas (Rocha, 2003). Entre los grupos descritos se encuentran los cefalópodos, los cuales se piensa que evolucionaron de los Monoplacóforos de concha tabicada y probablemente, planctónicos. Posteriormente, durante el proceso evolutivo, el cuerpo de los cefalópodos se alargó notablemente en dirección del eje dorsoventral, que se transformó en el eje anteroposterior funcional, lo que les permitió adoptar la forma hidrodinámica que presentan la mayoría de las especies actuales (Rocha, 2003).

En los últimos años se ha incrementado el interés por diversas especies de cefalópodos; particularmente en ciencias biológicas y médicas, siendo estos usados como modelos biológicos (Boletzky y Hanlon, 1983). El pulpo *Octopus vulgaris* ha sido modelo de investigación en estudios de neurobiología, fisiología animal y bioquímica, y también de comportamiento animal (Young, 1951; Wells, 1978).

Por otro lado, en los últimos 15 años se ha enfatizado el estudio de su biología y ciclo de vida en cautiverio, con el objetivo de aplicar estos conocimientos a su cultivo integral (Iglesias *et al*; 2007) en un intento por cubrir la demanda de productos de la pesca asociado con el incremento de la población mundial. La FAO menciona que esta demanda no puede ser abastecida y satisfecha únicamente con las pesquerías debido a la situación de estancamiento de las capturas desde 1985, ocasionada por la explotación plena, sobreexplotación o agotamiento de muchos de los sitios de captura que es alrededor del 80%.

En los últimos trece años, los registros oficiales de captura de los pulpos (*Octopus maya* y *O. vulgaris*) en la península de Yucatán han oscilado entre 9,500 y 26,000 toneladas (t) (SAGARPA, 2011). La captura de *O. maya* genera un total de 15,000

empleos directos y una derrama económica anual de aproximadamente 360 millones de pesos, lo que indica que los pulpos de esta especie son objeto de una presión pesquera importante, la cual sostienen buena parte de las actividades pesqueras de la península de Yucatán (Cabrera y Defeo, 2001; SAGARPA, 2011).

La captura de *O. maya* en los últimos años ha aumentado los riesgos de la sobrepesca y la consecuente baja de la producción para los años siguientes. Entre las estrategias de manejo de la pesquería de esta especie, se podrían implementar el mantenimiento o reducción del esfuerzo de pesca, así como su cultivo.

Entre los aspectos que se deben conocer de la biología de una especie cultivada están los parámetros ambientales y biológicos que determinan el éxito de la reproducción en cautiverio. Diversos estudios han demostrado que la reproducción en la mayoría de los cefalópodos depende fundamentalmente del tipo y calidad de la alimentación de los reproductores (Montoya *et al.*, 2002 y Olivares, 1996). En este sentido Montoya *et al.*, (2002), reportaron que la síntesis del vitelo depende del alimento que ingiere la hembra directamente y no de las reservas de ésta. Olivares, (1996), menciona que al parecer durante la pre-puesta, requieren mayor cantidad de alimento para cubrir con los requerimientos energéticos del desove y mantener las reservas suficientes para el periodo de incubación, por lo que es fundamental la calidad de la nutrición durante estos procesos. Entre los parámetros ambientales se mencionan la intensidad de luz, temperatura y la calidad del agua.

Asimismo, se ha observado que la fisiología del reproductor y su estado hormonal afectan la incorporación de compuestos en los huevos. Existen diversos factores que pueden afectar la calidad de la puesta, pero sin embargo solo algunos han demostrado una clara influencia en la calidad de la progenie (Tabla 1) (Fernández-Palacios, *et al.*, 2005, Carrillo *et al.*, 1995).

Tabla 1. Factores que afectan la reproducción en peces según Fernández-Palacios, *et al.*, (2005).

FACTORES QUE AFECTAN A LOS REPRODUCTORES	FACTORES QUE AFECTAN LOS HUEVOS
Alimentación	Propiedades físicas y biológicas
Inducción a la puesta	Aberraciones cromosómicas
Estrés	Colonización bacteriana
Edad	Propiedades físico-químicas del agua de la puesta e incubación
Sobremaduración	

En peces, se ha mencionado que el sistema endocrino de la hembra durante el crecimiento del oocito en el ovario puede afectar la calidad de la puesta, ya que existen evidencias de que los nutrientes asimilados por el oocito, y su procesamiento durante el crecimiento y maduración del mismo son unos de los principales factores que afectan la viabilidad del huevo. Aunque los peces se encuentren evolutivamente lejanos de los cefalópodos, es muy probable que los factores nutricionales que modulan la calidad de los huevos y la progenie operen en forma similar en ambos grupos.

1.1 Reproducción

En los cefalópodos la reproducción es sexual; para la evaluación del estado de desarrollo sexual se utilizan escalas de madurez (macroscópicas o microscópicas) y/o índices gonadosomaticos (Tirado *et al.*, 2003). La mayoría de los cefalópodos se reproducen una sola vez en su vida (Mangold, 1983; Giménez y García 2002) y se caracterizan por tener ciclos de vida cortos. El periodo de vida de los cefalópodos está directamente asociado a la temperatura del agua, siendo más larga la vida de las especies que habitan los ambientes fríos en comparación con el de aquellas que habitan las regiones tropicales del mundo (Domínguez *et al.*, (2002) y Mangold, (1983).

La conducta reproductiva de los cefalópodos y en particular de los pulpos es un proceso complejo. Se inicia con el cortejo también denominado comportamiento precopulatorio el cual consiste en cambios de coloración que presenta el macho (Van Heukelem, 1983). La eyaculación ocurre cuando los espermátóforos son transferidos hacia el canal del hectocotilo o brazo modificado y luego mediante movimientos musculares introduce el brazo modificado en la cavidad del manto de la hembra para llevar a cabo la transferencia de los espermátóforos. Los espermátóforos son depositados en la apertura del oviducto distal. La fecundación se lleva a cabo en la glándula del oviducto una vez que los huevos están maduros y son enviados al exterior para ser colocados en el nido (Van Heukelem, 1983).

Entre las especies de pulpos el número de huevos es muy variable, por ejemplo *Octopus briareus* produce de 200 a 500 huevos/desove, *O. maya* de 1000 a 1500 huevos/desove, mientras que *O. vulgaris* de 100,000 a 500,000 huevos/desove. Estudios previos han determinado que aunque la fecundidad no se encuentra directamente relacionada con la talla de las hembras de *O. maya*, la frecuencia de alimentación y la temperatura desempeñan un papel importante en la capacidad reproductiva de la especie, vista a través del número de huevos/desove y el número de crías eclosionadas y posteriormente en la sobrevivencia (Caamal-Monsreal, 2007; Quintana, 2009).

Los intentos de cultivo de *O. maya* se remontan a los trabajos desarrollados por diversos investigadores desde la década de 1960. Entre ellos se encuentran los reportes de Solis (1967), Van Heukelem (1976, 1977) y DeRusha *et al.* (1989), quienes desarrollaron el cultivo de esta especie a escala de laboratorio, con el principal objetivo de obtener información para el mantenimiento de organismos con fines de investigación. En ese mismo periodo el cultivo de *O. maya* se llevó a cabo por cuatro (Hanlon y Forsythe, 1985) o cinco generaciones consecutivas (Van Heukelem, 1983), lo que demostró que la especie podría ser adecuada para el desarrollo de cultivos masivos. Recientemente, se han logrado conocer diversas características biológicas y fisiológicas que garantizan la reproducción en cautiverio de la especie *O. maya*

manteniendo una producción constante de aproximadamente 5000 crías al mes (Rosas, *et al.* 2014).

1.2 Nutrición y Crecimiento

Diversos estudios han demostrado que *O. maya* presenta un crecimiento acelerado, debido a sus elevadas tasas de ingestión y de conversión de alimento que van desde 30 al 60% por día (Hanlon y Forsythe, 1985). Por otro lado, Van Heukelem (1983) estimó tasas de conversión de alimento de *O. maya* cercanas al 40% por día, con las cuales pudo alcanzar 1 Kg en 4 meses, y llegar a pesos superiores a los 3 Kg en 9 meses a 25°C.

Hanlon y Forsythe (1985) encontraron que las especies de pulpo con huevos de desarrollo directo como *O. maya* llegaron a los 5.7 Kg, con tasas de crecimiento del 4.1% al día durante su ciclo de vida completo en sistemas de cultivos. Por esta y otras razones, estos mismos autores, indicaron que *O. maya* es una de las especies más apropiadas para el cultivo a gran escala y en densidades elevadas, después de *O. bimaculoides* y *O. digueti*.

Aunque a la fecha no se cuenta con una tecnología completa para el cultivo de *O. maya*, algunos reportes son alentadores. En algunos ensayos de engorda se ha encontrado que la mortalidad en los tanques de cultivo es baja. Por ejemplo, Van Heukelem (1983) y Hanlon y Forsythe (1985) reportan mortalidades de entre 20 y 30% para la totalidad del ciclo de vida. Según Van Heukelem (1983), los ejemplares de *O. maya* cultivados en el laboratorio crecen más que los capturados en el medio natural, lo que al parecer se relaciona con la calidad y cantidad del alimento disponible.

Según Cagnetta y Sublimi, (2000) el régimen de alimentación de *O. vulgaris*, así como en la mayor parte de pulpos cultivados, está basado en uso de alimentos frescos y vivos, y hasta esa fecha el uso de alimentos secos parecía poco factible. Inclusive en la actualidad no hay reportes que indiquen el uso de alimentos secos que puedan sustituir completamente el uso de los alimentos frescos o vivos. Consecuentemente la

mayor parte de los experimentos relacionados con dietas se basan en el uso de dietas naturales, particularmente crustáceos, moluscos y peces.

En la naturaleza los crustáceos constituyen una parte importante en la dieta de los cefalópodos; sin embargo, en un sistema de cultivo la disponibilidad de crustáceos y su precio pueden ser un problema para el cultivo (García y Cerezo, 2006). García y Cerezo (2006) utilizaron pescado fresco como alimento único o complementario para evaluar el crecimiento de *O. vulgaris* y encontraron que el mejor crecimiento fue con la dieta que contenía cangrejo-pescado la cual se administraba en días alternados. En esos experimentos el crecimiento fue de casi el 2% por día y una eficiencia de alimentación de casi el 40% por día.

En estudios realizados con el pulpo *O. maya* en condiciones de laboratorio, Rodríguez (2006) recomienda el uso de crustáceos de bajo valor comercial como cangrejos del genero *Carcinus* y un tipo de sardina en relación 3:1. También propusieron utilizar una ración equivalente al 15% de la biomasa del pulpo al inicio del cultivo para después disminuirla hasta el 5% a la cosecha, con reducción de 1% por semana. En otro estudio realizado con juveniles de *O. maya* que fueron alimentados con presas vivas (palemónidos) se obtuvo una sobrevivencia del 60% en 30 días de experimento. Trabajando con la misma especie, Aguila *et al.*, (2008) probaron seis tipos de dietas con diferente porcentaje de inclusión de concentrado proteico de pescado (0, 5, 10, 15 y 20%) y encontraron que con la inclusión del 15% de ese concentrado en el total de la dieta se obtuvieron los mejores resultados para la estimulación de las enzimas digestivas con reducción del costo energético asociado a la digestión, mejorando así la producción de biomasa. Estudios más recientes han demostrado que los juveniles de *O. maya* tienen altas tasas de crecimiento cuando se les ofrece gamaridos marinos en combinación con una pasta elaborada a base de harina de calamar y jaiba (*Callinectes spp*), hecho que sin duda demuestra que, con alimentos complementarios, esta especie acepta bien dietas elaboradas (Baesa-Rojano *et al.*, 2012). En un estudio más completo llevado a cabo sobre la fisiología digestiva de *O. maya* se reportó que uno de los factores que limitan la digestibilidad de las dietas elaboradas posiblemente este asociada con el tipo de proteína que conforma el alimento (Martínez *et al.*, 2011a). La

posible participación de enzimas ácidas del tipo de las catepsinas y un ritmo digestivo que incluye dos etapas, ha hecho pensar que es el contenido de la proteína soluble el que determina la adecuada digestión del alimento (Martinez *et al.*, 2011a; Martínez *et al.*, 2011b; Martinez *et al.*, 2011c). Si los alimentos son elaborados principalmente con harinas obtenidas en altas temperaturas y la alta temperatura elimina las proteínas solubles y desnatura las proteínas reduciendo la digestibilidad (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008) es posible que ese mismo mecanismo se encuentre operando en los pulpos y que sea, precisamente la falta de proteína soluble de las dietas elaboradas las que limiten la digestibilidad y por ende el crecimiento de animales alimentados con ese tipo de dietas. En ese sentido, Rosas *et al.* (2013) demostraron que la digestibilidad y el crecimiento de *O. maya* es afectado directamente por el tipo de proteína con que es elaborado el alimento, sugiriendo que esto es producto de la imposibilidad de los animales de digerir proteínas desnaturalizadas utilizadas en la elaboración de alimentos balanceados. En ese trabajo se concluyó que esa limitación está ligada con la presencia de catepsinas en el jugo gástrico, las cuales, al igual que la pepsina son fuertemente afectadas por la carbonilación de la proteína procesada con calor, reduciendo su capacidad hidrolítica (Santé-Lhoutellier *et al.* 2008). Con eso en mente, Martinez (2010) diseñó un alimento balanceado elaborado con harinas liofilizadas de calamar (50%; *Dosidicus gigas*), y jaiba (50%; *Callinectes sapidus*), y adicionada con una mezcla de vitaminas y minerales. Esa dieta fue aglutinada utilizando gelatina natural (Rosas *et al.*, 2008) y suministrada a los animales en forma de pasta semi-húmeda. Esta dieta fue comparada con carne de cangrejo fresca, tal y como se venía utilizando en animales en otros estudios. Los resultados obtenidos por Martínez (2010) mostraron que cuando a los juveniles se les alimenta con harinas liofilizadas éstos crecen más y sobreviven en mayor proporción que cuando se les alimenta con carne fresca de cangrejo. Esos resultados permitieron comprobar la hipótesis que señalaba que el tipo de proteína es el principal factor limitante en la digestibilidad de los pulpos, debido principalmente a la forma que estos animales tienen de digerir el alimento.

1.3 Alimentación en reproductores de Cefalópodos

Desafortunadamente, a la fecha se sabe mucho menos de la nutrición de los reproductores de lo que actualmente se sabe de la nutrición de los juveniles. La nutrición en los reproductores es una de las áreas importantes ya que de estos depende el inicio de la cadena de cultivo (Books *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001).

En la actualidad existe una dieta que se utiliza para la alimentación de reproductores de pulpo *O. maya* que es producto de investigaciones realizadas con anterioridad. Esta dieta está conformada por una combinación de jaiba y mejillón (70-30%), la cual mostró la mayor producción de huevos por desove cuando fue comparada con otras mezclas. Aunque el uso de mejillón (*Mytilus spp.*) es apropiado para esto, los costos que actualmente tiene este insumo podrían hacer inviable el escalamiento productivo de una unidad de cultivo de esta naturaleza. Por esa razón se ha visto la necesidad de sustituir el mejillón o la carne de jaiba (o ambas) en la alimentación de los reproductores de *O. maya*. Entre las especies que pueden ser utilizadas para alimentar a los reproductores de *O. maya* se encuentra el mero (*Epinephelus morio*). En Yucatán la captura promedio de mero es de 6,791 t anuales (INP/SAGARPA, 2004). Como sub producto de esta pesquería, existe una amplia disponibilidad de cabezas que son descartadas por la industria pesquera local produciendo un desecho de alto impacto en la costa. Estudios de crecimiento y engorda de pulpo (*O. maya*) realizados por Rodríguez, (2007) demostraron que la carne de pescado y en particular la contenida en las cabezas resulta un buen complemento en la dieta de los pulpos. En ese estudio se registraron tasas de crecimiento entre 11 y 19 g/día por animal, dependiendo de la temperatura del agua. Estudios realizados en reproductores de *O. vulgaris* han recomendado el uso de pescado hasta en un 15% combinado con crustáceos (80%) y bivalvos (5%) con el fin de obtener puestas viables (Iglesias *et al.*, 2000).

En pulpos se ha observado que la composición química del vitelo es la que tiene una mayor influencia sobre la calidad de los huevos y larvas (Watanabe y Vasallo-Argius, 2003; Quintana, 2009; Bell *et al.* 1997; Almanza *et al.* 1999; Watanabe y Vasallo-Argius, 2003; Quintana, 2009). Diversos autores como Sargent *et al.*, (1995), Sargent

(1999a) e Izquierdo *et al.*, (2001) han manifestado la importancia de los lípidos en la nutrición y reproducción de diversas especies marinas, sin embargo hasta la fecha no se ha podido identificar y establecer los requerimientos nutricionales de los pulpos y sobre todo en la etapa reproductiva, la cual se considera fundamental para garantizar la viabilidad de las crías.

1.4 Desarrollo embrionario

Una descripción detallada del desarrollo embrionario de *O. vulgaris* la realizó Naef, (1928), quién clasificó este proceso en 20 estadios los cuales comienzan inmediatamente después de la puesta. El tiempo de desarrollo embrionario en los pulpos es muy variado dependiendo de la especie y es inversamente proporcional a la temperatura. En *O. maya* (Rosas, *et al.*, 2007, 2012) señalan un desarrollo embrionario de 45-50 días.

En la actualidad el uso de alimentos frescos como las jaibas y la mezcla de jaiba-mejillones (*Mytilus spp.*) ha dado buenos resultados durante la etapa reproductiva de *O. maya* bajo condiciones de cultivo. Esto hace pensar que existen componentes químicos en estos ingredientes que favorecen la síntesis del vitelo que constituye los huevos de esta especie. De acuerdo con su composición, se sabe que la carne de jaiba aporta principalmente proteína (más del 60% de su composición) y una baja proporción de lípidos (4 a 5%) de éstos, el 50% son ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). La composición nutricional de los mejillones es ligeramente diferente a la de las jaibas reportando una proporción mayor de lípidos (14%), de los cuales también el 50% suelen ser AGPI. Aunque en la actualidad se desconocen completamente los requerimientos nutricionales para la reproducción de los pulpos los estudios hasta ahora realizados sugieren que los AGPI podrían estar jugando un papel importante en la síntesis del vitelo. lo cual es un aspecto común a otros grupos de invertebrados marinos (Quintana *et al.* 2008). En este sentido, *O. maya* parece no ser la excepción pues, como ya se mencionó, existen evidencias que indican que los animales alimentados con ingredientes que contienen AGPI tienen buenas respuestas reproductivas (Caamal, 2007; Rosas *et al.*, 2014). Uno de los principales problemas

que hay que resolver para poder escalar el cultivo de *O. maya* a nivel piloto comercial es el de contar con una dieta que sea fácil de manejar y cuyos componentes puedan ser fácilmente encontrados en el mercado de los insumos para la elaboración de alimentos. Existen en Yucatán diversas fuentes de AGPI que pueden ser utilizadas para la elaboración de dietas para pulpo entre las que destacan las cabezas de *E. morio*, las cuales, a pesar de ser un desecho de la industria pesquera local, son una fuente rica de aceites, principalmente por el contenido de éstos en los ojos y en la masa cerebral. A la fecha no existe un análisis químico proximal que permita establecer con precisión el valor nutricional de estos ingredientes y sus posibles efectos en la inclusión de dietas para *O. maya*. Por esa razón, el presente estudio ha sido dirigido para contestar la siguiente pregunta de investigación

Es posible que insumos diferentes al mejillón (como las cabezas de pescado o el manto del calamar) y mezclados con la jaiba en una dieta para las hembras de *O. maya* provoquen el mismo efecto positivo en los desoves y en la calidad de las crías que se ha venido observando cuando se utiliza la mezcla jaiba-mejillón?

A la fecha y después de más de 200 desoves obtenidos en condiciones controladas, los desoves obtenidos han permitido la obtención de crías con un peso promedio de 0.14g, tasas de eclosión cercanas al 90% y sobrevivencias mayores al 80% después de un periodo de ayuno de 10 días. Estos elementos (tamaño y sobrevivencia) han sido considerados indicadores de calidad de las crías.

II HIPÓTESIS

Al igual que en otras especies marinas los ácidos grasos son los nutrientes cruciales para la reproducción de *Octopus maya*. Entre estos los AGPI (de la serie omega 3) son los que se postula que determinan el éxito del proceso reproductivo mediante la obtención de crías viables. Por esa razón es posible pensar que si las hembras de *O. maya* consumen alimentos ricos en AGPI de la serie omega 3, tendrán la posibilidad de producir una mayor cantidad de huevos por desove, huevos más grandes, el vitelo con características químicas que favorecerán la sobrevivencia de las crías producidas bajo

condiciones de cultivo. Asimismo, es de esperar que la combinación de insumos en las dietas para la reproducción aporten mezclas de AA que junto con los ácidos grasos promuevan la formación de embriones de alta calidad. Por su aporte, se espera que las cabezas de pescado junto con la jaiba sean una alternativa adecuada para la sustitución del mejillón en la dieta. No obstante, por su composición aminoacídica, el manto de calamar podría también ser un insumo candidato para esta sustitución ya que este insumo cuenta con elevadas concentraciones de His, AA esencial en la formación del sistema nervioso de los embriones de cefalópodos.

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Encontrar insumos para una dieta adecuada de hembras reproductoras de *O. maya* que aporten mezclas de aminoácidos y que junto con los ácidos grasos promuevan la formación de embriones de alta calidad.

3.2 Objetivos específicos

- Conocer las características químico proximales y los perfiles de ácidos grasos y aminoácidos de insumos alternativos al mejillón para ser utilizados en dietas para las hembras de *O. maya*.
- Conocer la influencia de mezclas de dietas en las características zootécnicas en los desoves producidos por las hembras de *O. maya*.
- Conocer la relación entre la composición bioquímica de las dietas y las características morfológicas de los huevos y embriones y bioquímicas del vitelo de *O. maya* con el fin de establecer las bases para establecer los requerimientos nutricionales para la reproducción de esta especie.

CAPITULO II

CARACTERIZACIÓN QUIMICA DE CUATRO POSIBLES INSUMOS EN LA DIETA DE REPRODUCTORES DE *Octopus maya*

I INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe poca información relacionada a la alimentación de los reproductores de cefalópodos y la información que ha sido generada ha surgido de los conocimientos que se tienen principalmente acerca de la reproducción de peces principalmente. Estudios realizados en el pargo japonés (*Pagrus major*) y otros estudios posteriores han mostrado evidencias de que la composición de las dietas para reproductores durante la etapa de pre-puesta es el factor que mayor influencia tiene en la calidad de los huevos y crías. Se ha detectado que los principales componentes son los lípidos, los AGPI, las proteínas, la vitamina A y E y los carbohidratos (Watanabe *et al.*, 1984, Harel *et al.*, 1994, Carrillo *et al.*, 1995, Emata *et al.*, 2000, Furuita *et al.*, 2003).

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes en las células y constituyen casi la mitad del peso seco de la mayor parte de los organismos, desempeñan muchos papeles biológicos y fisiológicos diferentes, por lo que se considera que las proteínas ejecutan prácticamente todas las actividades de la célula. Químicamente son polímeros constituidos por aminoácidos de los cuales existen 20 que se encuentran en todos los organismos. Entre otras funciones, en cefalópodos se ha demostrado que las proteínas son la principal fuente de energía (Lee, 1994; Águila *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2012).

Los lípidos son considerados de suma importancia ya que juegan un papel importante de forma estructural y funcional regulando diversos procesos fisiológicos. De acuerdo con Quintana, (2009) las principales funciones de los lípidos en los cefalópodos son:

- 1) Componentes de membranas celulares
- 2) Reserva energética
- 3) Transportadores de nutrientes (lipoproteínas)
- 4) Precursores de hormonas esteroideas y de sustancias biológicas activas conocidas como eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos alifáticos de cadena larga y es raro encontrarlos libres en la naturaleza ya que más bien se encuentran en forma esterificada como componentes mayoritarios de los diferentes lípidos, al igual son componentes de los glicéridos y se clasifican en función del número de enlaces en: saturados los cuales no tienen doble enlace carbono-carbono, insaturados o monoinsaturados (AGMI) al menos con un doble enlace carbono-carbono y como poliinsaturados (AGPI) aquellos con dos o más doble enlace (Melo y Tapia, 2004). Quintana (2009) mencionó que en peces, así como en cefalópodos abundan los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0, los monoinsaturados 18:1n-9 y 16:1n-7 y de los poliinsaturados el docosahexaenoico 22:6n-3 (DHA) y el eicosapentaenoico 20:5n-3 (EPA). Sin embargo, de estos ácidos grasos los DHA y EPA no pueden ser sintetizados por los organismos y por lo tanto tienen que ser incorporados en la dieta y por esa razón a estos se les considera como esenciales.

En peces, se ha demostrado la importancia y la función que desempeñan los ácidos grasos en la etapa reproductiva. Por ejemplo, se ha reportado que cuando los reproductores fueron alimentados con altos niveles de ácido araquidónico (AA) se producen huevos de mayor calidad y en las larvas de dorada se pudo mejorar el crecimiento y la supervivencia, así como también la resistencia al estrés por manejo cada vez que se incorporó el AA en la dieta de los reproductores (Bruce *et al.*, 1999).

Por todo lo descrito anteriormente, conocer la composición química de los pulpos así como la composición química de la dieta a suministrar es de gran importancia para la valoración del cambio y/o efecto que esta pudiera tener sobre la etapa reproductiva de los pulpos. De esta forma, los resultados obtenidos podrán ser utilizados como base para establecer el requerimiento nutricional en los reproductores de *O. maya*. Así el objetivo de esta parte de la investigación se dirigió a conocer las características químico proximales, los perfiles de ácidos grasos y aminoácidos de ingredientes alternativos al mejillón para ser utilizados en dietas para las hembras reproductoras de *O. maya*.

II MATERIALES Y MÉTODOS

Previo al análisis se hizo una selección de dietas que poseen altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) para la conformación de la dieta para las hembras en etapa reproductiva. Entre las que se encuentran disponibles en el estado de Yucatán se escogieron las cabezas completas de *E. morio* tanto por su abundancia como por su potencial utilidad por el contenido de AGPI que la cabeza de los peces marinos contienen. Asimismo se eligió el manto de calamar (*D. gigas*) considerando las altas tasas de crecimiento de los juveniles de *O. maya* (Martínez 2010) y el mejillón (*Perna canalicus*) por haber dado resultados satisfactorios en estudios anteriores durante la reproducción de *O. maya*. En base a las características mencionadas de cada uno de los insumos en el presente estudio se plantearon dietas mixtas a razón de 70% jaiba y 30% de complemento (manto de calamar, cabezas de pescado y mejillón).

2.1 Caracterización química de los insumos experimentales: jaiba (*Callinectes sapidus*), manto de calamar (*Dosidicus gigas*), mejillón (*Perna canalicus*) y cabezas de pescado (*Epinephelus morio*).

La caracterización química de los insumos consistió en el análisis químico proximal (proteína total, lípidos totales, cenizas, humedad y carbohidratos), perfil de aminoácidos y el perfil de ácidos grasos en cada uno de los insumos experimentales (jaiba (*Callinectes sp*), manto de calamar (*Dosidicus gigas*), mejillón (*Perna canalicus*) y de cabezas de pescado (*Epinephelus morio*).

2.2 Determinación químico proximal en insumos experimentales

Se determinó el análisis químico proximal de cuatro dietas frescas, jaiba (*Callinectes sp*), manto de calamar (*Dosidicus gigas*), mejillón (*Perna canalicus*) y de cabezas de pescado (*Epinephelus morio*). El análisis se efectuó en un pool compuesto por tres organismos por insumo. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Previo al análisis, las muestras fueron liofilizadas y homogenizadas. La humedad se determinó en sub muestras de cada pool. El análisis químico proximal se realizó en el laboratorio de Química de la UMDI-UNAM Sisal, siguiendo los métodos recomendados por la

Sociedad Oficial de Química Analítica (AOAC, 2000). El contenido de proteína total fue determinado por el método de Kjeldahl ($N \times 6.25$), el contenido de lípidos totales se determinó empleando la técnica del Goldfish (Figura 1), las cenizas por la incineración de la materia orgánica utilizando una mufla a 550°C y la humedad se obtuvo utilizando una balanza de la marca OHAUS.



Figura 1. Instrumento utilizado para la extracción de lípidos totales en las dietas experimentales

2.2.1 Determinación del perfil de aminoácidos en dietas experimentales

El perfil de aminoácidos se determinó empleando el método de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) siguiendo el protocolo recomendado por Waters AccQ tag system. El cuál consta de cuatro etapas:

- a). Preparación de la muestra (lío-filización y desengrasado de la muestra)
- b). Hidrólisis ácida (por el método Pico Tag)
- c). Análisis (diluciones y derivatización)
- d). Cuantificación (aminograma).

El análisis se realizó por triplicado por cada muestra, las cuales fueron hidrolizadas con ácido clorhídrico 6 N, reconstituidas, filtradas y preparadas para el análisis.

Posteriormente fueron analizadas con una columna 4 μm Nova Pack TMC-18, de 3.9 x 150 mm de Waters, con un volumen de inyección de 10 μl por un tiempo de detección de 40 min a una temperatura de 38°C (Figura 2).



Figura 2. Equipo de HPLC utilizado en el análisis de aminoácidos de los insumos que conformaron las dietas para los reproductores de *O. maya* y luego en las muestras de vitelo de los huevos producidos por las hembras alimentadas con las diferentes dietas experimentales.

2.2.2 Determinación del perfil de ácidos grasos en dietas experimentales

Los ácidos grasos fueron determinados en cada una de las dietas utilizando los lípidos extraídos en el análisis químico proximal. El análisis se realizó por triplicado utilizando 50 mg de grasa por muestra. Los lípidos fueron saponificados con KOH/MeOH (20% w/v). De la muestra se obtuvieron los ácidos grasos libres añadiendo HCL (35%) y posteriormente los ácidos grasos fueron metilados con 1 mL del reactivo de metilación Trifloruro de boro (BF_3/MeOH (10% w/v)). Posteriormente los ácidos grasos fueron detectados con un cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama (CG-FID) CLARUS 500 de Perkin Elmer, mediante una columna Omegawax de Perkin Elmer de 30 m, capilar de 0.25 mm de diámetro interno, con película de 25 μm . Se utilizó H_2 como gas transportador y la inyección fue por el método Splitless a una temperatura de 280°C y con el detector a 250°C.

2.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante los análisis químicos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía (Zar, 1999). Posteriormente, se realizó un Test a posteriori de Newman-Keuls para las comparaciones múltiples. Con los datos porcentuales (%) como la humedad se aplicó la transformación arcoseno. De manera complementaria en los perfiles de ácidos grasos y aminoácidos se realizó un análisis multivariado de componentes principales (ACP). En el análisis de componentes principales se usó un modelo matemático que transforma un conjunto de variables correlacionadas en un nuevo conjunto de variables no correlacionadas. En este sentido es utilizado como una herramienta para analizar los datos de variables múltiples.

III RESULTADOS

3.1 Análisis bromatológico de los alimentos experimentales

Los resultados del análisis proximal realizado a cada uno de los insumos utilizados en este estudio mostraron que el manto de calamar y la jaiba presentan un mayor porcentaje de humedad y proteína que el resto de los insumos (Tabla 2). Sin embargo, estos dos insumos presentaron una menor cantidad de lípidos en comparación con el mejillón y las cabezas de pescado. Para el caso de cenizas el insumo que presento mayor cantidad fueron las cabezas de pescado con el 26.24%, seguido de la jaiba con 10.69% ($P < 0.05$; Tabla 2). Los carbohidratos fueron determinados por diferencia. Al conformar la dieta se presentó una mayor cantidad de proteína en la dieta jaiba-calamar (84.62%) y menor en la dieta jaiba-cabezas de pescado (70.21%), en los lípidos se observó lo contrario un mayor porcentaje en la dieta jaiba-cabezas de pescado (12.93%) y menor en la dieta jaiba-calamar (4.28%), algo similar fue observado con la cantidad de cenizas, presentando una mayor cantidad la dieta jaiba-cabezas de pescado (15.36%) y menor en la dieta jaiba-mejillón (6.42) (Tabla 2).

Tabla 2. Composición químico proximal en base seca (BS) de los insumos y las dietas elaboradas para la alimentación de las hembras reproductoras de *O. maya*. Valores como promedio \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos a $P < 0.05$

INSUMO	Humedad		Proteína		Lípidos		Cenizas		Carbohidratos	TOTAL
PORCENTAJE (%) BS										
Manto de calamar (<i>Dosidicus gigas</i>)	84.05	d	90.07	d	4.13	a	6.91	a	0	101.11
	± 0.42		± 0.07		± 0.03		± 0.02			
Mejillón (<i>Perna canalicus</i>)	77.44	b	59.49	b	11.26	c	6.99	a	22.26	77.74
	± 0.22		± 0.57		± 0.20		± 0.09			
Cabezas de pescado (<i>Epinephelus morio.</i>)	69.49	a	42.01	a	32.94	d	26.24	c	0	101.19
	± 0.19		± 2.24		± 0.03		± 0.74			
Jaiba (<i>Callinectes sp.</i>)	83.1	c	82.29	c	4.35	b	10.69	b	2.67	97.33
	± 0.65		± 1.37		± 0.12		± 0.03			
DIETAS										
JAIBA-CALAMAR			84.62		4.28		9.56		1.87	
JAIBA-PESCADO			70.21		12.93		15.36		1.87	
JAIBA-MEJILLÓN			75.45		6.42		9.58		8.55	

Carbohidratos calculados por diferencia

3.2 Perfil de aminoácidos

La concentración observada de aminoácidos esenciales (AAE) expresados en g/100 mg de proteína tales como treonina, lisina y leucina, y los aminoácidos no esenciales (ANE) como la asparagina y glutamina, es similar en todos los insumos analizados y también en los niveles observados en *Octopus maya* (Tabla 3; Águila, *et al.* 2007). Por otra parte, se observó que la jaiba (*Callinectes sapidus*), fue el alimento que presentó los mayores niveles de contenido de AA, seguidos por el calamar y en una menor concentración por las cabezas de pescado (*Ephinephelus morio*).

El análisis de componentes principales (ACP), permitió representar la forma en que los AA se agrupan de acuerdo al tipo de insumo analizado (Fig. 3). Este análisis explica el 89 % de la variabilidad. El eje uno explica el 72.6 % de la variabilidad y se relacionó negativamente con Asparagina, Glutamina, Treonina, Arginina; Alanina, Valina, Lisina, Isoleucina, Leucina, Penilalanina y positivamente con Histidina. Este eje permitió separar al insumo jaiba respecto a calamar, mejillón y cabezas de pescado. El eje dos explica un 15.3 % de variabilidad y se relacionó positivamente con Glicina y Prolina; y negativamente con Glutamina, Histidina, Treonina, Tirosina, Lisina, Isoleucina y Leucina; este eje permitió separar al calamar de la jaiba, mejillón y cabezas de pescado.

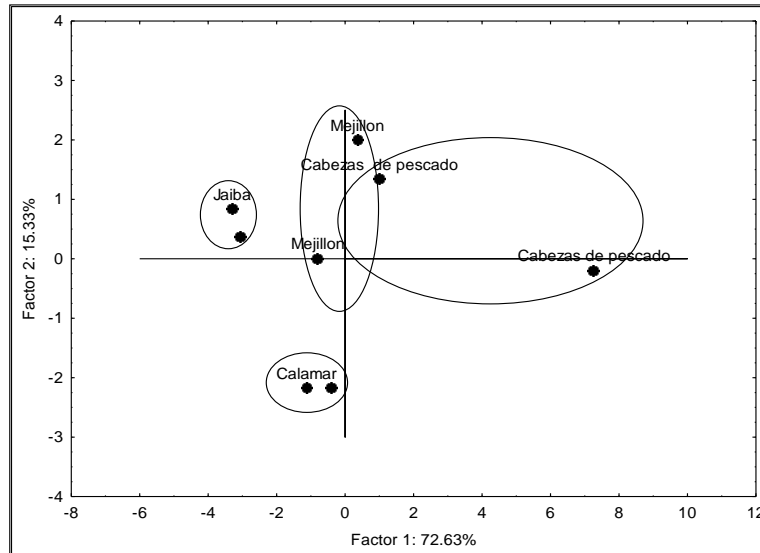


Figura 3. Distribución de los aminoácidos en los insumos utilizados en las dietas experimentales mediante el análisis de componentes principales (ACP).

3.3 Perfil de ácidos grasos

En la tabla 4, se indica la cantidad (% área) de ácidos grasos contenidos en los insumos y en las dietas experimentales. Como se puede apreciar los ácidos grasos saturados fueron los más abundantes en todos los insumos, aunque entre insumos la carne de jaiba fue la que presentó la menor concentración de estos AG. Del grupo de los ácidos grasos insaturados (AGI) se encontró que las cabezas de pescado fueron las que presentaron las mayores concentraciones, mientras que el calamar mostró los menores valores. De los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), se observó que el calamar presenta una mayor concentración, mientras que el pescado presentó la menor concentración. En los ácidos grasos de la familia n-3 el calamar presentó la mayor concentración, seguido de la jaiba y las cabezas de pescado. Este último insumo fue el que presentó la concentración más baja. Para el caso del ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA), se obtuvo que el calamar presentó la mayor concentración en ambos casos, seguidos por la jaiba y el mejillón, mientras que en el pescado se encontró la menor concentración (Tabla 4).

