



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Departamento de Biología y Ambiente

Factibilidad biológica del cultivo de los estadios tempranos del pulpito *Octopus tehuelchus*

Lic. Ramiro Braga

Directores: Dr. Nicolás Ortiz y Dra. Silvina Van der Molen

2022

PUERTO MADRYN

“El mar es la gran reserva de la naturaleza. El mundo, por así decirlo, comenzó en el mar, y quién sabe si no terminará en él. En él está la tranquilidad suprema. El mar no pertenece a los déspotas. En su superficie, aún pueden ejercer sus inicuos derechos, pelearse, devorarse y transportar todos los horrores terrestres, pero a treinta pies de profundidad, su poder cesa, su influencia se extingue y su imperio desaparece. ¡AH, señor, viva usted en el seno de los mares! ¡Solo ahí existe la independenciam! ¡Ahí no reconozco señor alguno!

¡Allí soy libre! “



20.000 Leguas de Viaje Submarino
Julio Verne (1828-1905)

Al Mar, a la Patagonia, al Metal Pesado...



AGRADECIMIENTOS

A mi director Nicolás Ortiz y a mi directora Silvina Van der Molen por la guía permanente a lo largo de mi formación y por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado junto a estos animales crípticos.

A Julián Pontones, Jimena Dima, Yamila Rodríguez, Analía Fernández, Antonela Martelli, Marianela Arijón y a todas las personas que pasaron por el Laboratorio de Cefalópodos para contribuir con mi trabajo.

A mi familia y sobre todo a mis viejos por regalarme aquel microscopio de juguete hace 27 años.

A mis amigos esparcidos por Quilmes y Puerto Madryn.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, al Centro Nacional Patagónico.

A la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, principalmente a Gabriel Casal y a Sandra Feijoo por la buena predisposición.

A los jurados Gaspar Soria, Lorena Storero y Pedro Barón por los valiosos aportes realizados a esta tesis.

A Alexandra Elbakyan por soñar con una ciencia libre y universal.

A Plutón.

A Nicolás Battini y Guillermo Gutiérrez por los buceos compartidos.

A Diente de Perro y a Therium por su música.

A Churro, a mi Q.:H.: Juan Martin Quiroga y a todos los librepensadores que pueblan la faz de la Tierra.

Somos víctimas fatales de las cosas del estado.

Somos víctimas fatales del estado de las cosas.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	4
TABLA DE CONTENIDOS	5
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	12
TRABAJOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE LA TESIS.....	16
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	18
OBJETIVOS.....	29
METODOLOGÍA GENERAL.....	31
ÁREA DE MUESTREO.....	32
OBTENCIÓN DE MASAS DE HUEVOS	33
ACONDICIONAMIENTO E INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE LOS HUEVOS	35
MANTENCIÓN Y CUIDADO DE LOS JUVENILES.....	36
CONSIDERACIONES DE ÉTICA Y CUIDADO ANIMAL	37
CAPÍTULO I.....	38
DESARROLLO EMBRIONARIO Y DESEMPEÑO DE LOS JUVENILES DE <i>OCTOPUS TEHUELCHUS</i> BAJO DISTINTOS REGÍMENES TÉRMICOS DE INCUBACIÓN.....	38
INTRODUCCIÓN.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
DISEÑO EXPERIMENTAL E INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE HUEVOS	44
EMBRIONES: ANÁLISIS MORFOLÓGICO, SUPERVIVENCIA Y TIEMPO DE DESARROLLO.....	45
JUVENILES: DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y SUPERVIVENCIA SIN ALIMENTACIÓN	46
ANÁLISIS DE DATOS.....	47
RESULTADOS.....	49
TIEMPO DE EMBRIOGÉNESIS, PERIODO DE ECLOSIÓN Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES	50
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS EMBRIONES.....	53
SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA.....	56
DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS JUVENILES	58
SUPERVIVENCIA EN INANICIÓN DE LOS JUVENILES	61
DISCUSIÓN.....	64
CAPÍTULO II.....	72
RESPUESTA ENZIMÁTICA, CAMBIOS CITOLÓGICOS DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA Y CAMBIOS MORFOMÉTRICOS CORPORALES EN JUVENILES DE <i>OCTOPUS TEHUELCHUS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE ALIMENTACIÓN	72
INTRODUCCIÓN.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS	78
RECOLECCIÓN E INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE HUEVOS	79
CRÍA Y MANTENIMIENTO DE LOS JUVENILES	79
DISEÑO EXPERIMENTAL	79
MEDICIONES MORFOMÉTRICAS DE LOS JUVENILES	80
COMPORTAMIENTO PREDATORIO DE LOS JUVENILES	80
PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA.....	81
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA	81
ANÁLISIS DE DATOS.....	83
RESULTADOS.....	85
CAMBIOS MORFOMÉTRICOS EN JUVENILES DE <i>OCTOPUS TEHUELCHUS</i>	86
COMPORTAMIENTO PREDATORIO EN JUVENILES DE <i>OCTOPUS TEHUELCHUS</i>	87
CAMBIOS CITOLÓGICOS EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA.....	87

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA	90
DISCUSIÓN	93
CAPÍTULO III	101
TASAS DE CRECIMIENTO E ÍNDICES BIOENERGÉTICOS DE LOS JUVENILES DE <i>OCTOPUS TEHUELCHUS</i> BAJO DOS REGÍMENES DE ALIMENTACIÓN.....	101
INTRODUCCIÓN.....	102
MATERIALES Y MÉTODOS	109
RECOLECCIÓN E INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE HUEVOS	110
MANTENIMIENTO DE LOS JUVENILES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	110
OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ALIMENTO	111
CARACTERIZACIÓN Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL ALIMENTO	113
ESTIMACIÓN DE LAS TASAS DE MORTALIDAD.....	114
ESTIMACIÓN DEL ALIMENTO INGERIDO.....	114
ESTIMACIÓN DE LAS TASAS DE CRECIMIENTO	115
ESTIMACIÓN DE LOS ÍNDICES BIOENERGÉTICOS.....	116
<i>TASAS DE ALIMENTACIÓN</i>	116
<i>EFICIENCIA DE ASIMILACIÓN TOTAL</i>	116
ANÁLISIS DE DATOS.....	117
RESULTADOS.....	118
COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL ALIMENTO	119
MORTALIDAD	120
PATRONES DE CRECIMIENTO	121
TASAS DE CRECIMIENTO E ÍNDICES BIOENERGÉTICOS.....	125
DISCUSIÓN.....	128
CONCLUSIONES	135
REFERENCIAS.....	139
ANEXOS.....	162

RESUMEN

En el mundo, el cultivo de cefalópodos despierta un alto interés tanto académico como comercial. Características tales como un crecimiento rápido, ciclos de vida cortos asociados a una elevada producción de biomasa y la gran aceptación que poseen en los mercados gastronómicos, los sitúa como candidatos atractivos para la acuicultura marina. Sin embargo, los cuellos de botella vinculados a los estadios tempranos de desarrollo resultan limitantes para el avance del cultivo. El “pulpito” *Octopus tehuelchus* (d’Orbigny 1834) es una especie endémica de Sudamérica, cuyo ciclo de vida es bentónico y poco se sabe de sus estadios tempranos. Enmarcado en el proyecto de estudiar la factibilidad de cultivo de esta especie, el objetivo general de esta tesis es determinar los parámetros biológicos y las tecnologías asociadas para el cultivo de las fases tempranas de desarrollo de *O. tehuelchus*. Considerando que en los cefalópodos la temperatura es el factor principal que modula la embriogénesis, como primer objetivo se planteó evaluar el efecto de distintos regímenes térmicos de incubación en la duración de la embriogénesis y en la supervivencia embrionaria, como así también en el desempeño (supervivencia y variaciones morfológicas) de los juveniles. Para esta experiencia se utilizaron puestas de huevos incubadas artificialmente a 13° y 16 °C en condiciones controladas de acuario; una vez eclosionados, los juveniles se mantuvieron en inanición a las mismas temperaturas. Los resultados mostraron que a 16 °C la duración de la embriogénesis fue en promedio de 101 días y a 13 °C fue de 186 días. En ambos tratamientos térmicos, las mayores mortalidades se registraron hasta comenzar la organogénesis y no se observaron diferencias significativas en el éxito de eclosión (promedio 64 %). Por otra parte se observó que, a 16 °C, los juveniles fueron de mayor tamaño al momento de la eclosión pero con una sobrevida en inanición menor que los juveniles mantenidos a 13 °C. El patrón de cromatóforos de los juveniles fue el mismo para ambos tratamientos térmicos y distintivo de las otras especies costeras de pulpos. En las crías de cefalópodos existe un período de

transición crítico en el cual el sistema digestivo, más precisamente la glándula digestiva (GD), sufre cambios asociados al paso del consumo de las reservas vitelinas a una alimentación exógena. Así, como segundo objetivo se planteó determinar los cambios morfofisiológicos asociados al sistema digestivo que ocurren durante el período post eclosión. Para este objetivo se evaluaron los cambios citológicos y enzimáticos de la GD junto con la variación en tamaño de juveniles sometidos a dos tratamientos alimentarios: alimentados con isópodos *Exosphaeroma* sp. y en inanición, ambos a 16 °C. En los dos tratamientos, durante los primeros 6 días los juveniles no mostraron crecimiento somático ni diferenciación celular de la GD, pero sí una activación de las enzimas ácidas. En los juveniles alimentados, luego de la primera semana y hasta el día 25, se registró un aumento progresivo en el tamaño y en el peso, como así también la maduración total de la GD y la máxima actividad de las enzimas alcalinas. En contraposición, los juveniles en inanición no presentaron crecimiento somático ni diferenciación celular en la GD. Además, se observó una baja actividad de las enzimas relacionadas con el consumo de vitelo, aun teniendo plaquetas de vitelo disponibles. En las etapas de pre-engorde y engorde los principales desafíos se centran en producir un alimento formulado que supla las dietas naturales; así, como último objetivo se planteó estimar las tasas de crecimiento e índices bioenergéticos de los juveniles de *O. tehuelchus* bajo diferentes dietas. Para este ensayo se utilizaron juveniles mantenidos a 16 °C sometidos a dos dietas: isópodos *Exosphaeroma* sp. y alimento formulado (pasta semi-húmeda). Los juveniles alimentados con isópodos mostraron un incremento en peso promedio de 431 % al finalizar el tratamiento, mientras que los alimentados con pasta no presentaron crecimiento alguno. Si bien en ambos tratamientos los juveniles se alimentaron, los ejemplares que consumieron isópodos presentaron una mayor ingesta de alimento, con tasas de crecimiento positivas y una asimilación del alimento ingerido del 46 %. Al finalizar los experimentos, a los 84 días de edad, la

mortalidad total de los juveniles fue de 44,8 % y del 100 % para los juveniles alimentados con isópodos y con pasta, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que la temperatura es un factor modulador de la embriogénesis y del desempeño de los juveniles. Desde un punto de vista ecológico, los embriones y juveniles de *O. tehuelchus* contarían con mecanismos adaptativos que les permitirían sobrevivir a las fluctuaciones de temperatura en las aguas de Patagonia Norte. Desde un punto de vista de cultivo, trabajar dentro del rango térmico utilizado permitiría programar la obtención de juveniles viables a diferentes tiempos. Por otro lado, la ingesta de isópodos pareciera actuar como un alimento desencadenante y regulador de la maduración y dinámica digestiva; y cumpliría con los requerimientos nutricionales de las etapas tempranas de los juveniles. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que los estadios tempranos de desarrollo son factibles de ser cultivados bajo las condiciones ensayadas. No obstante, será necesario desarrollar alimentos formulados de bajo costo que suplan el alimento vivo y permitan escalar las distintas etapas del cultivo de *O. tehuelchus*.

ABSTRACT

Worldwide, the culture of cephalopods arouses a high academic and commercial interest. Characteristics such as rapid growth, short life cycles associated with high biomass production and their great acceptance in gastronomic markets make cephalopods attractive candidates for marine aquaculture. However, the bottlenecks linked to the early stages of development limit the advancement of their culture. *Octopus tehuelchus* (d'Orbigny 1834) is an endemic species from South America with a benthic life cycle and little is known about its early stages. In the context of studying the culture feasibility for this species, the general objective of this thesis is to determine the biological parameters and associated technologies for the cultivation of *O. tehuelchus* early developmental phases. Considering that in cephalopods temperature is the main factor modulating embryogenesis, the first objective was to determine the effect of different thermal incubation regimes on embryogenesis and embryos' survival, and to evaluate the performance (survival and morphological variations) of juveniles. For this experience, egg clutches artificially incubated at 13° and 16 °C under controlled aquarium conditions were studied and, once hatched, the juveniles were kept starved within the same temperatures. The results showed that at 16 °C the duration of embryogenesis was on average 101 days and at 13 °C it was 186 days. In both thermal treatments, the highest mortalities were recorded until organogenesis began and no significant differences were observed in hatching success (mean 64 %). Moreover, it was observed that at 16 °C, the newborn juveniles were larger but with less survival time in starvation than the juveniles kept at 13 °C. The juveniles chromatophore pattern was the same for both thermal treatments and distinctive from the other coastal octopus' species. In cephalopod hatchlings there is a transitional period considered critical, in which the digestive system, particularly the digestive gland (DG), undergoes morphophysiological changes associated with the passage from the consumption of vitelline reserves to an independent feeding. Thereby, the second objective was to

determine the morphophysiological changes associated to the digestive system during the early post hatching period. In this experiment, juveniles were kept at 16 °C and fed with *Exopshaeroma* sp. or in starvation. In both treatments, during the first 6 days, the juveniles did not show somatic growth or cell differentiation of the DG, but an activation of acid enzymes occurred. In the juveniles fed with isopods, after the first week and up to day 25, a progressive increase in size and weight was recorded, as well as the total maturation of the DG and the maximum activity of the alkaline enzymes. In contrast, starved juveniles did not show somatic growth nor cell differentiation in the DG. In addition, a low activity of the enzymes related to yolk consumption was observed, even though yolk platelets were available. During pre-fattening and fattening stages, the main challenge is producing a formulated food that replace natural diets; thus, the third objective is to estimate juveniles' growth rates and bioenergetics indices under two different diets. Regarding this experiment, juveniles were kept at 16 °C and studied under two dietary treatments: isopods *Exopshaeroma* sp. and formulated food (semi-moist paste). The juveniles fed with isopods showed an average weight increase of 431 % at the end of the treatment, while the juveniles fed with the formulated food did not show any growth, reflected in their negative growth rates. Although in both treatments the juveniles fed, the specimens that consumed isopods presented a higher total food intake, obtaining positive growth rates and an assimilation of ingested food of 46 %. Total mortality was 44.8 % and 100 % for juveniles fed with isopods and formulated food, respectively. In general terms, temperature is a modulating factor of embryogenesis and juveniles' performance. From an ecological point of view, the embryos and juveniles of *O. tehuelchus* would have adaptive mechanisms that would allow them to survive temperature fluctuations in Northern Patagonia waters. From a culture point of view, working within the thermal range used would allow programming the procurance of viable juveniles at different times. Furthermore, the

ingestion of isopods seems to act as a triggering and regulating element of the digestive dynamics and of the maturation processes; besides, this isopod species would meet the nutritional requirements of the early stages of juveniles. The results of this thesis show that the early stages of development can be cultivated under the conditions tested. However, it is necessary to develop low cost formulated foods that replace live food and allow its cultivation at different scales.

TRABAJOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE LA TESIS

Braga, R., Van der Molen, S., Rodriguez, Y. E., Fernández-Giménez, A. V., Battini, N., Rosas, C., & Ortiz, N. (2022). Morphophysiological responses of *Octopus tehuelchus* juveniles during the transition period between endogenous and exogenous feeding. *Aquaculture*, 738269.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738269>

Braga, R., Van der Molen, S., Pontones, J., & Ortiz, N. (2021). Embryonic development, hatching time and newborn juveniles of *Octopus tehuelchus* under two culture temperatures. *Aquaculture*, 530, 735778.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735778>

XI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Comodoro Rivadavia Argentina 2022.
Cambios morfofisiológicos de los juveniles del pulpito *Octopus tehuelchus* durante la transición entre la alimentación endógena y exógena, bajo condiciones de cultivo.
Braga R; Van der Molen S; Rodriguez YE; Fernández-Giménez AV; Battini N; Rosas C; Ortiz N.

XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, Mar del Plata Argentina 2019.

Actividad enzimática de la glándula digestiva en juveniles de pulpito *Octopus tehuelchus* (D'Orbigny, 1834) bajo dos condiciones de alimentación. Libro de resúmenes. Pp 386. **Braga R**; Rodriguez YE; Fernández-Gimenez AV; Van Der Molen S; Ortiz N.

IV Jornadas de Presentación de Trabajos de Ingeniería Pesquera, Puerto Madryn Argentina 2018.

Resultados preliminares de la incubación de huevos de pulpo con el copépodo *Tisbe* sp. Pérez Defeo J; **Braga R**; Berrueta M; Van Der Molen S; Ortiz N.

X Jornadas Nacionales de Ciencias Del Mar, Buenos Aires Argentina 2018.

Hacia el cultivo de *Octopus tehuelchus*: ensayos de crecimiento de juveniles y tiempos de sobrevida sin alimentación. Libro de resúmenes. Pp 332. **Braga R**; Van Der Molen S; Dichiera N; Ortiz N.

Taller sobre avances en el Cultivo de Especies Marinas Australes, Mar del Plata Argentina 2017.

Pulpos patagónicos: Cultivo experimental de *Octopus tehuelchus*. **Braga R**; Van Der Molen S; Ortiz N.

X Congreso Latinoamericano de Malacología, Piriápolis Uruguay 2017.

Efecto de la temperatura de incubación en el desarrollo embrionario del pulpito *Octopus tehuelchus*, bajo condiciones de cultivo experimental. Libro de resúmenes. Pp 27. **Braga R**; Van Der Molen S; Crespi-Abril AC; Ortiz N.

Descripción morfológica y tiempos de sobrevida de juveniles de *Octopus tehuelchus* sin alimentación en condiciones controladas de acuario. Libro de resúmenes. Pp 26. **Braga R**; Van Der Molen S; Crespi-Abril AC; Ortiz N.

6ta Jornada de Presentación de Becarios, Divulgando la Ciencia, Puerto Madryn Argentina 2016.

Factibilidad biológica de los estadios tempranos del pulpito *Octopus tehuelchus*. Libro de resúmenes. Pp 29. **Braga R**; Van Der Molen S; Crespi-Abril AC; Ortiz N.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La historia sobre el cultivo de cefalópodos es reciente, y si bien existen reportes tempranos sobre su mantención y experimentación en cautiverio (Grimpe 1928, Naef 1928), los mayores avances sobre el cultivo de estos animales tienen su origen en la década de 1960 (Iglesias *et al.* 2014, Sykes *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2014). Entre los estudios pioneros están los llevados a cabo por Ohshima y Choe (1961) y por Itami y colaboradores (1963) relacionados con el desarrollo embrionario y crecimiento del calamar de arrecife de aleta grande, *Sepioteuthis lessoniana* y del pulpo común *Octopus vulgaris*. Con el pasar del tiempo, esta actividad se ha diversificado hacia proyectos de investigación orientados a la producción alimenticia (Rosas *et al.* 2007, Vidal *et al.* 2014), al repoblamiento (Nabhitabhata y Segawa 2014, Zheng *et al.* 2014), al desarrollo de modelos experimentales en campos como la neurociencia y la fisiología (Hanlon 1987, Gilbert *et al.* 1990, Koueta y Boucaud-Camou 1999), a la producción ornamental (Vidal *et al.* 2014) y a áreas de la biomedicina como lo es la regeneración de tejidos humanos (Rohrbach y Schmidtberg 2006, Miserez *et al.* 2009, Chiao y Chiao 2011, Laschi *et al.* 2012, Fox *et al.* 2013). Sin embargo, a pesar de esta proyección favorable, actualmente sólo es posible el cultivo para consumo como alimento a pequeña escala de pocas especies, como en los pulpos *Octopus maya* y *O. vulgaris* (por medio de engorde de subadultos en jaulas), *S. lessoniana* y la sepia europea *Sepia officinalis* (Walsh *et al.* 2002, Iglesias *et al.* 2007, Cerezo-Valverde *et al.* 2012, Sugita 2012, Rosas *et al.* 2013, Sykes *et al.* 2013, Martínez *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2014).

Determinadas características presentes en los cefalópodos, tales como poseer un ciclo de vida corto, crecimiento rápido y desarrollo directo, junto con una gran adaptabilidad a las condiciones en cautiverio, especialmente de las sepias y los pulpos, los sitúan como animales de gran potencial para el cultivo (Vidal *et al.* 2014). A su vez, en un contexto global, la presión de pesca sobre las poblaciones naturales de peces ha causado una disminución de las mismas, desplazando la actividad pesquera hacia otras

especies marinas, entre ellas las representadas por los cefalópodos (Pierce y Portela 2014, Rodhouse *et al.* 2014, FAO 2018). Desde 1950, las capturas de pulpos, sepias y calamares costeros y oceánicos experimentaron un incremento constante, sustentando pesquerías industriales y artesanales (Caddy y Rodhouse 1998, Hunsicker *et al.* 2010, Pierce y Portela 2014, Rodhouse *et al.* 2014). Sin embargo, luego de un pico de 4,9 millones de toneladas en 2014, las capturas de cefalópodos experimentaron una disminución notoria en sus desembarques (Pierce y Portela 2014, FAO 2020). Entre 2017 y 2018 las capturas de cefalópodos se redujeron a 3,6 millones de toneladas (FAO 2020). Estas observaciones indicarían una disminución crítica de los recursos de cefalópodos debido a la sobrepesca (Worm *et al.* 2009, Hilborn 2012, Rodhouse *et al.* 2014). En este sentido, la acuicultura, en un mediano y largo plazo, podría sustituir lo producido por el sector pesquero (Iglesias *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2014).

La acuicultura se caracteriza por ser el sector que más ha crecido en cuanto a la producción de alimentos de origen animal; actualmente existen alrededor de 622 especies acuáticas bajo cultivo en todo el mundo (FAO 2020). Con un incremento en la producción acuícola del 7,5 % por año desde 1970, la acuicultura se sitúa como la principal fuente sostenible para la obtención de recursos acuáticos. En la actualidad, esta actividad sobrepasó en producción (122 millones de toneladas) a los volúmenes obtenidos por la pesca (91,4 millones de toneladas) (FAO 2021). A nivel mundial, la producción acuícola de invertebrados superó las 26 millones de toneladas en el 2017 (FAO 2019). Aunque las principales líneas de cultivo se encuentran enfocadas en la producción de camarones, langostinos y bivalvos, con reportes de 22 millones de toneladas en el 2019, continúan los estudios para ampliar la utilización de otras especies de invertebrados en prácticas acuícolas (FAO 2019, Coban *et al.* 2020). En la actualidad, el cultivo de cefalópodos representa solo el 1 % de la producción por acuicultura de moluscos; su demanda como producto alimenticio es cubierta casi en su totalidad por la

pesca (FAO 2021). Sin embargo, la creciente demanda de alimentos para el consumo humano a nivel mundial, ha motivado un fuerte interés para el desarrollo de tecnologías de cultivo asociadas a diferentes especies de cefalópodos (FAO 2013, Iglesias *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2014).

Los cefalópodos se caracterizan por tener un desarrollo directo. Según el modo de vida que presenten al nacer, los cefalópodos octópodos se diferencian en dos grandes grupos: las especies meropelágicas cuyos especímenes recién nacidos (denominados paralarvas) presentan un comportamiento ecológico diferente al adulto, caracterizado por tener un periodo inicial de natación libre en la columna de agua, para luego adquirir el modo de vida bentónico al igual que los adultos; y las especies holobentónicas, cuyos individuos recién nacidos (denominados juveniles) exhiben un modo de vida directamente bentónico desde la eclosión (Boletzky 2003, Ortiz *et al.* 2006, Ortiz y Ré 2011, Vidal *et al.* 2014, Villanueva *et al.* 2021). A su vez, el estadio juvenil comprende el periodo entre la eclosión y el subadulto en aquellas especies holobentónicas y el periodo entre la paralarva y el subadulto en especies meropelágicas. Durante este periodo, los individuos poseen los caracteres morfológicos diagnósticos para la especie a excepción de la maduración sexual total y el tamaño final (Young y Harman 1988, Sweeney *et al.* 1992).

Lograr la sobrevivencia a la fase planctónica que presentan las especies de pulpos con estadio paralarvario es uno de los grandes cuellos de botella que dificulta el desarrollo del cultivo. En esta fase, de pulpo son extremadamente sensibles al estrés, a las lesiones físicas en la piel ocasionadas por el contacto contra los acuarios y, principalmente, a la falta de presas adecuadas, tanto en cantidad como en calidad, que logren satisfacer las demandas nutricionales (Villanueva 1995, Vidal *et al.* 2002a, Iglesias *et al.* 2007, Sánchez *et al.* 2013). Una vez alcanzada la etapa bentónica, las condiciones experimentales de cuidado, mantenimiento y alimentación resultan menos rigurosas (Iglesias *et al.* 2004).

Es por esto que la factibilidad del cultivo de cefalópodos es incipiente, limitado principalmente a la factibilidad biológica y acuícola, según la especie involucrada (Vidal *et al.* 2014), y solo factible económicamente en especies que presentan juveniles bentónicos como *S. lessoniana* (Hanlon 1990), *S. officinalis* (Forsythe *et al.* 1994) y de *O. maya* (Voss y Solís 1966, Rosas *et al.* 2007), con la excepción del engorde de subadultos de *O. vulgaris* (Chapela *et al.* 2006).

Otro de los aspectos que resultan críticos para el cultivo de cefalópodos se enfoca en el periodo de transición entre el consumo de las reservas de vitelo interno del individuo recién nacido y la alimentación exógena (Boletzky 1989, Moguel *et al.* 2010). En esta etapa de transición los individuos atraviesan cambios morfofisiológicos tanto en órganos externos como internos, particularmente en el sistema digestivo, durante la cual se tornan competentes para cazar y alimentarse de fuentes de alimento externas (Vidal *et al.* 2002a, 2005, Moguel *et al.* 2010, Martínez *et al.* 2011, Gallardo *et al.* 2017). En dicho periodo las características que posea el alimento ofertado a los juveniles en cuanto a calidad y palatabilidad resultarán decisivas para el crecimiento de los especímenes y, por lo tanto, para lograr avances en las prácticas de cultivo (Cerezo-Valverde *et al.* 2008, Quintana *et al.* 2011).

En organismos poiquilotermos como los cefalópodos, existe una relación directa entre la capacidad de su metabolismo y la temperatura (Forsythe *et al.* 2001). En tal sentido es que en los estadios tempranos de desarrollo, la temperatura es determinante en la duración de la embriogénesis, en la tasa de absorción de las reservas de vitelo y en las tasas de crecimiento y alimentación de los juveniles, así como en los tiempos de sobrevivencia post eclosión (Mangold y Boletzky 1973, Boletzky 1987, Domingues *et al.* 2001, 2002, Vidal *et al.* 2002a,b, 2014, Grigoriou y Richardson 2004, 2008, Iglesias *et al.* 2014, Villanueva *et al.* 2016, Uriarte *et al.* 2016, Schwarz *et al.* 2018). Por lo tanto, ensayar el cultivo de los estadios tempranos con temperaturas que se mantengan dentro

de los rangos a los cuales las especies se encuentran adaptadas resulta decisivo para lograr cultivos exitosos (Boyle 1991, Noyola *et al.* 2013b, Vidal *et al.* 2014).

Entre las especies de pulpos costeros presentes en el Mar Argentino, el “pulpito” *Octopus tehuelchus* (d’Orbigny 1834) (Figura 1) es el más estudiado tanto en sus aspectos biológicos, ecológicos y pesqueros como sociales e históricos (Iribarne *et al.* 1991, Ré 1998, Ré y Ortiz 2008, Storero y Narvarte 2013, Fassiano *et al.* 2017, Bocco *et al.* 2019). Es una especie endémica de América del Sur que se encuentra en el Océano Atlántico, desde Porto Seguro en Brasil (17 °S) hasta el norte del Golfo San Jorge, en la Patagonia Argentina (45 °S) (Ré 1998) (Figura 2).



Figura 1. Ejemplar adulto de *Octopus tehuelchus*.

Octopus tehuelchus se distribuye desde ambientes intermareales hasta los 100 metros de profundidad (Ré 1998, Narvarte *et al.* 2006, Storero *et al.* 2010). Se caracteriza por ser una especie holobentónica (Ré 1989), semélpara y con un ciclo de vida que dura entre 18 y 24 meses (Ré 1998). Es un pulpo con un peso y largo dorsal del manto promedio de 70-80 g y 60 mm en individuos adultos y con registros que alcanzan los 320 g y los 96 mm (Ré 1998, Storero *et al.* 2010, Pontones *et al.* 2018a). La especie posee una fecundidad que oscila entre 40 y 80 huevos (Pujals 1986), con un máximo de 220 huevos por puesta, y es considerada desovante simultánea terminal, es decir con un

patrón de ovulación sincrónico y que desovan una sola vez en la vida (Iribarne 1990, Ré 1998, Storero *et al.* 2012).

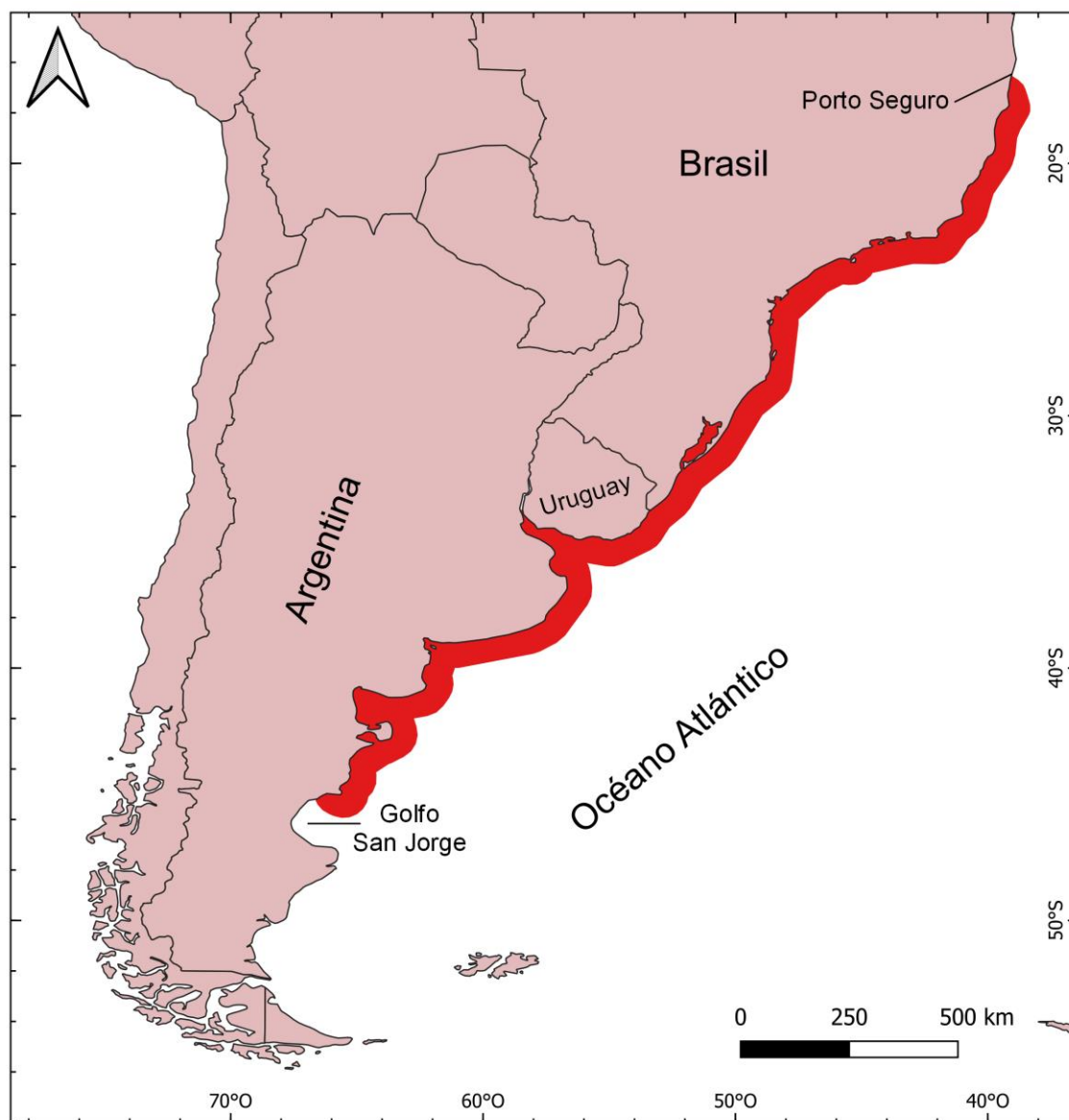


Figura 2. Área de distribución de *Octopus tehuilchus* (rojo).

Las puestas están conformadas por huevos grandes de 9-12 mm largo x 3-5 mm ancho, los cuales se disponen de manera individual o en racimos de dos o tres pegados sobre las valvas de moluscos o en superficies rocosas e incluso en sustratos de origen antrópico (Ré 1989, Iribarne 1990, Ré y Comes 2003, Voglino Carrera 2016). En los golfos San Matías, San José y Nuevo O. *tehuilchus* presenta un ciclo reproductivo estacional bien marcado, con un periodo de puesta y cuidado parental que abarca desde

el otoño hasta la primavera, habitualmente en aguas someras menores a 20 metros de profundidad (Iribarne 1990, Ré 1998, Ré y Comes 2003, Storero *et al.* 2010, Voglino Carrera 2016, Pontones *et al.* 2018b).

En Argentina existen pesquerías de pequeña escala que se desarrollan en las costas de Río Negro, Chubut y Santa Cruz y que tienen como especies objetivo al pulpito, *O. tehuelchus* y al pulpo colorado patagónico, *Enteroctopus megalocyathus* (Ré y Ortiz 2008, Ortiz 2009). Desde la década de 1930, *O. tehuelchus* se considera un recurso de alta relevancia regional por parte del sector artesanal (Ré 1998, Narvarte *et al.* 2006, Bocco *et al.* 2019). Esta pesquería, llamada “pulpeo”, es tradicionalmente llevada a cabo por familias de pescadores durante la temporada estival en los ambientes intermareales (Narvarte *et al.* 2006, Storero 2010). A su vez, esta especie también es capturada en ambientes submareales mediante el uso de trampas fondeadas a diferentes profundidades, tanto por pescadores artesanales como recreativos. Las capturas máximas reportadas para esta especie en Río Negro fueron de aproximadamente 300 toneladas anuales entre los años 1965 y 1974 (Iribarne 1991). Luego, durante la década de 1990 estas capturas declinaron drásticamente a menos de 50 toneladas anuales y para finales de la década de 2010 no superaron las 30 toneladas anuales (Iribarne 1991a, Narvarte *et al.* 1996, Storero 2010). Actualmente el pulpeo beneficia a las comunidades de pescadores y también contribuye al crecimiento económico del área mediante la oferta en la gastronomía local (Ré 1998, Narvarte *et al.* 2006). Sin embargo, esta práctica a pesar de mantenerse activa ha experimentado cambios sustanciales. Las rutas o caminos utilizados tradicionalmente por los pulperos se han modificado, ya sea por la presencia de campos privados, estancias o tramos en mal estado que dificultan el acceso a las zonas de pesca. A su vez, esta actividad ha dejado de ser itinerante y luego de unos pocos días de recolección, los pescadores regresan a sus hogares, evitando pernoctar en los antiguos puestos durante meses (Bocco *et al.* 2019).

La pesca artesanal de *E. megalocyathus* es llevada a cabo tanto en aguas del Océano Atlántico (Argentina) como en las aguas del Océano Pacífico (Chile). Su pesca se realiza mediante la utilización de ganchos en el intermareal y, en mayor medida, por buceo autónomo en el submareal (Ré 1998, Cinti *et al.* 2003, Ortiz 2009). En el sector chileno, hasta el año 2004, los registros sobre las capturas de pulpo colorado rondaron entre las 200 y 500 toneladas anuales (Chong *et al.* 2001, Osorio *et al.* 2006, Ibáñez y Chong 2008). En Argentina, las capturas se realizan desde fines de verano hasta fines de primavera (Ré y Ortiz 2008, Ortiz 2009, Ortiz *et al.* 2011). A partir de entrevistas realizadas a pescadores artesanales, se estimó que las capturas oscilaban entre las 10 y 15 toneladas anuales en los Golfos Nuevo y San José (Ré 1998) y las 9 toneladas anuales para la zona de Bahía Camarones (Cinti *et al.* 2003, Ortiz 2009). Sin embargo, la empresa FYRSA ha reportado un procesamiento de 22 toneladas anuales de *E. megalocyathus* en las zonas adyacentes a Camarones (Fiedorowicz-Kowal y Barifuzza 2020).

En nuestro país, con la excepción de la provincia de Río Negro, la cual posee una reglamentación para la extracción de *Octopus tehuelchus* con refugios en la zona de Bahía de San Antonio (límite de refugios, permisos de pesca y épocas de veda), no existen pautas de manejo que regulen la pesca de pulpos a nivel provincial ni nacional. Además, los volúmenes de pesca reportados en los desembarcos por parte de la flota industrial en puertos argentinos son de aproximadamente 700 kg por año, máximo valor en el periodo 2010-2020) (MINAGRI 2021) y sustancialmente menores a las capturas generadas por el sector pesquero artesanal, las cuales están estimadas en 45 toneladas al año solo para Río Negro y Chubut (Ré 1998, MINAGRI 2018, Fiedorowicz-Kowal y Barifuzza 2020). Estas capturas resultan insuficientes para abastecer el mercado interno, reportándose importaciones de pulpo provenientes de Chile, Brasil, España y Portugal por 300-400 toneladas por año (Ortiz 2009,

Fiedorowicz-Kowal y Barifuzza 2020, SENASA 2018). Así, la alta demanda por este tipo de animales como producto alimenticio, sitúan a *O. tehuelchus* como un recurso de potencial interés para el desarrollo acuícola.

