

**JACUMAR**  
**JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

**INFORME FINAL**

**Título: Cría de centolla (*Maja sp.*)**

## **INFORME FINAL EXTENSO**

### **1.- DATOS ADMINISTRATIVOS**

**TITULO: Cría de la centolla (*Maja* sp.)**

### **FECHAS DE REALIZACIÓN**

Inicio: 1-1-2006

Finalización: 31-12-2009

### **DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO**

Nombre y Apellidos: Guiomar ROTLLANT ESTELRICH

Organismo/ Centro: IRTA

Departamento: Unidad Operativa De Cultius Experimentals

Teléfono: 977 74 54 27 ext. 1836

Fax: 977 74 41 38

Correo electrónico: Guiomar.rotllant@irta.cat

Dirección postal completa: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

### **PARTICIPANTES por cada Comunidad Autónoma**

#### **CENTROS DE INVESTIGACIÓN**

Tipo de centro: Centro Público de I+D

Nombre: IRTA

CIF: Q-5855049-B

Nombre Representante Legal: Agustí Fonts Cavestany

## DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: ROTLLANT ESTELRICH  
Nombre: Guiomar  
Organismo: IRTA  
Centro:  
Departamento: Unitat operativa de cultius experimentals  
Equipo:  
Teléfono: 977 74 54 27  
Fax.: 977 74 41 38  
Correo electrónico: guimar.rotllant@irta.cat  
Dirección Postal: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

Apellidos: ANDREE  
Nombre: Karl Blyth  
Organismo: IRTA  
Centro:  
Departamento: Unitat operativa de cultius experimentals  
Equipo:  
Teléfono: 977 74 54 27  
Fax.: 977 74 41 38  
Correo electrónico: karl.andree@irta.cat  
Dirección Postal: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

Apellidos: ANDRÉS ROIG  
Nombre: Mireia  
Organismo: IRTA  
Centro:  
Departamento: Unitat operativa de cultius experimentals  
Equipo:  
Teléfono: 977 74 54 27  
Fax.: 977 74 41 38  
Correo electrónico: mireia.andres@irta.cat  
Dirección Postal: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

Apellidos: DURFORT COLL  
Nombre: Mercè  
Organismo: Universitat de Barcelona  
Centro: Facultat de Biologia  
Departamento: Biologia Cel·lular  
Equipo:  
Teléfono: 93 402 15 36  
Fax.: 93 411 29 67  
Correo electrónico: mdafort@ub.edu  
Dirección Postal: Av. Diagonal 645, 28028 Barcelona.

Apellidos: ESTÉVEZ GARCÍA  
Nombre: Alicia  
Organismo: IRTA  
Centro:  
Departamento: Unitat operativa de cultius experimentals  
Equipo:  
Teléfono: 977 74 54 27  
Fax.: 977 74 41 38  
Correo electrónico: alicia.estevez@irta.cat  
Dirección Postal: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

Apellidos: GUERAO SERRA  
Nombre: Guillermo  
Organismo: IRTA  
Centro:  
Departamento: Unitat operativa de cultius experimentals  
Equipo:  
Teléfono: 977 74 54 27  
Fax.: 977 74 41 38  
Correo electrónico: Guillermo.guerao@irta.cat  
Dirección Postal: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

Apellidos: GARCÍA SIMEÓ  
Nombre: Carlos  
Organismo: IRTA  
Centro:  
Departamento: Unitat operativa de cultius experimentals  
Equipo:  
Teléfono: 977 74 54 27  
Fax.: 977 74 41 38  
Correo electrónico: carlos.garcia@irta.cat  
Dirección Postal: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

Apellidos: GISBERT CASAS  
Nombre: Enric  
Organismo: IRTA  
Centro:  
Departamento: Unitat operativa de cultius experimentals  
Equipo:  
Teléfono: 977 74 54 27  
Fax.: 977 74 41 38  
Correo electrónico: enric.gisbert@irta.cat  
Dirección Postal: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

Apellidos: RIBES MORA  
Nombre: Enric  
Organismo: Universitat de Barcelona  
Centro: Facultat de Biologia  
Departamento: Biologia Cel·lular  
Equipo:  
Teléfono: 93 403 90 50  
Fax.: 93 411 29 67  
Correo electrónico: eribes@ub.edu  
Dirección Postal: Av. Diagonal 645, 28028 Barcelona.

Apellidos: TRIGO DE SOUSA ROQUE  
Nombre: Ana  
Organismo: IRTA  
Centro:  
Departamento: Unitat operativa de cultius experimentals  
Equipo:  
Teléfono: 977 74 54 27  
Fax.: 977 74 41 38  
Correo electrónico: ana.roque@irta.cat  
Dirección Postal: Carretera del Poble Nou km 5.5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona.

## CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro Público I + D  
Nombre: Laboratori d'Investigacions Marines i Aqüicultura (LIMIA)  
CIF: S-O711001-H  
Nombre Representante Legal: MIGUEL ANGEL CALVIÑO JULIA

## DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: PASTOR GRACIA  
Nombre: Elena  
Organismo: Dirección General de Pesca  
Centro: LIMIA  
Departamento:  
Equipo:  
Teléfono: 971672335  
Fax.:971674240  
Correo electrónico: epastorg@dgpesca.caib.es  
Dirección Postal: Avd. Gabriel Roca 69. 07158 Port d'Andratx, Mallorca.

Apellidos: GRAU JOFRE  
Nombre: Amalia  
Organismo: Dirección General de Pesca  
Centro: LIMIA  
Departamento:  
Equipo:  
Teléfono: 971672335  
Fax.:971674240  
Correo electrónico: amaliagrau@dgpesca.caib.es  
Dirección Postal: Avd. Gabriel Roca 69. 07158 Port d'Andratx, Mallorca.

Apellidos: DURAN CHICA  
Nombre: Juana  
Organismo: SEMILLA sa  
Centro: LIMIA  
Departamento:  
Equipo:  
Teléfono: 971672335  
Fax.:971674240  
Correo electrónico: jduran@dgpesca.caib.es  
Dirección Postal: Avd. Gabriel Roca 69. 07158 Port d'Andratx, Mallorca.

Apellidos: VALENCIA CRUZ  
Nombre: Jose Maria  
Organismo: Dirección General de Pesca  
Centro: LIMIA  
Departamento:  
Equipo:  
Teléfono: 971672335  
Fax.: 971674240  
Correo electrónico: jmvalencia@dgpesca.caib.es  
Dirección Postal: Avd. Gabriel Roca 69. 07158 Port d'Andratx, Mallorca.

Apellidos: MASSUTÍ PASCUAL  
Nombre: Enrique  
Organismo: Dirección General de Pesca  
Centro: LIMIA  
Departamento:  
Equipo:  
Teléfono: 971672335  
Fax.: 971674240  
Correo electrónico: emassuti@dgpesca.caib.es  
Dirección Postal: Avd. Gabriel Roca 69. 07158 Port d'Andratx, Mallorca.

Apellidos: RIERA MUNUERA  
Nombre: Francisco  
Organismo: Dirección General de Pesca  
Centro:  
Departamento: Recursos Marinos  
Equipo:  
Teléfono: 971176114  
Fax.: 971176156  
Correo electrónico: friera@dgpesca.caib.es  
Dirección Postal: Foners 10, 07006 Palma de Mallorca

## CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro publico de Investigación  
Nombre: Instituto Canario de Ciencias marinas  
CIF: S-3510001-D  
Nombre Representante Legal: María Soledad Izquierdo López

## DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Fernández-Palacios Barber  
Nombre: Hipólito  
Organismo: Agencia canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la información  
Centro: Instituto Canario de Ciencias Marinas  
Departamento: Acuicultura  
Equipo: Reproducción y nuevas especies  
Teléfono: 928132900  
Fax.:928132908  
Correo electrónico: pipo@iccm.rcanaria.es  
Dirección Postal: Apdo. 56, 35214, Telde, Gran canaria

Apellidos: Fernández-Palacios Barber  
Nombre: José Enrique  
Organismo: Consejería de Educación, Cultura y Deportes. Gobierno de Canarias  
Centro: IES Antonio Cabrera Perez  
Departamento:  
Equipo:  
Teléfono: 928696219  
Fax.:  
Correo electrónico: 35007696@gobiernodecanarias.org  
Dirección Postal: Avenida de la Paz nº 3. 35213 Las Remudas. Telde. Gran Canaria

## **CENTROS DE INVESTIGACIÓN** (falta Murcia)



## CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro público de investigación en acuicultura, adscrito a la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía  
Nombre: IFAPA, Centro Agua del Pino  
CIF: Q 4100689A  
Nombre Representante Legal: Javier de las Nieves López

## DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: ALAMINOS TERNERO  
Nombre: Javier  
Organismo: IFAPA  
Centro: Agua del Pino  
Departamento: Producción  
Equipo:  
Teléfono: 959 02 49 00  
Fax: 959 02 49 29  
Correo electrónico: fjavier.alaminos@juntadeandalucia.es  
Dirección postal: Ctra. Cartaya-Punta Umbría, s/n. 21459 Cartaya, Huelva.

Apellidos: HACHERO CRUZADO  
Nombre: Ismael  
Organismo: IFAPA  
Centro: Agua del Pino  
Departamento: Producción  
Equipo:  
Teléfono: 959 02 49 00  
Fax.: 959 02 48 29  
Correo electrónico: ismael.hachero@juntadeandalucia.es  
Dirección Postal: Ctra. Cartaya-Punta Umbría, s/n. 21459 Cartaya, Huelva

Apellidos: DOMINGUES  
Nombre: Pedro  
Organismo: Instituto Español de Oceanografía  
Centro: Centro Oceanográfico de Vigo  
Departamento: Cultivos  
Equipo:  
Teléfono: 986462929  
Fax.: 986498626  
Correo electrónico: pmd2001fr@yahoo.fr  
Dirección Postal: Subida a radiofaro nº 50, Canido - Cabo Estai. 36390 Vigo.

Apellidos: GARCÍA GARRIDO  
Nombre: Sandra  
Organismo: IFAPA  
Centro: Agua del Pino

Departamento: Producción

Equipo:

Teléfono: 959 02 49 00

Fax.: 959 02 48 29

Correo electrónico: [sandra.garcia.garrido.ext@juntadeandalucia.es](mailto:sandra.garcia.garrido.ext@juntadeandalucia.es)

Dirección Postal: Ctra. Cartaya-Punta Umbría, s/n. 21459 Cartaya, Huelva.

Apellidos: GARRIDO LORENZO

Nombre: Diego

Organismo: IFAPA

Centro: Agua del Pino

Departamento: Producción

Equipo:

Teléfono: 959 02 49 00

Fax.: 959 02 48 29

Correo electrónico: [diegogarridolorenzo@gmail.com](mailto:diegogarridolorenzo@gmail.com)

Dirección Postal: Ctra. Cartaya-Punta Umbría, s/n. 21459 Cartaya, Huelva.

## 2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

### 2.1. OBJETIVOS INICIALES

- 2.1.1. Valoración del estado de población de centolla mediterránea *Maja squinado* y obtención de reproductores.
- 2.1.2. Efecto de la cautividad en el mantenimiento de reproductores.
- 2.1.3. Optimización de la cría larvaria y estudio de su fisiología.
- 2.1.4. Bioenergética.
- 2.1.5. Descripción del sistema reproductor masculino.
- 2.1.6. Ontogenia del sistema reproductor.
- 2.1.7. Valoración del efecto de los factores ambientales en la calidad de las larvas recién eclosionadas.
- 2.1.8. Producción de juveniles.
- 2.1.9. Repoblación.

### 2.2. OBJETIVOS REALIZADOS

Todos los objetivos se han llevado a cabo. En el 2009 y 2010 el último objetivo se realizó con los fondos del proyecto JACUMAR repoblación y la financiación obtenida en el 2009 para el proyecto centolla se utilizó para optimizar el cultivo de juveniles; en 2010 el proyecto centolla no recibió financiación.

### 2.3. METODOLOGÍA

La metodología utilizada en este proyecto ha sido muy variada y depende de las distintas actividades realizadas. Para facilitar la interpretación de los resultados se ha decidido incluir un pequeño apartado de material y métodos en el punto 2.4.

- 2.3.1. Elaboración y distribución de paneles y etiquetas.
- 2.3.2. Métodos bioquímicos e inmunológicos estándar.
  - Porcentaje de humedad.
  - Contenido en cenizas.
  - Análisis elementales.
  - Análisis proximales.
  - Clases lipídicas
  - Análisis parámetros fisiológicos.
  - Análisis enzimas digestivas. Espectrofotometría y fluorimetría.
  - Análisis parámetros fisiológicos.
  - Análisis enzimas digestivas. Espectrofotometría y fluorimetría.
- 2.3.3. Técnicas de biología molecular: electroforesis, PCR, secuenciación y blast-análisis.
- 2.3.4. Zootecnia.
- 2.3.5. Consumo de oxígeno y excreción amoniacal.
- 2.3.6. Microscopía óptica y electrónica (transmisión y barrido).
- 2.3.7. Uso de marcas telemétricas.

## 2.4. RESULTADOS

### Línea 1: Población de centolla (*Maja sp.*).

**Actividad 1.1:** Valoración del estado de población mediterránea de *Maja squinado*. Para evaluar la población de *Maja squinado* en las CCAA de Cataluña y Baleares, se diseñó una campaña publicitaria con el objetivo principal de llamar la atención de pescadores profesionales y buceadores deportivos de las CCAA de Cataluña y Baleares para que informen de posibles avistamientos de ejemplares de *Maja squinado* en aguas en el Mediterráneo. Esta campaña consistió por un lado en el diseño de posters y dípticos informativos del proyecto que se colocaron en cofradías, mercados y clubes de buceo, por otro la realización de charlas informativas directamente a los pescadores profesionales donde se les explica la importancia su colaboración.



Se obtuvieron 28 ejemplares en 2006-2008 gracias a los pescadores de arrastre y de trasmallo y a buceadores deportivos. Estos datos confirman que la especie *Maja squinado* está prácticamente en extinción, tanto en Baleares como en Cataluña.

**Actividad 1.2.:** Obtención de reproductores de centolla Mediterránea (*Maja squinado*).

Se procedió a realizar las gestiones oportunas para la obtención de reproductores mediterráneos de *Maja squinado*. A parte de los ejemplares obtenidos en Baleares y Cataluña, de los que se obtuvieron puestas y se realizó el cultivo larvario y post-larvario, se capturaron reproductores salvajes en Cádiz (Conil de la Frontera), Ceuta, la costa del Adriático (Ancona) y Córcega. Se descartaron los

ejemplares capturados en las costas de Cádiz y Ceuta ya que se demostró por medio de estudios morfológicos y moleculares que pertenecían a la especie *Maja brachydactyla*.



*Maja brachydactyla* (Ceuta)



*Maja squinado* (Catalunya)

Identificación morfológica: La forma y orientación de la espina antorbital difiere en las dos especies (se aprecia claramente en visión frontal). En consecuencia, la relación entre la CL y la distancia máxima entre las dos espinas (e) es claramente diferente en las dos especies (Fig. 1).