Para evaluar la variabilidad en los insumos y en las dietas se realizó un análisis de componentes principales, el cual permitió representar las concentraciones (% área) de los ácidos grasos mediante la extracción de dos ejes que representaron el 64 % de la variabilidad obtenida (Figura 4). El eje uno que explica un 32.6 % de la variabilidad, permitió separar al insumo jaiba respecto a cabezas de pescado y mejillón. El eje dos explico un 30.5% de variabilidad y permitió separar a la jaiba y cabezas de pescado de calamar y mejillón para el caso de los AG en los insumos y en los grupos de AG en las dietas fue del 85% de la variabilidad teniendo en el eje uno el 67.7 % y en el dos el 27.4 %.

Tabla 3. Contenido total de aminoácidos en los insumos y en las dietas ofrecidas a las hembras en reproducción de *O. maya*. Valores como g/100g proteína. Promedios \pm desviación estándar. Datos para las dietas calculados tomando en consideración una proporción de 70% para la carne de jaiba y 30% para el complemento de las diferentes dietas. AAE =Amino Acidos Esenciales, ANE = Amino Acidos no Esenciales

		INSUMOS								DIETAS			
		Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>)		Calamar (<i>Dosidiscus gigas</i>)		Mejillón (<i>Perna canalicus</i>)		Cabezas de pescado (<i>Epinephelus morio</i>)		Jaiba	jaiba - calamar	Jaiba - mejillón	Jaiba- cabezas de pescado
AAE	His	1.59	\pm 0.04	1.25	\pm 0.12	1.09	\pm 0.10	3.40	\pm 3.18	1.59	1.48	1.44	2.13
	Thr	8.22	\pm 0.48	7.19	\pm 0.11	6.29	\pm 0.09	3.20	\pm 2.90	8.22	7.91	7.64	6.72
	Arg	3.50	\pm 0.05	3.02	\pm 0.02	3.03	\pm 0.23	2.16	\pm 0.65	3.50	3.36	3.36	3.10
	Val	3.09	\pm 0.06	2.31	\pm 0.06	2.37	\pm 0.13	1.50	\pm 0.94	3.09	2.86	2.88	2.62
	Lys	6.38	\pm 0.17	5.24	\pm 0.27	4.56	\pm 0.75	3.16	\pm 1.95	6.38	6.04	5.84	5.42
	Ile	2.80	\pm 0.03	2.36	\pm 0.06	2.18	\pm 0.24	1.23	\pm 0.59	2.80	2.67	2.61	2.33
	Leu	5.62	\pm 0.14	5.11	\pm 0.28	4.50	\pm 0.61	3.09	\pm 1.13	5.62	5.47	5.28	4.86
	Phe	3.33	\pm 0.01	2.51	\pm 0.08	2.54	\pm 0.19	1.69	\pm 1.04	3.33	3.08	3.09	2.84
ANE	Asp	7.18	\pm 0.02	6.27	\pm 0.49	6.56	\pm 0.48	4.13	\pm 2.27	7.18	6.91	6.99	6.27
	Ser	3.56	\pm 0.85	2.76	\pm 0.19	2.97	\pm 0.08	2.40	\pm 0.15	3.56	3.32	3.39	3.21
	Glu	11.62	\pm 0.43	10.02	\pm 0.99	10.06	\pm 0.27	2.77	\pm 0.33	11.62	11.14	11.16	8.97
	Gly	5.65	\pm 0.23	2.82	\pm 0.24	6.12	\pm 2.24	6.22	\pm 0.31	5.65	4.80	5.79	5.82
	Ala	5.15	\pm 0.05	3.88	\pm 0.29	3.91	\pm 0.14	3.52	\pm 1.79	5.15	4.77	4.78	4.67
	Pro	2.93	\pm 0.10	1.61	\pm 0.09	2.87	\pm 0.88	2.25	\pm 1.83	2.93	2.53	2.91	2.73
	Tyr	2.64	\pm 0.02	4.45	\pm 0.25	1.18	\pm 0.20	1.79	\pm 1.41	2.64	3.19	2.20	2.39
TOTALES													
AAE		34.53		28.99		26.57		19.43		34.53	32.87	32.14	30.00
ANE		38.75		31.80		33.67		18.94		38.75	36.66	37.22	34.04

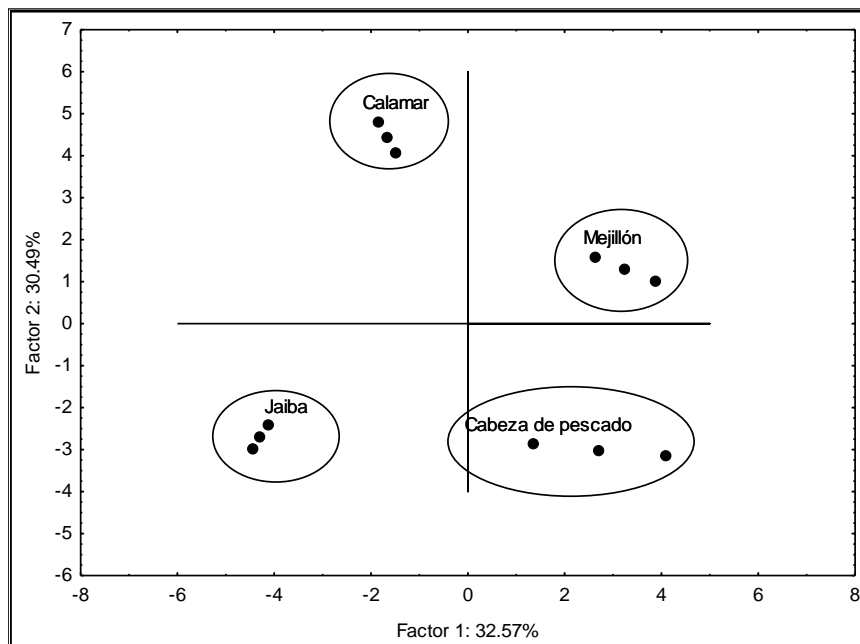


Figura 4. Distribución de los ácidos grasos en los insumos utilizados en las dietas experimentales mediante el análisis de componentes principales (ACP).

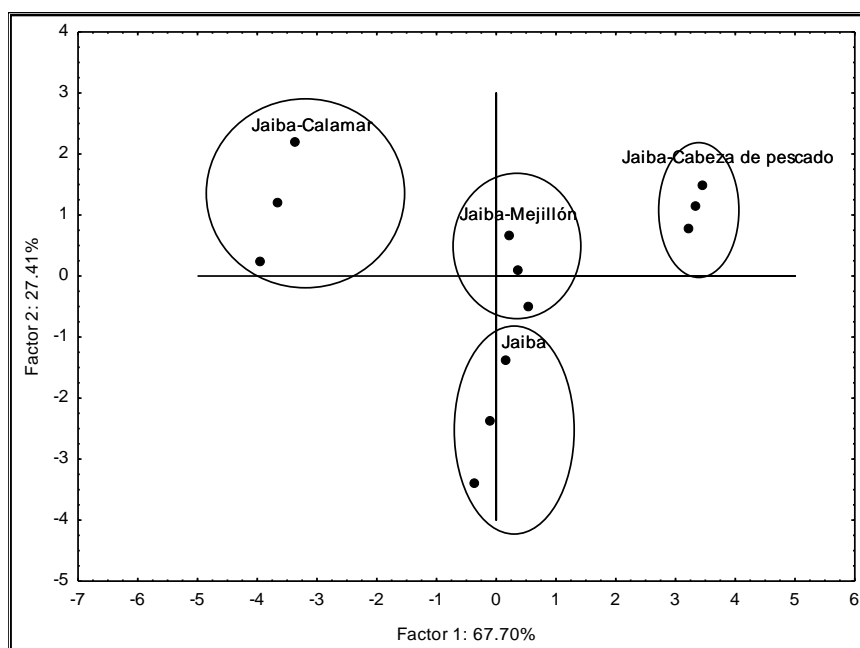


Figura 5. Distribución de los grupos de ácidos grasos en las dietas experimentales mediante el análisis de componentes principales.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos (% área) de los insumos y las dietas elaboradas para las hembras en reproducción de *O. maya*. Valores como promedio \pm desviación estándar, muestras por triplicado.

Ácidos grasos	INSUMOS								DIETAS			
	Calamar (<i>Dosidiscus gigas</i>)		Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>)		Mejillón (<i>Perna canalicus</i>)		Cabeza de pescado (<i>Epinephelus morio</i>)		Jaiba	Jaiba - Calamar	Jaiba - Mejillón	Jaiba- Cabezas de pescado
C14:0	1.42	\pm 0.04	2.31	\pm 0.06	9.69	\pm 0.41	8.80	\pm 0.53	2.31	2.05	4.53	4.26
C15:0	0.44	\pm 0.01	1.32	\pm 0.03	0.91	\pm 0.00	1.70	\pm 0.14	1.32	1.06	1.20	1.43
C16:0	36.73	\pm 0.49	25.49	\pm 0.80	35.92	\pm 1.07	34.47	\pm 2.92	25.49	28.86	28.62	28.18
C17:0	1.75	\pm 0.02	2.49	\pm 0.03	0.39	\pm 0.01	1.33	\pm 0.73	2.49	2.27	1.86	2.14
C18:0	15.03	\pm 0.29	11.96	\pm 0.56	9.90	\pm 0.57	10.89	\pm 1.25	11.96	12.88	11.34	11.64
C20:0	0.63	\pm 0.08	0.65	\pm 0.02	0.29	\pm 0.03	0.58	\pm 0.04	0.65	0.65	0.55	0.63
C21:0	2.03	\pm 0.09	7.02	\pm 0.13	1.24	\pm 1.14	1.25	\pm 1.25	7.02	5.52	5.28	5.29
C22:0	0.39	\pm 0.03	0.40	\pm 0.01	0.25	\pm 0.03	0.26	\pm 0.14	0.40	0.40	0.36	0.36
C23:0	0.38	\pm 0.25	0.70	\pm 0.07	0.63	\pm 0.02	0.00	\pm 0.00	0.70	0.60	0.68	0.49
C24:0	0.15	\pm 0.01	0.10	\pm 0.01	0.09	\pm 0.07	0.20	\pm 0.03	0.10	0.12	0.10	0.13
C14:1	0.05	\pm 0.03	0.08	\pm 0.00	0.07	\pm 0.03	0.17	\pm 0.02	0.08	0.07	0.08	0.10
C15:1	0.08	\pm 0.03	0.06	\pm 0.02	0.08	\pm 0.01	0.03	\pm 0.01	0.06	0.06	0.06	0.05
C16:1	0.85	\pm 0.03	6.56	\pm 0.13	16.60	\pm 0.28	12.36	\pm 1.17	6.56	4.84	9.57	8.30
C17:1	0.22	\pm 0.12	0.18	\pm 0.07	0.39	\pm 0.01	0.66	\pm 0.52	0.18	0.19	0.24	0.32
C18:1n9c/t	1.85	\pm 0.17	15.38	\pm 0.23	2.63	\pm 0.16	16.84	\pm 2.85	15.38	11.32	11.56	15.82
C20:1n9	10.58	\pm 0.73	1.35	\pm 0.09	3.34	\pm 0.36	1.21	\pm 0.37	1.35	4.12	1.95	1.31

Tabla 4 (Continuación)

C22:1n9	0.43	±	0.31	0.14	±	0.00	0.24	±	0.04	0.49	±	0.26	0.14	0.23	0.17	0.24
C24:1n9	0.14	±	0.11	0.04	±	0.03	0.03	±	0.03	0.04	±	0.04	0.04	0.07	0.04	0.04
C18:2n6c	0.12	±	0.01	5.68	±	0.24	1.57	±	0.08	0.75	±	0.55	5.68	4.01	4.44	4.20
C18:2n6t	0.13	±	0.03	0.18	±	0.06	0.09	±	0.07	0.17	±	0.00	0.18	0.16	0.15	0.17
C18:3n6	0.00	±	0.00	0.24	±	0.03	0.14	±	0.00	0.18	±	0.03	0.24	0.17	0.21	0.22
C18:3n3	0.16	±	0.01	1.16	±	0.04	0.12	±	0.00	0.60	±	0.47	1.16	0.86	0.85	0.99
C20:2	0.22	±	0.03	0.97	±	0.15	0.52	±	0.00	0.30	±	0.05	0.97	0.75	0.83	0.77
C20:3n6	0.04	±	0.01	0.37	±	0.02	0.25	±	0.23	0.17	±	0.10	0.37	0.27	0.34	0.31
C20:3n3	0.00	±	0.00	0.03	±	0.01	0.00	±	0.00	0.01	±	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02
C20:4n6	0.15	±	0.00	0.11	±	0.00	0.00	±	0.00	0.05	±	0.04	0.11	0.12	0.08	0.09
C20:5n3	9.53	±	0.29	9.18	±	0.16	8.29	±	0.57	4.57	±	0.58	9.18	9.28	8.91	7.80
C22:2	0.11	±	0.04	0.04	±	0.03	0.42	±	0.03	0.25	±	0.00	0.04	0.06	0.16	0.11
C22:6n3	15.98	±	0.37	5.28	±	0.04	5.63	±	0.37	1.26	±	1.26	5.28	8.49	5.38	4.07
Saturados	59.35	±	0.71	52.99	±	1.07	59.57	±	0.13	59.89	±	2.80	52.99	54.90	54.96	55.06
Monoinsaturados	14.21	±	0.06	23.78	±	0.36	23.39	±	0.76	31.80	±	1.87	23.78	20.91	23.66	26.19
Poliinsaturados	26.43	±	0.77	23.23	±	0.71	17.04	±	0.89	8.30	±	0.93	23.23	24.19	21.37	18.75
n-3	25.66	±	0.66	15.64	±	0.24	14.05	±	0.94	6.44	±	0.22	15.64	18.65	15.16	12.88
n-6	0.44	±	0.04	6.57	±	0.35	2.05	±	0.08	1.31	±	0.65	6.57	4.73	5.22	4.99
EPA	9.53	±	0.29	9.18	±	0.16	8.29	±	0.57	4.57	±	0.58	9.18	9.28	8.91	7.80
DHA	15.98	±	0.37	5.28	±	0.04	5.63	±	0.37	1.26	±	1.26	5.28	8.49	5.38	4.07
DHA/EPA	1.68	±	0.01	0.57	±	0.01	0.68	±	0.00	0.30	±	0.32	0.57	0.91	0.60	0.52

IV DISCUSIÓN

El tipo de alimento y su composición son considerados los factores principales en la fisiología de los organismos. Los valores nutricionales de los alimentos que se consideran como principales son el contenido de proteína, los niveles de aminoácidos esenciales y el perfil de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3. Estudios realizados de la composición química proximal en el manto de *Dosidicus gigas* realizado por Abugoch, (1999) y Rosas, (2007) reportaron el 82.23 % \pm 0.98 de humedad, 86.21 % \pm 5.23 de proteína, 7.37 % \pm 0.67 de cenizas y 4.89 % \pm 1.01 de grasas en base húmeda. En el calamar *Illex illecebrosus* estos mismos autores reportaron un contenido de 80.25 % de proteína, mientras que para las especies del género *Loligoidae* y *Ommastrephidae* se reportaron niveles de proteína de 77.90%. La composición de calamares y sepias como la de otros moluscos, se caracterizan por el alto contenido proteico y por tener un bajo porcentaje de grasa, característica muy habitual en músculo de organismos marinos. En el caso particular de los cefalópodos, como las sepias, el calamar y el pulpo, las características en común además de las ya mencionadas son el alto contenido de humedad y el bajo contenido de extracto no nitrogenado. Para el caso del pescado, Castro-González (2004) reportó en la carne de mero (*Epinephelus morio.*), un porcentaje de humedad de 70.9 \pm 0.01% y un nivel de proteína de 70.69%. Por otro lado, Izquierdo (2000) *Epinephelus striatus* encontró una humedad en músculo del mero de 78.64%, y niveles de proteína de 92.37% y de grasa 13.95% y 7.86% de cenizas, respectivamente. La grasa del pescado tiene elevados niveles de ácidos grasos poliinsaturados de la serie ω 3 y ω 6, destacando el ácido eicosapentanoico, 20:5 ω 3 y el ácido docosahexaenoico 22:6 ω 3 además son importantes ya que son constituyentes de las membranas celulares (Izquierdo, 2000).

Los valores obtenidos en el mejillón coinciden con los reportados por Fraga, (1956); aunque también se encuentran variaciones de humedad, grasa y cenizas; pero estas sugieren que pueden estar relacionadas con diversas variaciones estacionales, profundidad, peso y talla del espécimen.

Por otro lado, García *et al.*, (2002) encontraron que la composición química del boga (*Boops, boops*) y la sardina (*Sardina pilchardus*) utilizadas en la alimentación de *Octopus vulgaris* no afectaron en el crecimiento de los animales cultivados. Otros autores como Mangold (1983); Forsythe y Van Heukelem (1987) han observado que los machos alcanzan un mayor peso que las hembras, lo cual puede estar relacionado a que las hembras experimentan cambios metabólicos asociados con la reproducción (O 'Dor y Wells, 1978; Mangold y Von Boletzky, 1973). García y Aguado (2002) demostraron que en *Octopus vulgaris* la dieta tiene una clara influencia sobre el crecimiento, la ingestión y eficiencia energética obteniendo los mejores resultados cuando son alimentados con boga y no con sardina. Estas diferencias pueden estar relacionadas con los niveles de lípidos y proteínas; el boga presenta una menor cantidad de lípidos y mayor de proteínas en comparación con la sardina, ya que la boga presento un 5.94 % de lípidos y un 18.48 % de proteína, mientras que la sardina un 19.64 % de lípidos y un 17.77 % de proteína. En relación con esto O'Dor *et al.*, (1984) sugirieron que la digestión de lípidos en el pulpo era baja e ineficiente, probablemente debido a la escasez de emulsionante en su tracto digestivo. Sin embargo, algunos cefalópodos son capaces de almacenar cantidades significativas de lípidos en la glándula digestiva, que se reducen durante la inanición que los animales experimentan durante el cuidado parental que realizan las hembras.

En relación al perfil de aminoácidos de los alimentos estudiados, se encontró que entre los aminoácidos esenciales la treonina, lisina y leucina, se encuentran en una mayor concentración en los insumos y dietas analizadas y de los aminoácidos no esenciales la asparagina y glutamina. Las concentraciones observadas en los aminoácidos se encuentran entre los reportados por Águila *et al.*, (2007) en el pulpo *Octopus maya*. En el presente estudio, se observó que la jaiba (*Callinectes sapidus*), fue el alimento que presento una mayor concentración de aminoácidos esenciales y no esenciales, seguidos por el calamar y en una menor concentración en la cabeza de pescado (*Ephinephelus morio*). Por otra parte, Aguila, *et. al.*, (2007), reportaron entre los esenciales con mayor concentración en jaiba (*Callinectes sapidus*) a treonina, lisina y leucina, los no esenciales asparagina y glutamina. Por otra parte, Solorzano *et. al.*,

(2009) y Villanueva *et al.*, (2004), sugieren que la lisina, arginina, e isoleucina podrían desempeñar un papel protagonista en el metabolismo de las proteínas de los cefalópodos. Por ejemplo, se sabe que la arginina es fuertemente metabolizada por los cefalópodos (Hochachka *et al.* 1983; Solorzano *et al.* 2009). Durante el trabajo anaeróbico, el fosfato de arginina se hidroliza, lo que conducen a una mayor disponibilidad de arginina para la condensación con piruvato derivado de la glucosa para formar octopina. La octopina es el principal producto final anaeróbico que se acumula en los cefalópodos adultos durante períodos de ejercicio y el estrés (Hochachka *et al.*, 1976; Storey y Storey, 1978). Por otra parte, la lisina se ha identificado como un precursor del crecimiento en sub adultos de *S. officinalis* (Domingues, 1999), y esto concuerda con los resultados obtenidos en el estudio realizado con juveniles de *O. bimaculoides* por Solorzano *et al.*, (2009) quienes observaron que los juveniles conservan la lisina y los niveles de arginina a pesar de que el alimento fue deficiente.

En las especies marinas dominan los ácidos grasos de la serie linolénica y se hallan mayores porciones de ácidos grasos de 20 y 22 carbonos, por lo que se puede inferir que requerirían en su dieta eicosapentaenoico y docosahexaenoico. Los niveles de ácidos grasos de la familia n-6 son menores en relación con los de la serie n-3 debido a su alimentación (Sargent, 1976). En los resultados obtenidos en el presente trabajo se observó una mayor cantidad de ácidos grasos n-3 en todos los insumos (manto de calamar, jaiba, mejillón y cabezas de mero), en comparación con los de la serie n-6. Entre las concentraciones en el manto de calamar 25.66%, jaiba 15.64%, mejillón con 14.05%, no presentaron diferencias significativas entre sí; las cabezas de pescado contienen el 6.44% de la serie n-3. También se pudo observar un porcentaje mayor al 50% de ácidos grasos saturados, el manto de calamar con el 59.33%, la jaiba 52.99%, el mejillón 59.57% y las cabezas de mero con 59.89%. Izquierdo *et al.*, (2000), reportó en el mero un total de 40% de ácidos grasos saturados, 43.8% monoinsaturados y 16.5% de poliinsaturados, valores ligeramente inferiores a los obtenidos en el presente estudio. Estas diferencias podrían estar asociadas con la especie o con el hecho de que ahora se utilizaron cabezas de pescado mientras que Izquierdo *et al.*

(2000) utilizaron al pez completo. Por otra parte, Castro-González *et al.*, (2004) reportaron el 11.5 % de saturados, 73.8% de monoinsaturados y el 93.8% de poliinsaturados para la misma especie en base húmeda del filete del pescado. En la jaiba, Çelik *et al.* (2004), reportaron en *Callinectes sapidus* un total de 16.21% de ácidos grasos de la serie $n-3$ y 7.25% de la serie $n-6$, y de EPA (C20:5 $n-3$) 8.93% y de DHA (C22:6 $n-3$) 5.99%, similares a los obtenidos en el presente estudio. Estudios de la composición de lípidos y ácidos grasos en los cefalópodos *Sepioteuthis australis*, *Gonatus antarcticus*, *Moroteuthis robsoni* y *Todarodes spp* y desarrollado por Phillips *et al.*, (2002), presentan un promedio de 14.5% de EPA, 34.7% de DHA, 28.6% de ácidos grasos saturados, 16.3% monoinsaturados y por ultimo 54.7% de poliinsaturados. Valores similares a los obtenidos ahora.

V CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los insumos y las dietas utilizadas tienen composiciones químicas cercanas a la composición del *O. maya*. De entre éstas todo parece indicar que la que contienen la mayor cantidad de AA esenciales y AGPI de la serie omega 3 fue la combinación jaiba-calamar, seguida de la carne de jaiba. Las mezclas realizadas con las cabezas de pescado sugieren que esta dieta podría tener cantidades menores de los AA esenciales y de la AGPI lo que podría limitar el crecimiento y posiblemente el desarrollo del ovario de las hembras de *O. maya* durante la reproducción.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN ZOOTÉCNICA DEL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE HEMBRAS DE *Octopus maya* ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

I INTRODUCCIÓN

Una de las principales etapas para el desarrollo del cultivo de cualquier especie de interés comercial es la reproducción. En la reproducción de los pulpos, no existen comportamientos agonísticos ni cortejo prenupcial, la duración de la cópula es generalmente larga. Además no hay evidencias de formación de parejas estables o de protección por parte del macho, y ambos sexos son promiscuos (Lira, 2013). Rocha (2003) menciona que en algunas especies hay algún tipo de competencia por la hembra. En *Octopus bimaculoides* se han observado varios machos tratando de copular con una sola hembra al mismo tiempo, por lo que se piensa que pudiera existir una competencia espermática. A manera de resumen en la tabla 5 se mencionan las principales características del comportamiento de elección de pareja y de copula en los pulpos (Lira, 2013).

En *O. maya* al igual que en otras especies de pulpo, la fecundación es interna, y ocurre en las glándulas oviductales, donde el esperma es almacenado. Cuando los ovocitos van pasando por el oviducto proximal al distal, se realiza la fecundación (Rocha, 2003). Las hembras de *O. maya* depositan sus huevos en forma de racimos adheridos a un sustrato duro en el interior del habitáculo y las hembras permanecen ahí cuidando la puesta, durante la cual limpia con los brazos y los airea constantemente, arrojando sobre ellos chorros de agua a través del sifón (Rocha, 2003; Caamal, 2007; Rosas *et al.*, 2008). Después de la eclosión de las crías la hembra muere por inanición, es decir por los cambios fisiológicos que conllevan el cuidado parental durante el cual los animales no se alimentan (Rocha, 2003).

Tabla 5. Etograma de *O. maya* durante la cópula y transferencia espermática (Lira, 2013).

Conducta/Nominación previa.	Contexto	Individuo Focal	Descripción	Especie/Referencia
Abrazo (Fig. 1)	Precópula, Cópula (I, II y III) y Postcópula.	Macho o Hembra.	El focal envuelve a la pareja con toda (Fig. 1a) o parte de la umbrela (Fig. 1b).	<i>Octopus joubini</i> en Mather (1980).

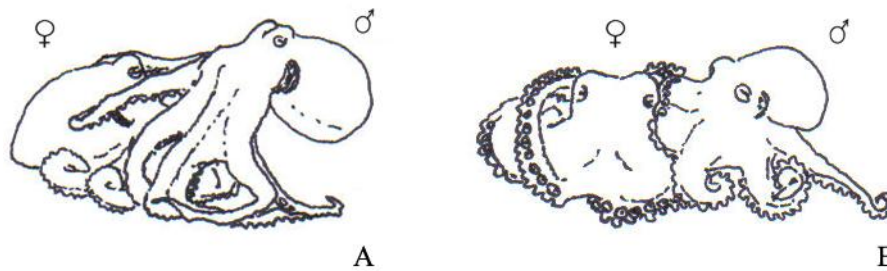


Figura 1: Abrazo. A) Contacto con toda la umbrela o (B) parte de ella.

Conducta/Nominación previa.	Contexto	Individuo Focal	Descripción	Especie/Referencia
Arrastre (Fig. 2)	Precópula, Cópula (I, II y III) y Postcópula.	Macho o Hembra.	El focal se desplaza adherido al fondo (Fig. 11a) o pared (Fig. 11b).	<i>O. vulgaris</i> en Packard y Sanders (1971).

Figura 2. Arrastre: A) fondo y B) pared

En los trabajos realizados sobre la reproducción de *O. vulgaris*, una de las especies más estudiadas hasta el momento, se indica una alta fecundidad, con desoves que pueden fluctuar de entre 100, 000-500, 000 huevos/hembra (Wells, 1978; Mangold, 1983; Iglesias *et al.*, 1997; Quintana, 2009). A diferencia de esto, se reporta que en *O. maya* los desoves pueden llegar a ser de entre 1000 y 2000 huevos/hembras habiéndose registrado hasta 5000 huevos/desove (Rosas *et al.*, 2014).

Como se había mencionado anteriormente, la mayoría de los trabajos relacionados con la reproducción de los cefalópodos se basa en los conocimientos adquiridos con la reproducción de los peces. Hernández-Palacios *et al.*, (2005) menciona que uno de los parámetros utilizados para evaluar la calidad de la puesta es la de la fecundidad en especies de peces que ponen los huevos varias veces durante la época natural de puesta. La fecundidad se considera como el producto del número de puestas por el número medio de huevos producido en cada una de ellas y la fecundidad relativa sería la fecundidad expresada por unidad de peso (Wotton, 1979). En el caso de los Cefalópodos se considera como fecundación real a la cantidad de huevos fecundados y la fecundación relativa a la cantidad de huevos en el ovario (Rosas, *et al.*, datos no publicados). Diversos autores mencionan que las hembras de *O. maya* pueden desovar de 1000-2000 huevos/hembra (Solis-Ramirez, 1967; Rosas, *et al.*, 2008; Briceño, 2009; Moguel *et al.*, 2010), y es una de las especies que presenta huevos grandes y de desarrollo directo. Por otro lado, Rosas *et al.*, (2010) y Martínez *et al.*, (2011) la señalan como una especie holobentónica.

Diversos estudios señalan que la reproducción en la mayoría de los cefalópodos depende fundamentalmente del tipo y calidad de la alimentación en los reproductores (Olivares, 1996; Montoya *et al.*, 2002; Uriarte *et al.*, 2011). En este sentido, Montoya *et al.*, (2002), reportaron que la síntesis del vitelo depende del alimento que ingiere la hembra directamente y no de las reservas de ésta y que durante la madurez del ovario requieren mayor cantidad de alimento para cubrir los requerimientos energéticos y nutritivos que se necesitan para el proceso de formación del huevo. Por esa razón, se considera como fundamental la calidad de la nutrición de las hembras durante estos procesos. Los resultados obtenidos en laboratorio con *O. vulgaris*, *O. mimus* y *O. maya*

han demostrado que el origen y la calidad de los alimentos usados en los reproductores juegan un rol importante en el crecimiento y en la calidad de las puestas y resistencia de la crías (Olivares, 1996; Caamal, 2007; Quintana, 2009). Por lo tanto, conocer el efecto del tipo de alimento en la capacidad reproductiva de hembras de *O. maya* y la viabilidad de las crías es la base fundamental para establecer el requerimiento nutricional en la etapa reproductiva y garantizar el éxito en la producción y cultivo de esta especie.

Por esta razón los objetivos de esta parte del estudio son:

- Conocer la influencia de mezclas de alimentos en las características de los desoves producidos por las hembras de *O. maya*.
- Conocer la relación entre la composición bioquímica de las dietas y las características morfológicas y bioquímicas de los huevos y embriones de *O. maya* con el fin de establecer las bases para establecer los requerimientos nutricionales para la reproducción de esta especie.

II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Captura y selección de reproductores de *Octopus maya*

Los pulpos utilizados como reproductores fueron obtenidos de la población silvestre localizada frente a las costas de Sisal, Yucatán. Los animales fueron capturados utilizando la técnica de pesca local conocida como “gareteo”, la cual consiste de una embarcación de la cual penden líneas en las que se amarran cangrejos como carnada. Se capturaron un total 60 hembras y 60 machos en proceso de maduración. La identificación del sexo se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Rosas *et al.*, (2008). Una vez identificado el sexo los pulpos fueron colocados en un estanque de 5 m de diámetro en una proporción 1:1 para su aclimatación y garantizar así la fecundación. Durante los 15 días que duró el acondicionamiento, los animales fueron mantenidos en agua de mar con niveles de $O_2 > 5$ mg/L, pH > 8 y salinidad de 32 UPS.

Ahí los pulpos fueron alimentados a ración *ad libitum* con jaibas del género *Callinectes* spp a razón de 1 jaiba (100 ± 20 g) por animal por día. En esas condiciones permanecieron por 15 días. Posteriormente, las hembras fueron trasladadas al área de reproducción con temperatura (24°C) y luz controlada (30 lux/cm²). Ahí se pesaron y se colocaron de forma individual en tanques de 200 L los cuales fueron suministrados con un sistema de recirculación con agua de mar y aireación constante. A cada hembra se le proporcionó una caja de fibra de vidrio como refugio y nido para el desove.

2.2 Alimentación y mantenimiento de los reproductores

Las hembras fueron alimentadas diariamente con dietas compuestas de jaiba solo en un grupo y en los tres restantes con diferentes mezclas en donde la jaiba fue suministrada al 70% de la dieta y el insumo complementario en 30% (mejillón, manto de calamar y cabezas de pescado). Así, se estructuraron 4 grupos cada uno con 15 pulpos por dieta, cada uno de los cuales correspondió con una dieta experimental compuesta de jaiba 100%, jaiba-calamar, jaiba-mejillón y jaiba-pescado (70-30%) respectivamente. Una dieta con solo jaiba (100%) fue considerada como dieta control. Las mezclas fueron suministradas al mismo tiempo y de tal manera que los organismos tuvieran la posibilidad de consumir ambos componentes en cada una de las dos tomas en que se dividió la ración diaria.

La limpieza de los tanques se realizó previa a cada alimentación mediante la técnica conocida como sifoneo, esto con el objetivo de retirar todos los desechos del alimento no ingerido y prevenir altas concentraciones de amonio en el sistema.

Con el fin de llevar un control de las condiciones de mantenimiento de las hembras en el laboratorio, diariamente por las mañanas se midió la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto de cada tanque. Los refugios fueron revisados diariamente por la mañana y por la tarde para observar la presencia de algún desove, el cual fue registrado (Figura 6A). Las hembras en desove fueron identificadas dejándose bajo observación diaria en el sistema hasta que concluyera con la puesta de los huevos, lo

cual ocurre entre 5 y 7 días después de haberse iniciado el proceso de desove. Posteriormente los huevos fueron trasladados al sistema de incubación en donde permanecieron hasta el momento de la eclosión (Fig. 6b).

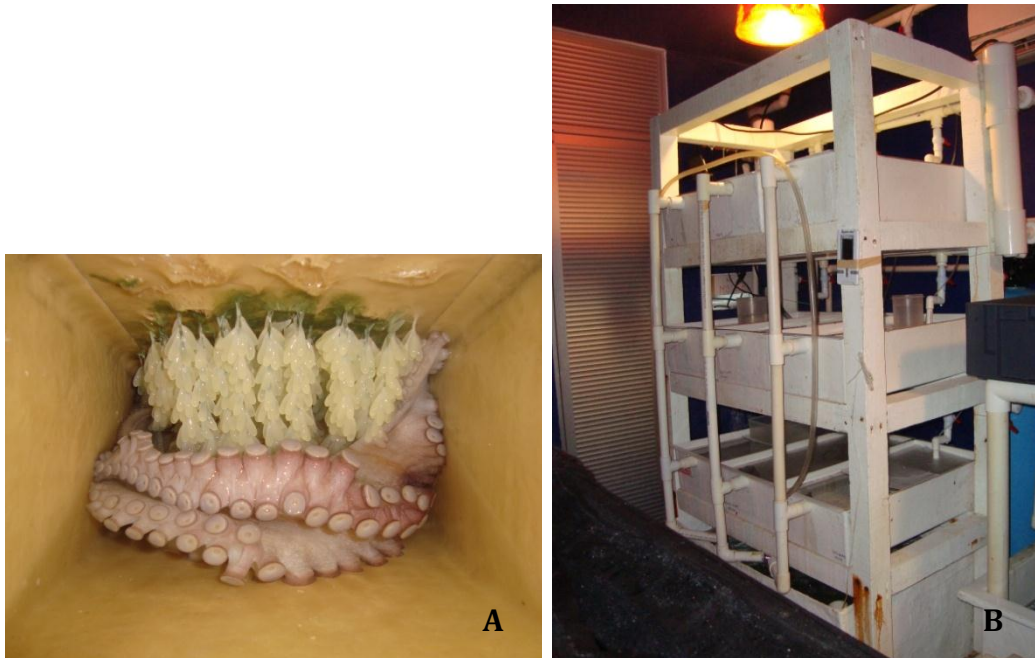


Figura 6. Producción de huevos y crías en el estudio: A) Ejemplar de hembra de *O. maya* en proceso del desove y B) Sistema de incubación artificial.

2.3 Tasa de ingestión (TI; % día⁻¹)

La tasa de ingestión se determinó de acuerdo con Uriarte *et al.* (2010) y Uriarte *et al.* (2011) como:

$$TI (\% \text{ día}^{-1}) = [(Al_e - Al_R)/Pc] \times 100$$

Donde Al_e es el alimento entregado (g MO día⁻¹), Al_R (g MO día⁻¹) es el alimento remanente obtenido después de 2 h de haberse ofrecido y Pc es el peso (gMO) de las hembras. Para la evaluación de la cantidad de materia orgánica tanto del alimento (entregado y remanente) como de las hembras de pulpo, 10 muestras de cada tipo de alimento y de pulpo fueron pesadas en fresco, posteriormente secadas en una estufa a

60°C hasta peso constante y posteriormente incineradas en una mufla a 500°C por 8 h. Al hacer los cálculos en relación con la materia orgánica contenida en el alimento fue posible cuantificar con precisión la cantidad de alimento extraído por los pulpos tanto de las jaibas como de las cabezas de pescado, los cuales presentan estructuras duras a las que los pulpos podrían tener acceso y que son difíciles de cuantificar si solo se expresaran en peso seco.