Los antecedentes obtenidos en experiencias realizadas con subadultos y adultos de *O. tehuelchus* demuestran que esta especie posee una buena tolerancia y adaptabilidad al cultivo bajo condiciones controladas (Ré 1989, Klaich *et al.* 2006, 2008, Berrueta *et al.* 2020). Sin embargo, las investigaciones llevadas a cabo en los estadios tempranos de desarrollo (embriones y juveniles) son escasas. Las experiencias que permitan establecer cómo la temperatura afecta la supervivencia y crecimiento de los estadios tempranos de *O. tehuelchus* son de vital importancia para sentar los parámetros necesarios para generar un cultivo factible para la especie.

En Argentina, la acuicultura se encuentra representada principalmente por dos especies de peces; la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* y el pacú *Piaractus mesopotamicus* (MAGyP 2020). Para el año 2019, los volúmenes de producción de estas especies alcanzaron las 2.500 toneladas, representando el 87 % de la producción nacional. Si bien esta actividad se encuentra dominada por la producción de trucha y pacú, a partir del 2001 comenzó a diversificarse hacia nuevos objetivos como lo son la carpa, el surubí, la tilapia, el salmón de río, el dorado, la ostra y los mejillones. Para el 2019, estas especies representaron el 13 % de la producción acuícola nacional con 327 toneladas (Carciofi y Rossi 2021). Respecto a la maricultura argentina, su producción se caracteriza por ser en su mayor parte artesanal o experimental. Sin embargo, dicha actividad genera un creciente interés, reflejado en la producción de 4 toneladas de mejillones *Mytilus* sp. en Chubut y Tierra del Fuego y de 15,5 toneladas de ostra cóncava japonesa *Crassostrea gigas*, especie introducida en el sur de Buenos Aires. Sumado a esto, Rio Negro posee cultivos experimentales de vieiras, mejillones y ostras planas que cotizan los USD 10.000 por tonelada (MAGyP 2020, Carciofi y Rossi 2021).

Si se tiene en cuenta la baja diversidad de especies cultivadas implicadas en la producción acuícola marina de nuestro país, resulta relevante ampliar y diversificar esta actividad. A su vez, es necesario generar tecnologías de cultivos sobre especies nativas, para prevenir los riesgos y problemáticas asociadas al cultivo de especies exóticas (Naylor *et al.* 2001). Estas observaciones, junto con la alta demanda mundial por este tipo de productos (Vidal *et al.* 2014, FAO 2018), el amplio conocimiento sobre la biología de *O. tehuelchus*, sumado a su tolerancia al cautiverio, desarrollo directo y la gran aceptación que posee en el mercado regional, le otorgan a esta especie un gran potencial para su cultivo.

OBJETIVOS

Considerando que el cultivo de las primeras etapas de vida de los pulpos constituye la etapa que ralentiza el proceso de producción, esta tesis plantea como **objetivo general** determinar los parámetros biológicos y las tecnologías asociadas para el cultivo de las fases tempranas de desarrollo de *O. tehuelchus*. En este marco, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar el efecto de distintos regímenes térmicos de incubación en la duración de la embriogénesis y en la supervivencia embrionaria, como así también en la supervivencia y el tamaño de los juveniles.
2. Determinar los cambios morfofisiológicos asociados al sistema digestivo que ocurren durante el período post eclosión.
3. Estimar las tasas de crecimiento e índices bioenergéticos de los juveniles de *O. tehuelchus* bajo distintas dietas.

METODOLOGÍA GENERAL

ÁREA DE MUESTREO

Los ejemplares utilizados en este estudio provienen de aguas del Golfo Nuevo, de la zona de Punta Arco ($42^{\circ} 42' S$, $64^{\circ} 59' O$), al noroeste de la Bahía Nueva, en Puerto Madryn, Chubut (Figura 3). Este golfo se caracteriza por ser una cuenca semicerrada cuya profundidad promedia los 80m y se comunica con la plataforma adyacente por una boca de 16 km de ancho (Rivas y Beier 1990). Las corrientes, impulsadas principalmente por el viento, son débiles (1-4,5 cm/s) y la temperatura en la columna de agua varía dependiendo la época del año (Rivas 1990, Palma *et al.* 2008, Tonini *et al.* 2013). En verano la columna de agua se estratifica ($18^{\circ} C$ en superficie y $11^{\circ} C$ en el fondo), mientras que en invierno se mantiene homogénea ($10^{\circ} C$ en promedio) (Rivas 1990, Rivas y Beier 1990, Dellatorre *et al.* 2012). A su vez, posee un régimen de mareas semidiurno con una amplitud promedio de 3,2 m (SHN 2021). Los fondos marinos correspondientes al área de muestreo se caracterizan por estar desprovistos de formaciones rocosas y con predominancia de un sustrato compuesto por arena media y gruesa, junto con limos arenosos y arcillosos (Haller *et al.* 1997).

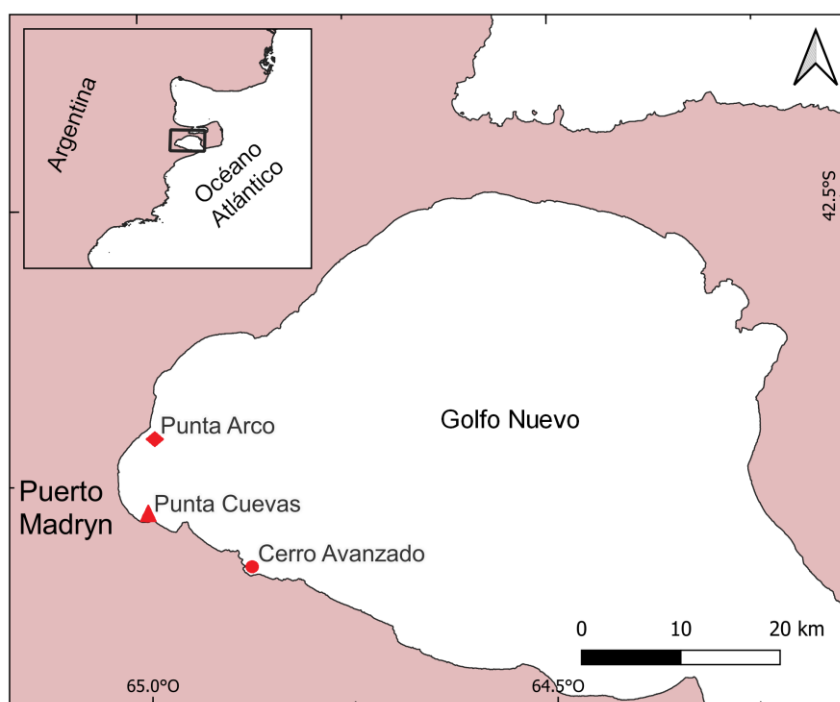


Figura 3. Área de muestreo para recolección de las masas de huevos (rombo rojo).

OBTENCIÓN DE MASAS DE HUEVOS

Los muestreos para la obtención de las masas de huevos se realizaron entre abril y agosto, teniendo en cuenta la época de puesta de *O. tehuelchus* (Ré y Comes 2003). Como arte de pesca se utilizaron refugios artificiales consistentes en tubos de PVC (5 cm x 15 cm), engalgados a un cabo madre y fondeados entre 10 y 15 metros de profundidad (Figura 4) (Ré 1997, Ré y Comes 2003). Para cada línea de 100 metros de largo se engalgaron un total de 50 tubos de doble boca separados entre sí de manera equidistante. Luego de transcurrido un mes, las líneas fueron izadas mediante buceo para corroborar, en la embarcación, la presencia de puestas. Los tubos en los cuales se verificó la existencia de hembras con huevos fueron colocados en recipientes de 60 l con agua de mar aireada para su traslado y posterior aclimatación en las instalaciones del Bioterio Acuático Experimental del CCT CONICET-CENPAT (Centro Científico Tecnológico- Centro Nacional Patagónico) (Figura 5).



Figura 4. Trampas fondeadas para la captura de ejemplares de *Octopus tehuelchus*.



Figura 5. Bioterio Acuático Experimental del CCT CONICET-CENPAT.

Los muestreos para la obtención de huevos fueron realizados durante el transcurso de abril a agosto entre los años 2017, 2018 y 2019 (Tabla 1).

Tabla 1. Valores medios mensuales, máximos y mínimos de la temperatura (°C) del agua del Golfo Nuevo en superficie y fondo (Pisoni com pers.) durante la época de muestreo.

SUPERFICIE			FONDO (15m de profundidad)			
AÑO 2017						
Mes	T media	T máx.	T mín.	T media	T máx.	T mín.
abril	16,4	17,9	15,4	16,3	17,6	15,1
mayo	14,9	16,1	13,7	14,7	15,9	13,5
junio	12,9	14,2	12,0	12,8	14,0	11,4
julio	11,5	12,6	10,7	11,4	12,4	10,5
agosto	10,7	11,2	10,3	10,8	11,3	10,1
AÑO 2018						
abril	15,9	17,5	15,0	15,8	17,2	14,7
mayo	14,5	15,5	13,6	14,3	15,2	13,1
junio	12,6	13,9	11,2	12,5	13,8	10,9
julio	11,1	11,7	10,2	10,9	11,6	10,0
agosto	10,4	11,0	9,6	10,2	10,7	9,3
AÑO 2019						
abril	16,1	17,7	15,2	15,8	16,7	14,7
mayo	14,5	15,3	13,3	14,3	15,1	12,7
junio	13,1	14,0	12,0	12,9	13,9	11,6
julio	11,7	12,2	10,7	11,4	12,0	10,5
agosto	10,9	11,8	10,3	10,7	11,4	10,0

ACONDICIONAMIENTO E INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE LOS HUEVOS

Tras 24 horas de aclimatación se extrajeron los huevos de los refugios mediante la utilización de una microespátula para poder hacer un seguimiento controlado de su desarrollo embrionario. Una vez separados, los huevos fueron incubados en cestas de malla plástica para permitir la circulación constante de agua sobre los mismos, como así también una correcta manipulación e inspección visual (Figura 6). En ausencia del cuidado parental de las hembras, cada tres días los huevos fueron limpiados con un pincel fino (Ortiz y Ré 2011, Ortiz *et al.* 2006) para evitar la acumulación de biofouling sobre la superficie del corion y así permitir el intercambio de gases y metabolitos entre el interior del huevo y el ambiente externo (Parra *et al.* 2000; Uriarte *et al.* 2012). A lo largo de las experiencias, la sujeción y manipulación de los huevos fue a través del cementante adherido en el extremo del pedúnculo, de modo de evitar cualquier tipo de alteración embrionaria, como la rotura del pedúnculo o de la cámara embrionaria. La limpieza manual se interrumpió a partir del estadio embrionario XIX para evitar cualquier eclosión prematura (Ortiz y Ré 2011) que pudiera reducir las posibilidades de supervivencia de los juveniles (Boletzky y Villanueva 2014, Vidal *et al.* 2014).



Figura 6. Cesta de malla plástica para la incubación de los huevos de *Octopus tehuilchus*.

Para la incubación artificial se utilizaron acuarios de vidrio (sistema cerrado) de cinco litros de agua de mar filtrada mecánicamente (10, 5 y 1 μm), desinfectada por UV y aireada. El agua en los acuarios fue reemplazada en un 75% cada dos días y su calidad fue monitoreada diariamente. Se utilizó una sonda multiparamétrica TOA-DDK para tomar los parámetros de calidad del agua, a excepción de las mediciones de amoníaco para lo cual se utilizó un test-PRODAC colorimétrico. El agua se mantuvo con las siguientes características: oxígeno disuelto >5 mg/l, rango de pH de 7,5-8,4, concentración de amoníaco total <1 mg/l y salinidad de 33-35 ppm. El fotoperiodo se estableció en 12 h de luz: 12 h de oscuridad. Las temperaturas de los experimentos, según el objetivo, fueron de 9 °, 13 ° y 16 °C, las cuales representan los extremos del rango térmico en las capas superficiales hasta los 15 m de profundidad en el Golfo Nuevo durante el periodo de puesta de *O. tehuelchus* (Rivas y Ripa 1989, Ortiz *et al.* 2011, Williams *et al.* 2018). Las temperaturas de incubación se mantuvieron constantes mediante el control térmico de las cámaras de temperatura controlada en donde se realizaron las experiencias.

MANTENCIÓN Y CUIDADO DE LOS JUVENILES

Para cada experiencia, los juveniles fueron dispuestos en acuarios de plástico de 3 litros cada uno (sistemas cerrados) (Figura 7). En cada acuario se agregaron, por juvenil, dos valvas de mejillón *Mytilus* sp. como refugios para minimizar el estrés de los animales. Los especímenes fueron mantenidos bajo condiciones de temperatura constante a 13 ° y 16 °C para el objetivo 1, y a 16 °C para los objetivos 2 y 3. El fotoperiodo y los parámetros de la calidad del agua fueron los mismos que los utilizados para la incubación artificial de huevos.



Figura 7. Acuarios para la mantención de los juveniles de *Octopus tehuelchus*.

CONSIDERACIONES DE ÉTICA Y CUIDADO ANIMAL

Todas las experiencias se realizaron siguiendo las regulaciones vigentes de cuidado y bienestar animal (Moltschaniwskyj *et al.* 2007, Sykes *et al.* 2012, Butler-Struben *et al.* 2018). Para realizar las mediciones morfométricas se anestesiaron los ejemplares utilizando etanol en agua de mar administrado de manera gradual: 0.5 % v/v, aumentando a 1, 2 y luego 3 % en intervalos de 5 minutos. El uso de etanol como anestésico general es capaz de producir un bloqueo fuerte y reversible de la señal neural tanto aferente como eferente. Por estas características es considerado un anestésico genuino en relación a otros sedantes que solo inmovilizan al animal pero no lo insensibilizan (Butler-Struben *et al.* 2018). Por otra parte, los juveniles utilizados en los ensayos bioquímicos fueron anestesiados por disminución gradual de la temperatura del agua hasta los 2 °C, minimizando así el estrés. Los ejemplares fueron posteriormente almacenados a -80 °C hasta su análisis. El empleo de agua fría como anestésico no es adecuada para especies tropicales, pero no queda descartada para su utilización en especies de aguas templadas (Butler-Struben *et al.* 2018).

CAPÍTULO I



DESARROLLO EMBRIONARIO Y DESEMPEÑO DE LOS JUVENILES DE *OCTOPUS TEHUELCHUS* BAJO DISTINTOS REGÍMENES TÉRMICOS DE INCUBACIÓN

INTRODUCCIÓN

Conocer cuáles son los aspectos biológicos de los estadios tempranos de desarrollo en cefalópodos y comprender cómo estos organismos responden a los factores ambientales y sus cambios es indispensable para lograr supervivencias significativas al momento de programar experiencias de cultivo (Sakurai *et al.* 1996, Oosthuizen *et al.* 2002, Boletzky y Villanueva 2014, Uriarte *et al.* 2018). Además, desde una perspectiva ecológica, esta información resulta relevante para entender cómo afectan los factores físicos del ambiente a la dinámica y estructura poblacional de los pulpos en su hábitat natural (Boletzky 1989, 2003, Juárez *et al.* 2015, Villanueva *et al.* 2016).

La temperatura es el factor principal que modula el ciclo de vida de los cefalópodos (Forsythe *et al.* 2001, Iglesias *et al.* 2014, Villanueva *et al.* 2016, Schwarz *et al.* 2018). En los estadios tempranos, el tiempo de desarrollo y crecimiento embrionario, consumo de vitelo y éxito de eclosión, están influenciados por la temperatura de incubación (Boletzky 1987, Grigoriou y Richardson 2008, Vidal *et al.* 2014, Uriarte *et al.* 2016). En varias especies de cefalópodos, dentro del rango de térmico en el cual se encuentra adaptada la especie, la duración de la embriogénesis disminuye con el aumento de la temperatura de incubación de los huevos (Boletzky 1989, Uriarte *et al.* 2012, 2016, Caamal-Monsreal *et al.* 2016). Las experiencias llevadas a cabo con temperaturas localizadas en los extremos del rango térmico pueden generar anomalías morfológicas y una elevada mortalidad embrionaria, un bajo éxito en la eclosión y una deficiencia en el uso de las reservas de vitelo interno de los juveniles recién nacidos, generando así bajas tasas de crecimiento y tiempos cortos de sobrevivencia (Vidal *et al.* 2002b, Villanueva *et al.* 2003, Rosa *et al.* 2012, Vidal y Boletzky 2014, Zheng *et al.* 2014).

El ciclo de vida de las especies de cefalópodos consideradas holobentónicas se caracteriza por estar asociado con el bentos (Iglesias *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2014, Villanueva *et al.* 2016). Estas especies presentan ejemplares recién nacidos grandes y

bentónicos lo que conlleva supervivencias mayores en experiencias de alimentación en cultivo respecto a las especies meropelágicas (Rosas *et al.* 2007, Solorzano *et al.* 2009, Vidal *et al.* 2014, Villanueva *et al.* 2021). Por otro lado, conocer el modo de vida que pueden exhibir los cefalópodos octópodos al nacer resulta determinante para comprender la dinámica poblacional de la especie y su capacidad de dispersión en la naturaleza (Villanueva *et al.* 2016).

Experiencias realizadas en subadultos de *O. tehuelchus* demostraron que la temperatura afecta tanto a las tasas de alimentación, digestión y conversión de alimentos como a las de crecimiento, siendo estas mayores a temperaturas más elevadas (10° vs 15 °C) (Ré *et al.* 1991, Klaich *et al.* 2006, 2008). En cuanto al desarrollo embrionario, Ré (1989) registró que su duración fue de 120 días a 15 °C y que al nacer los juveniles pesaron 13 g, mostrando un comportamiento predatorio sobre *Artemia salina* a los 3 días post-eclosión. Por otro lado, Ortiz (com. pers) observó una supervivencia de 39 días sin alimentación para juveniles mantenidos a 12 °C. Todo esto indicaría el rol fundamental que cumple la temperatura al regular el consumo de las reservas energéticas (vitelo), modulando el tiempo en el cual el juvenil recién nacido se vuelve apto para cazar y alimentarse de manera exógena. Poder comprender de qué manera la temperatura modula la embriogénesis y el desempeño de los juveniles (crecimiento, desarrollo, mortalidad, etc.), junto con conocer cuáles son los requerimientos nutricionales, resultará decisivo para evaluar la factibilidad biológica del cultivo de esta especie.

En este capítulo se analiza, por un lado, la duración de la embriogénesis junto con la descripción del proceso, la supervivencia embrionaria y los parámetros morfométricos medidos a lo largo del desarrollo embrionario y la duración del periodo de eclosión bajo tres regímenes térmicos. Por otro lado, se describe por primera vez la

morfología de los juveniles recién nacidos y se evalúa la supervivencia bajo condiciones de cultivo experimental.

En base a lo observado en cefalópodos, la hipótesis plantea que la temperatura actúa como factor condicionante en la duración de la embriogénesis, en la supervivencia embrionaria y en el desempeño de los juveniles. Como predicción se establece que a mayores temperaturas los tiempos de embriogénesis serán más cortos y la supervivencia embrionaria tendrá una respuesta diferencial para los distintos estadios de desarrollo tratados a diferentes temperaturas. A su vez, menores temperaturas mejorarán el desempeño de los juveniles.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL E INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE HUEVOS

Las masas de huevos fueron recolectadas en aguas del Golfo Nuevo, de la zona de Punta Arco (42 ° 42 'S, 64 ° 59 'O) (Figura 3), en los meses de junio y julio de 2017. Estas fueron separadas de los refugios y, bajo lupa, se asignó el estadio de desarrollo embrionario según lo determinado por Naef (1928). La escala de desarrollo embrionario de Naef consiste en 20 estadios que contemplan los siguientes procesos: blastulación (estadios I-II), gastrulación (estadios III-VI), fase de transición entre gastrulación y organogénesis (estadio VII), organogénesis (estadios VIII-XVI) y post-organogénesis (XVII-XX). Para esta experiencia se utilizaron cinco puestas completas de 102, 66, 60, 96 y 60 huevos, cuyos estadios de desarrollo al inicio se encontraban en los estadios I-II.

Los huevos de cada puesta fueron separados al azar en tres grupos con el mismo número de unidades y se incubaron de manera artificial bajo tres regímenes de temperatura controlada: 9 ± 1 °C, 13 ± 1 °C y 16 ± 1 °C. En estos experimentos se utilizaron, para cada temperatura, cinco acuarios de vidrio de 5 l de agua de mar filtrada (10, 5 y 1 μm), desinfectada por UV y aireada. En cada uno de estos acuarios se depositaron las cestas de malla plástica con los huevos en su interior (Figura 6). Cada cesta contuvo únicamente los huevos de una misma puesta. Tanto la limpieza de los huevos como su manipulación y el monitoreo de la calidad del agua se realizó siguiendo los parámetros mencionados en la Metodología General.

Cabe destacar que durante el transcurso de la incubación a 9 °C, luego de 126 días de experiencia, por un desperfecto del equipo de refrigeración la temperatura se elevó hasta llegar a los 20 °C, ocasionando eclosiones prematuras y muerte embrionaria.

EMBRIONES: ANÁLISIS MORFOLÓGICO, SUPERVIVENCIA Y TIEMPO DE DESARROLLO

La inspección y el recuento de huevos se realizaron diariamente. En los casos donde se registraron huevos con un desarrollo anormal (potencialmente no viables), se les asignó el estadio de desarrollo embrionario correspondiente y se separaron en cestas individuales de incubación, para verificar la inviabilidad (mortalidad) de los mismos con el tiempo.

Cada 7 días se observaron bajo microscopio estereoscópico 5 huevos elegidos al azar de cada uno de los acuarios para determinar el estadio de desarrollo embrionario en el cual se hallaban. A su vez, para la totalidad de las puestas se calculó la supervivencia embrionaria relativa (SER).

SER %= número de huevos viables en el estadio i x 100 / número de huevos viables en el estadio i-1

El termino i es el estadio embrionario en que la no viabilidad del huevo fue registrada. Los huevos inviables fueron caracterizados según las anomalías detectadas visualmente.

Además, se evaluó el éxito de eclosión o supervivencia embrionaria total (SET).

SET %= número de huevos iniciales viables x 100/ número de huevos eclosionados

A su vez, calculó la duración del desarrollo embrionario junto con el periodo de eclosión para cada temperatura. El periodo de eclosión fue definido, siguiendo a Vidal y colaboradores (2014), como el tiempo transcurrido entre la primera y la última eclosión de una misma puesta.

Como indicadores del desarrollo se analizaron diferentes parámetros morfológicos de los embriones. Se utilizaron un total de 168 huevos, 93 a 16 °C y 75 a 13 °C. Cada 10 días, los huevos fueron fotografiados bajo microscopio estereoscópico para luego registrar el largo dorsal del manto (LDM), el largo de brazo (LB), el diámetro

del ojo (DO) y el volumen del saco de vitelo externo (VSVE). Las mediciones se realizaron utilizando el programa ImageJ (Schneider *et al.* 2012). El VSVE (mm³) corresponde al volumen de un elipsoide y se calculó como:

$$VSVE = (4 \cdot \pi \cdot AB^2) / 3$$

En donde A es la mitad de la longitud del saco vitelino externo y B es la mitad del ancho del saco vitelino externo (Vidal *et al.* 2002a, Uriarte *et al.* 2014).

JUVENILES: DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y SUPERVIVENCIA SIN ALIMENTACIÓN

Para la descripción morfológica de los juveniles se tomaron al azar de cada uno de los acuarios un total de 30 ejemplares recién eclosionados del tratamiento de incubación a 13 °C y 33 juveniles del tratamiento de incubación a 16 °C. Para reducir el estrés, los especímenes fueron anestesiados siguiendo lo mencionado en la Metodología General. Posteriormente, los juveniles fueron fotografiados bajo microscopio estereoscópico y medidos mediante el programa ImageJ (Schneider *et al.* 2012). Se registró el diámetro del ojo (DO), el ancho del manto (AM), el ancho de la cabeza (AC), el largo ventral del manto (LVM), el largo total (LT), el largo dorsal del manto (LDM), el largo de brazo (LB) y el largo del sifón (LS). A su vez, se registró el peso húmedo total (PHT). A su vez, para 22 juveniles (11 a cada temperatura), se describió el patrón de cromatóforos y se contabilizó el número de ventosas. Todas las observaciones mencionadas se realizaron siguiendo lo expuesto por Young y colaboradores (1989), Hochberg y colaboradores (1992) y Sweeney y colaboradores (1992). Además, los juveniles fueron observados con microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato durante 3 horas y luego se deshidrataron con el método de punto crítico para el posterior recubrimiento de oro (Ortiz y Ré 2011). Asimismo, para calcular el tiempo de sobrevivencia sin alimentación, se estudiaron un total de 62 juveniles a 13 °C y 44 juveniles a 16 °C. Estos juveniles recién

nacidos se separaron por fecha de eclosión y fueron puestos en acuarios de plástico de tres litros cada uno (Figura 7) con una densidad de un espécimen por litro. Durante toda la experiencia se utilizaron en total 36 acuarios para el tratamiento a 13 °C y 21 acuarios a 16 °C. Los especímenes fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de temperatura, fotoperiodo y calidad del agua que se menciona en la Metodología General.

ANÁLISIS DE DATOS

Los parámetros morfológicos de los embriones fueron comparados entre y dentro de cada tratamiento térmico a lo largo de la embriogénesis. Para ello se construyó un Modelo Lineal de Efectos Mixtos (Pinheiro *et al.* 2016) donde se consideró al parámetro morfométrico (LDM, DO, LB y VSVE) como la variable respuesta, a la temperatura y al tiempo de embriogénesis como las variables explicativas fijas y a los acuarios como la variable explicativa aleatoria. Para el análisis del DO, se incorporó una estructura de varianza de función exponencial para corregir la heterocedasticidad. A su vez, se estimó el efecto de la temperatura sobre los parámetros morfológicos para el mismo día de desarrollo embrionario mediante el método de Mínimos Cuadrados Generalizados. Por último, se utilizó un Test de Tukey para comparar las diferencias entre los días de la embriogénesis dentro de cada tratamiento térmico.

Para analizar el efecto de la temperatura y de los estadios de desarrollo embrionario sobre la SER % se construyó un Modelo Lineal de Efectos Mixtos (Zuur *et al.* 2009) con una distribución binomial (link= logit). En este caso se consideró a la SER % como la variable respuesta, a la temperatura y a los estadios de desarrollo embrionarios como variables explicativas fijas y a los acuarios como la variable explicativa aleatoria. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la SET % se

construyó un Modelo Lineal Generalizado con una distribución quasi-binomial (link=logit). Esta distribución fue seleccionada por presentar sobredispersión en los datos binomiales. Aquí se consideró a la SET % como la variable respuesta y a la temperatura como la variable explicativa.

En el caso de los juveniles, para evaluar la supervivencia sin alimentación se construyó un Modelo Lineal Generalizado con una distribución Gamma (link=inverse). Aquí se consideró al tiempo de supervivencia sin alimentación como la variable respuesta y a la temperatura como la variable explicativa. Para este análisis estadístico los acuarios no fueron tenidos en cuenta como variable aleatoria por explicar solamente el 0,06 % de la varianza total. Los modelos mencionados fueron seleccionados siguiendo el Criterio de Información de Akaike (AIC) y parsimonia, según el modelo con el menor valor de AIC.

El efecto de la temperatura sobre los parámetros morfológicos de los juveniles recién nacidos fue evaluado con un ANOVA de un factor para cada una de las variables. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Zar 1996) para estimar la relación entre el tiempo de supervivencia sin alimentación y el tiempo de eclosión.

Para los análisis los acuarios fueron considerados réplicas, salvo para el caso en donde se compararon los parámetros morfológicos entre juveniles eclosionados a distintas temperaturas; aquí cada espécimen fue considerado como réplica. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico R, versión 4.0.0, y el nivel de significancia utilizado fue $p < 0,05$.

RESULTADOS

TIEMPO DE EMBRIOGÉNESIS, PERIODO DE ECLOSIÓN Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES

La temperatura afectó la embriogénesis de *O. tehuelchus*. La duración del desarrollo embrionario fue de $186 \pm 8,68$ (media \pm DE) días a $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ y de $101 \pm 5,68$ días a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la primera eclosión. A su vez, el periodo de eclosión fue de $38 \pm 12,5$ (media \pm DE) días para $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ y de $21 \pm 12,58$ días para $16\text{ }^{\circ}\text{C}$. El tiempo transcurrido entre la primera y la última eclosión considerando el total de las puestas de cada temperatura fue de 68 y 37 días para $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente (Figura I.1).

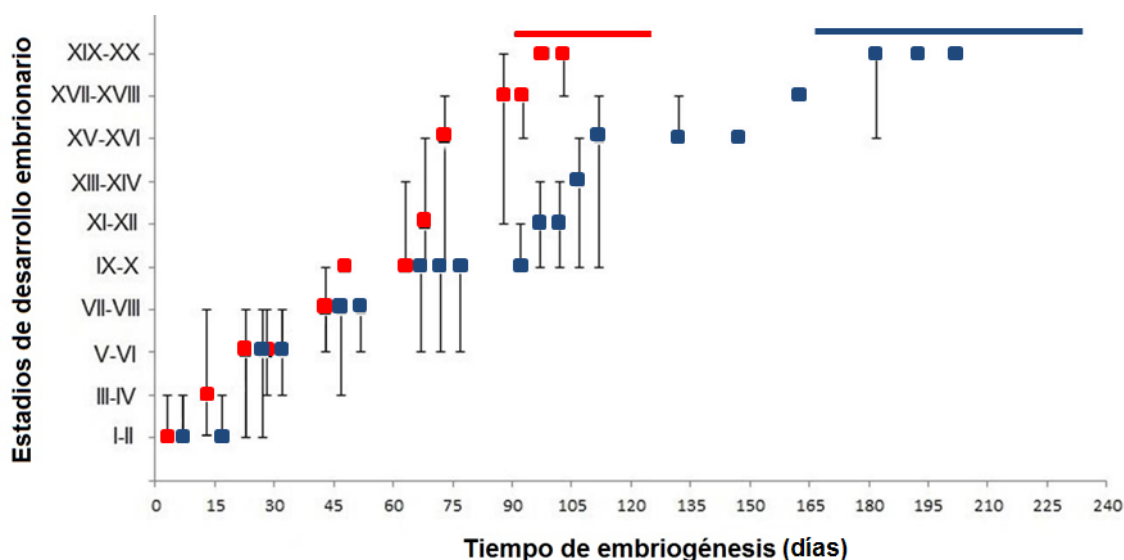


Figura I.1. Estadios del desarrollo embrionario de *Octopus tehuelchus* en función del tiempo de embriogénesis (días) a $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cuadrados azules) y $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cuadrados rojos). Cada cuadrado representa la moda de 25 observaciones, las líneas verticales muestran los estadios máximos y mínimos. Las líneas horizontales indican el período de eclosión a $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ (línea azul) y $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ (línea roja).

Para el mismo tiempo de incubación, los embriones tratados a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ presentaron un mayor grado de desarrollo (estadios más avanzados) respecto a los embriones incubados a $13\text{ }^{\circ}\text{C}$. A la temperatura más elevada, el progreso en el desarrollo embrionario fue constante, mientras que a $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observaron dos fases claramente marcadas. Una primera fase que comprende desde los estadios I-II hasta los estadios XV-XVI (fin de la organogénesis) y una segunda fase, menos marcada, comprendida entre los estadios XV-XVI y la eclosión (Figura I.1).

Durante los primeros 30 días de desarrollo embrionario, a ambas temperaturas, la mayor parte de los huevos se encontraron atravesando el proceso de blastulación y gastrulación. El primero de estos procesos se caracteriza por la formación del disco germinal en el polo animal del huevo (estadios I-II) (Figura I.2A). Durante este periodo, la cámara embrionaria está conectada al pedúnculo del huevo. Mientras que en el segundo proceso, comprendido entre los estadios III-VI, las células que conforman el blastodermo migran sobre la superficie del vitelo cubriéndolo parcialmente (Figura I.2B) o en su totalidad.

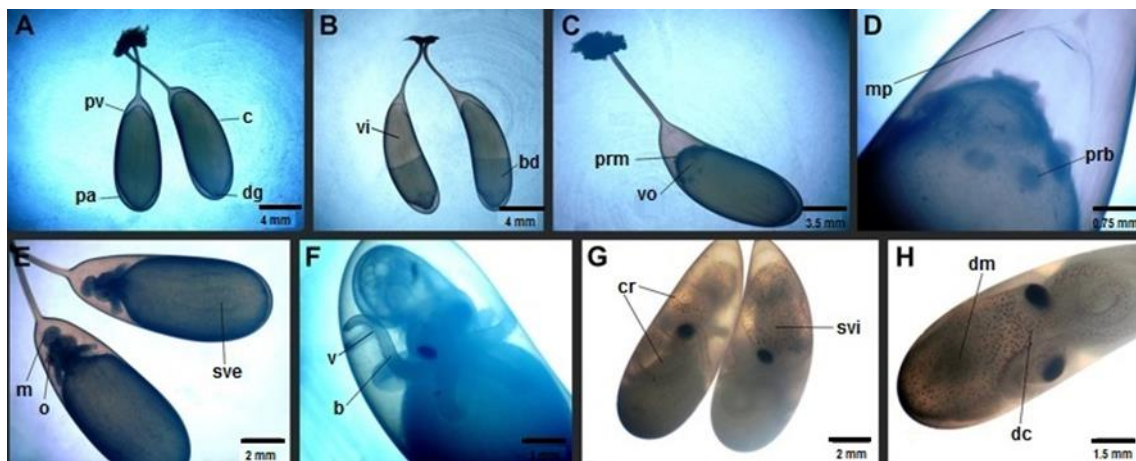


Figura I.2. Estadios de desarrollo embrionario de *Octopus tebuelchus*. A) Estadios I-II, B) Estadios V-VI: células de blastodermo que ocupan el 30-50 % de la superficie del huevo, C-D) Estadio VIII: final de la primera inversión y comienzo de la organogénesis, E) Estadios IX-X, F) Estadios XIII-XIV, G) Estadio XVIII, H) Estadio XIX: final de la segunda inversión. (b) brazos, (bd) blastodermo, (c) corion, (cm) complejo del manto, (cr) cromatóforos, (dc) dorso de la cabeza, (dg) disco germinal, (dm) dorso del manto, (m) manto, (mp) membrana perivitelina, (o) ojo, (pa) polo animal, (prm) primordio del manto, (prb) primordio del brazo, (pv) polo vegetal, (sve) saco vitelino externo, (svi) saco de vitelo interno, (v) ventosas, (vi) vitelo, (vo) vesícula óptica. El embrión en la imagen F no realizó la primera inversión.

A partir del día 45, a ambas temperaturas, la mayoría de los embriones se ubicaron en el polo vegetal, lo que señala el final de la primera inversión. En este periodo, la membrana perivitelina rodea y encierra al embrión e, internamente, la cámara embrionaria se separa del pedúnculo. A su vez, comienzan a aparecer los órganos rudimentarios, identificados por un aumento en la concentración de tejido, lo que indica el comienzo del proceso de organogénesis (estadio VIII) (Figura I 2.C, D). Al

día 50 todos los embriones incubados a la mayor temperatura se encontraron en los estadios IX-X. En dichos estadios se evidencia el pigmento rojo de la retina notorio y, en la región cefálica, el complejo del manto adquiere mayor desarrollo. A su vez, los brazos crecen en longitud distinguiéndose las primeras ventosas (Figura I.2E). Sin embargo, en este periodo ninguno de los embriones incubados a 13°C sobrepasó los estadios VII-VIII (Figura I.1).

Para el día 65 de desarrollo algunos de los embriones incubados a 16 °C alcanzaron los estadios XIII-XIV, donde se observó tanto al manto como a los brazos más alargados que en estadios previos, las ventosas con mayor grado de desarrollo y el complejo óptico en forma de copa (Figura I.2F). Para el mismo día, a 13 °C ninguno de los embriones sobrepasó los estadios IX-X (Figura I.1). A los 75 días la mayoría de los embriones incubados a 16 °C se encontraron entre los estadios XV-XVI. En este periodo aparecen los primeros cromatóforos en la parte dorsal de la cabeza de los embriones, los ojos alcanzan su máxima pigmentación y tanto el corazón sistémico como los branquiales comienzan a latir. Entre los días 90 y 95 la mayor parte de los embriones incubados a 16 °C alcanzaron los estadios XVII-XVIII. En el estadio XVIII los cromatóforos comienzan a aparecer tanto en el manto como en los brazos y el saco de vitelo interno comienza a crecer (Figura I.2G), mientras que a 13 °C la mayoría de los embriones todavía se encuentran atravesando los estadios IX-X.

Entre los días 100 y 105 la mayoría de los embriones incubados a mayor temperatura llegaron a los estadios XIX-XX, mientras que a la menor temperatura dichos estadios fueron alcanzados entre los 180 y 200 días (Figura I.1). En el estadio XIX los embriones retornan al polo animal, marcando el final de la segunda inversión y el saco de vitelo externo fue absorbido casi en su totalidad (Figura I.2H). Al finalizar este proceso, los especímenes se encuentran totalmente desarrollados. Cabe destacar que muchos de los embriones completan su normal desarrollo sin realizar la primera

inversión, situándose directamente en el polo animal durante toda la embriogénesis (Figura I.2F).

Durante toda la experiencia a 9 °C el desarrollo de la embriogénesis fue extremadamente lento. En los primeros 50 días los huevos se encontraban entre los estadios I y VI, en donde los embriones con mayor grado de desarrollo presentaban al blastodermo cubriendo entre un 30 y 50 % de la superficie del huevo (Figura I.2B). Entre los 90 y 100 días se registró el final de la primera inversión y el comienzo de la organogénesis, dado por la aparición tenue del pigmento de la retina junto con el primordio del manto y de los brazos (VIII) (Figura I 2.C, D). Finalmente, al día 126 de la experiencia, previo al desperfecto de la temperatura en la cámara de incubación, el máximo estadio alcanzado fue el IX-X y ningún ejemplar llegó a presentar cromatóforos en el cuerpo (Figura I.2E).

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS EMBRIONES

En cuanto a las medidas morfométricas realizadas en los embriones, tanto el DO como el LB se vieron afectados por la temperatura y por el tiempo de embriogénesis, mientras que el LDM y el VSVE se vieron afectados por la interacción entre ambos factores. A su vez, el acuario tuvo un efecto significativo sobre el LDM, el DO y el LB (Tabla I.1).