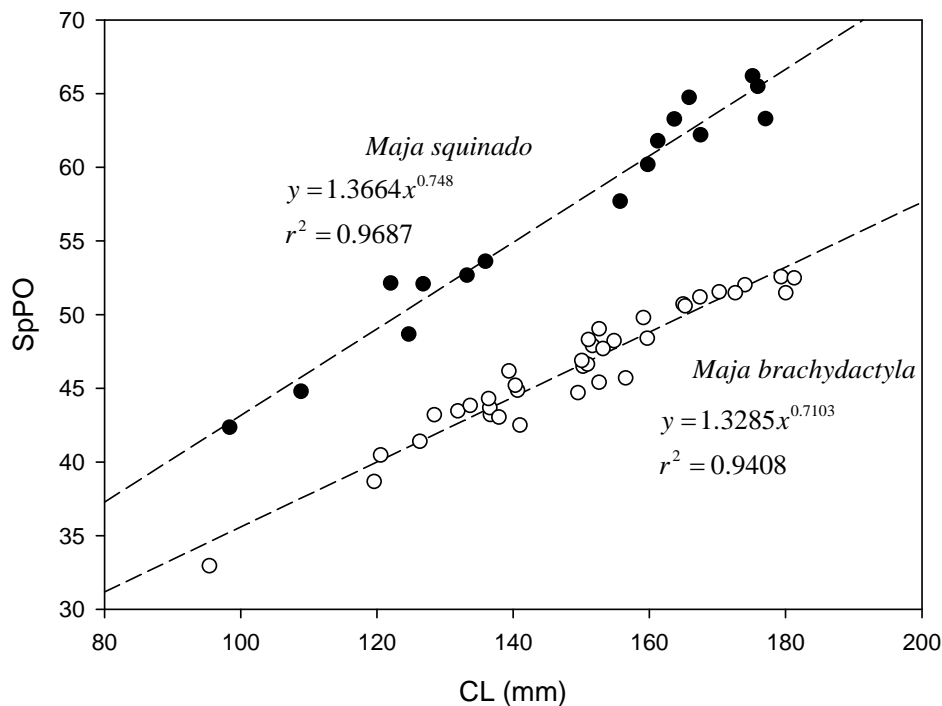


Figura 1. Relación entre la CL y la distancia máxima entre las espinas preoculares (e) en *Maja brachydactyla* y *M. squinado*.



Identificación molecular: Algunas regiones del gen mitocondrial COI parecen ser características a nivel específico; por lo tanto *M. brachydactyla* y *M. squinado* pueden ser identificadas mediante la utilización de enzimas de restricción (Ase I y Spe I) como se puede ver en la Fig. 2.

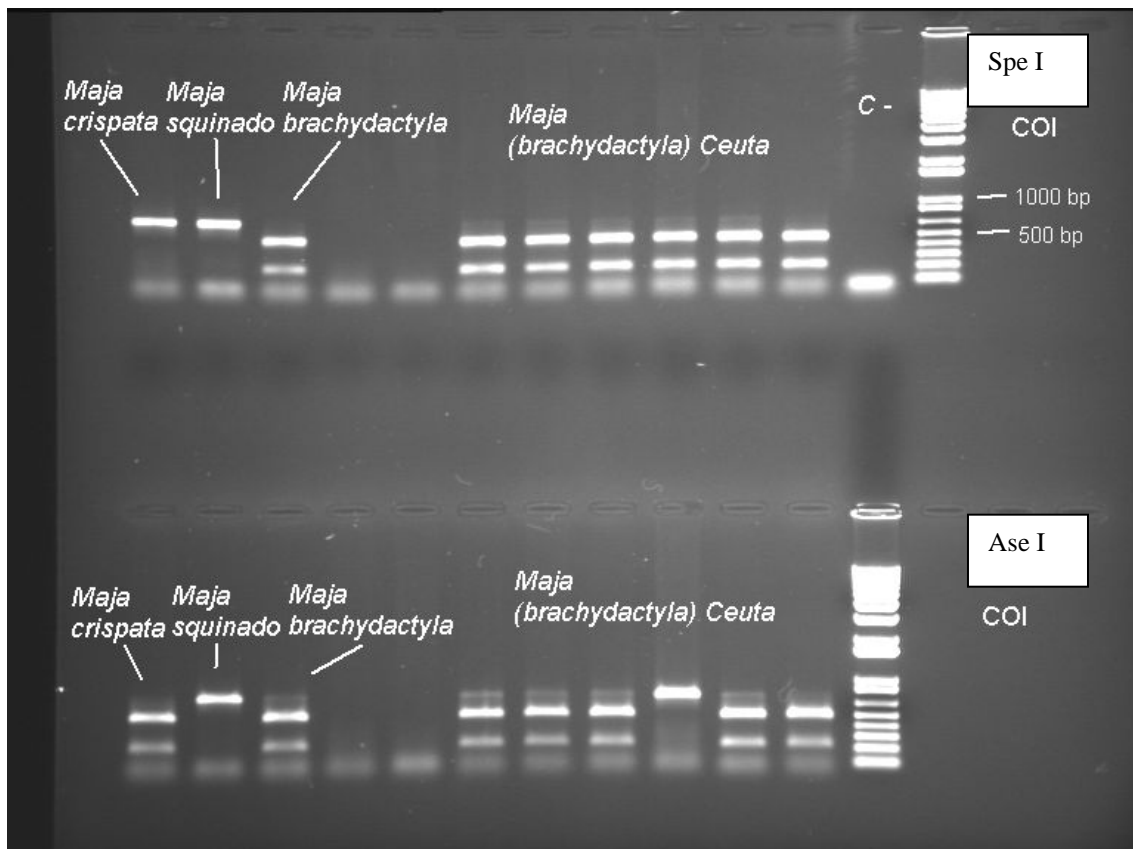


Figura 2. Gen COI tratado con el enzima de restricción Ase I y Spe I. El enzima Spe I corta el ADN en la región ACTAGT y proporciona mejores resultados que el Ase I para identificar *M. brachydactyla* y *M. squinado*.

Los investigadores de Baleares transportaron centollas de Córcega mediante un camión frigorífico (Fig. 3 y 4), cuyo equipamiento consistía en:

- Dos tanques, de 600 y 500 L de capacidad cada uno.
- Botella de oxígeno y oxímetro.
- Ampollas de neutralización de amonio, medidor de amonio.
- Termómetro, medidor de pH.
- Filtros biológicos.
- Bomba de agua.
- Transformadores, compresores.
- Bomba de aire.

Los reproductores de centolla (32 machos y 28 hembras; peso: 700-2000 g; longitud cefalotórax: 15-21 mm) se mantuvieron en los tanques del camión con agua a Tª ambiente de 18° C, 7.6 ppm O<sub>2</sub> y prácticamente un valor nulo de amoníaco.



Fig. 3: camión frigorífico



Fig. 4: ejemplares hembra en el tanque

## Línea 2: Fisiología.

Para determinar si el stock de reproductores se mantenía en buenas condiciones se valoraron los niveles de distintos metabolitos en la hemolinfa (colesterol, glucosa, vitamina C, lactatos y proteínas) y los niveles de distintos enzimas digestivos (tripsina, amilasa y lipasa), así como la concentración de bacterias del género *Vibrio* en la hemolinfa.

Actividad 2.1: Valoración de los parámetros fisiológicos e inmunológicos en *Maja brachydactyla*.

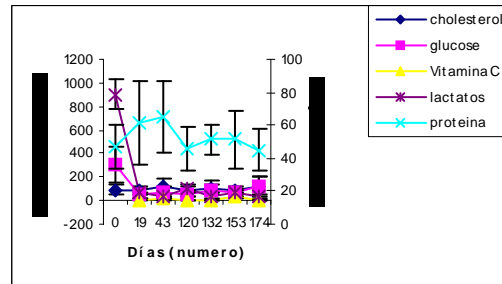
### **Valoración de distintos metabolitos y bacterias en la hemolinfa de *M. brachydactyla***

Los centollos capturados en Galicia se transportaron al Centro de Acuicultura del IRTA y se identificaron con códigos de color en el 6º pereiópodo izquierdo. Se seleccionaron solamente hembras adultas y maduras con un peso húmedo promedio de 1122 ± 195 g y una longitud de caparazón de 159 ± 10 mm, que se mantuvieron en un tanque 1500 L en circuito semi-abierto a 18±1 °C, 36±1 ppt, fotoperiodo natural y aireación a saturación y alimentadas diariamente con mejillón fresco o cangrejo congelado.

Cada tres semanas se muestrearon todos los centollos. Para cada organismo y en cada muestreo se tomaron: a) 200 µL de hemolinfa directamente a una jeringa de 1mL de los cuales se utilizaron 100 µL para inocular una placa de Petri con agar TCBS, selectivo para vibrios que se incubó a 28°C, 24 h para contar las colonias formadas (sacarolíticas-amarillas y non sacarolíticas-verdes) y b) una muestra de 2 mL a una jeringa de 5 mL (previamente lavada con EDTA 10 mM). Estas últimas se utilizaron en los análisis bioquímicos.

Para glucosa y colesterol se utilizaron los kits de Termotrace®. El cálculo de la concentración final se hizo a través de la elaboración de una curva patrón. Para proteína se utilizó la prueba de Bradford (Pascual et al., 2003). La medición de lactatos se hizo con el kit de Biotécnica®. La valoración se realizó con un patrón de lactato a 493 µg ml<sup>-1</sup>. La vitamina C se midió con un kit de Biotécnica®.

El análisis de ANOVA de los niveles de colesterol y proteína medidos al momento de la captura no difieren significativamente a lo largo del tiempo. Sin embargo los niveles de glucosa y lactatos fueron significativamente mayores al momento de la captura con relación a los siguientes muestreos en cautividad. Sugerimos que la captura y el transporte son los responsables de este incremento durante el primer muestreo ya que en situaciones de estrés la glucosa y el lactato se utilizan como fuente de energía en otras especies de crustáceos (Racotta & Palacios, 1998).



El número de centollos en los que se detectó la presencia de vibrios potenciales (fotos 1 y 2) en la hemolinfa aumentó al lo largo del tiempo; en noviembre, diciembre y enero sólo se detectaron estas bacterias en 3 organismos, sin embargo, a partir de marzo se detectaron vibrios en 5 de individuos. Es posible que este aumento sea debido al aumento de la temperatura del agua exterior que conlleva a una mayor disponibilidad de materia orgánica. La presencia de vibrios es frecuente en crustáceos dado que su sistema circulatorio es semi-abierto (Welsh and Sizemore, 1985). Los resultados de este seguimiento indican que las hembras adultas de *M. brachydactyla* se pueden mantener bajo condiciones de cultivo sin un detrimento aparente pese al ligero aumento en la presencia de vibrios.

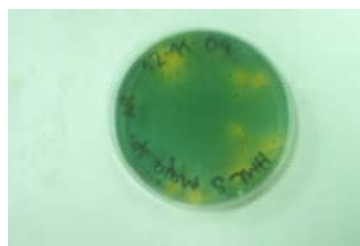


Foto 1: Muestra noviembre



Foto 2: Muestra agosto

### Identificación de los vibrios aislados de la hemolinfa de *M. brachydactyla*

Se muestrearon tres grupos de centollas para conocer las bacterias del género *Vibrio* asociadas a esta especie. El primer lote constó de 9 hembras procedentes de Galicia y mantenidas en el vivarium del IRTA durante un año (ver informe 2006), el segundo lote constó de 6 machos y 6 hembras colectados en Galicia, enviados al IRTA y muestreados a su llegada, y el último lote constó de 6 machos y 6 hembras recolectados en Canarias, donde extrajo una muestra de hemolinfa por individuo, se sembró ésta en agar TCBS y las placas fueron enviadas al IRTA por Ión Lauricica del ICCM.



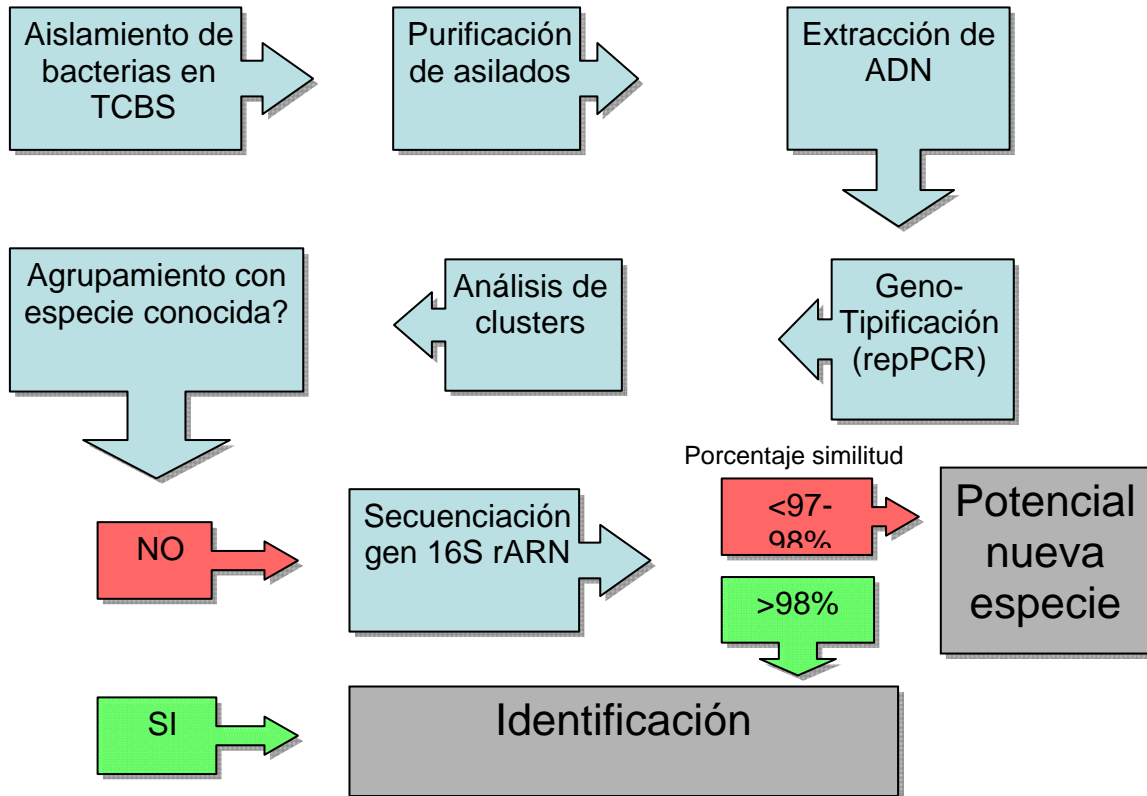
De cada placa se seleccionaron 10 colonias al azar, las cuales se purificaron en TSA + 2% NaCl y luego fueron criopreservadas a -70°C hasta su análisis. Se extrajo ADN de los aislados ajustándose a una concentración de 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . La tipificación de los aislados se realizó mediante rep-PCR usando el oligonucleótido GTG<sub>5</sub>. Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa, usando como controles las cepas tipo CAIM 320<sup>T</sup> y CAIM 513<sup>T</sup> en cada electroforesis. El análisis de los patrones de bandas se realizó mediante el programa GelCompar II ver. 4.5.

En total se obtuvieron 285 aislados de los cuales se pudieron recuperar para análisis 194 (68%). De estas últimas, 63% formaron colonias amarillas en TCBS. Para las bacterias aisladas del lote del IRTA y de Galicia se tipificaron 112 aislados, de éstos, 99 son cepas y 13 son clones. Actualmente están identificadas 54% de las cepas que pertenecen a 11 especies de *Vibrio* y una de *Photobacterium* (anteriormente *Vibrio*).

No identificadas	63	IRTA, Galicia y Canarias
<i>Vibrio alginolyticus</i>	4	IRTA, Galicia
<i>Vibrio campbellii</i>	1	Galicia
<i>Vibrio chagasii</i>	15	IRTA, Galicia y Canarias
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	39	IRTA y Galicia
<i>Vibrio harveyi</i>	1	IRTA
<i>Vibrio kanaloae</i>	2	Galicia
<i>Vibrio lentus</i>	2	Galicia
<i>Vibrio mediterranei</i>	2	IRTA y Galicia
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	Galicia
<i>Vibrio rotiferianus</i>	10	Galicia y Canarias
<i>Vibrio</i> sp. nov.4	1	Galicia
<i>Photobacterium</i> sp. nov. 1	3	Canarias
Total	194	

De las 11 especies identificadas, los aislados de 5 eran procedentes exclusivamente de hembras, los aislados de 1 especie sólo de macho y las otras 5 especies provenían de machos y hembras.

# Metodología



Se muestrearon tres grupos de centollas para conocer las bacterias del género *Vibrio* asociadas a esta especie. El primer lote constó de nueve hembras mantenidas en el IRTA por mas de un año, el segundo lote constó de 6 machos y 6 hembras colectados en Galicia y enviados al IRTA y el ultimo lote constó de 6 machos y 6 hembras colectados en Canarias por los investigadores del proyecto, donde ellos tomaron la muestra de hemolinfa, la sembraron en agar TCBS y las placas fueron enviadas al IRTA (ver informe 2007). Todos los aislados fueron analizados por repPCR con el primer (GTG)<sub>5</sub> para tipificarlos.