2.4 Manejo de la puesta

La manipulación de la puesta (racimos de huevos) se efectuó una vez que las hembras concluyeron con el proceso de desove entre 5-7 días. Una vez transcurrido este tiempo se procedió al traslado de la puesta al sistema de incubación, siguiendo el manual de procedimientos del área. El sistema de incubación consta de una serie de tanques de fibra de vidrio, los cuales cuentan con flujo y aireación constante; temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), luz (30 lux/cm² y calidad de agua contralada (UV, y filtro de 5 μm) para el desarrollo adecuado de los embriones de pulpo. Previo al traslado de la puesta al sistema de incubación se cuantificaron el número de racimos desovados y el número de huevos por racimo, lo que permitió estimar el total de huevos producidos. Para hacer esto se tomaron al azar cinco racimos. Este procedimiento se realizó en 15 desoves obtenidos con cada una de las dietas experimentales (jaiba, jaiba-calamar, jaiba-mejillón, jaiba-cabeza de pescado). Posteriormente las hembras fueron sacrificadas y pesadas con el fin de determinar el cambio de peso de los animales alimentados con cada una de las dietas experimentales.

Para la evaluación de los efectos del tipo de dieta en la reproducción se cuantificaron los siguientes indicadores:

Cambio de peso de las hembras en el área de reproducción como la diferencia entre el peso al inicio y el obtenido después del desove. El número de huevos por racimo, así como el total de huevos fecundados y el total de crías vivas al momento de la eclosión. El porcentaje de eclosión fue calculado a partir de la diferencia entre el número de huevos desovados y el total de crías vivas obtenidas después de la incubación. Así

mismo como un indicador de la fortaleza de los pulpos, se cuantificó la sobrevivencia de los juveniles después de haber sido sometidos a un periodo de ayuno de 10 días. Esta prueba parte del principio que los juveniles cuentan con un vitelo interior al nacer el cual les permite terminar de desarrollarse y sobrevivir un tiempo después de la eclosión antes de comenzar a alimentarse.

2.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA). En el caso de que el ANOVA indicara diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó una prueba de Tuckey para establecer diferencias entre los promedios de los indicadores obtenidos de los diferentes tratamientos experimentales.

III RESULTADOS

Las hembras de *O. maya* utilizadas en el presente estudio tuvieron un peso inicial promedio de entre 870 y 1000 g de peso. No se registraron diferencias significativas entre los pesos de las hembras al inicio del experimento (Tabla 6).

La tasa de ingestión de las hembras fue afectada por el tipo de alimento suministrado. Las hembras alimentadas con jaiba sola ingirieron significativamente menos materia orgánica ($2.6\% \text{ día}^{-1}$) que las hembras alimentadas con la mezcla jaiba-mejillón o jaiba-pescado ($3.2\% \text{ día}^{-1}$). Un valor de tasa de ingestión de $4.8\% \text{ día}^{-1}$ fue registrado en las hembras alimentadas con jaiba-calamar, el cual resultó ser significativamente más alto que el registrado en el resto de los tratamientos (Fig. 7).

3.1 Días para el desove

El número de días para el desove fue afectado por la dieta ofrecida. Las hembras alimentadas con jaiba sola desovaron en promedio 8 días después de haber sido iniciado el experimento, mientras que las hembras alimentadas con la mezcla jaiba-

pescado desovaron 37 días después de haber sido alimentadas con esa dieta (Tabla 6). El peso final de las hembras después del desove también fue afectado por el tipo de dieta, con los menores pesos registrados en las hembras alimentadas con jaiba ($P < 0.05$). No se registraron diferencias significativas entre los pesos finales de las hembras alimentadas con el resto de las dietas (Tabla 6).

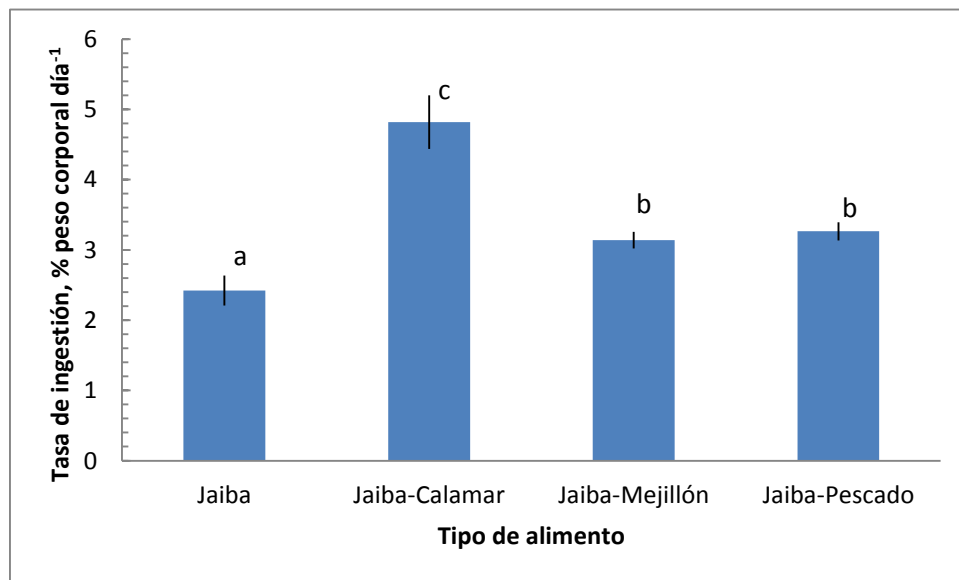


Figura. 7. Efecto del tipo de alimento en la tasa de ingestión de hembras de *O. maya* mantenidas en condiciones experimentales por un periodo de entre 8 y 33 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

3.2 Número de huevos desovados

Del total de hembras experimentales se observó que las hembras alimentadas con la combinación de jaiba-mejillón presentaron una mayor cantidad de huevos/hembra, con un promedio de 833 huevos/desove. Los pulpos alimentados con jaiba 757 huevos, con jaiba-cabeza de pescado 751 huevos y la menor cantidad se obtuvo con jaiba-calamar con 664 huevos. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las dietas. (Tabla 6).

3.3 Número de huevos por racimo

El número de huevos por racimo no fue afectado por el tipo de dieta ($P > 0.05$; Tabla 6). Así, un valor promedio de 26 huevos/por racimo con un rango de entre 20 y 35 huevos/racimo fue calculado para las 57 hembras utilizadas en el presente estudio.

3.4 Número de crías totales por desove

El menor número de crías/desove fue registrado en los pulpos alimentados con la jaiba sola (396 juveniles/hembra) ($P < 0.05$; Tabla 6). Un valor promedio de 435 crías totales/hembra fueron obtenidos en los pulpos alimentados con las dietas jaiba-calamar y jaiba-pescado, los cuales fueron significativamente menores a los registrados en los pulpos alimentados con la mezcla jaiba-mejillón (601 crías/desove; $P < 0.05$; Tabla 6).

3.5 Número de crías vivas y porcentaje de eclosión

El tipo de alimento entregado a las hembras no afectó el número de crías vivas obtenidas, las cuales fluctuaron entre 319 y 479 crías por desove (Tabla 6; $P > 0.05$). Sin embargo, el porcentaje de eclosión observado varió con el tipo de alimento suministrado, con los mayores valores obtenidos en las hembras alimentadas con jaiba-pescado.

3.6 Número de crías muertas

Del total de crías eclosionadas se encontró que la dieta que se le dio a las hembras y compuesta por jaiba y jaiba-mejillón mostraron una sobrevivencia de las crías 19% menor que la observada en las crías obtenidas de las hembras alimentadas con la mezcla jaiba-pescado (Tabla 6).

3.7 Peso de las crías después de la eclosión

El peso de los juveniles de *Octopus maya* al momento de la eclosión fue afectado por el tipo de dieta que las hembras ingirieron. Los animales con mayor peso fueron

aquellos obtenidos de hembras alimentadas con jaiba sola ($P < 0.05$) en comparación con el obtenido en el resto de los tratamientos ($P < 0.05$) (Tabla 6).

3.8 Sobrevivencia al periodo de ayuno de 10 días

La sobrevivencia de los juveniles de *O. maya* al periodo de ayuno de 10 días mostró los mayores valores en los animales procedentes de hembras alimentadas con la mezcla jaiba-mejillón y jaiba-pescado (82%) y los menores en los animales obtenidos de las hembras alimentadas con jaiba (58%). Un valor intermedio de 72% fue obtenido de los animales cuyas hembras fueron alimentados con la mezcla jaiba-calamar (Tabla 6).

Tabla 6. Características zootécnicas de hembras de *O. maya* alimentadas con dietas diferentes. Valores promedio \pm desviación estándar.

Característica	DIETAS			
	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>)	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Calamar (<i>Dosidiscus gigas</i>)	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Mejillón (<i>Perna canalicus</i>)	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Cab. de pescado (<i>Epinephelus morio</i>)
Peso inicial, (g) hembras	1002.53 \pm 128.72 a	916.57 \pm 158.33 a	868.18 \pm 112.50 a	877.86 \pm 212.89 a
Peso final, (g) hembras	828.73 \pm 112.49 a	931.64 \pm 97.86 b	927.82 \pm 200.72 b	1046.43 \pm 276.38 c
Ganancia en peso, (g)	-173.80 \pm 78.48 a	15.07 \pm 151.73 b	59.64 \pm 169.26 b	168.57 \pm 286.04 b
Días para el desove	8.80 \pm 4.10 a	22.60 \pm 10.90 b	27.80 \pm 13.60 b	33.50 \pm 21.40 b
Huevos por racimo	21.96 \pm 5.91 a	19.45 \pm 6.86 a	21.39 \pm 5.32 a	19.57 \pm 5.57 a
Huevos por desove	757.18 \pm 332.70 a	643.36 \pm 419.74 a	833.61 \pm 296.66 a	751.71 \pm 465.28 a
Numero de crías totales	396.40 \pm 265.20 a	466.92 \pm 296.46 b	601.00 \pm 403.07 c	487.46 \pm 201.72 b
Crias vivas	319.08 \pm 160.27 a	435.00 \pm 298.17 a	475.40 \pm 308.37 a	479.92 \pm 203.38 a
Crias muertas	130.50 \pm 67.11 b	31.75 \pm 31.07 a	125.60 \pm 113.89 b	7.54 \pm 3.62 a
Sobrevivencia a la eclosión, %	80	93	79	98
Peso al nacer, g	0.13 \pm 0.02 b	0.12 \pm 0.01 a	0.12 \pm 0.01 a	0.12 \pm 0.01 a
Sobrevivencia al ayuno, %	57.69 \pm 17.03 a	71.50 \pm 15.82 b	81.54 \pm 15.46 b	81.79 \pm 9.12 b
Número de desoves	15	14	13	15

Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$).

Letras diferentes presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

IV DISCUSIÓN

En cefalópodos existen pocos trabajos que demuestran la influencia de la dieta de los reproductores sobre la calidad de la puesta (Semmens *et al.*, 2004). Por lo tanto, muchos de los principios utilizados en la reproducción de estos organismos se basan principalmente en los conocimientos adquiridos con la reproducción de los peces. En los peces silvestres y de cultivo la población depende de la calidad de la puesta. En este sentido, en la acuicultura los huevos de buena calidad han sido definidos como aquellos que tienen baja mortalidad en la fecundación, formación del embrión, eclosión y antes de la primera alimentación externa, es decir cuando la larva haya consumido las reservas de vitelo (Bromage *et al.*, 1992). Fernández-Palacios *et al.*, (2005) menciona que la fecundidad se ve afectada por las deficiencias nutricionales en las dietas ingeridas por los reproductores la cual está asociada con el desequilibrio de nutrientes que afectan el sistema endocrino cerebro-pituitario gonadal o por restricciones en la disponibilidad de componentes bioquímicos para la formación de los huevos. Fernández-Palacios *et al.*, (2005) observó en reproductores de *Sparus aurata* que después de tres semanas de alimentación con dietas con niveles de n-3 HUFA de 14.3 y 21% del total de la dieta (Dieta harina de pescado desengrasado y aceite de calamar, harina de calamar desengrasada y aceite de sardina, respectivamente) el porcentaje de huevos no fecundados se redujo significativamente, y mostró una correlación negativa con el ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3), y con el ácido araquidónico (AA 20:4 n-6). Asimismo, observaron que con el EPA y el DHA mejoraron los porcentajes de huevos vivos. Por otro lado, no se encontró relación alguna entre los n-3 HUFA con los porcentajes de eclosión y la sobrevivencia de las larvas. Las larvas procedentes de reproductores alimentados con la dieta de harina de pescado desengrasada y aceite de calamar y viceversa (niveles de n-3 HUFA más altos) presentaron hipertrofia del saco vitelino, característica que no fue observada en los huevos de *O. maya* (Fernández-Palacios *et al.*, 2005).

En los resultados obtenidos en este estudio no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el número de huevos producidos por desove con respecto a las dietas analizadas. Sin embargo, el tipo de alimento afectó la forma en que las hembras utilizaron los nutrientes contenidos en éstos. Similares diferencias también fueron observadas en *O. vulgaris* cuando fueron alimentados con dietas compuestas por cangrejos, camarón, calamar, mejillón, sardina y dietas artificiales (Quintana *et al.*, 2008; García *et al.*, 2002; García *et al.*, 2011; Petza, *et al.*, 2011). A este respecto, Rosa *et al.* (2004) señalaron que las hembras de pulpo, además de canalizar la energía a la reproducción, una parte importante del alimento que ingieren lo canalizan al crecimiento lo que demuestra que estos animales no dejan de crecer aún durante el periodo en que se desarrollan los huevos en el ovario. Esto explica porque en el presente estudio las hembras de *O. maya* aumentaron de peso aun cuando se encontraban en la fase de producción de huevos. Es interesante notar que las dietas proporcionadas tuvieron efectos diferentes, provocando pérdida o ganancia de peso. Los resultados obtenidos ahora sugieren que la mezcla jaiba-pescado promueve mucho mejor el crecimiento que el resto de las otras mezclas ya que ésta presentó un consumo medio y la mayor acumulación de biomasa. Estudios recientes han demostrado que dietas mixtas proporcionan mejores crecimientos que mono dietas, sugiriendo, como es de esperar que en las mezclas se cubran de mejor manera los requerimientos de la especie (Estefanell *et al.* 2011; Estefanell *et al.* 2013).

La ausencia de una relación entre el número de huevos y el peso de las hembras, al parecer es una característica general entre los pulpos. En un estudio realizado en *Enteroctopus megalocyathus* tampoco se observó una relación entre el peso de las hembras y el número de huevos desovados (Farías *et al.*, 2011), lo que sugiere que, una vez alcanzada la madurez sexual, las hembras son capaces, independientemente de su tamaño, de producir un número variable de huevos. Si tal y como se ha observado ahora no existe una relación entre el peso y el número de huevos y las diferentes dietas utilizadas ahora tampoco produjeron un efecto sobre el número de huevos, es posible pensar que existen otras características en el huevo y/o en el

embrión que podrían ser mejores indicadores de los efectos de la dieta en esta especie de pulpos.

Quintana (2009) evaluó la influencia de las dietas (calamar, cangrejo y sardina) en los reproductores de *O. vulgaris* analizando los principales parámetros de la calidad de la puesta. Este autor no encontró una relación entre tipo de dieta suministrada y el periodo para que las hembras desoven aunque si observó diferencias de coloración de piel en las hembras con respecto al tipo de dieta. Al igual que en *O. maya*, Quintana (2009) observó que la dieta afectó el tamaño y peso de las hembras después del desove, obteniendo un mayor tamaño y peso en las hembras alimentadas con calamar y cangrejo, en comparación a las alimentadas con otros tipos de alimento. En este sentido, Petza *et al.*, (2011) señalaron que el crecimiento somático y el rendimiento de la alimentación se ven fuertemente afectados por la dieta suministrada, lo que concuerda con otros estudios realizados en *O. vulgaris* (García García y Aguado Giménez 2002; Aguado Giménez y García García 2002; Miliou *et al.* 2006; García García y Cerezo Valverde 2006). En el presente estudio, no se encontró una relación evidente entre ninguno de los indicadores reproductivos y la tasa de ingestión del alimento, lo que pudiera sugerir que todas las mezclas utilizadas ahora cubrieron en forma similar los requerimientos nutricionales para la reproducción de esta especie.

A este respecto Quintana (2009) observó en *O. vulgaris* que puede existir una relación directa entre la dieta, la talla de la hembra y el número de huevos que se producen. Este autor, aunque no contó el número de huevos desovados, observó que las puestas eran de mayor número de cordones, mayor longitud y concluyó que por esa razón tendrían un mayor número de huevos en hembras alimentadas con calamar y cangrejo. Por otro lado, Montoya *et al.*, (2002) estudiando *Octopus mimus* observaron una relación directa entre el peso del organismos y el número total de huevos producidos, dato que se ha considerado de gran importancia para determinar el peso mínimo de captura de esta especie. Uriarte *et al.*, (2011) mencionan que cuando las hembras de *O. maya* son acondicionadas y alimentadas por 30 días con una dieta mixta a base de jaiba y mejillón (75 y 25%, respectivamente) a razón del 5% del peso

corporal por día, el 85% de las hembras desovaron y se obtuvo un 90% de huevos fertilizados.

Se ha mencionado que las dietas para los pulpos deberían ser caracterizadas y al menos contar con características similares al organismo. En este contexto, se ha señalado al calamar como un insumo potencial para la alimentación de los pulpos. En relación con esto, Petza *et al.*, (2011) y Quintana *et al.*, (2008) estudiando a *O. vulgaris* concluyeron que el calamar podría ser la materia prima apropiada para la elaboración de alimentos para el pulpo pues se caracteriza por tener una mejor consistencia y cohesión, la cual se la da el alto porcentaje de colágeno en su tejido.

En cuanto a las propiedades nutricionales del calamar, los resultados obtenidos en el presente estudio (Véase capítulo 1) mostraron que éste mantiene una relación DHA/EPA de 1.5, que de acuerdo con Okumura *et al.*, (2005) es necesaria para el crecimiento y desarrollo normal de las paralarvas de pulpo. En efecto, Miliou *et al.*, (2006) encontraron que pulpos alimentados con calamar mostraron una relación de DHA/EPA de más que 1.5, la cual favorece el crecimiento de juveniles, pre-adultos y adultos. Otros estudios llevados a cabo en *O. vulgaris* mostraron que el calamar y el pulpo tienen composiciones químicas similares, lo que explicaría los beneficios que este alimento tiene para los pulpos (García García y Aguado Giménez 2002; Aguado Giménez y García García 2002; García García y Cerezo Valverde 2006; Petza *et al.*, 2006).

V CONCLUSIÓN

En este trabajo se obtuvo un mayor porcentaje de sobrevivencia al ayuno de 10 días en las crías obtenidas de las hembras alimentadas con las mezclas jaiba calamar, jaiba-mejillón y jaiba-cabezas de pescado. Este periodo fue establecido considerando que es durante estos primeros días post embrionarios cuando los juveniles consumen el vitelo interior remanente de su vida como embriones (Moguel *et al.*, 2010). Nuevamente, las dietas mixtas resultaron con mejores características que la jaiba sola,

lo que demuestra que la complementariedad entre nutrientes es una mejor manera de aproximarse a los requerimientos que al utilizar mono-dietas.

CAPITULO IV

EFFECTO DEL TIPO DE ALIMENTO EN LA CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA Y BIOQUIMICA DEL HUEVO Y LOS EMBRIONES DE *Octopus maya*

I INTRODUCCIÓN

Montoya *et al.*, (2002), reportó que la síntesis del vitelo depende del alimento que la hembra ingiere directamente y no de las reservas de ésta. Fernández-Palacios *et al.*, (1997) mencionaron que varios nutrientes son esenciales para el desarrollo normal del embrión, y su nivel óptimo en la dieta de los reproductores mejora la morfología del huevo y el porcentaje de eclosión.

El análisis de la composición química de los tejidos nos permite establecer la variación que puede experimentar esa composición en función de la dieta suministrada. Como se ha venido mencionando anteriormente, muchos estudios han mostrado que la composición química de los tejidos de los reproductores, y de los huevos emitidos por ellos, reflejan el contenido de la dieta. Por esa razón, los datos de esta naturaleza sirven para establecer los requerimientos nutricionales de los reproductores que son necesarios para el buen desarrollo de los embriones y por ende de la progenie. Según Sargent *et al.*, (2002) los peces marinos requieren en la dieta DHA, EPA y AA para un normal crecimiento, desarrollo y reproducción. También señalan que el requerimiento de estos ácidos grasos está relacionado con la carencia y baja efectividad de las enzimas elongasas y desaturasas, implicadas en las rutas metabólicas que participarían en la síntesis de HUFA partir de sus precursores 18:3n-3 y 18:2n-6. Generalmente se cree que los sustratos principalmente utilizados para la obtención de energía son el 16:0 y el 18:1n-9 y como sustrato energético durante el desarrollo embrionario y primeras fases del desarrollo larvario al 20:5n-3 y 22:6n-3 (Ronnestad *et al.*, 1994; Cejas *et al.*, 2004; Quintana, 2009).

En cefalópodos se ha observado que el tamaño de los huevos puede variar según la especie, y que estas diferencias están relacionadas con el hábitat de los recién eclosionados y que al igual estas diferencias influyen en la viabilidad posterior. Con ejemplares de *O. vulgaris* se encontró que la dieta suministrada a los reproductores también puede influir sobre las características morfométricas del huevo y en la supervivencia de las paralarvas (Quintana, 2009).

Por otro lado, se ha mencionado que la composición química de los huevos y crías de los cefalópodos está relacionada con la composición química del vitelo, y este a su vez influenciada con la dieta los reproductores. En este contexto, Navarro y Villanueva (2000) demostraron que las paralarvas del pulpo *O. vulgaris* poseen un elevado contenido de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), tales como el 22:6n-3 (DHA, 20% del total de ácidos grasos), el 20:5n-3 (EPA, 13%), o el 20:4n-6 (ARA, 7%), y que el 60% restante del total de lípidos lo constituyen los lípidos polares, mientras que el colesterol puede suponer más de un 20% del total de lípidos (Sexias, 2009).

Otro de los parámetros establecidos para determinar la calidad de las crías en los cefalópodos ha sido el porcentaje de consumo o absorción del vitelo, la tasa de crecimiento del embrión y los cambios morfológicos que este experimenta durante la vida embrionaria. De hecho, estas características se han utilizado para evaluar, además de las condiciones de cultivo (Uriarte et al. 2009; Uriarte et al. 2010; Uriarte et al. 2011; Uriarte et al. 2014), los efectos de la temperatura (Uriarte et al. 2012), lo cual ha demostrado que pueden ser utilizadas como elementos de evaluación del desarrollo embrionario. Este tipo de análisis parece tener validez también para otros cefalópodos. En un estudio llevado a cabo por Vidal *et al.*, (2002), con paralarvas de *Loligo vulgaris reynaudii* en el cual se evaluaron el consumo de vitelo después de la eclosión se encontró que existe una relación entre el porcentaje de eclosión y la tasa de consumo de éste, lo que permitió explicar porque estos organismos tienen un desarrollo embrionario de tan solo 3 a 4 días.

Teniendo como base estudios anteriores llevados a cabo con otras especies de cefalópodos, el objetivo de este capítulo fue el de determinar los cambios morfo-métricos en los huevos y embriones de *O. maya*, así como la calidad y viabilidad de las crías en función de la dieta de los reproductores. Esta parte del estudio fue dirigida a determinar los principales componentes de las dietas que influyen en las características de los embriones y su viabilidad.

II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de muestra

Las muestras para esta parte del estudio fueron obtenidas de los desoves producidos con las hembras alimentadas con las dietas experimentales (véase capítulo 1). Los embriones fueron obtenidos del sistema de incubación descrito en el capítulo 2 de esta tesis. Una muestra de seis huevos de cinco desoves de cada tratamiento (N= 30 huevos/tratamiento) fueron tomados de la incubadora cada 10 días, a partir del día cero (desove) y hasta el día 40 (N total = 120 embriones/tratamiento).

2.2 Medidas morfométricas de los huevos

Las medidas morfométricas obtenidas en los huevos fueron: largo y ancho (mm), peso (g) y volumen de vitelo (mm^3). El peso se determinó utilizando una balanza analítica marca OHAUS Pioneer ($\pm 0.0001\text{g}$); el largo y ancho con una regla vernier ($\pm 1 \text{ mm}$), mientras que el volumen del vitelo fue calculado a partir de las imágenes captadas con un estereoscopio NIKON SMZ 280 acoplado a una cámara fotográfica NIKON. Esas imágenes fueron captadas a una resolución de 1280 x 960 pixeles y analizadas mediante el programa Motic Imágenes 2000, a un objetivo de 10X.

El volumen del vitelo se calculó dependiendo de la forma geométrica que éste adquiere durante el desarrollo del embrión: ovalo, cilindro o esfera:

$$\text{Volumen de un Ovalo} = 4/3 \pi \times r_1 \times r_2$$

$$\text{Volumen de un cilindro} = \pi \times r^2 \times h$$

$$\text{Volumen de una esfera} = 4/3 \pi \times r^3$$

Donde r es el radio ya sea mayor (r_1) o menor (r_2) y h la altura

2.3 Medidas morfométricas en embriones

Se realizaron medidas morfométricas en embriones de *O. maya* a partir del día 20 de edad, los embriones fueron extraídos después de haber tomado las mediciones de los huevos. Se realizó un pequeño corte al huevo con un bisturí y con una pinza se tomó cuidadosamente al embrión, este fue colocado en una caja petri con agua de mar y alcohol al 1% utilizado como anestésico para facilitar la manipulación. Posteriormente, los embriones fueron llevados al área de microscopia para la captación de imágenes de cada embrión, las cuales se obtuvieron con el mismo sistema de observación y captura utilizado en los huevos.

2.4 Obtención de muestras para análisis químico

Para los análisis químicos se tomaron 30 huevos de cada desove/dieta a los que se les extrajo el vitelo haciendo dos pools de 15 huevos/desove cada uno. Cada pool fue colocado en una centrifuga refrigerada ICE Centra MP4R y con una programación de 1600 rpm por 5 min a 4°C con el fin de separar el líquido perivitelino del vitelo. El líquido perivitelino fue conservado para la determinación de proteínas solubles y el vitelo para la cuantificación de lípidos totales, el perfil de ácidos grasos y el perfil de aminoácidos. Las muestras obtenidas fueron fijadas con nitrógeno líquido y almacenadas en un ultra congelador de -80°C para el análisis químico posterior.

2.5 Peso de crías eclosionadas

Las crías recién eclosionadas fueron colectadas directamente en el tanque de incubación. Del total de pulpos obtenidos en cada desove se tomó una sub-muestra de 50 a los que se les determinó el peso. Los animales fueron secados con una toalla de papel previo el pesado, el cual se llevó a cabo en una balanza DENVER Mod. XP-300 con una sensibilidad de 0.0001 g.

2.6 Prueba de ayuno

La prueba de ayuno consistió en dejar a las crías recién eclosionadas sin suministro de alimento por un periodo de 10 días. Para esto se utilizaron 20 pulpos recién

eclosionados los que fueron colocados individualmente en piezas en forma de T con diámetro de 1" de PVC cuyos extremos fueron cubiertos con una malla mosquitero de fibra de vidrio fijada con unas ligas. El tercer orificio fue cerrado con un tapón de PVC del mismo diámetro. El cuidado y mantenimiento de este dispositivo experimental fue el de la limpieza del tanque y mantener el flujo y aireación constante. Una vez transcurridos los 10 días, se cuantificaron las crías vivas presentes en los refugios.

2.7 Análisis químicos de vitelo y líquido perivitelino en huevos de *O. maya*

2.7.1 Determinación de lípidos totales

Los lípidos totales fueron determinados mediante la técnica de Folch *et al.*, (1975) con algunas modificaciones. Se utilizaron 150 mg de muestra liofilizada en viales de 15 ml a la que se le añadió la solución solvente diclorometano-metanol (2:1 v/v). Las muestras fueron homogenizadas en un homogenizador ultrasónico por 15 min. Posteriormente a la muestra se le agregó 4 ml de Cloruro de potasio al 0.88% (KCL), se agito con un vortex y se colocaron en una centrifuga a 5000 RPM por 10 minutos. Posteriormente, con una pipeta Pasteur se tomó la fase orgánica la cual fue pasada por una jeringa de filtración y transferida a un vial limpio. Posteriormente las muestras nuevamente fueran centrifugadas con el fin de retirar el exceso de agua con una pipeta Pasteur. A la muestra se le agregó 1 g de sulfato de sodio (Na₂SO₄), con el fin de evitar la oxidación y se transfirió a un vial limpio previamente pesado. Las muestras fueron evaporadas a sequedad utilizando un flujo de nitrógeno. Posteriormente, se colocaron en una estufa con vacío por 1 h y por último los viales fueron pesados. El cálculo de lípidos fue determinado con la siguiente formula:

$$\% \text{ lípidos} = (Pf - Pi) (Pt / Pm) * 100$$

Donde:

Pf= peso final de vial

Pi= peso inicial de vial

Pt= peso total de lípidos

Pm= peso de muestra

2.7.2 Proteína soluble

El líquido perivitelino fue desengrasado utilizando 1 ml de hexano 0.95%. A cada muestra se le agregaron 500 μ l de hexano el cual permitió separar a los lípidos y desecharlos. Esto se realizó mediante centrifugación. Una vez desengrasada la muestra, se procedió a su preparación para el análisis. Para la evaluación de las proteínas solubles se utilizó una prueba comercial para micro determinaciones basada en la técnica de Bradford, (1976). Para hacer esto, la muestra de 5 μ l del líquido se diluyó en 300 μ l de agua inyectable libre de pirógenos. De esta dilución se tomaron 10 μ l los que se colocaron en micro placa de lector de Elisa a la que se le añadieron 200 μ l de solución reactiva en incubación a temperatura ambiente por 5 minutos. La lectura de la concentración de proteínas solubles se realizó a una absorbancia de 595 nm. El cálculo de la concentración de proteína (mg/ml), se determinó utilizando una curva patrón determinada con albumina bovina.

2.7.3 Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos presentes en muestras de vitelo de huevos recién desovados de pulpo *O. maya* fueron determinados por el método de Cromatografía de gases masas. Se utilizaron cinco muestras por dieta siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente en el capítulo 1 (análisis de las dietas experimentales).

2.7.4 Perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos se determinó en cinco muestras de vitelo de huevos recién desovados de pulpo por dieta. Las muestras previamente fueron desengrasadas, liofilizadas y homogenizadas. El análisis se realizó por duplicado por muestra, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el capítulo 1 (análisis de las dietas experimentales).

2.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio fueron procesados en dos partes. Primero se llevó a cabo el análisis de componentes principales (ACP) de los perfiles de

los ácidos grasos obtenidos del vitelo de los embriones procedentes de las hembras alimentadas con cada una de las dietas experimentales. El análisis permite la estructuración de un conjunto de datos multivariados obtenidos de una población, cuya distribución de probabilidades no necesita ser conocida (Pla, 1986). Los objetivos más importantes de este análisis fueron:

1. Generar nuevas variables que puedan expresar la información contenida en el conjunto original de datos.
2. Reducir la dimensionalidad del problema que se está estudiando, como paso previo para futuros análisis.
3. Eliminar, cuando sea posible, algunas de las variables originales si ellas aportan poca información.

Para llevar a cabo el análisis se consideraron las proyecciones de los perfiles de ácidos grasos para los componentes 1 y 2, los cuales fueron expresados como los cosenos cuadrados representados en ambos ejes. Los valores con valores de los cosenos cuadrados mayores de 0.8 fueron considerados como aquellos que tuvieron la mayor influencia en el análisis.

Una vez determinados los elementos del perfil de ácidos grasos que tuvieron la mayor influencia en el ACP, se procedió a relacionar la magnitud de ese valor con las características morfológicas de los embriones procedentes de hembras alimentadas con las diferentes dietas experimentales. La relación entre los elementos destacados del perfil de ácidos grasos y las características morfológicas se analizó utilizando un análisis varianza de dos vías.

III RESULTADOS

3.1 Análisis químico del vitelo en los huevos de *O. maya* producidos con las dietas experimentales

3.1.1 Lípidos en el vitelo

La concentración de lípidos en el vitelo de las hembras fue significativamente influenciada por el tipo de alimento suministrado a las hembras de *O. maya*. El vitelo procedente de las hembras alimentadas con la combinación jaiba-calamar presentó el mayor porcentaje de lípidos con un 13.2 %, mientras que con las hembras alimentadas con jaiba y la combinación jaiba-cabeza de pescado la proporción resultó ser de 11%, mientras que en la de las hembras alimentadas con la mezcla jaiba-mejillón fue de 10.3%, respectivamente ($P < 0.05$; Fig. 8).

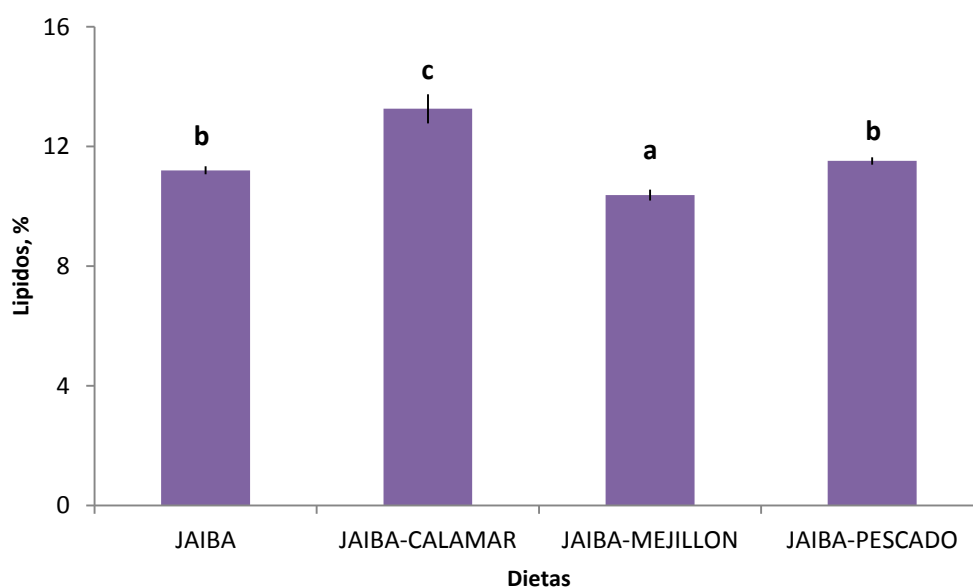


Figura 8. Porcentaje de lípidos totales en el vitelo de huevos de *O. maya* obtenidos con las dietas experimentales. Valores promedio \pm error estándar

3.1.2 Proteína soluble en líquido perivitelino de huevos de pulpo *O. maya*

La cantidad de proteína soluble presente en el líquido perivitelino de los huevos de pulpos de *O. maya* obtenidos no fue afectado significativamente por las dietas experimentales. Un valor promedio de 44.19 ± 7.1 mg ml⁻¹ fue calculado para el líquido perivitelino de los huevos de *O. maya*.

3.1.3 Perfil de ácidos grasos en el vitelo de huevos de *O. maya*.

La proporción de ácidos grasos saturados contenidos en el vitelo de los huevos de *O. maya* procedentes de las hembras alimentadas con diferentes tipos de alimentos fueron los más abundantes en todas las dietas, seguidos por los monosaturados y los poliinsaturados (Tabla 7). El ACP mostró que la variabilidad obtenida en los ejes 1 y 2 correspondió con el 67% de la variabilidad total (Fig. 9). El eje uno explicó un 36% de la variabilidad lo que permitió separar a la dieta insumo jaiba-mejillón respecto a la jaiba y jaiba-calamar. El eje dos explicó un 30.3 % de variabilidad y permitió separar a las dietas jaiba de jaiba-mejillón y jaiba-calamar.