Tabla I.1. Resultados del modelo lineal de efectos mixtos. Efecto de la temperatura, el tiempo de embriogénesis, su interacción y el acuario (efecto aleatorio), sobre los parámetros morfométricos de los embriones de *Octopus tehuelchus*; largo dorsal del manto (LDM), diámetro del ojo (DO), largo de brazos (LB) y volumen del saco de vitelo externo (VSVE).

Efectos fijos	LDM		DO		LB		VSVE	
	F	p	F	p	F	p	F	p
Temperatura	11,7101	0,0091	7,6132	0,0247	3,9091	0,0504	1,0660	0,3319
Tiempo de embriogénesis	504,6060	<,0001	176,6272	<,0001	413,4802	<,0001	205,2191	<,0001
Temp.* Tiempo embriogénesis	8,8532	0,0034	2,1322	0,1463	0,7001	0,4046	28,0911	<,0001
Efectos aleatorios	L.Ratio	p	L.Ratio	p	L.Ratio	p	L.Ratio	p
Acuarios	47,2662	<,0001	27,7511	<,0001	35,3933	<,0001	0,2990	0,5843

Las primeras diferencias fueron registradas al día 45; a partir de aquí, el LDM, el DO y el LB fueron mayores en los embriones incubados a 16 °C respecto a los de 13 °C (Tabla I.2, Figura I.3A, B, C). En cuanto al VSVE, las diferencias estadísticas se registraron a partir del día 65, donde los embriones incubados a mayor temperatura presentaron menores volúmenes de vitelo respecto a los embriones tratados a menor temperatura (Tabla I.2, Figura I.3D). Esta tendencia observada entre los individuos de ambas temperaturas se mantuvo hasta el final del desarrollo embrionario (Tabla I.2, Figura I.3).

Por otro lado, dentro del tratamiento a 13 °C se evidenció un incremento en el LDM (F=51,91, p<0,0001), el DO (F=18,01, p<0,0001) y el LB (F=73,91, p<0,0001) a partir del día 75. En cambio, a 16 °C este patrón fue observado desde el día 45 en adelante (LDM: F=35,10, p<0,0001; DO: F=28,58, p<0,0001; LB: F=23,70, p<0,0001). En cuanto al VSVE, decreció desde el día 65 en adelante en el tratamiento a 16 °C, mientras que a 13 °C este patrón se evidenció veinte días antes (F=38,10, p<0,0001) (Figura I.3).

Tabla I.2. Resultados del modelo de mínimos cuadrados generalizados. Efecto de la temperatura en el largo dorsal del manto (LDM), diámetro del ojo (DO), largo de brazos (LB) y volumen del saco de vitelo externo (VSVE) de los embriones de *Octopus tehuelchus* para el mismo día de la embriogénesis.

Tiempo de embriogénesis (días)	LDM			DO			LB			VSVE		
	GL	F	p	GL	F	p	GL	F	p	GL	F	p
25	13	1,1791	0,2988	13	1,0194	0,3325	13	2,3060	0,1547	13	0,4474	0,5163
45	18	7,7553	0,0127	18	12,0152	0,0031	18	7,5810	0,0136	18	0,0881	0,7703
55	19	24,5211	1e⁻⁰⁴	19	12,6674	0,0022	16	15,0891	0,0015	19	0,0011	0,9662
65	40	72,2884	<,0001	38	18,0842	1e⁻⁰⁴	28	55,1633	<,0001	41	11,6412	0,0015
75	48	126,1481	<,0001	47	61,9411	<,0001	28	67,3412	<,0001	48	133,9622	<,0001
95	7	12,8002	0,0117	7	25,9372	0,0022	6	19,0454	0,0073	7	12,2223	0,0129

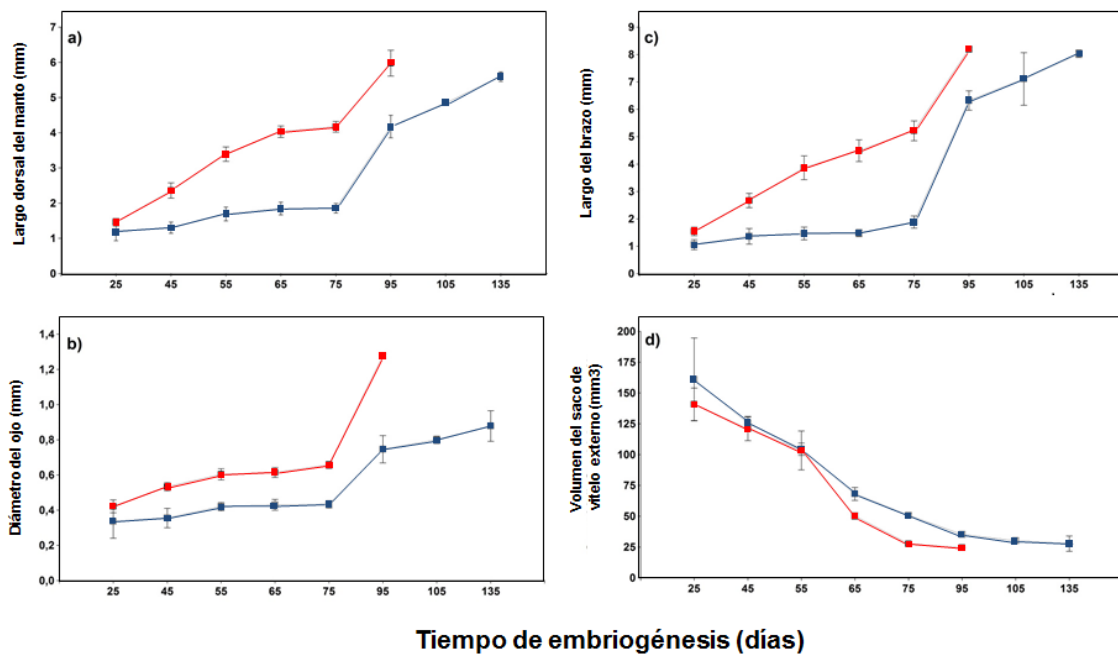


Figura I.3. Relación entre los parámetros morfométricos embrionarios y el tiempo de embriogénesis (días) de los embriones de *Octopus tehuelchus* incubados a 13 °C (cuadrados azules) y 16 °C (cuadrados rojos). a) Largo dorsal del manto (LDM), b) diámetro del ojo (DO), c) largo del brazo (LB), y d) volumen del saco de vitelo externo (VSVE). Las barras verticales indican el error estándar.

SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA

La supervivencia embrionaria relativa (SER %) fue afectada por los estadios de desarrollo embrionario ($\chi^2 = 6,653$, $p = 0,0098$), pero no por la temperatura ni por la interacción de ambos factores.

Para ambas temperaturas, las mortalidades más altas se registraron en los estadios tempranos de la embriogénesis, más precisamente en la primera mitad del desarrollo (Figura I.4). La SER % promedio más baja se observó entre los estadios que van desde el I-II al V-VI inclusive (88,5 % respectivamente). Luego, comenzó a incrementarse entre los estadios VII-VIII y IX-X hasta alcanzar los máximos niveles de supervivencia embrionaria (100 %) en los estadios siguientes. Hacia el final del desarrollo embrionario, entre los estadios XIX-XX, la SER % promedio decreció levemente alcanzando los porcentajes de 95,5 % (Figura I.4).

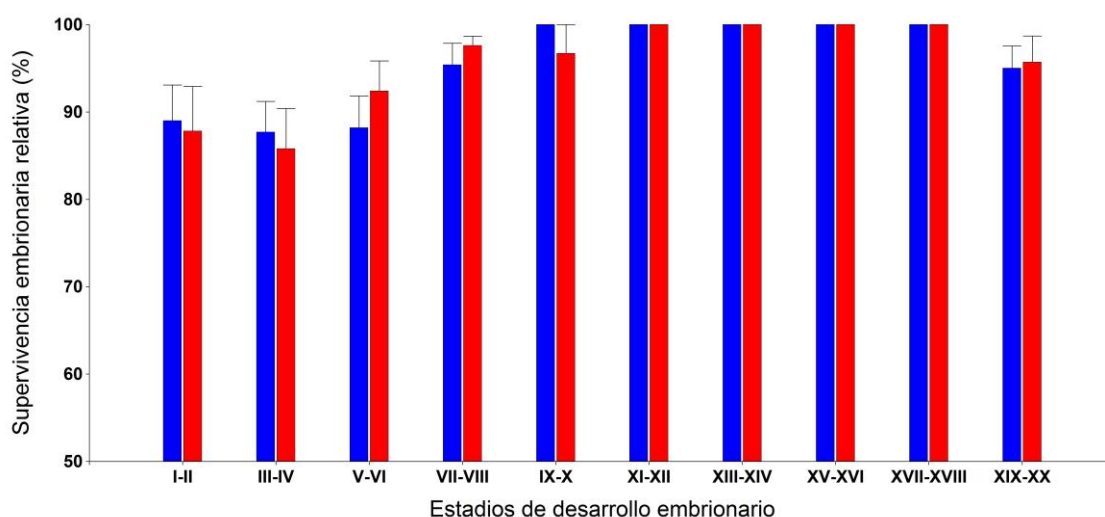


Figura I.4. Supervivencia embrionaria relativa (SER %) promedio de *Octopus tehuelchus* en función de los estadios de desarrollo embrionario (barras azules: 13 °C, barras rojas: 16 °C). Las barras verticales grises indican el error estándar.

En cuanto a la supervivencia embrionaria total (SET %), no se observaron diferencias entre temperaturas ($\chi^2=0,0257$, $p=0,8724$) (Figura I.5). El promedio de la SET % fue de 65 % para 13 °C y de 63 % para 16 °C.

Para la experiencia a 9°C, durante el normal desarrollo de la experiencia, la SER % se mantuvo en 100 % entre los estadios I-II y III-IV, bajando al 36,4 % en los estadios V-VI y VII-VIII, para luego aumentar a un 72,8 % en el estadio IX-X. Tras 41 días del desperfecto, eclosionaron los únicos pulpos, registrándose una SET % en promedio de 16,8 %. El aumento de la temperatura de incubación tras la falla aceleró drásticamente el desarrollo embrionario, provocando que los juveniles comenzaran a eclosionar prematuramente o murieran atrapados al intentar salir del huevo. Todos los juveniles de este tratamiento térmico murieron a las pocas horas de nacer.

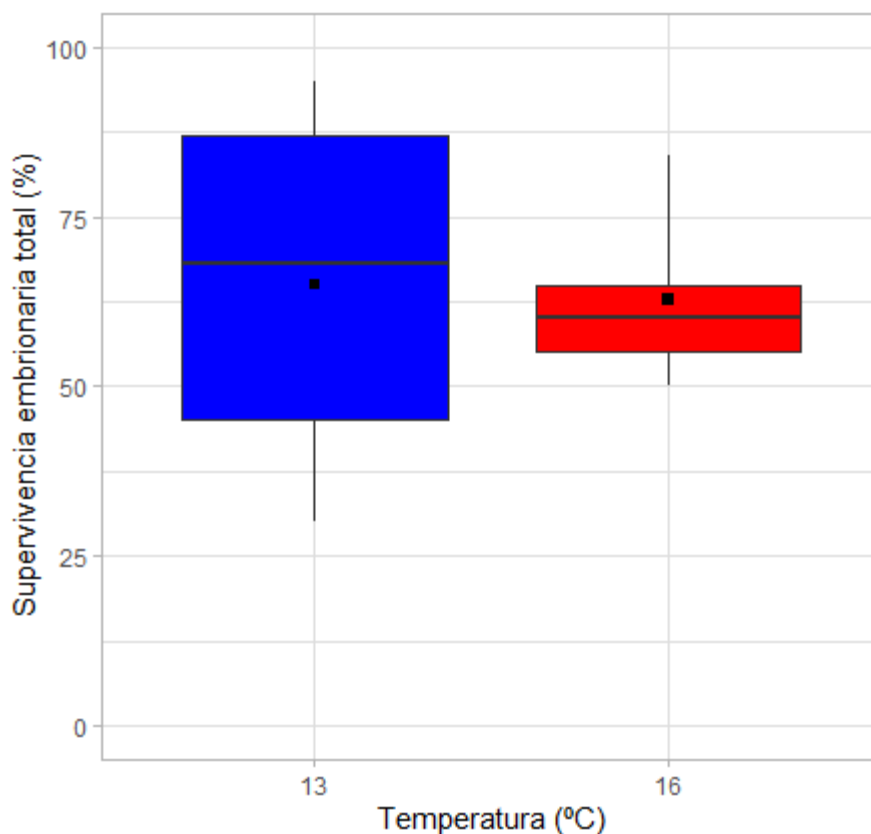


Figura I.5. Bloxpot de la supervivencia embrionaria total (%) en función de la temperatura (caja azul: 13 °C, caja roja: 16 °C). La línea negra indica la mediana, los límites superior e inferior de la caja representan los cuartiles 1 y 3, el cuadrado negro la media y las líneas verticales representan los valores máximos y mínimos.

Para todos los tratamientos térmicos, los huevos no viables fueron identificados según determinadas características presentes, tales como hinchazón o aumento del volumen de la cámara embrionaria, pérdida de turgencia, coloración amarillenta, vitelo

colapsado hacia el centro o hacia alguna de las paredes del huevo, vitelo granuloso o fragmentado y presencia de embriones pequeños sin desarrollo separados del saco de vitelo externo (Figura I.6).

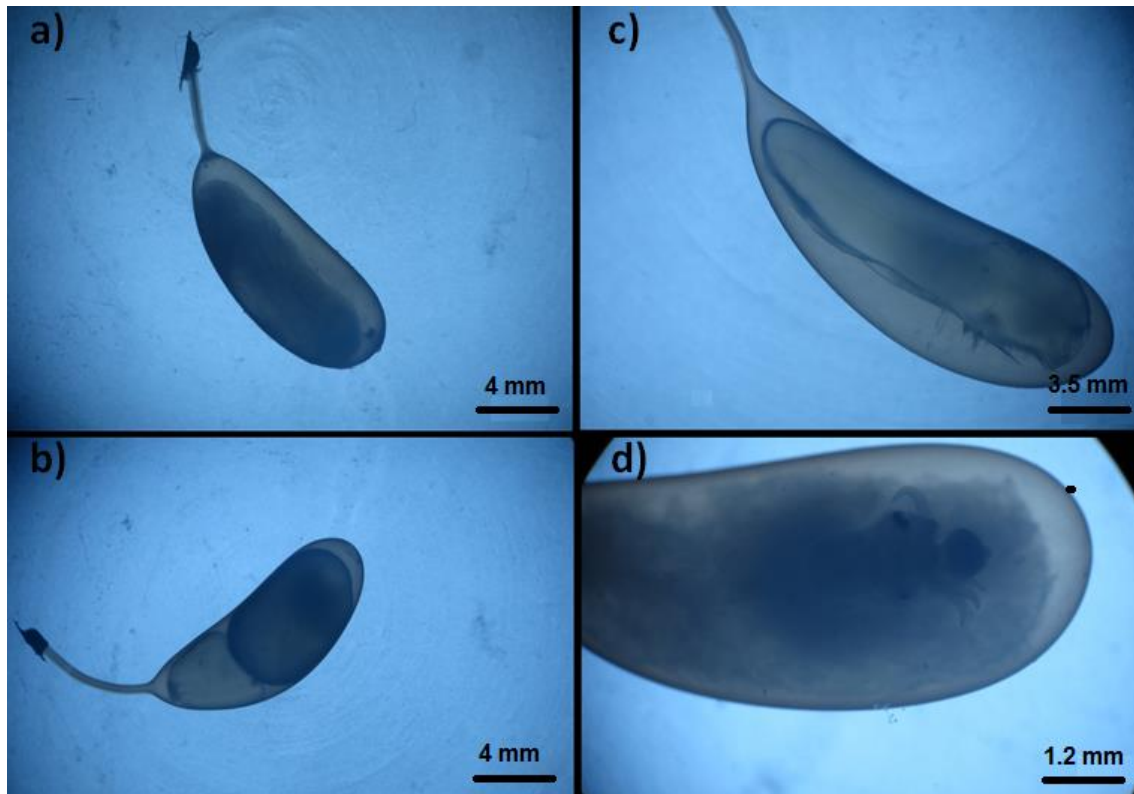


Figura I.6. Huevos no viables de *Octopus tehuelchus* con diferentes malformaciones: a) vitelo colapsado y granuloso sobre una de las paredes del huevo, b) vitelo fragmentado, c) vitelo deformado, d) huevo hinchado con embrión de escaso desarrollo.

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS JUVENILES

Tras la eclosión, los juveniles adoptaron un modo de vida completamente bentónico, situándose en el fondo de los acuarios o escondiéndose en los refugios. En cuanto a las medidas morfométricas, no se observaron diferencias en el LDM, el LB y el LS de los juveniles sometidos a los diferentes tratamientos térmicos. Sin embargo, el DO, AC, AM, LVM, LT y el PHT fueron mayores en los juveniles recién nacidos sometidos al régimen térmico más alto durante la embriogénesis (Tabla I.3).

Tabla I.3. Promedio +/- EE de las variables morfométricas de los juveniles de *Octopus tehuatlensis* recién eclosionados y comparación de las variables morfométricas entre temperaturas. Resultados obtenidos mediante el uso de ANOVA de un factor.

Medidas Morfométricas	Temperatura de incubación		GL	F	p
	16 °C	13 °C			
Número de juveniles	33	30			
Diámetro del ojo (mm)	1,48 ± 0,31	1,23 ± 0,18	62	4,7920	0,0413
Ancho del manto (mm)	4,62 ± 0,31	4,27 ± 0,35	62	6,0790	0,0234
Ancho de cabeza (mm)	4,95 ± 0,28	4,26 ± 0,45	62	18,2228	0,0004
Largo ventral del manto (mm)	5,05 ± 0,96	3,93 ± 0,49	62	11,1121	0,0035
Largo total (mm)	17,35 ± 1,43	15,78 ± 1,80	62	4,9191	0,0389
Peso húmedo total (g)	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,03	62	4,5753	0,0368
Largo del brazo (mm)	8,46 ± 1,44	8,15 ± 1,41	62	0,2470	0,6249
Largo del sifón (mm)	1,87 ± 0,45	1,73 ± 0,42	62	0,5385	0,4720
Largo dorsal del manto (mm)	6,15 ± 0,59	5,87 ± 0,64	62	1,1165	0,3039

No se observaron diferencias en el patrón de cromatóforos de los juveniles entre temperaturas. En ambos tratamientos térmicos, los individuos eclosionados presentaron la cabeza, los brazos, la membrana interbraquial, los ojos y el dorso del manto densamente cubiertos por pequeños cromatóforos tegumentarios de color marrón rojizo y negro. En cambio, el sifón, el margen anterior ventral del manto y el epitelio perivisceral no presentaron pigmentación alguna. Los juveniles se caracterizaron por tener el manto en forma de “matraz” (en inglés, *flask*) (Figuras I.7, I.8). A su vez, en cada brazo se contabilizaron un total de 50 ventosas dispuestas en dos filas, cuyos tamaños disminuyen a medida que se alejan de la boca y llegan a los extremos. Las dos ventosas cercanas al pico se encuentran alineadas, mientras que el resto están dispuestas en zigzag. Los brazos se caracterizaron por carecer de ventosas terminales. Asimismo, los ejemplares analizados presentaron órganos de Kölliker a lo largo de toda la superficie de los brazos, manto y cabeza (Figura I.9): estas pequeñas estructuras pueden apreciarse en pulpos vivos como puntos iridiscentes (Figuras I.7, I.8). Dichas estructuras, solo presentes en los estadios tempranos de desarrollo, son mechones dispersos por la

superficie corporal, conformados por setas quitinosas que pueden salir y retraerse dentro de minúsculos bolsillos (Villanueva *et al.* 2021).

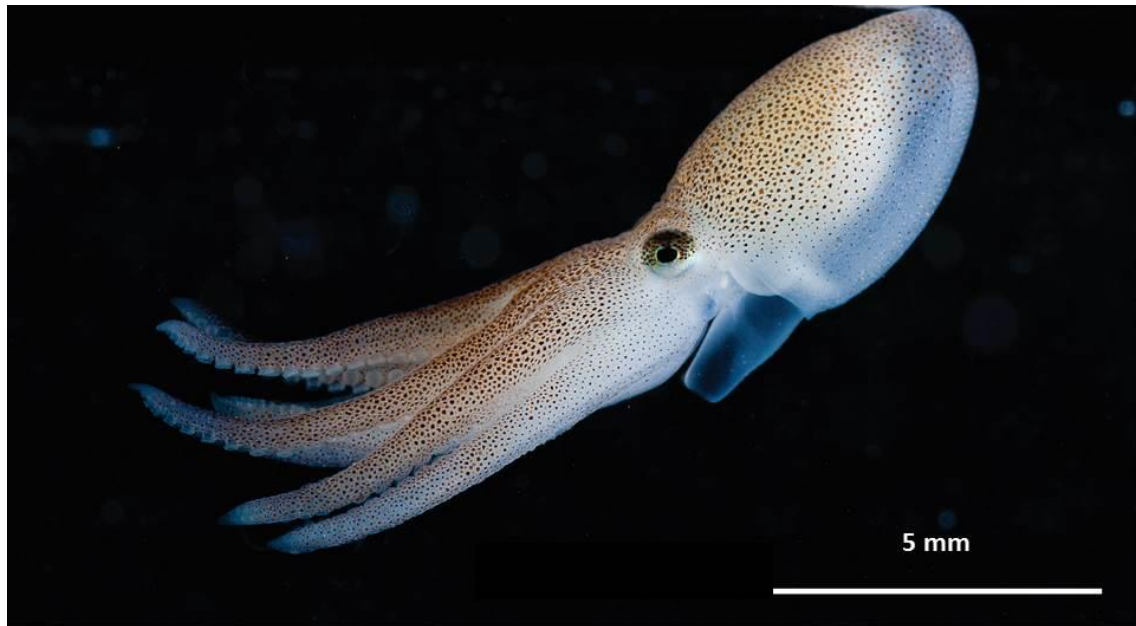


Figura I.7. Vista lateral de un juvenil recién nacido de *Octopus tebelchus*. Se observa el manto dorsal y ventral, la cabeza, los brazos y los ojos densamente cubiertos por cromatóforos, y el sifón junto con el margen anterior ventral del manto sin cromatóforos. También se observan los órganos de Kölliker presentes como puntos iridiscentes en la región ventral del manto.

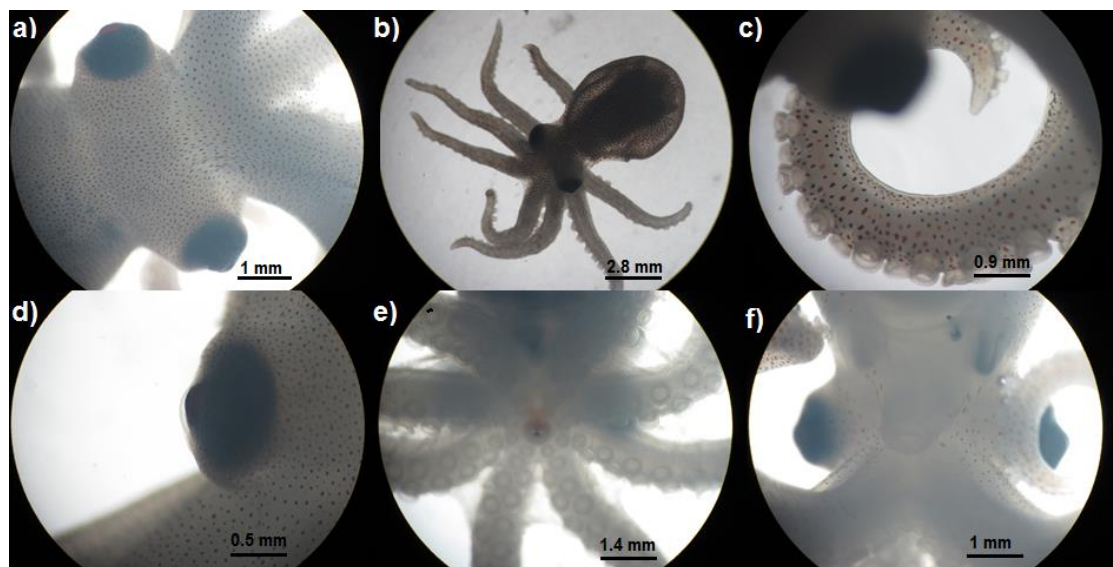


Figura I.8. Características morfológicas y patrón de distribución de los cromatóforos de juveniles de *Octopus tebelchus*. Imágenes de a) cabeza b) cuerpo entero, c) detalle del brazo, d) ojo, e) pico y cara interna de los brazos con ventosas, f) sifón y margen anterior ventral del manto.

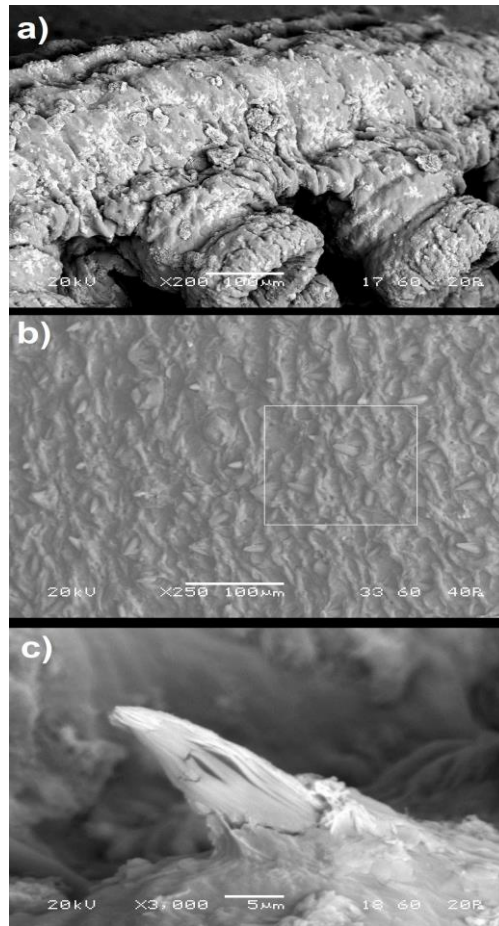


Figura I.9. Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido (SEM) de un juvenil de *Octopus tehuelchus*. Detalle de los órganos de Kölliker sobre, a) la cara dorsal interna del brazo, b) la superficie del manto dorsal, y c) la cabeza.

SUPERVIVENCIA EN INANICIÓN DE LOS JUVENILES

En cuanto a la supervivencia sin alimentación de los juveniles, en ambas temperaturas se registraron tiempos de supervivencia máxima similares: 54 días para 13 °C y 59 días para 16 °C. Sin embargo, el tiempo de sobrevivencia en inanición promedio fue significativamente mayor para los juveniles sometidos a la temperatura más baja ($\chi^2 = 5,6482$, $p = 0,0174$), con registros de 24 días a 13 °C y de 17 días a 16 °C (Figura I.10).

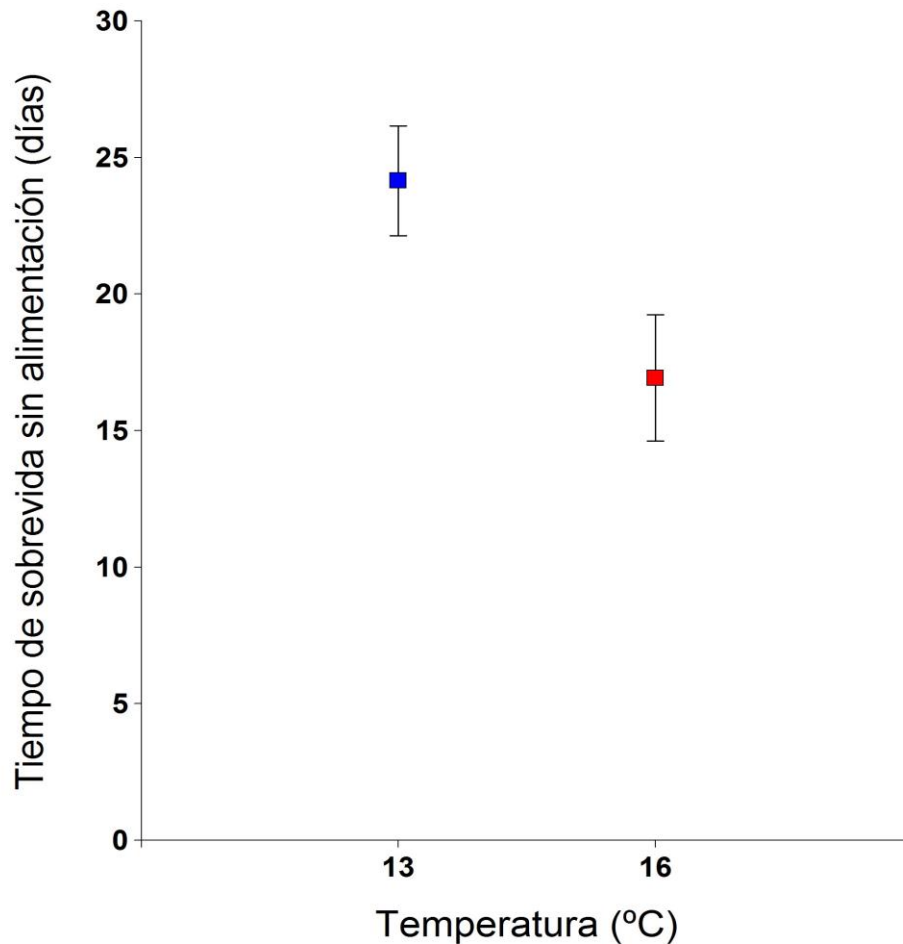


Figura I.10. Tiempo de supervivencia sin alimentación en juveniles de *Octopus tehuelchus* sometidos a 13 °C (azul) y a 16 °C (rojo). Los cuadrados reflejan la media y las barras grises el error estándar.

A su vez, para ambas temperaturas el coeficiente de correlación de Pearson entre el día de eclosión y el tiempo de supervivencia sin alimentación fue negativo y significativo ($p < 0,0001$, $r = -0,51$ y $p = 0,0109$, $r = -0,38$ para 13 y 16 °C), lo cual indica que los primeros juveniles en eclosionar vivieron más tiempo sin alimentarse que los últimos en nacer (Figura I.11). Cabe destacar que no se observó canibalismo entre los juveniles a lo largo de las experiencias realizadas.

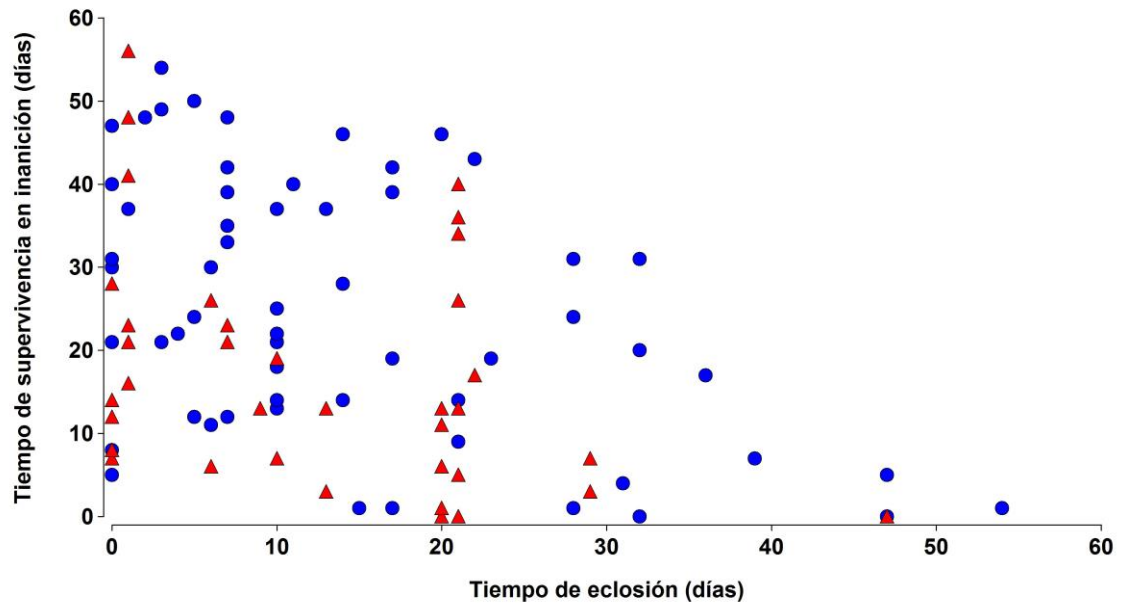


Figura I.11. Tiempo de supervivencia en inanición en función del tiempo de eclosión (días) a 13 °C (círculos azules) y 16 °C (triángulos rojos) en juveniles de *Octopus tehuelchus*.

DISCUSIÓN

En los cefalópodos, la duración del desarrollo embrionario depende directamente de la velocidad de absorción del vitelo externo, la cual, a su vez, se encuentra modulada por la temperatura (Boletzky 2003). En términos generales, las especies que presentan huevos pequeños se caracterizan por exhibir una duración de la embriogénesis más corta, mientras que en las especies cuyos huevos son de mayor tamaño ocurre lo contrario. Asimismo, las especies que se encuentran adaptadas a aguas frías presentan un desarrollo más prolongado respecto a las especies presentes en aguas cálidas (Clarke 1982, Boletzky 1987, 1984, Vidal *et al.* 2014). Por otro lado, experiencias llevadas a cabo por Boletzky (2003), Caamal-Monsreal y colaboradores (2016) y Uriarte y colaboradores (2016) mostraron que dentro del rango térmico al cual las especies de cefalópodos están adaptadas, a mayores temperaturas la embriogénesis resulta más corta y no se observan efectos negativos sobre el éxito de eclosión. Por fuera de esos rangos térmicos, los embriones experimentan daños fisiológicos irreversibles (Pimentel *et al.* 2012, Repolho *et al.* 2014, Sanchez-García *et al.* 2017). En cuanto a *O. tehuatlensis* que es una especie de aguas templadas cuyas puestas presentan huevos grandes, se registró un desarrollo embrionario extenso. En los experimentos llevados a cabo en la presente tesis, la embriogénesis duró aproximadamente seis meses a 13 °C y se redujo a la mitad con el aumento de 3 °C en la temperatura de incubación, sin afectar ni la supervivencia embrionaria relativa ni la total. A su vez, el éxito de eclosión promedió fue de 64 % a ambas temperaturas y fue similar al encontrado en otras especies de pulpo como *Enteroctopus megalocyathus* (39,6 % - 65,8 %) de aguas templado-frías y *Octopus maya* (60 % - 76 %) de aguas cálidas, en condiciones óptimas de incubación (Caamal-Monsreal *et al.* 2016, Uriarte *et al.* 2016). Si bien en el ambiente natural las temperaturas cercanas a los 9 °C están dentro del rango térmico de incubación de *O.tehuatlensis* (Williams *et al.* 2018, Pisoni com pers., ver Metodología General), esta temperatura no sería óptima para el cultivo debido a la extensa duración de la embriogénesis y a las altas mortalidades registradas.

En condiciones de cultivo, independientemente de la temperatura, el periodo que comprende desde el desove hasta el comienzo de la organogénesis (estadio VIII), pareciera ser la etapa más crítica en la supervivencia de los embriones de *O. tehuelchus*. Según Boletzky (2003), durante este periodo se observa una mayor susceptibilidad del embrión. En esta etapa tienen lugar los procesos de blastulación y gastrulación y es cuando se registran malformaciones embrionarias con mayor regularidad. Estas anomalías generan huevos no viables que se pueden identificar fácilmente por exhibir: hinchazón, pérdida de turgencia y coloración amarillenta inusual, tal como ha sido observado en *Loligo vulgaris reynaudii* (Oosthuizen *et al.* 2002) y en *E. megalocyathus* (Uriarte *et al.* 2011). Estas particularidades también fueron registradas en los huevos de *O. tehuelchus* e implicaron un desarrollo anormal donde los embriones resultaron ser no viables. Además, durante estos estadios tempranos de desarrollo los huevos poseen la cámara embrionaria comunicada con el pedúnculo, lo que impone un cuidado adicional a la hora de manipularlos. Una vez alcanzado el estadio VIII, cuando la membrana perivitelina se encuentra totalmente formada, esta conexión se interrumpe. Dicha conexión entre la cámara del huevo y el pedúnculo solo fue descrita en *O. bimaculoides* (Monsalvo-Spencer *et al.* 2013), especie que se caracteriza por producir huevos grandes y juveniles bentónicos. Esta característica observada debe ser tomada en cuenta al momento de la experimentación, para evitar mortalidades embrionarias por rotura del pedúnculo en los primeros estadios de desarrollo.

La temperatura juega un rol fundamental y condicionante en los procesos metabólicos embrionarios, entre ellos, la tasa y eficiencia en la absorción de vitelo y en el crecimiento y desarrollo de los embriones (Boletzky 1987, Vidal *et al.* 2002b, Villanueva *et al.* 2007, Uriarte *et al.* 2012, Caamal-Monsreal *et al.* 2016). En este sentido, *O. tehuelchus* presentó diferentes patrones en el desarrollo embrionario en las temperaturas ensayadas. A 16 °C el desarrollo del embrión pareció ser constante

durante toda la embriogénesis, no así a 13 °C, en que a partir de los estadios XV-XVI (post-organogénesis) el desarrollo se vuelve más lento hasta llegar a la eclosión. Este mismo patrón, caracterizado por la presencia de dos fases en el desarrollo, fue observado en embriones de *L. vulgaris reynaudii* (Oosthuizen *et al.* 2002). Asimismo, a partir del día 45 los embriones mantenidos a 16 °C fueron más grandes que los incubados a 13 °C. Adicionalmente, a ambas temperaturas, una vez alcanzados los estadios IX-X se incrementó el consumo de vitelo, lo que indicaría un mayor requerimiento de las reservas del saco de vitelo externo para satisfacer la elevada demanda energética en función de la formación de órganos y crecimiento del embrión. Estas observaciones concuerdan con las registradas en *O. maya*, en las cuales, independientemente de la temperatura de incubación, la cantidad de vitelo externo permaneció constante hasta el estadio X, para luego aumentar la tasa de consumo del mismo (Caamal-Monsreal *et al.* 2016). En *O. tehuelchus*, el seguimiento de las curvas de los estadios de desarrollo embrionario en función del tiempo de embriogénesis podría ser utilizado como una guía para establecer el periodo de eclosión a una determinada temperatura.