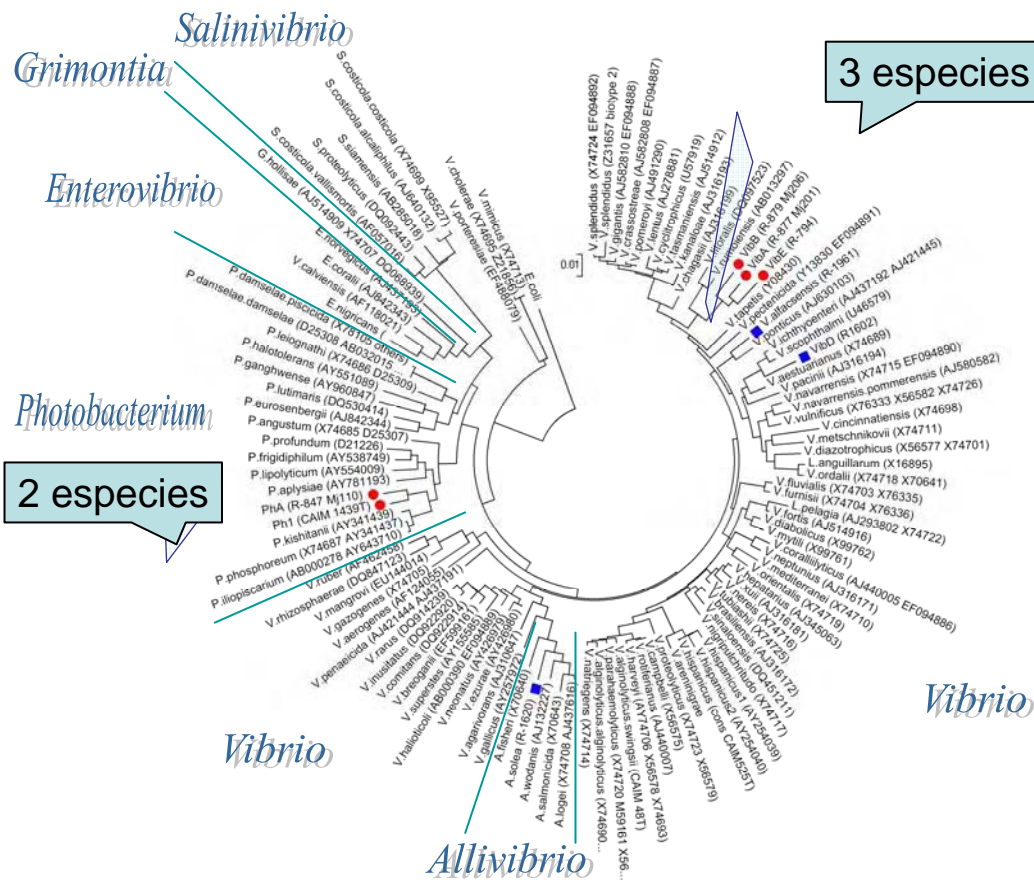
Durante el presente año, de todos los aislados (n=277) que no pudieron identificados a una especie determinada fueron parcialmente secuenciados con la repPCR (n=52).

Inicialmente se secuenció el primer tercio del gen 16S rDNA utilizando primers universales para amplificar dicho fragmento; el amplicon se purificó con el kit Promega PCR preps y se envió a secuenciar. Debido a que la calidad de las secuencias era muy buena, se decidió a posteriori, llevar a cabo la secuenciación total del gen 16S rDNA. Para esto se utilizaron primers universales y una vez amplificado y purificado el amplicon se secuenció.

Las secuencias fueron analizadas, se realizó un BLAST análisis, se alinearon las secuencias y se hizo un dendograma. Con esta metodología se identificaron 18 aislados.

Si la similitud aun seguía siendo baja, se asume que probablemente se trate de una nueva especie. Para poder confirmar esta hipótesis, se están actualmente llevando a cabo hibridaciones ADN-ADN a cinco potenciales nuevas especies.

Para las hibridaciones, se lleva a cabo una extracción del ADN bacteriano por fenol cloroformo a partir de 10 mL de cultivo. Se verifica la calidad y la cantidad del ADN obtenido y se procede a la hibridación por el método de PCR cuantitativa.

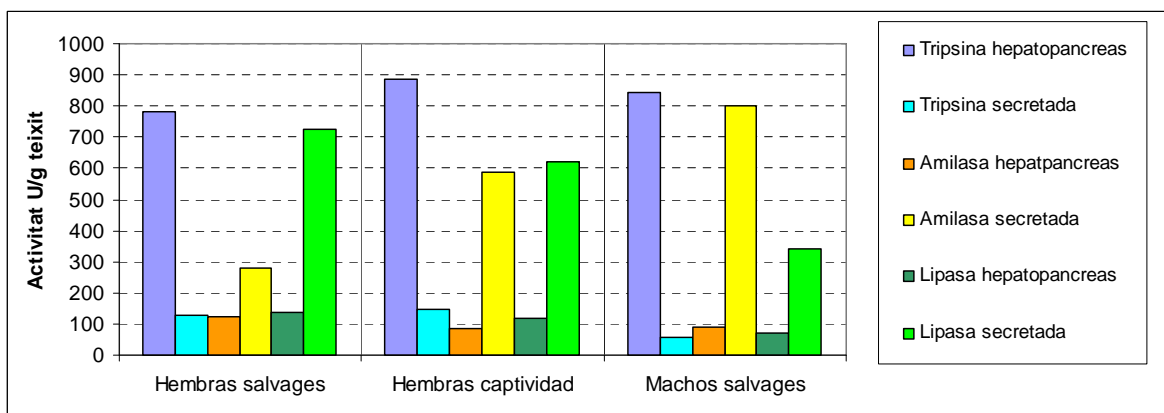


### Actividad 2.2: Determinación de los enzimas digestivos de la centolla.

Se valoró los niveles de enzimas digestivos en larvas y adultos de centolla por espectrofotometría y fluorimetría.

## Valoración de los niveles de enzimas digestivos en adultos mantenidos en cautividad vs salvajes

Con el fin de evaluar el estado fisiológico de los ejemplares adultos de centolla y ver si existe algún efecto de la alimentación que se les proporciona en cautividad, se ha procedido a estudiar el perfil de enzimas digestivos pancreáticos (tripsina, amilasa y lipasa) en ejemplares salvajes y en otros con más de un año de cautividad. Sólo se procedió a comparar hembras salvajes y estabuladas y machos salvajes, al no disponer de machos mantenidos en cautividad. Así, se ha procedido a cuantificar los niveles de los anteriores enzimas en el hepatopáncreas (enzima sintetizada) y la región intestinal (enzima secretado), estando los resultados presentados en la siguiente figura.



Los análisis realizados muestran como los protocolos de alimentación en cautiverio llevados a cabo en el IRTA basados en mejillón, calamar y cangrejo congelado no parecen afectar de forma negativa a la estabulación de los animales salvajes (comparación de perfiles enzimáticos entre animales salvajes y estabulados). Las diferencias encontradas entre las actividades de la tripsina y lipasa en machos y hembras salvajes parecen indicar una dieta más pobre en proteínas y lípidos de éstos, mientras que en el caso de las hembras se daría caso contrario. Estas diferencias vendrían dadas por la diferente estrategia reproductora llevada a cabo por cada sexo, así las hembras presentarían niveles mayores de tripsina y lipasa al tener una dieta mucho más rica en proteínas y lípidos que los machos, al ser estos dos nutrientes muy importantes para la formación del huevo y la acumulación de reservas endógenas para la reproducción, mientras que en el caso de los machos éstos presentarían una dieta más omnívora con un menor grado de proteínas y lípidos en la dieta, y un mayor grado de carbohidratos derivados de restos vegetales (amilasa).

## Valoración del uso de la fluorimetría para el estudio de enzimas digestivos en las larvas de crustáceos.

Para medir la actividad de las enzimas digestivas tanto la espectrofotometría (SP) como la fluorimetría (FL) son técnicas idóneas para el estudio de la fisiología digestiva larvaria y la evaluación de su condición nutricional. La valoración de ambas técnicas se encuentra resumida en la tabla que se presenta a continuación.

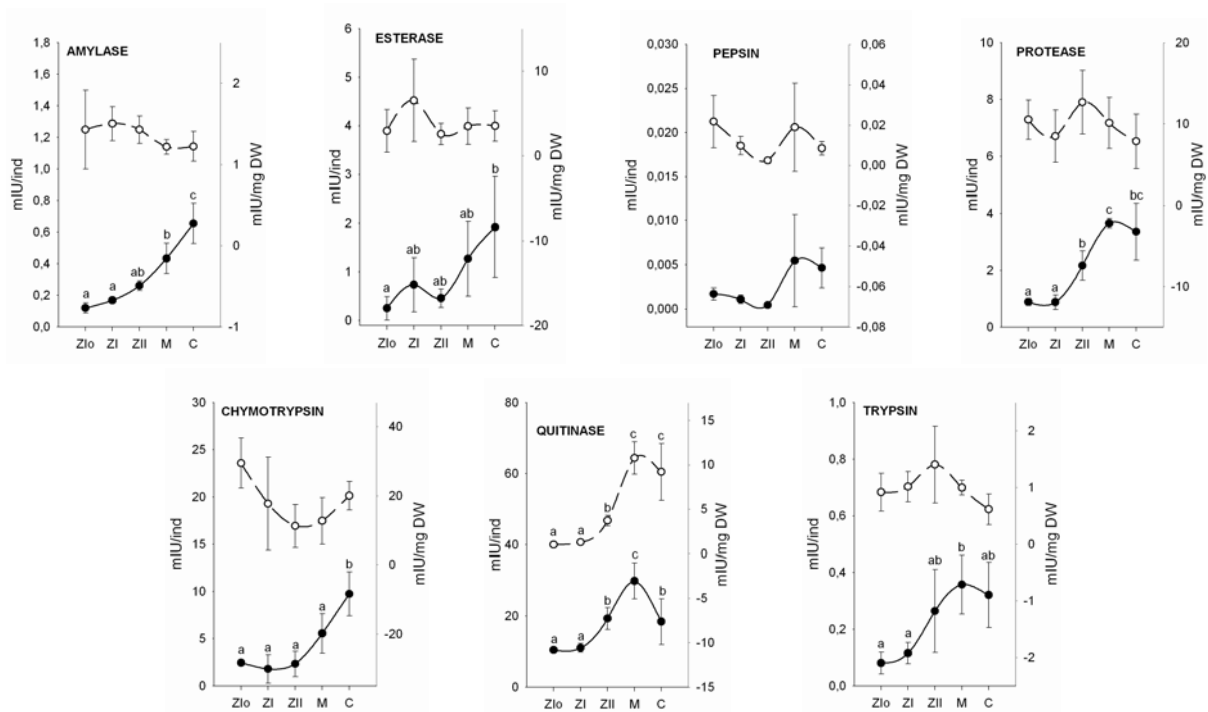
	SP	FL
Sensibilidad	1	3
Resolución	2	3
Interfase	2	1
Repetitividad	2	2
Factibilidad	2	3
Estandarización	3	1
Coste	1	3

Dependiendo del interés del estudio y del diseño experimental un método será más apropiado que otro. Para estudios basados en la caracterización de actividades enzimáticas en poblaciones de crustáceos sin límite de muestra, se recomienda usar técnicas de SP ya que éstas son menos laboriosas y menos caras. Cuando el diseño experimental requiere un número elevado de tratamientos como distintos parámetros zootécnicos (temperatura, salinidad, concentración de oxígeno, color de los tanques, densidad larva/presa, etc.), regímenes alimentarios, y/o estadios de muda considerados, los análisis por FL son más apropiados debido al bajo número de individuos necesarios para muestrear, reduciendo considerablemente la infraestructura experimental. Si se quiere estudiar la variabilidad individual de la población, entonces el método FL es imprescindible. La gran ventaja de la SP es que permite buenas comparaciones entre estudios, mientras que los resultados por FL varían mucho según los equipos utilizados. Para más detalles ver Rotllant et al. (2008).

### **Ontogenia de enzimas digestivos**

Varias puestas producidas entre Noviembre de 2006 y Julio de 2007 fueron cultivadas en el IRTA bajo condiciones de cultivo intensivo estándar a escala piloto, en tanques de 500 L a densidades aproximadas de 60 larvas/L con el objetivo de obtener grandes cantidades de muestras de todos los estadios larvarios y juveniles para los análisis enzimáticos. Las muestras de los distintos estadios larvarios se conservaron congeladas (-80°C) hasta el análisis enzimático fue realizado.

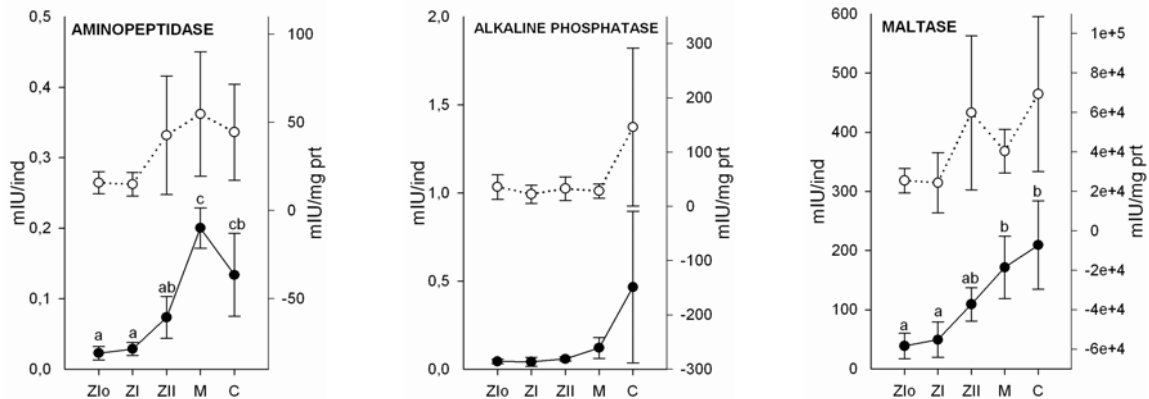
A continuación se muestran los resultados de la variación de la actividad en los enzimas digestivos analizados por espectrofotometría (amilasa, esterasa, pepsina, proteasas totales, quimotripsina y tripsina) y fluorimetría (quitinasa). Entre los enzimas analizados en hepatopancreas y estómago (Fig 1), se detectó una variación significativa en la actividad absoluta medida por individuo, de manera que, en general, la actividad enzimática digestiva aumenta conforme avanza la ontogenia larvaria. Sin embargo, la metamorfosis a primer juvenil implica una disminución de ciertas actividades enzimáticas, como las proteasas totales y tripsinas y también las quitinasas. Cuando las actividades se expresan de forma relativa (respecto al peso seco del individuo), estas diferencias dejan de ser significativas excepto para la quitinasa, en la que se mantienen las diferencias observadas a nivel individuo.