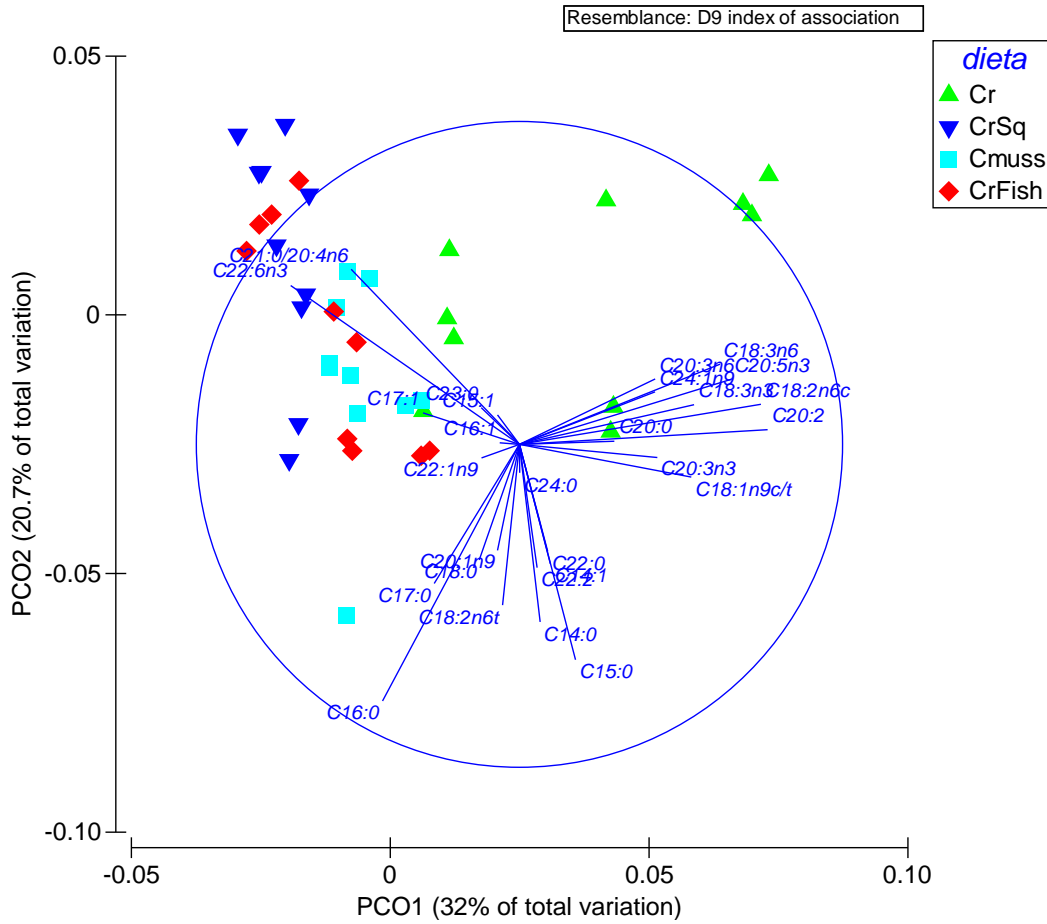


Figura 9. Análisis de contenidos (%) de 28 AG en el vitelo de 40 embriones de *O. maya* alimentados con 4 dietas frescas (Cr= jaiba; Crmuss=jaiba +mejillón; Crsq=jaiba+calamar; Crfish= jaiba+pez), y su relación con los contenidos de los mismos AG en las propias dietas.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos (%) en el vitelo de huevos de hembras de *O. maya* alimentadas con diferentes dietas. Valores como promedio \pm desviación estándar.

Ácidos grasos	DIETAS							
	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>)		Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Calamar (<i>Dosidiscus gigas</i>)		Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Mejillón (<i>Perna canalicus</i>)		Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Cab. de pescado (<i>Epinephelus morio</i>)	
C11:0	0.01	\pm 0.00	0.02	\pm 0.00	0.03	\pm 0.04	0.01	\pm 0.01
C12:0	0.25	\pm 0.01	0.20	\pm 0.07	0.21	\pm 0.11	0.22	\pm 0.08
C13:0	0.04	\pm 0.01	0.02	\pm 0.01	0.03	\pm 0.01	0.04	\pm 0.01
C14:0	3.14	\pm 0.45	3.04	\pm 0.50	3.15	\pm 0.25	3.35	\pm 0.27
C15:0	0.85	\pm 0.07	0.81	\pm 0.05	0.86	\pm 0.06	0.85	\pm 0.09
C16:0	30.87	\pm 2.33	31.82	\pm 1.01	32.42	\pm 1.32	32.33	\pm 1.40
C17:0	1.93	\pm 0.28	2.01	\pm 0.26	2.00	\pm 0.08	1.93	\pm 0.16
C18:0	8.83	\pm 0.84	8.56	\pm 1.26	9.06	\pm 0.21	8.49	\pm 0.43
C20:0	0.09	\pm 0.03	0.05	\pm 0.03	0.05	\pm 0.05	0.05	\pm 0.03
C22:0	0.37	\pm 0.32	0.34	\pm 0.34	0.43	\pm 0.54	0.38	\pm 0.40
C23:0	1.40	\pm 0.13	1.38	\pm 0.18	1.17	\pm 0.06	1.46	\pm 0.42
C24:0	0.04	\pm 0.06	0.00	\pm 0.00	0.02	\pm 0.04	0.03	\pm 0.02
C14:1	0.10	\pm 0.04	0.11	\pm 0.05	0.10	\pm 0.05	0.08	\pm 0.02
C15:1	0.01	\pm 0.05	0.00	\pm 0.00	0.03	\pm 0.06	0.16	\pm 0.21
C16:1	1.54	\pm 0.13	1.54	\pm 0.20	1.74	\pm 0.10	1.58	\pm 0.15
C17:1	2.08	\pm 0.66	2.13	\pm 0.86	2.96	\pm 0.68	2.70	\pm 0.79
C18:1n9c/t	9.11	\pm 0.72	7.96	\pm 0.47	8.31	\pm 0.48	8.09	\pm 0.68
C20:1n9	3.09	\pm 0.18	3.04	\pm 0.38	3.32	\pm 0.36	3.19	\pm 0.12
C21:0/20:4n6	13.51	\pm 1.48	14.36	\pm 0.84	13.91	\pm 0.79	13.82	\pm 1.30
C22:1n9	0.28	\pm 0.12	0.31	\pm 0.03	0.40	\pm 0.05	0.26	\pm 0.15
C24:1n9	0.69	\pm 1.88	0.03	\pm 0.03	0.05	\pm 0.04	0.09	\pm 0.06
C18:2n6c	1.07	\pm 0.14	0.48	\pm 0.18	0.71	\pm 0.30	0.66	\pm 0.09

Tabla 7 Continuación

C18:2n6t	0.09 ± 0.05	0.10 ± 0.16	0.12 ± 0.20	0.07 ± 0.06
C18:3n6	1.30 ± 2.65	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.02
C18:3n3	0.45 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.19 ± 0.16
C20:2	1.81 ± 0.23	1.00 ± 0.14	0.96 ± 0.19	0.98 ± 0.37
C20:3n6	0.27 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.11 ± 0.07	0.21 ± 0.03
C20:3n3	0.13 ± 0.06	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.05	0.12 ± 0.07
C20:5n3	9.23 ± 0.60	8.50 ± 0.58	8.14 ± 0.57	8.29 ± 0.61
C22:2	0.22 ± 0.09	0.14 ± 0.07	0.28 ± 0.12	0.22 ± 0.06
C22:6n3	7.98 ± 0.37	11.42 ± 0.71	8.96 ± 0.71	10.12 ± 1.12
Saturados	47.83 ± 3.67	48.25 ± 2.16	49.45 ± 1.39	49.13 ± 2.05
Monoinsaturados	30.42 ± 2.16	29.47 ± 1.49	30.83 ± 1.14	29.97 ± 1.92
Poliinsaturados	22.57 ± 2.95	22.27 ± 1.18	19.72 ± 1.29	20.89 ± 1.19
EPA+DHA/PUFA	9.59 ± 0.56	9.02 ± 0.58	8.60 ± 0.58	8.77 ± 0.58
n-3	17.80 ± 0.64	20.34 ± 1.25	17.53 ± 1.28	18.72 ± 1.17
n-6	16.25 ± 2.65	15.15 ± 0.82	14.87 ± 0.76	14.79 ± 1.21
n-3/n-6	1.12 ± 0.17	1.34 ± 0.07	1.18 ± 0.11	1.28 ± 0.15
Ácido eicosapentanoico (EPA)	9.23 ± 0.60	8.51 ± 0.58	8.14 ± 0.57	8.29 ± 0.61
Ácido docosahexanoico (DHA)	7.98 ± 0.37	11.42 ± 0.71	8.96 ± 0.71	10.12 ± 1.12
DHA/EPA	0.87 ± 0.08	1.34 ± 0.05	1.10 ± 0.04	1.23 ± 0.19

Muestras por triplicado

La calidad de la proyección del ACP mostró a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) como los elementos desatacados que determinaron la mayor influencia entre los grupos de dietas analizados. Teniendo en consideración ese resultado se procedió a analizar la relación entre las características morfológicas de los embriones con respecto a los niveles de AGPI contenidos en el vitelo.

Tabla 8. Calidad de proyección de los componentes del perfil de ácidos grasos del vitelo de los huevos de *O. maya* procedentes de hembras alimentadas con los diferentes tipos de alimentos. Los AG marcados presentaron relativamente altos valores de correlación de Pearson con cada uno de las Coordenadas principales. También se indican aquellas corrdenadas que explicaron porcentajes mayores de la variación total

Pcoord	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% variación	32.02	20.7	13.86	9.97	6.69	5.48	4.49	3.38	2.38
C14:0	0.06	-0.55	0.39	-0.53	0.17	-0.01	0.23	0.05	0.00
C14:1	0.10	-0.37	0.34	-0.16	0.04	-0.12	0.07	0.54	-0.15
C15:0	0.17	-0.67	0.02	0.28	0.03	-0.11	0.39	0.05	0.07
C15:1	-0.07	0.09	-0.10	-0.11	-0.24	0.16	-0.10	0.01	-0.19
C16:0	-0.42	-0.79	0.15	0.17	0.12	0.05	0.17	0.14	-0.05
C16:1	-0.06	0.01	-0.30	-0.48	-0.19	0.40	0.04	0.02	0.24
C17:0	-0.26	-0.43	-0.28	0.67	0.22	-0.03	-0.10	-0.05	0.14
C17:1	-0.30	0.10	-0.48	-0.62	-0.37	0.15	0.14	-0.10	0.09
C18:0	-0.12	-0.36	-0.56	0.50	0.11	-0.13	-0.38	-0.04	0.00
C18:1n9c/t	0.53	-0.10	-0.04	-0.45	0.32	-0.14	-0.33	0.44	-0.09
C18:2n6c	0.75	0.12	-0.20	-0.04	0.19	-0.17	0.05	-0.04	0.10
C18:2n6t	-0.05	-0.50	-0.08	0.12	-0.02	0.11	-0.14	0.09	-0.29
C18:3n6	0.62	0.25	0.08	0.41	-0.52	0.07	0.11	0.19	-0.02
C18:3n3	0.54	0.12	0.00	-0.05	0.06	0.03	-0.39	0.26	0.13
C20:0	0.29	0.01	0.01	0.28	0.35	-0.24	-0.04	0.17	-0.27
C20:1n9	-0.07	-0.33	-0.32	-0.13	-0.39	-0.16	-0.06	-0.29	-0.31
C20:2	0.77	0.05	-0.12	0.09	0.28	-0.25	0.13	-0.20	-0.04
C20:3n6	0.42	0.20	0.13	0.14	0.16	-0.18	0.01	-0.26	-0.16
C21:0/20:4n6	-0.52	0.54	-0.37	0.19	0.30	0.17	0.11	0.20	0.01
C20:3n3	0.43	-0.04	0.27	0.11	0.18	0.11	0.41	-0.22	0.07
C20:5n3	0.65	0.20	0.50	-0.09	0.06	-0.15	0.20	0.13	0.23
C22:0	0.09	-0.33	-0.02	-0.15	-0.05	-0.38	-0.43	-0.05	0.52

C22:1n9	-0.12	-0.04	-0.27	0.10	0.02	-0.04	0.16	-0.07	0.05
C22:2	0.05	-0.38	-0.27	0.02	-0.05	0.03	-0.13	-0.04	0.13
C23:0	-0.12	0.11	-0.33	0.39	0.35	-0.14	0.53	-0.33	-0.01
C22:6n3	-0.71	0.49	0.47	0.03	-0.06	-0.05	-0.07	-0.02	-0.06
C24:0	0.00	-0.09	-0.38	0.26	0.31	0.06	0.12	0.12	-0.35
C24:1n9	0.42	0.16	0.09	-0.16	0.42	0.35	-0.25	-0.50	-0.14

3.2 Características morfométricas de los huevos en relación a la concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)

3.2.1 *Peso y largo de huevos*

En el peso, la longitud y el ancho de los huevos cambiaron con la edad de los embriones, con los valores más bajos al inicio y los más altos al final del desarrollo embrionario. Los huevos de mayor tamaño en todos los indicadores fueron aquellos que contenían niveles de AGPI entre 20 (hembras alimentadas con la mezcla jaiba-mejillón) y 21% (hembras alimentadas con la mezcla jaiba-pescado). Los huevos de menor tamaño fueron aquellos que contenían niveles de 24% de AGPI (hembras alimentadas con jaiba sola) ($P < 0.05$; Fig. 10).

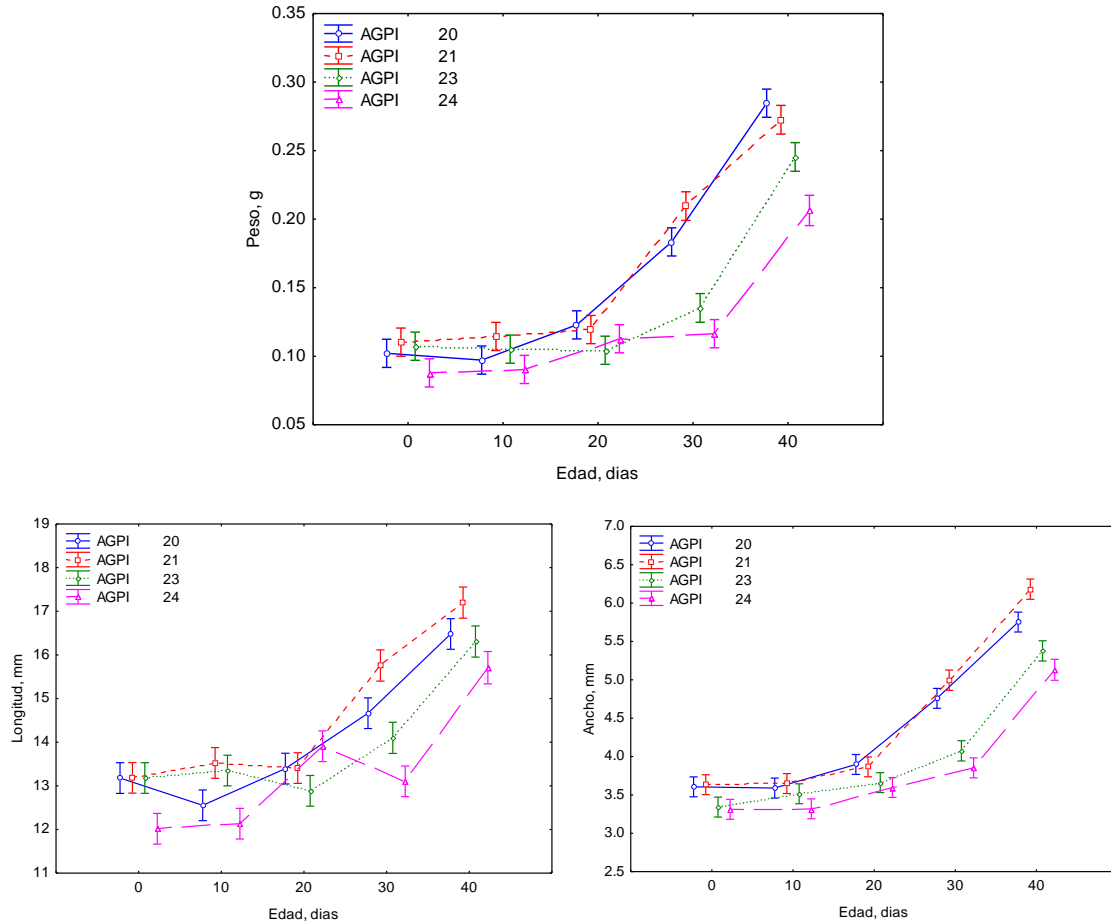


Figura. 10. Relación entre la edad y el peso y la longitud y el ancho de los huevos de *O. maya* con diferentes contenidos de AGPI en el vitelo y a lo largo del desarrollo embrionario. Valores dados como promedio \pm DS.

3.2.1 Volumen de vitelo.

El análisis de varianza indicó que el volumen del vitelo se fue reduciendo en la medida que los embriones se desarrollaron, con los valores más altos al inicio y los menores al final del desarrollo embrionario ($P < 0.05$; Fig. 11A). Así mismo ese análisis mostró que un menor volumen de vitelo fue registrado en los embriones con niveles de AGPI de 24%, correspondientes a las hembras alimentadas solo con jaiba ($P < 0.05$; Fig. 11B). El resto de los niveles de AGPI no afectaron significativamente el volumen del vitelo de los embriones ($P > 0.05$; Fig. 11C).

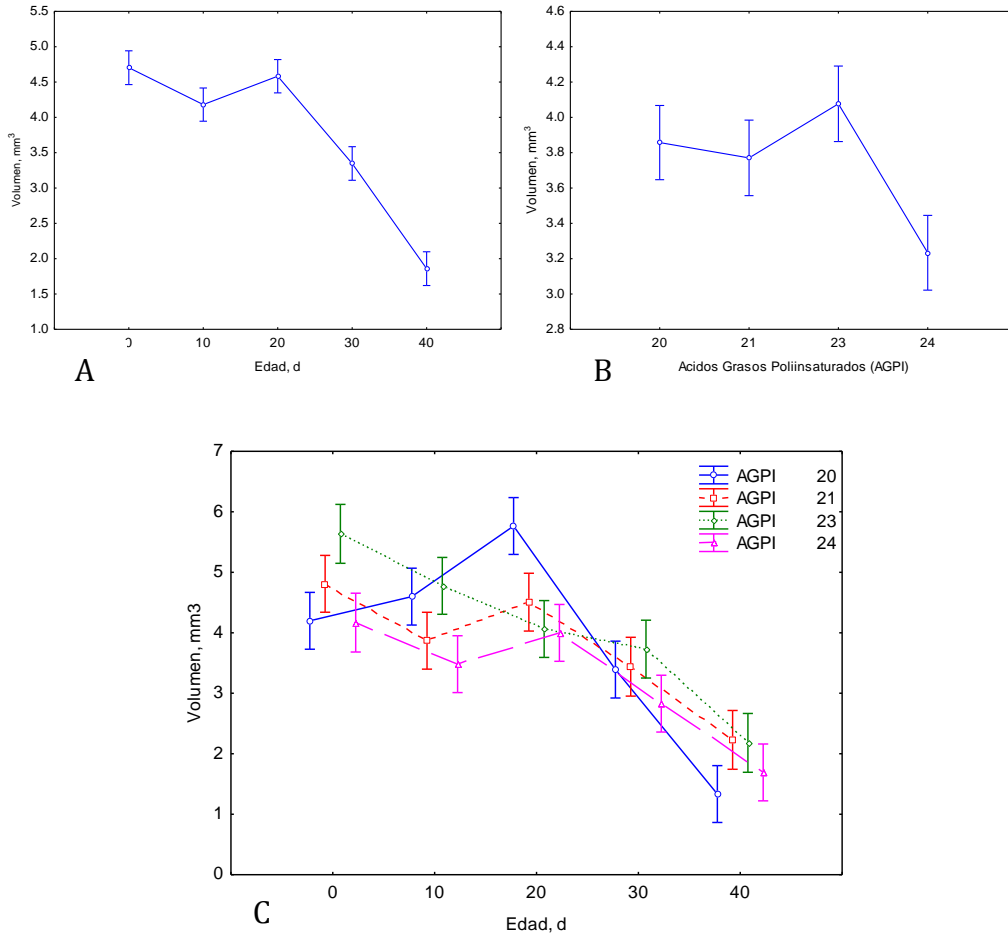


Figura. 11. Relación entre la edad y el volumen del vitelo contenido en los huevos de *O. maya* con diferentes contenidos de AGPI en el vitelo y a lo largo del desarrollo embrionario. Valores dados como promedio \pm desviación estándar.

3.3 Características morfométricas de los embriones

Las medidas de los embriones fueron relacionadas con el nivel de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en el vitelo contenido en los huevos producidos con las dietas utilizadas en el experimento (Fig. 12). Los análisis de varianza efectuados para conocer los efectos combinados de los niveles de ácidos grasos del vitelo y la edad de los embriones indicó que el tamaño de los embriones procedentes de las hembras alimentadas con la mezcla jaiba mejillón (20% AGPI) resultó, al momento de la

eclosión, significativamente mayor en todas las estructuras medidas que los obtenidos en el resto de los tratamientos ($P < 0.05$; Fig. 12)

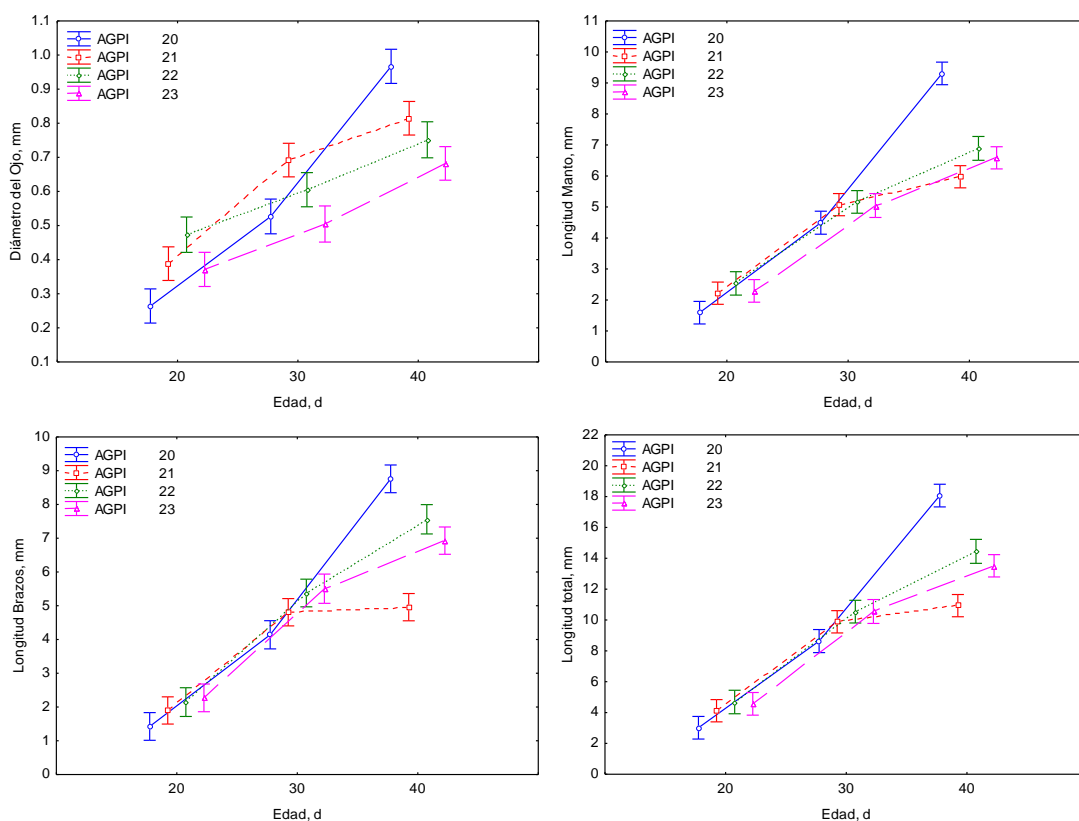


Figura 12. Relación entre la edad y las características morfológicas (diámetro del ojo, longitud del manto, la longitud de brazos y longitud total) de los embriones de *O. maya* con distintos niveles de AGPI del vitelo proveniente de las dietas ingeridas por las hembras durante la ovogénesis. Valores dados como promedio \pm desviación estándar.

3.4 Perfil de aminoácidos en el vitelo de huevos de *O. maya*

La Glutamina (Glu) contenida en el vitelo de los huevos de *O. maya* procedentes de las hembras alimentadas con los diferentes tipos de alimentos fue el AA más abundantes en todas las dietas, seguidos por la Leu y Lys (Tabla 9). El ACP mostró que la variabilidad obtenida en los ejes 1 y 2 correspondió con el 72.6% de la variabilidad total (Fig. 13). El eje uno explicó el 51.15 % de la variabilidad lo que permitió separar

a la dieta elaborada con la mezcla jaiba-calamar y jaiba de las mezclas jaiba-pescado y jaiba-mejillón. El eje dos explico un 21.4 % de variabilidad y permitió separar a la dieta jaiba-calamar del resto de los tratamientos.

La calidad de la proyección del ACP mostró que la Ser, Gly, His, Pro y Tyr como los AA destacados que determinaron la mayor influencia entre los grupos de dietas analizados.

Tabla 9. Contenido total de aminoácidos en el vitelo de huevos de hembras de *O. maya* alimentadas con diferentes dietas. Valores como g/100g proteína, promedios \pm desviación estándar.

Aminoácido	DIETAS				
	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>)	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Calamar (<i>Dosidiscus gigas</i>)	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Mejillón (<i>Perna canalicus</i>)	Jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>) y Cab. de pescado (<i>Epinephelus morio</i>)	
AAE	His	1.18 \pm 0.04	1.26 \pm 0.07	1.38 \pm 0.17	1.38 \pm 0.05
	Thr	3.74 \pm 0.10	3.91 \pm 0.15	4.22 \pm 0.23	4.23 \pm 0.13
	Arg	4.20 \pm 0.19	4.49 \pm 0.23	4.57 \pm 0.34	5.09 \pm 0.39
	Val	3.61 \pm 0.09	4.05 \pm 0.14	4.17 \pm 0.21	4.32 \pm 0.17
	Me	1.55 \pm 0.05	1.42 \pm 0.08	1.61 \pm 0.15	1.57 \pm 0.07
	Lys	5.74 \pm 2.43	6.96 \pm 0.40	6.93 \pm 0.72	1.62 \pm 2.17
	Ile	2.90 \pm 1.47	4.07 \pm 0.18	3.43 \pm 1.73	1.48 \pm 1.45
	Leu	7.19 \pm 1.99	8.54 \pm 0.24	8.88 \pm 0.39	4.75 \pm 1.57
AANE	Phe	2.75 \pm 0.11	2.97 \pm 0.15	3.12 \pm 0.41	3.04 \pm 0.12
	Asp	6.63 \pm 0.17	6.49 \pm 0.20	6.53 \pm 0.53	6.67 \pm 0.21
	Ser	4.06 \pm 0.10	4.08 \pm 0.12	4.27 \pm 0.20	4.32 \pm 0.10
	Glu	10.63 \pm 0.24	10.86 \pm 0.28	10.95 \pm 0.76	11.34 \pm 0.32
	Gly	1.35 \pm 0.04	1.33 \pm 0.05	1.43 \pm 0.09	1.42 \pm 0.04
	Ala	2.51 \pm 0.05	2.48 \pm 0.05	2.54 \pm 0.09	2.59 \pm 0.07
	Pro	2.48 \pm 0.07	2.47 \pm 0.05	2.72 \pm 0.14	2.77 \pm 0.11
	Tyr	2.84 \pm 0.10	2.84 \pm 0.15	3.12 \pm 0.44	3.12 \pm 0.15
TOTALES					
AAE	32.85	37.66	38.30	27.49	
AANE	23.87	24.06	25.04	25.56	

Muestras por triplicado

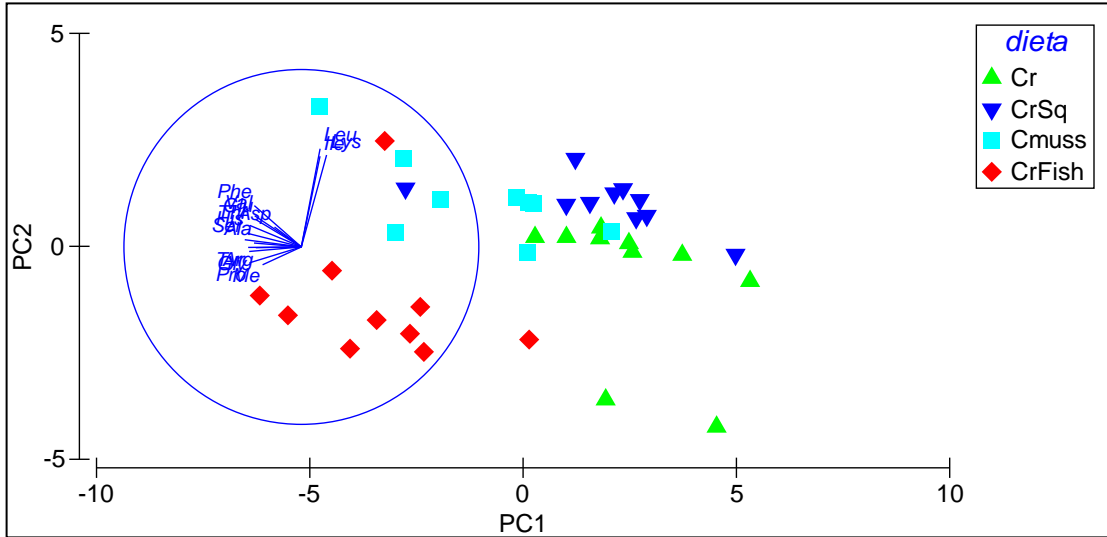


Figura 13. Análisis del contenido de 16 amino ácidos en el vitelo de 40 embriones de *O. maya* alimentados con 4 dietas frescas (Cr= jaiba; Crmuss=jaiba +mejillón; Crsq=jaiba+calamar; Crfish= jaiba+pez), y su relación con los contenidos de los mismos AA en las propias dietas.

Tabla 10. Calidad de proyección de los componentes del perfil de AA del vitelo de los huevos de *O. maya* procedentes de hembras alimentadas con los diferentes tipos de alimentos. Los AA marcados presentaron relativamente altos valores de correlación de Pearson con cada uno de los componentes principales. También se indican aquellos componentes que explicaron porcentajes mayores de la variación total.

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
	57.7	16.7	10.4	7.8	2.6
Asp	-0.151	-0.112	-0.639	-0.184	-0.083
Ser	-0.319	-0.041	-0.013	0.117	-0.026
Glu	-0.259	-0.155	-0.219	-0.417	-0.117
Gly	-0.294	0.026	-0.049	0.348	0.082
His	-0.308	-0.078	0.226	0.021	-0.011
Arg	-0.257	0.004	0.175	-0.229	0.795
Thr	-0.291	-0.122	0.121	-0.077	-0.487
Ala	-0.267	-0.022	-0.433	-0.027	0.134
Pro	-0.292	0.089	-0.061	0.046	0.126
Tyr	-0.3	0.003	0.154	0.214	-0.123
Val	-0.263	-0.175	0.221	-0.373	-0.137
Me	-0.219	0.1	-0.186	0.594	-0.006
Lys	0.142	-0.518	-0.152	0.142	0.138
Ile	0.105	-0.511	0.166	0.128	-0.028
Leu	0.105	-0.554	-0.097	0.132	0.123
Phe	-0.265	-0.233	0.293	0.062	-0.002

De los AA destacados se seleccionó a la His para relacionarla con las características morfológicas de los embriones (Fig. 14).

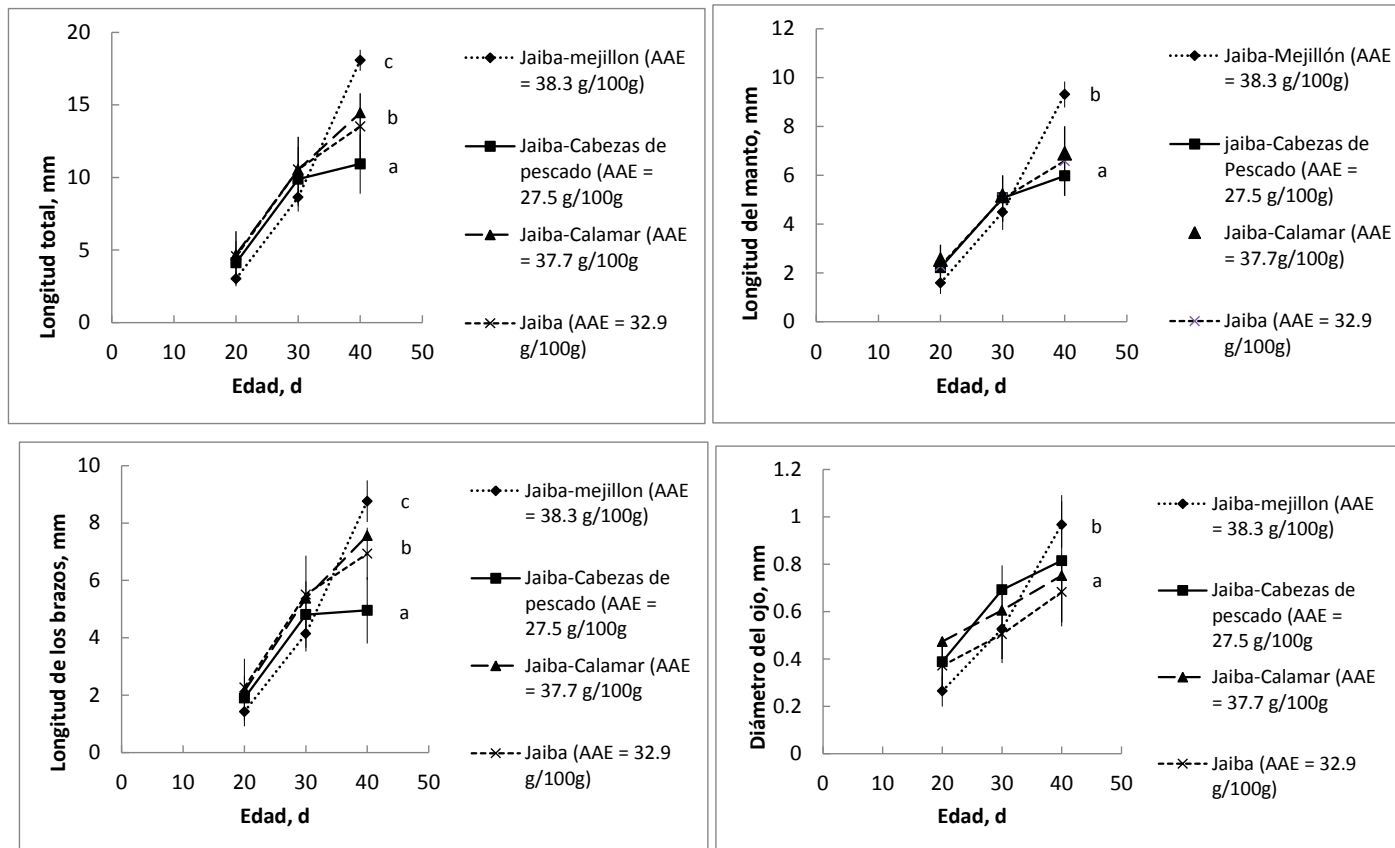


Figura. 14. Relación entre la edad y las características morfológicas (diámetro del ojo, longitud del manto, la longitud de brazos y longitud total) de los embriones de *O. maya* con distintos niveles de His del vitelo proveniente de las dietas ingeridas por las hembras durante la ovogénesis. Valores dados como promedio \pm desviación estándar.

IV DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo señalan que la composición química del alimento desempeña un papel importante en la reproducción de los pulpos, principalmente en las características de los huevos y la calidad de la progenie. En este sentido, Márquez *et al.*, (2013) compararon las características de los huevos de *O. vulgaris* durante el desarrollo embrionario en función del estadio de desarrollo, independientemente de la edad, y encontraron que las diferencias observadas en la longitud y peso de los embriones no solamente están influenciadas por la dieta de los reproductores, sino también por el estadio del desarrollo.

En el presente estudio, los efectos de la dieta entregada a las hembras fue evaluada a través de la relación que presentó el vitelo y sus efectos en las características morfológicas de los embriones. Desde esa perspectiva, los resultados obtenidos ahora mostraron que los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en el vitelo en un intervalo de 20 a 21% del total de ácidos grasos provenientes de la dieta jaiba-mejillón y jaiba-pescado y los aminoácidos Ser, Lys, Ile y Leu, son los que determinaron la separación de grupos identificados a partir de las dietas entregadas a las hembras. Siendo éstos AA del grupo de los esenciales, se seleccionaron éstos para relacionarlos con las características morfológicas, teniendo en cuenta que estos AA fueron destacados en el análisis de PCA. Así, se pudo observar que un nivel de 38.3g/100g de AAE en dietas para hembras de *O. maya* elaboradas con una mezcla jaiba-mejillón promovió embriones de mayor tamaño que las demás dietas.

Estudios previos han demostrado la utilidad que tiene la determinación de los cambios en las características morfológicas de los embriones como indicadores del crecimiento de los pulpos. Esos caracteres han sido relacionados tanto con el crecimiento muscular (longitud de los brazos), la organogénesis (longitud del manto) y el desarrollo del sistema nervioso (diámetro del ojo) (Uriarte *et al.*, 2009; Villanueva, 2004; Uriarte *et al.*, 2013). En esos estudios se observó que el crecimiento de los embriones está directamente relacionado con el consumo del vitelo, mientras que la composición del vitelo está relacionado con la dieta de las hembras. En este sentido, Rosa *et al.*, (2004)

demonstraron que la maduración sexual y la ovogénesis de las hembras de *O. vulgaris* están estrechamente relacionada con el tipo de alimento que los animales ingieren. Estos autores observaron que las propiedades del ovario durante la ovogénesis se relacionan directamente con el tipo de alimento que las hembras consumen ya que, los pulpos, no cuentan con tejido de reserva en donde los nutrientes sean almacenado y luego transformados para la síntesis del vitelo.