Durante el período de post-organogénesis se suceden cambios morfofisiológicos abruptos en los cuales los embriones crecen en tamaño hasta alcanzar su máximo desarrollo, cuando se vuelven competentes para eclosionar (Naef, 1928, Boletzky 2003, Olivares *et al.* 2019). La velocidad en que este proceso ocurre, donde la última porción de vitelo externo es absorbido y transferido al interior del embrión, está influenciada por la temperatura en la cual el embrión se desarrolla (Bouchaud y Daguzan 1990, Boletzky 2003, 1994). En los juveniles, el saco de vitelo interno actúa como reserva energética durante los primeros días post-eclosión (Naef 1928, Boletzky 2002, Caamal-Monsreal *et al.* 2016, Sanchez-García *et al.* 2017). Dado que la tasa de absorción del vitelo en los embriones de *O. tehuelchus* sujetos a bajas temperaturas disminuyó durante las etapas posteriores a la organogénesis (duplicando aproximadamente el tiempo total

de embriogénesis), la velocidad de este proceso determinaría el tiempo de eclosión individual y, en consecuencia, el período de eclosión. Además, la relación inversa observada entre el tiempo de eclosión y el tiempo de supervivencia sin alimentación para una misma temperatura podría estar indicando una compensación energética entre los estadios previos a la eclosión y el desempeño de los juveniles. A su vez, un periodo previo a la eclosión de mayor duración generará un consumo del vitelo mayor por parte del embrión todavía dentro del huevo, restringiendo de esta manera la energía disponible durante los primeros días de vida libre. En otras palabras, los procesos que ocurren durante el período previo a la eclosión tendrían un papel fundamental en el tiempo de eclosión individual y en el desempeño de los juveniles recién eclosionados de *O. tehuelchus*.

En los cefalópodos, la plasticidad en el periodo de eclosión podría representar una ventaja para sobrevivir en ambientes cuyas condiciones sean heterogéneas (Boletzky 2003). De acuerdo con Boletzky (1987, 1994), la eclosión de los juveniles podría retrasarse si la temperatura de desarrollo embrionario se acercara al límite inferior de la temperatura de adaptación de la especie en cuestión. En este sentido, un retardo en la eclosión permitiría que los juveniles nazcan cuando en el ambiente haya disponibilidad de alimento. Particularmente, esta característica podría adquirir una función reguladora y permitiría que los pulpos se adapten a aquellos ambientes donde la disponibilidad de alimento muestra fluctuaciones estacionales (Clarke 1982, Boletzky 1994). Esto se observa en los ambientes templados de la Patagonia correspondientes al extremo sur de la distribución de *O. tehuelchus* en el Océano Atlántico. En esta área, la temperatura del agua de mar varía entre 8° y 19 °C y la producción primaria se caracteriza por ser fuertemente estacional con dos picos, uno en otoño y otro en primavera (Rivas *et al.* 2006, Williams *et al.* 2018). A su vez, el reclutamiento progresivo y discontinuo de los juveniles entre la primavera y el comienzo del verano en las poblaciones de la Patagonia

Norte (Iribarne 1991) podría explicarse por la relación entre el período de eclosión y la temperatura, el cual en este periodo puede abarcar de semanas a meses, junto con un período de puesta que se extiende desde principios de otoño hasta principios de invierno (Iribarne 1991, Ré 1998, Storero *et al.* 2010). Por el contrario, un desarrollo embrionario y un período de eclosión más cortos dados por un aumento en la temperatura, permitirían a los pulpos eclosionar antes, crecer más rápido y sobrevivir hasta la edad reproductiva, aumentando la condición de la población (Uriarte *et al.* 2012, Nande *et al.* 2018). Esta característica podría verse reflejada en las poblaciones de *O. tehuelchus* que habitan en las aguas subtropicales del sur de Brasil, donde la temperatura oscila entre los 12 y 24 °C y cuya productividad es relativamente alta (Ciotti *et al.* 1995); lo cual permitiría que las crías tengan disponibilidad de alimento durante todo el año (Ciotti *et al.* 1995, Alves y Haimovici 2011).

En las experiencias del presente estudio, la temperatura mostró el potencial de aumentar o disminuir el desempeño de los juveniles en el período inicial de post-eclosión. En *S. officinalis*, *D. opalescens*, *D. sanpaulensis*, *D. gahi* y *O. vulgaris* se registró que los juveniles obtenidos a bajas temperaturas eran de mayores tamaños y más pesados que los incubados a temperaturas más cálidas (Bouchaud 1991, Vidal *et al.* 2002a, Barón 2003, Repolho *et al.* 2014). En cambio, Caamal-Monsreal y colaboradores (2016) establecieron en *O. maya* que el mejor desempeño de las crías ocurrió cuando los embriones fueron incubados a temperaturas intermedias (22-26 °C) y no en los extremos térmicos (18-30 °C). En *O. tehuelchus*, una mayor temperatura de incubación y mantenimiento de los juveniles parece optimizar la eficiencia en la conversión de vitelo, dando lugar a juveniles más grandes. Por el contrario, a temperaturas más bajas la energía obtenida a través de la absorción del vitelo durante el desarrollo embrionario sería utilizada para en mayor proporción para garantizar procesos metabólicos básicos y para el mantenimiento fisiológico de los juveniles, y no tanto para el crecimiento. A su

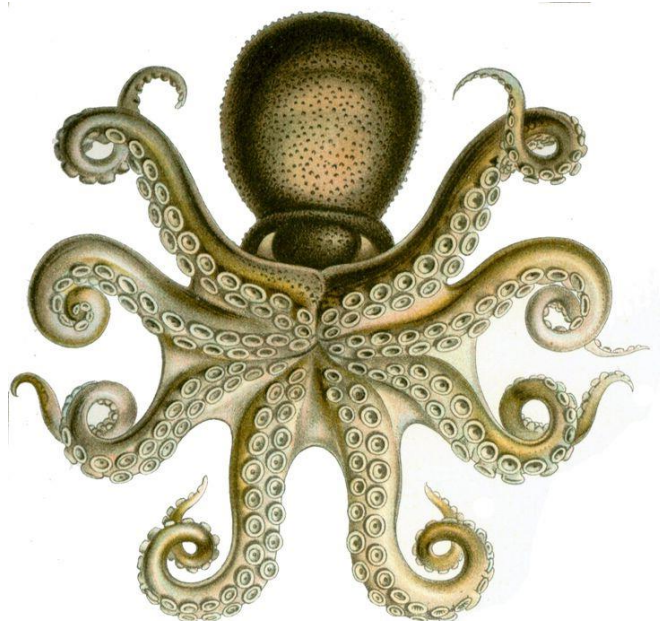
vez, a mayores temperaturas, las tasas metabólicas serían mayores, por lo que la absorción del vitelo sería más rápida, generando así una reducción en el tiempo de sobrevida sin alimentación.

Dado que las características morfométricas pueden variar según la temperatura y sufrir cambios durante la ontogenia de los juveniles, estos parámetros no serían suficientes para realizar la correcta identificación de juveniles recién eclosionados en poblaciones naturales (Kubodera y Okutani 1981, Young *et al.* 1989, Hochberg *et al.* 1992, Messenger 2001). Por el contrario, los patrones de cromatóforos se caracterizan por ser específicos de cada especie y permanecen sin cambios durante el crecimiento del juvenil (Sweeney *et al.* 1992, Villanueva y Norman 2008). En cuanto a los juveniles de *O. tehuelchus*, se observó que el patrón de cromatóforos parece ser independiente de la temperatura de incubación de los embriones. En este sentido, la presencia de cromatóforos cubriendo densamente el manto, la cabeza y los brazos, sumado a la ausencia de pigmentación en el sifón, podrían servir para distinguir a las crías de *O. tehuelchus* de otras especies simpátricas costeras, como *Enteroctopus megalocyathus* y *Robsonella fontaniana*, ambas ya descritas en la costa norte de la Patagonia (Ortiz *et al.* 2006, Ortiz y Ré 2011).

Las diferencias observadas en la duración de la embriogénesis y en el tiempo de eclosión entre ambas temperaturas de experimentación podrían ser mecanismos de adaptación que optimizan la viabilidad de embriones y juveniles bajo las diferentes temperaturas ambientales que se pueden encontrar en las costas del norte de la Patagonia. Sin embargo, se espera que estos mecanismos compensatorios provoquen costos metabólicos y cambios de comportamiento y en el desempeño de los juveniles (Higgins *et al.* 2012, Noyola *et al.* 2013a,b) y, por lo tanto, estas características deben investigarse para establecer condiciones de cultivo aptas para su desarrollo. Desde un punto de vista práctico, conocer las condiciones de manipulación adecuada para tratar

las puestas, sumado a comprender cómo los efectos relacionados con la temperatura actúan sobre la embriogénesis y la supervivencia de los juveniles, ayudaría a organizar los procedimientos de laboratorio para planificar la obtención de juveniles en diferentes épocas del año y así potenciar este recurso acuícola.

CAPÍTULO II



**RESPUESTA ENZIMÁTICA, CAMBIOS CITOLÓGICOS
DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA Y CAMBIOS
MORFOMÉTRICOS CORPORALES EN JUVENILES DE
OCTOPUS TEHUELCHUS BAJO DOS REGÍMENES DE
ALIMENTACIÓN**

INTRODUCCIÓN

En los cefalópodos, el período posterior a la eclosión resulta crítico debido a que se produce la transición entre el consumo de las reservas internas de vitelo y una alimentación independiente. En este período, las crías experimentan cambios fisiológicos y morfológicos, tanto en órganos externos como internos, que les dan la capacidad para alimentarse de recursos exógenos (Vecchione 1987, Boletzky 1989, Moguel *et al.* 2010, Martínez *et al.* 2011). Durante esta etapa de transición, tanto los procesos involucrados en la absorción y asimilación de nutrientes como la calidad y la palatabilidad del alimento son considerados un cuello de botella en paralarvas y juveniles de cefalópodos (Cerezo-Valverde *et al.* 2008, Quintana *et al.* 2011, Gallardo *et al.* 2017, Bastos *et al.* 2020). De esta manera, es necesario comprender estos procesos para el desarrollo de protocolos de viabilidad de las crías (Iglesias *et al.* 2007, Rosas *et al.* 2008, Vidal *et al.* 2014, Sykes *et al.* 2017, Uriarte *et al.* 2018).

En esta clase de moluscos, los procesos digestivos consisten en dos eventos fundamentales: una digestión extracelular y una intracelular. La digestión extracelular comienza con la acción mecánica del pico y la rádula combinada con la secreción enzimática, principalmente quimotripsina, de las glándulas salivales sobre la presa para formar el quimo. Luego, este quimo es ingerido por la boca pasando al estómago anterior (buche) y casi simultáneamente al estómago posterior (degradación de las macromoléculas), ciego y glándula digestiva (GD). Ya en el buche, los jugos gástricos con las enzimas de la GD comienzan a actuar sobre el alimento ingerido. En el ciego, el quimo se separa en material no digerido y en nutrientes. Por un lado, el material no digerido es transportado al intestino y eliminado a través del ano en forma de heces. Por otro lado, los nutrientes son transportados a la GD donde por acción de las células y enzimas digestivas son absorbidos y comienza la digestión intracelular (Boucher-Rodoni *et al.* 1987, Gallardo *et al.* 2017, Ibarra-García *et al.* 2018a). Durante la digestión intracelular, los lípidos, proteínas y polisacáridos son hidrolizados y transformados en

acil-glicéridos, aminoácidos y carbohidratos (Boucaud-Camou *et al.* 1976, Boucher-Rodoni *et al.* 1987, Budelmann *et al.* 1997, Gallardo *et al.* 2017) y luego son transportados a los tejidos a través de la hemolinfa para su uso en la restauración tisular, ser almacenados en el músculo para posterior crecimiento o como fuente energética (Gallardo *et al.* 2017).

En todo este proceso digestivo, la GD cumple un rol clave dado que es el órgano responsable del almacenamiento de nutrientes (lípidos y proteínas), secreción enzimática, absorción de moléculas, digestión intracelular y excreción de desechos (Pollero e Iribarne 1988, Moguel *et al.* 2010, Martínez *et al.* 2011). Durante los primeros días después de la eclosión, la GD sufre una serie de cambios estructurales importantes, actuando inicialmente como reserva vitelina para luego ser el órgano principal involucrado en la digestión intracelular de los alimentos ingeridos por acción de las células digestivas y por la secreción de enzimas (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni 1983, Perrin *et al.* 2004, Moguel *et al.* 2010, Martínez *et al.* 2011, Ibarra -Garcia *et al.* 2018a).

La fisiología digestiva es considerada un aspecto crucial para el avance del cultivo de pulpos (Gallardo *et al.* 2017, Ibarra-García *et al.* 2018a). En estos animales, cuya dieta natural se basa principalmente en crustáceos, peces y moluscos, el principal sustrato metabólico es la proteína (Alejo-Plata *et al.* 2009, Estefanell *et al.* 2013, Gallardo *et al.* 2017, Krstulović y Vrgoc 2009). Es por ello que la actividad de las peptidasas responsables de la hidrólisis de proteínas es determinante en la eficiencia de los procesos digestivos (Boucaud-Camou y Boucher Rodoni 1983, Morote *et al.* 2005, Ibarra-García *et al.* 2018a). Entre dichas peptidasas, las alcalinas como la tripsina y quimotripsina, contribuyen a la digestión extracelular y, las ácidas o aspárticas, como las catepsinas intracelulares, contribuyen en la digestión intracelular (Martínez *et al.* 2011, Hamdan *et al.* 2014, Ibarra-García *et al.* 2018a, Safi *et al.* 2018). A su vez, inmediatamente después

de la eclosión, existe una alta actividad de las lipasas y fosfatasas ácidas asociadas con la degradación de las reservas de vitelo (Pasteels 1973, Perrin *et al.* 2004, Lacoue-Labarthe *et al.* 2010, Moguel *et al.* 2010, Ibarra-García *et al.* 2018b) compuestas principalmente por lípidos, proteínas y carbohidratos (Craig 2001, Matozzo *et al.* 2015). Esta respuesta fisiológica brinda a los juveniles la posibilidad de sobrevivir durante los primeros días, cuando la comida puede estar ausente o en cantidades limitadas (Segawa y Hanlon 1988, Moguel *et al.* 2010, ver Capítulo I).

En los cefalópodos, a diferencia de otros animales como los peces, la digestión ácida intracelular ocurre junto con la digestión alcalina extracelular de forma simultánea durante toda la vida (O'Dor y Webber 1986, Boucaud-Camou y Roper 1995, Lazo *et al.* 2007). Esta combinación de ambos procesos da como resultado un sistema digestivo que genera una alta eficiencia en la asimilación de nutrientes, provocando un rápido crecimiento de los especímenes (Boucaud-Camou y Roper 1995, Swift *et al.* 2005, Safi *et al.* 2018). Sin embargo, estudios llevados a cabo en calamares como *Doryteuthis opalescens* (Forsythe y Van Heukelem 1987, Vidal *et al.* 2002a,b) y en pulpos como *O. maya* (Moguel *et al.* 2010) demostraron que previa a una etapa de crecimiento exponencial, existe una ventana temporal en la cual el peso y el tamaño de los ejemplares no varía. Esta etapa temprana en donde el peso perdido durante la absorción de las reservas de vitelo es recuperado a través del consumo de presas, igualando el peso de la cría al nacer, es definida como “periodo sin crecimiento neto” (Parra *et al.* 2000, Vidal *et al.* 2002b). Este período se caracteriza por tener una elevada mortalidad relacionada con la no resistencia a la inanición de las crías, producto de no poder suplir la demanda energética para desarrollarse debido a que la cantidad de alimento disponible se torna insuficiente (Vidal *et al.* 2002b, Moguel *et al.* 2010, Uriarte *et al.* 2011).

En el medio natural, el isópodo *Exosphaeroma* sp. constituye una fracción de la dieta de los juveniles de *O. tehuelchus* (Ré y Gómez-Simes 1992). En experiencias previas realizadas bajo condiciones controladas de acuario, Ré (1989) observó que los juveniles de *O. tehuelchus* mostraron un comportamiento predatorio sobre *Artemia* sp. a partir del tercer día después de la eclosión. A su vez, en el Capítulo I se demostró que el régimen térmico modula el uso de las reservas vitelinas como así también los tiempos de supervivencia y el tamaño de diversas estructuras corporales en juveniles. Sin embargo, se desconoce cómo el alimento estimula la dinámica digestiva y el crecimiento durante los primeros meses del ciclo de vida. En este contexto, conocer los procesos morfofisiológicos de la glándula digestiva (GD) de *O. tehuelchus* resulta determinante para poder definir los requerimientos nutricionales y las características alimentarias que garanticen la viabilidad de las crías (Arvy 1960, Mangold y Young 1998, Rosas *et al.* 2008, Martínez *et al.* 2011, Gallardo *et al.* 2017).

Con el fin de caracterizar la dinámica digestiva y el crecimiento durante el periodo post eclosión, en este capítulo se evalúan la actividad enzimática específica de lipasas, fosfatasas ácidas y alcalinas, y peptidasas aspárticas, cisteínicas y alcalinas, junto con los cambios citológicos de la GD y los cambios registrados en el peso húmedo (PH) y en el largo dorsal del manto (LDM) en juveniles de *O. tehuelchus* bajo dos tratamientos alimenticios: inanición y alimentación con isópodos *Exosphaeroma* sp.

La hipótesis puesta a prueba en este capítulo es que en los juveniles el sistema digestivo experimenta cambios morfológicos y fisiológicos a lo largo del desarrollo del individuo hasta el periodo en el cual alcanza la madurez funcional. Y la predicción es que los cambios citológicos y bioquímicos en glándula digestiva serán indicativos del periodo en el cual los individuos estarán aptos para alimentarse por vía exógena.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN E INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE HUEVOS

Las masas de huevos de *O. tehuelchus* fueron recolectadas durante el período de puesta entre abril y mayo de 2018, en aguas del Golfo Nuevo, zona de Punta Arco (42 ° 42 'S, 64 ° 59 'O) (Figura 3), siguiendo lo establecido en la Metodología General. Se utilizaron un total de nueve masas de huevos (puestas) completas, y se incubaron artificialmente en acuarios independientes de vidrio de 5l (Figura 6) a 16 ± 1 °C, siguiendo los protocolos de limpieza y mantención mencionados en la Metodología General y el Capítulo I.

CRÍA Y MANTENIMIENTO DE LOS JUVENILES

Cada juvenil se colocó en un acuario individual de plástico de 3 l (Figura 7), con dos refugios, que fue mantenido a 16 °C. Los parámetros de calidad del agua fueron monitoreados de acuerdo a lo mencionado en la Metodología General. En cada acuario, la calidad del agua se verificó diariamente y cada dos días se reemplazó 3/4 del volumen.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para probar los efectos de la alimentación y la edad sobre los parámetros morfométricos, los cambios citológicos y la dinámica enzimática de la GD de los juveniles, se aplicó un diseño factorial. Los juveniles fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos tratamientos de alimentación: inanición y alimentación *ad libitum* con isópodos *Exosphaeroma* sp. Los isópodos fueron obtenidos de las zonas rocosas intermareales del Golfo Nuevo; el alimento ofertado consistió en ejemplares vivos de ambos sexos con longitudes totales entre 5 y 15mm y un peso húmedo entre 0,0032 y 0,3331 g. Los niveles de muestreo para los juveniles en inanición fueron 6, a los 2, 4, 6, 8, 10 y 15 días post eclosión (DPE), y para los juveniles alimentados con isópodos el muestreo se extendió a 20 y 25 DPE.

En el tratamiento inanición no se contemplaron los niveles correspondientes a los 20 y 25 DPE debido a que, en experiencias previas realizadas con un régimen térmico de 16 °C, el tiempo de supervivencia de las crías sin alimentarse fue, en promedio, de 17 DPE (ver Capítulo I). A su vez, se realizaron mediciones al DPE 0 para proporcionar un valor inicial de cada variable analizada.

Para la realización de estos análisis se utilizaron un total de 366 juveniles criados y mantenidos en acuarios individuales. Parte de estos juveniles fueron seleccionados de manera aleatoria previamente a los estudios histológicos y enzimáticos para la toma de las medidas morfométricas. Antes del muestreo, se privó de alimento a todos los pulpos del tratamiento con isópodos durante 12hs (Moguel *et al.* 2010).

MEDICIONES MORFOMÉTRICAS DE LOS JUVENILES

Se midió el peso húmedo (PH) en gramos y el largo dorsal del manto (LDM) en mm en un total de 150 juveniles de *O. tehuelchus*: 10 para el DPE 0, más 10 individuos para cada tratamiento en cada día de muestreo. Los juveniles fueron pesados y fotografiados bajo un microscopio estereoscópico para luego ser medidos mediante el software ImageJ (Schneider *et al.* 2012). Cada juvenil fue considerado como una réplica.

COMPORTAMIENTO PREDATORIO DE LOS JUVENILES

Mediante inspecciones visuales realizadas diariamente, se describió el comportamiento de los juveniles tras la eclosión. Se determinó el uso del acuario por parte de los juveniles (hábitos nectobentónicos o totalmente bentónicos). A su vez, en los ejemplares a los cuales se les suministró isópodos, se estableció si los isópodos fueron aceptados como alimento y a partir de que día comienzan a alimentarse.

PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA

Se evaluaron los cambios citológicos en la GD en 3 juveniles por cada DPE. Los animales fueron anestesiados (ver metodología general) y diseccionados para separar la GD del resto de las estructuras corporales. Las GD se fijaron en solución de Bouin durante 24 horas (Avila-Poveda y Baqueiro-Cárdenas 2009, Martínez *et al.* 2011) y se conservaron en etanol al 70 % con glicerina al 0,1 % (Sweeney y Roper 1983, Avila-Poveda *et al.* 2009). Luego, se procedió según Ávila-Poveda y colaboradores (2009) con el lavado, deshidratación e inclusión en parafina para su posterior corte. Los cortes transversales de las GD se realizaron con un micrótopo rotativo manual (Leica RM 2225) en secciones en serie de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson. Las imágenes para la identificación de estructuras celulares se obtuvieron con la cámara Leica DFC 450 montada en un microscopio Leica DM 2500. Las estructuras celulares en los diferentes DPE fueron diagnosticadas siguiendo la clasificación y terminología propuesta por Martínez y colaboradores (2011).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA

Para determinar la actividad enzimática específica de las enzimas digestivas se analizaron un total de 42 (0 DPE), 153 (tratamiento de inanición) y 126 (tratamiento con isópodos) GD. Para cada enzima se midieron entre 3 y 4 réplicas por DPE por tratamiento. Para alcanzar el volumen de trabajo deseado, cada réplica consistió en un grupo de 3 GD. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Después de la disección, las GD se almacenaron a -80 °C hasta el análisis requerido. Las muestras fueron liofilizadas y luego transportadas al Laboratorio de Fisiología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Aplicada (IIMyC, Mar del Plata, Argentina). Al momento de ser utilizadas, las muestras se hidrataron en agua destilada a 4 °C durante la noche para luego preparar los homogenatos. Estos homogenatos se prepararon con agua destilada

1: 3 (p/v) y se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 30 minutos. Para estos análisis, la concentración de proteínas de las soluciones se realizó siguiendo el procedimiento de Bradford (1976).

La determinación de la actividad de la lipasa se realizó según el método modificado de Nolasco-Soria y colaboradores (2018). En una microplaca de 96 pocillos se añadieron 10 µl de taurocolato de sodio (100 mM), 50 µl de buffer Tris-HCl (200 mM) a pH 8 y 10 µl de sustrato β-naftil caprilato (20 mM) en dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 µl de extracto de proteína. Después de incubar 9 minutos a 25 °C, se añadieron 10 µl de fast blue (20 mM) en DMSO. Se incorporaron 110 µl de TAC-SDS (2 % p/v de TAC y 12,5 % p/v de SDS) y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 1 minuto. Finalmente, la absorbancia se leyó a 540 nm. Para determinar la actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas, se siguieron los métodos de Moyano y colaboradores (1996) y Principato y colaboradores (1982). A 10 µl de homogenato vertido en placas para cultivo de fondo plano se añadieron como sustrato 10µl de p-nitrofenilfosfato al 2 % p/v en un buffer de Tris-HCl 1 M pH 3 (fosfatasas acidas) o Tris-HCl 1 M pH 10 (fosfatasas alcalinas). Después de incubar durante 30 minutos a 25 °C, se añadieron 100 µl de NaOH 1 M. La absorbancia se midió a 405 nm.

La actividad de las peptidasas aspárticas (pH 4) se analizó según Bonete y colaboradores (1984). A 5 µl de homogenato se añadieron 250 µl de buffer acetato 0,4 M (pH 4) y 250 µl de hemoglobina (0,5 % p/v) como sustrato. Se incubó a 37 °C durante 60 minutos y se le adicionó 250 TAC (20 % p/v). La muestra se dejó enfriar durante 10 minutos y luego se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos. La densidad óptica se midió a 280 nm. La actividad de las peptidasas cisteínicas (pH 6) se midió según el protocolo modificado utilizado por Cárdenas-López y Haard (2005). A 5 µl de homogenato se le añadieron 250 µl de buffer fosfato de sodio 100 mM (pH 6) con 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Luego se añadieron 250 µl de sustrato

de azocaseína (0,5 % p/v) y se incubaron a 37 °C durante 60 minutos. Se agregaron 250 µl de TAC (20 % p/v) y la reacción se enfrió durante 10 minutos. Tras esto, se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos. La absorbancia se midió a 366 nm (González-Zamorano *et al.* 2013).

La actividad de la peptidasa alcalina se determinó siguiendo el método descrito por Sarath y colaboradores (1989) y modificado por Nolasco-Soria (2021). A 5 µl de homogenato, se le añadieron 250 µl de buffer Tris-HCl 0,05 M / CaCl₂ 10 mM (pH 8,1) y 250 µl de azocaseína (0,5 % p/v) como sustrato. Después de la incubación a 37 °C durante 60 minutos, se añadieron 250 µl (TAC) (20 % p/v) para detener la reacción. La preparación se enfrió durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos. Finalmente, la densidad óptica se midió a 366 nm. La temperatura utilizada para la medición de todas las peptidasas se estandarizó siguiendo los protocolos utilizados por Safi y colaboradores (2018).

Todas las actividades enzimáticas se calcularon de la misma manera para unificar unidades y, por lo tanto, se expresaron como U mg⁻¹ de proteína, donde una unidad de actividad enzimática se definió como el cambio de absorbancia por minuto.

ANÁLISIS DE DATOS

Las variables morfométricas (PH y LDM) junto con la actividad enzimática específica se compararon entre tratamientos para cada nivel o edad (DPE) utilizando modelos lineales con una significancia estadística de $p < 0,05$. Dado que la mayoría de las variables no mostraron una relación lineal con la edad, esta última se consideró categórica. Los datos de 0 DPE no se consideraron en los análisis, ni tampoco los datos de juveniles alimentados con isópodos a los 20 y 25 DPE, ya que no hubo tratamiento de inanición para esos DPE para poder comparar. Siempre que se detectó heterocedasticidad, se aplicó al modelo una estructura de varianza de potencia. Cuando

la interacción entre los tratamientos de alimentación y la edad (DPE) fue significativa, las variables respuesta se compararon entre ambos tratamientos alimenticios para cada DPE utilizando modelos lineales similares. En los casos en los que se detectaron diferencias significativas solo para la edad, se realizaron comparaciones múltiples utilizando pruebas de Tukey. Todos los análisis se realizaron en R versión 4.0.3. (R Core Team 2020) utilizando el paquete "nlme" (Pinheiro *et al.* 2016). Los resultados obtenidos se expresan como medias y desviaciones estándar.

RESULTADOS

CAMBIOS MORFOMÉTRICOS EN JUVENILES DE *OCTOPUS TEHUELCHUS*

Para las dos variables morfométricas, LDM y PH, las diferencias se explicaron por la interacción entre la edad (DPE) y el tratamiento alimenticio (Tabla II.1). Al momento de la eclosión, el LDM y el PH fueron $6,68 \pm 0,74$ mm y $0,16 \pm 0,04$ g. Independientemente del tratamiento, ambas variables morfométricas se comportaron de manera similar a lo largo del tiempo (Figura II.1). Para el tratamiento de inanición no se observaron cambios sustanciales a lo largo de la experiencia. En cambio, para el tratamiento con isópodos ambas variables aumentaron progresivamente a lo largo de los días, con picos máximos a los 20 DPE para el LDM ($7,35 \pm 1,16$ mm) y a los 25 DPE para PH ($0,34 \pm 0,08$ g), esta última variable morfométrica duplicó su valor desde la eclosión (Figura II.1).

Tabla II.1. Resultados de los modelos lineales. Efecto del tratamiento alimenticio, la edad (DPE) y su interacción sobre el peso húmedo (PH) y el largo dorsal del manto (LDM) en juveniles de *Octopus tehuilchus*.

Fuente de variación	GL	PH		LDM	
		F	p	F	p
Tratamiento alimenticio	1	27,4915	<0,0001	16,2801	0,0001
Edad	5	5,7587	<0,0001	1,9428	0,0931
Edad x Tratamiento alimenticio	5	6,3272	<0,0001	3,9180	0,0027

Para ambas variables morfométricas se registraron diferencias entre tratamientos al mismo DPE: fueron mayores en los juveniles alimentados con isópodos (Figura II.1). Para el PH, se observaron diferencias a partir de los 6 DPE ($\chi^2 = 9,6486$, $p = 0,0018$) que permanecieron al día 8 ($\chi^2 = 4,3067$, $p = 0,0379$), al día 10 ($F = 37,137$, $p < 0,0001$) y al día 15 ($F = 14,824$, $p = 0,0011$) (Figura II.1A). En cuanto al LDM, las diferencias comenzaron a verse también a los 6 DPE ($F = 8,046$, $p = 0,0109$) y continuaron al día 10 ($F = 10,537$, $p = 0,0044$) hasta el final del tratamiento a los 15 días ($F = 14,378$, $p = 0,0013$) (Figura II.1B).

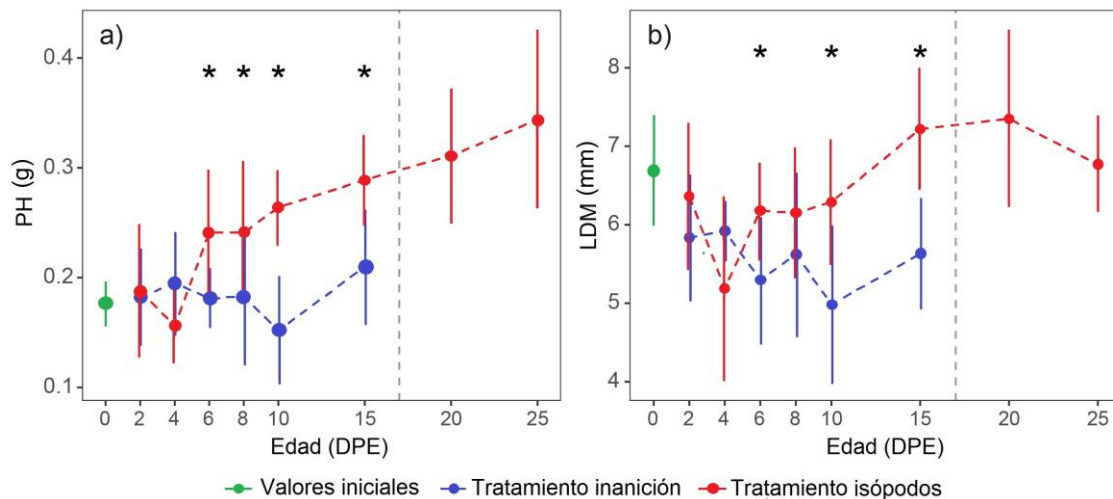


Figura II.1. Relación entre los parámetros morfométricos de los juveniles de *Octopus tehuelchus* y la edad (DPE) en función del tratamiento: en inanición (puntos azules) y alimentados con isópodos (puntos rojos). Los valores iniciales se muestran como puntos de color verde. a) peso húmedo, b) largo dorsal del manto. Las barras verticales indican la desviación estándar. Los asteriscos marcan diferencias significativas entre los tratamientos para cada DPE. La línea gris punteada vertical indica el tiempo promedio de supervivencia en inanición (días) de los juveniles (ver Capítulo I).

COMPORTAMIENTO PREDATORIO EN JUVENILES DE *OCTOPUS TEHUELCHUS*

Los juveniles de ambos tratamientos exhibieron un comportamiento totalmente bentónico inmediatamente después de la eclosión, colocándose bajo los refugios o explorando el fondo del acuario. En el tratamiento con isópodos, los juveniles reaccionaron a los estímulos visuales generados por *Exosphaeroma sp* (movimiento errático sobre el fondo del acuario o una natación rápida) y comenzaron a alimentarse unas horas después de la eclosión, es decir entre los 0 y 1 DPE.

CAMBIOS CITOLÓGICOS EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA

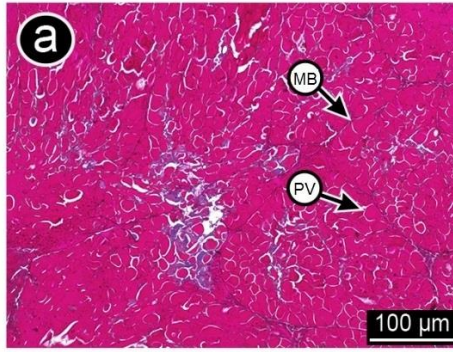
En los cortes histológicos de la GD de los juveniles en inanición, a diferencia de lo registrado en las crías alimentadas con isópodos, no se observó diferenciación celular a lo largo del tratamiento (Figura II.2). En los juveniles recién nacidos (0 DPE), la GD se observó completamente cubierta de plaquetas de vitelo (Figura II.2A). Hasta el 6 DPE,

para ambos tratamientos, los túbulos de la GD estuvieron pobremente diferenciados y con la superficie cubierta de grandes plaquetas de vitelo. Sin embargo, en los juveniles alimentados con isópodos comenzó a observarse la aparición de una pequeña luz central en algunos de los túbulos (Figura II.2B, C).

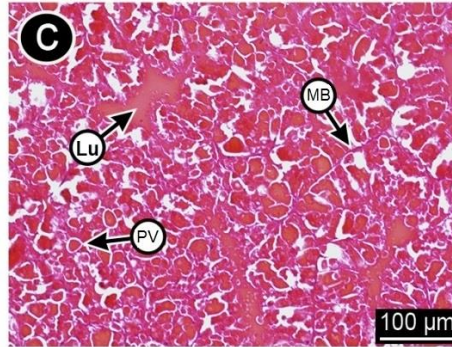
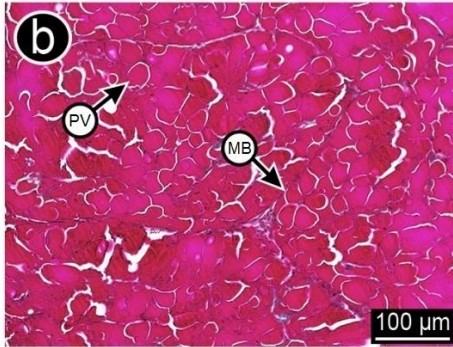
Después del 6 DPE, en el tratamiento inanición, el lumen central de los túbulos comenzó a expandirse y la cantidad y tamaño de las plaquetas de vitelo disminuyeron hasta consumirse casi por completo entre los días 10 y 15 (Figura II.2D, F). Por el contrario, en el tratamiento con isópodos, pasado los 6 DPE y hasta los 10 DPE, aparecieron en primer lugar los heterolisosomas mientras que la luz central de los túbulos se expandió considerablemente a medida que las plaquetas de vitelo disminuyeron en tamaño y cantidad. Durante este mismo periodo, pero unos DPE después, aparecieron los heterofagosomas y se hizo visible la membrana lateral de los túbulos de la GD (Figura II.2E).

En el tratamiento con isópodos, a los 15 DPE, el vitelo se redujo por completo y comenzaron a aparecer los lisosomas secretores junto con los cuerpos residuales (Figura II.2G). Finalmente, a los 25 DPE las microvellosidades de las células digestivas de los túbulos se hicieron visibles (Figura II.2H). Sin embargo, a los 15 DPE, final de la comparación entre ambos tratamientos, se observó que las GD de los juveniles sometidos a inanición tenían mayor cantidad de vitelo como así también plaquetas más grandes en comparación con las GD del tratamiento con isópodos (Figura II.2F, G).