**Fig. 1.** Variación en la actividad de los enzimas digestivos procedentes de extractos de hepatopancreas y estómago (amilasa, esterasa, pepsina, proteasas totales, quimotripsina, quitinasa y tripsina) a lo largo de la ontogenia larvaria (zoea I recién eclosionada-ZIo; zoea I de 2-3 días-ZI; zoea II de 7-8 días-ZII y megalopa de 12-13 días-M) y primer juvenil (18 días-C) de *M. brachydactyla* (●: actividad absoluta por individuo-mIU/ind-eje Y izquierdo; ○: actividad relativa por peso-mIU/mg DW-eje derecho)



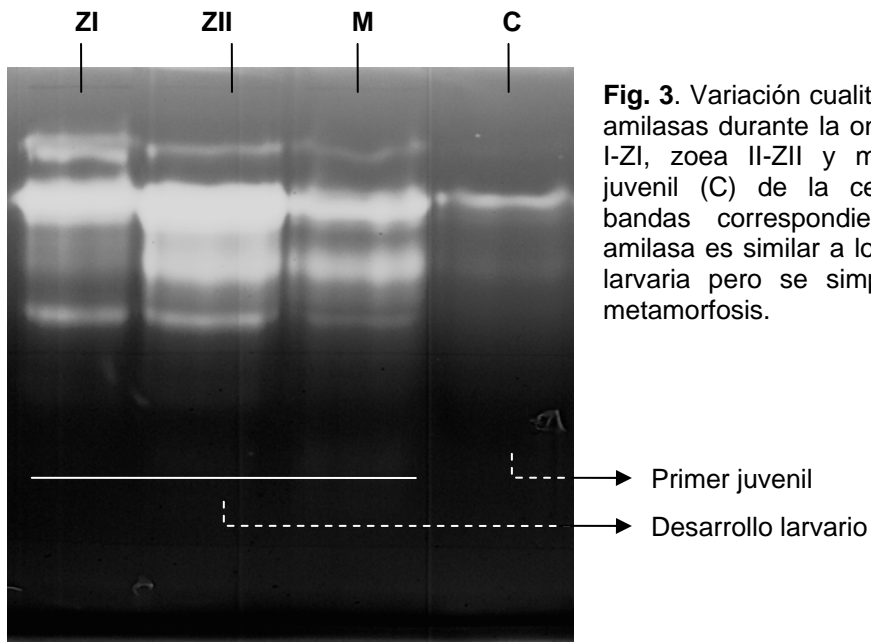
Las actividades enzimáticas detectadas en el intestino también presentaron variaciones significativas a nivel individual durante la ontogenia larvaria, excepto para la fosfatasa alcalina (Fig.2). Así, tanto la actividad aminopeptidasa como la maltasa aumentan su actividad conforme avanza el desarrollo larvario. Después de la metamorfosis, la actividad de ambos enzimas se estanca respecto a la observada en la última fase larvaria (megalopa). La actividad enzimática relativa intestinal, no muestra variaciones significativas durante la ontogenia.



**Fig. 2.** Variación en la actividad de los enzimas digestivos procedentes de extractos intestinales (aminopeptidasa, fosfatasa alcalina y maltasa) a lo largo de la ontogenia larvaria (zoea I recién eclosionada-Zlo; zoea I de 2-3 días-ZI; zoea II de 7-8 días-ZII y megalopa de 12-13 días-M) y primer juvenil (18 días-C) de *M. brachydactyla* (•: actividad absoluta por individuo-mIU/ind-eje Y izquierdo; ○: actividad relativa por peso-mIU/mg de proteína-eje Y derecho)

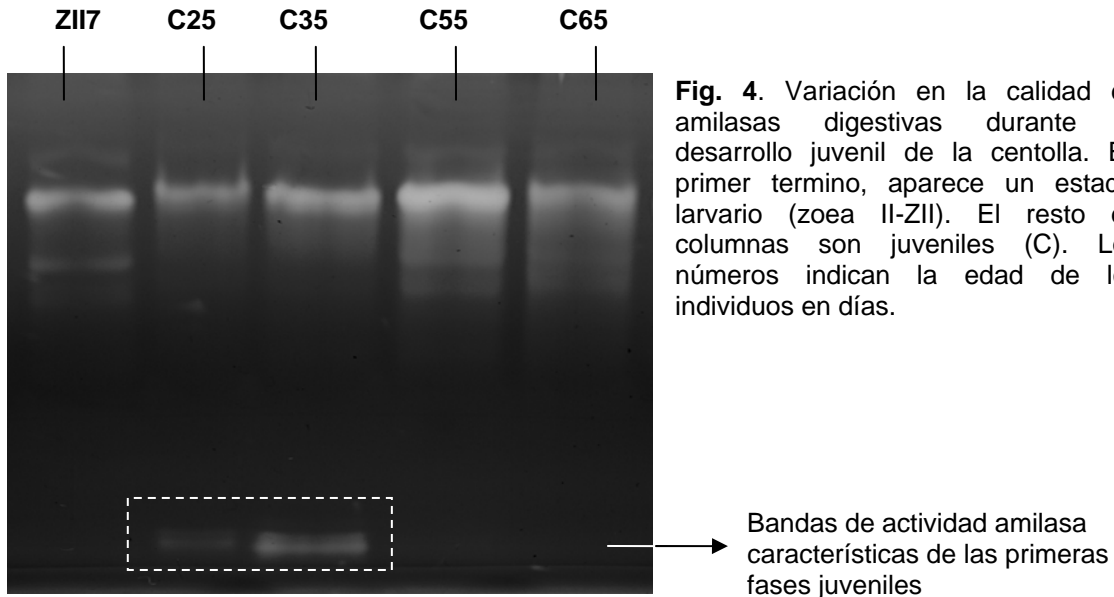
Como complemento a los datos cuantitativos de actividades enzimáticas se realizó, durante 2008, la puesta a punto para la detección cualitativa de actividad amilasa y proteasas totales en larvas, juveniles y adultos de *M. brachydactyla* mediante técnicas electroforéticas (zimogramas SDS-PAGE). Para la detección de actividades enzimáticas en los geles se usaron dos técnicas de resolución diferente, la incubación de los geles en sustrato (caseína para proteasas y almidón para amilasas) después de finalizada la electroforesis o bien la inclusión del sustrato en el mismo gel (copolimerización) y la posterior incubación de éste.

La actividad amilasa y proteasas totales se detecta desde la eclosión pero el número de isoformas varía durante la ontogenia. Los resultados de actividad amilasa muestran que las actividades enzimáticas en las fases larvarias son diferentes que en juveniles y adultos a nivel cualitativo (Fig 3).



**Fig. 3.** Variación cualitativa en los perfiles de amilasas durante la ontogenia larvaria (zoea I-ZI, zoea II-ZII y megalopa-M) y primer juvenil (C) de la centolla. El patrón de bandas correspondientes a la actividad amilasa es similar a lo largo de la ontogenia larvaria pero se simplifica después de la metamorfosis.

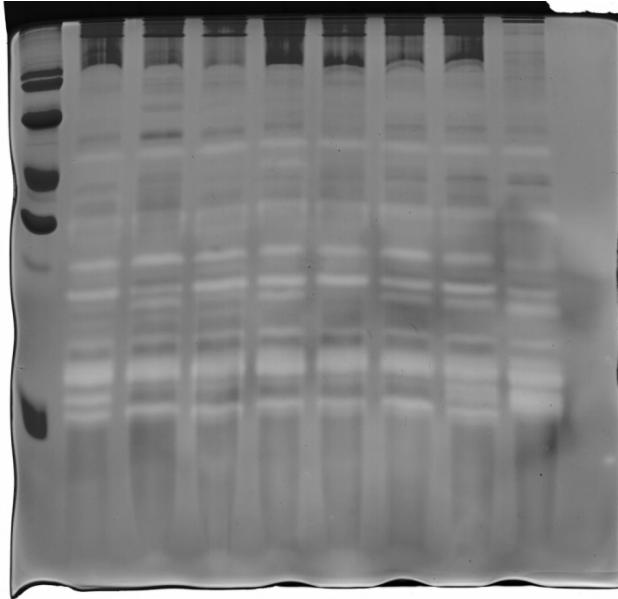
Tras la metamorfosis, las primeras fases de cangrejo muestran un perfil de isoformas de amilasas muy característico, sencillo y de actividad débil comparada con larvas y juveniles posteriores (Fig 4). A partir del día 55 de cultivo, la actividad amilasa, ya refleja los perfiles observados en adultos.



**Fig. 4.** Variación en la calidad de amilasas digestivas durante el desarrollo juvenil de la centolla. En primer termino, aparece un estadio larvario (zoea II-ZII). El resto de columnas son juveniles (C). Los números indican la edad de los individuos en días.



Los zimogramas preliminares de actividad proteasa demuestran que el número de isoformas de proteasas totales aumenta durante la ontogenia, apareciendo primero las de mayor peso molecular. Las proteasas digestivas son mayoritariamente serín proteasas. De ellas, mayoritariamente tripsina. No se ha identificado quimotripsina, hasta la fecha. En cangrejos de más de 100 días desde la eclosión aparecen dos fenotipos distintos que se mantienen en el adulto (Fig. 5).

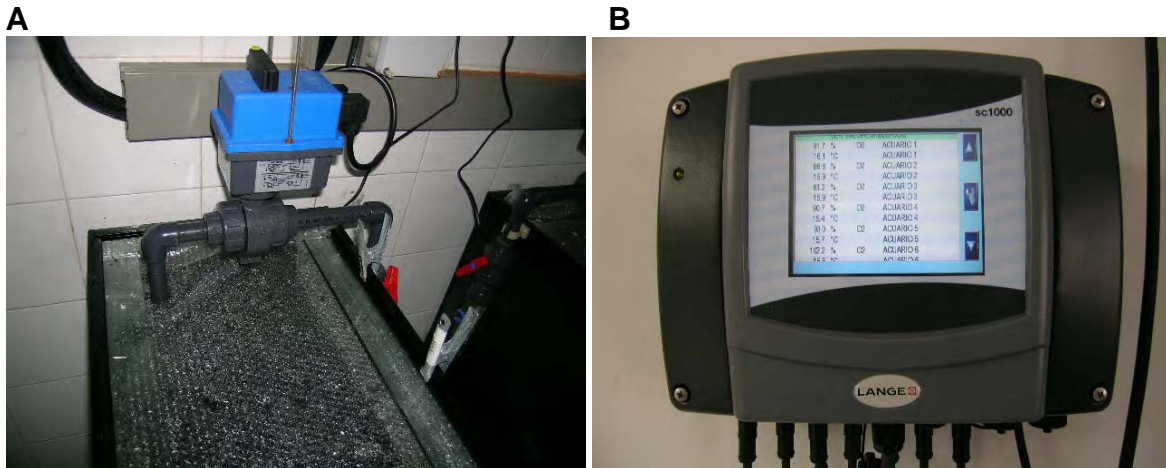


**Fig. 5.** Variación en la calidad de proteasas totales digestivas en el jugo gástrico centollas adultas. Las bandas 1, 7 y 8 muestran un fenotipo, mientras que las bandas 2 a 6 muestran otro fenotipo.

Actividad 2.3.: Bioenergética.

### Instalaciones experimentales del IMIDA

Se adecuaron todos los componentes de los acuarios-respirómetros para llevar a cabo las determinaciones de consumo de oxígeno y producción de amoníaco en la centolla (Fig. 1). En total la instalación consta de 15 acuarios, 9 de 175 L y 6 de 75 L, mantenidos en circuito cerrado con control de la temperatura, filtración mecánica y biológica, y lámpara UV. Cada acuario está dotado de una electroválvula conectada a un reloj programador que regula la entrada de agua a los acuarios. Dentro de cada uno de ellos se ha instalado una sonda de oxígeno y temperatura para medición en continuo (Sensor de oxígeno por luminiscencia LDO, Hach Lange), conectadas a su vez a un monitor de registro de datos (Display de controlador SC1000, Hach Lange).



**Figuras 1 (A-B).** Detalle de las electroválvulas que regulan la entrada de agua a los acuarios (A) y del monitor para registro de la concentración de oxígeno y temperatura (B).

### Determinación y análisis del patrón de consumo de oxígeno.

Se emplearon animales capturados en las Rías Gallegas y transportados por mensajería de transporte en frío hasta la estación de acuicultura del IMIDA. La supervivencia en el transporte fue elevada para los ejemplares menores de 1 kg, en torno al 80-90 %, sin embargo, el 50 % de los ejemplares grandes (> 1,5 Kg) no sobrevivieron, o bien morían uno o dos días después de su estabulación. Antes de comenzar las medidas los animales se sometieron a un periodo de adaptación de dos semanas, suministrando mejillón a una ración aproximada del 2-3 % de su peso. El fotoperiodo fue el natural (37° 50' N, 0° 46' W), la salinidad del 37 ‰ y el nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 80 %.

Durante los años 2007 y 2008 se han llevado a cabo determinaciones del patrón de consumo de oxígeno en 47 ejemplares de *Maja brachydactyla* en distintas condiciones experimentales, desarrollándose ecuaciones para explicar el consumo de oxígeno de esta especie en función del peso (P: 15-1414 g), la temperatura (T: 13,5-27,9°C), el sexo (S) o el ciclo luz-oscuridad, abarcando por lo tanto los rangos de interés para su cultivo. Las medidas se llevaron a cabo en ejemplares individuales durante tres días consecutivos suministrando raciones máximas de alimentación, con el fin de simular las condiciones en un cultivo intensivo (Fig. 2).

Entre los meses de febrero y julio de 2008 se analizó la respuesta del consumo de oxígeno a la hipoxia progresiva en 18 ejemplares en distintas condiciones de peso (0,42-1,62 Kg) y temperatura (17,8-26,3°C), así como su capacidad de recuperación. Se obtuvieron ecuaciones para explicar las concentraciones crítica y letal de oxígeno en función de la temperatura del agua, permitiendo establecer niveles de oxígeno peligrosos para su supervivencia. Los efectos del peso, la temperatura y la existencia de una deuda de oxígeno como consecuencia de la hipoxia fueron discutidos.

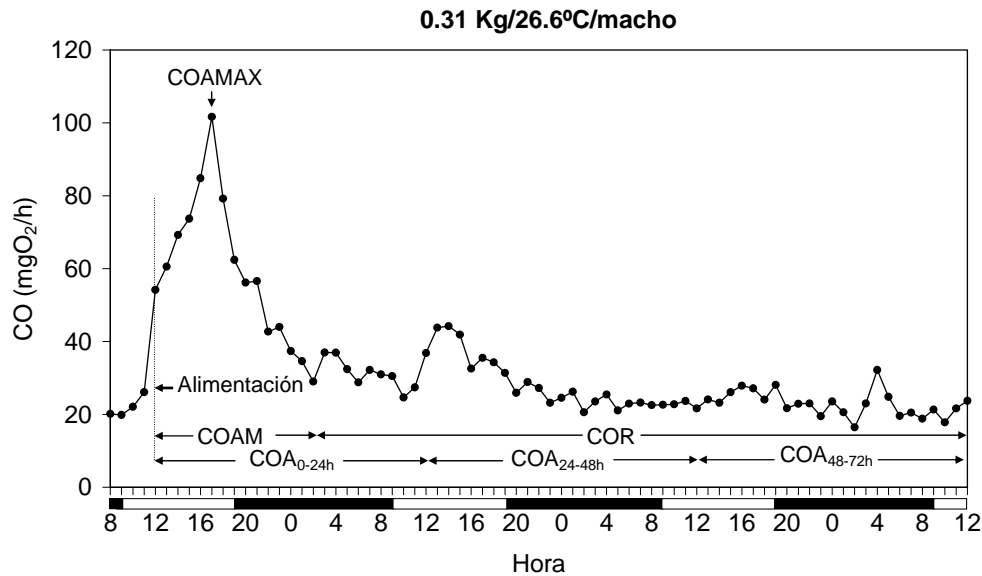
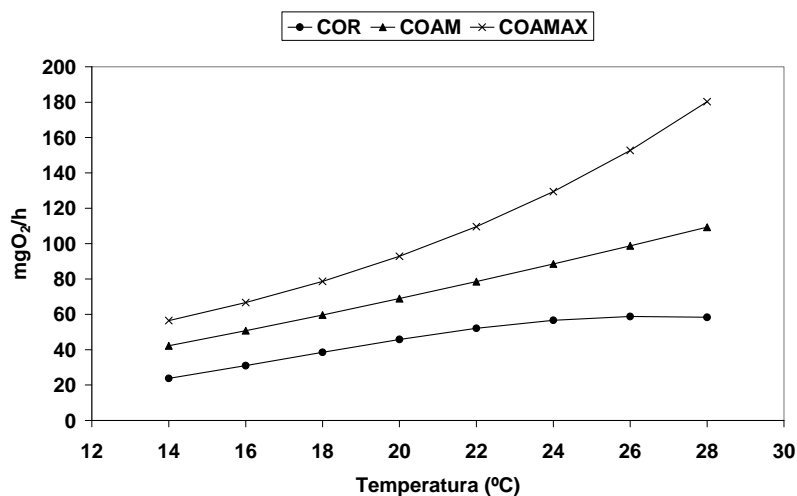


Figura 2. Divisiones llevadas a cabo para la determinación de las diferentes categorías de consumo de oxígeno. Los valores fueron divididos en rutina (COR), postprandial (COAM), pico máximo debido a la alimentación (COAMAX) y promedio diario entre 0 y 24 horas (COA0-24h), 24 y 48 h (COA24-48h) y 48 y 72 h (COA48-72h) después de la alimentación. La barra debajo del eje X representa el fotoperíodo.