Trabajos realizados por Villanueva (1995), Iglesias *et al.*, (2004) y Carrasco *et al.*, (2006), entre otros, mencionan que en el cultivo de paralarvas de *O. vulgaris* a medida que éstas van creciendo, la proporción de los brazos frente al manto aumenta, hecho que ha sido interpretado como una estrategia asociada con la obtención de presas de mayor tamaño. En el presente estudio, los embriones de *O. maya* provenientes de las hembras alimentadas con dietas compuesta de jaiba-mejillón o jaiba-pescado mostraron los mayores valores para el largo de los brazos, lo que sugiere que esos juveniles tendrían una mayor oportunidad de sobrevivencia al estar mejor capacitados para la obtención de presas de mayor tamaño al momento de la eclosión que las que pudieran tener los juveniles provenientes de las otras dietas.

El uso de la longitud del manto en embriones como un indicador del crecimiento ha sido relacionado con la organogénesis, principalmente por el hecho de que es precisamente en esa estructura en donde se localizarán los órganos durante el desarrollo embrionario (Villanueva y Norman 2008; Uriarte *et al.* 2009; Uriarte *et al.* 2012; Uriarte *et al.* 2014). En los embriones de *Robsonella fontaniana* y de *Enteroctopus megalociatus* se reportaron que la relación entre la longitud del manto y la edad de estos embriones se puede representar bien utilizando una ecuación exponencial (Uriarte *et al.*, 2009; Uriarte *et al.*, 2014). Aunque en el presente estudio no se buscó ningún modelo para representar esa relación debido a que únicamente se contó con información de la edad de 3 grupos de embriones (20, 30 y 40 días), los valores obtenidos ahora muestran que muy probablemente en *O. maya* la longitud del manto también presente una relación de esta naturaleza, sugiriendo que ese tipo de crecimiento no es exclusiva de una especie.

El diámetro del ojo ha sido considerado otra estructura importante para la determinación del crecimiento de los embriones, pues éste está relacionado con el desarrollo del sistema nervioso en los cefalópodos (Villanueva y Norman, 2008; Uriarte *et al.*, 2009, 2012, 2014). En *R. fontaniana* el crecimiento del ojo siguió una curva de saturación (Uriarte *et al.*, 2009) mientras que en *E. megalocyathus* se encontró una relación exponencial hasta el estadio XX (Uriarte *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en *O. maya* sugieren que el crecimiento del sistema nervioso (medido a través de la evaluación del diámetro del ojo) podría depender de las propiedades del vitelo y por último de la alimentación de las hembras. Los embriones provenientes de hembras alimentadas con la mezcla jaiba-mejillón mostraron una tendencia exponencial al crecimiento del diámetro del ojo, mientras que el resto de los embriones mostraron una tendencia hacia una curva de saturación. Estas diferencias sugieren que podría haber algunos elementos nutricionales en la mezcla jaiba-mejillón que podría estar fortaleciendo la formación del sistema nervioso de los pulpos. En este sentido los resultados obtenidos ahora indican que los AGPI contenidos en el vitelo son los que marcan la diferencia e indican que la mezcla jaiba-mejillón consumida por las hembras podría estar también estimulando más que las otras dietas el desarrollo del sistema nervioso de los embriones. El sistema nervioso de los cefalópodos ha sido ampliamente estudiado debido a que es uno de los más desarrollados entre los animales marinos (D'Aniello *et al.* 1995; De Sio 2011). La coordinación de los brazos, el mimetismo y una conducta compleja son algunos de los aspectos que han llamado la atención de una gran diversidad de investigadores (Hanlon and Messenger 2002; Villanueva and Norman 2008; Onthank and Cowles 2011). De esos estudios se ha podido concluir que uno de las razones por las cuales los pulpos perdieron la concha y se convirtieron en el grupo exitoso de animales marinos que son hoy día fue precisamente por el desarrollo tan importante del cerebro, el cual marcó la diferencia con otros miembros del grupo que si conservaron estructuras protectoras (Schweid 2014). En este sentido, contar con una dieta que promueva el desarrollo del sistema nervioso es sin duda importante para garantizar el éxito en el desarrollo del embrión y del juvenil posterior a éste.

En lo que respecta al contenido en proteínas y aminoácidos totales Villanueva *et al.*, (2004), menciona que la fracción proteica en las paralarvas de *Octopus vulgaris* es de alrededor de un 70%, y que los aminoácidos Lis, Arg y Leu representan cerca de la mitad del total de los aminoácidos esenciales (Villanueva *et al.*, 2004). En el presente estudio los embriones de *O. maya* fueron analizados también en cuanto a la composición aminoacídica de los tejidos. En *O. maya* los aa más abundantes resultaron ser Thr, Leu, Asp, Ser y Glu, los cuales forman parte del 50% del contenido total de AA de los embriones de esta especie. Es interesante hacer notar que los resultados del PCA efectuado a la composición AA del vitelo y su relación con las características morfológicas de los embriones indican que no por ser abundantes, los aa antes mencionados tienen un papel relevante en el desarrollo de *O. maya*. Es decir, los resultados del PCA sugieren que las variaciones de la His en el vitelo de los embriones podría estar asociada con el crecimiento y desarrollo de éstos. De acuerdo con (Wenge and Bönisch, 2013) la His es un neurotransmisor que funciona como ligando de la norepinefrina, además de participar como elemento esencial en el crecimiento, y el sistema de defensa a través de su participación como precursor de la histamina, la cual tiene propiedades de vasodilatador y alérgeno. Otros estudios más finos deberán de llevarse a cabo con el fin de dilucidar el papel de éste y otros AA en el desarrollo embrionario de esta especie.

V CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demostraron que la dieta elaborada a partir de mezclas de jaiba y mejillones y en segundo término la mezcla jaiba-pescado provocaron la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en el vitelo de los embriones que favorecen el crecimiento y desarrollo y que, junto con la His aparentemente cubren los requerimientos nutricionales necesarios para la obtención de juveniles con alta sobrevivencia (Véase capítulo 2).

CAPITULO V

**DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES GENERALES, REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS Y ARTICULO SOMETIDO PARA SU PUBLICACIÓN**

I DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las características químicas del vitelo, de los embriones y sus características morfológicas fueron afectadas por el tipo de dieta entregada a las hembras durante el proceso de formación de los huevos en el ovario. El análisis de componentes principales llevado a cabo para saber si el contenido de ácidos grasos en el vitelo permite agrupar los distintos grupos experimentales indicó que los embriones procedentes de hembras alimentadas con dietas mixtas formaron un grupo distinto de los embriones provenientes de hembras alimentadas con jaiba. El análisis permanova efectuado a esos datos mostró que esta separación es altamente significativa. Los ácidos grasos del vitelo destacados en el análisis de componentes principales y que permiten la separación de los grupos mencionados fueron el C16:0 (Ac. Palmítico), el C18:2n6 (linoléico) y el C18: 3n3 (linolénico). Estudios realizado en *Sepia officinalis* demostraron que existe una relación directa entre los componentes de la dieta y las características bioquímicas de la glándula digestiva (Fluckiger *et al.* 2008). Analizando los perfiles de ácidos grasos, estos autores sugirieron que, debido al bajo requerimiento que los animales tienen por los lípidos en general, es muy probable que los ácidos grasos sean transportados en su estado nativo a los tejidos en donde serán utilizados. A este respecto (Rosa *et al.* 2004; Rosa *et al.* 2005a; Rosa *et al.* 2005b) reportaron que tanto en pulpos como en calamares, los ácidos grasos y otros componentes del alimento, son obtenidos directamente del alimento y canalizados hacia las gónadas en donde se presume son utilizados para la síntesis de vitelo. En el caso de *O. maya*, los resultados obtenidos en el presente estudio ponen en evidencia que, al igual que en otros cefalópodos, las características de la dieta determinaron la composición del vitelo en el embrión en el cual se destacan los ácidos grasos mencionados. Es interesante hacer notar que el análisis de Mantel aplicado para saber si existe una correlación entre la variación de los ácidos grasos en las dietas entregadas a las hembras y el vitelo de los embriones refuerza la idea de que la composición química de la dieta, en estos cefalópodos, es la que dirige la composición de los tejidos y entre éstos del vitelo en los huevos.

El hecho de que los ácidos grasos destacados por el PCA hayan sido los mencionados tiene repercusiones en la comprensión sobre los mecanismos bioquímicos involucrados en el proceso, transporte y depósito de los lípidos en el vitelo y su relación con las características morfológicas de los embriones. En general se sabe que el ácido graso C16:0 (Ácido palmítico) es el compuesto final de la cadena de eventos bioquímicos que conduce a la síntesis de los ácidos grasos entre los animales (Zubay 1983). A partir de éste, existen rutas bioquímicas para la síntesis de ácidos grasos más largos o insaturados, mediante la participación de elongasas y desaturasas, las cuales utilizarán al ácido palmítico hidrolizado (Palmitol-CoA) como sustrato. Es importante hacer notar aquí que en los cefalópodos no se tiene información de la capacidad que pudiera tener para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, lo que permite asumir que, al igual que los vertebrados, los cefalópodos pudieran tener que adquirir éstos de la dieta.

Entre los ácidos grasos que deben de ser ingeridos están el C18:2n6 (ácido Linoleico) y el C18:3 n3 (Ácido γ -linolénico) los cuales son utilizados para la síntesis del ácido araquidónico ARA y de los ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA 20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6 n3). Estos ácidos grasos resultaron ser claves en la separación de los grupos experimentales en el PCA lo cual puede ser interpretado en el sentido de la importancia que éstos tienen para la formación del embrión. Se sabe que los ácidos grasos poliinsaturados son fundamentales para la síntesis de tejido, formación de membranas celulares, y cumplen con la función de recibir y transmitir información. En cefalópodos estudios diversos señalan que la alimentación en las hembras reproductoras es el elemento crucial para el éxito de la reproducción sin embargo hasta la fecha no se ha descrito el mecanismo de transferencia de los nutrientes hacia el embrión (Estefanell *et al.* 2010; Farías *et al.* 2011; Márquez *et al.* 2013). De acuerdo con los resultados obtenidos ahora se puede proponer que, una vez digeridos los nutrientes, los amino ácidos y los lípidos son transportados hacia el ovario en donde las células foliculares realizan la síntesis de vitelo (O'Dor and Wellls 1978; Budelmann *et al.* 1997) (Fig. 15).

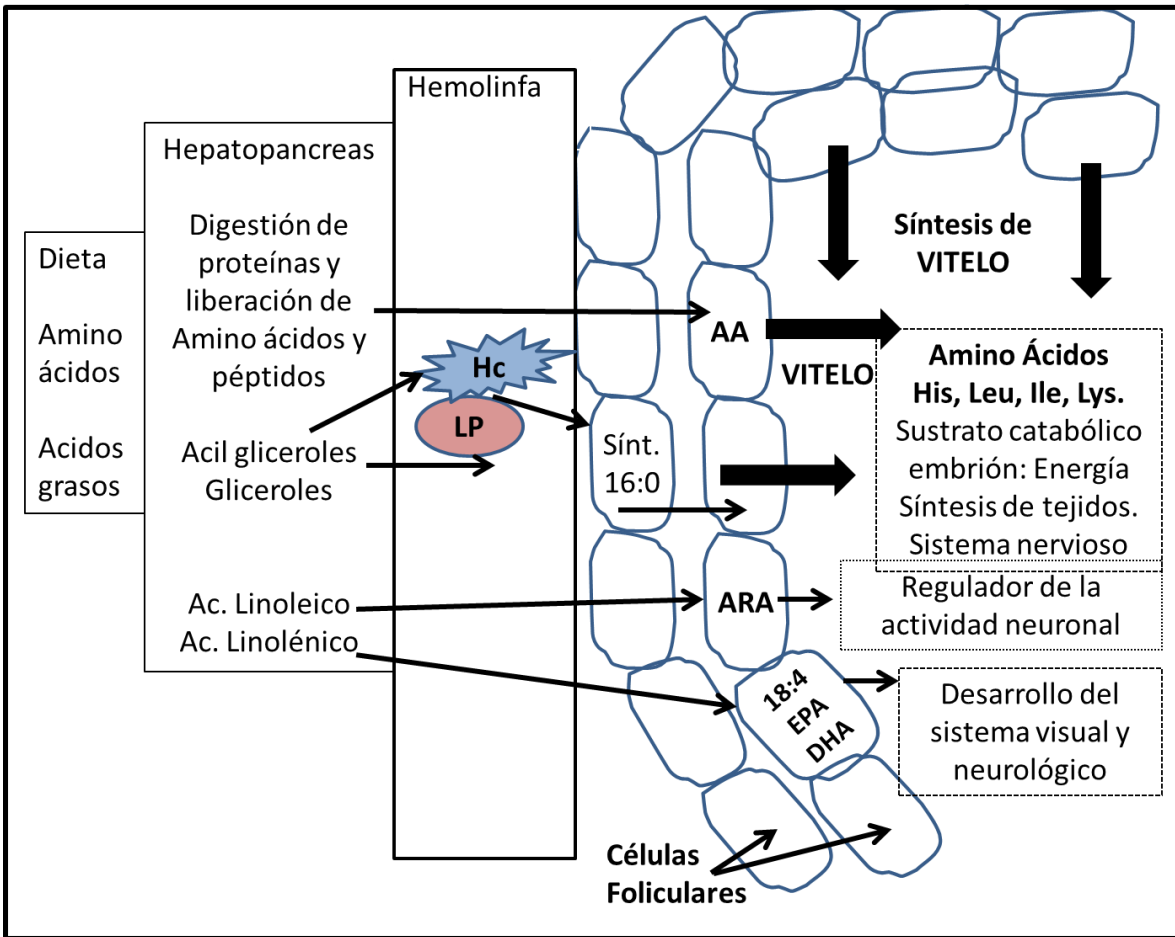


Figura 15. Esquema que sugiere la forma en que los nutrientes del alimento son llevados hasta el ovario en donde las células foliculares son las responsables de la síntesis del vitelo. Los lípidos son transportados por lipoproteínas (LP) que, junto con la hemocianina (Hc) se encargan de llevarlos a través de la hemolinfa hasta el ovario (Heras and Pollero 1990; Heras and Pollero 1992). Ahí las células foliculares son las responsables de la síntesis de vitelo y por tanto de recibir y sintetizar las moléculas que lo conforman (Di Cosmo *et al.* 2002). Se destacan el ácido Araquidónico (ARA) el ácido Ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Al igual que en vertebrados se sugiere que el EPA y el DHA son sintetizados por las células foliculares a partir de los ácidos linolénico y linoleico adquiridos por las hembras directamente de la dieta. Los amino ácidos son transportados como péptidos y AA libres hasta el ovario. Entre todos los AA se destacan la Hys, Ile, Leu y Lys.

Cuando la hembra ingiere el alimento, el quimo formado en el tracto digestivo, es llevado hacia el hepatopáncreas, donde se lleva a cabo la digestión intracelular. Aunque no se sabe si los ácidos grasos de cadena larga como los ácidos linolenico y linoleico son digeridos o no, por la baja actividad registrada en la actividad de las lipasas en cefalópodos, es de suponer que éstos pudieran no ser digeridos siendo traspasados a la hemolinfa en su estado original. De acuerdo con (Heras and Pollero 1990) los acilglicéridos, ácidos grasos libres, alcoholes, colesterol y fosfolípidos provenientes de la digestión son transportados por 3 tipos de lipoproteínas que junto con la hemocianina forman parte del sistema de transporte de lípidos en los pulpos (Heras and Pollero 1992). Así los lípidos son transportados desde el hepatopancreas hasta el ovario y otros tejidos donde son utilizados tanto como fuente de energía como para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (Fig. 15). Una vez en el ovario los ácidos grasos y los aminoácidos son llevados directamente al celoma reproductivo en donde se encuentran los ovocitos en formación. Teniendo en cuenta que son las celulares foliculares las responsables de la síntesis de vitelo en cefalópodos (Di Cosmo *et al.* 2002) es fácil imaginar que los nutrientes provenientes de la digestión de alimento son llevados directamente a las células foliculares las cuales tienen la capacidad para llevar a cabo las funciones de síntesis y el uso de esos nutrientes para la formación del embrión. Los aminoácidos de la dieta, además de su papel como fuente de moléculas para la síntesis de un sinnúmero de moléculas (entre éstas la vitelogenina) ya en el vitelo participan como fuentes de energía y moléculas para el desarrollo del embrión. Por su parte los ácidos grasos, junto con los aminoácidos son canalizados para la síntesis de vitelo, interviniendo en el metabolismo intermediario y en la producción de energía. El ácido araquidónico (ARA), además es indispensable en la formación del sistema nervioso del embrión, es precursor del EPA y DHA, y a su vez es precursor de los ecosainodes, los cuales funcionan como mediadores para el sistema nervioso central. Es interesante hacer notar que en el desarrollo embrionario las moléculas involucradas en síntesis del sistema nervioso adquieren particular importancia. Los niveles de DHA y EPA y al parecer todos los mecanismos para su abasto están dirigidos para que, durante el desarrollo embrionario, las estructuras ligadas al complejo nervioso se desarrollen apropiadamente. Esto explica porque en los embriones una de las primeras estructuras

en aparecer son los ojos, los cuales, ligados al cerebro, tienen origen ectodérmico (Budelmann *et al.* 1997). El aporte de los ácidos grasos poliinsaturados en el desarrollo de los embriones quedó en evidencia en el presente estudio. Las dietas mixtas promovieron embriones más resistentes al ayuno, hecho que sin duda permite valorar los beneficios en la composición de esas mezclas. La relación EPA y DHA observada en el vitelo producido con las dietas mixtas fue mayor a 1, mientras que en la monodieta (jaiba) fue menor a 1, lo que podría explicar las diferencias observadas en las características morfométricas de los embriones producidos con las dietas experimentales así como en la sobrevivencia observada. En este contexto, con los resultados obtenidos ahora es posible concluir que dietas mixtas en las que la carne de jaiba participa en un 70% y es complementada con ingredientes que contienen niveles elevados de ácido palmítico, lonoleico o linolénico podrían ser buenos candidatos para la formulación de dietas completas que favorezcan la producción de embriones de alta calidad para el cultivo.

II CONCLUSIONES GENERALES

1. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la forma en que las hembras utilizan los nutrientes del alimento para la reproducción depende directamente de la composición de los ingredientes que lo componen.
2. Si bien las dietas utilizadas ahora permiten la madurez y la producción de huevos de *O. maya*, las dietas mixtas produjeron juveniles con una mayor calidad, establecida ésta a partir de la sobrevivencia de los organismos después de un periodo de 10 días.
3. Las diferencias en de calidad de los juveniles están relacionadas con las diferencias en que las dietas mixtas provocan en el desarrollo embrionario. Los embriones cuyas madres fueron alimentadas con dietas mixtas mostraron que el crecimiento en esa etapa esta relacionado con el nivel de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) contenidos en el vitelo. Aunque todos los alimentos aquí utilizados fueron considerados de alta calidad la proporción de ácidos grasos de la serie 18n al parecer es la que favorece una mayor concentración de AGPI en el vitelo, particularmente de DHA y el EPA, los cuales presentaron una relación DHA/EPA mayor de 1 en los vitelos de los embriones procedentes de hembras alimentadas con dietas mixtas.
4. La inclusión de ácidos grasos de la serie 18n en particular del ácido linoleico y linolénico podrían ser la clave para la formulación de dietas para la reproducción de *O. maya*.

III REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abugoch J. L., Guarda, A., Pérez, L., y Paredes, M. P. 1999. Determinación de la composición- químico proximal y la formulación de un producto tipo gel jibia (*Dosidicus gigas*). Archivos latinoamericanos de nutrición. Vol.49. N°2.
- Aguila, J.,Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P., Gaxiola , G., Maldonado, T. y Carlos Rosas. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. Aquaculture 273, 641–655.
- Almansa, E., Pérez, M.J., Cejas, J.R., Badía, P., Villamandos, J.R., Lorenzo, A., 1999. Influence of broodstock Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season. Aquaculture 170, 323-336.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. International 17 th Ed., AOAC International. Gaithersburg, MD., USA, Official Method.
- Baesa-Rojano E, Domingues P, Capella S, Noreña-Barroso E, Caamal-Monsreal C, Rosas C (2012) Marine gammarids (Crustacea: Amphipoda): a new live prey to culture *Octopus maya* hatchlings. Aquaculture Research Volume 44,: 1602–1612
- Bell, J.G., Farndale, B.M., Bruce, M.P., Navas, J.M., Carrillo, M., 1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 149, 107-119.
- Boletzky Sv 2003. Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Adv Mar Biol* 44:143-203.
- Boletzky S. & Hanlon R.T. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod mollusks. *Mem. Nat. Mus. Vic.* 44, 147- 187.

- Books, S., C.R. Tyler y J.P. Sumpeter. 1997. Eggs quality in fish: What makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7:387-416.
- Boyle, P.R. (1983). Cephalopod life cycles. *Comparative Reviews*. Vol. II, Academic Press Inc., London. 441 p.
- Budelmann BU, Schipp R, Boletzky SV (1997) Cephalopoda Microscopic anatomy of invertebrates. Wiley-Liss, pp 119-414.
- Blanchier, B., Boucaud-Camou, E., 1984. Lipids in the digestive gland and the gonad of immature and mature *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Biology* 80, 39-43.
- Blanchier, B., Boucaud-Camou, E., Silberzahn, P., 1986. Comparative study of the sterol composition of the digestive gland and the gonad of *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Parte B* 83, 599-602.
- Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J., Farndale, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Bromage, N., 1999. Development of broodstock diets for the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture* 177, 85-97.
- Caamal M. C. P. 2007. Efecto del tipo de alimento sobre el desove y eclosión del pulpo (*Octopus maya*), en condiciones controladas. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. Instituto Tecnológico de Conkal. 50 pp.
- Cabrera, J.L. & Defeo, O. 2001. Daily bioeconomical analisis in a multispecific artisanal fishery in Yucatán, México. *Aquatic living Resources* 14, 19-28.
- Cagnetta, P. and A. Sublimi. 2000. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. *Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification*. CIHEAM, Cah. Options Mediterr. 47, 331-336.

- Carrasco, J.F., Arronte, J.C., Rodríguez, C., 2006. Paralarval rearing of the common octopus, *Octopus vulgaris* (Cuvier). *Aquaculture Research* 37, 1601-1605.
- Carrillo, M., S. Zanuy, f., J. cerda, e. mañanos, N. Bromage, J. Ramos y O. Kah. 1995. Nutritional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Netherlands Journal of Zoology*, 45 (1-2):204-209.
- Castro-González, M., Ojeda, A., Silencio, J. L. 2004. Perfil lipídico de 25 pescados marinos mexicanos con especial énfasis en sus ácidos grasos n-3 como componentes nutraceuticos. *ALAN*. [online]. Sep. 2004, Vol. 54, N. 3
- Cejas, J.R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Samper, M., Lorenzo, A., 2004a. Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodus sargus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte B* 138, 91-102.
- Celik Mehmet, Tureli C., çelik, M., Yanar, Y., Erdem, Ü., Küçükgülmez. 2004. Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) I the north eastern Mediterranean. *Food Chemistry* 88, 271-273.
- D'Aniello A, Nardi G, De Santis A, Vetere A, Di Cosmo A, Merchelli R, Dossena A-, Fisher G (1995) Free L-amino acids and D-aspartate content in the nervous system of Cephalopoda. A comparative study. *Comp Biochem Physiol Part B* 112: 661-666
- DeRusha R.H., Forsythe J.W., DiMarco F.P. & Hanlon R.T. 1989. Alternative diets for maintaining and rearing cephalopods in captivity. *J. Lab. Anim. Sci.* 39, 306-312.
- De Sio F (2011) Leviathan and the Soft Animal: Medical Humanism and the Invertebrate Models for Higher Nervous Functions, 1950s–90s. *Medical History* 55
- Di Cosmo A, Di Cristo C, Paolucci M (2002) A estradiol-17B receptor in the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris*: characterization and immunolocalization. *MolReprodDev* 61: 367-375.

- Domingues, P.M. (1999). Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. thesis. University of the Algarve, Portugal. 95 p.
- Domingues, P.M., T., Sykes, A. y Andrade, J.P. (2002). The effects of temperature in the life cycle of two consecutive generations of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), cultured in the Algarve (South Portugal). *Aquaculture International*. 10:207-220.
- Estefanell J, Socorro J, Roo FJ, Guirao R, Fernández-Palacios H, Izquierdo M (2010) Gonad maturation in *Octopus vulgaris* during ongrowing, under different conditions of sex ratio. *ICES J Mar sci* 67: 1487-1493.
- Estefanell J, Socorro J, Tuya F, Izquierdo M, Roo FJ (2011) Growth, protein retention and biochemical composition in *Octopus vulgaris* fed on different diets based on crustaceans and aquaculture by-products. *Aquaculture* 322-323: 91-98.
- Estefanell J, Roo J, Guirao R, Afonso JM, Fernández-Palacios H, Izquierdo M, Socorro J (2013) Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) fed fresh and agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and low price trash species. *Aquaculture Research* 44: 93-105.
- FAO, (2012). Food and Agriculture organization of the United Nations. Species fact sheets. Fisheries and Aquaculture Department. Consultado 20/11/12. En: <http://www.fao.org /fishery/species/3571/en>.
- Farías A, Navarro JC, Cerna V, Pino S, Uriarte I (2011) Effect of broodstock diet on the fecundity and biochemical composition of eggs of the Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus* Gould 1852). *Ciencias Marinas* 37: 11-21.
- Fenucci, L. y Harán, N. S. 2006. Acción de los lípidos en crustáceos penaeoideos. Subprograma II: Acuicultura red temática II.C. Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamerica. Rosas, c. Carrillo, O., Wilson, R., y Andreatta. 152-174 pp.

- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Montero, D., 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 148, 233-246.
- Fernandez-Palacios, H., Izquierdo S. y Robaina L. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. Informe técnico. Instituto canario de ciencias marinas. Número 12.
- Furuita, H., Yamamoto, T., Shima, T., Suzuki, N., Takeuchi, T., 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 220, 725-735.
- Fluckiger M, Jackson GD, Nichols P, Virtue P, Daw A, Wotherspoon S (2008) An experimental study of the effect of diet on the fatty acid profiles of the European Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Mar Biol* 154: 363-372.
- Fraga, F. 1956. Variación estacional de la composición química del mejillón (*Mytilus edulis*). *Investigación pesquera*. Tomo IV. Pp. 109-125.
- García García, B., Aguado Giménez, F., 2002. Influence of diet on ongrowing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211, 171-182.
- García, G. B., y Cerezo V. J. 2005. Optimal proportions of craps and fish in diet for common Octopus (*Octopus vulgaris*) ongrowing. *Acuaculture* 253: 502-511.
- García-García, B. y Cerezo, J.V. (2006). Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on growing. *Aquaculture*. 256:502-511.
- García, S., Domingues, P., Navarro, J.C., Hachero, I., Garrido, D. y Rosas, C. (2011). Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquaculture International*. 17:174-187.

- Hanlon, R.T. y Forsythe, J.W. 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*, 33-40.
- Hanlon RT, Messenger JB (2002) Cephalopod behavior. Cambridge University Press, Cambridge.
- Harel, M., Tandler, A., Kissil, G.Wm., Applebaum, S., 1994. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. *Br. J. Nutr.* 72, 45-78.
- Heras H, Pollero RJ (1990) Occurrence of plasma lipoproteins in octopods. Partial characterization and interorgan transport of lipids. *J Exp Mar Biol Ecol* 140: 29-38.
- Heras H, Pollero RJ (1992) Hemocyanin as an apolipoprotein in the hemolymph of the cephalopod *Octopus tehuelchus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1125: 245-250.
- Hernandez Flores, A., Solis Ramirez, M., Espinoza Mendes, J.C., Aguilar, R.M. y Gil, F.R. 2001. Pulpo. In: *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México*.
- Hochachka, P.W., Hartline, P.H., Fields, J.H.A., 1976. Octapine as an end product of anaerobic glycolysis in the chambered nautilus. *Science* 195, 72-74.
- Hochachka, P.W., Mommsen, T.P., Storey, K.B., Johansen, K., French, C.J., 1983. The relationship between arginine and proline metabolism in cephalopods. *Mar.Biol.Lett.* 4, 1-21.
- Iglesias, J., Sánchez, E. y Moxica, J. (2000). Culture of octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. *Catch Options the Mediterranean*. 47:313-321.
- Iglesias, J., Otero J.J., Moxica C., Fuentes L. y Sánchez, F.J., (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarvae rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to eight months of age. *Aquaculture International*. 12:481-487.

- Iglesias, J., Sánchez F.J., Bersano J.G.F., Carrasco, J.F., Dhont J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J.L., Okumura, S., Roo, J., van der Meeren, T., Vidal, E.A.G. y Villanueva, R. (2007). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*. 266:1-15.
- INP/SAGARPA. 2004. Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de Yucatán 2003. *Reporte interno del Instituto Nacional de la Pesca*, México. 13 p.
- Izquierdo, P., Torres, G., Barboza, Y., Marquéz, E., y M. Allara. 2000. Análisis proximal, perfil de ácidos grasos, aminoácidos esenciales y contenido de minerales en doce especies de pescado de importancia comercial en Venezuela. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. Vol. 50. N°2.
- Izquierdo, M., Fernández-Palacios, H., Tacon, A., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42.
- Mangold, K., Boletzky, S., 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology* 19, 7-12.
- Mangold, K., (1983). Food, feeding and growth in cephalopods. *Memoirs of the National Museum Victoria*. 44:81-93.
- Márquez L, Quintana D, Lorenzo A, Almansa E (2013) Biometrical relationships in developing eggs and neonates of *Octopus vulgaris* in relation to parental diet. *Helgol Mar Res* In press: DOI 10.1007/s10152-10012-10335-y.
- Martinez R (2010) Bioquímica digestiva, cinética celular y fisiología energética de *Octopus maya* (Voss y Solis 1966). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Mérida.
- Martinez R, López-Ripoll E, Avila-Poveda O, Santos-Ricalde R, Mascaró M, Rosas C (2011c) Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus*

- maya*, and cytological background of digestion in juveniles. *Aquatic Biology* 11: 249-261.
- Martinez R, Santos R, Alvarez A, Cuzon G, Arena L, Mascaró M, Pascual C, Rosas C (2011a) Partial characterization of hepatopancreatic and extracellular digestive proteinases of wild and cultivated *Octopus maya* *Aquaculture International* 19: 445-457.
- Martínez R, Santos R, Mascaró M, Canseco L, Caamal-Monsreal C, Rosas C (2011b) Digestive dynamics during chyme formation of *Octopus maya* (Mollusca, Cephalopoda). *Aquaculture Research* doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02915.x
- Moguel, C., Mascaró, M., Ávila-Poveda, O., Caamal, C., Sánchez, A., Pascual, C. y Rosas, C. (2010). Morphological, physiological, and behavioural changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on digestive system. *Aquatic Biology*. 9:35-48.
- Montoya, J. Aranda, S., y C. Yamashiro. 2002. Algunos aspectos sobre el comportamiento reproductivo del pulpo, *Octopus mimus*, en cautiverio. Primer Congreso Nacional de Acuicultura. Noviembre.
- Miliou, H., Fintikaki, M., Tzitzinakis, M., Kountouris, T., Verriopoulos, G., 2006. Fatty acid composition of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. *Aquaculture* 256, 311-322.
- Naef, A. (1928). Die Cephalopoden (Embryologie). *Fauna and Flora des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte*, Berlín. 1-357 p.
- Navarro, J.C. y Villanueva, R. (2000). Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*. 183:161-177.
- O'Dor, R. K. y Wells, M. J. (1978). Reproduction versus somatic growth: hormonal control in *Octopus vulgaris*. *The Journal of Experimental Biology*. 77:15-31.

- O'Dor, R.K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M.J., Wells, J., 1984. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine Behaviour and Physiology* 11, 239-258.
- Okumura, S., Kurihara, A., Iwamoto, A., Takeuchi, T., 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*: Improved survival and growth of common octopus paralarvae. *Aquaculture* 244, 147-157.
- Olivares, A. Zuñiga, O. Castors, 6. Segura C. & Sanchez J. 1996. Bases biológicas para el manejo de mímus. Reproducción y crecimiento. *Estud. Oceanol*; 15:61:74.
- Onthank K, Cowles DL (2011) Prey selection in *Octopus rubescens*: possible roles of energy budgeting and prey nutritional composition. *Marine Biology* 158: 2795-2804.
- Petza, D., Katsanevakis, S., Verriopoulos, G., 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed *ad libitum* on a high-lipid diet. *Marine biology* 148 (4), 827-832.
- Petza, D., Katsanevakis, S., Lykouri, N., Spiliotis, V., Verriopoulos, G., 2011. Investigation of the potential effect of diet, body mass and maturity on growth and feed performance of common octopus *Octopus vulgaris*: an information theory approach. *Aquaculture Nutrition* 17, e348-e361.
- Phillips, K. L., P. Nichols and G. Jackson. 2002. Lipid and fatty acid composition of the mantle and digestive gland of four Southern Ocean squid species: implications for food-web studies. *Antarctic Science* 14(3): 212-220.
- Quintana, D., Domingues P. y García S. (2008). Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*. (208):161-164.

- Quintana, C.D. (2009). Valoración de los requerimientos nutricionales de reproductores de pulpo común (*Octopus vulgaris*). Tesis de grado Doctoral. Universidad de la Laguna. Departamento de biología animal. Canarias, España. 19-27 p.
- Rocha, F. (2003). Biología, ecología, cultivo y pesquería de cefalópodos. Curso de Doctorado: "Biología Marina y Acuicultura". Instituto de investigaciones Marinas. Universidad de Santiago Compostela, Vigo y La Coruña, España. 207 p.
- Rodríguez, C., Carrasco, J.F., Arronte, J.C. y Rodríguez, M. (2006). Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile on growing in floating cages. *Aquaculture* 254:293-300.
- Rosa R, Costa PR, Nunes L (2004) Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of *Octopus vulgaris* and *O. defilippi* (Mollusca: Cephalopoda). *MarBiol* 145: 563-574.
- Rosa R, Costa PR, Bandarra N, Nunes AJP (2005a) Changes in Tissue Biochemical Composition and Energy Reserves Associated With Sexual Maturation in the Ommastrephid Squids *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae* *BiolBull* 208: 100-113.
- Rosas, C., Caamal-Monsreal C., Águila, J. Ponce, M y Mena, R. 2009. Manual preliminar de cultivo de pulpo *Octopus maya* desde la producción de crías hasta la cosecha de animales de 30 g. Informe Anual. SAGARPA-CONAPESCA. pp 33.
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sanchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P. y Cuzon G. 2008. Effect of type of binde ron growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Acuaculture* 275, 291-297.
- Rosas, R., Z. 2007. Caracterización parcial de sólidos solubles presentes en el agua de cocción del musculo de calamar gigante (*Dosidiscus gigas*). Tesis Profesional para obtener el titulo de Ingeniero Bioquímico. Instituto Tecnológico los Mochis, Sinaloa. 78 pp.

- Rosas C, Valero A, Caamal-Monsreal C, Uriarte I, Farias A, Gallardo P, Sánchez A, Domingues P. (2013) Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research* 44: 1029–1044.
- Rosas C, Gallardo P, Mascaró M, Caamal-Monsreal C, Pascual C (2014) *Octopus maya*. In: Iglesias J, *et al.* (eds) *Cephalopod Culture*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp DOI 10.1007/1978-1094-1017-8648-1005_1020.
- SAGARPA. (2011). Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Plan de Manejo Pesquero de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) del Golfo de México y Mar Caribe. Documento interno, Tercero Edición. 48 p.
- Santé-Lhoutellier V, Astruct T, Marinova P, Greve E, Gatellier P (2008). Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *JAgricFoodChem* 56: 1488-1494.
- Sargent, J. R. 1976. The structure, metabolism and function of lipids in marine organisms. En D.C. Malins y J.R. Sargent. *Biochem and Biophys. I marine Biology*, 3: 149-212.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Origin and functions of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. En: Cevc, G., Paltauf, F. (Eds.), *Phospholipids: Characterisation, Metabolism and Novel Biological Applications*. American Oil Chemist Society Press, Champaign, III, USA, pp. 248-258.
- Sargent, J.R., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D.R., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217-229.
- Schweid R (2014) *Octopus*. Reaktion Books, LTD, London.

- Seixas, P. (2009). Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), alimentadas con juveniles de *Artemia* enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales. Tesis de Doctorado. Universidad Santiago Compostela, España. 288p.
- SEMARNAP. 1999. Anuario Estadístico de Pesca 1998. Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Gobierno Federal. México.
- Semmens, J.M., Pecl, G.T., Villanueva, R., Jouffre, D., Sobrino, I., Wood, J.B. y Rigbi, P.R. (2004). Understanding octopus growth: Patterns, variability and physiology. *Marine and Freshwater Research*. 55:367-377.
- Solis, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis. *Inst. Nacional Investig. Biol. Pesqueras* (México), Publicación Num. 18, 90 p.
- Solorzano, Y., Viana, M. T., López Luz, Correa, J. True, C. y Carlos Rosas. 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: Growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. *Aquaculture* 289, 84-90.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1978. Energy metabolism in the mantle muscle of the squid *Loligo pealeii*. *J.Comp.Physiol.* 123, 169-175.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in fish biology and fisheries* 6, 287-318.
- Tirado, C., Rodríguez de la Rúa, A., 2003. Estudio de ciclo reproductor y el crecimiento de moluscos bivalvos y cefalópodos del litoral andaluz. *Conserjería de Agricultura y Pesca* (Eds.), Sevilla, 360 pp.
- Uriarte I, Espinoza V, Gutiérrez R, Zúñiga O, Olivares A, Rosas C, Pino S, Farías A (2014) Key aspects of egg incubation in Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus*) for cultivation purposes. *Aquaculture* 424-425: 158 – 166.