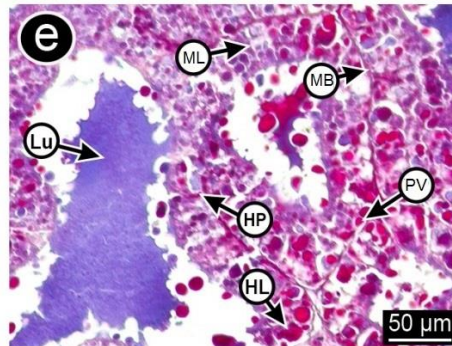
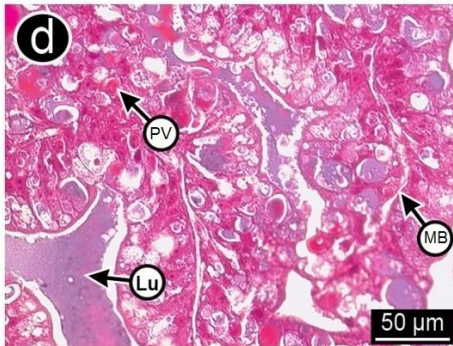
0 DPE



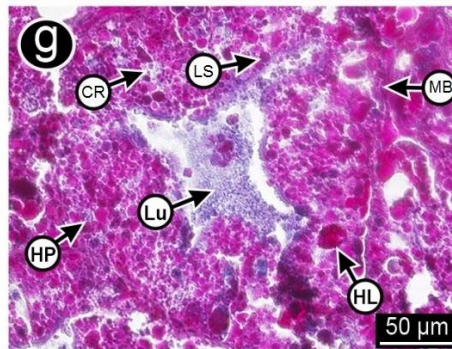
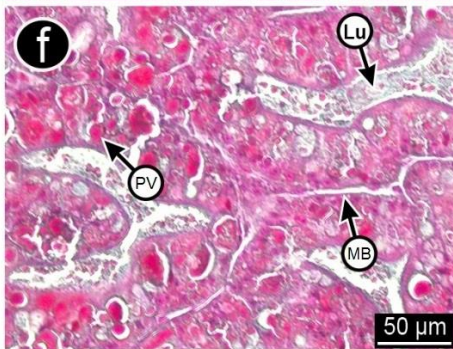
6 DPE



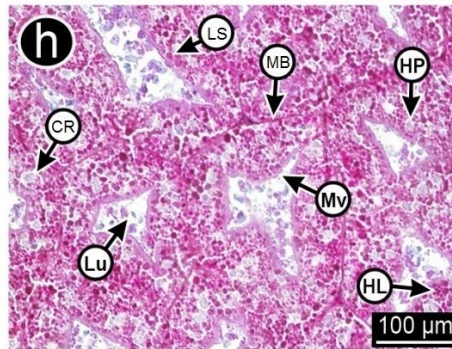
10 DPE



15 DPE



25 DPE



Tratamiento inanición

Tratamiento isópodos

Figura II.2. Cambios citológicos de la glándula digestiva en juveniles de *Octopus tehuelchus* a lo largo de diferentes días post eclosión (DPE) para el tratamiento en inanición y el tratamiento con isópodos. CR: cuerpos residuales (cuerpos densos formados por la fusión de de lisosomas secretores y heterolisosomas), HL: heterolisosomas (estructuras homogéneas redondeadas que contienen material pinocítico o fagocítico), HP: heterofagosomas (vacuolas de absorción formadas por la fusión de lisosomas primarios con un fagosoma) , LS: lisosomas secretores (cuerpos acidófilos densos y redondeados) , Lu: lumen, MB: membrana basal, ML: membrana lateral, Mv: microvellosidades (borde en cepillo de las células digestivas), PV: plaquetas de vitelo (cuerpos homogéneos con material de reserva). Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina y eosina (A, B, C y D) y con tricrómico de Masson (E, F, G y H).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA

La actividad medida de cada enzima fue diferente según la edad (DPE) y el tratamiento. En el caso de las lipasas, la actividad enzimática específica se vio afectada sólo por la edad (DPE). En cuanto a las fosfatasas ácidas y alcalinas y las peptidasas cisteínicas y alcalinas, las diferencias se explicaron por la interacción entre el factor edad y tratamiento alimenticio. Mientras que la actividad de las peptidasas aspárticas no se vio afectada por ninguno de los factores o por su interacción (Tabla II.2).

Tabla II.2. Resultados de los modelos lineales. Efectos principales del tratamiento alimenticio, la edad (DPE) y su interacción, sobre la actividad enzimática específica de cada enzima en la glándula digestiva de juveniles de *Octopus tehuelchus*.

Fuente de variación	GL	Lipasas		Fosfatasas ácidas		Fosfatasas alcalinas	
		χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
Tratamiento alimenticio	1	0,5650	0,4522	140,3221	<0,0001	2,3920	0,1219
Edad	5	17,8321	0,0032	1310,9501	<0,0001	5,8642	0,2096
Edad*Tratamiento alimenticio	5	10,2001	0,0698	298,0201	<0,0001	19,6901	0,0006
		Peptidasas aspárticas		Peptidasas cisteínicas		Peptidasas alcalinas	
Tratamiento alimenticio	1	0,1086	0,7440	7,4364	0,0064	0,0710	0,7900
Edad	5	2,1254	0,0887	12,1282	0,0331	16,8842	0,0047
Edad x Tratamiento alimenticio	5	1,0342	0,4154	13,4711	0,0193	13,5773	0,0185

En el caso de las lipasas, el tratamiento en inanición registró un pico máximo de actividad específica a los 4 DPE, seis días antes que el pico máximo observado en el tratamiento con isópodos. Después de estos picos, en ambos tratamientos, la actividad enzimática disminuyó progresivamente hasta el final de la experiencia (Figura II.3A). El test de Tukey mostró que a los 4 y 10 DPE fueron diferentes al 15 DPE.

Para ambas fosfatasas, la actividad específica registrada en el tratamiento de inanición permaneció baja y con poca variación durante los 15 DPE del experimento (Figura II.3B, C). Por el contrario, para el tratamiento con isópodos la actividad específica aumentó con el tiempo, alcanzando la máxima actividad para las fosfatasas ácidas a los 15 DPE y para las fosfatasas alcalinas entre los 10 y 20 DPE (Figura II.3B, C). Al comparar entre tratamientos, en las fosfatasas ácidas se observó una actividad específica mayor en los juveniles alimentados con isópodos al 4 DPE ($\chi^2 = 24,514$, $p < 0,0001$), 6 ($\chi^2 = 35,392$, $p < 0,0001$), 10 ($\chi^2 = 52,6445$, $p < 0,0001$) y 15 ($F = 1676$, $p < 0,0001$); mientras que para las fosfatasas alcalinas se observaron diferencias en el DPE 4 ($F = 7,324$, $p = 0,0068$), 8 ($\chi^2 = 11,375$, $p = 0,0007$), 10 ($\chi^2 = 18,609$, $p < 0,0001$) y 15 ($\chi^2 = 17,596$, $p < 0,0001$) (Figura II.3B). Es decir, que a partir del día 4 hasta el final de la comparación entre tratamientos, las actividades específicas de las fosfatasas fueron mayores en los juveniles alimentados.

En cuanto a las peptidasas aspárticas, no se detectaron diferencias entre tratamientos; estas enzimas mostraron un comportamiento errático a lo largo de los días (Figura II.3D). A diferencia del resto de las enzimas, para las peptidasas cisteínicas la actividad específica en el tratamiento con isópodos se mantuvo baja y poco variable, mientras que en el tratamiento de inanición se mantuvo siempre por encima del tratamiento con isópodos, observándose diferencias al 8 DPE ($\chi^2 = 5,338$, $p = 0,0209$) y al 15 ($\chi^2 = 4,159$, $p = 0,0414$) (Figura II.3E). Para las peptidasas alcalinas, el tratamiento de inanición mostró una actividad baja y uniforme, mientras que en el tratamiento con

isópodos la actividad aumentó a lo largo de los días, llegando a sus niveles máximos a los 20 DPE (Figura II.3F). Al comparar entre tratamientos, se registró una actividad mayor al 2 DPE ($\chi^2 = 5,847$, $p = 0,0156$) en los juveniles en inanición y al 10 DPE ($\chi^2 = 8,980$, $p = 0,0027$) en los juveniles alimentados con isópodos (Figura II.3F).

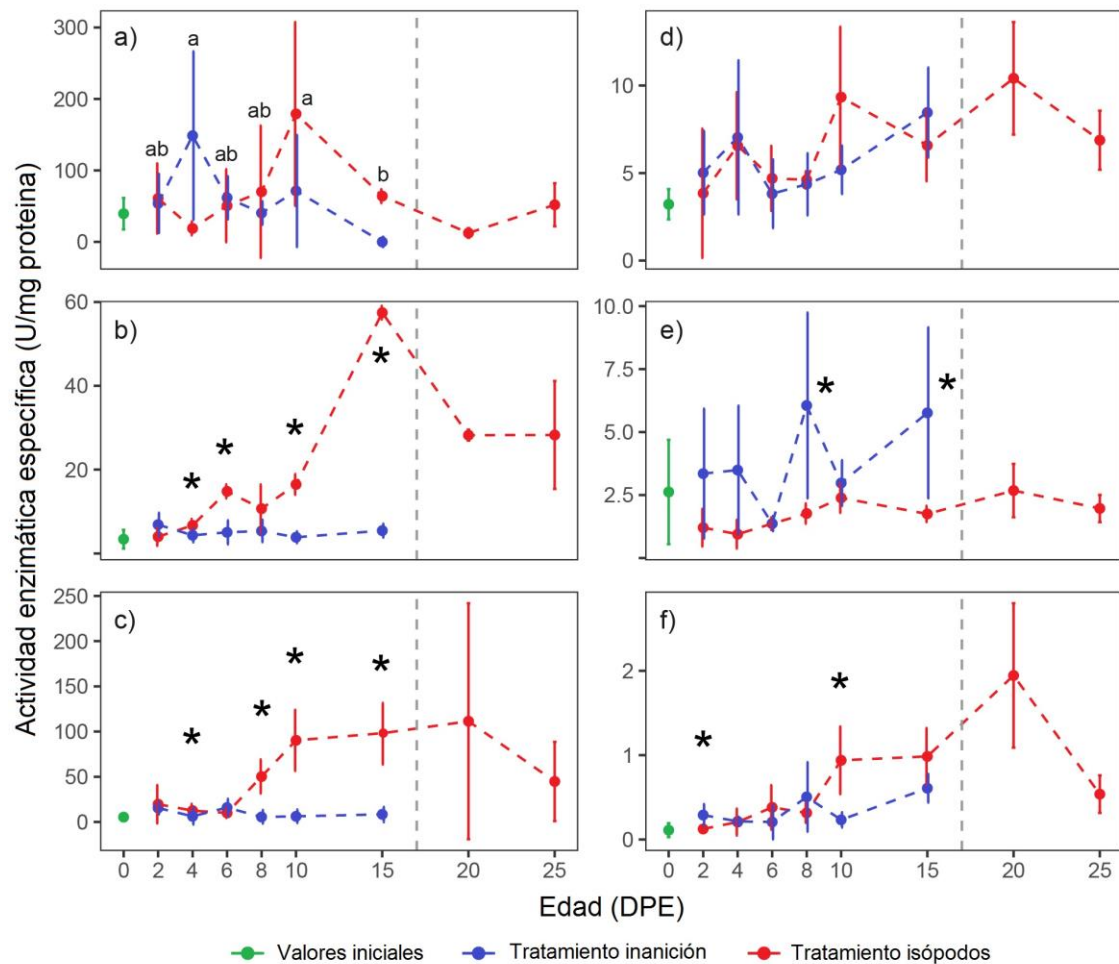


Figura II.3. Relación entre la actividad enzimática específica de la GD y la edad (DPE) en juveniles de *Octopus tehuelchus* en función del tratamiento: en inanición (puntos azules) y alimentados con isópodos (puntos rojos). Los valores iniciales se muestran como puntos de color verde. a) lipasas, b) fosfatasa ácida, c) fosfatasa alcalina, d) peptidasa aspártica, e) peptidasa cisteínica, f) peptidasa alcalina. Las barras verticales indican la desviación estándar. Los asteriscos marcan diferencias significativas entre los tratamientos para cada DPE. La línea gris punteada vertical indica el tiempo medio de supervivencia en inanición (días) de los juveniles (ver Capítulo I). Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los DPE.

DISCUSIÓN

Durante el periodo transcurrido entre el nacimiento de las crías y el desarrollo completo de las mismas, ocurren elevadas mortalidades (Moguel *et al.* 2010). Este se caracteriza, en parte, por: la presencia de un metabolismo altamente lipídico (Boucher-Rodoni *et al.* 1987, Segawa y Hanlon 1988, Vidal *et al.* 2002a,b), un periodo sin crecimiento neto de las crías (Vidal *et al.* 2002b), una GD inmadura y sin diferenciación celular (Vecchione y Hand 1989, Safi *et al.* 2018) y una caza errática de presas o ausencia de actividad predatoria (Wells 1958, Boletzky 1975, Rosas *et al.* 2007, 2008, Moguel *et al.* 2010). A su vez, Moguel y colaboradores (2010) registraron que los juveniles de *O. maya*, una especie holobentónica, adquieren un comportamiento nectobentónico durante las primeras semanas después de la eclosión.

En el caso de *O. tehuelchus*, durante los primeros 6 DPE los juveniles exhibieron ciertas características típicas de una fase temprana post eclosión, tales como: un periodo sin crecimiento neto y una GD inmadura caracterizada solo por la presencia de plaquetas de vitelo. A su vez, presentaron determinados atributos característicos de un juvenil completamente desarrollado: comportamiento totalmente bentónico y consumo regular y activo de presas desde el primer día de vida. La duración del periodo sin crecimiento neto de los juveniles de *O. tehuelchus* fue similar al registrado para las crías de *S. officinalis* pero más corto que lo observado en *D. opalescence*, *L. vulgaris reynaudii* y *R. fontaniana* (Vidal *et al.* 2002a, 2005, Moguel *et al.* 2010, Espinoza *et al.* 2017, Safi *et al.* 2018). Si bien los factores que modulan la duración de este periodo no están del todo claros, en *O. tehuelchus* podría estar relacionado con el tipo de alimento ofertado. En este sentido, ciertas características como la palatabilidad del alimento y los estímulos visuales y químicos generados por las presas podrían desencadenar el comportamiento predatorio por parte de las crías (Langridge 2009, Moguel *et al.* 2010, Querol *et al.* 2015, Uriarte *et al.* 2018). Estas características del alimento junto con su composición nutricional (Iglesias *et al.* 2000, Caamal-Monsreal *et al.* 2015) favorecerían

la activación de las enzimas digestivas y el consecuente crecimiento de las crías (Moguel *et al.* 2010, Safi *et al.* 2018).

En cuanto a la actividad digestiva de los juveniles de *O. tehuelchus* durante el periodo post eclosión, se observaron ciertos eventos relacionados con el uso de las reservas vitelinas endógenas. En el transcurso de los primeros 6 DPE se evidenció únicamente un aumento en la actividad de las lipasas y fosfatasas ácidas, enzimas directamente implicadas en la degradación del vitelo interno (Pasteels 1973, Ibarra-García *et al.* 2018b). Durante este periodo, en los juveniles no alimentados la lipasa alcanzó su máxima actividad específica, mientras que en los juveniles alimentados la actividad permaneció en niveles basales. A su vez, la actividad de las fosfatasas ácidas sólo aumentó en los juveniles alimentados. Estos fenómenos indicarían que la dinámica enzimática asociada a los primeros seis días de vida estaría relacionada directamente con el consumo de vitelo, aunque condicionada por la ingesta de alimentos. Sin embargo, esta actividad enzimática no se reflejó en cambios citológicos de la GD ni en el crecimiento somático de los individuos.

En investigaciones previas, Vidal y colaboradores (2002a) determinaron que las crías de cefalópodos deben recibir alimento exógeno apropiado antes de agotar en su totalidad las reservas de vitelo interno. Durante este lapso de tiempo, la morfofisiología de la GD experimenta cambios determinantes que le permiten a los juveniles el uso y aprovechamiento de los nutrientes tanto de fuentes endógenas como exógenas (Morote *et al.* 2005, Rosas *et al.* 2008, Solorzano *et al.* 2009, Moguel *et al.* 2010, Gallardo *et al.* 2017). Entre los 6 y 10 DPE, en los juveniles alimentados de *O. tehuelchus* se registró la máxima actividad de las lipasas, así como la presencia de heterolisosomas y heterofagosomas y estructuras celulares implicadas en la digestión de los nutrientes en la GD y en su movilización a través de la hemolinfa (Martínez *et al.* 2011, Linares *et al.* 2015, Gallardo *et al.* 2017). A su vez, se observó un aumento de las enzimas alcalinas,

tanto de las peptidasas como de las fosfatasas. Este incremento en la actividad enzimática estaría relacionado con los procesos digestivos extracelulares involucrados durante la alimentación exógena (Boucaud-Camou y Roper 1995, Hamdan *et al.* 2014, Martínez *et al.* 2011, Perrin *et al.* 2004, Ibarra-García *et al.* 2018a) y con la absorción y el transporte de los nutrientes obtenidos (Boucaud-Camou y Roper 1995). Así, estos hallazgos muestran que la ingesta de alimento no solo aumenta el consumo de las reservas de vitelo, sino que también desencadena la maduración de la GD a nivel morfológico y fisiológico, dando como resultado juveniles aptos para la transformación de los recursos endógenos y exógenos en biomasa, reflejado durante estos días en el crecimiento de los juveniles alimentados con isópodos.

Entre los 15 y 25 DPE, la presencia de lisosomas secretores, cuerpos residuales y microvellosidades de las células digestivas, junto con el agotamiento total de las plaquetas de vitelo asociado a la menor actividad de las lipasas y la máxima actividad de las enzimas alcalinas indicarían que los juveniles de *O. tehuatlensis* alcanzarían la madurez total de la GD. Este patrón de maduración morfo-fisiológico también fue observado en crías de *O. maya* (Rosas *et al.* 2007, López-Ripoll 2010, Martínez *et al.* 2011). En consecuencia, aproximadamente al 20 DPE, los especímenes de *O. tehuatlensis* dependerían exclusivamente de alimento exógeno para satisfacer su demanda energética.

Estudios realizados en paralarvas y juveniles de cefalópodos han demostrado que estos organismos tienen la capacidad de regular el uso de sus reservas de vitelo en función de la condición y disponibilidad del alimento (Vidal *et al.* 2002a, Boletzky 2003). En situaciones en las cuales las crías están sometidas a inanición, éstas experimentan cambios morfo-fisiológicos asociados a una disminución en la actividad metabólica hasta que el alimento se encuentre disponible (Gebauer, Paschke y Anger 2010, Rosas *et al.* 2011, Espinoza *et al.* 2017). Teniendo en cuenta que los juveniles de *O.*

tehuelchus pueden sobrevivir sin alimentarse en promedio 17 días con un máximo de 59 DPE a 16 °C (ver Capítulo I), sumado a que en el presente trabajo los juveniles sin alimentación registraron una actividad de las lipasas mínima aun presentando plaquetas de vitelo, se sugiere que en situaciones de estrés alimenticio el consumo de las reservas de vitelo se retrasaría en el tiempo al reducirse la actividad de las lipasas, extendiendo de esta manera el tiempo de supervivencia. Más aún, al igual que en otras especies (Rosas *et al.* 2011, Vidal *et al.* 2006, Espinoza *et al.* 2017), la poca variación registrada en las medidas morfométricas de *O. tehuelchus* durante los 15 días del tratamiento en inanición indicaría que el consumo de reservas de vitelo estaría destinado al mantenimiento de las estructuras corporales y no al crecimiento.

Con respecto a la actividad específica de las peptidasas cisteínicas, se observó un comportamiento totalmente diferente al registrado en el resto de las enzimas digestivas. En este caso, en los juveniles de *O. tehuelchus* sin alimentarse la actividad enzimática se mantuvo alta y errática, mientras que en los juveniles alimentados permaneció en niveles muy bajos a lo largo de todo el tratamiento. Sin bien esta enzima ha sido muy poco estudiada, lo observado en los juveniles sin alimentación podría estar vinculado con la presencia de una digestión ácida intracelular como en el caso del calamar *Dosidicus gigas* (Cárdenas-López y Haard 2005, 2009) y con la degradación de las proteínas del vitelo en los primeros días de nacimiento como ocurre en la rana *Xenopus laevis* (Yoshizaki y Yonezawa 1998). Por otro lado, en el calamar *Euprymna scolopes* esta enzima se ha relacionado con la degradación de tejidos asociada a infecciones (Peyer *et al.* 2018) y, en humanos, con la degeneración de tejidos asociados a procesos patológicos (Jordan *et al.* 2000). Por lo tanto, considerando la evidencia en otros taxones, se sugiere que el aumento de las peptidasas cisteínicas en juveniles de *O. tehuelchus* podría ser el resultado de procesos patológicos como respuesta a una condición de desnutrición o a

fenómenos auto-degradativos de las proteínas estructurales, tras el agotamiento de las reservas de vitelo.

Varios estudios realizados en crías de cefalópodos han clasificado los procesos digestivos en relación a múltiples factores, desde la descripción de los cambios citológicos en la ontogenia de la GD (Lopez-Ripoll 2010, Martinez *et al.* 2011) hasta la delimitación de eventos en función del tipo de digestión y la dinámica enzimática (Boucher-Rodoni *et al.* 1987, Gallardo *et al.* 2017). En base a los estudios mencionados, en los juveniles de *O. tehuelchus* se podrían identificar tres fases de desarrollo caracterizadas por la morfología y la fisiología de la GD y su repercusión en el crecimiento somático. En cuanto a la fase I, abarca desde el nacimiento hasta los 6 DPE: no se observa crecimiento neto de los juveniles y la GD se encuentra completamente inmadura; además, prevalecen los procesos digestivos ácidos intracelulares relacionados principalmente con la degradación de las reservas vitelinas. En la fase II, registrada entre los 6 y 10 DPE, se hace notable el crecimiento de las crías junto con el inicio de la maduración de la GD. Esta fase se reconoce como un período de transición entre una alimentación endógena y una exógena, ligada a los ajustes enzimáticos de una digestión ácida intracelular a una digestión alcalina extracelular. Por último, en la fase III, determinada entre los 15 y 25 DPE, el crecimiento de los juveniles aumenta y permanece continuo, la GD alcanza la maduración completa y predomina la digestión alcalina extracelular, vinculada al consumo de presas. Cabe destacar que los juveniles en inanición nunca pasaron de la fase I. Estas fases de desarrollo proporcionan un marco integrador para comprender los procesos de maduración digestiva y cómo repercuten en el rendimiento del juvenil. Además, brindan la información necesaria para realizar futuros estudios comparativos sobre la ontogenia digestiva.

La evaluación de la actividad enzimática digestiva es un procedimiento ampliamente utilizado en estudios que comprenden la maduración del sistema

digestivo en especies de importancia acuícola (Caruso *et al.* 2009, Nimrat *et al.* 2013, Gallardo *et al.* 2017). Sin embargo, los ensayos enzimáticos no están estandarizados y la metodología elegida puede afectar la cuantificación de la actividad enzimática sesgando los valores absolutos (Bisswanger 2014, Nolasco-Soria 2021). Por ejemplo, cuando el sustrato azocaseína se hidroliza libera compuestos solubles con el pigmento azo asociado pero también compuestos no pigmentados. Esto no permite saber con exactitud cuántos fueron los enlaces peptídicos hidrolizados, subestimándose así la actividad enzimática (Nolasco-Soria 2021). A su vez, en este trabajo los ensayos sobre la actividad específica de las peptidasas se realizaron a una temperatura superior (37°C) al rango de temperatura al que la especie está adaptada, entre 8 y 24°C (Rivas y Beier 1990, Ciotti *et al.* 1995, Williams *et al.* 2018). Una temperatura más alta aumentaría la velocidad de reacción enzimática, dando una sobreestimación de los valores reales de actividad enzimática (Bisswanger 2014, Nolasco-Soria 2021). No obstante lo anterior, al igual que en otros estudios sobre cefalópodos (Semmens 2002, Perrin *et al.* 2004, Morote *et al.* 2005, Solorzano *et al.* 2009, Gallardo *et al.* 2020), en el presente trabajo los ensayos enzimáticos se realizaron bajo las mismas condiciones experimentales para ambos tratamientos permitiendo así una evaluación comparativa confiable sobre la dinámica digestiva entre los tratamientos utilizados.

Respecto a los resultados de este trabajo, se concluye que los cambios morfológicos y fisiológicos asociados a la maduración de la GD de los juveniles de *O. tehuatlensis* están relacionados, como es esperado, con la edad al igual que en *O. maya* (Lopez-Ripoll 2010, Martinez *et al.* 2011), pero también con la ingesta de alimentos apropiados. En este sentido, los ensayos de alimentación mostraron que *Exophaeroma sp.* sería una presa viva adecuada que favorece el rápido crecimiento de los ejemplares de *O. tehuatlensis* en condiciones de cultivo. Con este alimento, los juveniles muestran la capacidad de alimentarse de forma endógena y exógena de manera simultánea y de

combinar de manera eficiente los procesos digestivos ácidos intracelulares y alcalinos extracelulares, llegando a duplicar el peso de las crías a los 25 días después de la eclosión. En este sentido, estos estudios son el punto de partida para el desarrollo de tecnologías de cultivo vinculadas con experiencias de alimentación que permitan el crecimiento de juveniles de pulpito. A su vez, como línea futura de investigación, sería importante plantear el desarrollo de técnicas que permitan el cultivo auxiliar de isópodos con el fin de independizarse de la obtención de los mismos a partir del ambiente natural.

CAPÍTULO III



**TASAS DE CRECIMIENTO E ÍNDICES
BIOENERGÉTICOS DE LOS JUVENILES DE *OCTOPUS*
TEHUELCHUS BAJO DOS REGÍMENES DE
ALIMENTACIÓN**

INTRODUCCIÓN

Si bien el potencial acuícola que poseen los cefalópodos es elevado, todavía existen numerosos cuellos de botella asociados a las distintas etapas del ciclo de vida que deben ser superados (Vidal *et al.* 2014, Gallardo *et al.* 2017, Uriarte *et al.* 2018). Ejemplo de esto es la elevada mortalidad que atraviesan los animales durante la fase planctónica en condiciones de cultivo. Esta mortalidad puede ser producto de fallas tanto en los aspectos zootécnicos como deficiencias nutricionales (Iglesias y Fuentes 2014, Garrido *et al.* 2017). Luego del periodo en el cual los pulpos pasan de una fase paralarvaria como nadadores activos a la etapa juvenil desarrollada enteramente al fondo del acuario, las condiciones de mantenimiento y alimentación, tal como lo observado en *O. mimus* y *O. vulgaris*, se vuelven menos rigurosas (Van Heukelem 1976, Cortez *et al.* 1999, Iglesias *et al.* 2004, 2014). Una vez alcanzada la etapa de juvenil, los mayores inconvenientes se centran en reducir el elevado costo de alimentación asociado al suministro de alimento vivo, y en sortear las deficiencias nutricionales de los alimentos artificiales suministrados para generar un crecimiento adecuado de los individuos (Boletzky 1983, Chen y Long 1991, Iglesias *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2014). Es por ello que resulta de vital importancia el diseño de protocolos de alimentación adecuados que contemplen características como el tipo de alimento (*i.e.* vivo o formulado), el tamaño del alimento en relación a la boca del predador, la cantidad y frecuencia de alimentación. Estas características resultan claves para obtener elevadas tasas de supervivencia, crecimiento y el desempeño de los animales durante la experimentación (Linares *et al.* 2015, Cerezo-Valverde y García 2017, Sykes *et al.* 2017).

Los cefalópodos se caracterizan por tener una alta eficiencia digestiva en el aprovechamiento de nutrientes (ver Capítulo II). Esta característica hace que estos animales tengan elevadas tasas de crecimiento (Iglesias *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2014). En cultivo, la producción de estos animales se encuentra limitada en gran medida

por sus hábitos alimenticios que son altamente selectivos. Como carnívoros estrictos, requieren dietas basadas en proteínas y lípidos de alta calidad ricos en ácidos grasos esenciales, fosfolípidos y colesterol (Miliou *et al.* 2005, Rosas *et al.* 2013, Vidal *et al.* 2014, Cerezo-Valverde y García 2017).

A lo largo del desarrollo de los cefalópodos, la alimentación se diversifica en función de la etapa del ciclo de vida (Boletzky 1983, Nixon 1985, Segawa 1990, 1993, Rodhouse y Nigmatullin 1996, Coelho *et al.* 1997, Franco-Santos y Vidal 2014). En la naturaleza, los cefalópodos se alimentan de una gran variedad de ítems presa, incluyendo crustáceos, moluscos, peces y gusanos, etc. (Joll 1977, Villanueva 1994, Cortéz *et al.* 1999, Iglesias *et al.* 2000, Alejo-Plata *et al.* 2009, Krstulović y Vrgoc 2009, Estefanell *et al.* 2013). En el caso de los pulpos, dentro de este amplio espectro alimenticio, los crustáceos son el ítem presa más consumido (Wells y Wells 1970, Cagnetta y Sublini 2000, Iglesias *et al.* 2000, Roura *et al.* 2012, Gallardo *et al.* 2017, Xavier *et al.* 2018). Más aun, en condiciones de cultivo, se ha observado que las mayores tasas de crecimiento se obtuvieron al alimentarlos con cangrejos, cumpliendo así con los altos requerimientos proteicos de estos animales (Wells y Wells 1970, Giménez y García-García 2002, Domingues *et al.* 2007, Cerezo-Valverde *et al.* 2008, Gallardo *et al.* 2017).

Bajo condiciones de cultivo, los pulpos presentan un consumo dominante de presas vivas frente a dietas formuladas (O'Dor y Wells 1987, Castro 1991, Hanlon *et al.* 1991, Lee *et al.* 1991, Castro *et al.* 1993, Castro y Lee 1994, Domingues 1999, Domingues *et al.* 2005, 2007, Rosas *et al.* 2007, Ferreira *et al.* 2010, Vidal *et al.* 2014). La preferencia de presas vivas es una potencial desventaja, por lo que resulta necesario desarrollar dietas formuladas que satisfagan las necesidades nutricionales de los especímenes cultivables para el reemplazo total o parcial del alimento vivo. En este sentido, *O. maya* presentó elevadas tasas de crecimiento y supervivencias del

100% al utilizar dietas formuladas en base a alimento fresco, principalmente cangrejo y calamar liofilizado mezclados con gelatina, vitaminas y minerales (Martínez *et al.* 2014). Contrariamente, Rosas y colaboradores (2013) documentaron tasas de crecimiento negativas y una digestibilidad deficiente en los pulpos sometidos a regímenes alimenticios conformados por alimentos a base de harinas de animales marinos, en especial de pescado. Estas deficiencias en la digestibilidad, podrían ser el resultado de la carbonilación de las proteínas al momento de la cocción para la obtención de las harinas, al eliminarse los sitios activos para que las peptidasas cisteínicas actúen (Santé-Lhoutellier *et al.* 2008). El uso de dietas formuladas ha sido factible económicamente en *O. maya* (Rosas *et al.* 2011, Quintana *et al.* 2011, Martínez *et al.* 2014, Tercero *et al.* 2015, Gallardo *et al.* 2020) y de engorde de *O. vulgaris* (Giménez y García-García 2002, Chapela *et al.* 2006, Domingues *et al.* 2010, Cerezo-Valverde *et al.* 2008, 2012, 2017). Sin embargo, el desarrollo de este tipo de alimentos aún se encuentra en etapa de experimentación para la mayoría de las especies de cefalópodos (Prato *et al.* 2010, Domingues *et al.* 2010, Cerezo-Valverde *et al.* 2012, Vidal *et al.* 2014) por lo que es imperioso abordar el desarrollo dietas formuladas para disponer de un alimento que brinde elevadas tasas de supervivencia, conversión y crecimiento de manera redituable para la industria (Iglesias *et al.* 2004, Vidal *et al.* 2014).

El pulpito *Octopus tehuelchus*, es considerado un depredador generalista que se alimenta de diversos tipos de presas (Ré 1998, Ré y Gómez-Simes 1992). Principalmente se alimenta de crustáceos y bivalvos, aunque en sus contenidos digestivos se han identificado al menos 14 especies de presas, entre ellas, crustáceos como *Cyrtograpsus angulatus*, *Leucippa pentagona* y *Betaeus* sp., tres especies de bivalvos mitílidos, almejas juveniles, gasterópodos como *Trophon geversianus* y *Patinigera magellanica*, dos especies de poliquetos y de peces (Ré 1998, Ré y Gómez-

Simes 1992, Storero 2010). A su vez, en los meses de verano y otoño es común el canibalismo sobre juveniles y huevos. En particular, se determinó que la presa más consumida por los juveniles es el isópodo *Exosphaeroma* sp. El consumo de esta presa en el Golfo San Matías se registró desde mediados de marzo en ejemplares inmaduros hasta mediados de diciembre en hembras (en maduración) y machos (50 % inmaduros) (Ré y Gómez-Simes 1992, Ré 1998). Recientemente se observó a juveniles de *O. tehuelchus* cazando ejemplares pequeños de crustáceos *Mysidopsis* sp. en su medio natural (Braga obs. pers) (Figuras III.1,2). La cantidad de alimento ingerido por *O. tehuelchus* dependerá del tamaño de los individuos tanto de la presa como del predador y de la temperatura del medio. Existe una alimentación intensa de los pulpos durante los meses más cálidos, en donde se observa un crecimiento rápido y se produce la maduración sexual, seguido de una etapa de baja alimentación en los meses de menor temperatura, al alcanzar la madurez sexual y durante la época de puesta (Ré 1989, 1998).



Figura III.1. Ejemplares de camarón *Mysidopsis* sp. observados por buceo.



Figura III.2. Juvenil de pulpito *Octopus tehuelchus* cazando ejemplares de *Mysidopsis* sp.

En experiencias llevadas a cabo en acuario, Iribarne y colaboradores (1991) observaron que *O. tehuelchus* posee una aceptación diferencial según las presas ofertadas, mostrando una predación dominante sobre los crustáceos *Corystoides chilensis*, *Rochinia grasilipes* y *Leurocyclus tuberculatus*. En cuanto a los procesos implicados en la digestión, Ré y colaboradores (1991) registraron que, en condiciones controladas de acuario, la duración de la digestión disminuye con el aumento de la temperatura. Asimismo, estudios realizados por Klaich y colaboradores (2006) en subadultos y adultos de *O. tehuelchus* mostraron que tanto la ingesta y la conversión de alimentos como el crecimiento estarían relacionados con la temperatura y con la madurez sexual de los especímenes: pulpos inmaduros exhibieron mayores tasas de alimentación diarias y crecimiento instantáneo cuando fueron sometidos a temperaturas más elevadas. Sin embargo, aún no se sabe que implicancias en el crecimiento podrían existir en ejemplares juveniles de *O. tehuelchus*.

El estudio sobre el crecimiento y la bioenergética de los animales provee la información necesaria para establecer la eficiencia con la cual los especímenes aprovechan los componentes nutricionales del alimento presente en el ambiente para su crecimiento (Van Heukelem 1976, Klaich *et al.* 2006, Lupiano 2012). En este capítulo se busca determinar las tasas de crecimiento e índices bioenergéticos de juveniles *O. tehuelchus*. Para ello se realizaron experiencias de alimentación con el isópodo *Exosphaeroma* sp. y con un alimento formulado.

En relación a las características del crecimiento y los requerimientos nutricionales de las crías de cefalópodos, como hipótesis se plantea que la composición bioquímica del alimento suministrado a los juveniles de *O. tehuelchus* es determinante de las tasas de crecimiento y de los índices bioenergéticos. . La predicción consiste en que los ejemplares alimentados con dieta natural presentarán mejoras en la eficiencia nutricional como así también una mayor tasa de crecimiento con respecto a los ejemplares alimentados con alimento formulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN E INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE HUEVOS

Las masas de huevos de *O. tehuelchus* fueron recolectadas durante el período de puesta entre julio y agosto de 2018, en aguas del Golfo Nuevo, zona de Punta Arco (42 ° 42 'S, 64 ° 59 'O) (Figura 3). La incubación de los huevos fue realizada a 16 ± 1 °C y los protocolos de limpieza y mantenimiento se realizaron según lo detallado en la Metodología General.

MANTENIMIENTO DE LOS JUVENILES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Tras la eclosión, cada juvenil se colocó por separado en un acuario de plástico (Figura 7) con tres litros de agua de mar aireada, filtrada (10, 5 y 1 μm) y esterilizada con UV a 16 °C. Los parámetros de calidad del agua se conservaron dentro de los niveles expresados en la Metodología General.

Para esta experiencia, se utilizaron 50 juveniles asignados de manera aleatoria a dos tratamientos alimentarios. Del total de los juveniles, 21 fueron alimentados con una pasta semi-húmeda (alimento formulado) y 29 con isópodos *Exosphaeroma* sp. La experiencia de alimentación con isópodos se extendió por 84 días. Los tiempos en los cuales se enmarcó la experiencia aseguraron poder evaluar el crecimiento de los juveniles a partir de una alimentación completamente exógena, una vez consumido el total de las reservas de vitelo, sobrepasando los tiempos de la fase de transición (ver Capítulo II). Durante el ensayo los juveniles de pulpito fueron pesados desde su eclosión, cada 7 días, en una balanza Shimadzu de $\pm 0,001$ g de precisión. También, cada 7 días se procedió al pesaje tanto del alimento ofertado como del alimento no ingerido, en una balanza Leco CPA 1245 de $\pm 0,0001$ g de precisión.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ALIMENTO

Para realizar el tratamiento de alimento vivo se utilizaron isópodos *Exhophaeroma sp.* (Figura III.3) recolectados en el intermareal rocoso del área de Punta Cuevas (42 °47 'S, 65 °00 'O), Golfo Nuevo. La colecta de isópodos se llevó a cabo con una periodicidad de 7 días, y los ejemplares se transportaron en baldes con agua de mar a las instalaciones del Bioterio Acuático del CCT CONICET-CENPAT. Una vez allí, los isópodos fueron colocados en acuarios de 5l con agua de mar aireada. Los juveniles de *O. tehuelchus* fueron alimentados *ad libitum* con isópodos con un tamaño entre 5 y 16mm de largo y con un peso húmedo de 0,0029 a 0,3401 g.



Figura III.3. Isópodos *Exosphaeroma sp.* utilizados para la alimentación de los juveniles de *Octopus tehuelchus*.

En cuanto al tratamiento de alimento formulado, se utilizó una pasta semi-húmeda creada a partir de una modificación del alimento formulado por Martínez y colaboradores (2014). La pasta utilizada para alimentar a los juveniles de *O. tehuelchus*

consistió en 64% calamar, 25% cangrejo, 10% gelatina y 1% de vitaminas (p/p total). Para la formulación de este alimento se utilizó el manto desprovisto de piel de calamares adultos frescos de la especie *Illex argentinus* obtenidos en las pescaderías de la localidad de Puerto Madryn. En cuanto a los cangrejos, se utilizaron ejemplares adultos de la especie *Ovalipes trimaculatus* obtenidos por buceo en la zona de Cerro Avanzado (42 °50 'S, 64 °52 'O), Golfo Nuevo, a los cuales únicamente se les removió el caparazón y las vísceras. Además, se utilizó gelatina sin sabor (Royal, Mondelez International) y un complejo rico en vitaminas (Supradyn Forte, Bayer). Para la preparación de la pasta semi-húmeda se molieron y mezclaron todos los “ingredientes” y luego se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso. Una vez iniciada la experiencia de alimentación, la pasta semi-húmeda fue descongelada y dispuesta sobre valvas de mejillones *Mytilus sp.* para ser ofertada como alimento (Figura III.4).



Figura III.4. Pasta artificial dispuesta sobre valvas de mejillones *Mytilus sp.* utilizadas para la alimentación de los juveniles de *Octopus tebelchus*.

CARACTERIZACIÓN Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL ALIMENTO

Para ambos alimentos se estableció la composición proximal: se determinó la humedad, las cenizas, las proteínas, los lípidos y el glucógeno. Para los análisis se utilizaron tres grupos de isópodos *Exosphaeroma* sp. y tres de pasta semi-húmeda. Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

El contenido de humedad se determinó secando las muestras de alimento en una estufa a 75 °C hasta alcanzar un peso seco constante (AOAC 1990). Para determinar el contenido de cenizas, las muestras fueron calcinadas en una mufla a 550 °C durante 24 h para luego ser pesadas en seco (AOAC 1990).