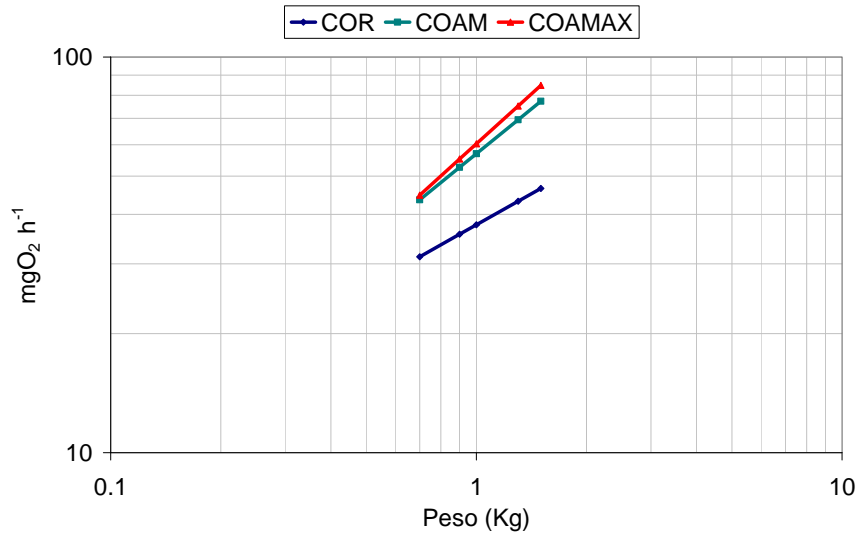
Los resultados obtenidos fueron publicados por Cerezo Valverde et al. (2009) y se resumen a continuación:

-La alimentación con raciones máximas produjo en *M. brachydactyla* un incremento en el consumo de oxígeno de 1,7-7,3 ( $2,90 \pm 1,25$ ) veces el valor de rutina, con picos máximos obtenidos entre 2 y 16 horas ( $7,94 \pm 4,12$  h) y con una duración del efecto de la alimentación de 10-24 h ( $19,8 \pm 3,56$ ).

-Los distintos niveles de consumo de oxígeno dependieron de forma significativa de la temperatura (Fig. 3), el peso (Fig. 4) y el sexo (Fig. 5) de los animales, ajustándose los datos de forma significativa ( $P < 0.001$ ) a los modelos propuestos y explicando un porcentaje de la varianza superior al 92 %.

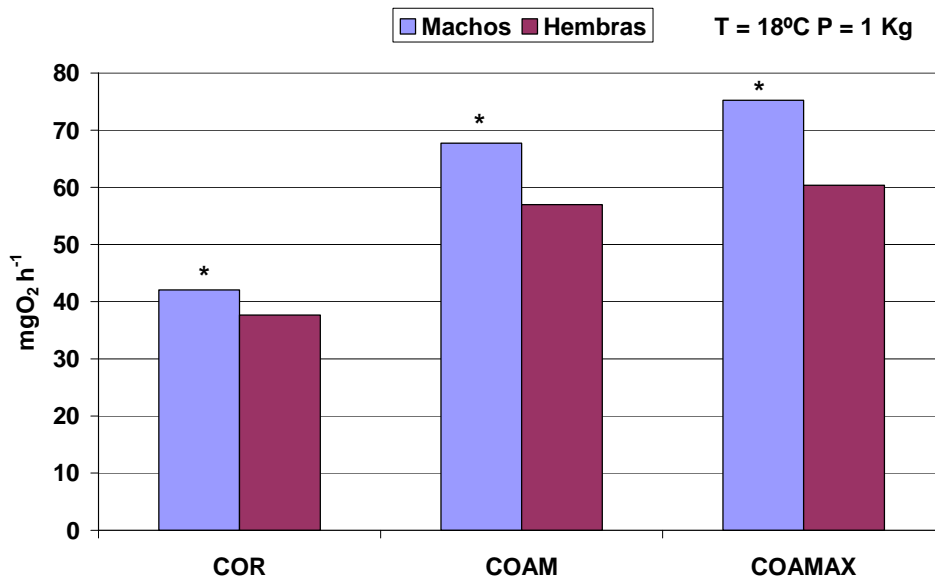


**Figura 3.** Efecto de la temperatura sobre el COR, COAM y COAMAX en hembras de *M. brachydactyla* de 1 Kg de peso.



**Figura 4.** Efecto del peso sobre el COR, COAM y COAMAX en hembras de *Maja brachydactyla* a 18°C de acuerdo con las ecuaciones propuestas. Ejes representados en escala logarítmica.

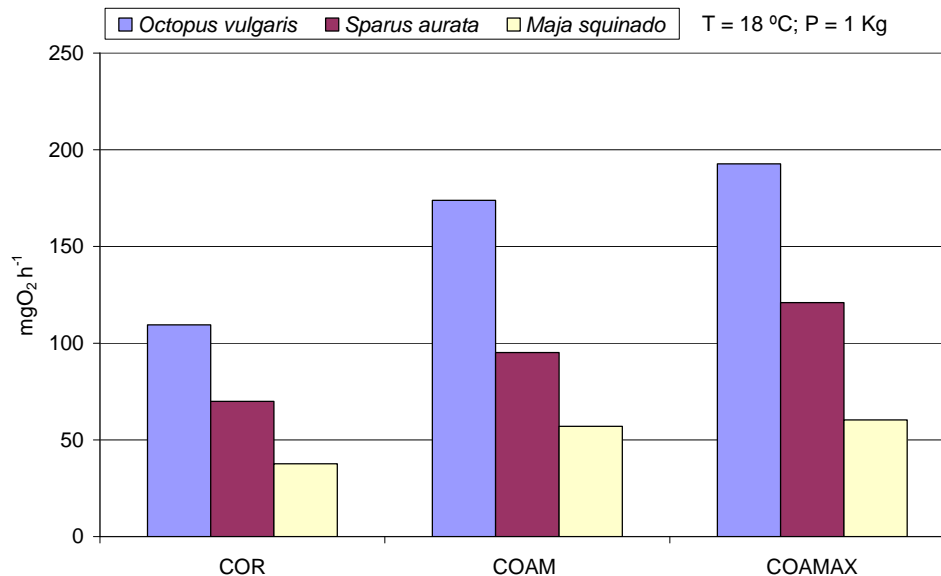
-El sexo afectó significativamente a todos los niveles de consumo de oxígeno, mostrando los machos valores superiores respecto de las hembras en condiciones experimentales similares (Fig. 5).



**Figura 5.** Comparación de los valores estimados de COR, COAM y COAMAX para machos y hembras de *M. brachydactyla* de 1 Kg de peso a 18°C.

-Aunque algunos ejemplares mostraron un mayor consumo de oxígeno durante la noche, en el análisis global de los datos la influencia del ciclo luz-oscuridad no llegó a ser significativa.

-Comparaciones interespecíficas revelan consumos de oxígeno inferiores respecto de otras especies de peces y cefalópodos de interés en acuicultura, y similares en comparación con otros crustáceos en las mismas condiciones experimentales (Fig. 6).



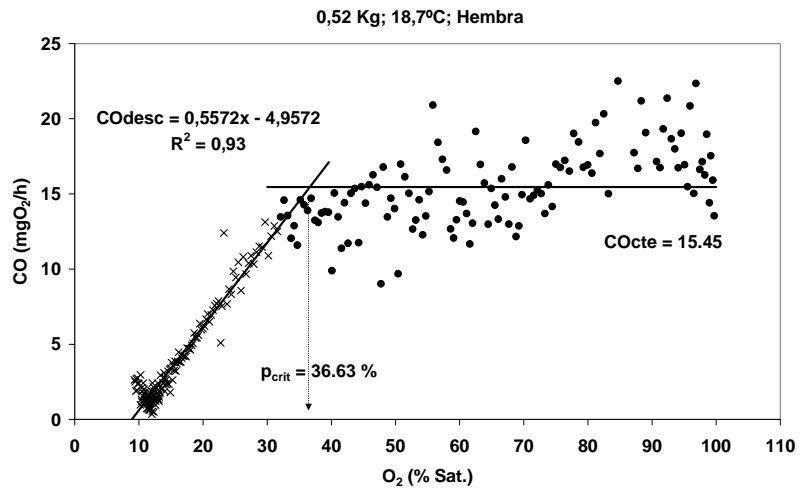
**Figura 6.** Comparación del COR, COAM y COAMAX en diferentes especies de interés para la acuicultura en condiciones experimentales similares.

-*M. brachydactyla* se comportó como un organismo regulador, manteniendo constante su consumo de oxígeno hasta que se alcanzó una concentración crítica de oxígeno ( $P_{crit}$ ).  $P_{crit}$  varió entre el 24,1 y 53,3 % de saturación de oxígeno ( $42,4 \pm 7,4$  % Sat.;  $2,95 \pm 0,43$  mgO<sub>2</sub>/l), dependiendo de forma significativa de la temperatura del agua (Fig. 7).

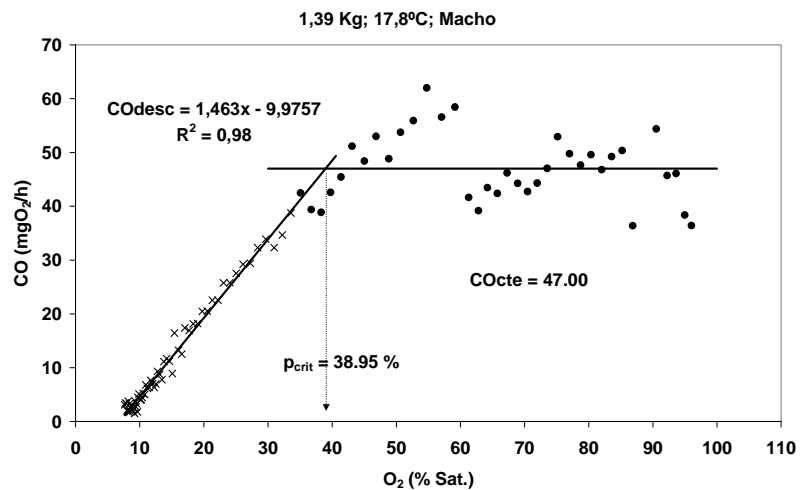
-La concentración letal de oxígeno (LC) varió entre el 4,8 y 20,3 % Sat. ( $12,15 \pm 5,32$  % Sat.;  $0,85 \pm 0,35$  mgO<sub>2</sub>/l), dependiendo significativamente de la temperatura del agua.

-Al restablecer los niveles de oxígeno tras la exposición a una hipoxia aguda, los animales se recuperaron, existiendo un consumo de oxígeno incrementado o deuda de oxígeno respecto del valor de rutina hasta 10 horas después.

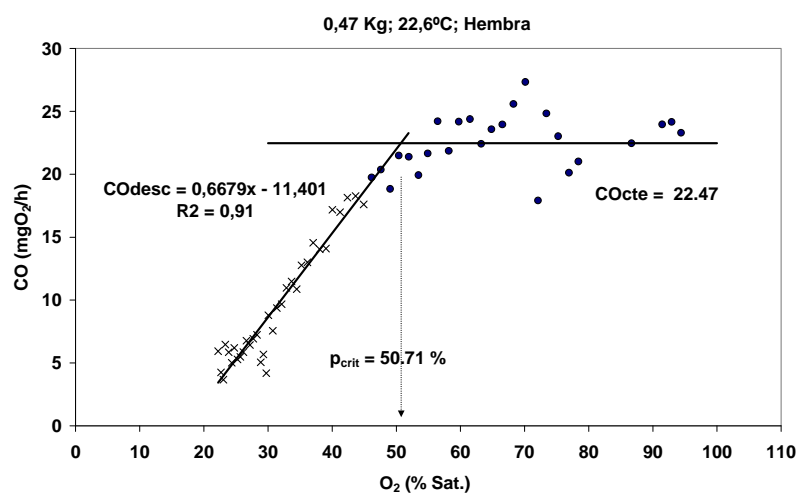
-Se podrían fijar niveles de oxígeno peligrosos para esta especie: por debajo de un 36 % Sat. a 18°C y un 49 % a 26°C la participación del metabolismo anaeróbico sería evidente y los animales sobrevivirían sólo durante un periodo limitado de tiempo. Los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de regular el consumo de oxígeno en *M. brachydactyla* son por lo tanto similares respecto de la mayoría de especies de crustáceos, discutiéndose además los posibles efectos del peso y la temperatura.



A



B



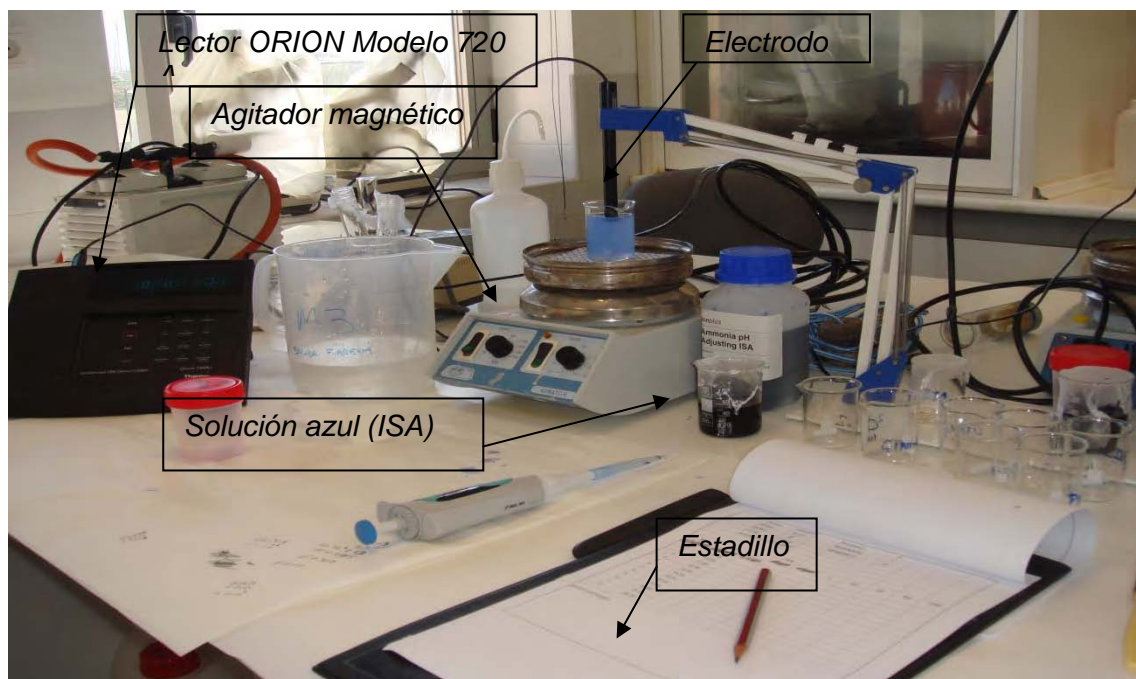
C

**Figura 7 (A-C).** Respuesta del consumo de oxígeno (CO) en función del nivel de saturación de oxígeno en tres ejemplares de *M. brachydactyla*. Se indica el valor de saturación de oxígeno donde se modifica el consumo de oxígeno ( $P_{crit}$ ).