- Uriarte I, Espinoza V, Herrera M, Zuñiga O, Olivares A, Carbonell P, Pino S, Farias A, Rosas C (2012) Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *JExpMarBiolEcol* 416-417: 168-175.
- Uriarte I, Farías A, Paschke K, Navarro JC, Rosas C (2011) Observations on feeding and biochemical characteristics to improve larviculture of *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae). *Aquaculture* 315: 121-124.
- Uriarte I, Hernández J, Dörner J, Paschke K, Farías A, Crovetto E, Rosas C (2010) Rearing and growth of the octopus *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae) from planktonic hatchlings to benthic juveniles. *Biol Bull* 218: 200-210.
- Uriarte I, Zuñiga O, Olivares A, Espinoza V, Cerna V, Farías A, Rosas C (2009) Morphometric changes and growth rate during embryonic development of *Robsonella fontaniana*. *Vie et Millieu* 59: 315-323.
- Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Ph. D. thesis, Univ. Hawaii, 224 p.
- Van Heukelem, W.F. 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Lab. Anim. Sci.* 27, 852-859.
- Van Heukelem, W.F. 1983. *Octopus maya* In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Vol. I. Academic Press, London, pp: 311-323.
- Vidal, E., DiMarco, F.P., Wormuth, J.H., Lee, P.G., 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bull.mar.Sci.* 71, 915-931.
- Villanueva, R., 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciencie.* 52: 2639-2650.

Villanueva R, Norman MD (2008) Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *OceanogrMarBiolAnnRev* 46: 105-202.

Villanueva, R., Riba, J., Ruíz-Capillas C., González, A.V. y Baeta, M. (2004). Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarve. *Aquaculture* (242):455-478.

Watanabe, T., Arakawa, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1984. Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of Red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50, 495-501.

Watanabe, T., Vasallo-Agius, R., 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture* 227 (1-4), 35-61.

Wells, M.J. (1978). *Octopus. Physiology and behaviour of an advanced invertebrate.* Chapman and Hall, London. 417 p.

Wenge B, Bönisch H (2013) The role of Cysteines and Histidines of the norepinephrine transporter. *Neurochem Res* 38: 1303-1314.

Young, J.Z., 1951. Growth and plasticity in the nervous system. *Proceedings of the Royal Society, Series B*, 18-37.

IV ARTICULO SOMETIDO PARA SU PUBLICACIÓN

El artículo enviado lleva por Título: Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchlings quality.

Elsevier Editorial System(tm) for Aquaculture
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchlings quality

Article Type: Research Paper

Keywords: Diet, embryo characteristics, *Octopus maya*, reproduction, yolk characteristics

Corresponding Author: Dr. Carlos Rosas, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, UNAM

First Author: Claudia Caamal-Monsreal, MC

Order of Authors: Claudia Caamal-Monsreal, MC; Maite Mascaró, Dr.; Pedro Gallardo, Dr.; Sergio Rodríguez, Dr.; Elsa Noreña-Barroso, Dr.; Pedro Domingues, Dr.; Carlos Rosas, Ph.D.

Abstract: This study examined the effects of mixed diets (with the crab *Callinectes* spp. as the main component of the diet) on embryonic development and hatchling quality of *O. maya*. Several *O. maya* females were fed one of 4 different diets being 1) crab, 2) crab and squid, 3) crab and mussel and 4) crab and fish heads, in a 7:3 ratio. The effects of each diet on the reproductive performance was evaluated by quantifying the total number of eggs female⁻¹, eggs clutch⁻¹, hatchlings female⁻¹, hatchling weight and hatchling quality, measured as the hatchlings survival after 10 d of fasting. In addition, the chemical characteristics of the diet were studied through determination of proximal analysis, amino acids and fatty acids profiles, its relation to the chemical characteristics of the yolk and the morphological characteristics of embryos. Results indicate that mixed diets promoted embryos with a combination of nutrients that promoted a better performance, compared to those from females fed crab exclusively. Mixed diets used in the present study could have the nutritional components to satisfy nutritional requirements for reproduction in this octopus species.

Suggested Reviewers: Eduardo Almansa Dr
Researcher, Instituto Oceanográfico Español de Tenerife
eduardo.almansa@ca.ieo.es

Dr. Eduardo Almansa have many papers related with effect of diets (mainly lipids) on nutritional characteristics of octopus broodstocks and their embryos

Juan Carlos Navarro Dr
Researcher, Instituto de Acuicultura Torres de la Sal
jcnavarro@iats.csic.es

Professor Navarro have many papers related with fatty acids in octopus embryos and hatchlings. Is an specialist in this area of knowledge

Jayson Semmens Dr
Researcher, University of Tasmania
jayson.semmens@utas.edu.au

Professor Semmens have many experience and papers published in reproduction of cephalopodos

Alberto Jorge Nunes Dr
Researcher, Instituto de Ciencias do Mar, Universidade Federal do Ceará
alberto@labomar.ufc.br
Professor Nunes is one of the most recognized nutritionist of invertebrates in America

Opposed Reviewers: Jesus Cerezo-Valverde Dr
Researcher, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
jesus.cerezo@carm.es
In recent years Dr. Cerezo has reviewed some of our papers expressing conflicts related to octopus culture and nutrition

Benjamin Garcia Dr
Researcher, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
benjamin.garcia@carm.es
In recent years Dr. García-García has reviewed some of our papers expressing conflicts related to octopus culture and nutrition

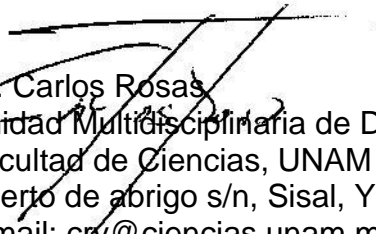
Sisal, Yucatán, México, September 19, 2014



Dr. Delbert Gatlin
Editor Nutrition Section
Aquaculture

I am sending the manuscript entitled "Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchlings quality" to be considered in Aquaculture.

Thank you very much in advance



Dr. Carlos Rosas
Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación
Facultad de Ciencias, UNAM
Puerto de abrigo s/n, Sisal, Yucatán, México
e-mail: crv@ciencias.unam.mx

Highlights

1. We provide information about optimal diets for *Octopus maya* reproduction
2. Mixed diets delivered better results compared to a mono-diet.
3. Crab and mussels mix diet increased hatchling quality.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its**
2 **consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of**
3 **embryos and hatchlings quality**

4
5 **Claudia Caamal-Monsreal¹, Maite Mascaró¹, Pedro Gallardo¹, Sergio**
6 **Rodríguez², Elsa Noreña-Barroso², Pedro Domingues³ and Carlos Rosas¹**

7
8 1. Unidad Muldisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias,
9 Universidad Nacional Autónoma de México. Puerto de abrigo s/n, Sisal, Yucatán,
10 México

11
12 2. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de
13 Química-Sisal, Puerto de Abrigo s/n, Sisal, Yucatán, México

14
15 3. Instituto Oceanográfico Español. Vigo, España

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

18 Abstract

19

20 This study examined the effects of mixed diets (with the crab *Callinectes* spp. as
21 the main component of the diet) on embryonic development and hatchling quality
22 of *O. maya*. Several *O. maya* females were fed one of 4 different diets being 1)
23 crab, 2) crab and squid, 3) crab and mussel and 4) crab and fish heads, in a 7:3
24 ratio. The effects of each diet on the reproductive performance was evaluated by
25 quantifying the total number of eggs female⁻¹, eggs clutch⁻¹, hatchlings female⁻¹,
26 hatchling weight and hatchling quality, measured as the hatchlings survival after 10
27 d of fasting. In addition, the chemical characteristics of the diet were studied
28 through determination of proximal analysis, amino acids and fatty acids profiles, its
29 relation to the chemical characteristics of the yolk and the morphological
30 characteristics of embryos. Results indicate that mixed diets promoted embryos
31 with a combination of nutrients that promoted a better performance, compared to
32 those from females fed crab exclusively. Mixed diets used in the present study
33 could have the nutritional components to satisfy nutritional requirements for
34 reproduction in this octopus species.

35

36 **Key words:** Diet; embryo characteristics, *Octopus maya*, reproduction, yolk
37 characteristics.

1
2
3
4 38 1. Introduction

5
6 39 Since yolk synthesis depends on octopus female metabolism (Rosa *et al.*,
7
8 40 2004), maternal diet can be seen as an important factor determining egg size,
9
10 41 embryonic development and hatchling characteristics. Ultimately, maternal diet
11
12 42 determines the success of the next generation via hatchling performance
13
14 43 (Quintana *et al.*, 2011). Due to its implications in animal production, information on
15
16 44 how these characteristics are determined is a key aspect for both aquaculture
17
18 45 technology (Cerezo-Valverde *et al.*, 2012b, Cerezo-Valverde *et al.*, 2013) and the
19
20 46 ecology of these aquatic species (Quetglas *et al.*, 2011), most of which contribute
21
22 47 to fisheries around the world. Despite the importance of octopus species, there
23
24 48 have been few studies evaluating the effects of female diet on spawns, embryos
25
26 49 and hatchlings either from a morphological or a biochemical point of view. Márquez
27
28 50 *et al.*, (2013) showed that egg length and initial wet weight in *O. vulgaris* had a high
29
30 51 correlation with neonate dry weight, and females fed on squid produced larger
31
32 52 paralarvae than those fed on crabs or sardine. In another study, Farias *et al.*
33
34 53 (2011) observed that female *Enteroctopus megalocyathus* fed on fish and fish-crab
35
36 54 mixed diets at 10% of female body weight spawned more eggs than those fed only
37
38 55 fish at 7.5% body weight. Based on the analysis of fatty acids in unfertilized eggs,
39
40 56 Farías *et al.*, (2011) suggested that the main factor affecting the biochemical
41
42 57 composition of yolk was dietary ration more than the type of diet. Contrary,
43
44 58 Estefanell *et al.*, (2010) showed that sexual maturation of both male and female
45
46 59 *Octopus vulgaris* was not influenced by diet (fish-crab mix vs only fish) when adults
47
48 60 were sexually mature or in a post-reproductive stage.

49
50 61 According to (Villanueva *et al.*, 2014), *O. maya* is one of the most promising
51
52 62 octopus species in aquaculture diversification, owing this to the holobenthic
53
54 63 hatchlings that become real benthic juveniles as early as 7-10 days after hatching
55
56 64 (Moguel *et al.*, 2010). In the short history of *O. maya* culture, there have been new
57
58 65 outdoor tanks designed (Domingues *et al.*, 2012), and more recently a successful
59
60 66 diet that allows to obtain animals with 250g for the gourmet market (Martinez *et al.*,
61
62 67 2014). At the beginning of the programme, when only wild females where used for
63
64 68 hatchling production, animals were fed frozen crabs (*Callinectes* spp; 70%) and
65

1
2
3
4 69 mussels (*Mytilus* spp; 30%) at 15% BW ration (Uriarte *et al.*, 2011). However,
5
6 70 because the programme expected to use these diets in sites where the
7
8 71 components could be expensive and/or scarce, it became necessary to test other
9
10 72 potential preys that could be used to feed octopus breeders. In the semi-pilot scale
11
12 73 facilities at UNAM (Universidad Nacional Autonoma de Mexico) in Sisal, Yucatan,
13
14 74 *O. maya* females spawn a mean of 800 + 200 eggs spawn⁻¹, with 95% of those
15
16 75 fertilized eggs hatching 40 – 50 days after. Hatchlings weight on average 0.146 +
17
18 76 0.02 g (Rosas *et al.*, 2014), and 95% of them survive after 10 d of fasting. These
19
20 77 results indicate that hatchlings have enough reserves in the internal yolk that will
21
22 78 last while the digestive gland finishes development and the digestive enzymes are
23
24 79 ready to process external food (Moguel *et al.*, 2010). At these semi-pilot production
25
26 80 levels such animals are considered to be high quality hatchlings.

26 81 Before choosing a dietary component it is necessary to know its biochemical
27
28 82 characteristics and the way in which nutritional molecules are later derived to the
29
30 83 yolk, embryo and hatchlings. According to Cerezo-Valverde *et al.* (2012) total lipid
31
32 84 and lipid classes are key factors in formulating octopus diets. After analysis of 39
33
34 85 groups/species candidates for formulated octopus diets, these authors found that
35
36 86 groups/species with higher lipid levels than those of *O. vulgaris* were not suitable,
37
38 87 given the limited capacity of octopuses to digest lipids and the potential
39
40 88 interference of lipids with protein absorption. Supporting evidence of this is that a
41
42 89 zero growth rate was registered (Domingues *et al.*, 2007) *O. maya* fed an artificial
43
44 90 diet with a higher total lipid content (21.5%) than that of octopus mantle (7%).
45
46 91 Amongst lipids, long chain poly-unsaturated fatty acids (PUFA) are important for
47
48 92 both octopus adults and paralarvae (Navarro and Villanueva (2003). Rosa *et al.*,
49
50 93 (2004) showed that gonads of *O. vulgaris* and *O. defilippi* were mainly constituted
51
52 94 by PUFA and highly-unsaturated fatty acids (HUFA) from n-3 series (particularly
53
54 95 DHA and EPA). Navarro and Villanueva (2000; 2003) indicate that DHA plays an
55
56 96 important role in maintaining the structural and functional integrity of cell
57
58 97 membranes in *O. vulgaris* paralarvae. In a more recent paper, Reis *et al.*, (2014)
59
60 98 suggested that the nutritional requirements of *O. vulgaris* hatchlings in terms of FA

1
2
3
4 99 are highly specific, and long chain -PUFA must be considered essential dietary
5
6 100 nutrients.

7
8 101 In cephalopods, amino acids (AA) from muscle protein are fundamental in
9
10 102 the formation of yolk protein (O'Dor and Wellls, 1978). The formation of egg yolk in
11
12 103 mature females increases the leucine demand as octopus loose muscle. When 42
13
14 104 different groups/species were analyzed and the nutritional score calculated
15
16 105 (Cerezo-Valverde *et al.*, 2012a), Leucine was also identified as an important amino
17
18 106 acid for growth in *O. vulgaris*. In *O. maya* juveniles, Thr, Phe, Ile, Ala, Glu and Ser
19
20 107 were preferentially used as a source of energy when animals were exposed to a 10
21
22 108 days fasting period. This suggests that those AA could be used during periods of
23
24 109 maternal care or with ecological constrains on food (George-Zamora *et al.*, 2011).

25
26 110 In an attempt to satisfy the nutritional requirements for the reproduction of
27
28 111 octopus species, researchers have tested different prey species (Marquez *et al.*,
29
30 112 2013; Estefanell *et al.*, 2010; Farias *et al.*, 2011). Whist most of these studies have
31
32 113 showed that female diet influences both embryo and hatchling characteristics,
33
34 114 none have included further evaluations of the size and nature of such effects.
35
36 115 These aspects, however, are central for the design of adequate diets leading to an
37
38 116 improvement in octopus culture technology. There are many evidences showing
39
40 117 that marine crabs could be the most complete diet for cephalopods. However, the
41
42 118 theoretical nutritional requirements in octopus proposed by (Cerezo-Valverde *et al.*,
43
44 119 2013, Cerezo-Valverde *et al.*, 2012a) suggest that crab diets could be improved if
45
46 120 other ingredients are mixed with crab. The present study was designed to examine
47
48 121 the effect of mixed diets (where crab is the main component) on embryonic
49
50 122 development and hatchling quality of *O. maya*. The effects of the type of diet on the
51
52 123 reproductive performance of females quantified through the total number of eggs
53
54 124 female⁻¹, eggs clutch⁻¹, hatchlings female⁻¹, hatchling weight and hatchling quality
55
56 125 were accessed. Hatchling quality was measured by octopus survival after 10 d of
57
58 126 fasting. In addition, the chemical characteristics of the diet were studied by
59
60 127 determination of proximal analysis, amino acids and fatty acids profiles, and its
61
62 128 relation to both the chemical characteristics of the yolk and the morphological
63
64 129 characteristics of the embryos.
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

130 2. Materials and methods

131 2.1. Origin of experimental animals

132 Sixty males and 60 females *O. maya* were captured using artisanal fishery lines
133 and crabs as live bait, off the harbour at Sisal (Yucatán, Mexico). Octopuses were
134 transported in a 120 l circular tank with sea water to the laboratory situated 300 m
135 inland. Octopuses were then placed in 3 outdoor tanks (5m diameter) in a 1:1 sex
136 proportion, with aerated sea water for 15 days prior to the experiment, in order to
137 ensure copula had occurred and females had been inseminated. Three pieces of
138 PVC tubes (50 mm in diameter) per octopus were placed inside the tanks to
139 provide octopuses with sufficient refuge. Tanks were connected to a flow through
140 sea water system to maintain oxygen levels above 5 mg/L, pH > 8, temperature at
141 28 + 2°C, and salinity at 32 UPS. During the 15 day acclimation period octopuses
142 were fed with one crab (100 + 20g; *Callinectes* spp.) per individual per day.

143 – Following acclimation, females were weighed and brought to the spawning
144 area where they were placed individually in dark 200L tanks with continuously
145 aerated, filtered (5µm) and UV sterilized sea water at 24°C temperature. A red light
146 (30 lux cm⁻²) was used to maintain a 10:14 h light-dark photoperiod. A rectangular
147 glass fibre box was offered to each female as a spawning den (Rosas *et al.*, 2014).
148 Female *O. maya* remained 30-45 d until spawning had occurred. During this time,
149 the remaining food was cleaned on a daily basis by gently siphoning the tanks
150 (08:00h). Physical and chemical water parameters were then measured and the
151 refuges checked to detect any spawning females.

152

153 2.2 Experimental design

154 Four dietary treatments were established: 1) 100% crab (*Callinectes* spp.,
155 Cr), 2) 70-30% crab-green mussel (*Perna canaliculus*, Cr-Mu), 3) 70-30% crab-fish
156 head (*Epinephelus morio*, Cr-Fi), and 4) 70-30% crab-squid mantle (*Dosidicus*
157 *gigas*; Cr-Sq). Fifteen females (initial wet weight of 926 + 61 g; p>0.05) were
158 randomly assigned to each diet, and were fed at 09:00 and 18:00h on a daily basis
159 during the conditioning period. The initial ration was set at 10 % of the female

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

160 biomass, but was adjusted depending on individual consumption given that
161 females reduce food consumption as they approach spawning.

162

163 2.3. Female ingestion rate (IR)

164 Ingestion rate during the conditioning period was evaluated taking into
165 consideration the quantities of organic matter eaten by octopus from each diet as:

166

$$167 \text{ IR (\% day}^{-1}\text{)} = [(DF - RF)/BW] \times 100$$

168

169 where DF is delivered food (g of organic matter: OM), RF is the remaining food (g
170 OM) and BW is female body weight (g OM). In order to estimate the amount of real
171 flesh ingested by female, the remaining organic matter of each food type was
172 evaluated. Remaining food was dried for 48h at 110°C until constant weight, and
173 then incinerated in a muffle furnace at 500°C by h. Organic matter in remaining
174 food was calculated as the difference between dry weight and the ashes left after
175 incineration. The organic matter of the food offered, as well as of the female
176 mantle, was quantified in 10 samples in each experimental diet and 15 samples of
177 20g ww of mantle processed in the same form that remaining food.

178

179 2.4. Zoo-technical evaluations

180 The reproductive performance of female *O. maya* was assessed once
181 females had finished spawning, which occurred in a period between 5 to 7 days.
182 The total number of eggs females⁻¹ was quantified by counting the number of eggs
183 in five clutches from every female. The mean value of eggs clutch⁻¹ was then
184 multiplied by the number of clutches per spawn to estimate the total number of
185 eggs female⁻¹.

186 The complete spawn was artificially incubated for 50 d in a filtered and UV
187 sterilized sea water system maintained at 24 ± 1°C (Rosas *et al.*, 2014). Hatchlings
188 were counted and samples of 50 octopuses (1 day old) per female and diet
189 treatment were weighed. Hatchlings were blotted with a paper towel and weighed
190 in an electronic semi-micro balance (± 0.0001g). Hatching production (%) was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

191 calculated as the proportion between fertilized eggs and hatched embryos. These
192 values were corrected considering those eggs and embryos that were removed for
193 sampling throughout the incubation time when evaluating biochemical and
194 morphological characteristics. In order to evaluate hatchling quality, one day old
195 individuals (n=20) from each female in each dietary treatment were individually
196 placed in a 1 inch PVC T-shaped piece covered with mesh on both sides. These
197 20 pieces, each with one hatchling were placed in a 40-L tank connected to a flow-
198 through aerated, seawater system connected to a protein skimmer and an
199 anthracite earth filter. Fifty per cent of the seawater in the flow-through system was
200 renewed daily. Seawater in the experimental containers was maintained at 5.0
201 mg/L of dissolved oxygen, pH > 8, 24±1°C temperature, and 38 UPS salinity.
202 Hatchlings remained in the PVC T-shaped piece for a fasting period of 10 days,
203 after which octopus survival was registered.

204
205 2.5 Chemical analysis of the diets and egg yolk

206 Proximal analysis of the diets (n = 5 samples per diet) were performed on
207 only the edible part of the dietary ingredient in each diet (i.e. crab, mussel, fish and
208 squid). The fresh flesh of each dietary component was dried (110°C to constant
209 weight), and ground in a laboratory mill (Thomas Willey Mod. 4, USA) until particles
210 of 0.5 mm in diameter were obtained. The humidity, total proteins, total lipids, and
211 ash contents were determined following methods established by A.O.A.C. (2000)
212 (protocols 934.01, 976.05, 920.39 and 942.05, respectively). Final proximal
213 analysis in each of the mixed diets was calculated using data obtained from the
214 analysis of each ingredient.

215 Samples from each diet (n = 3) and the egg yolk in 1 day old eggs (n = 30
216 eggs per spawn) that had been spawned by females (n = 10) fed with each diet
217 were frozen (-80°C) for fatty acid determination and then dry frozen for
218 preservation prior to analysis. To obtain the egg yolk, samples were centrifuged at
219 1600 rpm 5 min at 4°C and the egg yolk placed in liquid nitrogen to be stored at -
220 80°C until analysis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

221 Lipids were extracted with chloroform: methanol (2:1, v/v), according to the
222 Folch extraction procedure (Folch et al., 1957). Lipid extracts were saponified with
223 20% KOH:Methanol (w:v) and free fatty acids were recovered in hexane from the
224 acidified saponifiable fraction (pH = 1–2). Fatty acid methyl esters (FAMES) were
225 obtained by esterification with 10%BF₃ in methanol (Fluka, 15716) for 60 min at
226 80°C. FAMES were analyzed by capillary gas chromatography in a Perkin Elmer
227 Clarus 500 GC equipped with a Perkin Elmer Elite-WAX (30 m 9 0.25 mm 9 0.25
228 lm film thickness, crossbond–PEG) capillary column and a flame ionization
229 detector. Hydrogen was used as carrier gas with a flow rate of 40 mL min⁻¹.
230 Injector and detector temperatures were programmed to 280 and 250°C,
231 respectively. Column temperature was programmed from 40 to 200°C at 20°C
232 min⁻¹ and from 200 to 250°C at 2.5°C min⁻¹. Individual FAMES were identified by
233 comparing retention times with reference standards (Supelco 37 Comp. FAME Mix,
234 47885-U). Results were reported as percentage area.

235 The amino acid content (g AA/100 g protein) of samples (number of
236 replicates similar to those used for fatty acids) from diets and egg yolk was
237 determined. Defatted tissue samples (20 mg) were hydrolyzed with 200 µL of 6 N
238 HCl and 0.06% phenol in a closed vial and heated to 110°C for 24 h. Amino acid
239 profiles were determined following Waters AccQ-Tag™ procedure as follows:
240 (1) Hydrolyzed samples were dried in a thermic mono block at 60°C with nitrogen
241 and rehydrated with 1 mL water HPLC grade. (2) Samples were then filtered (0.45
242 µm) and maintained at -20°C until used. (3) Samples were derivatized using the
243 Waters system AccQ-Tag™. (4) Samples were chromatographed through a
244 reverse phase column (3.9×150 mm) 4 µm Nova Pak™ C-18, using the water-
245 acetonitrile gradient recommended by the Waters AccQ-Tag™ system (Milford,
246 MA, USA), in a Waters™ HPLC and a fluorescence detector (excitation and
247 emission wavelength; 250 and 395 nm, respectively). (6) Analyses were conducted
248 at a constant temperature of 39 °C. (7) HPLC signal calibration and standard
249 curves were obtained by using an amino acid standard solution at three different
250 concentrations containing from 18.75 to 150 pmol of each amino acid. Taking into

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

251 account that Met and Cys were partially destroyed by acid hydrolysis, the results of
252 both amino acids were taken with caution.

253

254 2.6. Morphological characteristics of eggs and embryos

255 Embryos samples were obtained directly from the incubator system. Six
256 eggs from each of five spawns (different female octopuses) from each treatment
257 were sampled between days 20 and 40 of embryonic development (total n = 30
258 eggs per treatment). All 120 eggs and their corresponding embryos were
259 measured and photographed using a light microscope (NIKON SMZ 280) coupled
260 to an NIKON camera. Images were captured in a resolution of 1280 x 960 pixels
261 and analyzed with Motic2000 image software using amplification of 10x.

262 Photos were used to determine: egg length (EL), embryo total length
263 (TotLeng), mantle length (MantLeng), arm length (ArmLeng) and eye diameter
264 (EyeDiam). Given the large size of *O. maya* embryos, it was necessary to extract
265 them from the eggs in order to obtain accurate body measures. To do this,
266 embryos were first anesthetized with alcohol (1%), carefully removed from the
267 eggs and placed in a petri dish to be photographed. The outer yolk sac volume was
268 estimated by superimposing an oval, cylindrical or spherical form depending on the
269 stage observed throughout embryonic development. Formulas used for the
270 estimation were:

271

272 Oval volume = $\frac{4}{3} \pi \times r_1 \times r_2$

273 Cylindrical volume = $\pi \times r^2 \times h$

274 Spherical volume = $\frac{4}{3} \pi \times r^3$

275

276 where r is half the diameter of the yolk sac (r_1 = width of yolk sac; r_2 = length of yolk
277 sac), h is the length of yolk sac, and π is 3.14159. Yolk volumes were multiplied by
278 a density of 1.036 mg mm^{-3} to convert them to wet weights (Vidal et al., 2002).

279

280 2.7. Statistical analysis

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

281 One way ANOVAs were used to evaluate the effect of diet on the
282 reproductive performance and ingestion rate of females during the conditioning.
283 Proximal analysis of the diets was also statistically evaluated using one ANOVA
284 analysis. Prior to analysis, an arc-sin transformation was applied on percentage
285 data and homogeneity of variances was verified by the Cochran test (Montgomery,
286 2004).

287 Yolk Fatty acid (FA) and amino acid (AA) content from 1 day old hatchlings
288 produced by females fed each of the four diets were analysed by Principal
289 Coordinate ordination (PCo). Percent content of each component was first
290 expressed as a proportion, and the Wittaker's index of association (D_g) calculated
291 as a dissimilarity measure amongst samples (Legendre & Legendre, 1998). To
292 compare samples obtained from females fed with the different diets, a
293 permutational MANOVA (Anderson 2001) was applied on the dissimilarity matrices
294 of FA and AA data. The underlying experimental design was a one-way model with
295 "diet" as the main factor (4 levels). In each case, 999 unrestricted permutations of
296 raw data were used to obtain the empirical distribution of *pseudo-F* values
297 (Anderson 2001; McArdle & Anderson 2001).

298 The FA and AA content in samples from the 5 different diets was also
299 represented in a two-dimensional configuration using a PCo procedure like the one
300 described above. This allowed a direct comparison between those variables (FA
301 and AA) that most contributed to the ordination of samples both in diets and egg
302 yolk.

303 The morphological characteristics of 40 day old embryos (MC) from females
304 fed on the different diets were analysed were also analysed by PCo. In this case,
305 Euclidean distances amongst samples were calculated before a permutational
306 MANOVA (Legendre & Legendre, 1998; Anderson 2001) was applied on the
307 dissimilarity matrices to compare embryos from different diets. Both the underlying
308 experimental designs and the permutational procedures were similar to those
309 described for previous analysis.

310

311 **3. Results**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

312 3.1 Chemical characteristics of the diets

313 Table 1 shows the proximal analysis of ingredients. Squid mantle and crab
314 had higher humidity contents than other ingredients (83 and 84%, respectively).
315 The lowest humidity content was registered in fish heads (69.5%). Crude protein
316 (CP) varied between 42 and 90%, with high values in squid mantle, and low ones
317 in fish heads. Intermediate values were recorded in mussel (60%) and crab flesh
318 (82%). A high value of total lipids (TL) was recorded in fish heads (33%) and a low
319 one in squid and crab flesh (4.1 and 4.4%, respectively). Intermediate values were
320 recorded in mussel flesh (11.3%). A high value in ash content was registered in
321 fish heads and a low in squid mantle and mussel flesh, as expected. An
322 intermediate value was recorded in crab flesh.

323 When ingredients were mixed to produce diets, values for CP fluctuated
324 between 70 and 85%, with low values in Cr-Fi diet and high ones in the Cr-Sq.
325 High TL values were obtained in the Cr-Fi diet, and low ones in the Cr-Mu and Cr-
326 Sq combinations. The ash content varied in the diets with high values in the Cr-Fi
327 diet and low ones in Cr-Mu and the Cr-Sq diets.

328
329 Fatty acids (FA)

330 Table 1 shows ingredients and diets FA composition. More than 50% of FA were
331 saturated both in all ingredients and diets analysed. Squid mantle, mussel flesh
332 and fish heads showed higher values (59%) than those in crab flesh. When
333 ingredients were mixed to produce the dietary treatments, saturated FA varied
334 between 52 and 55%. Mono-unsaturated fatty acids (MUFA) varied between 14
335 and 32%, with high values in fish heads and low ones in squid mantle. Intermediate
336 values were registered in crab and mussel flesh. When the ingredients were mixed,
337 MUFA varied between 20 and 26% with low values in the Cr-Sq diet (24%), and
338 high ones in Cr-Fi diet (26%). The lowest poly-unsaturated fatty acid (PUFA)
339 content was recorded in fish heads (8%), followed by mussel (17%), crab (23%)
340 and squid mantle (26%). When the ingredients were mixed the lowest PUFA were
341 obtained in the Cr-Fi diet (19%), followed by the Cr-Mu diet (21%). Arachidonic
342 acid (C20:4n6) was not detectable in mussel flesh and very low in fish heads

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

343 (0.05%). Squid mantle and crab flesh, however, had 0.15 and 0.11% of arachidonic
344 acid, respectively.

345 Principal coordinate analysis (Fig. 1) showed that the first two coordinates
346 explained 91.8% of the variation in the FA content of diets (57.4 and 34.4% for the
347 first and the second axis, respectively). The C22:6n3 C20:1n9 and C15:0 were the
348 FA that most contributed to the ordination in the first axis, with samples from Cr-Sq
349 having a high contribution, and those from Cr and Cr-Fi having a low contribution of
350 the first two components. Contrary, samples from Cr-Sq diet had low contents of
351 C15:0, and those from Cr and Cr-Fi diets were high in this FA. The C17:0 and
352 C21:0 were the components that most contributed (positively) in the ordination on
353 the second axis, whereas C14:2 and C22:2 contributed in opposite direction
354 (negatively). Samples from the Cr diet had relatively higher values of C17:0 and
355 C21:0, whereas samples from Cr-Mu had lower contents of these FA.

356

357 Amino acids (AA)

358 The AA composition is shown in Table 3. Of the AA analyzed, Thr was the
359 most abundant essential amino acid (EAA) while Glu was the most abundant non-
360 essential amino acid (NEAA), both in crab flesh and squid mantle. In mussel flesh,
361 the most abundant EAA was Asp, whereas Glu was the most abundant NEAA in
362 crab flesh and squid mantle. In fish heads, as in the mussel flesh, Asp was the
363 most abundant EAA, and Gly was the most concentrated NEAA. As for the mixed
364 diets, Asp was the most abundant EAA in Cr-Sq and Cr-Mu diets, while Thr was
365 the most concentrated EAA in Cr-Fi (19.7, 19.8, 19.5 and 18.5% of the total EAA,
366 respectively). Glu was the most abundant NEAA in all the diets with high values in
367 Cr, Cr-Sq, Cr-Mu and low in Cr-Fi (36.8, 37.4, 36.9 and 32.3% of the total NEAA,
368 respectively).

369 Figure 2 shows the principal coordinate analysis of the variation in AA
370 contents of the diets. The first two coordinates explained 88.7% of the variation in
371 the AA content of diets (70.5 and 18.2% for the first and the second axis,
372 respectively). Tyr, Gly and Pro were the AA that most contributed to the ordination
373 in the first axis, with samples from Cr-Sq having a high contribution, and those from

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

374 Cr, Cr-Mu and Cr-Fi having a low contribution of the Tyr. By contrast, samples from
375 these last three diets had high contents of Gly and Pro, and those from Cr-Sq were
376 low in this AA. His, Thr were the AA that most contributed (positively) in the
377 ordination on the second axis, whereas Ser contributed in opposite direction
378 (negatively). Samples from diets, however, were not clearly separated along the
379 vertical axis, indicating that these AA did not contribute markedly in the ordination
380 of samples from the different diets.

381

382 3.2 Effect of type of diet in the reproductive performance of *O. maya* females.

383 Ingestion rate of female *O. maya* was affected by the diet on which they fed.
384 Animals fed Cr-Sq showed higher ingestion rates (4.8% BW d⁻¹) than those fed Cr-
385 Mu and Cr-Fi (mean value of 3.2% BW d⁻¹), and Cr (2.4% BW d⁻¹) (Fig. 3).

386 Reproductive performance is shown in Table 4. Of the total females tested,
387 100% of spawns occurred amongst animals fed with Cr and Cr-Fi; spawns
388 occurred in 93 and 86% of females fed Cr-Sq and Cr-Mu diets (Table 4). Once
389 spawning had begun, females fed Cr spawned faster (8.8 d) than those fed Cr-Sq
390 (22.6 d), crab-mussel (27.8 d) and crab-fish heads (33.5 d). Diet, however, did not
391 affect the number of eggs per clutch, eggs per spawn and hatchlings per spawn
392 (427 ± 75), indicating a similar reproductive performance in all *O. maya* females.
393 The mean number of eggs per clutch (20 ± 1), eggs per spawn (746 ± 78) and
394 hatchlings per spawn (427 ± 75) were thus calculated for all females irrespective of
395 diet.

396 In contrast, heavier hatchlings were recorded in spawns from females fed
397 Crab, (0.13g), and the highest survival of hatchlings after a 10 day fasting period
398 was obtained in animals obtained from females fed Crab-Squid, Crab-Mussel and
399 Crab-Fish diets (mean value of 0.12g; P < 0.05).

400

401 3.3. Biochemical characteristics of the yolk

402 The yolk volume in eggs was not affected by diet fed to female *O. maya* (P <
403 0.05). As expected, yolk was consumed throughout the embryonic development
404 (Fig. 4). The diet had a significant effect on the content of total lipids in egg yolk

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

405 (Fig. 5). Eggs from females fed Crab-Squid had higher total lipid content (13.2%)
406 than those from Crab, Crab-Fish and Crab-Mussel ($P < 0.05$, Fig. 5). The total lipid
407 content in eggs was never lower than 10.3% of the total volume of the egg yolk
408 (Fig. 5).

409

410 Fatty acids (FA)

411 Fifty percent of the FA content in the yolk of *O. maya* embryos was
412 saturated. MUFAs varied between 29.5 and 30.8% and PUFAs between 19.7 and
413 22.6%. The DHA/EPA ratio was lower (0.87) in egg yolk from females fed Cr than
414 other females (Table 5).

415 Figure 6 shows the principal coordinate analysis in FA content of the diets.
416 The first two coordinates explained 52.7% of the variation (32 and 20.7% for the
417 first and the second axis, respectively). The proportion of Linoleic acid (C18:2n6c),
418 C20:2, EPA (C20:5n3) and Docosahexaenoic Acid Methyl Ester (C22:6n3) were
419 the FA that most contributed to the ordination in the first axis. Egg yolk samples
420 from females fed the Cr diet had a high content of the first two FA, but a low
421 content of the last two. Egg yolk samples from females fed with any of the
422 remaining diets had a low contribution of the first two components and a high
423 contribution of the last two. The C16:0 and C15:0 were the FA that most
424 contributed in the ordination on the second axis. While yolk samples from eggs in
425 the Cr diet had relatively higher values of these FA, they did not contribute
426 markedly in the ordination of samples from the remaining diets.