El contenido de proteínas se determinó utilizando el método de Lowry y colaboradores (1951). Para solubilizar la proteína presente en la muestra, a 100 mg de muestra molida se le agregó 5ml de NaOH al 1 N y se calentó durante 30 minutos y se llevó a volumen (50 ml) en un matraz. Luego se tomó una alícuota de la muestra digerida (0,05 ml) y se adicionó 0,35 ml de agua destilada junto con 2 ml de CuSO₄ (1 % m/v) y 0,35 ml de tartrato de sodio y potasio (2 % m/v). Tras 10 minutos, con el fin de colorear la reacción para detectar la concentración de proteínas, a las muestras se les agregaron 2 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de 30 minutos y una vez coloreada la reacción, se midió la absorbancia a 750 nm a través de un espectrofotómetro UV/visible Agilent HP 8453. Los valores obtenidos por el espectrofotómetro fueron comparados con los valores de referencia obtenidos por la preparación de una curva patrón de albúmina. Por último, mediante la ley de Lambert-Beer se estimó la concentración de proteínas.

Los lípidos fueron determinados según el método de Bligh y Dyer (1959): a 500 mg de muestra seca triturada se le agregaron 2 ml de agua destilada, 2,5 ml de CHCl₃ y 5 ml de CH₃OH. Luego de agitar por 2 minutos, se agregaron nuevamente 2,5 ml de

CHCl₃ y se agitó por 2 minutos. Por último, se agregaron 2,5 ml de agua destilada y se agitó por 30 segundos. La mezcla se vertió en una ampolla de decantación, separándose en dos capas, una capa metálica y una capa clorofórmica en la que se encuentran contenidos los lípidos. Tras lavarse con 2,5 ml de CHCl₃, se descartó la capa metálica, quedándose con la capa clorofórmica. Luego de la evaporación del CHCl₃ bajo campana, se procedió a pesar los lípidos. Los lípidos se obtuvieron por diferencia con la muestra pesada inicialmente.

Por último, el contenido de glucógeno fue estimado utilizando el método colorimétrico según Fraga (1956). A 100 mg de muestra se le agregó 10 ml de TCA y se calentó a 80 °C durante 1 hora. Luego se procedió a enfriar la muestra y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. A 2 ml de sobrenadante se le adicionaron 1 ml de C₆H₆O y 5 ml de H₂SO₄. A través de un espectrofotómetro Agilent HP 8453 se midió la absorbancia a 620 nm. Los valores obtenidos por el espectrofotómetro fueron comparados con los valores de referencia obtenidos por la preparación de una curva patrón de glucosa. Se calculó la concentración de glucógeno mediante la ley de Lambert-Beer.

ESTIMACIÓN DE LAS TASAS DE MORTALIDAD

Diariamente se verificó la presencia/ausencia de juveniles muertos. Se calculó la mortalidad acumulada como el porcentaje de muertes sumadas a determinado tiempo de observación. A su vez, se calculó la mortalidad relativa como el porcentaje de muertes registradas en cada observación y la mortalidad absoluta como el porcentaje de muertes totales al tiempo final.

ESTIMACIÓN DEL ALIMENTO INGERIDO

Para ambos ensayos, el alimento ofertado (AO) se pesó previamente a ser suministrado a los juveniles de *O. tehuilchus*. Luego de la alimentación se procedió a

tomar el peso del alimento no consumido diariamente representado por los restos totales (PRT). El PRT para el tratamiento con dieta viva se obtuvo por la sumatoria de los pesos de los restos de isópodos consumidos más el peso de los isópodos no consumidos. Para el tratamiento con pasta semi-húmeda, el PRT se obtuvo mediante el peso de la pasta no consumida. Finalmente, la cantidad de alimento ingerido (AI) se calculó por la diferencia entre AO y PRT.

$$\mathbf{AI= AO-PRT}$$

Tanto el AO como los restos se escurrieron en un papel absorbente previamente al pesaje para reducir el error asociado al agua retenida.

ESTIMACIÓN DE LAS TASAS DE CRECIMIENTO

Para cada uno de los juveniles se obtuvo el peso húmedo inicial (PH_i) y el peso húmedo final (PH_f) cada 7 días, de manera tal que el peso obtenido para cada pulpo al final del intervalo se corresponde con el peso húmedo inicial para el intervalo siguiente. Los pesajes se realizaron tras 24hs de ayuno para asegurar que el alimento no esté presente en los órganos digestivos repercutiendo en el peso del animal al tomar las mediciones (Segawa y Nomoto 2002).

Se estimaron la tasa absoluta de crecimiento (TAC) y la tasa específica de crecimiento (TEC) de los juveniles en función de la diferencia entre pesos a lo largo del tiempo (Forsythe y Van Heukelem 1987).

$$\mathbf{TAC = PH_f - PH_i / \Delta t}$$

$$\mathbf{TEC = (\ln PH_f - \ln PH_i) / \Delta t * 100}$$

Dónde: PH_f = peso húmedo final del juvenil, PH_i = peso húmedo inicial del juvenil, Δt = tiempo transcurrido entre dos pesajes.

ESTIMACIÓN DE LOS ÍNDICES BIOENERGÉTICOS

TASAS DE ALIMENTACIÓN

Con los datos obtenidos a partir del alimento ingerido (AI) y los pesos de los juveniles se calculó la tasa diaria de alimentación (TDA) y la tasa absoluta de alimentación (TAA), según Farías y colaboradores (2010).

$$\text{TDA} = (\text{AI} / (\text{PH}_p * \Delta t)) * 100$$

$$\text{TAA} = \text{AI} / \Delta t$$

Dónde: TDA= relación porcentual entre el AI diario en relación con el PH_p, el PH_p = peso húmedo promedio del juvenil en el intervalo de tiempo medido.

Posteriormente, se estimó la tasa de alimentación de proteínas (TAP), la tasa de alimentación de lípidos (TAL) y la tasa de alimentación de glucógeno (TAG), considerando los valores nutricionales de los isópodos y de la pasta semi-húmeda, siguiendo la metodología de Gutiérrez y colaboradores (2015).

$$\text{TAP} = \text{PI} / \Delta t$$

$$\text{TAL} = \text{LI} / \Delta t$$

$$\text{TAG} = \text{GI} / \Delta t$$

Dónde: PI = proteínas ingeridas, LI = lípidos ingeridos, GI = glucógeno ingerido, Δt = tiempo entre dos pesajes consecutivos. PI, LI y GI se calcularon en función del porcentaje del peso de las proteínas, lípidos y glucógeno (valores obtenidos de la composición proximal del alimento) presentes en el AI.

EFICIENCIA DE ASIMILACIÓN TOTAL

Se calculó la eficiencia de asimilación total (EAT) como el porcentaje del AI que el juvenil utilizó diariamente para su crecimiento, en un periodo de tiempo determinado.

$$\text{EAT} = \text{PH}_f - \text{PH}_i * 100 / \text{AI}$$

Dónde: PH_f = peso húmedo final del juvenil, PH_i = peso húmedo inicial del juvenil, AI = alimento ingerido.

ANÁLISIS DE DATOS

Para estimar la composición proximal tanto de los isópodos como de la pasta semi-húmeda se calcularon los porcentajes de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y glucógeno. Las comparaciones de los componentes bioquímicos de los alimentos se determinaron mediante el uso de ANOVA de un factor. La distribución normal de los datos se demostró mediante el test de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene.

Para estudiar el crecimiento de los juveniles se realizaron análisis de regresión entre las variables peso húmedo (gramos) y el tiempo de desarrollo (días) para ambos tratamientos alimenticios. Para los juveniles que completaron la experiencia y cuyas tasas de crecimiento fueron positivas, se ajustaron modelos exponenciales y se determinaron los parámetros del modelo por el método de mínimos cuadrados (Zar 2010). Para los juveniles que no completaron la experiencia, que registraron crecimiento positivo y fueron pesados un mínimo de tres veces, el patrón de crecimiento se describió cualitativamente. Para determinar si existieron diferencias significativas en el peso de los juveniles muertos a lo largo del periodo de experimentación se utilizó un ANOVA de un factor. Las tasas de crecimiento e índices bioenergéticos se compararon cualitativamente entre tratamientos alimenticios.

RESULTADOS

COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL ALIMENTO

En ambos alimentos ofertados la humedad fue el componente más representado (63,92 % en isópodos y 68,73 % en pasta). Respecto al resto de los componentes bioquímicos, en las dos dietas se observaron mayores proporciones de proteínas, seguidos de lípidos y por último de glucógeno (Tabla III.1, Figura III.1). Al comparar entre alimentos, se registraron porcentajes mayores de humedad y de proteínas en la pasta semi-húmeda. Mientras que los isópodos presentaron porcentajes más elevados de cenizas. No se observaron diferencias entre alimentos en el porcentaje de lípidos ni en el de glucógeno (Tabla III.1, Figura III.1).

Tabla III.1. Composición proximal de los alimentos ofertados a los juveniles de *Octopus tehuelchus*.

Tratamiento alimenticio	Variable (%)	Media	D.E	Min.	Máx.	GL	F	p
<i>Exosphaeroma sp.</i>	humedad	63,9237	1,8754	62,0439	65,7947	5	19,4712	0,0116
<i>Pasta semi-húmeda</i>		68,7312	0,2076	68,5071	68,9168			
<i>Exosphaeroma sp.</i>	lípidos	3,4267	0,2607	3,1485	3,6653	5	0,0631	0,8259
<i>Pasta semi-húmeda</i>		3,6784	1,8387	2,5521	5,8002			
<i>Exosphaeroma sp.</i>	proteínas	7,8671	0,7216	7,0376	8,3497	5	164,8111	0,0002
<i>Pasta semi-húmeda</i>		14,4571	0,5194	14,1332	15,0562			
<i>Exosphaeroma sp.</i>	glucógeno	1,1007	0,4458	0,6942	1,5774	5	0,9732	0,3804
<i>Pasta semi-húmeda</i>		0,8462	0,0414	0,7993	0,8779			
<i>Exosphaeroma sp.</i>	cenizas	18,2017	0,8116	17,2863	18,8331	5	604,8445	<0,0001
<i>Pasta semi-húmeda</i>		6,4676	0,1559	6,3095	6,6212			

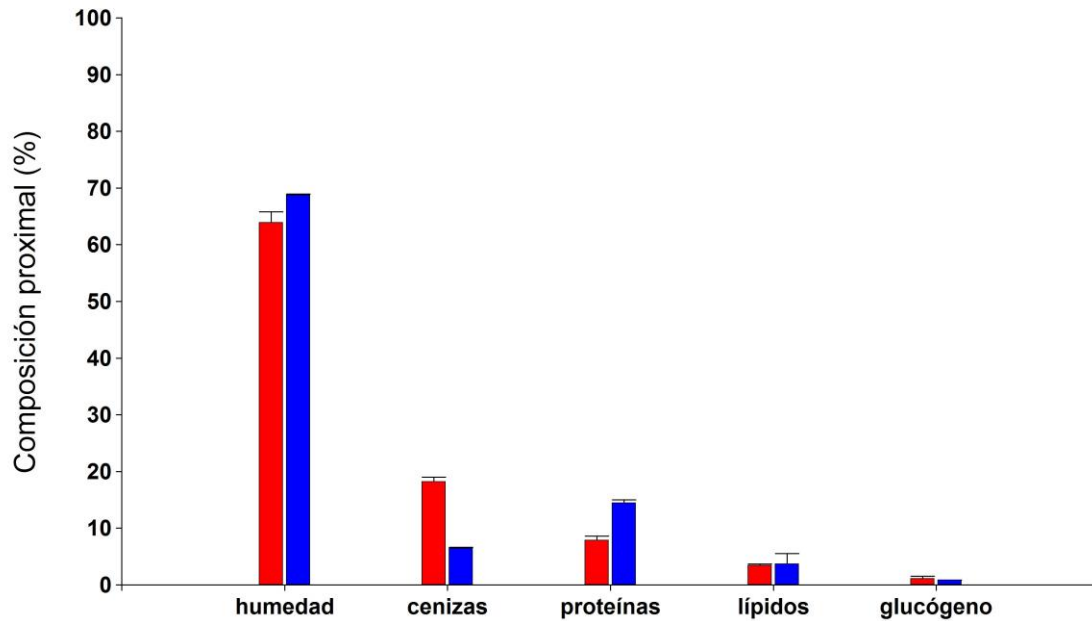


Figura III.1. Composición proximal media (%) de los isópodos *Exosphaeroma* sp. (barras rojas) y de la pasta semi-húmeda (barras azules), ofertados a los juveniles de *Octopus tehuelchus*. Las líneas verticales indican los desvíos estandar.

MORTALIDAD

De los 29 juveniles alimentados con el isópodo *Exosphaeroma* sp., 16 completaron los 84 días de tratamiento. La mortalidad relativa se evidenció únicamente durante los primeros 28 días de vida (Figura III.2) y se registró una mortalidad total del 44,82 %.

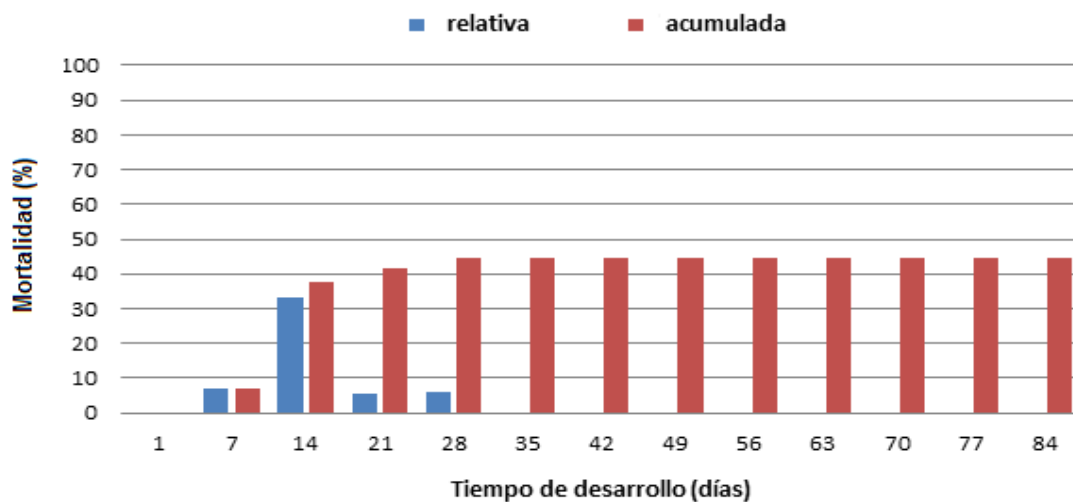


Figura III.2. Mortalidades en función del tiempo de desarrollo de los juveniles alimentados con isópodos *Exosphaeroma* sp.

Por otro lado, en el tratamiento de alimentación con pasta semi-húmeda se registró una mortalidad total del 100 % de los juveniles. En este caso, las mortalidades relativas aumentaron progresivamente desde la segunda semana de vida hasta el día 63, en donde la mortalidad fue total (Figura III.3). De los 21 juveniles utilizados para este tratamiento, 14 llegaron a los 35 días de tratamiento y solo uno llegó a vivir 63 días. En este tratamiento, la mortalidad relativa se comportó igual a la acumulada.

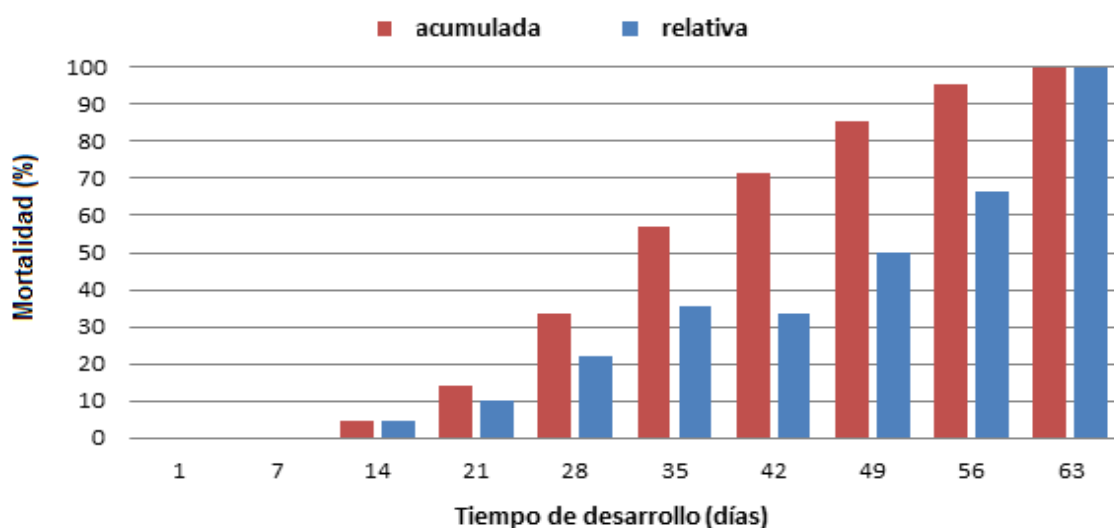


Figura III.3. Mortalidades en función del tiempo de desarrollo de los juveniles alimentados con pasta semi-húmeda.

PATRONES DE CRECIMIENTO

Para el tratamiento de alimentación con isópodos, los 16 juveniles que completaron la experiencia presentaron un ajuste al modelo exponencial ($p < 0,0001$) y un crecimiento positivo (Figura III.4, Tabla III.2). Estos ejemplares registraron un PH_i promedio de 0,16 g y un PH_f promedio de 0,89 g. A su vez, el rango resultó entre 0,11 g de peso mínimo y 1,4 g de peso máximo (Anexo 1). El incremento en peso se vio reflejado en el aumento de tamaño corporal de los juveniles entre el nacimiento y el final de la experiencia (Figura III.5, 6).

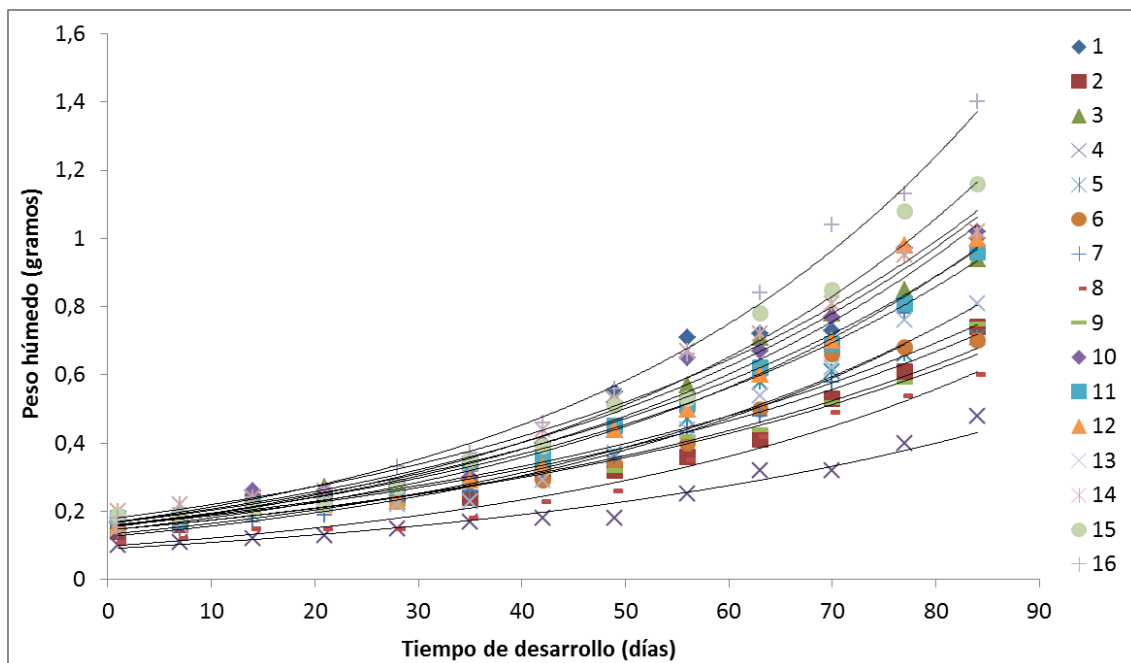


Figura III.4. Curvas de crecimiento de juveniles de *Octopus tehuelchus* alimentados con isópodos *Exosphaeroma* sp. que completaron la experiencia.

Tabla III.2. Modelos exponenciales de crecimiento para los juveniles de *Octopus tehuelchus* alimentados con isópodos *Exosphaeroma* sp. que completaron la experiencia.

Juvenil	Modelo	R2
1	peso = 0,1536 e ^{0,0228 t}	0,9572
2	peso = 0,1454 e ^{0,018 t}	0,9611
3	peso = 0,1647 e ^{0,0211 t}	0,9713
4	peso = 0,0903 e ^{0,0186 t}	0,9695
5	peso = 0,1587 e ^{0,0184 t}	0,9748
6	peso = 0,1564 e ^{0,0182 t}	0,9705
7	peso = 0,1258 e ^{0,0221 t}	0,9906
8	peso = 0,0979 e ^{0,0218 t}	0,9733
9	peso = 0,1454 e ^{0,0183 t}	0,9828
10	peso = 0,1658 e ^{0,0221 t}	0,977
11	peso = 0,1578 e ^{0,0212 t}	0,9909
12	peso = 0,1442 e ^{0,0227 t}	0,9749
13	peso = 0,1327 e ^{0,0215 t}	0,9771
14	peso = 0,1774 e ^{0,0215 t}	0,9795
15	peso = 0,1527e ^{0,0242 t}	0,9788
16	peso = 0,1657e ^{0,0252 t}	0,9947



Figura III.5. Ejemplar de *Octopus tehuelchus* recién nacido.



Figura III.6. Ejemplares de *O. tehuelchus* de tres meses de edad alimentados con *Exosphaeroma* sp. La escala está representada por los cuadrados de 1cm x 1cm correspondientes a la grilla de la placa.

Respecto a los 13 juveniles alimentados con isópodos que murieron durante el transcurso de la experiencia, 2 de ellos sobrepasaron los 14 días de vida, llegando a vivir uno 21 y el otro 28 días (Anexo 1). No se observaron diferencias en el peso de los juveniles a lo largo de los días ($F=0,93$, $p=0,4589$). Solo 2 ejemplares presentaron un crecimiento positivo durante parte de la experimentación (Figura III. 7)

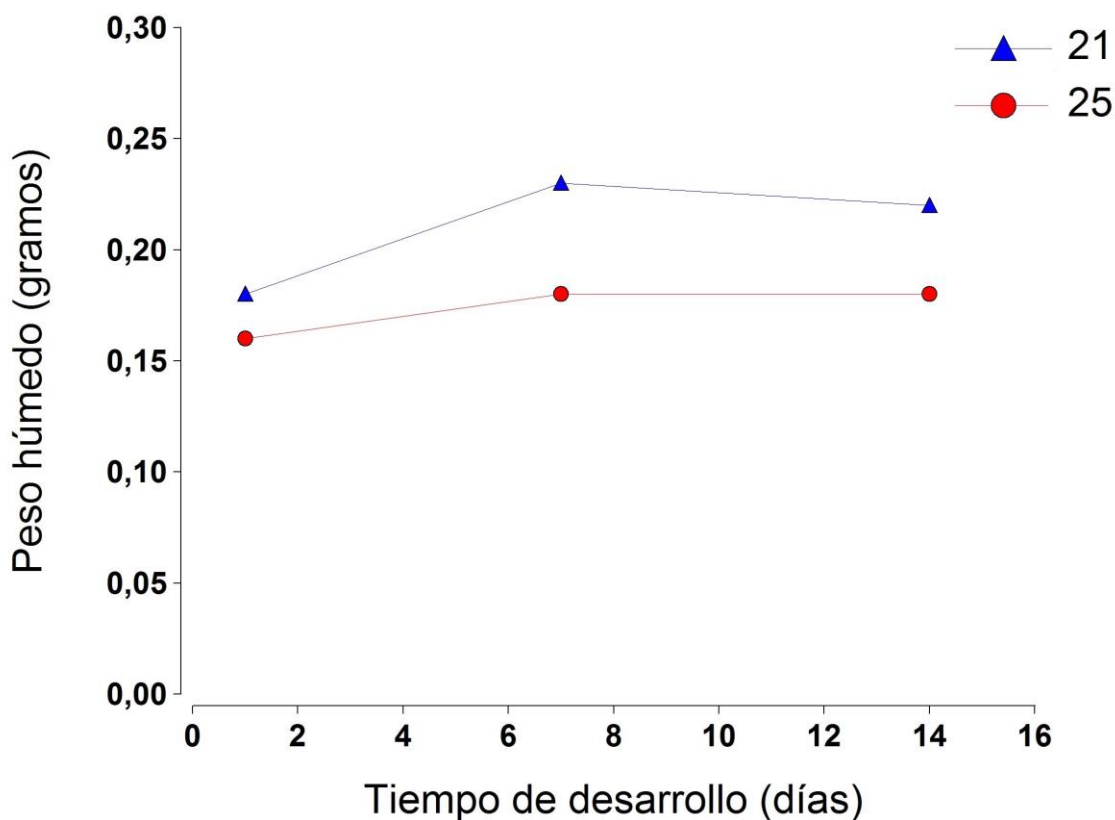


Figura III.7. Crecimiento de los juveniles # 21 (triángulo azul) y # 25 (círculo rojo) de *Octopus tehuelchus*, alimentados con isópodos *Exosphaeroma* sp. que no completaron la experiencia.

En el tratamiento con pasta semi-húmeda, los juveniles registraron un PH_i promedio de 0,17 g y un PH_f promedio de 0,14 g, experimentando un decrecimiento a lo largo del tiempo (Anexo 2). El PH_i promedio inicial se mantuvo constante durante los primeros 28 días de vida, para luego disminuir hasta el día 56 ($F= 2,51$, $p= 0,0112$). Luego de este periodo, un solo ejemplar logro sobrevivir alimentándose de pasta hasta

el día 63 (Anexo 2). De las 21 crías alimentadas con pasta semi-húmeda, solo 3 presentaron crecimiento durante parte de la experiencia (Figura III. 8).

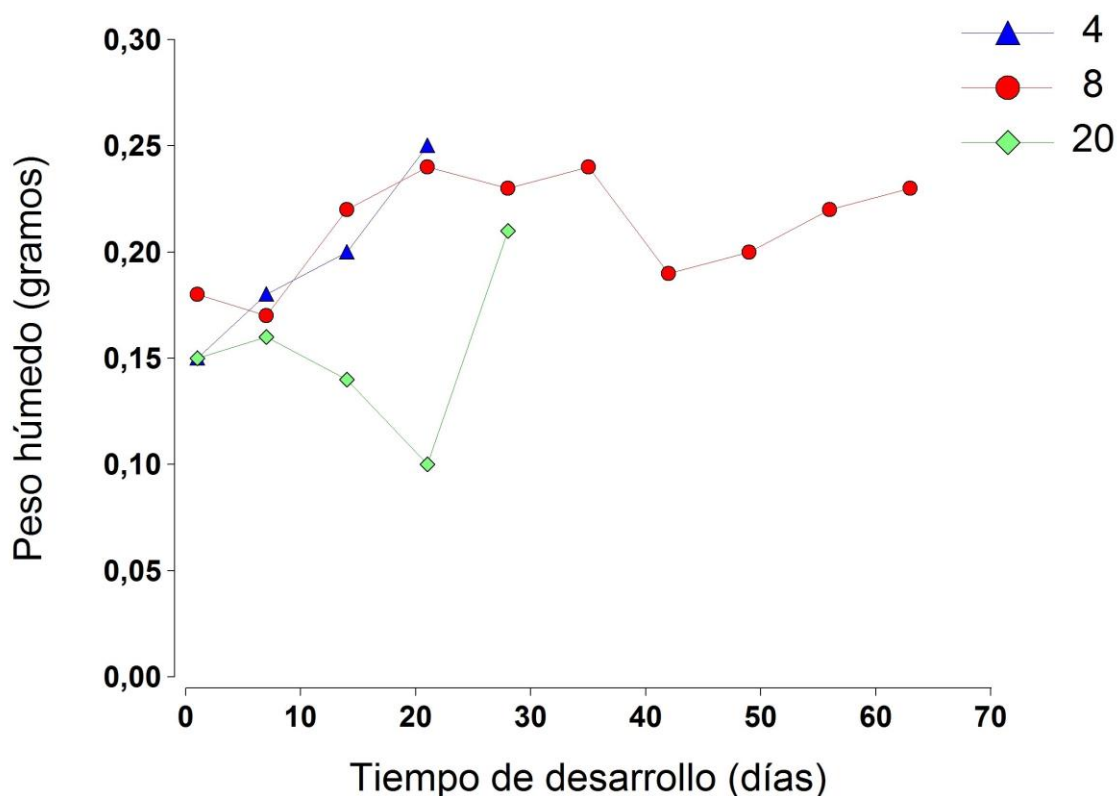


Figura III.8. Crecimiento de los ejemplares # 4 (triángulo azul), # 8 (círculo rojo) y # 20 (rombo verde) de juveniles de *Octopus tehuelchus* alimentados con pasta semi-húmeda.

TASAS DE CRECIMIENTO E ÍNDICES BIOENERGÉTICOS

Las tasas de crecimiento e índices bioenergéticos fueron calculadas para los 29 juveniles alimentados con isópodos (Anexo 1) y para los 21 ejemplares alimentados con pasta semi-húmeda (Anexo 2).

Los juveniles alimentados con isópodos que completaron el tratamiento, presentaron un ΔPH promedio de 0.72 g, es decir, un incremento en peso del 431 % en promedio al finalizar el tratamiento. En contraposición, los juveniles que murieron en los dos tratamientos, experimentaron un decrecimiento en peso,

expresando ΔPH negativos (Tabla III.3). Si bien los juveniles de ambos tratamientos se alimentaron, los ejemplares que completaron los 84 días de tratamiento y que consumieron isópodos tuvieron una tasa de AI total en promedio 3,6 veces mayor que los alimentados con pasta semi-húmeda (Tabla III.3). En cuanto a las TDA mayores fueron registradas para los juveniles alimentados con pasta. La TAA en promedio fue 1,5 veces mayor en los juveniles que completaron la experiencia comiendo isópodos (Tabla III.3). Las tasas TAP, TAL y TAG fueron extremadamente bajas en los juveniles que murieron alimentándose de isópodos, y similares entre los juveniles que vivieron a base de isópodos y los alimentados con pasta. A su vez, para ambos tratamientos, el consumo de proteínas fue predominante sobre el consumo de lípidos y glucógeno (Tabla III.3).

En los juveniles alimentados con *Exosphaeroma* sp. que sobrevivieron toda la experiencia, presentaron tanto la TEC como la TAC positivas, lo que se evidencia en un crecimiento en el peso corporal de las crías. Por lo contrario, las mismas variables para los juveniles que murieron y fueron alimentados con pasta o con isópodos fueron negativas, mostrando un decrecimiento de su masa corporal a lo largo del tiempo (Tabla III.3). Solo los juveniles que vivieron alimentándose de isópodos presentaron una EAT positiva, mostrando una asimilación del alimento ingerido del 46 % (Tabla III.3).

Tabla III.3. Tasas de crecimiento, índices bioenergéticos y alimento ingerido total para los juveniles de *O. tehuatlchus* alimentados con isópodos *Exosphaeroma* sp. y pasta semi-húmeda. Δ PH: PH final-PH inicial, AI total: alimento ingerido total, TAC: tasa absoluta de crecimiento, TEC: tasa específica de crecimiento, TDA: tasa diaria de alimentación, TAA: tasa absoluta de alimentación, TAP: tasa de alimentación de proteínas, TAL: tasa de alimentación de lípidos, TAG: tasa de alimentación de glucógeno, EAT: eficiencia de asimilación total. Media \pm desvío estandar (mínimo y máximo).

	Tratamiento isópodos (juveniles que vivieron)	Tratamiento isópodos (juveniles que murieron)	Tratamiento pasta semi-húmeda
Δ PH (g)	0,72 \pm 0,21 (0,38 - 1,22)	-0,02 \pm 0,04 (-0,08 - 0,04)	-0,03 \pm 0,06 (-0,14 - 0,10)
AI total (g)	2,1857 \pm 0,4060 (1,8471 - 3,2572)	0,0806 \pm 0,0696 (0,0023 - 0,1971)	0,5971 \pm 0,2505 (0,0653 - 1,0006)
TAC (g/día)	0,0088 \pm 0,0027 (0,0045 - 0,0149)	-0,0015 \pm 0,0029 (-0,0057 - 0,0043)	-0,0008 \pm 0,0019 (-0,0046 - 0,0048)
TEC (%.día ⁻¹)	2,0128 \pm 0,1776 (1,6849 - 2,3589)	-0,8162 \pm 2,2364 (-4,5400 - 4,500)	-0,7295 \pm 1,3995 (-4,5748 - 2,4300)
TDA (%.día ⁻¹)	6,0563 \pm 1,4128 (4,1091 - 10,0510)	3,0743 \pm 2,5538 (0,1933 - 8,7201)	9,9328 \pm 3,2568 (0,8667 - 17,0924)
TAA (g/día)	0,0257 \pm 0,0039 (0,0220 - 0,0358)	0,0051 \pm 0,0040 (0,0003 - 0,0129)	0,0166 \pm 0,0055 (0,0010 - 0,0286)
TAP (g/día)	0,0020 \pm 0,0003 (0,0017 - 0,0029)	0,0004 \pm 0,0003 (0 - 0,0010)	0,0024 \pm 0,0008 (0,0002 - 0,0042)
TAL (g/día)	0,0009 \pm 0,0001 (0,0008 - 0,0012)	0,0002 \pm 0,0001 (0 - 0,0004)	0,0006 \pm 0,0002 (0 - 0,0010)
TAG (g/día)	0,0003 \pm 0,0001 (0,0002 - 0,0004)	0,0001 \pm 0,0001 (0 - 0,0001)	0,0001 \pm 0,0001 (0,0000 - 0,0002)
EAT (%)	46,5261 \pm 16,8348 (24,1945 - 84,7568)	-96,6498 \pm 490,1280 (-869,5652 - 1153,8462)	-3,8530 \pm 25,4663 (-75,6568 - 37,1957)

DISCUSIÓN

A lo largo de la ontogenia, el crecimiento en cefalópodos presenta dos etapas que se relacionan con diferentes procesos del desarrollo. La primera etapa se encuentra asociada a los estadios tempranos de vida, más precisamente al estadio paralarvario y juvenil, en el cual la energía obtenida del alimento es utilizada principalmente para el crecimiento somático, generando así un patrón de crecimiento exponencial. Luego, en las etapas subsiguientes, la energía es destinada a los procesos reproductivos y aunque el crecimiento persiste, se detiene casi por completo, generando curvas de crecimiento de carácter logarítmico (Jackson 1994, Moltschaniwskyj 2004, Boyle y Rodhouse 2008). Al igual que lo observado en *S. officinalis*, *Illex illecebrosus*, *Robsonella fontaniana* y *E. megalocyathus* (Koueta y Boucaud-Camou 1999, Arkhipkin y Fetisov 2000, Uriarte *et al.* 2009, 2010, Sarrá 2018), los juveniles de *O. tehuelchus* alimentados con isópodos que sobrevivieron a los 84 días de experimentación respondieron al patrón típico de la primera etapa de crecimiento exponencial. En estos juveniles se observaron tasas de crecimiento positivas y una ganancia en peso promedio de 0,72 gramos. Estos resultados indicarían que, una alimentación a base de isópodos *Exosphaeroma* sp. cumple con los requerimientos nutricionales necesarios para generar el crecimiento de los juveniles, y podría ser un alimento clave en la transición hacia la etapa de sub-adulto en cultivo.

Durante la fase de crecimiento exponencial, en cefalópodos existe una relación entre las tasas de crecimiento y la temperatura, siendo estas mayores a temperaturas más elevadas (Domingues *et al.* 2001, Forsythe *et al.* 2001, Grist y Jackson 2004, Vidal *et al.* 2014). En los juveniles de *O. tehuelchus* alimentados con *Exosphaeroma* sp. que completaron la experiencia, se observó que tanto la tasa específica de crecimiento promedio (TEC=2,01 % por día) como la tasa absoluta de crecimiento promedio (TAC=0,0082 g por día) fueron menores o similares a las

obtenidas en juveniles de *O. maya* alimentados con crustáceos vivos (TEC= 3,6 % por día, TAC= 0,009 g por día) (Briceño *et al.* 2010, Baeza-Rojano *et al.* 2013, Rosas *et al.* 2013). A su vez, fueron superiores a las obtenidas en *E. megalocyathus* alimentados con crustáceos vivos y con descartes pesqueros (cefalotórax de langostino *Pleoticus muelleri*) (TEC= 0.9 % por día) (Uriarte *et al.* 2011, Sarrá 2018). Estos resultados sugieren que además del tipo de alimento ofertado, la temperatura cumpliría un rol fundamental en la modulación de tasas de crecimiento, observándose cómo los ejemplares de *O. tehuelchus*, especie adaptada a aguas templado-cálidas, presentan tasas mayores respecto a las especies de aguas templado-frías, como *E. megalocyathus*, pero menores o similares respecto a especies de aguas cálidas, como *O. maya*.

Las tasas de alimentación y la cantidad de alimento ingerido demuestran que tanto los isópodos como la pasta semi-húmeda fueron aceptados por los juveniles de *O. tehuelchus* sin inconvenientes. Respecto al promedio de la tasa diaria de alimentación (TDA) tanto para el tratamiento con pasta como el de isópodos (9,93 y de 6,05 % por día) fue mayor que la registrada por Klaich y colaboradores (2006) en ejemplares de la misma especie con maduración incipiente y avanzada (2,21 % y de 1,09 % por día), alimentados con cangrejos. Este patrón indicaría que la TDA sería mayor en ejemplares con menor grado de desarrollo para satisfacer rápidamente los requerimientos nutricionales durante esta etapa crítica (ver Capítulo II, Hanlon 1987, Lee 1995, Sarrá 2018).