### Producción de amoniaco:

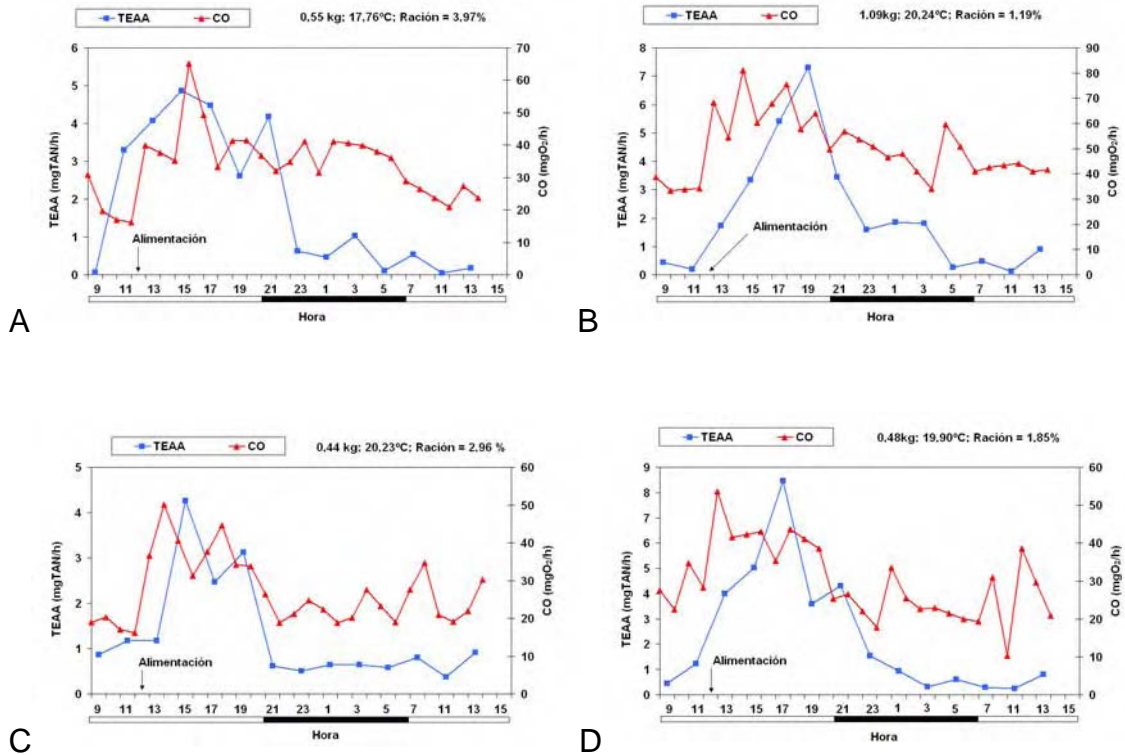
Durante los meses de enero y agosto de 2008 se estudiaron los factores que afectan a la producción de amoniaco en *Maja brachydactyla*, como son el peso (P: 0,1-1,6 kg), temperatura (T: 17-22°C), ingesta de proteína (TAAP: 0-4,1 g/d, a base de mejillón *Mytilus edulis*) y concentración de nitrógeno amoniacal total en el medio (TAN: 0-1,5 mg/L) (Fig. 8). Con este fin, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos: 1) producción de amoniaco en ejemplares aislados (N = 20) en diferentes condiciones de P, T y TAAP durante ciclos de 28 horas; 2) producción de amoniaco a distintas TAN en animales aislados (N = 13) mantenidos en ayunas durante ciclos de 28 horas. En el primer tipo de experimento se calcularon las tasas medias diarias y máximas de excreción amoniacal en términos absolutos (mgTAN/h), y relativas al peso corporal (mgTAN/kg/h), así como la relación O/N, tiempo que tarda en alcanzarse el pico máximo de producción de amoniaco y duración del incremento de producción de amoniaco debido a la alimentación sobre el valor de rutina. En el segundo tipo de experimentos se calculó el punto crítico de excreción de amoniaco o TAN donde se estabiliza la excreción de amoniaco en el centollos.



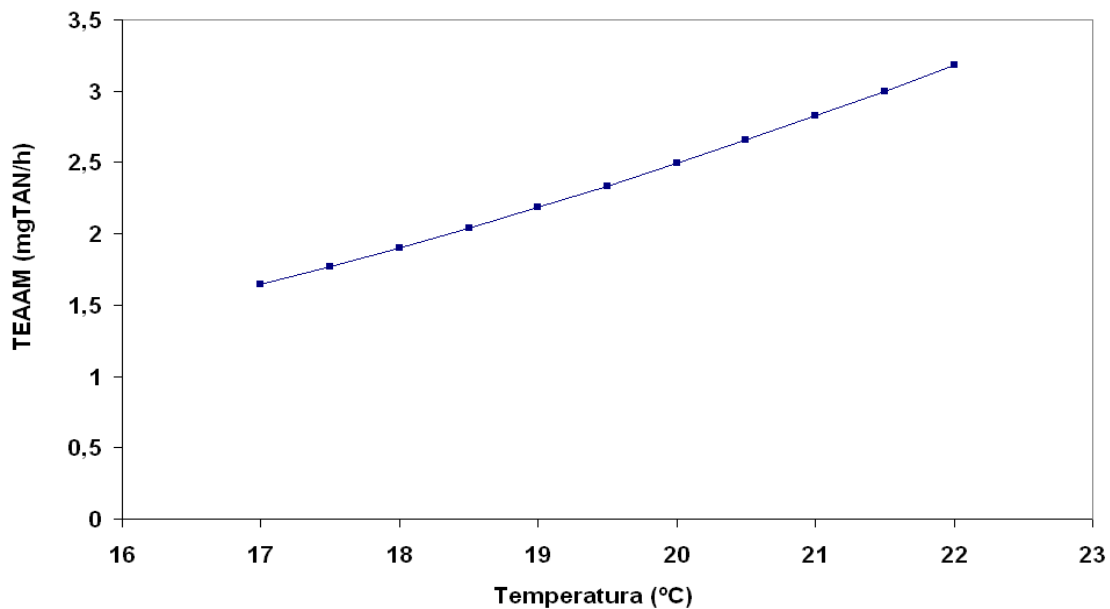
**Figura 8.** Medidas de las muestras de amoniaco disuelto en agua.

Los resultados obtenidos en cuanto a la excreción de amoniaco se detallan a continuación:

-La alimentación provocó un incremento importante en la tasa de excreción amoniacal, con un valor medio de hasta  $4,00 \pm 2,04$  veces el valor de rutina, con picos máximos que se producen entre 1 y 7 horas después de suministrar el alimento, y con una duración del efecto de la alimentación sobre la producción de amoniaco que osciló entre 9 y 17 horas ( $13,3 \pm 3,4$  h) (Fig. 9).

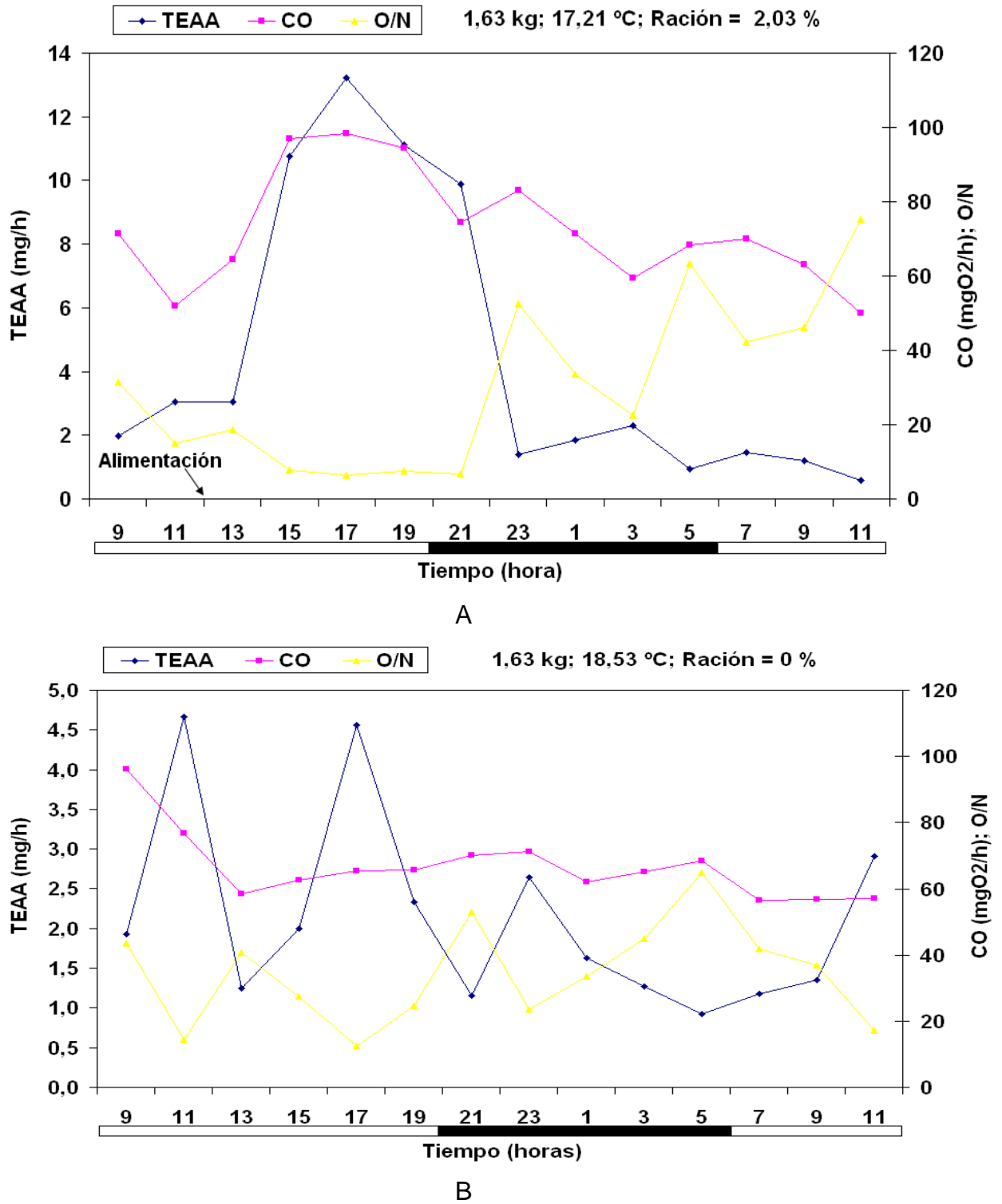


**Figura 9 (A-D).** Patrón de excreción de amoniaco en función del tiempo cuando se suministró una sola toma de alimento a sociedad basado en mejillón (*Mytilus edulis*).



**Figura 10.** Efecto de la temperatura sobre la producción de amoniaco en *M. brachydactyla* de 1 kg de peso.





**Figura 11.** Relación O/N en un centollo de 1,63 kg de peso con alimentación (A) y en ayunas (B).

-El peso, la temperatura (fig. 10) y la ingesta de proteína provoca aumentos significativos en la tasa media diaria de excreción de amoníaco en el centollo, mostrando valores inferiores respecto de otras especies de interés en acuicultura como la dorada, la lubina o el pulpo en condiciones experimentales similares.

-La relación O/N sugiere en los centollos un metabolismo principalmente lipídico durante períodos de ayuno, sin embargo, en periodos de alimentación demuestran mayor utilización de proteínas como fuente de energía (Fig. 11).

-Una concentración de nitrógeno amoniacal total inferior a 0,3 mg/L asegura una correcta tasa de excreción en el centollo en las condiciones experimentales del presente estudio, si bien los ejemplares más grandes tolerarían concentraciones más elevadas.

### Línea 3: Reproducción.

Actividad 3.1: Mantenimiento de reproductores para la obtención de larvas.

Las CCAA participantes adaptaron sus instalaciones para mantener reproductores de centolla. En Canarias además se prepararon tanques para mantener las hembras ovígeras y así poder seguir las puestas individualmente. El mantenimiento de los reproductores es sencillo, siempre y cuando, se mantenga una buena calidad del agua (alto contenido en oxígeno y bajo contenido en amonios).

### **LIMIA-*Maja squinado***

Los ejemplares fueron estabulados en dos tanques de 5000 L cada uno separando los machos de las hembras, cuando las hembras venían ovadas. El alimento suministrado durante la estancia en el laboratorio fue mejillón (2007) y mejillón y erizo (2008). La temperatura osciló desde los 17<sup>o</sup>-20<sup>o</sup> C, la salinidad fue de 37 ‰ y los ejemplares se mantuvieron en condiciones de penumbra.

En el laboratorio se realizaron **observaciones macroscópicas** de la masa de huevos cinco hembras y se asignaron los estados descritos por González-Gurriarán et al. (1995). Nosotros hemos distinguido macroscópicamente, y claramente, entre un color anaranjado (estado I), color rojo (estado II), color marrónáceo (estado III) y color marrón oscuro casi negro (estado IV). Esto puede significar que se trate de otro estado de coloración de los huevos presente en *M. squinado* y no en *M. brachydactyla*.

También se realizaron **observaciones microscópicas** mediante lupa binocular, estableciendo los estados de desarrollo embrionario descritos por Iglesias et al. (2002). Las medias de las medidas que presentaron los huevos en los diferentes estadios son las siguientes:

ESTADO I	ESTADO II	ESTADO III	ESTADO IV
741,75 µm	785-862,5 µm	800 µm	827,5 µm



Estado I



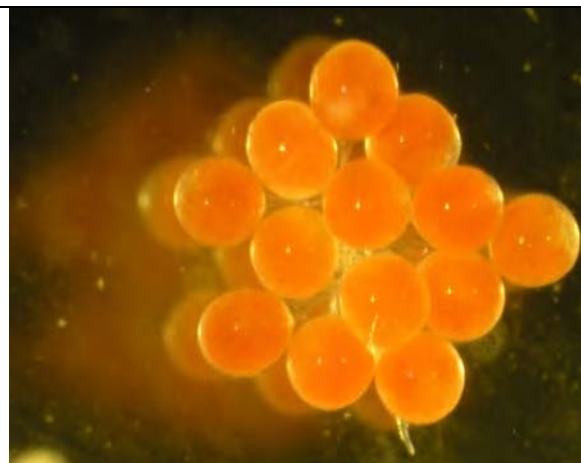
Estado II



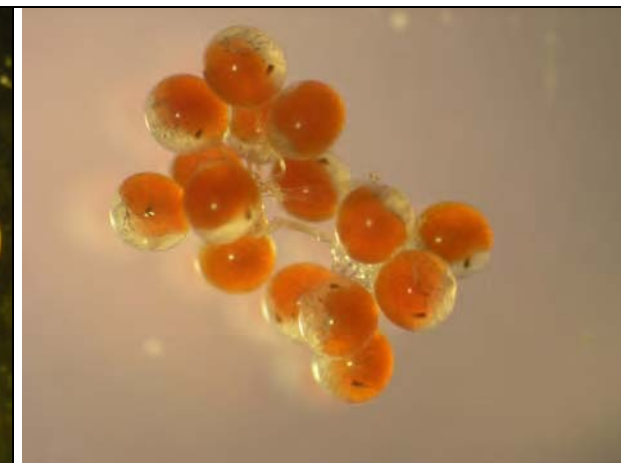
Estado III



Estado IV



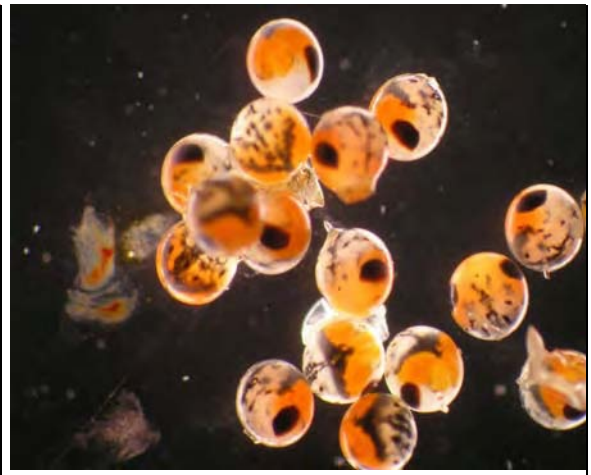
Estado I (masa de huevos naranja)



Estado II (presencia manchas oculares, masa roja de los huevos)



Estado III (mayor pigmentación, movimiento, masa marrón de los huevos, 9 días antes de la puesta)



Estado IV (4 días antes de la puesta, movimiento, masa marrón casi negra de los huevos)

Durante el verano de 2007 solo se pudo determinar el **periodo de interpuesta** de una de las hembras, siendo éste de 4 días hasta su 2ª puesta. Por otro lado, la máxima **duración del periodo de incubación** que pudimos atestiguar fue de 32 días.