427 Results of the permutational MANOVA performed on the FA data showed
428 that female diet had a significant effect on the fatty acid composition of the egg yolk
429 in 1 day old *O. maya* embryos (pseudo-F = 6.19; $p < 0.001$; 999 unique
430 permutations). Paired comparisons amongst diets showed that the FA content of
431 the yolk in embryos in the Cr dietary treatment was significantly different than that
432 of the remaining diets (pseuso-t values ranged from 2.57 to 3.14; $p < 0.01$; 993 to
433 994 unique permutations), thus explaining the clear separation of these samples in
434 the configuration obtained by the PCo (Fig. 6). Samples in the Cr-Mu diet were
435 significantly different from those in Cr-Sq (pseudo-t = 2.69; $p < 0.001$, 998 unique

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

436 permutations), but could not be statistically distinguished from those in the Cr-Fi
437 diet (pseudo-t = 1.46; p < 0.07, 991 unique permutations). Samples in the Cr-Sq
438 and Cr-Fi diets were statistically similar (pseudo-t = 1.49; p < 0.07, 989 unique
439 permutations).

440
441 Amino acids (AA)

442 Proportions of the essential amino acids (EAA) of the yolk were affected by
443 type of diet. Low values of EAA were observed in yolk of embryos spawned by
444 females fed Cr-Fi (Table 6). Lys and Leu were the most abundant essential amino
445 acids (EAA) in the yolk of *O. maya* eggs, while Glu was the most concentrated
446 non-essential amino acid (NEAA) (Table 6).

447 Figure 7 shows principal coordinate analysis of the variation in FA content of
448 the diets. The first two coordinates explained 74.4% of the variation (57.7 and
449 16.7% for the first and the second axis, respectively). With the exception of Asp,
450 Ile, Lys and Leu, all AA contributed in a similar way, both in magnitude and
451 direction, to the ordination of samples in the first axis. Egg yolk samples from
452 females fed the Cr-Fi had high contents of these AA, followed by samples from the
453 Cr-Mu diets. In contrast, samples from the Cr and Cr-Sq dietary treatments had low
454 contents of these AA. Ile, Lys and Leu were the AA that most contributed to the
455 ordination of samples on the second axis, and again their contribution was similar
456 both in magnitude and direction. Yolk samples from eggs in the Cr-Fi had the
457 lowest content of Ile, Leu and Lys, followed by samples from the Cr diet, and
458 samples from the Cr-Sq and Cr-Mu diets had the highest values of these AA.

459 Results of the permutational MANOVA performed on the AA data showed
460 that female diet had a significant effect on the amino acid composition of the egg
461 yolk in 1 day old *O. maya* embryos (pseudo-F = 12.74; p < 0.001; 998 unique
462 permutations). Paired comparisons amongst diets showed that the FA content of
463 the yolk of embryos in all dietary treatments differed significantly from one another
464 (pseudo-t values ranged from 2.57 to 4.59; p < 0.01; 989 to 995 unique
465 permutations), thus explaining the clear separation of these samples in the
466 configuration obtained by the PCo (Fig. 7).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

467 3.4. Morphological changes of the embryos with age.

468 Figure 8 shows the principal coordinate analysis of the variation in 40 days
469 old embryos morphology. The first coordinate explained 83.4% of the variation in
470 embryo morphology. This first horizontal axis was correlated with total, arm and
471 mantle length and can be considered to represent overall embryo size. The second
472 coordinate explained 13% of total variation in the data and was correlated with the
473 diameter of embryo eyes (Fig. 8). The ordinations of samples from the Cr-Mu diet
474 treatment had a larger overall body size (and slightly larger eye diameter), followed
475 by those from the Cr and Cr-Sq treatments. Embryos from females fed the Cr-Fi
476 diet had the smallest overall body size.

477 Results of the permutational MANOVA performed on the MC data showed
478 that female diet had a significant effect on the overall size of 40 day old embryos
479 (pseudo-F = 10.64; $p < 0.001$; 999 unique permutations). Paired comparisons
480 showed that embryos from females fed Cr-Mu had the largest overall body size
481 (pseudo-t ranged from 3.74 to 6.71, $p < 0.01$; from 684 to 923 unique
482 permutations). Embryos for females fed Cr and Cr-Sq diets could not be
483 distinguished from each other (pseudo-t = 0.76; $p = 0.428$; 684 unique
484 permutations) or from the Cr-Fi treatment (pseudo-t ranged from 1.73 to 2.24; $p \geq$
485 0.05; 694 and 908 unique permutations). Analyses showed that there was a
486 significant effect of the nested factor “females” explaining differences in the
487 morphological characteristics of embryos within each dietary treatment (pseudo-F:
488 11.3; $p < 0.001$, 999 unique permutations).

489
490 4. Discussion

491 Results from this study showed that maternal diet affected the chemical
492 composition of yolk and, ultimately determined several characteristics in *O. maya*
493 hatchlings. Whilst we still lack information on how the dietary components are
494 interpreted by females when synthesizing yolk, results obtained here allow
495 suggesting that females use dietary amino acids and fatty acids to promote
496 particular chemical characteristics of the yolk. We observed changes in the quality
497 of the embryo, hence in hatchling survival, both depending on the diet and the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

498 specific nutritional components of the yolk. Marquez et al. (2007) showed that
499 maternal diet could have different effects at different stages of embryo
500 development. Whilst no differences in the number of eggs due to diet effect could
501 be found, possibly due the high variability observed in the number of eggs per
502 spawn, a trend to obtain more hatchlings from females fed with mixed diets than
503 those fed only crabs could be detected (Table 4). Correlations between the number
504 of hatchlings and female diet have never been reported for octopus species, a
505 characteristic that appears to be omnipresent in this group. (Farías *et al.*, 2011)
506 showed no statistical differences in the number of eggs spawned by female
507 *Enteroctopus megalocyathus* fed with mono and mixed diets, suggesting that once
508 females reach the sexual maturity they can produce a variable number of eggs
509 irrespective of food diversity. In our research facilities and after more than 200
510 spawns we have not observed relationships between the size of females or its diet
511 and the number of eggs spawned, suggesting that females are well adapted to
512 mobilize nutrients in a highly flexible way.

513 Results obtained in the present study strongly indicate that a PUFA content
514 of 21% of total lipids and EAA adding up to 38.3 g/100g protein resulted in
515 embryos in the Crab-Mussel diet to produce overall larger body size than those in
516 other treatments (Fig. 6). In addition, embryos spawned by females fed with mixed
517 diets produced hatchlings that were more tolerant to fasting than hatchlings from
518 females fed with a diet consistent only of crab. This suggests that mixed diets not
519 only allow nutrients in the yolk to be channelled to tissue production, but also
520 promote the production of yolk with enough nutrients to be used during the first 10
521 days of life.

522 Embryo growth, measured through changes in morphological
523 characteristics, has been described in several octopus species. Studies have
524 related muscle growth to arm length, organogenesis to mantle length, and the
525 development of the nervous system to eye diameter (Uriarte *et al.*, 2009, 2012,
526 2014, Villanueva and Norman, 2008). Villanueva, (1995), Iglesias *et al.*, (2004) and
527 Carrasco *et al.*, (2006) showed that the growth of the arms in *O. vulgaris*
528 paralarvae is related to the predatory capacity of individuals during planktonic life

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

529 stages. In *O. maya*, embryos with longer arms were those spawned by females fed
530 with the Cr-Mu diet (Fig. 8), indicating that those individuals may perform better as
531 hunters immediately after hatching than those with shorter arms, more so if live
532 food is used at early culture stages (Baeza-Rojano *et al.*, 2012).

533 The use of mantle length as a growth index in embryos has been related to
534 organogenesis (Uriarte *et al.*, 2014, Uriarte *et al.*, 2009, Uriarte *et al.*, 2012,
535 Villanueva and Norman, 2008). In the present study, *O. maya* embryos spawned
536 by female fed with the Cr-Mu diet showed a faster organogenesis, suggesting that
537 the nutrients in this diet promoted embryonic growth in an integral manner.
538 Changes in eye diameter with embryonic development have also been related to
539 paternal diet. Eye diameter is considered an important feature in cephalopod
540 embryonic growth because of its close relation to the development of the nervous
541 system (Villanueva & Norman, 2008; Uriarte *et al.*, 2009, 2012, 2014). *Octopus*
542 *maya* embryos spawned by females fed with the Cr-Mu diet had larger eyes (Fig.
543 8), suggesting that, together with large body size, this diet promoted the
544 development of the nervous system, a feature that could be advantageous in the
545 first days of life.

546 The most abundant EAA in the yolk of the embryos spawned by females fed
547 with Crab, Crab-Squid and Crab-Mussel diets were Arg, Lys and Leu, while the
548 most abundant EAA from females fed with the Crab-Fish diet were Thr, Arg and
549 Leu (Fig. 7). The most abundant NEAA in all the embryos were Glu and Asp, and
550 EAA were always more than 50% than the NEAA. The difference was that in the
551 yolk of embryos spawned by female feed crab-fish heads, Lys was substituted by
552 Thr as the most abundant EAA. Similar values were observed in *O. vulgaris*
553 paralarvae, where Lys, Arg and Leu comprised half of EAA (Villanueva *et al.*,
554 2004). It is interesting to note that the AA that most contributed to the ordination of
555 yolk samples in the PCo were Lys and Leu (more abundant) and Ile (not abundant)
556 (Fig. 7), suggesting that amongst all EAA, Lys (basis of Carnitin synthesis and
557 used in fatty acids transport), Leu (ketogenic AA) and Ile (glucogenic, energetic
558 and ketogenic AA) are playing fundamental roles in embryonic development.
559 Ketogenic amino acids are required during carbohydrate oxidation in aerobic

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

560 pathways, as well as during AA biosynthesis and β -oxidation of fatty acids,
561 because they are the principal source of Acetyl-CoA (Zubay, 1983). During embryo
562 development Ac-CoA takes part in the synthesis of Acetyl-choline, an important
563 stimulator of muscle contractions that is essential for heart activity in the stage XV
564 of development (Naef, 1928, Uriarte *et al.*, 2009, 2012).

565 A question that arises from our study is concerning the way females
566 interpret the AA composition of the diet to synthesize yolk. According to results of
567 the PCo ordination (Fig. 7), the AA that defined differences between diets were
568 Ser, Gly, Ala, Pro, Tyr and Val. Whilst Tyr is Ketogenic, the rest of these AA are
569 used for energetic purposes, suggesting that the protein of the those diets was
570 used mainly as source of energy.

571 Fatty acids in the yolk that influenced the PCo ordination were C16:0
572 (Palmitic acid), C18:2n6 (linoleic acid), C18: 3n3 (linolenic acid) and C22:6n3
573 (DHA; Fig. 6). All of these have specific roles in the metabolism of lipids in
574 cephalopods, both during growth and gonad maturation, and embryonic
575 development (Cerezo-Valverde *et al.*, 2013, Estefanell *et al.*, 2010, Farías *et al.*,
576 2011). Studies made in *Sepia officinalis* demonstrated a relationship between
577 dietary components and biochemical characteristics of the digestive gland, and
578 suggest that the low lipid requirements of cephalopods allows fatty acids to be
579 transported in their native form, and the different dietary components be placed in
580 the ovary of females (Fluckiger *et al.*, 2008). Palmitic acid is the main precursor in
581 the synthesis of unsaturated fatty acids, whilst linoleic acid is a precursor of
582 arachidonic acid and linolenic acid is precursor of EPA (Cerezo-Valverde *et al.*,
583 2013, Estefanell *et al.*, 2010, Farías *et al.*, 2011). These fatty acids were also the
584 most influential in the chemical characteristics of the yolk observed in *O. maya*
585 embryos (Fig. 6), between the most important fatty acids for cephalopods. Overall,
586 unsaturated FA (C14:0, C15:0, C17:0 and C21:0), PUFA C18:1n9 (oleic acid),
587 C18:3n3 (α -Linoleic Acid), C20:1n9 (Eicosenoic acid), C:22 and C22:6n3 (DHA)
588 contributed strongly to the ordination of samples from embryos FA, suggesting that
589 unsaturated fatty acids (UFA) could be used to synthesize saturated FA (SFA),

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

590 whereas PUFA were sent directly to follicular cells to form part of the yolk and be
591 used during embryo development (Márquez *et al.*, 2013, Zubay, 1983).

592 But, how did the dynamics of FA affect embryo performance once animals
593 hatched? Results from the present study demonstrate that females fed with mixed
594 diets produced hatchlings with more reserves than those fed Crab, suggesting that
595 the yolk produced by females fed with the mixed diets was provided the EEA (Leu,
596 Lys and Ile) and long chain FA used for the synthesis of Arachidonic acid, EPA and
597 DHA. All of these components play an essential role as regulators of neuronal
598 activity, which is highly complex in cephalopods and of vital importance both during
599 reproduction (D’Aniello *et al.*, 1995, Di Cosmo and Polese, 2014) and after
600 hatching (Villanueva and Norman, 2008, Rosa *et al.*, 2005, Rosa *et al.*, 2004).

601

602 Acknowledgements

603 This study was partially financed by CONACYT- CB201001 project No. 150810 to
604 Rosas C. and by PAPIIT- IT 200713-3 to Gallardo P. Thanks are also given for all
605 of the support given by Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

606

607 Literature cited

608 Anderson, M.J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of
609 variance. *Austral Ecology* 26, 32-46.

610 A.O.A.C. (2000). *Official Methods of Analysis of the Association of Official*
611 *Analytical Chemists. International 17th Ed.*, AOAC International. Gaithersburg.MD.,
612 USA, Official method.

613 Baeza-Rojano, E., Domingues, P., Caamal-Monsreal, C., Guerra-García, J.,
614 Capella, S., Noreña, E. & Rosas, C. (2012) Use of marine and freshwater
615 gammarids as alternative prey to culture *Octopus maya* hatchlings. *Aquaculture*
616 *Research*, 44, 1602-1612.

617 Carrasco, J.F., Arronte, J.C., Rodríguez, C. (2006). Paralarval rearing of the
618 common octopus, *Octopus vulgaris* (Cuvier). *Aquac. Res.*, 37, 1601–1605

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

619

620 Cerezo-Valverde, J., Dolores-Hernández, M.-D., Aguado-Giménez, F., Morillo-
621 Velarde, P.S. & García-García, B. (2013) Performance of formulated diets with
622 different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*.
623 *Aquaculture Research*, **44**, 1952–1964.

624 Cerezo-Valverde, J., Martínez-Llorens, S., Tomás, A., Jover, M., Rodríguez, C.,
625 Estefanell, J., Gairín, J.I., Domingues, P., Rodríguez, C.J. & García-García, B.
626 (2012a) Amino acids composition and protein quality evaluation of marine species
627 and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquacult Int.*, **21**, 413-433.

628 D’Aniello, A., Nardi, G., De Santis, A., Vetere, A., Di Cosmo, A., Merchelli, R.,
629 Dossena, A.-. & Fisher, G. (1995) Free L-amino acids and D-aspartate content in
630 the nervous system of Cephalopoda. A comparative study. *Comp Biochem Physiol.*
631 *Part B*, **112**, 661-666.

632 Di Cosmo, A. & Polese, G. (2014) Cephalopods meet neuroecology: The role of
633 chemoreception in *Octopus vulgaris* reproductive behaviour In *Neuroecology and*
634 *Neuroethology in Molluscs* (Di Cosmo, A. & Winlow, W. eds.), pp. 117-132. Nova
635 Science Publishers, Inc.

636 Domingues, P., Lopez, N., Muñoz, J.A., Maldonado, T., Gaxiola, G. & Rosas, C.
637 (2007) Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus,
638 *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, **13**, 1-9.

639 Domingues, P.M., López, N. & Rosas, C. (2012) Preliminary trials on the use of
640 large outdoor tanks for the ongrowing of *Octopus maya* juveniles. *Aquaculture*
641 *Research*, **43**, 26-31.

642 Estefanell, J., Socorro, J., Roo, F.J., Guirao, R., Fernández-Palacios, H. &
643 Izquierdo, M. (2010) Gonad maturation in *Octopus vulgaris* during ongrowing,
644 under different conditions of sex ratio. *ICES J. Mar. sci*, **67**, 1487-1493.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

645 Farías, A., Navarro, J.C., Cerna, V., Pino, S. & Uriarte, I. (2011) Effect of
646 broodstock diet on the fecundity and biochemical composition of eggs of the
647 Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus* Gould 1852). *Ciencias*
648 *Marinas*, **37**, 11-21.

649 Fluckiger, M., Jackson, G.D., Nichols, P., Virtue, P., Daw, A. & Wotherspoon, S.
650 (2008) An experimental study of the effect of diet on the fatty acid profiles of the
651 European Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Mar. Biol.*, **154**, 363-372.

652 Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation
653 and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226, 497-509.

654 George-Zamora, A., Viana, T., Rodriguez, S., Espinoza, G. & Rosas, C. (2011)
655 Amino acid mobilization and growth of juvenile *Octopus maya* (Mollusca:
656 Cephalopoda) under inanition and re-feeding. *Aquaculture*, **314**, 121-124.

657 Iglesias, J., Otero, J.J., Moxica, C., Fuentes, L., Sanchez, F.J. (2004). The
658 complete life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture
659 conditions: Paralarval rearing using *Artemia* and crab zoeae, and first data on
660 juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International* 12, 481-487.

661 Legendre P., Legendre L. (1998). Numerical ecology, 2nd English edn. Elsevier,
662 Amsterdam.

663
664 Márquez, L., Ceballos, M., Domingues, P., (2007). Functional response of early
665 stages of the cuttlefish *Sepia officinalis* preying on the mysid *Mesopodopsis*
666 *slabberi*. *Marine Biology Research* 3, 463-467.

667 Márquez, L., Quintana, D., Lorenzo, A. & Almansa, E. (2013) Biometrical
668 relationships in developing eggs and neonates of *Octopus vulgaris* in relation to
669 parental diet. *Helgol. Mar. Res.*, **In press**, DOI 10.1007/s10152-10012-10335-y.

670 Martinez, R., Gallardo, P., Pascual, C., Navarro, J.C., Sánchez, A., Caamal-
671 Monsreal, C. & Rosas, C. (2014) Growth, survival and physiological condition of
672 *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, **426–427**, 310–
673 317.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

674 McArdle B.H., Anderson M.J. (2001). Fitting multivariate models to community
675 data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82, 290–297
676

677 Moguel, C., Mascaró, M., Avila-Poveda, O., Caamal, C., Sánchez, A., Pascual, C.
678 & Rosas, C. (2010) Morphological, physiological, and behavioural changes during
679 post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with
680 special focus on digestive system. *Aquatic Biology*, **9**, 35-48.

681 Montgomery, D.C. (2004) *Diseño y análisis de experimentos*, Limusa Wiley,
682 México.

683 Naef, A. (1928) Die Cephalopoden (Embryologie) *Fauna e flora del Golfo di Napoli*,
684 **35**, 1-375.

685 Navarro, J.C. & Villanueva, R. (2000). Lipid and fatty acid composition of early
686 stages of cephalopods: An approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183,
687 161-177.

688 Navarro, J.C. & Villanueva, R. (2003). The fatty acid composition of *Octopus*
689 *vulgaris* parvalvae reared with live and inert food: Deviation from their natural fatty
690 acid profile. *Aquaculture* 219, 613-631.

691 O’Dor, R.K. & Wellls, M.J. (1978) Reproduction versus somatic growth: hormonal
692 control in *Octopus vulgaris* *J. Exp. Biol.*, **77**, 15-31.

693 Quetglas, A., Ordines, F. & Valls, M. (2011) What drives seasonal fluctuations of
694 body condition in a semelparous income breeder octopus? *Acta Oecologica*, **37**,
695 476-483.

696 Quintana, D., Rosas, C. & Moreno-Villegas, E. (2011) Relationship between
697 nutritional and rearing parameters of *Octopus maya* juveniles fed different rations
698 of crab paste. *Aquaculture Nutrition*, **17e**, 379-388.

699 Reis, D.B., Acosta, N.G., Almansa, E., Navarro, J.C., Tocher, D.R., Monroige, O.,
700 Andrade, J.P., Sykes, A. & Rodríguez, C. (2014) In vivo metabolism of unsaturated
701 fatty acids in *Octopus vulgaris* hatchlings determined by incubation with 14C-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

702 labelled fatty acids added directly to seawater as protein complexes. *Aquaculture*,
703 **in press**, 10.1016/j.aquaculture.2014.1005.1016.

704 Rosa, R., Costa, P.R., Bandarra, N. & Nunes, A.J.P. (2005) Changes in Tissue
705 Biochemical Composition and Energy Reserves Associated With Sexual
706 Maturation in the Ommastrephid Squids *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae*
707 *Biol.Bull.*, **208**, 100-113.

708 Rosa, R., Costa, P.R. & Nunes, L. (2004) Effect of sexual maturation on the tissue
709 biochemical composition of *Octopus vulgaris* and *O. defilippi* (Mollusca:
710 Cephalopoda). *Mar.Biol.*, **145**, 563-574.

711 Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C. & Pascual, C. (2014)
712 *Octopus maya* In *Cephalopod Culture* (Iglesias, J. & et al. eds.), pp. DOI
713 10.1007/1978-1094-1017-8648-1005_1020,. Springer Science+Business Media,
714 Dordrecht.

715 Uriarte, I., Espinoza, V., Gutiérrez, R., Zúñiga, O., Olivares, A., Rosas, C., Pino, S.
716 & Farías, A. (2014) Key aspects of egg incubation in Patagonian red octopus
717 (*Enteroctopus megalocyathus*) for cultivation purposes. *Aquaculture*, **424-425**, 158
718 - 166.

719 Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M., Zuñiga, O., Olivares, A., Carbonell, P., Pino,
720 S., Farias, A. & Rosas, C. (2012) Effect of temperature on embryonic development
721 of *Octopus mimus* under controlled conditions. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.*, **416-417**, 168-
722 175.

723 Uriarte, I., Iglesias, J., Domínguez, P., Rosas, C., Navarro, J.C., Seixas, P., Vidal,
724 E., Ausburger, A., Pereda, S., Godoy, F., Paschke, K. & Farías, A. (2011) Current
725 Status and Bottle Neck of Octopod Aquaculture: The Case of American Species.
726 *Journal of the World Aquaculture Society*, **42**, 735-752.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

727 Uriarte, I., Zuñiga, O., Olivares, A., Espinoza, V., Cerna, V., Farías, A. & Rosas, C.
728 (2009) Morphometric changes and growth rate during embryonic development of
729 *Robsonella fontaniana*. *Vie et Millieu*, **59**, 315-323.

730 Villanueva, R. (1995). Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus*
731 *vulgaris* from hatching to settlement. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52, 2639–2650

732 Villanueva, R. & Norman, M.D. (2008) Biology of the planktonic stages of benthic
733 octopuses. *Oceanogr.Mar.Biol.Ann.Rev.*, **46**, 105-202.

734 Villanueva, R., Sykes, A., Vidal, A.T., Rosas, C., Nabhitabhata, J., Fuentes, L. &
735 Iglesias, J. eds. (2014) *Current status and future challenges in cephalopod culture*,
736 Springer Science + Business Media, Dordrecht.

737 Zubay, G. (1983) *Biochemistry*, Addison-Wesley Publishing Company, USA.

738

739

740

1
2
3
4 741 Figure Captions
5

6 742 Figure 1. Principal coordinate ordination on the fatty acid content in samples (n=3) of 4
7 743 different diets (Cr: 100% crab; Cr-Mu: 70-30% crab-green mussel; Cr-Fi: 70-30% crab-fish
8 744 head; and Cr-Sq: 70-30% crab-squid mantle) fed to female *O. maya* throughout
9 745 experiments on reproductive performance.

10
11 746 Figure 2. Principal coordinate ordination on the amino acid content in samples (n=3) of 4
12 747 different diets (Cr: 100% crab; Cr-Mu: 70-30% crab-green mussel; Cr-Fi: 70-30% crab-fish
13 748 head; and Cr-Sq: 70-30% crab-squid mantle) fed to female *O. maya* throughout
14 749 experiments on reproductive performance.
15
16 750

17
18 751 Figure 3. Ingestion rates (mean \pm SD) of females *O. maya* fed different diets. Different
19 752 letters in rows correspond to groups amongst which statistical differences were found at p
20 < 0.05
21 753

22
23 754 Figure 4. Changes in yolk volume in *O. maya* eggs throughout embryonic development.
24 755 Data are mean values \pm SD. Different letters means statistical differences at p < 0.05.

25
26 756 Figure 5. Diet effect on the total lipid content of yolk in 1 d old eggs of *O. maya* obtained
27 757 from females fed different diets. Data are mean values \pm SD. Different letters in rows
28 758 correspond to groups amongst which statistical differences were found at p < 0.05.
29 759

30
31 760 Figure 6. Principal coordinate ordination on the fatty acid content in samples (n=10) of the
32 761 egg yolk in 1 day old embryos obtained from female *O. maya* fed with 4 different diets (Cr:
33 762 100% crab; Cr-Mu: 70-30% crab-green mussel; Cr-Fi: 70-30% crab-fish head; and Cr-Sq:
34 763 70-30% crab-squid mantle) throughout experiments on reproductive performance.

35
36
37 764 Figure 7. Principal coordinate ordination on the amino acid content in samples (n=10) of
38 765 the egg yolk in 1 day old embryos obtained from female *O. maya* fed with 4 different diets
39 766 (Cr: 100% crab; Cr-Mu: 70-30% crab-green mussel; Cr-Fi: 70-30% crab-fish head; and Cr-
40 767 Sq: 70-30% crab-squid mantle) throughout experiments on reproductive performance.
41 768

42
43
44 769 Figure 8. Principal coordinate ordination on morphological characteristics of 40 day
45 770 embryos (n=30) obtained from female *O. maya* fed with 4 different diets (Cr: 100% crab;
46 771 Cr-Mu: 70-30% crab-green mussel; Cr-Fi: 70-30% crab-fish head; and Cr-Sq: 70-30%
47 772 crab-squid mantle) throughout experiments on reproductive performance.
48 773

Table 1. Proximal analysis (dry basis) of the dietary components and the mixed diets fed to *O. maya* females during reproductive conditioning. Data are mean values \pm SD.

Ingredient	Humidity		Protein		Lipids		Ash		TOTAL
	Percentage (%)								
Squid Mantle (<i>Dosidicus gigas</i>)	84.05	c	90.07	d	4.13	a	6.91	a	101.11
	± 0.42		± 0.07		± 0.03		± 0.02		
Mussel (<i>Perna canaliculus</i>)	77.44	b	59.49	b	11.26	c	6.99	a	77.74
	± 0.22		± 0.57		± 0.20		± 0.09		
Fish head (<i>Epinephelus morio</i> .)	69.49	a	42.01	a	32.94	d	26.24	c	101.19
	± 0.19		± 2.24		± 0.03		± 0.74		
Crab (<i>Callinectes sp.</i>)	83.1	c	82.29	c	4.35	b	10.69	b	97.33
	± 0.65		± 0.71		± 0.12		± 0.03		
DIETS									
Crab-Squid			84.62		4.28		9.56		
Crab-Fish heads			70.21		12.93		15.36		
Crab-Mussel			75.45		6.42		9.58		

Different letters in rows correspond to groups amongst which statistical differences were found at $p < 0.05$

Table 2. Fatty acids profile of the ingredients and experimental diets fed to *O. maya* females during reproductive conditioning. Data are mean values \pm SD.

Fatty acid	Ingredients				Diets			
	Squid	Crab	Mussel	Fish head	Crab	Crab-Squid	Crab-Mussel	Crab-Fish head
	(<i>Dosidiscus gigas</i>)	(<i>Callinectes sapidus</i>)	(<i>P. canaliculus</i>)	<i>E. morio</i>				
C14:0	1.42 \pm 0.04	2.31 \pm 0.06	9.69 \pm 0.41	8.8 \pm 0.53	2.31 \pm 0.06	2.05 \pm 0.03	4.53 \pm 0.08	4.26 \pm 0.2
C15:0	0.44 \pm 0.01	1.32 \pm 0.03	0.91 \pm 0	1.7 \pm 0.14	1.32 \pm 0.03	1.06 \pm 0.02	1.2 \pm 0.02	1.43 \pm 0.06
C16:0	36.73 \pm 0.49	25.5 \pm 0.8	35.9 \pm 1.07	34.5 \pm 2.92	25.5 \pm 0.8	28.86 \pm 0.71	28.6 \pm 0.24	28.18 \pm 0.31
C17:0	1.75 \pm 0.02	2.49 \pm 0.03	0.39 \pm 0.01	1.33 \pm 0.73	2.49 \pm 0.03	2.27 \pm 0.01	1.86 \pm 0.02	2.14 \pm 0.2
C18:0	15.03 \pm 0.29	12 \pm 0.56	9.9 \pm 0.57	10.9 \pm 1.25	12 \pm 0.56	12.88 \pm 0.48	11.3 \pm 0.22	11.64 \pm 0.02
C20:0	0.63 \pm 0.08	0.65 \pm 0.02	0.29 \pm 0.03	0.58 \pm 0.04	0.65 \pm 0.02	0.65 \pm 0.04	0.55 \pm 0.01	0.63 \pm 0
C21:0	2.03 \pm 0.09	7.02 \pm 0.13	1.24 \pm 1.14	1.25 \pm 1.25	7.02 \pm 0.13	5.52 \pm 0.12	5.28 \pm 0.25	5.29 \pm 0.28
C22:0	0.39 \pm 0.03	0.4 \pm 0.01	0.25 \pm 0.03	0.26 \pm 0.14	0.4 \pm 0.01	0.4 \pm 0.00	0.36 \pm 0.02	0.36 \pm 0.04
C23:0	0.38 \pm 0.25	0.7 \pm 0.07	0.63 \pm 0.02	0 \pm 0	0.7 \pm 0.07	0.6 \pm 0.12	0.68 \pm 0.04	0.49 \pm 0.05
C24:0	0.15 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01	0.09 \pm 0.07	0.2 \pm 0.03	0.1 \pm 0.01	0.12 \pm 0.00	0.1 \pm 0.03	0.13 \pm 0.01
C14:1	0.05 \pm 0.03	0.08 \pm 0	0.07 \pm 0.03	0.17 \pm 0.02	0.08 \pm 0	0.07 \pm 0.00	0.08 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01
C15:1	0.08 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
C16:1	0.85 \pm 0.03	6.56 \pm 0.13	16.6 \pm 0.28	12.4 \pm 1.17	6.56 \pm 0.13	4.84 \pm 0.08	9.57 \pm 0.17	8.3 \pm 0.44
C17:1	0.22 \pm 0.12	0.18 \pm 0.07	0.39 \pm 0.01	0.66 \pm 0.52	0.18 \pm 0.07	0.19 \pm 0.01	0.24 \pm 0.05	0.32 \pm 0.2
C18:1n9c/t	1.85 \pm 0.17	15.4 \pm 0.23	2.63 \pm 0.16	16.8 \pm 2.85	15.4 \pm 0.23	11.32 \pm 0.11	11.6 \pm 0.21	15.82 \pm 0.7
C20:1n9	10.58 \pm 0.73	1.35 \pm 0.09	3.34 \pm 0.36	1.21 \pm 0.37	1.35 \pm 0.09	4.12 \pm 0.16	1.95 \pm 0.05	1.31 \pm 0.17
C22:1n9	0.43 \pm 0.31	0.14 \pm 0	0.24 \pm 0.04	0.49 \pm 0.26	0.14 \pm 0	0.23 \pm 0.09	0.17 \pm 0.01	0.24 \pm 0.08
C24:1n9	0.14 \pm 0.11	0.04 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03	0.04 \pm 0.04	0.04 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
C18:2n6c	0.12 \pm 0.01	5.68 \pm 0.24	1.57 \pm 0.08	0.75 \pm 0.55	5.68 \pm 0.24	4.01 \pm 0.17	4.44 \pm 0.14	4.2 \pm 0
C18:2n6t	0.13 \pm 0.03	0.18 \pm 0.06	0.09 \pm 0.07	0.17 \pm 0	0.18 \pm 0.06	0.16 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.17 \pm 0.04
C20:2	0.22 \pm 0.03	0.97 \pm 0.15	0.52 \pm 0	0.3 \pm 0.05	0.97 \pm 0.15	0.75 \pm 0.12	0.83 \pm 0.11	0.77 \pm 0.09
C22:2	0.11 \pm 0.04	0.04 \pm 0.03	0.42 \pm 0.03	0.25 \pm 0	0.04 \pm 0.03	0.06 \pm 0.01	0.16 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02
C18:3n6	0 \pm 0	0.24 \pm 0.03	0.14 \pm 0	0.18 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.17 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	0.22 \pm 0.03
C18:3n3	0.16 \pm 0.01	1.16 \pm 0.04	0.12 \pm 0	0.6 \pm 0.47	1.16 \pm 0.04	0.86 \pm 0.03	0.85 \pm 0.02	0.99 \pm 0.17
C20:3n6	0.04 \pm 0.01	0.37 \pm 0.02	0.25 \pm 0.23	0.17 \pm 0.1	0.37 \pm 0.02	0.27 \pm 0.01	0.34 \pm 0.09	0.31 \pm 0.01
C20:3n3	0 \pm 0	0.03 \pm 0.01	0 \pm 0	0.01 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0	0.02 \pm 0.01
C20:4n6	0.15 \pm 0	0.11 \pm 0	0 \pm 0	0.05 \pm 0.04	0.11 \pm 0	0.12 \pm 0.00	0.08 \pm 0	0.09 \pm 0.01
C20:5n3	9.53 \pm 0.29	9.18 \pm 0.16	8.29 \pm 0.57	4.57 \pm 0.58	9.18 \pm 0.16	9.28 \pm 0.20	8.91 \pm 0.05	7.8 \pm 0.29
C22:6n3	15.98 \pm 0.37	5.28 \pm 0.04	5.63 \pm 0.37	1.26 \pm 1.26	5.28 \pm 0.04	8.49 \pm 0.14	5.38 \pm 0.08	4.07 \pm 0.35
Saturated	58.95 \pm 11.73	52.4 \pm 8.038	59.3 \pm 11.2	59.5 \pm 10.73	52.4 \pm 8.04	54.41 \pm 9.1	54.5 \pm 8.85	54.55 \pm 8.73
Monounsaturated	14.2 \pm 3.608	23.8 \pm 5.487	23.4 \pm 5.68	31.8 \pm 6.677	23.8 \pm 5.49	20.9 \pm 4.04	23.7 \pm 4.77	26.18 \pm 5.8
Polyunsaturated	26.44 \pm 0.77	23.2 \pm 0.71	17 \pm 0.89	8.31 \pm 0.93	23.2 \pm 0.71	24.19 \pm 3.5	21.4 \pm 2.97	18.75 \pm 2.55
n-3	25.67 \pm 0.66	15.7 \pm 0.24	14 \pm 0.94	6.44 \pm 0.22	15.7 \pm 0.24	18.65 \pm 4.9	15.2 \pm 4.15	12.88 \pm 3.51
n-6	0.44 \pm 0.04	6.57 \pm 0.35	2.05 \pm 0.08	1.31 \pm 0.65	6.57 \pm 0.35	4.73 \pm 1.93	5.22 \pm 2.15	4.99 \pm 2.02
EPA	9.53 \pm 0.29	9.18 \pm 0.16	8.29 \pm 0.57	4.57 \pm 0.58	9.18 \pm 0.16	9.28 \pm 0.2	8.91 \pm 0.05	7.8 \pm 0.29
DHA	15.98 \pm 0.37	5.28 \pm 0.04	5.63 \pm 0.37	1.26 \pm 1.26	5.28 \pm 0.04	8.49 \pm 0.14	5.38 \pm 0.08	4.07 \pm 0.35
DHA/EPA	1.68	0.58	0.68	0.28	0.58	0.91	0.60	0.52
DHA/ARA	106.5	48.0	--	25.2	48.0	70.8	67.3	45.2
EPA/ARA	63.5	83.5	--	91.4	91.4	77.3	111.4	86.7
Linoleic Acid/ARA	0.8	51.6	--	15.0	51.6	33.4	55.5	46.7
Linolenic acid/EPA	0.00	0.03	0.02	0.04	0.03	0.02	0.02	0.03
Linolenic acid/DHA	0.00	0.05	0.02	0.14	0.05	0.02	0.04	0.05

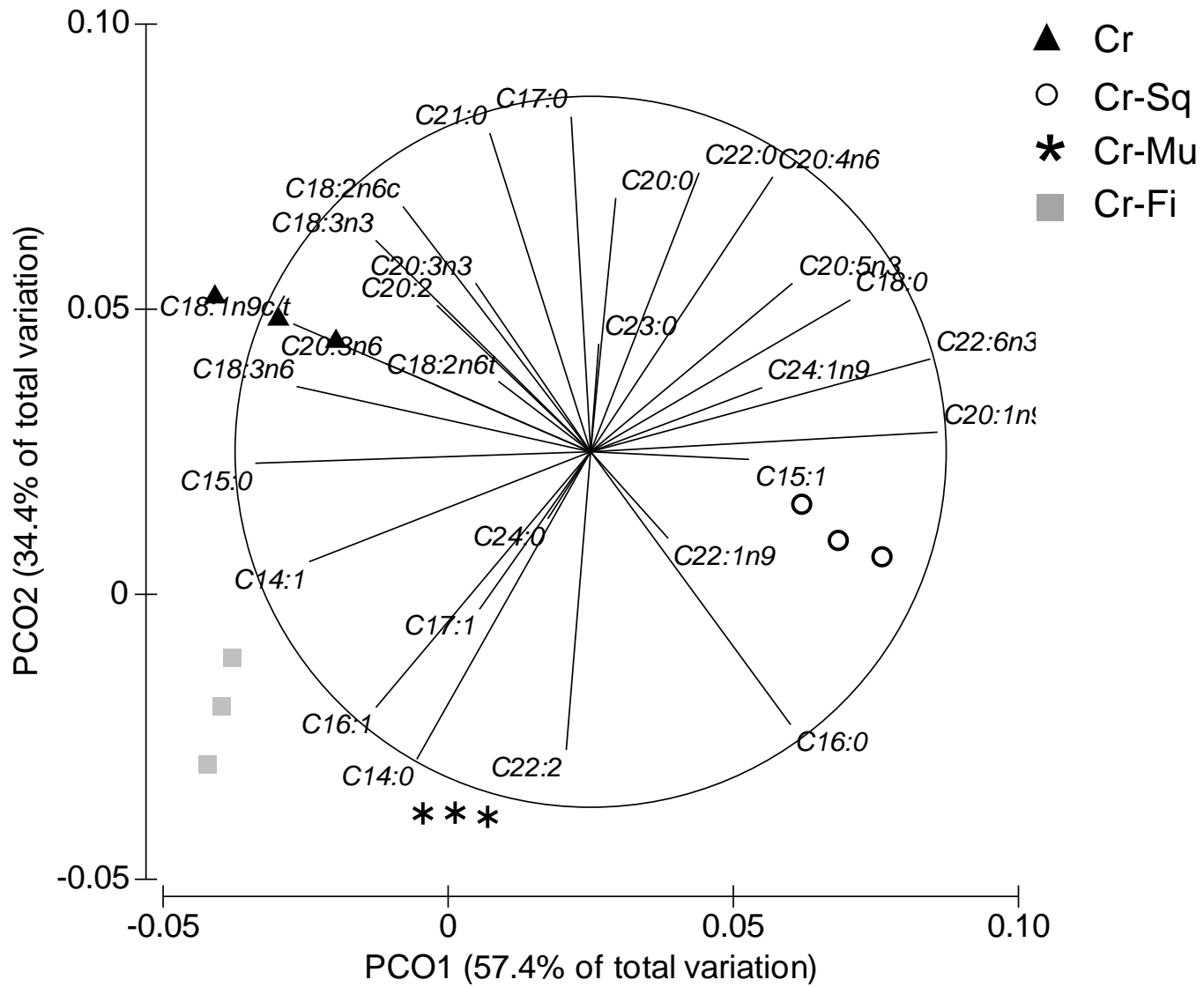


FIG. 1

Table 3. Amino acids content of the ingredients and experimental diets fed to *O. maya* females during reproductive conditioning. Data are mean values \pm SD.