Otro resultado interesante fue que a pesar de que la tasa de alimentación de proteínas (TAP) fue similar entre tratamientos, los juveniles alimentados con pasta tuvieron un consumo de alimento 3,6 veces menor. Si bien los cefalópodos se caracterizan por tener un metabolismo con altas demandas de proteína (Villanueva y Norman 2008, Rosas *et al.* 2011), TAP elevadas no necesariamente se traducirían

en el crecimiento. Estudios realizados en *O. maya*, han mencionado la importancia de tener proteína de alta calidad en los alimentos formulados para pulpos, con el fin de facilitar la digestión (Rosas *et al.* 2008). En cuanto a los juveniles muertos en ambos tratamientos, en su mayoría presentaron TAC y TEC negativas, aun teniendo TDA y TAA positivas. En consecuencia, si bien todas las crías se alimentaron, no todas lograron convertir ese alimento en biomasa.

La eficiencia de asimilación total (EAT) en los juveniles de *O. tehuelchus* que sobrevivieron alimentándose con isópodos fue de 46,5 %, ampliamente superior a los valores negativos arrojados por el consumo de pasta y 4,7 veces mayor que lo registrado por Sarrá (2018) en juveniles de *E. megalocyathus* alimentados con cefalotórax de langostino, aun cuando la tasa absoluta de alimentación (TAA) fue mucho menor en los juveniles de *O. tehuelchus* respecto a *E. megalocyathus* (0,025 y 28,5 g por día). A su vez, fue en promedio similar a las EAT obtenidas en ejemplares de maduración incipiente y mayores a las obtenidas en ejemplares de maduración avanzada de *O. tehuelchus* alimentados con cangrejo *Cyrtograpsus altimanus* (Klaich *et al.* 2006, 2008). Esta variable, definida como la relación entre el porcentaje de incremento del peso de los individuos por gramo de alimento ingerido, podría depender de varios factores, entre ellos, de la especie bajo estudio, del estadio del ciclo de vida, del tipo y la calidad de alimento proporcionado, de la posición trófica que ocupa el individuo y de las variables físicas (Mootz y Epifanio 1974, Díaz Herrera 1989). Más precisamente, de acuerdo con Sarrá (2018) en el pulpo *E. megalocyathus* podría existir una asociación directa entre el alto contenido de proteínas del alimento y una elevada EAT. Por otro lado, Klaich y colaboradores (2006) establecen que en *O. tehuelchus* alimentados con cangrejos, la EAT estaría relacionada con la temperatura y con el estadio de maduración sexual. En los juveniles de *O. tehuelchus* parecería no existir una asociación directa entre la EAT y el

porcentaje de proteínas presentes en los isópodos, reflejado en EAT elevadas y un crecimiento exponencial de los juveniles, aun con porcentajes de proteínas bajos respecto las dietas utilizadas por los otros autores.

En relación con la composición proximal de las dietas suministradas a los juveniles de *O. tehuelchus* se obtuvo que, para ambas dietas, el principal componente bioquímico fueron las proteínas. Al compararlas, la pasta artificial arrojó porcentajes significativamente mayores de humedad y proteínas mientras que los isópodos reflejaron mayores porcentajes de cenizas. Si bien los juveniles consumieron pasta, el AI total fue 3,6 veces menor que con isópodos, lo que podría estar relacionado con la palatabilidad del alimento. Según diversos análisis (Lee *et al.* 1991, Domínguez *et al.* 2007, Cerezo-Valverde *et al.* 2008), los altos niveles de humedad observados en el alimento formulado, entre otros factores, podrían afectar la palatabilidad. Aunque al momento de la preparación de la pasta se utilizó gelatina para mejorar tanto la estabilidad en el agua como para crear una textura aceptable para los juveniles (Cerezo-Valverde *et al.* 2008, Rosas *et al.* 2008, Quintana *et al.* 2011, Martínez *et al.* 2014), los resultados de las tasas de crecimiento y de la EAT en *O. tehuelchus* no fueron positivos. En cuanto a l porcentaje elevado de cenizas presente en los isópodos podría deberse a las partes del exoesqueleto presentes en las muestras analizadas, las cuales no son consumidas por los pulpos. En tal sentido, al igual que en los langostinos utilizados como alimento de *E. megalocyathus*, (Sarrá 2018), las cenizas al tratarse de un compuesto carente de valor nutricional no sería un factor a tener en cuenta para el engorde de los juveniles de pulpito tehuelche.

En *O. tehuelchus* la mortalidad registrada entre dietas fue altamente contrastante. Los ejemplares alimentados con pasta húmeda registraron una mortalidad del 100 % en comparación con el 44,82 % en aquellos alimentados con *Exosphaeroma* sp. Si bien en el presente trabajo la formulación de la pasta semi-

húmeda se realizó siguiendo los protocolos utilizados por Martínez y colaboradores (2014), se hipotetiza que las variaciones en ciertos compuestos podrían haber causado el bajo desempeño de los juveniles. Por ejemplo, para *O. tehuelchus* se utilizó una mezcla de vitaminas y minerales conteniendo, particularmente, vitamina C. Esta vitamina es un antioxidante ampliamente utilizado en la preparación de alimentos para acuicultura, es de fácil oxidación y se destruye fácilmente en presencia de oxígeno, de humedad y de oligoelementos (Hilton *et al.* 1977). Estudios más recientes sugieren el reemplazo de esta vitamina por fosfato de ascorbilo (Gallardo *et al.* 2020), el mismo utilizado por Martínez y colaboradores (2014). Este derivado se caracteriza por ser estable en agua, altamente antioxidante y contribuye a la defensa del sistema inmune (Boonyaratpalin y Phromkunthong 2001). Es por ello, que resulta necesario reemplazar dicha vitamina en futuros alimentos formulados a la hora de programar las experiencias de alimentación con juveniles de *O. tehuelchus*.

Por un lado, el isópodo *Exosphaeroma* sp. demostró ser una fuente de alimento efectiva y aceptable para el crecimiento de los juveniles en la primera etapa de vida. Se registraron curvas de crecimiento exponenciales y tasas de crecimiento e índices energéticos positivos, demostrando que *Exosphaeroma* sp. cumple con los requerimientos nutricionales durante los tres meses de experimentación. Por el contrario, si bien hubo ingesta de la pasta, las tasas de crecimiento de los juveniles de *O. tehuelchus* resultaron ser negativas y esto repercutió en un decrecimiento en peso, confirmando que los alimentos formulados siguen siendo de muy baja eficiencia en la conversión del alimento al crecimiento y de mala digestibilidad en contraposición con el alimento vivo (Vidal *et al.* 2014).

Como líneas de investigación a futuro, el principal desafío que existe en esta etapa de pre-engorde y engorde, es poder disponer una dieta de bajo costo que pueda satisfacer las demandas alimenticias de los juveniles y que reemplace a la dieta

natural para lograr escalar a un cultivo comercial. Para ello se deberá seguir investigando los efectos de distintas dietas formuladas en el desempeño de los juveniles y adultos de *O. tehuatlensis*.

CONCLUSIONES

≈ La temperatura juega un rol determinante tanto en el desarrollo de la embriogénesis como en el desempeño de los juveniles de *O. tehuelchus*. A 13 y 16°C se modifican la duración de la embriogénesis, el patrón de desarrollo embrionario, el tiempo de eclosión individual, el periodo de eclosión y el tamaño de los embriones y de los juveniles, así como su desempeño en inanición. Los tiempos de embriogénesis son menores, y los embriones y juveniles son más grandes en los cultivos a 16°C, respecto a los de 13°C.

≈ La mortalidad embrionaria disminuye cuando el proceso de gastrulación llega a su fin y el éxito de eclosión no se ve afectado cuando la incubación se realiza a 13 o 16°C, siendo en promedio de 65% en los experimentos realizados.

≈ Los primeros juveniles en eclosionar sobreviven sin alimentarse más tiempo respecto a los últimos en nacer. Por otro lado, la sobrevivencia en inanición de los juveniles aumenta o disminuye según la temperatura. Esto resulta en una supervivencia siete días mayor a 13°C, respecto a 16°C.

≈ Los ejemplares recién nacidos de *O. tehuelchus* son descritos por primera vez en este estudio. El tamaño de los juveniles y el patrón de los cromatóforos permiten distinguir a ejemplares de esta especie del resto de las crías pertenecientes a otras especies de octópodos citadas para la costa atlántica.

≈ En juveniles de *O. tehuelchus* el alimento actúa como un factor modulador de los procesos madurativos asociados al sistema digestivo, incluidos la dinámica enzimática y la diferenciación citológica de la glándula digestiva.

≈ El isópodo *Exosphaeroma* sp. cumple con los requerimientos nutricionales de los juveniles durante el periodo de pre-engorde hacia la etapa de sub-adultos. Esto se reflejó en una ganancia promedio de peso de los juveniles de 0,72g, tasas de crecimiento positivas y en un 46,5% de asimilación del alimento consumido, luego de tres meses de alimentación.

≈ Tanto el crecimiento somático como la diferenciación celular de la glándula digestiva se observan a partir de la segunda semana de vida en los juveniles alimentados con *Exosphaeroma* sp.

≈ El consumo de las reservas de vitelo interno es regulado por los juveniles en función de la disponibilidad de alimento.

≈ En los juveniles en inanición, las reservas de vitelo interno son utilizadas para el mantenimiento y no para el desarrollo y crecimiento.

≈ La pasta semi-húmeda puesta a prueba en esta tesis, no cumple con los requerimientos nutricionales de los juveniles. Si bien todas las crías se alimentaron, no lograron convertir este alimento en biomasa.

≈ En términos generales, los juveniles de *O. tehuilchus* atraviesan tres etapas hasta llegar a la fase de subadultos. La primera etapa, hasta el día 6 de vida, se caracteriza por una nutrición a partir de las reservas de vitelo interno exclusivamente, aun existiendo consumo de presas. La segunda etapa, entre los días 6 y 10 post eclosión, está determinada por la combinación entre una alimentación endógena a base de reservas vitelinas y una alimentación exógena. Y

la tercera etapa, a partir del día 15 luego del nacimiento, en donde la nutrición es enteramente por vía exógena.

≈ Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información esencial respecto al cultivo de las fases tempranas de desarrollo de *O. tehuatlensis* y demuestran que los mismos son factibles de ser cultivados bajo las condiciones ensayadas. Los avances presentados permitirán programar tanto experiencias de incubación como de alimentación, vinculadas a la etapa del pre-engorde de ejemplares, con el fin de poder escalar el cultivo de esta especie.



REFERENCIAS

- Alejo-Plata, M. D. C., Gómez-Márquez, J. L., Ramos Carrillo, S., & Herrera-Galindo, J. E. (2009). Reproducción, dieta y pesquería del pulpo *Octopus (Octopus) hubbsorum* (Mollusca: Cephalopoda) en la costa de Oaxaca, México. *Revista de Biología Tropical*, 57(1-2), 63-78.
- Alves, J., & Haimovici, M., 2011. Reproductive biology of *Octopus tehuelchus* d'Orbigny, 1834 (Cephalopoda: Octopodidae) in southern Brazil. *Nautilus*. 125, 150–158.
- AOAC. (1990). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 16th edición, Ed. By Hoorwitz.
- Arkhipkin, A. I., & Fetisov, A. A. (2000). Population structure and growth of the squid *Illex illecebrosus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) off Nova Scotia, north-west Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80(2), 367-368.
- Arvy, L. (1960). Histoenzymological data on the digestive tract of *Octopus vulgaris* Lamarck (Cephalopoda). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 90(3), 929-949.
- Avila-Poveda, O. H., & Baqueiro-Cárdenas, E. R. (2009). Reproductive cycle of *Strombus gigas* Linnaeus 1758 (Caenogastropoda: Strombidae) from Archipelago of San Andres, Providencia and Santa Catalina, Colombia. *Invertebrate Reproduction & Development*, 53(1), 1-12. <https://doi.org/10.1080/07924259.2009.9652284>
- Avila-Poveda, O. H., Colin-Flores, R. F., & Rosas, C. (2009). Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *The Biological Bulletin*, 216(1), 94-102.
- Baeza-Rojano, E., Domingues, P., Guerra-García, J. M., Capella, S., Noreña-Barroso, E., Caamal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2013). Marine gammarids (Crustacea: Amphipoda): a new live prey to culture *Octopus maya* hatchlings. *Aquaculture Research*, 44(10), 1602-1612.
- Barón, P. J. (2003). The paralarvae of two South American sympatric squid: *Loligo gahi* and *Loligo sanpaulensis*. *Journal of Plankton Research*, 25(11), 1347-1358.
- Bastos, P., Fracalossi, D. M., Chimal, M. E., Sánchez, A., & Rosas, C. (2020). Digestive enzymes and timing of digestion in *Octopus vulgaris* type II. *Aquaculture Reports*, 16, 100262.
- Berrueta, M. M., Desiderio, J. A., Agliano, F., Lopez, A. V., Aristizabal Abud, E. O., & Ortiz, N. (2020). Mating behavior of Patagonian octopus (*Octopus tehuelchus*) under laboratory conditions. *Marine and Fisheries Science*, 16, 100262.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*. 1 (1–6), 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Bocco, G., Cinti, A., Vezub, J., Sánchez-Carnero, N., & Chávez, M. (2019). Lugar y sentido de lugar en un camino de la costa atlántica patagónica, 1950-1970. *Región y Sociedad*, 31. <https://doi.org/10.22198/rys2019/31/1127>
- Boletzky, S. V. (1975). A contribution to the study of yolk absorption in the Cephalopoda. *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*, 80(3), 229-246.

- Boletzky, S. V. (1983). A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44, 147-187.
- Boletzky, S. V. (1984). The embryonic development of the *Octopus Scaevurgus unicolor* (Mollusca, Cephalopoda). *Vie et Milieu*, 34, 87-93.
- Boletzky, S. V. (1987). Embryonic phase. En *Cephalopod life cycles Vol II, Comparative Reviews*, 5-60.
- Boletzky, S. V. (1989). Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. *Advances in Marine Biology*, 25, 85-115.
- Boletzky, S. V. (1994). Embryonic development of cephalopods at low temperatures. *Antarctic Science*, 6(2), 139-142. <https://doi.org/10.1017/S0954102094000210>
- Boletzky, S. V. (2002). Yolk sac morphology in cephalopod embryos. *Abhandlungen der Geologischen Bundesanstalt in Wien*, 57, 57-68.
- Boletzky, S. V. (2003). Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Advances in Marine Biology*, 44, 144-204. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(03\)44003-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(03)44003-0)
- Boletzky, S. V., & Villanueva, R. (2014). Cephalopod biology. En *Cephalopod culture* (pp. 3-16). Springer, Dordrecht.
- Bonete, M. J., Manjon, A., Llorca, F., & Iborra, J. L. (1984). Acid proteinase activity in fish II. Purification and characterization of cathepsins B and D from *Mujil auratus* muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 78(1), 207-213.
- Boonyaratpalin, M., & Phromkunthong, W. (2001). Bioavailability of ascorbyl phosphate calcium in hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther) × *Clarias gariepinus* (Burchell) feed. *Aquaculture Research*, 32, 126-134.
- Boucaud-Camou, E., Boucher-Rodoni, R., & Mangold, K. (1976). Digestive absorption in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *Journal of Zoology*, 179(2), 261-271.
- Boucaud-Camou, E., & Boucher-Rodoni, R. (1983). Feeding and digestion in cephalopods, En: Saleuddin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), *The Mollusca. Physiology*. Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 149-187.
- Boucaud-Camou, E., & Roper, C. F. (1995). Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 57(2), 313-327.
- Bouchaud, O. (1991). Energy consumption of the cuttlefish *Sepia officinalis* L (Mollusca: Cephalopoda) during embryonic development, preliminary results. *Bulletin of Marine Science*, 49(1-2), 333-340.
- Bouchaud, O., & Daguzan, J. (1990). Étude expérimentale de l'influence de la température sur le déroulement embryonnaire de la seiche *Sepia officinalis* L (Cephalopode, Sepioidae). *Cahiers de Biologie Marine*, 31(1), 131-145.
- Boucher-Rodoni, R., Boucaud-Camou, E., & Mangold, K. (1987). Feeding and digestion, En: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Academic Press London, London, pp. 85-108.

- Boyle, P. R. (1991). The UFAW handbook on the care and management of cephalopods in the laboratory. Universities Federation for Animal Welfare.
- Boyle, P., & Rodhouse, P. (2008). Cephalopods: ecology and fisheries. John Wiley & Sons.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Briceño, F., Mascaró, M., & Rosas, C. (2010). Energy demand during exponential growth of *Octopus maya*: exploring the effect of age and weight. *ICES Journal of Marine Science*, 67(7), 1501-1508.
- Butler-Struben, H. M., Brophy, S. M., Johnson, N. A., & Crook, R. J. (2018). In vivo recording of neural and behavioral correlates of anesthesia induction, reversal, and euthanasia in cephalopod molluscs. *Frontiers in Physiology*, 9, 109. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00109>
- Budelmann, B.U., Schipp, R. & Boletzky, S.V. (1997). Cephalopoda. En *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Volume 6A, F.W. Harrison & A.J.Kon (eds), New York: Wiley-Liss, 119-414.
- Caamal-Monsreal, C., Mascaró, M., Gallardo, P., Rodríguez, S., Noreña-Barroso, E., Domingues, P., & Rosas, C. (2015). Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchling quality. *Aquaculture*, 441, 84-94.
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Díaz, F., Sánchez, A., Re, D., & Rosas, C. (2016). Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture*, 451, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.011>
- Caddy, J. F., & Rodhouse, P. G. (1998). Cephalopod and groundfish landings: evidence for ecological change in global fisheries?. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(4), 431-444.
- Cagnetta, P., & Sublimi, A. (2000). Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47, 331-336.
- Carciofi, I. & Rossi, L. (2021). Acuicultura en Argentina: red de actores, procesos de producción y espacios para el agregado de valor. En búsqueda del impulso exportador para los productos acuícolas. Documentos de Trabajo del CCE N° 13, septiembre de 2021, Consejo para el Cambio Estructural - Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación.
- Cárdenas-López, J. L., & Haard, N. F. (2005). Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 171-186. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00009.x>
- Cárdenas-López, J. L., & Haard, N. F. (2009). Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. *Food Chemistry*, 112:442–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.100>
- Caruso, G., G Denaro, M., & Genovese, L. (2009). Digestive enzymes in some teleost species of interest for Mediterranean aquaculture. *The Open Fish Science Journal*, 2(1).

- Castro, B. G. (1991). Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food?. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 19(1), 35-38.
- Castro, B. G., DiMarco, F. P., DeRusha, R. H., & Lee, P. G. (1993). The effects of surimi and pelleted diets on the laboratory survival, growth, and feeding rate of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 170(2), 241-252.
- Castro, B. G., & Lee, P. G. (1994). The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L.(Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(4), 1007-1016.
- Cerezo-Valverde, J., Hernández, M. D., Aguado-Giménez, F., & García, B. G. (2008). Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, 275(1-4), 266-273.
- Cerezo-Valverde, J., Hernández, M. D., García-Garrido, S., Rodríguez, C., Estefanell, J., Gairín, J. I., Rodríguez, C. J., Tomás, A., & García, B. G. (2012). Lipid classes from marine species and meals intended for cephalopod feeding. *Aquaculture International*, 20(1), 71-89.
- Cerezo-Valverde, J., & García, B. G. (2017). High feeding and growth rates in common octopus (*Octopus vulgaris*) fed formulated feeds with an improved amino acid profile and mixture of binders. *Aquaculture Research*, 48(7), 3308-3319.
- Chapela, A., González, Á. F., Dawe, E. G., Rocha, F., & Guerra, Á. (2006). Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. *Scientia Marina*, 70(1), 121-129.
- Chen, X. Q., & Long, L. J. (1991). Research and production of live feeds in China. *Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceeding Dings of a US. Asia Workshop*, Honolulu, 187-201.
- Chiao, M., & Chiao, J. C. (Eds.). (2011). *Biomaterials for MEMS*. Pan Stanford Publishing.
- Choe, S. (1966). On the growth, feeding rates and the efficiency of food conversion for cuttlefishes and squids. *The Korean Journal of Zoology*, 9(2), 12-20.
- Chong Lay-Son, J., Cortés, N., Galleguillos R., & Oyarzún, C. (2001) Estudio biológico pesquero del recurso pulpo en la X y XI regiones. Universidad Católica de la Santísima Concepción, Chile. *Informes Técnicos del Fondo de Investigación Pesquera (FIP-IT No. 99-20)*, xix + 211 pp.
- Cinti, A., Soria, G., Orensanz, J.M., & Parma, A.M. (2003) Relevamiento del Sector Pesquero Artesanal y Deportivo en el Área del Polo Pesquero Bahía Camarones, provincia del Chubut. Documento Técnico No. 8 de la Comisión Técnica Dirección de Pesca-Centro Nacional Patagónico (CENPAT)-Asociación de Pescadores Artesanales de Puerto Madryn (APAPM), 28 pp.
- Ciotti, Á. M., Odebrecht, C., Fillmann, G., & Moller, O. O. (1995). Freshwater outflow and Subtropical Convergence influence on phytoplankton biomass on the southern Brazilian continental shelf. *Continental Shelf Research*, 15, 1737-1756. [https://doi.org/10.1016/0278-4343\(94\)00091-Z](https://doi.org/10.1016/0278-4343(94)00091-Z)

- Clarke, A. (1982). Temperature and embryonic development in polar marine invertebrates. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 5(2), 71-82. <https://doi.org/10.1080/01651269.1982.10553456>
- Çoban, D., Demircan, M.D., Tosun, D.D. (Eds.) 2020. *Marine Aquaculture in Turkey: Advancements and Management*. Turkish Marine Research Foundation (TUDAV) Publication No: 59, İstanbul, Turkey, 430 p
- Coelho, M., Domingues, P., Balguerías, E., Fernandez, M., & Andrade, J. P. (1997). A comparative study of the diet of *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1799)(Mollusca: Cephalopoda) from the south coast of Portugal and the Saharan Bank (Central-East Atlantic). *Fisheries Research*, 29(3), 245-255.
- Cortez, T., González, A. F., & Guerra, A. (1999). Growth of cultured *Octopus mimus* (Cephalopoda, Octopodidae). *Fisheries Research*, 40(1), 81-89.
- Craig, S. (2001). Environmental conditions and yolk biochemistry: factors influencing embryonic development in the squid *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae) Steenstrup 1856. Tesis Doctoral, University of Aberdeen, Reino Unido.
- d'Orbigny, A. (1834). Voyage dans l'Amérique Méridionale exécuté pendant les années 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832 et 1833, Tome 5, Partie 3, Mollusques. pp. 1-758.
- Díaz-Herrera, F. (1989). Estudio ecofisiológico del langostino gigante *Mucrobruchiutn rosettbetgii*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Dellatorre, F. G., Pisoni, J. P., Barón, P. J., & Rivas, A. L. (2012). Tide and wind forced nearshore dynamics in Nuevo Gulf (Northern Patagonia, Argentina): Potential implications for cross-shore transport. *Journal of Marine Systems*, 96, 82-89.
- Domingues, P. M. (1999). Development of alternative diet for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. Tesis Doctoral, Unidade De Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos, Universidad do Algarve, Brasil.
- Domingues, P. M., Kingston, T., Sykes, A., & Andrade, J. P. (2001). Growth of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758) at the upper end of the biological distribution temperature range. *Aquaculture Research*, 32(11), 923-930.
- Domingues, P. M., Sykes, A., & 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(3), 207-220.
- Domingues, P. M., Dimarco, P. F., Andrade, J. P., & Lee, P. G. (2005). Effect of artificial diets on growth, survival and condition of adult cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758. *Aquaculture International*, 13(5), 423-440.
- Domingues, P. M., López, N., Muñoz, J. A., Maldonado, T., Gaxiola, G., & Rosas, C. (2007). Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13(4), 273-280.

- Domingues, P., Garcia, S., Hachero-Cruzado, I., Lopez, N., & Rosas, C. (2010). The use of alternative prey (crayfish, *Procambarus clarki*, and hake, *Merluccius gayi*) to culture *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797). *Aquaculture international*, 18(3), 487-499.
- Espinoza, V., Viana, M. T., Rosas, C., Uriarte, I., & Farías, A. (2017). Effect of starvation on the performance of baby octopus (*Robsonella fontaniana*) paralarvae. *Aquaculture Research*, 48, 5650–5658. <https://doi.org/10.1111/are.13387>
- Estefanell, J., Socorro, J., Izquierdo, M., & Roo, J. (2013). Growth, food intake, protein retention and fatty acid profile in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed agglutinated moist diets containing fresh and dry raw materials based on aquaculture by-products. *Aquaculture Research*, 45(1), 54-67.
- FAO. (2013). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2013*. Rome.
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome.
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome.
- FAO. (2021). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2021*. Rome.
- Farías, A., Pereda, S. V., Uriarte, I., Dörner, J., Cuzon, G., & Rosas, C. (2010). Evaluating the effects of formulated moist diets on juveniles of Patagonian octopus *Enteroctopus megalocyathus* (Gould 1852). *Journal of Shellfish Research*, 29(4), 793-798.
- Fassiano, A. V., Ortiz, N., & Ríos de Molina, M. del C. (2017). Reproductive status, antioxidant defences and lipid peroxidation in *Octopus tehuelchus* (Cephalopoda: Octopodidae) females. *Journal of Natural History*, 51, 2645–2660. <https://doi.org/10.1080/00222933.2017.1329460>
- Ferreira, A., Marquez, L., Almansa, E., Andrade, J. P., Lorenzo, A., & Domingues, P. M. (2010). The use of alternative diets to culture juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*: effects on growth and lipid composition. *Aquaculture Nutrition*, 16(3), 262-275.
- Fiedorowicz-Kowal, M. & Barifuzza, M. (2020). *Desarrollo de producto: pulpo colorado patagonico entero congelado*. Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnologica Nacional, Argentina.
- Forsythe, J.W., & Van Heukelem, W.F. (1987). Growth, En: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Academic Press, London, pp, 135–155.
- Forsythe, J. W., DeRusha, R. H., & Hanlon, R. T. (1994). Growth, reproduction and life span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Mollusca) cultured through seven consecutive generations. *Journal of Zoology*, 233(2), 175-192.
- Forsythe, J. W., Walsh, L. S., Turk, P. E., & Lee, P. G. (2001). Impact of temperature on juvenile growth and age at first egg-laying of the Pacific reef squid *Sepioteuthis lessoniana* reared in captivity. *Marine Biology*, 138(1), 103-112. <https://doi.org/10.1007/s002270000450>
- Fox, J. D., Capadona, J. R., Marasco, P. D., & Rowan, S. J. (2013). Bioinspired water-enhanced mechanical gradient nanocomposite films that mimic the architecture and properties of the squid beak. *Journal of the American Chemical Society*, 135(13), 5167-5174.

- Fraga, F. (1956). Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. Separata facticia de la Revista Investigación Pesquera. Investigaciones Científicas Patronato Juan de la Cierva, 3, 69-74 pp.
- Franco-Santos, R. M., & Vidal, E. A. G. (2014). Beak development of early squid paralarvae (Cephalopoda: Teuthoidea) may reflect an adaptation to a specialized feeding mode. *Hydrobiologia*, 725(1), 85-103.
- Gallardo, P., Olivares, A., Martínez-Yáñez, R., Caamal-Monsreal, C., Domingues, P. M., Mascaró, M., Sánchez, A., Pascual, C., & Rosas, C. (2017). Digestive physiology of *Octopus maya* and *O. mimus*: temporality of digestion and assimilation processes. *Frontiers in Physiology*, 8, 355. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00355>
- Gallardo, P., Villegas, G., Rosas, C., Domingues, P., Pascual, C., Mascaró, M., Sánchez-Arteaga, A., Estefanell, J., & Rodríguez, S. (2020). Effect of different proportions of crab and squid in semi-moist diets for *Octopus maya* juveniles. *Aquaculture*, 524, 735233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735233>
- Garrido, D., Varo, I., Morales, A. E., Hidalgo, M. C., Navarro, J. C., Hontoria, F., Monroig, O., Iglesias, J., Otero, J. J., Estévez, A., Pérez, J., Martín, M. V., Rodríguez, C., Almansa, E., & Cardenete, G. (2017). Assessment of stress and nutritional biomarkers in cultured *Octopus vulgaris* paralarvae: effects of geographical origin and dietary regime. *Aquaculture*, 468, 558-568.
- Gebauer, P., Paschke, K., & Anger, K. (2010). Seasonal variation in the nutritional vulnerability of first-stage larval porcelain crab, *Petrolisthes laevigatus* (Anomura: Porcellanidae) in southern Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 386, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.02.016>
- Gilbert, D., Adelman, H. & Arnold, J. (1990). *Squid as Experimental Animals*, 516, New York, NY: Plenum Press.
- Giménez, F. A., & García-Garúa, B. (2002). Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10(5), 361-377.
- González-Zamorano, M., Navarrete del Toro, M. A., & García-Carreño, F. L. (2013). Exogenous proteinases as feed supplement for shrimp: in vitro evaluation. *Aquaculture Nutrition*, 19(5), 731–740. <https://doi.org/10.1111/anu.12020>.
- Grigoriou, P., & Richardson, C. A. (2004). Aspects of the growth of cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*, 35(12), 1141-1148.
- Grigoriou, P., & Richardson, C. A. (2008). The effect of ration size, temperature and body weight on specific dynamic action of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Marine Biology*, 154, 1085–1095. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1002-3>
- Grimpe, G. (1928). Pflege, Behandlung und Zucht der Cephalopoden für zoologische und physiologische Zwecke. In: Überhalden E (ed) *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden*. Verlag Urban & Schwarzenberg, Berlin, pp 331–402.

- Grist, E. P., & Jackson, G. D. (2004). Energy balance as a determinant of two-phase growth in cephalopods. *Marine and Freshwater Research*, 55(4), 395-401.
- Gutiérrez, R., Uriarte, I., Yany, G., & Farías, A. (2015). Productive performance of juvenile Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus*) fed with fresh preys: are relevant the quantity of protein and energy on diets?. *Aquaculture Research*, 46, 64-75.
- Haller, M. J., Monti, A. J. A., & Meister, C. M. (1997). Programa Nacional de Cartas geológicas 1:250.000. Hoja Geológica 4363-I. Península Valdés. Provincia de Chubut, República Argentina. Convenio UNPSJB – Secretaría de Minería. 35pp.
- Hamdan, M., Tomás-Vidal, A., Martínez, S., Cerezo-Valverde, J., & Moyano, F. J. (2014). Development of an in vitro model to assess protein bioavailability in diets for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture Research*, 45(12), 2048-2056. <https://doi.org/10.1111/are.12155>
- Hanlon, R. T. (1987). Mariculture. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles*, vol 2. Academic, London, pp 291-305.
- Hanlon, R. T. (1990). Maintenance, rearing and culture of teuthoid and sepioid squids. In: Gilbert DL, Adelman Jr WJ, Arnold JM (eds) *Squid as experimental animals*. Plenum, New York, pp 35-62.
- Hanlon, R. T., Turk, P. E., & Lee, P. G. (1991). Squid and cuttlefish mariculture: an updated perspective. *Journal of Cephalopod Biology*, 2(1), 31-40.
- Hunsicker, M. E., Essington, T. E., Watson, R., & Sumaila, U. R. (2010). The contribution of cephalopods to global marine fisheries: can we have our squid and eat them too?. *Fish and fisheries*, 11(4), 421-438.
- Higgins, F. A., Bates, A. E., & Lamare, M. D. (2012). Heath tolerance, behavioural temperature selection and temperature-dependent respiration in larval *Octopus buttoni*. *Journal of Thermal Biology*, 37, 83–88.
- Hilborn, R. (2012). The evolution of quantitative marine fisheries management 1985–2010. *Natural Resource Modeling*, 25(1), 122-144.
- Hilton, J. W., Cho, C. Y., & Slinger, S. J. (1977). Factors affecting the stability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34(5), 683-687.
- Hochberg, F. G., Nixon, M., & Toll, R. B. (1992). Order OCTOPODA Leach, 1818. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 513, 213-280.
- Ibañez, C.M. y Chong, J.V. (2008) Feeding ecology of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda: Octopodidae) in southern Chile. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(4), 793–798.
- Ibarra-García, L. E., Tovar-Ramírez, D., Rosas, C., Campa-Córdova, Á. I., & Mazón-Suástegui, J. M. (2018a). Digestive enzymes of the Californian two-spot octopus, *Octopus bimaculoides* (Pickford and McConnaughey, 1949). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 215, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.10.001>

- Ibarra-García, L. E., Mazón-Suástegui, J. M., Rosas, C., Tovar-Ramírez, D., Bárcenas-Pazos, G., Civera-Cerecedo, R., & Campa-Córdova, A. I. (2018b). Morphological and physiological changes of *Octopus bimaculoides*: from embryo to juvenile. *Aquaculture*, 497, 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.069>
- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Otero, J. J., & Moxica, C. (2000). Cultivo del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier): situación actual, problemas y perspectivas. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 77, 313-321.
- Iglesias, J., Otero, J. J., Moxica, C., Fuentes, L., & Sánchez, F. J. (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12(4), 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 Meren, T., Vidal, E. A. G., & Villanueva, R. (2007). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.019>
- Iglesias, J., Fuentes, L., & Villanueva, R. (2014). *Cephalopod culture*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5>
- Iribarne, O. O. (1990). Use of shelter by the small Patagonian octopus *Octopus tehuelchus*: availability, selection and effects on fecundity. *Marine Ecology Progress Series*, 66, 251–258.
- Iribarne, O. O. (1991). Life history and distribution of the small south-western Atlantic octopus, *Octopus tehuelchus*. *Journal of Zoology*, 223, 549–565. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb04387.x>
- Iribarne, O. O., Fernandez, M. E., & Zucchini, H. (1991). Prey selection by the small Patagonian octopus *Octopus tehuelchus* d'Orbigny. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 148(2), 271–281. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(91\)90020-G](https://doi.org/10.1016/0165-7836(91)90020-G)
- Itami, K., Izawa, Y., Maeda, S., & Nakay, K. (1963). Notes on the laboratory culture of the octopus culture. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 29, 514–520.
- Jackson, G. D. (1994). Statolith age estimates of the loliginid squid *Loligo opalescens* (Mollusca: Cephalopoda): corroboration with culture data. *Bulletin of Marine Science*, 54(2), 554-557.
- Joll, L. M. (1977). Growth and food intake of *Octopus tetricus* (Mollusca: Cephalopoda) in aquaria. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 28: 45-56.
- Jordan, J., Galindo, M. F., Cena, V., & Gonzalez-Garcia, C. (2000). Cysteine proteinase and neurodegeneration. *Revista de Neurologia*, 31(4), 333-340.
- Juárez, O. E., Galindo-Sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., Sánchez-García, A. M., Camaal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2015). Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 467, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.020>
- Klaich, M. J., Re, M. E., & Pedraza, S. N. (2006). Effect of temperature, sexual maturity and sex on growth, food intake and gross growth efficiency in the “Pulpito” *Octopus tehuelchus*

- (D'orbigny, 1834). *Journal of Shellfish Research*, 25, 979–986.
[https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[979:EOTSMA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[979:EOTSMA]2.0.CO;2)
- Klaich, M. J., Ré, M. E., & Pedraza, S. N. (2008). Gross growth efficiency as a function of food intake level in the “Pulpito” *Octopus tehuelchus*: A multimodel inference application. *Aquaculture*, 284, 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.054>
- Koueta, N., & Boucaud-Camou, E. (1999). Food intake and growth in reared early juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L.(Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 240(1), 93-109.
- Krstulović, S., & Vrgoc, N. (2009). Diet and feeding of the musky octopus, *Eledone moschata*, in the northern Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89, 413–419. doi: 10.1017/S0025315408002488
- Kubodera, T., & Okutani, T. (1981). The systematics and identification of larval Cephalopods from the northern north Pacific. *Research Institute of North Pacific Fisheries, Special volume*, 131–159.
- Lacoue-Labarthe, T., Le Bihan, E., Borg, D., Koueta, N., & Bustamante, P. (2010). Acid phosphatase and cathepsin activity in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: the effects of Ag, Cd, and Cu exposure. *ICES Journal of Marine Science*, 67(7), 1517-1523.
- Langridge, K. V. (2009). Cuttlefish use startle displays, but not against large predators. *Animal Behaviour*, 77(4), 847-856.
- Laschi, C., Cianchetti, M., Mazzolai, B., Margheri, L., Follador, M., & Dario, P. (2012). Soft robot arm inspired by the octopus. *Advanced robotics*, 26(7), 709-727.
- Lasta, C. A., Ruarte, C., & Carozza, C. R. (2001). Flota costera Argentina: antecedentes y situación actual. *Boschi, EE ed., El Mar Argentino y sus Recursos Pesqueros*, 3, 89-106.
- Lazo, J. P., Mendoza, R., Holt, G. J., Aguilera, C. & Arnold, C. R. (2007). Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265(1-4), 194–205. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.043
- Lee, P. G., Forsythe, J. W., DiMarco, P. F., DeRusha, R. H., & Hanlon, R. T. (1991). Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 49(1-2), 362-372.
- Lee, P. G. (1995). Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25(1-3), 35-51.
- Linares, M., Caamal-Monsreal, C., Olivares, A., Sánchez, A., Rodríguez, S., Zúñiga, O., Pascual, C., Gallardo, P., & Rosas, C. (2015). Timing of digestion, absorption and assimilation in octopus species from tropical (*Octopus maya*) and subtropical-temperate (*O. mimus*) ecosystems. *Aquatic Biology*, 24(2), 127-140. <https://doi.org/10.3354/ab00642>
- López-Ripoll, E.R. (2010). Descripción del desarrollo y efecto de la alimentación en la estructura de la glándula digestiva de los juveniles tempranos de *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) Voss y Solís-Ramírez (1966). Tesis Doctoral, Universidad de Bogotá, Colombia.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lupiano, M. (2012). Comportamiento de alimentación del pulpo *Enteroctopus megalocyathus* bajo condiciones controladas de acuario. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina.
- MAGyP (2021). Agricultura impulsa el desarrollo de la acuicultura y la piscicultura en el territorio nacional. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Mangold, K., & Von Boletzky, S. (1973). New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19(1), 7-12.
- Mangold, K. M., & Young, R. E. (1998). The systematic value of the digestive organs. *Smithsonian Contributions to Zoology*, (586), 21-30.
- Martínez, R., López-Ripoll, E., Ávila-Poveda, O. H., Santos-Ricalde, R., Mascaró, M., & Rosas, C. (2011). Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya*, and cytological background of digestion in juveniles. *Aquatic Biology*, 11, 249-261. <https://doi.org/10.3354/ab00305>
- Martínez, R., Gallardo, P., Pascual, C., Navarro, J., Sánchez, A., Caamal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2014). Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, 426, 310-317.
- Matozzo, V., Conenna, I., Riedl, V. M., Marin, M. G., Marčeta, T., & Mazzoldi, C. (2015). A first survey on the biochemical composition of egg yolk and lysozyme-like activity of egg envelopment in the cuttlefish *Sepia officinalis* from the Northern Adriatic Sea (Italy). *Fish & shellfish immunology*, 45(2), 528-533.
- Messenger, J. B. (2001). Cephalopod chromatophores: Neurobiology and natural history. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76, 473-528. <https://doi.org/10.1017/S1464793101005772>
- Miliou, H., Fintikaki, M., Kountouris, T. & Verriopoulos, G. (2005). Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 249(1-4): 245-256
- MINAGRI. (2018). Desembarques de capturas marítimas totales. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Agroindustria de la Nación Argentina, <http://www.minagri.gob.ar>
- MINAGRI. (2021). Desembarques de capturas marítimas totales. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Agroindustria de la Nación Argentina, <http://www.minagri.gob.ar>
- Miserez, A., Weaver, J.C., Pedersen, P.B., Schneeberk, T., Hanlon, R.T., Kisailus, D. & Birkedal, H. (2009), Microstructural and Biochemical Characterization of the Nanoporous Sucker Rings from *Dosidicus gigas*. *Advanced Materials*, 21(4), 401-406. <https://doi.org/10.1002/adma.200801197>