Para la recolección de las puestas se instaló un rebosadero y en éste se dispuso un colector de malla de 500 µm para recoger las zoeas recién nacidas.

PUESTA	FECHA	Nº ZOEAS	Tª °C
1ª	11-5-07	130.000	18
2ª	20-5-07	106.000	19.9



Tanque reproductores hembra



HEMBRA	H1		H2			H3			H4		H5		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
PUESTA													
Duración total INCUBACIÓN (días)		31		32	(+)		33	(+)		30		(+)	32
Estadio A (días)		17		17			22			17			14
Estadio B (días)		8		8			2			6			6
Estadio C (días)		4		4		9	6		4	6	6		8
Estadio D (días)	4	2	3	3		2	3		4	1	2		4
Periodo de Interpuesta(días)		3		1	46		2	29		5		2	14
Fecha puesta	21/5	24/6	22/5	25/6		25/5	29/6		27/5	01/7	04/6		16/8
<b>Zoeas totales</b>	<b>78000</b>	<b>18460</b>	<b>222000</b>	<b>122940</b>		<b>123000</b>	<b>19825</b>		<b>52400</b>	<b>85000</b>	<b>14800</b>		<b>50000</b>
Zoeas vivas	41200	*	78000	97540		45000	1400		28400	53000	74000		*
Zoeas muertas	21800	*	144000	25400		78000	18425		24000	32000	74000		*

\* Prácticamente toda la puesta estaba viva, no se separó la fracción de zoeas muertas.

+ Puestas que no fueron adelante. La hembra soltó la puesta o murió con la puesta en fase D (H2)

Tabla II. Seguimiento de las puestas de cinco hembras.

En 2008, se realizaron semanalmente observaciones macroscópicas de la masa de huevos de cinco hembras. En la Tabla I se presentan los datos de estado de desarrollo de la masa ovárica, duración de los estadios y del periodo embrionario, período de interpuesta después de la puesta hasta la observación de una nueva masa ovárica naranja, así como el número de zoeas eclosionadas (vivas y muertas) y número de puestas de cada hembra. Una vez realizada la puesta, se pesaron las hembras vacías.

El sistema de recogida de las zoeas recién eclosionadas varió en relación con el año anterior. Las hembras en fase de prepuesta fueron aisladas en tanques cilindro-cónicos de 400-1000 litros. Una vez realizada la puesta, se devolvía la hembra al tanque de reproductores y se recogían las zoeas mediante el vaciado del tanque en un salabre de 500 micras.

Se obtuvieron a lo largo del periodo diez puestas, cada hembra puso dos veces desarrollando tres de ellas una tercera masa ovárica que no llegó a la eclosión debido a que la hembra la soltó o como en el caso de la hembra H2 que murió con la masa ovárica a punto de eclosionar en estadio D.

El número total de zoeas obtenidas fue de 869.625 con una supervivencia a día 0 del 47,93%. Se consideraron como zoeas muertas las que se observaron en peor estado, color gris pálido y con poca vitalidad. Solo se emplearon para las pruebas zoeas activas y que presentaban un color oscuro.

### ***Maja brachydactyla*-IRTA**

Los reproductores se compraron a LONXANET en A Coruña. Se trasladaron al IRTA en cajas de forexpan con placas de hielo y envueltos en trapos húmedos con agua de mar. La supervivencia fue de un 70%. Se utilizaron las instalaciones de cultivo existentes, las condiciones de luz eran las naturales, temperatura a 18°C y la alimentación a base de mejillón fresco, mejillón congelado y cangrejo congelado a excepción del período estival cuando se alimentó exclusivamente con mejillón congelado por la falta de suministro de los otros alimentos. Se controló diariamente la temperatura y salinidad de los tanques de reproductores, y semanalmente los nitritos, nitratos y amonios que en ningún caso superaron niveles importantes.



Se decidió que era mejor no manipular las hembras para evitar el estrés y esperar a la eclosión de las larvas. Se colocaron colectores fuera del tanque y las larvas recién eclosionadas se dirigían a éstos gracias a la corriente creada por el sistema de recirculación.

### ***Maja brachydactyla*-ICCM**

Se alimentaron los reproductores con mejillón congelado (sin valvas). Se realizaron semanalmente las tareas de limpieza y muestreo de los ejemplares: No se observó ganancia de peso en ninguno de los ejemplares en cautividad.

Se obtuvieron puestas desde Octubre de 2006 que se utilizaron para las diferentes experiencias de cultivo larvario, o se desecharon por no reunir las mínimas características de calidad para ser aprovechables para uno u otro objetivo.

Todas las hembras del stock realizaron la puesta en cautividad. Las primeras puestas se dieron a primeros de Noviembre y no cesaron durante el período de estudio (hasta finales de mayo de 2007). En la Tabla 1 se presentan los valores observados durante dicho período:

	H1	H2	H5	H6	H8	H9	H10	H11
<b>FA 1</b>	48500	37400	48000	28600	p	82500	88750	84375
<b>FA 2</b>	p	p	67300	18000	67300	73300	92500	64583
<b>FA 3</b>	57500	p	36000	39200	70000			
<b>FA 4</b>	12495		56750	18166	34687			
<b>FA 5</b>				26562				
<b>FR 1</b>	65,53	133,62	104,64	97,64	---	166,59	177,07	183,22
<b>FR 2</b>	---	---	161,58	66,64	106,4	140,23	178,46	146,64
<b>FR 3</b>	82,26		86,12	147,64	113,05			
<b>FR 4</b>	17,61		137,91	66,25	57,03			
<b>FR 5</b>				99,59				
<b>P</b>	691,2	284,4	420,3	270,3	626,4	473,9	483,2	472,1
<b>DI</b>	37/39/34	25	-/35/39/31	-/35/33/35/37	36/36/38	34/38	33/38	38/37
<b>PI</b>	4/4	3	1/1/2	1/1/1/1/3	2/1/2/3	1/1	0/2	0/2

Las hembras H5 y H6 se reclutaron ovígeras, de manera que no se puede estimar la duración de la incubación de su primera puesta del ciclo (-). Los ejemplares H2, H3, H4 y H7 murieron en el transcurso del estudio, de modo que no podemos determinar si murieron antes de terminar su ciclo de puestas. La hembra H1 murió habiendo transcurrido un mes desde su última puesta. Al no presentar una puesta sucesiva en dicho período, consideramos terminado su ciclo. Al término del período descrito (Mayo), permanecen ovígeras las hembras H6, H8, H9, H10 Y H11, por lo que en la Tabla 1 aparecen reflejados los períodos interpuesta posteriores a las últimas puestas referidas.

La fecundidad relativa se obtuvo tomando el peso de la hembra vacía el día de la eclosión en cada puesta, salvo para las hembras que presentaron una nueva masa ovígera el mismo día de la eclosión (H10 y H11), en las que se utilizó el peso total (puesta incluida). Los pesos descritos en la Tabla 1 son el valor medio de las pesadas tras cada eclosión. Salvo durante la aclimatación a las condiciones de cultivo, en las que se observó tanto ligeras ganancias de peso como pérdidas, los distintos ejemplares mantuvieron estable su peso a lo largo del período de estudio.

En mayo de 2008 permanecían 10 ejemplares en stock después de dos años en cautividad. En noviembre de 2008 se amplió el stock con 17 ejemplares. Las nuevas hembras, nuevas fecundadas en cautividad y una de las nuevas ovadas fueron estabuladas directamente en los tanques de eclosión, tal como figura en la tabla del último muestreo de 2008:



Tanque (eclosión)	Peso (gramos)	Talla (centímetros)	Sexo	Eclosión
01	390	9,3	♀	13/10
01	420	9,4	♀	17/10
01	450	9,4	♀	25/10
02	570	10,1	♀	11/11
02	220	7,4	♀	01/12

### ***Maja brachydactyla*-IFAPA-Agua del Pino**

Los trabajos se iniciaron en junio de 2006 mediante la compra a pescadores de la zona de 14 ejemplares de centollo (7 machos y 7 hembras), capturados en las aguas litorales frente a las propias instalaciones del Centro. Estos ejemplares se estabularon en tanques de 80x54x58 cm (30cm de profundidad del agua en el tanque) a una tasa de dos hembras por macho, quedando el resto de ejemplares en un tanque común de 172x103x72, para reposición de pérdidas. La alimentación que se ofreció inicialmente fue mejillón congelado y sardina, pasando finalmente a darles a todos mejillón congelado dada la poca aceptación de la sardina y la suciedad que provocaba en el agua. Las condiciones de cultivo que se establecieron fueron fotoperiodo natural, temperatura 20°C y salinidad oscilando entre el 35 y 37%.





La adaptación a las condiciones de cautividad fue bastante aceptable. La mortalidad escasa y el número de puestas elevado, con una media de 2,4 puestas por hembra durante un período que comprendió desde junio a noviembre. La mayoría de las hembras venían ovadas tras su captura y dada la capacidad de las centollas de almacenar el esperma para fecundarse a si mismas (se estima que entre dos-tres veces sin necesidad de nuevas cópulas), se presume que las puestas ocurridas en cautividad se produjeron sin intervención de los machos. No obstante, al menos en uno de los casos existe la fundada sospecha de que la cópula previa a la fecundación se produjo con los individuos ya en cautividad.

En coordinación con la bibliografía consultada, el desarrollo embrionario se prolongó durante 30-40 días en las condiciones de estabulación preestablecidas, sin embargo no se cumplieron con demasiada exactitud las tres fases de desarrollo embrionario que describe González Gurriarán et al. (1995) en función del estado macroscópico de la masa de huevos (amarillo-anaranjado, pardo y marrón oscuro), lo que, entendemos, fue causado por una alimentación que a la postre se resolvió deficitaria. Durante los 6 meses que duró el periodo fértil, tuvimos un total de 12 puestas procedentes de 5 hembras.



### Actividad 3.2: Efecto de las condiciones ambientales en la calidad de la puesta

Los reproductores capturados en Galicia se distribuyeron en grupos de 8±1 ejemplares en tanques de 2000 L de volumen conectados a un sistema de recirculación con una temperatura de 18±1°C y aireación constante. Cada tratamiento se ha realizado por duplicado. Las condiciones de estabulación para cada experimento han sido:

1. Proporción de sexos: los reproductores se mantuvieron con fotoperiodo natural y salinidad 34.8±0.5‰, con dos tratamientos: ausencia de machos (3H:0M, H: hembras, M: machos) y presencia de machos en una proporción 3H:1M.
2. Fotoperiodo 1 (fijo): los reproductores se han mantenido en una salinidad de 34.8±0.5‰ y una proporción de sexos 3H:1M. Los tratamientos que se han realizado han sido:
  - fotoperiodo largo: 16hL/8hO (L: luz, O: oscuridad)
  - fotoperiodo medio: 12hL/12hO
  - fotoperiodo corto: 8hL/16hO
  - fotoperiodo natural
3. Salinidad: los reproductores se han mantenido con fotoperiodo natural y una proporción de sexos 3H:1M. Los tratamientos a los que se han sometido los reproductores han sido salinidad 38‰ y 34‰.
4. Fotoperiodo 2 (variable): los reproductores se han mantenido en una salinidad de 34.8±0.5‰ y una proporción de sexos 3H:1M. Los tratamientos que se han realizado han sido:
  - fotoperiodo natural
  - fotoperiodo natural desfasado 3 meses
  - fotoperiodo natural desfasado 6 meses

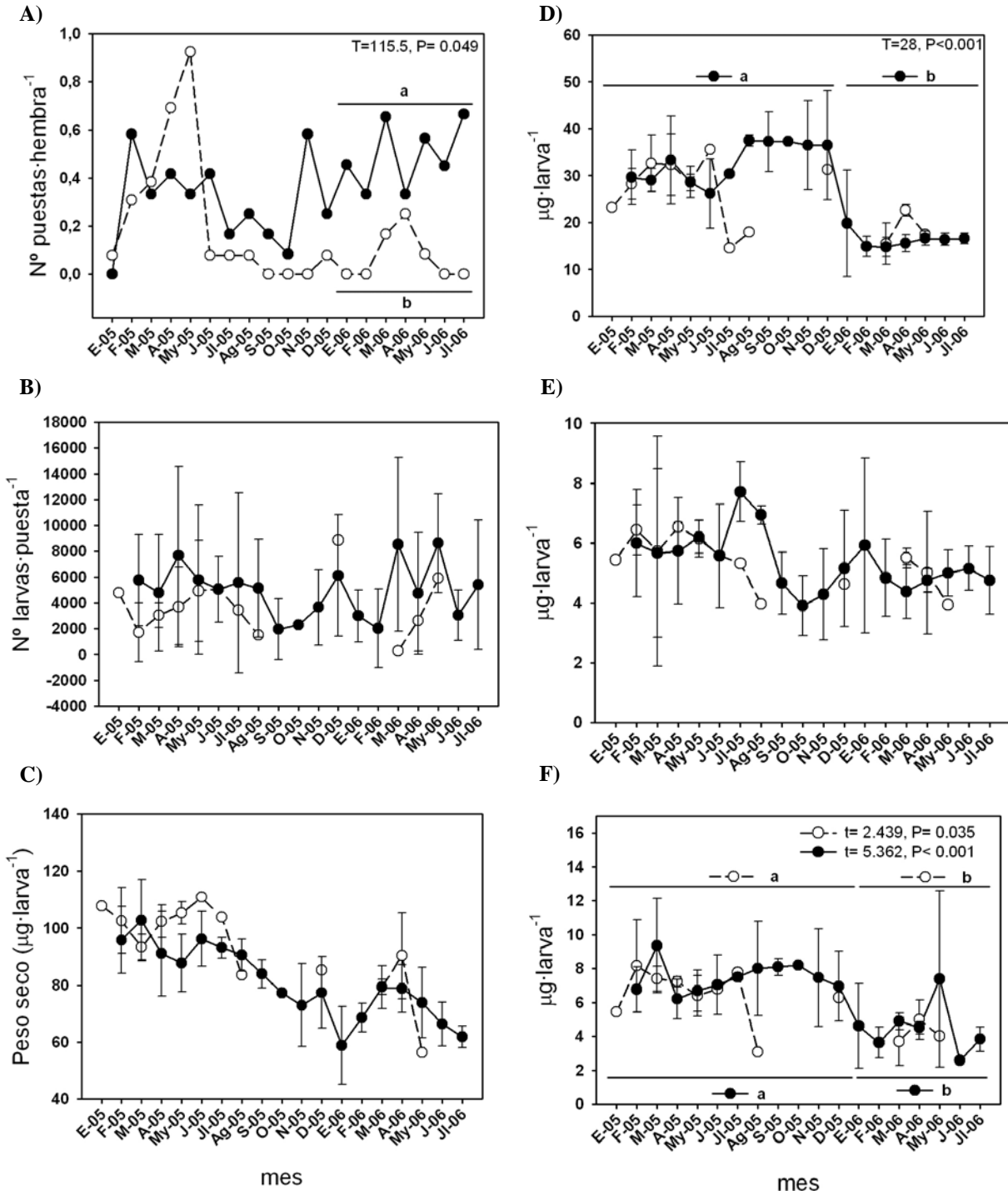
	2008												2009											
	E	F	M	A	My	J	Jl	A	S	O	N	D	E	F	M	A	My	J	Jl	A	S	O	N	D
<b>Control</b>	I			P			V			Ot			I			P			V			Ot		
<b>3-</b>	8hL:16hOs			I			P			V			Ot			I			P			V		
<b>6-</b>	8hL:16hOs			I			P			V			Ot			I			P			V		

I, invierno; L, luz; Os, oscuridad; Ot, otoño; P, primavera; V, verano

Las larvas recién eclosionadas (en adelante, puesta) son recogidas mediante colectores a la salida del tanque de los reproductores. Para cada tratamiento se ha estimado el número de puestas por hembra, el número de larvas por puesta y el peso seco individual (3 réplicas de 200 larvas secadas 24h a 60°C). De la misma manera, se han tomado muestras para su análisis bioquímico del contenido proteico, lipídico y en carbohidratos.