	Ingredients				Diets			
	Crab	Squid	Mussel	Fish head	Crab	Crab-Squid	Crab-Mussel	Crab-Fish head
Essential amino acids								
His	1.59 \pm 0.04	1.25 \pm 0.12	1.09 \pm 0.1	3.4 \pm 3.18	1.59 \pm 0.03	1.42 \pm 0.03	1.50 \pm 0.01	1.84 \pm 0.29
Thr	8.22 \pm 0.48	7.19 \pm 0.11	6.29 \pm 0.09	3.2 \pm 2.9	8.22 \pm 0.34	7.71 \pm 0.13	7.88 \pm 0.29	7.52 \pm 0.01
Arg	3.5 \pm 0.05	3.02 \pm 0.02	3.03 \pm 0.23	2.16 \pm 0.65	3.50 \pm 0.03	3.26 \pm 0.02	3.42 \pm 0.00	3.31 \pm 0.09
Val	3.09 \pm 0.06	2.31 \pm 0.06	2.37 \pm 0.13	1.5 \pm 0.94	3.09 \pm 0.04	2.70 \pm 0.04	2.96 \pm 0.02	2.87 \pm 0.13
Lys	6.38 \pm 0.17	5.24 \pm 0.27	4.56 \pm 0.75	3.16 \pm 1.95	6.38 \pm 0.12	5.81 \pm 0.04	6.05 \pm 0.19	5.93 \pm 0.09
Ile	2.8 \pm 0.03	2.36 \pm 0.06	2.18 \pm 0.24	1.23 \pm 0.59	2.80 \pm 0.02	2.58 \pm 0.01	2.69 \pm 0.05	2.58 \pm 0.04
Leu	5.62 \pm 0.14	5.11 \pm 0.28	4.5 \pm 0.61	3.09 \pm 1.13	5.62 \pm 0.10	5.36 \pm 0.05	5.42 \pm 0.16	5.26 \pm 0.03
Phe	3.33 \pm 0.01	2.51 \pm 0.08	2.54 \pm 0.19	1.69 \pm 1.04	3.33 \pm 0.01	2.92 \pm 0.02	3.18 \pm 0.02	3.10 \pm 0.11
Non essential amino acids								
Asp	7.18 \pm 0.02	6.27 \pm 0.49	6.56 \pm 0.48	4.13 \pm 2.27	6.91 \pm 6.99	6.73 \pm 0.17	7.07 \pm 0.07	6.76 \pm 0.21
Ser	3.56 \pm 0.85	2.76 \pm 0.19	2.97 \pm 0.08	2.4 \pm 0.15	3.32 \pm 3.39	3.16 \pm 0.37	3.46 \pm 0.48	3.40 \pm 0.53
Glu	11.62 \pm 0.43	10.02 \pm 0.99	10.06 \pm 0.27	2.77 \pm 0.33	11.14 \pm 11.16	10.82 \pm 0.20	11.34 \pm 0.28	10.17 \pm 0.44
Gly	5.65 \pm 0.23	2.82 \pm 0.24	6.12 \pm 2.24	6.22 \pm 0.31	4.8 \pm 5.79	4.23 \pm 0.17	5.73 \pm 0.42	5.34 \pm 0.57
Ala	5.15 \pm 0.05	3.88 \pm 0.29	3.91 \pm 0.14	3.52 \pm 1.79	4.77 \pm 4.78	4.51 \pm 0.12	4.93 \pm 0.01	4.93 \pm 0.20
Pro	2.93 \pm 0.1	1.61 \pm 0.09	2.87 \pm 0.88	2.25 \pm 1.83	2.53 \pm 2.91	2.27 \pm 0.06	2.92 \pm 0.06	2.83 \pm 0.12
Tyr	2.64 \pm 0.02	4.45 \pm 0.25	1.18 \pm 0.2	1.79 \pm 1.41	3.19 \pm 2.2	3.55 \pm 0.08	2.38 \pm 0.04	2.52 \pm 0.12
Total								
EAA	41.71	35.26	33.12	23.56	34.53	31.76	33.10	32.41
NEAA	31.56	25.53	27.11	18.94	36.66	35.27	37.83	35.95

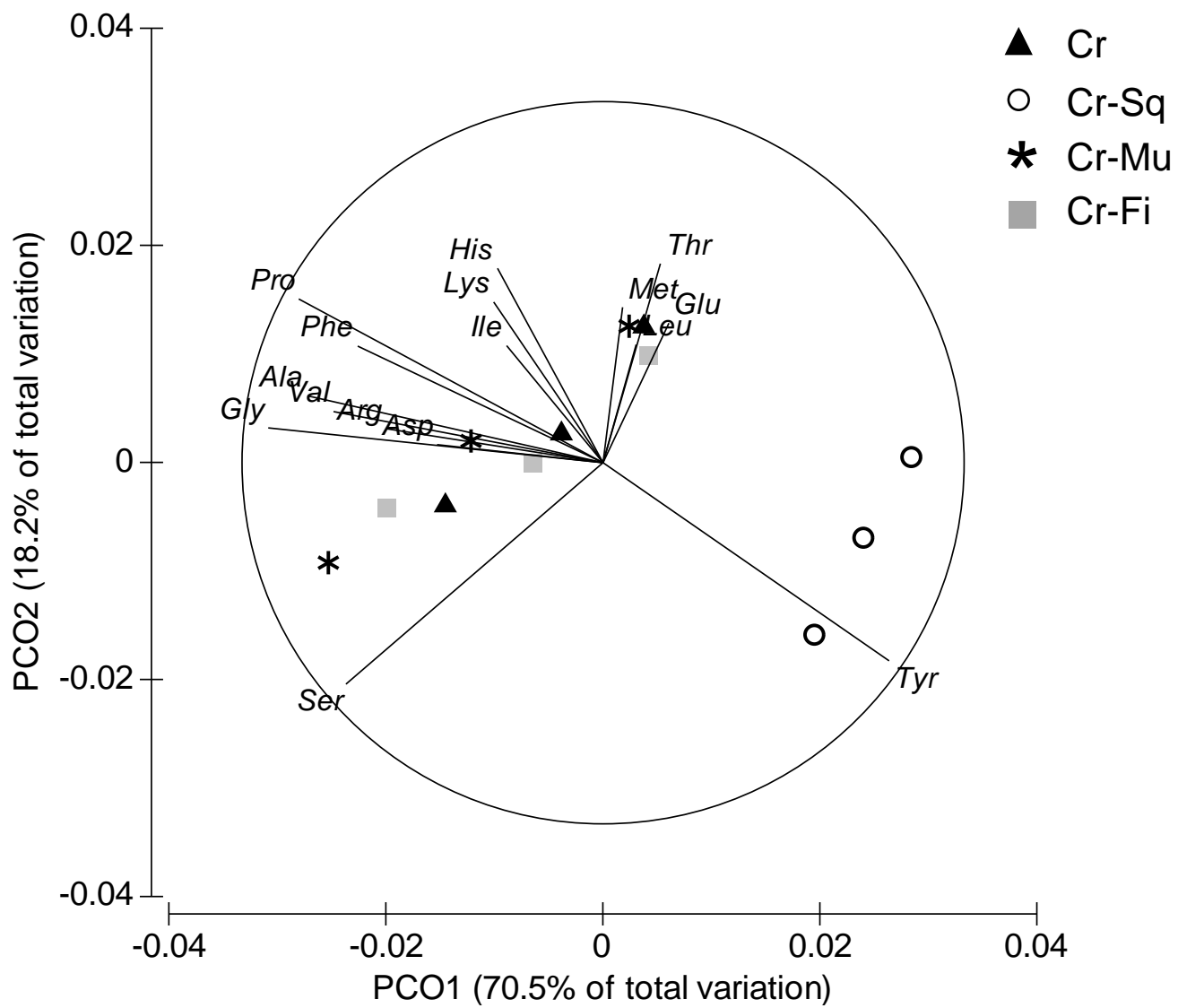


FIG. 2

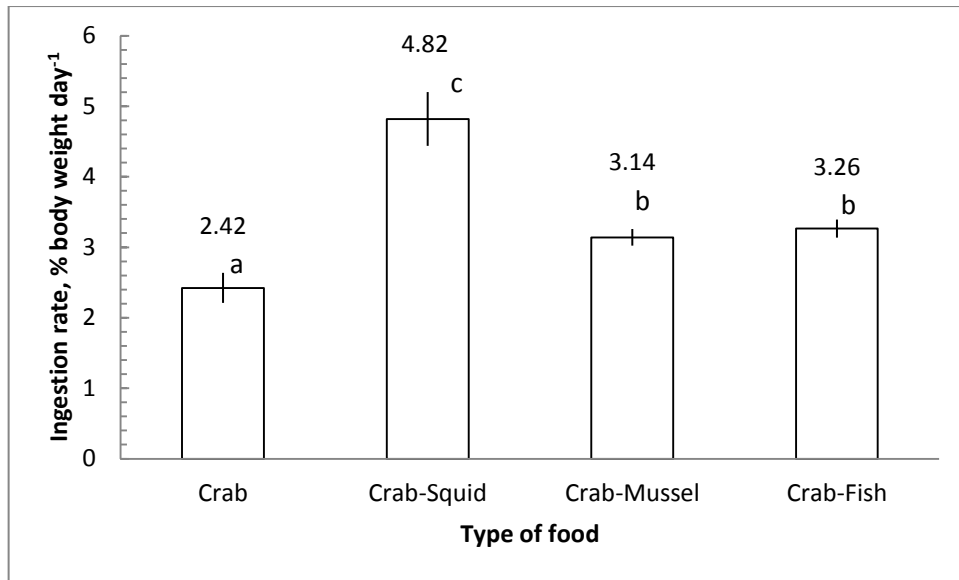


FIG. 3

Table 4. Reproductive performance of *O. maya* females fed different experimental diets. Data are as mean values \pm SD

Female performance	DIET											
	Crab (<i>C. sapidus</i>)			Crab (<i>C. sapidus</i>) and Squid (<i>D. gigas</i>)			Crab (<i>C. sapidus</i>) and Mussel (<i>P. canaliculus</i>)			Crab (<i>C. sapidus</i>) and Fish head (<i>Epinephelus morio</i>)		
Initial wet weight, g	1002.53	\pm 128.72	a	916.57	\pm 158.33	a	868.18	\pm 112.50	a	877.86	\pm 212.89	a
Weight after spawn, g	828.73	\pm 112.49	a	931.64	\pm 97.86	b	927.82	\pm 200.72	b	1046.43	\pm 276.38	c
Number of females	15			15			15			15		
Change in weight, g	-173.80	\pm 78.48	a	15.07	\pm 151.73	b	59.64	\pm 169.26	b	168.57	\pm 286.04	b
Days to spawn	8.80	\pm 4.10	a	22.60	\pm 10.90	b	27.80	\pm 13.60	b	33.50	\pm 21.40	b
Eggs per clutch	21.96	\pm 5.91	a	19.45	\pm 6.86	a	21.39	\pm 5.32	a	19.57	\pm 5.57	a
Eggs per spawn	757.18	\pm 332.70	a	643.36	\pm 419.74	a	833.61	\pm 296.66	a	751.71	\pm 465.28	a
Fecundated eggs	396.40	\pm 265.20	a	466.92	\pm 296.46	b	601.00	\pm 403.07	c	487.46	\pm 201.72	b
Hatchlings per spawn	319.08	\pm 160.27	a	435.00	\pm 298.17	a	475.40	\pm 308.37	a	479.92	\pm 203.38	a
Survival at hatch, %	80			93			79			98		
Wet weight of hatchlings (1d old), g	0.13	\pm 0.02	b	0.12	\pm 0.01	a	0.12	\pm 0.01	a	0.12	\pm 0.01	a
Survival after Fasting period (10 d), %	57.69	\pm 17.03	a	71.50	\pm 15.82	b	81.54	\pm 15.46	b	81.79	\pm 9.12	b
Spawns obtained per treatment	15			14			13			15		

Different letters in rows correspond to groups amongst which statistical differences were found at $p < 0.05$.

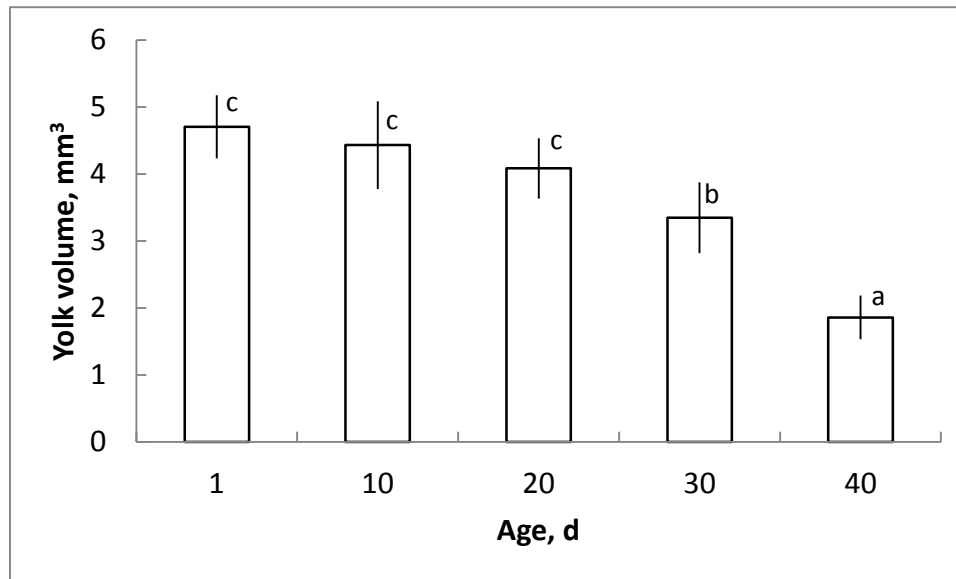


FIG. 4

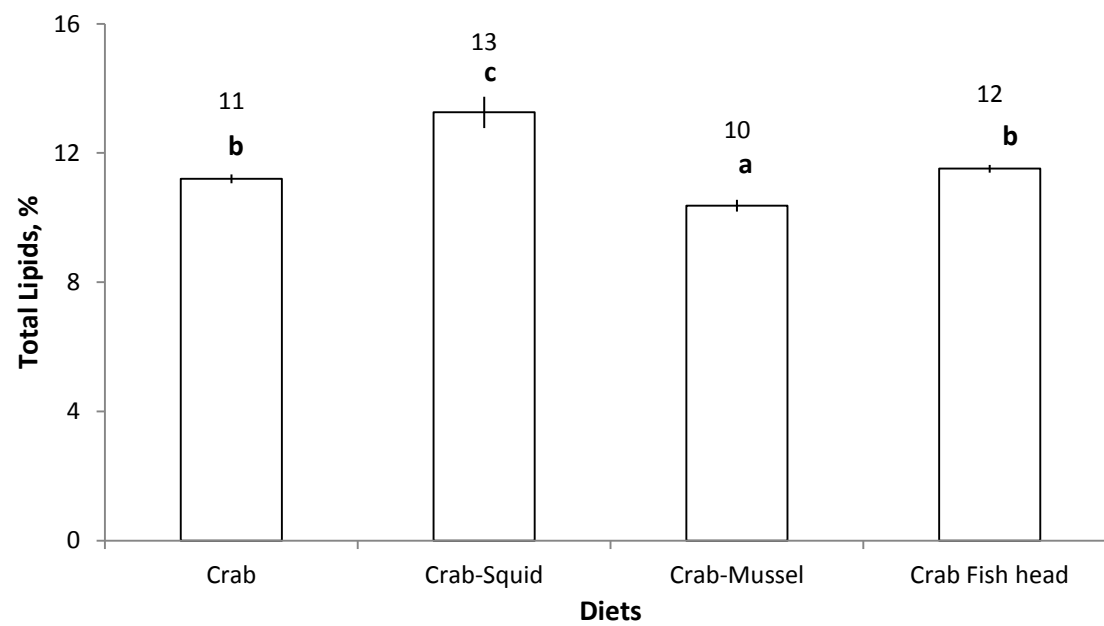


FIG. 5

Table 5. Fatty acid content in the yolk of 1 d old embryos obtained from *O. maya* females fed different diets. Data are mean values \pm SD

Component	Crab		Crab-Squid		Crab-Mussel		Crab-Fish head	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
C14:0	3.14	0.45	3.04	0.50	3.15	0.25	3.35	0.27
C15:0	0.85	0.07	0.81	0.05	0.86	0.06	0.85	0.09
C16:0	30.87	2.33	31.82	1.01	32.42	1.32	32.33	1.40
C17:0	1.93	0.28	2.01	0.26	2.00	0.08	1.93	0.16
C18:0	8.83	0.84	8.56	1.26	9.06	0.21	8.49	0.43
C20:0	0.09	0.03	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.03
C21:0	13.51	1.48	14.36	0.84	13.91	0.79	13.82	1.30
C22:0	0.37	0.32	0.34	0.34	0.43	0.54	0.38	0.40
C23:0	1.40	0.13	1.38	0.18	1.17	0.06	1.46	0.42
C24:0	0.04	0.06	0.00	0.00	0.02	0.04	0.03	0.02
C14:1	0.10	0.04	0.11	0.05	0.10	0.05	0.08	0.02
C15:1	0.01	0.05	0.00	0.00	0.03	0.06	0.16	0.21
C16:1	1.54	0.13	1.54	0.20	1.74	0.10	1.58	0.15
C17:1	2.08	0.66	2.13	0.86	2.96	0.68	2.70	0.79
C18:1n9c/t	9.11	0.72	7.96	0.47	8.31	0.48	8.09	0.68
C20:1n9	3.09	0.18	3.04	0.38	3.32	0.36	3.19	0.12
C22:1n9	0.28	0.12	0.31	0.03	0.40	0.05	0.26	0.15
C24:1n9	0.69	1.88	0.03	0.03	0.05	0.04	0.09	0.06
C18:2n6c	1.16	0.19	0.58	0.34	0.83	0.50	0.73	0.14
C18:2n6t	0.58	0.09	0.29	0.17	0.42	0.25	0.37	0.07
C20:2	1.81	0.23	1.00	0.14	0.96	0.19	0.98	0.37
C22:2	0.22	0.09	0.14	0.07	0.28	0.12	0.22	0.06
C18:3n6	1.30	2.65	0.01	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02
C18:3n3	0.45	0.05	0.33	0.05	0.36	0.05	0.19	0.16
C20:3n6	0.27	0.02	0.20	0.03	0.11	0.07	0.21	0.03
C20:3n3	0.13	0.06	0.09	0.04	0.07	0.05	0.12	0.07
C20:4n6	0.41	0.04	0.43	0.03	0.42	0.02	0.41	0.04
C20:5n3	9.23	0.60	8.50	0.58	8.14	0.57	8.29	0.61
C22:6n3	7.98	0.37	11.42	0.71	8.96	0.71	10.12	1.12
Saturated	61.04	3.67	62.38	2.16	63.08	1.39	62.68	2.05
Monounsaturat	16.91	2.16	15.11	1.49	16.92	1.14	16.15	1.92
Polyunsaturatec	23.55	2.95	22.99	1.18	20.55	1.29	21.67	1.19
n-3	17.80	0.64	20.34	1.25	17.53	1.28	18.72	1.17
n-6	16.25	2.65	15.15	0.82	14.87	0.76	14.79	1.21
EPA	9.23	0.60	8.51	0.58	8.14	0.57	8.29	0.61
DHA	7.98	0.37	11.42	0.71	8.96	0.71	10.12	1.12
DHA/EPA	0.86	0.08	1.34	0.05	1.10	0.04	1.22	0.19
DHA/ARA	19.69		26.51		21.46		24.41	
EPA/ARA	22.77		19.74		19.51		20.00	
inoleic Acid/AR	2.87		1.35		2.00		1.76	
inolenic acid/EP	0.13		0.07		0.10		0.09	
nolenic acid/DE	0.16		0.001		0.001		0.003	

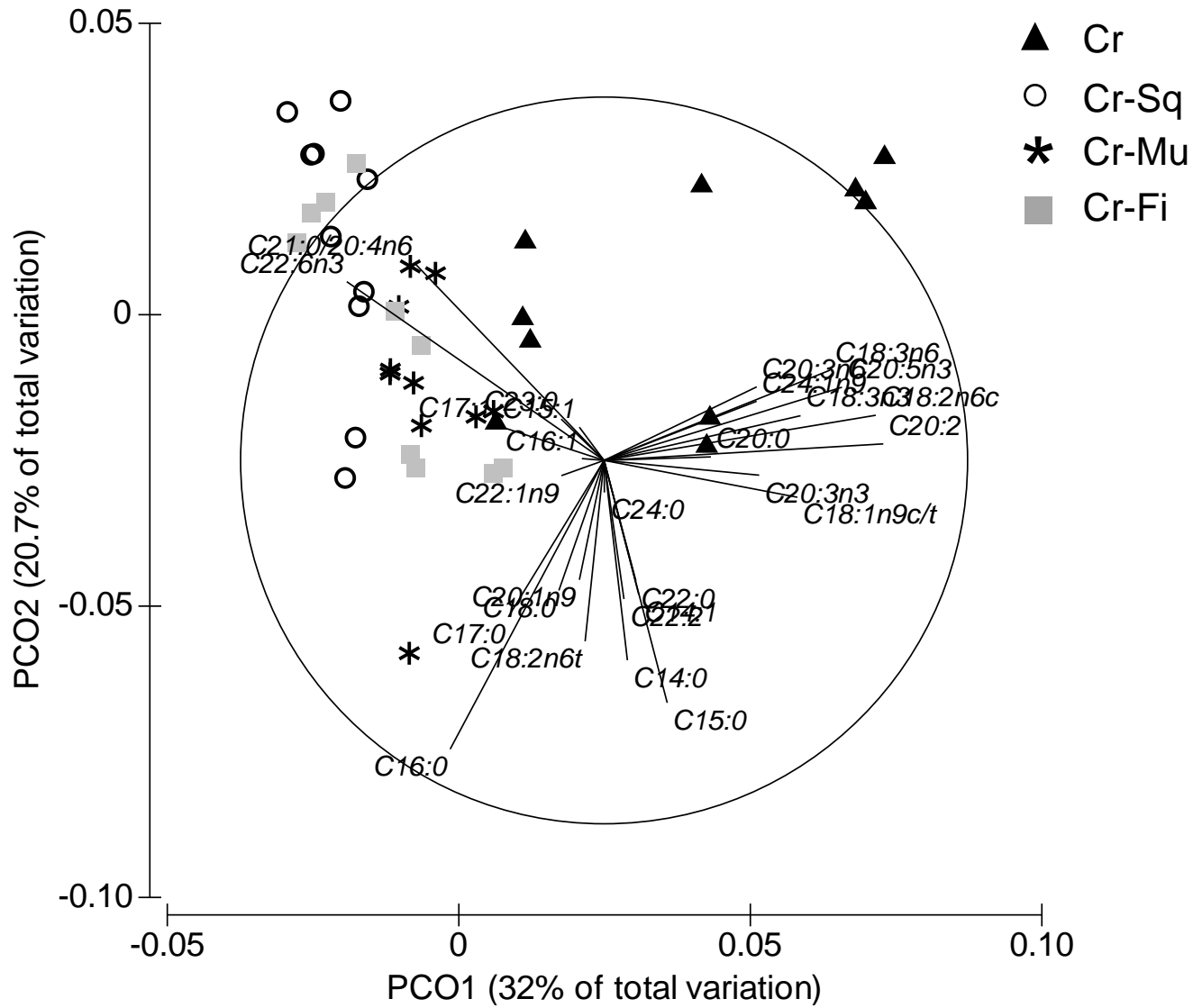


FIG. 6

Table 6. Amino acids content in the yolk of 1 d old embryos obtained from *O. maya* females fed different diets. Data are mean values \pm SD.

Amino Acids in yolk		FEMALE DIETS											
		Crab			Crab-Squid			Crab-Mussel			Crab-Fish Heads		
EAA	His	1.18	\pm	0.04	1.26	\pm	0.07	1.38	\pm	0.17	1.38	\pm	0.05
	Thr	3.74	\pm	0.1	3.91	\pm	0.15	4.22	\pm	0.23	4.23	\pm	0.13
	Arg	4.2	\pm	0.19	4.49	\pm	0.23	4.57	\pm	0.34	5.09	\pm	0.39
	Val	3.61	\pm	0.09	4.05	\pm	0.14	4.17	\pm	0.21	4.32	\pm	0.17
	Me	1.55	\pm	0.05	1.42	\pm	0.08	1.61	\pm	0.15	1.57	\pm	0.07
	Lys	5.74	\pm	2.43	6.96	\pm	0.4	6.93	\pm	0.72	1.62	\pm	2.17
	Ile	2.9	\pm	1.47	4.07	\pm	0.18	3.43	\pm	1.73	1.48	\pm	1.45
	Leu	7.19	\pm	1.99	8.54	\pm	0.24	8.88	\pm	0.39	4.75	\pm	1.57
	Phe	2.75	\pm	0.11	2.97	\pm	0.15	3.12	\pm	0.41	3.04	\pm	0.12
NEAA	Asp	6.63	-	0.17	6.49	-	0.2	6.53	-	0.53	6.67	-	0.21
	Ser	4.06	\pm	0.1	4.08	\pm	0.12	4.27	\pm	0.2	4.32	\pm	0.1
	Glu	10.6	\pm	0.24	10.9	\pm	0.28	11	\pm	0.76	11.3	\pm	0.32
	Gly	1.35	\pm	0.04	1.33	\pm	0.05	1.43	\pm	0.09	1.42	\pm	0.04
	Ala	2.51	\pm	0.05	2.48	\pm	0.05	2.54	\pm	0.09	2.59	\pm	0.07
	Pro	2.48	\pm	0.07	2.47	\pm	0.05	2.72	\pm	0.14	2.77	\pm	0.11
	Tyr	2.84	\pm	0.1	2.84	\pm	0.15	3.12	\pm	0.44	3.12	\pm	0.15
TOTAL													
EAA	32.86			37.67			38.31			27.48			
NEAA	30.5			30.55			31.56			32.23			

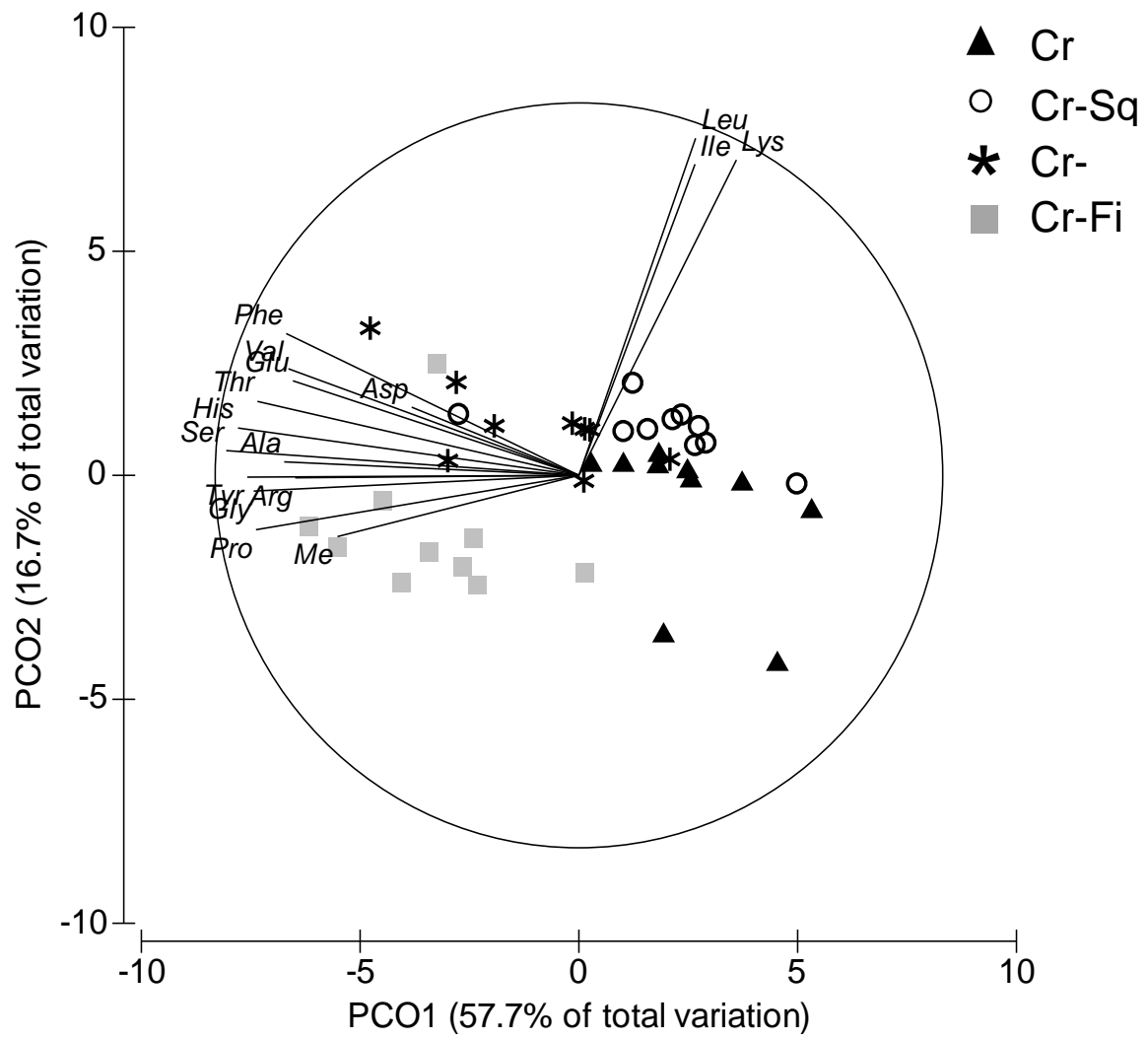


FIG. 7

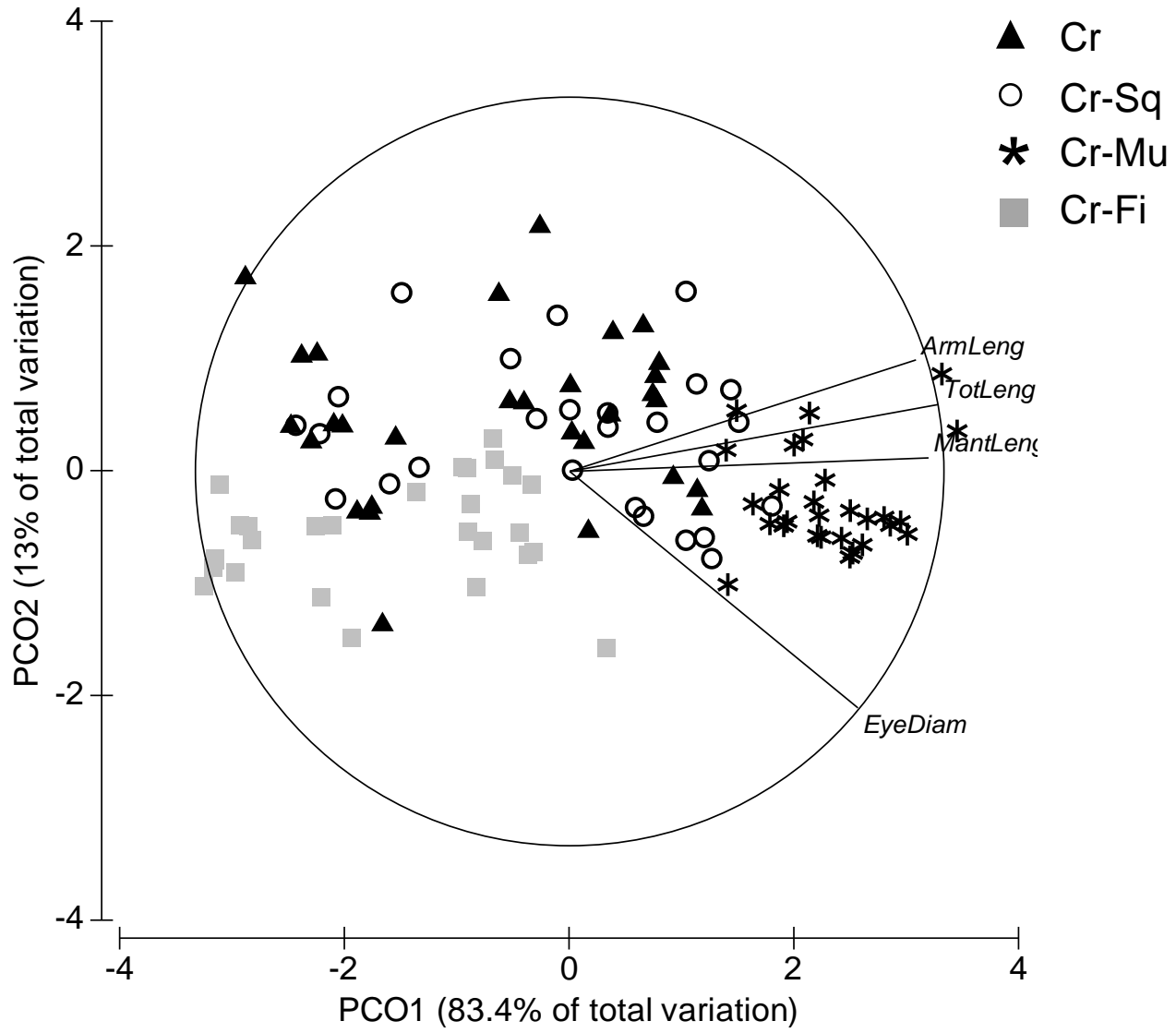


Fig. 8.