- Moguel, C., Mascaró, M., Avila-Poveda, O. H., Caamal-Monsreal, C., Sanchez, A., Pascual, C., & Rosas, C. (2010). Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system. *Aquatic Biology*, 9(1), 35-48.
- Moltschaniwskyj, N. A. (2004). Understanding the process of growth in cephalopods. *Marine and Freshwater Research*, 55(4), 379-386.
- Moltschaniwskyj, N.A., Hall, K., Lipinski, M.R., Marian, J.E., Nishiguchi, M., Sakai, M., Shulman, D. J., Sinclair, B., Sinn, D. L., Staudinger, M., Van Gelderen, R., Villanueva, R., & Warnke, K. (2007). Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 17, 455-476. <https://doi.10.1007/s11160-007-9056-8>
- Monsalvo-Spencer, P., Salinas-Zavala, C. A., & Reynoso-Granados, T. (2013). Morfología de la membrana coriónica de los huevos de *Octopus bimaculoides* y *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae). *Hidrobiologica*, 23, 124–129.
- Mootz, C. A., & Epifanio, C. E. (1974). An energy budget for *Menippe mercenaria* larvae fed *Artemia nauplii*. *The Biological Bulletin*, 146(1), 44-55.
- Morote, E., Rodríguez, M., Muñoz, J. L., Mancera, J. M., & Moyano, F. J. (2005). Digestive enzymes indicating nutritional condition in octopus paralarvae *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*, 177-186.
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J., & Sarasquete, M. C. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(2), 121-130. 15, 121-130. <https://doi.org/10.1007/BF01875591>
- Nabhitabhata, J., & Segawa, S. (2014). Aquaculture to restocking. In: *Cephalopod Culture* (pp. 113-130). Springer, Dordrecht.
- Naef, A. (1928). Die Cephalopoden. *Embryologie. Die Fauna Flora Golf Neapel*, 35(2), 1-357.
- Nande, A.M., Domingues, P., & Rosas, C. (2018). Effects of temperature on the embryonic development of *Octopus vulgaris*. *Journal of Shellfish Research*, 37(5), 1013-1019. <https://doi.org/10.2983/035.037.0512>
- Narvarte, M., González, R., & Fernández, M. (2006). Comparison of Tehuelche octopus (*Octopus tehuelchus*) abundance between an open-access fishing ground and a marine protected area: Evidence from a direct development species. *Fisheries Research*, 79(1-2), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.02.013>
- Naylor, R. L., Williams, S. L., & Strong, D. R. (2001). Aquaculture--A gateway for exotic species. *Science*, 294(5547), 1655-1656.
- Nimrat, S., Tanutpongpalin, P., Sritunyalucksana, K., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2013). Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. *Aquaculture International*, 21 (3), 655–666. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9600-y>

- Nixon, M. (1985). Capture of prey, diet and feeding of *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda). *Vie et Milieu* 35, 255-261.
- Nolasco-Soria, H., Moyano-López, F., Vega-Villasante, F., del Monte-Martínez, A., Espinosa-Chaurand, D., Gisbert, E., & Nolasco-Alzaga, H. R. (2018). Lipase and phospholipase activity methods for marine organisms, En: Sandoval G., (Ed), *Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology*, vol 1835. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_7
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., & Rosas, C. (2013a). Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 38, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.09.001>
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., & Rosas, C. (2013b). Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 445, 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.008>
- O'Dor, R. K., & Webber, D. M. (1986). The constraints on cephalopods: why squid aren't fish. *Canadian Journal of Zoology*, 64(8), 1591-1605.
- O'Dor, R. K., & Wells, M. J. (1987). Energy and nutrient flow. En: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*, vol. 2. Academic Press, London, pp. 109–133.
- Ohshima, Y., & Choe, S. (1961). On the rearing of young cuttlefish and squid. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 27(11), 979-986.
- Olivares, A., Rodríguez-Fuentes, G., Mascaró, M., Arteaga, A. S., Ortega, K., Monsreal, C. C., & Rosas, C. (2019). Maturation trade-offs in octopus females and their progeny: energy, digestion and defence indicators. *PeerJ*, 7, e6618.
- Oosthuizen, A., Roberts, M. J., & Sauer, W. H. (2002). Temperature effects on the embryonic development and hatching success of the squid *Loligo vulgaris reynaudii*. *Bulletin of Marine Science*, 71(2), 619-632.
- Ortiz, N., Ré, M. E., & Márquez, F. (2006). First description of eggs, hatchlings and hatchling behaviour of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Plankton Research*, 28, 881–890. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbl023>
- Ortiz, N. (2009). Biología poblacional del pulpo colorado *Enteroctopus megalocyathus* en la costa patagónica norte y central y sus implicancias en el manejo pesquero. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Ortiz, N., & Ré, M. E. (2011). The eggs and hatchlings of the octopus *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91(3), 705–713. <https://doi.org/10.1017/S0025315410001232>
- Ortiz, N., Ré, M. E., Márquez, F., & Glembocki, N.G. (2011). The reproductive cycle of the red octopus *Enteroctopus megalocyathus* in fishing areas of Northern Patagonian coast. *Fisheries Research*, 110(1), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2011.03.016>

- Osorio, C., Peña, R., Ramajo, L., & Garcelon., N. (2006) Malacofauna bentónica de los canales oceánicos del sur de Chile (43o - 45o S). *Ciencia y Tecnología del Mar*. 29 (1), 103-114.
- Palma, E. D., Matano, R. P., & Piola, A. R. (2008). A numerical study of the Southwestern Atlantic Shelf circulation: Stratified ocean response to local and offshore forcing. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 113(C11).
- Palmegiano, G. B. & Sequi, R. (1981). On the possibility of the introduction of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) in a management strategy for the coastal lagoons. International Symposium on Coastal Lagoons. Bordeaux, France. pp 1-9
- Palmegiano, G. B. & Sequi, R. (1984). Allevamento estensivo di *Sepia officinalis* L. *Agricoltura e Ricerca*, 41, 49-56
- Parra, G., Villanueva, R., & Yúfera, M. (2000). Respiration rates in late eggs and early hatchlings of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80(3), 557–558. <https://doi.org/10.1017/S0025315400002319>
- Pasteels, J. J. (1973). Acid phosphatase and thiolacetic esterase activities studied with the electron microscope in the gill epithelium and eggs of lamellibranchial molluscs. *Bulletin de l'Association des Anatomistes*, 57, 603-606.
- Perrin, A., Le Bihan, E., & Koueta, N. (2004). Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311(2), 267-285. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.05.012>
- 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(2): E348-E361.
- Peyer, S. M., Kremer, N., & McFall-Ngai, M. J. (2018). Involvement of a host Cathepsin L in symbiont-induced cell death. *Microbiology Open* 7, e00632. <https://doi.org/10.1002/mbo3.632>
- Pierce, G. J., & Portela, J. (2014). Fisheries production and market demand. In: *Cephalopod culture* (pp. 41-58). Springer, Dordrecht.
- Pimentel, M. S., Truebenbach, K., Faleiro, F., Boavida-Portugal, J., Repolho, T., & Rosa, R. (2012). Impact of ocean warming on the early ontogeny of cephalopods: a metabolic approach. *Marine Biology*, 159(9), 2051-2059.
- Pinheiro, J. C., Bates, D. J., DebRoy, S., Sakar., D., & R Core Team. (2016). Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package 3.1-128. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Pollero, R. J., & Iribarne, O. O. (1988). Biochemical changes during the reproductive cycle of the small Patagonian octopus, *Octopus tehuelchus*, D'Orb. *Comparative Biochemistry and*

- Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 90(2), 317-320. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90080-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90080-6)
- Pontones, J., Scavarda, A. & Ortiz, N. (2018a). Una pequeña pulpa gigante: Registro del tamaño máximo de *Octopus tehuelchus* (Mollusca: Cephalopoda). VIII Jornadas de Becarios del CENPAT.
- Pontones, J., Van der Molen, S., Scavarda, A., Crespi-Abril, A. C. & Ortiz, N. (2018b). Estacionalidad del desove y fecundidad de *Octopus tehuelchus* en áreas de pesca localizadas en el extremo sur de su distribución. IV Simposio Iberoamericano de Ecología Reproductiva, Reclutamiento y Pesquerías. Iquique, Chile.
- Prato, E., Portacci, G., & Biandolino, F. (2010). Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 309, 203–211.
- Principato, G. B., Aisa, M. C., Biagioni, M., & Giovannini, E. (1982). Partial purification and characterization of an alkaline phosphatase in *Helix nemoralis* and in *Octopus vulgaris*. *Comparative Biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry*, 72(2), 325-328. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90055-4)
- Pujals, M. A. (1986). Contribución al conocimiento de la biología de *Octopus tehuelchus* d'Orbigny (Mollusca: Cephalopoda). *Anales de la Sociedad Científica Argentina, Serie I*, 214, 29-71.
- Querol, P., Gairín, J. I., Guerao, G., Monge, R., Jover, M., & Tomás, A. (2015). Effect of two extruded diets with different fish and squid meal ratio on growth, digestibility and body composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquaculture Research*, 46, 2481–2489. <https://doi.org/10.1111/are.12407>
- Quintana, D., Domingues, P., & 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*, 280(1-4), 161-164.
- Quintana, D., Rosas, C., & Moreno-Villegas, E. (2011). Relationship between nutritional and rearing parameters of *Octopus maya* juveniles fed with different rations of crab paste. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 379-388.
- R Core Team. (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
- Ré, M. E. (1989). Estudios ecológicos sobre el crecimiento y la alimentación de *Octopus tehuelchus* d'Orbigny en Puerto Lobos, Golfo San Matías. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Ré, M. E., Kuba, L., & Berón, J. C. (1991). Velocidad de digestión de *Octopus tehuelchus* D'Orbigny. *Actas de las Jornadas Nacional del Ciencias del Mar*, 91: 59-66.
- Ré, M. E., & Gómez-Simes, E. (1992). Hábitos alimentarios del pulpo (*Octopus tehuelchus*). I. Análisis cuali-cuantitativos de la dieta en el intermareal de Puerto Lobos, Golfo San Matías (Argentina). *Frente Marítimo*, 11, 119-128.

- Ré, M. E. (1997). Pesquerías costeras norpatagónicas: artes alternativas y optimización. Pulpos. Informe Técnico LAPEMAR N° 7, Centro Nacional Patagónico (CONICET).
- Ré, M. E. (1998). Pulpos octopódidos (Cephalopoda, Octopodidae), En: Boschi E.E. (Ed.), El Mar Argentino y sus Recursos Pesqueros, Tomo 2. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, pp 69-98.
- Ré, M. E., & Comes, O. F. (2003). Captura experimental de pulpo con líneas de refugios artificiales en Golfo Nuevo. Informe Técnico LAPEMAR N° 14, Centro Nacional Patagónico (CONICET).
- Ré, M. E., & Ortiz, N. (2008). Pesquerías de cefalópodos. En: Boltovskoy D. (Ed.). <http://atlas.ambiente.gov.ar>
- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M. S., Dionísio, G., Trübenbach, K., Lopes, V. M., Lopes, A. R., Calado, R., Diniz, M., & Rosa, R. (2014). Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(1), 55–64. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0783-y>
- Rivas, A. L., & Ripa, P. (1989). Variación estacional e la estructura termo-halina de golfo Nuevo, Argentina. *Geofísica Internacional*, 28(1).
- Rivas, A. L. (1990). Análisis estacional de la estructura termohalina en el Golfo San José, Argentina. *Geoacta*, 17(1), 37-48.
- Rivas, A. L., & Beier, E. J. (1990). Temperature and salinity fields in the north patagonian gulfs. *Oceanologica acta*, 13(1), 15-20.
- Rivas, A. L., Dogliotti, A. I., & Gagliardini, D. A. (2006). Seasonal variability in satellite-measured surface chlorophyll in the Patagonian Shelf. *Continental Shelf Research*, 26(6), 703-720. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2006.01.013>
- Rodhouse, P. G., & Nigmatullin, C. M. (1996). Role as consumers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1343), 1003-1022.
- Rodhouse, P. G., Pierce, G. J., Nichols, O. C., Sauer, W. H., Arkhipkin, A. I., Laptikhovsky, V. V., Lipinski, M. R., Ramos, J. E., Michael, G., Kidocoro, H., Sadayasu, K., Pereira, J., Lefkaditou, E., Pita, C., Gasalla, M., Haimovici, M., Sakai, M., & Downey, N. (2014). Environmental effects on cephalopod population dynamics: implications for management of fisheries. *Advances in Marine Biology*, 67, 99-233.
- Rohrbach, B., & Schmidtberg, H. (2006). Sepia arms and tentacles: model systems for studying the regeneration of brachial appendages, including suckers. *Vie et Milieu* 56(2).
- Rosa, R., Pimentel, M. S., Boavida-Portugal, J., Teixeira, T., Trübenbach, K., & Diniz, M. (2012). Ocean warming enhances malformations, premature hatching, metabolic suppression and oxidative stress in the early life stages of a keystone squid. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038282>
- Rosas, C., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Chay, D., López, N., Maldonado, T., & Domingues, P. M. (2007). Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152(2), 371–381. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0692-2>

- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P., & Cuzon, G. (2008). Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275(1-4), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.015>
- Rosas, C., Sánchez, A., Pascual, C., Aguila, J., Maldonado, T., & Domingues, P. (2011). Effects of two dietary protein levels on energy balance and digestive capacity of *Octopus maya*. *Aquaculture International*, 19, 165-180. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9350-7>
- 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(7), 1029-1044.
- Roura, A., González, A., Redd, K., & Guerra, A. (2012). Molecular prey identification in wild *Octopus vulgaris* paralarvae. *Marine Biology*, 159, 1335–1345. doi: doi: 10.1007/s00227-012-1914-9
- Safi, G., Martinez, A. S., Le Pabic, C., Le Bihan, E., Robin, J. P., & Koueta, N. (2018). Digestive enzyme ratios are good indicators of hatchling yolk reserve and digestive gland maturation in early life stages of cuttlefish *Sepia officinalis* L.: application of these new tools in ecology and aquaculture. *Journal of Comparative Physiology B*, 188(1), 57-76. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1115-4>
- Sakurai, Y., Bower, J. R., Nakamura, Y., Yamamoto, S., & Watanabe, K. (1996). Effect of temperature on development and survival of *Todarodes pacificus* embryos and paralarvae. *American Malacological Bulletin*, 13(1-2), 89-95.
- Sanchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C. E., Ortega, K., Mascaró, M., López, E., Caamal-Monsreal, C., Juárez, O., Noreña-Barroso, E., Re, D., & Rosas, C. (2017). Thermal sensitivity of *O. maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico. *Ecological Indicators*, 72, 574-585. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.043>
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Greve, E., & Gatellier, P. (2008). Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1488-1494.
- Sarath, G., De La Motte, R. S., & Wagner, F. W. (1989). Protease assay methods, En: Beynon, R., Bond, J., (Eds.), *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 25–56.
- Sarrá, E. N. (2018). Ensayos de alimentación de pulpo colorado patagónico, *Enteroctopus megalocyathus* con descartes pesqueros de langostino, *Pleoticus muelleri*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- Schwarz, R., Piatkowski, U., & Hoving, H. J. T. (2018). Impact of environmental temperature on the lifespan of octopods. *Marine Ecology Progress Series*, 605, 151–164. <https://doi.org/10.3354/meps12749>
- Segawa, S., & Hanlon, R. T. (1988). Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 13(4), 389-400. <https://doi.org/10.1080/10236248809378687>
- Segawa, S. (1990). Food consumption, food conversion and growth rates of the oval squid *Sepioteuthis lessoniana* by laboratory experiments. *Nippon Suisan Gakkaishi. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 56:217–222.
- Segawa, S. (1993). Field and laboratory feeding studies of the Japanese oval squid, *Sepioteuthis lessoniana*. En: Okutani T, O'Dor RK, Kubodera T (eds) *Recent Advances in Cephalopod Fisheries Biology*. Tokai University Press, Tokyo, 499-511.
- Segawa, S., & Nomoto, A. (2002). Laboratory growth, feeding, oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus ocellatus*. *Bulletin of Marine Science*, 71(2), 801-813.
- Semmens, J. M. (2002). Changes in the digestive gland of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson 1830) associated with feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 274(1), 19-39.
- SENASA. (2018). Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gov.ar>
- Sequi, R., & Palmegiano, G. B. (1984). Some alternatives for the use of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) resources in coastal lagoons. *Studies and Reviews-General Fisheries Council for the Mediterranean*, FAO, Rome, Italy. 607-614.
- SHN. (2021). Servicio de Hidrografía Naval. <http://www.hidro.gov.ar>
- Solorzano, Y., Viana, M. T., López, L. M., Correa, J. G., True, C. C., & Rosas, C. (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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.036>
- Storero, L. P. (2010). Características ecológicas del pulpito *Octopus tehuelchus* en tres ambientes del Golfo San Matías. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Cordoba, Argentina.
- Storero, L. P., Ocampo-Reinaldo, M., González, R. A., & Narvarte, M. A. (2010). Growth and life span of the small octopus *Octopus tehuelchus* in San Matías Gulf (Patagonia): Three decades of study. *Marine Biology*, 157, 555–564. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1341-8>
- Storero, L. P., & Narvarte, M. A. (2013). Coccidian infection may explain the differences in the life history of octopus host populations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3), 222-225.
- Sugita, A. (2012). Aori-ika, *Sepioteuthis lessoniana*. *Aquaculture Magazine*, 49 (4), 68-71.
- Sweeney, M. J., & Roper, C. F. (1983). Techniques for fixation, preservation, and curation of cephalopods. *Memoirs of the National Museum Victoria*.

- Sweeney, M. J., Roper, C. F., Mangold, K. M., Clark, M. R., & Boletzky, S. V. (1992). "Larval" and juvenile cephalopods: a manual for their identification. Smithsonian Contributions to Zoology.
- Swift, K., Johnston, D., & Moltschaniwskyj, N. (2005). The digestive gland of the southern dumpling squid (*Euprymna tasmanica*): structure and function. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 315(2), 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.09.017>
- Sykes, A. V., Baptista, F. D., Gonçalves, R. A., & Andrade, J. P. (2012). Directive 2010/63/EU on animal welfare: a review on the existing scientific knowledge and implications in cephalopod aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, 4(3), 142-162.
- Sykes, A. V., Gonçalves, R. A., & Andrade, J. P. (2013). Early weaning of cuttlefish (*Sepia officinalis*, L.) with frozen grass shrimp (*Palaemonetes varians*) from the first day after hatching. *Aquaculture Research*, 44(12), 1815-1823.
- Sykes, A. V., Koueta, N., & Rosas, C. (2014). Historical review of cephalopods culture. *Cephalopod Culture*, 59-75.
- Sykes, A.V., Almansa, E., Cooke, G. M., Ponte, G., & Andrews, P. L. (2017). The digestive tract of cephalopods: a neglected topic of relevance to animal welfare in the laboratory and aquaculture. *Frontiers in Physiology*, 8, 492. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00492>
- Tercero, J. F., Rosas, C., Mascaro, M., Poot, G., Domingues, P., Noreña, E., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C., Estefanell, J., & Gallardo, P. (2015). Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture*, 448, 234-242.
- Tonini, M. H, Palma, E. D, & Piola, A. R. (2013). A numerical study of gyres, thermal fronts and seasonal circulation in austral semi-enclosed gulfs. *Continental Shelf Research*, 65:97–110.
- Uriarte, I., Zúñiga, 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 Milieu/Life & Environment*, 315-323.
- Uriarte, I., Hernandez, J., Dorner, J., Paschke, K., Farias, A., Crovetto, E. & Rosas, C. (2010). Rearing and growth of the octopus *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae) from planktonic hatchlings to benthic juveniles. *The Biological Bulletin*, 218(2): 200-211.
- Uriarte, I., Iglesias, J., Domingues, P., Rosas, C., Viana, M.T., Navarro, J.C., Seixas, P., Vidal, E., Ausburger, A., Pereda, S., Godoy, F., Paschke, K., Farías, A., Olivares, A., & Zuñiga, O. (2011). Current Status and Bottle Neck of Octopod Aquaculture: The Case of American Species. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 735–752. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00524.x>
- Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M., Zúñiga, O., Olivares, A., Carbonell, P., Pino, S., Farías, A., & Rosas, C. (2012). Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 416–417, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.03.003>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.039>
- Uriarte, I., Martínez-Montañón, E., Espinoza, V., Rosas, C., Hernández, J., & Farías, A. (2016). Effect of temperature increase on the embryonic development of Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus* in controlled culture. *Aquaculture Research*, 47, 2582–2593. <https://doi.org/10.1111/are.12707>
- Uriarte, I., Rosas, C., Espinoza, V., Hernández, J., & Farías, A. (2018). Thermal tolerance of paralarvae of Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus*. *Aquaculture Research*, 49, 2119–2127. <https://doi.org/10.1111/are.13666>
- Van Heukelem, W. F. (1976). Growth, bioenergetics and life-span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Tesis Doctoral, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Vecchione, M. (1987). Juvenile ecology, En: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod life cycle: Comparative reviews*. Academic Press, London, pp. 61–84.
- Vecchione, M., & Hand, V. A. (1989). Digestive-gland histology in paralarval squids (Cephalopoda; Loliginidae). *Fishery Bulletin*, 87, 995-1000.
- Vidal, E. A. G., DiMarco, F. P., Wormuth, J. H., & Lee, P. G. (2002a). Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bulletin of Marine Science*, 71(2), 915-931.
- Vidal, E. A. G., DiMarco, F. P., Wormuth, J. H., & Lee, P.G. (2002b). Optimizing rearing conditions of hatchling loliginid squid. *Marine Biology*, 140, 117–127. <https://doi.org/10.1007/s002270100683>
- Vidal, E. A., Roberts, M. J., & Martins, R. S. (2005). Yolk utilization, metabolism and growth in reared *Loligo vulgaris reynaudii* paralarvae. *Aquatic Living Resources*, 18, 385-393. <https://doi.org/10.1051/alr:2005040>
- Vidal, E. A., DiMarco, P., & Lee, P. (2006). Effects of starvation and recovery on the survival, growth and RNA/DNA ratio in loliginid squid paralarvae. *Aquaculture*, 260, 94-105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.056>
- Vidal, E. A. G., & Boletzky, S. V. (2014). *Loligo vulgaris* and *Doryteuthis opalescens*. En *Cephalopod culture*. Springer, Dordrecht. pp. 271-313.
- Vidal, E. A. G., Villanueva, R., Andrade, J. P., Gleadall, I. G., Iglesias, J., Koueta, N., Rosas, C., Segawa, S., Grasse, B., Franco-Santos, R. M., Albertin, C. B., Caamal-Monsreal, C., Chimal, M. E., Edsinger-Gonzales, E., Gallardo, P., Le Pabic, C., Pascual, C., Roubledakis, K., & Wood, J. (2014). Cephalopod culture: Current status of main biological models and research priorities, *Advances in Marine Biology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800287-2.00001-9>
- Villanueva, R. (1994). Decapod crab zoeae as food for rearing cephalopod paralarvae. *Aquaculture*, 128(1-2), 143-152.

- Villanueva, R. (1995). Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(12), 2639-2650.
- Villanueva, R., Koueta, N., Riba, J., & Boucaud-Camou, E. (2002). Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia nauplii* and compound diets. *Aquaculture*, 205(3-4), 269-286.
- Villanueva, R., Arkhipkin, A., Jereb, P., Lefkaditou, E., Lipinski, M. R., Perales-Raya, C., Riba, J., & Rocha, F. (2003). Embryonic life of the loliginid squid *Loligo vulgaris*: Comparison between statoliths of Atlantic and Mediterranean populations. *Marine Ecology Progress Series*, 253, 197–208. <https://doi.org/10.3354/meps253197>
- Villanueva, R., Moltschaniwskyj, N. A., & Bozzano, A. (2007). Abiotic influences on embryo growth: Statoliths as experimental tools in the squid early life history. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 17(2), 101-110. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-9022-x>
- Villanueva, R., & Norman, M. D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanogr. Marine Biology* 46, 105–208. <https://doi.org/10.1201/9781420065756.ch4>
- Villanueva, R., Vidal, E. A. G., & Fernando, A. (2016). Early Mode of Life and Hatchling Size in Cephalopod Molluscs: Influence on the Species Distributional Ranges. *PLoS ONE* 11(11): e0165334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165334>
- Villanueva, R., Coll-Lladó, M., Bonnaud-Ponticelli, L., Carrasco, S. A., Escolar, O., Fernández-Álvarez, F. Á., Gleadall, I. G., Nabhitabhata, J., Ortiz, N., Rosas, C., Sánchez, P., Voight, J. R., & Swoger, J. (2021). Born With Bristles: New Insights on the Kölliker's Organs of Octopus Skin. *Frontiers in Marine Science*, 361.
- Voglino Carrera, G. S. (2016). Estudio de la estructura poblacional del pulpito (*Octopus tehuelchus*) en el Golfo Nuevo. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina.
- Voss, G. L., & Solís Ramírez, M. (1966). *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 16(3), 615-625.
- Walsh, L. S., Turk, P. E., Forsythe, J. W., & Lee, P. G. (2002). Mariculture of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* through seven successive generations. *Aquaculture*, 212(1-4), 245-262.
- Wells, M. J. (1958). Factors affecting reactions to Mysis by newly hatched *Sepia*. *Behaviour*, 13, 96-111.
- Wells, M. J., & Wells, J. (1970). Observations on the feeding, growth rate and habits of newly settled *Octopus cyanea*. *Journal of Zoology*, 161(1):65-74.
- Williams, G. N., Solís, M. E., & Esteves, J. L. (2018). Satellite-measured phytoplankton and environmental factors in North Patagonian Gulfs. En *Plankton Ecology of the Southwestern Atlantic* (pp. 307-325). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77869-3_15

- Worm, B., Hilborn, R., Baum, J.K., Branch, T.A., Collie, J.S., Costello, C., Fogarty, M. J., Fullton, E. A., Hutchings, J. A., & Zeller, D.(2009). Rebuilding global fisheries. *Science* 325, 578–585.
- Xavier, J. C., Cherel, Y., Allcock, L., Rosa, R., Sabirov, R. M., Blicher, M. E., & Golikov, A. V. (2018). A review on the biodiversity, distribution and trophic role of cephalopods in the Arctic and Antarctic marine ecosystems under a changing ocean. *Marine biology*, 165(5), 1-26.
- Yoshizaki, N., & Yonezawa, S. (1998). Cysteine proteinase plays a key role for the initiation of yolk digestion during development of *Xenopus laevis*. *Development, Growth & Differentiation*, 40(6), 659-667.
- Young, R. E., & Harman, R. F. (1988). "Larva," "paralarva" and "subadult" in cephalopod terminology. *Malacologia*, 29 (1): 201-207.
- Young, R. E., Harman, R. F., & Hochberg, F. G. (1989). Octopodid paralarvae from Hawaiian waters. *The Veliger*, 32(2), 152-165.
- Zar, J. H. (1996). *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis* -5th ed. Pearson Prentice Hall. 44.
- Zheng, X. D., Qian, Y. S., Liu, C., & Li, Q. (2014). *Octopus minor*. En *Cephalopod culture* (pp. 415-426). Springer, Dordrecht.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. (2009). *Mixed effects models and extensions in ecology with R* (Vol. 574). New York: Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-87458-6_1

ANEXOS

Anexo 1. Juveniles de *O. tehuatlensis* alimentados con isópodos *Exosphaeroma* sp. PH inicial: peso húmedo inicial del juvenil, PH final: peso húmedo final del juvenil, ΔPH: PH final-PH inicial, AI total: alimento ingerido total, TAC: tasa absoluta de crecimiento, TEC: tasa específica de crecimiento, TDA: tasa diaria de alimentación, TAA: tasa absoluta de alimentación, TAP: tasa de alimentación de proteínas, TAL: tasa de alimentación de lípidos, TAG: tasa de alimentación de glucógeno, EAT: eficiencia de asimilación total. Los valores en verde corresponden a los juveniles que completaron los 84 días de tratamiento.

juveniles	PH inicial (g)	PH final (g)	Δ PH (g)	N° pesajes	Tiempo de vida (días)	AI total (g)	TAC (g/día)	TEC (%.día ⁻¹)	TDA (%.día ⁻¹)	TAA (g/día)	TAP (g/día)	TAL (g/día)	TAG (g/día)	EAT (%)
1	0,17	1	0,83	13	84	2,4252	0,0099	2,1095	5,4585	0,0289	0,0023	0,0010	0,0003	38,7817
2	0,14	0,74	0,6	13	84	2,0501	0,0071	1,9822	6,7705	0,0244	0,0019	0,0008	0,0003	37,4584
3	0,19	0,94	0,75	13	84	2,0875	0,0089	1,9034	5,0347	0,0249	0,0020	0,0009	0,0003	40,2801
4	0,1	0,48	0,38	13	84	1,9342	0,0045	1,8674	10,0510	0,0230	0,0018	0,0008	0,0003	24,1945
5	0,17	0,71	0,54	13	84	2,0370	0,0064	1,7017	5,8210	0,0243	0,0019	0,0008	0,0003	63,0167
6	0,17	0,7	0,53	13	84	1,9742	0,0063	1,6849	5,9718	0,0235	0,0018	0,0008	0,0003	35,9026
7	0,14	0,87	0,73	13	84	1,9408	0,0087	2,1748	5,8847	0,0231	0,0018	0,0008	0,0003	72,3091
8	0,11	0,6	0,49	13	84	2,0645	0,0058	2,0196	8,3213	0,0246	0,0019	0,0008	0,0003	31,1023
9	0,14	0,75	0,61	13	84	2,1144	0,0073	1,9981	6,6032	0,0252	0,0020	0,0009	0,0003	37,5543
10	0,18	1,02	0,84	13	84	1,8471	0,0100	2,0650	4,1091	0,0220	0,0017	0,0008	0,0002	63,7607
11	0,18	0,96	0,78	13	84	2,0582	0,0093	1,9928	5,2863	0,0245	0,0019	0,0008	0,0003	38,3702
12	0,16	1	0,84	13	84	1,9668	0,0100	2,1816	5,1048	0,0234	0,0018	0,0008	0,0003	84,7568
13	0,15	0,81	0,66	13	84	1,8715	0,0079	2,0076	6,1197	0,0223	0,0018	0,0008	0,0002	35,9457
14	0,2	1,02	0,82	13	84	2,2978	0,0098	1,9396	5,2677	0,0274	0,0022	0,0009	0,0003	41,6136
15	0,19	1,16	0,97	13	84	3,0454	0,0136	2,2180	5,7922	0,0335	0,0027	0,0011	0,0004	39,1472
16	0,18	1,4	1,22	13	84	3,2572	0,0149	2,3589	5,3044	0,0358	0,0029	0,0012	0,0004	60,2243
17	0,21	0,18	-0,03	5	28	0,1971	-0,0011	-0,5500	3,7817	0,0070	0,0006	0,0002	0,0001	-20,0086
18	0,17	0,13	-0,04	3	14	0,0745	-0,0029	-1,9200	3,7505	0,0053	0,0004	0,0002	0,0001	-42,7350
19	0,24	0,19	-0,05	4	21	0,1332	-0,0024	-1,1100	3,3493	0,0063	0,0005	0,0002	0,0001	-505,8043
20	0,2	0,14	-0,06	3	14	0,0047	-0,0043	-2,5500	0,9643	0,0015	0,0001	0,0001	0,0000	-571,6440
21	0,18	0,22	0,04	3	14	0,0421	0,0029	1,4300	1,3635	0,0030	0,0002	0,0001	0,0000	272,3863
22	0,08	0,11	0,03	2	7	0,0026	0,0043	4,5500	0,3910	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	1153,8462
23	0,18	0,16	-0,02	2	7	0,0023	-0,0029	-1,6800	0,1933	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	-869,5652
24	0,19	0,15	-0,04	3	14	0,0359	-0,0029	-1,6900	1,4365	0,0026	0,0002	0,0001	0,0000	-446,5174
25	0,16	0,18	0,02	3	14	0,1811	0,0014	0,8400	7,3154	0,0129	0,0010	0,0004	0,0001	18,1159
26	0,18	0,18	0	3	14	0,0534	0,0000	0,0000	2,0075	0,0038	0,0003	0,0001	0,0000	98,3090
27	0,17	0,09	-0,08	3	14	0,1764	-0,0057	-4,5400	8,7201	0,0126	0,0010	0,0004	0,0001	-39,5257
28	0,2	0,14	-0,06	3	14	0,0809	-0,0043	-2,5500	3,8552	0,0058	0,0005	0,0002	0,0001	-169,9713
29	0,18	0,16	-0,02	3	14	0,0640	-0,0014	-0,8400	2,8374	0,0046	0,0004	0,0002	0,0001	-133,3333

Anexo 2. Juveniles de *O. tebuelchus* alimentados con pasta semi-húmeda. PH inicial: peso húmedo inicial del juvenil, PH final: peso húmedo final del juvenil, Δ PH: PH final-PH inicial, AI total: alimento ingerido total, TAC: tasa absoluta de crecimiento, TEC: tasa específica de crecimiento, TDA: tasa diaria de alimentación, TAA: tasa absoluta de alimentación, TAP: tasa de alimentación de proteínas, TAL: tasa de alimentación de lípidos, TAG: tasa de alimentación de glucógeno, EAT: eficiencia de asimilación total.

juveniles	PH inicial (g)	PH final (g)	Δ PH (g)	N° pesajes	Tiempo de vida (días)	AI total (g)	TAC (g/día)	TEC (%.día ⁻¹)	TDA (%.día ⁻¹)	TAA (g/día)	TAP (g/día)	TAL (g/día)	TAG (g/día)	EAT (%)
1	0,18	0,17	-0,01	3	14	0,2447	-0,0007	-0,4083	9,3716	0,0175	0,0026	0,0006	0,0001	4,5651
2	0,16	0,12	-0,04	4	21	0,3903	-0,0019	-1,3699	11,9414	0,0186	0,0027	0,0006	0,0002	13,9929
3	0,17	0,09	-0,08	6	35	1,0006	-0,0023	-1,8171	17,0924	0,0286	0,0042	0,0010	0,0002	3,3397
4	0,15	0,25	0,1	4	21	0,2871	0,0048	2,4300	6,9250	0,0137	0,0020	0,0005	0,0001	37,1957
5	0,15	0,09	-0,06	7	42	0,6840	-0,0014	-1,2163	10,4534	0,0163	0,0024	0,0005	0,0001	-75,6568
6	0,14	0,13	-0,01	6	35	0,5941	-0,0003	-0,2117	12,1387	0,0170	0,0025	0,0006	0,0001	2,6864
7	0,21	0,15	-0,06	7	42	0,5273	-0,0014	-0,8011	7,7916	0,0126	0,0018	0,0004	0,0001	-7,1840
8	0,18	0,23	0,05	10	63	0,0653	0,0008	0,3890	0,8667	0,0010	0,0002	0,0000	0,0000	-24,1825
9	0,17	0,16	-0,01	8	49	0,8477	-0,0002	-0,1237	9,0106	0,0173	0,0025	0,0006	0,0001	4,4875
10	0,19	0,08	-0,11	8	49	0,7116	-0,0022	-1,7653	8,4225	0,0145	0,0021	0,0005	0,0001	-43,2046
11	0,17	0,14	-0,03	8	49	0,7275	-0,0006	-0,3962	7,8603	0,0148	0,0022	0,0005	0,0001	10,3288
12	0,21	0,07	-0,14	9	56	0,9015	-0,0025	-1,9618	8,5630	0,0161	0,0024	0,0005	0,0001	-12,7319
13	0,17	0,19	0,02	7	42	0,6492	0,0005	0,2648	7,4584	0,0155	0,0023	0,0005	0,0001	20,1902
14	0,18	0,05	-0,13	5	28	0,5598	-0,0046	-4,5748	11,0604	0,0200	0,0029	0,0007	0,0002	-13,2031
15	0,16	0,14	-0,02	6	35	0,7836	-0,0006	-0,3815	12,8690	0,0224	0,0033	0,0007	0,0002	1,5832
16	0,14	0,14	0	5	28	0,3917	0,0000	0,0000	8,7842	0,0140	0,0021	0,0005	0,0001	22,4738
17	0,17	0,07	-0,1	9	56	0,9489	-0,0018	-1,5845	10,2125	0,0169	0,0025	0,0006	0,0001	-11,5828
18	0,18	0,1	-0,08	6	35	0,3760	-0,0023	-1,6794	10,3943	0,0107	0,0016	0,0004	0,0001	-32,8031
19	0,15	0,15	0	5	28	0,6151	0,0000	0,0000	13,8606	0,0220	0,0032	0,0007	0,0002	0,6456
20	0,15	0,21	0,06	5	28	0,4008	0,0021	1,2010	9,9455	0,0143	0,0021	0,0005	0,0001	27,5550
21	0,19	0,12	-0,07	6	35	0,8331	-0,0020	-1,3129	13,5661	0,0238	0,0035	0,0008	0,0002	-9,4090