### Resultados

1. Proporción de sexos: La presencia de machos es necesaria para asegurar las puestas a partir del año en cautividad. En la figura 1 se observan una disminución significativa en el número de larvas por puesta recogidas en el grupo con ausencia de machos en relación al grupo con presencia de machos.



**Figura 1:** Experimento de proporción de sexos: variación anual de: A) número de puestas por hembra (● 3H:1M, ○ 3H:0M), B) número de larvas por puestas, C) peso seco individual ( $\mu\text{g} \cdot \text{larva}^{-1}$ ), D) contenido proteico ( $\mu\text{g} \text{ proteína} \cdot \text{larva}^{-1}$ ), E) contenido en carbohidratos ( $\mu\text{g} \text{ carbohidratos} \cdot \text{larva}^{-1}$ ) y F) contenido lipídico ( $\mu\text{g} \text{ lípidos} \cdot \text{larva}^{-1}$ ). Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos. Las letras precedidas de los símbolos indican diferencias significativas entre el primer y segundo año en un mismo tratamiento. El valor del estadístico y los niveles de significación se indican en cada gráfica.

2. Fotoperiodo 1 (fijo): Los resultados obtenidos indican un efecto negativo de los fotoperiodos fijos. El fotoperiodo largo y medio produjeron una disminución significativa del número de puestas por hembra en el primer año. El efecto del fotoperiodo corto se ha manifestado a partir del segundo año (Tabla 1).

	Fotoperiodo	Nº puestas-hembra <sup>-1</sup>	Nº larvas-puesta <sup>-1</sup>	Peso seco individual (µg-larva <sup>-1</sup> )
2006	Largo	0.08±0.15 <sup>a</sup>	10245.06±4952.94 <sup>a</sup>	76.10±10.47 <sup>a</sup>
	Medio	0.12±0.16 <sup>a</sup>	5301.16±2437.21	78.56±11.74
	Corto	0.19±0.31	5747.80±2559.77	79.18±11.74
	Natural	0.30±0.18 <sup>b</sup>	5673.65±955.92 <sup>b</sup>	88.03±9.25 <sup>b</sup>
2007	Largo	0	N.d.	N.d.
	Medio	0	N.d.	N.d.
	Corto	0.14±0.09 <sup>A</sup>	5431.46±3978.18	80.81±16.77
	Natural	0.29±0.27 <sup>B</sup>	5046.88±2663.49	69.68±8.00

**Tabla 1.** Resultados del experimento de fotoperiodo. Los valores se encuentran expresados como media ± desviación estándar. Distintas letras (minúsculas: 2006; mayúsculas: 2007) indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). N.d: sin datos.

3. Salinidad: Los resultados muestran un efecto negativo en el número de puestas por hembra, número de larvas por puesta y peso seco individual (Tabla 2).

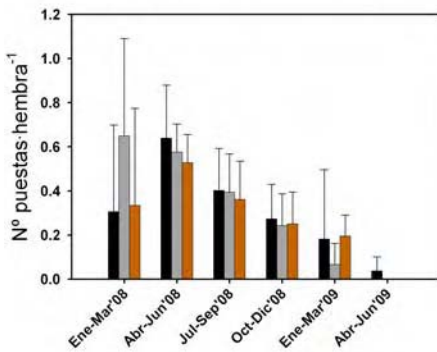
**Tabla 2.** Resultados preliminares del experimento de salinidad (enero-julio 2007). Los valores se encuentran expresados como media ± desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

Salinidad	Nº puestas-hembra <sup>-1</sup>	Nº larvas-puesta <sup>-1</sup>	Peso seco individual (µg-larva <sup>-1</sup> )
38 ‰	0.06±0.06 <sup>a</sup>	1077.12±1807.67 <sup>a</sup>	71.71±14.41 <sup>a</sup>
34 ‰	0.32±0.19 <sup>b</sup>	5763.70±1014.11 <sup>b</sup>	94.40±5.15 <sup>b</sup>

4. Fotoperiodo 2 (variable): No hubo diferencias significativas en el número de puestas por hembra (Fig 2 A), con un máximo a principios de año (enero a junio), como en el medio natural (González-Gurriarán *et al.*, 1998) seguido de una progresiva disminución. La misma tendencia se observó en el número de larvas por puesta y hembra (Fig. 2B). La disminución del número de puestas por hembra y larvas por puesta y hembra sugiere un efecto negativo de la estabulación, que podría estar relacionado con el estado nutricional, edad o agotamiento reproductivo de los reproductores (Racotta *et al.*, 2003).



Variación anual del nº puestas·hembra<sup>-1</sup>



Variación anual del nº larvas·puesta<sup>-1</sup>

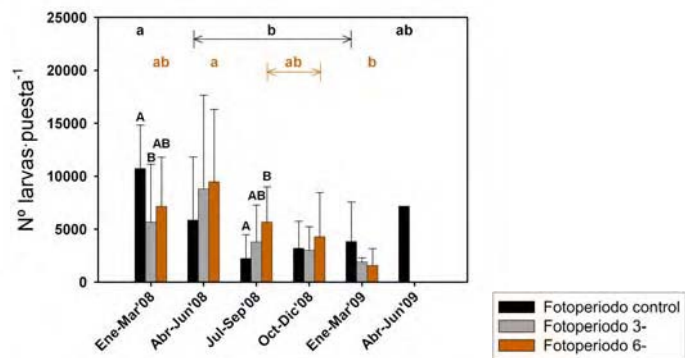
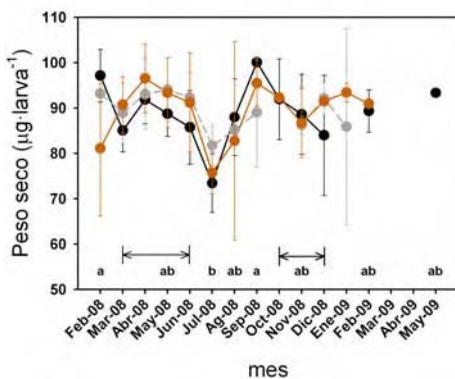


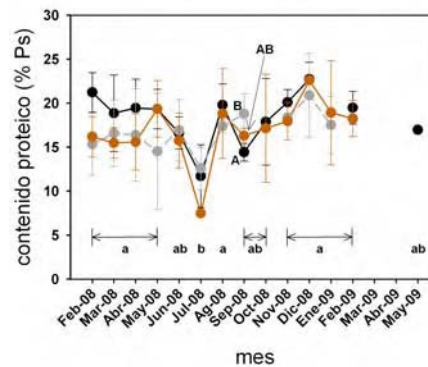
Fig. 2. Representación trimestral de la variación anual del número de puestas por hembra (A) y número de larvas por puesta y hembra (B). Las letras minúsculas indican diferencias entre diferentes meses de un mismo tratamiento. El color de las letras minúsculas indica el tratamiento. Las distintas letras mayúsculas en Fig. 1B indican diferencias significativas entre tratamientos.

No existieron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control ni en el Ps de las larvas (Fig. 3A) ni en el contenido de PRT, CH y LPD (Fig. 3B-C), excepto el contenido de PRT en septiembre. Las variaciones anuales en contenido en PRT y LPD fueron similares a las del Ps, mientras que los CHs aumentaron progresivamente a lo largo del año (Fig. 3C).

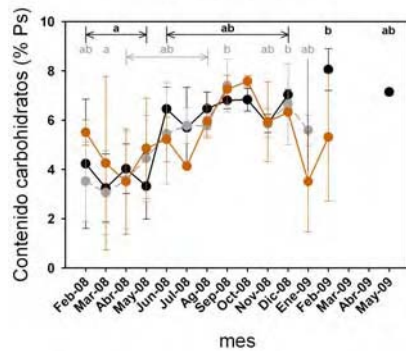
Variación anual del peso seco



Variación anual del contenido proteico



Variación anual del contenido en carbohidratos



Variación anual del contenido lipídico

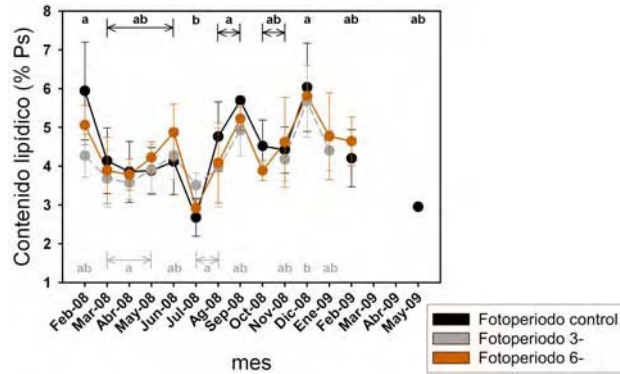


Fig. 3. Variación anual del peso seco (A), del porcentaje de PRT (B), CH (C) y LPD (D). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre diferentes meses de un mismo tratamiento. El color de las letras minúsculas indica el tratamiento. Las distintas letras mayúsculas en Fig. 3B indican diferencias significativas entre tratamientos.

### Actividad 3.3: Efecto de la alimentación en la calidad de la puesta.

El conocimiento del estado nutricional de los reproductores es básico para obtener puestas de buena calidad, en consecuencia se diseñó un experimento para determinar el efecto de distintas dietas en los adultos mantenidos en cautividad. El desarrollo experimental se inició con la compra de 30 centollos adultos (15 machos y 15 hembras) procedentes de la pesca extractiva en el área de Marruecos (costa atlántica). De ellos se segregaron 3 machos y 3 hembras que fueron sacrificados de inmediato para comprobar el estado nutricional silvestre. Con el resto se formaron 4 grupos de 6 centollos cada uno y una ratio de 3 machos x 3 hembras y se mantuvieron en otros tantos tanques de cultivo de 0,5 m<sup>3</sup> (base cuadrada de 1x1 m y 50 cm de profundidad). Cada grupo se alimentó con una dieta distinta durante 4 meses, siendo éstas:

- Mejillón fresco.
- Mejillón congelado.
- Un pienso comercial de langostinos.
- Cangrejo verde congelado (*Carcinus maena*)

Durante el período experimental, los animales se cultivaron en circuito abierto, utilizándose agua de mar previamente decantada, filtrada y tratada con luz UV. Salinidad entorno a los 35 ppt, temperatura de 18±2°C y fotoperiodo natural correspondiente a los meses de febrero a mayo.

A los 4 meses se sacrificaron todos los individuos y se extrajeron muestras de gónada, hepatopáncreas y músculo para realizar análisis bioquímicos indicativos del estado nutricional de los individuos, distinguiendo entre machos y hembras. Los parámetros para analizar previstos fueron:

- Lípidos en hepatopáncreas y gónada.
- Carotenoides en hepatopáncreas y gónada.
- Proteínas en hepatopáncreas y músculo.

Dando como resultado el siguiente número de muestras y determinaciones analíticas:

- Lípidos:	2 por individuo	Total: 60 determinaciones
- Proteínas:	2 “	60 “
- Carotenoides:	2 “	60 “
- Humedad:	3 “	90 “

El porcentaje de humedad se determinó con muestras de 500 mg usando el método de Horwitz (1980). Los lípidos totales (LT) se extrajeron usando cloroformo : metanol (2:1 v/v) con 0,01% del antioxidante butil hidroxil tolueno (BHT) (Christie, 1982). Los solventes orgánicos se evaporaron en una campana de extracción con nitrógeno y el contenido en lípidos se cuantificó por gravimetría.

Las clases lipídicas se separaron por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) usando metil acetato/ isopropanol/ cloroformo/ metanol/0,25% (w/v) KCl (25:25:25:10:9 en volumen), como el sistema de solventes polares, y hexano/ dietil éter/ ácido acético glacial (80:20:2 en volumen), como el sistema de solventes neutros. Las clases lipídicas se cuantificaron por combustión incompleta con acetato de cobre y se estimaron por densitometría, usando un escáner de

doble longitud de onda de reconocimiento rápido (Olsen y Henderson, 1989). Los LT se sometieron a transesterificación catalizada con ácido 16 h a 50 °C, usando 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico en metanol al 1% (v/v). Los ésteres de ácidos grasos metilados resultantes (FAME) se purificaron por cromatografía en capa fina (TLC), y se visualizaron con yodina en cloroformo al 1% (v/v) (Christie, 1982). Los FAME se separaron y cuantificaron con un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 2010 equipado con un detector iónico de llama (280 °C) y una columna capilar de cristal de sílice Tecnokroma-Suprawax-280 (15 m x 0.1 mm I.D.). Los FAME se identificaron usando como referencia un estándar de aceite de pescado bien identificado.

BHT, cloruro potásico, bicarbonato potásico e yodina fueron suministrados por Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Las placas de TLC (20 x 20 cm x 0.25 mm) y HPTLC (10 x 10 cm x 0.15 mm) fueron suministradas por Macherey-Nagel (Düren, Germany). Todos los solventes orgánicos para el cromatógrafo de gases Shimadzu GC 2010 fueron reactivos de alta calidad suministrados por Panreac (Barcelona, Spain).

Los resultados de la composición lipídica están presentados como media  $\pm$  desviación estándar (SD). La normalidad de los datos se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnoff, y la homogeneidad de la varianza con el test de Levene, y se hizo una transformación arcsen cuando fue necesario. A todos los datos expresados en porcentaje se les aplicó la transformación arcsen (Fowler et al., 2002). Para comparar las diferencias entre grupos se hizo una ANOVA de una vía o un Kruskal–Wallis ANOVA de una vía en rangos, en función de si los datos cumplían o no con la normalidad y la homogeneidad de la varianza respectivamente.

### Resultados y discusión

Se observó que el contenido en lípidos neutros del hepatopáncreas de las hembras está estrechamente relacionado con el de la gónada, detectándose una correlación positiva entre el contenido en lípidos neutros en ambos órganos (coeficiente de correlación Pearson = 0.589,  $p=0.044$ ). Esto indica que hay una transferencia de lípidos entre la gónada y el hepatopáncreas que confiere a este último órgano funciones de reserva de lípidos.

En la tabla 1 se muestra el contenido en lípidos totales y las clases lipídicas del hepatopáncreas de los centollos silvestres y de los alimentados con las cuatro dietas de referencia. Se puede observar que en cuanto a lípidos totales, los individuos alimentados con cangrejo tienen un hepatopáncreas algo más graso que los silvestres, si bien no hay diferencia estadísticamente significativa ( $p>0,05$ ) entre ellos. En el caso opuesto está la dieta de mejillón congelado, con menos lípidos totales pero también sin diferencias estadísticamente significativas con el silvestre. Por su parte, la dieta de mejillón fresco es la que más se acerca al silvestre, con valores de lípidos totales en el hepatopáncreas muy similares a éste, y la de pienso comercial, la que más se aleja, presentando valores de lípidos totales significativamente ( $p<0,05$ ) menores que silvestre.

Con relación a los lípidos neutros y clases lipídicas, existen claramente dos grupos bien diferenciados: uno formado por los animales que recibieron dietas de mejillón fresco y cangrejo, con una composición lipídica muy similar al control (silvestre) y otro formado por los que recibieron dietas de pienso de crustáceos y mejillón congelado, entre los que se muestran carencias de lípidos de reserva en el hepatopáncreas, con relación al silvestre. Mención aparte merece el caso de los lípidos polares, cuyo contenido es muy homogéneo en todos los casos sin que aparezcan diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sin embargo, esta aparente contradicción, concuerda con la principal función fisiológica de los lípidos polares, que como integrantes de las paredes celulares, cumplen funciones estructurales y no deben estar sometidos a posibles fluctuaciones en función de la dieta.

Tabla 1. Composición en lípidos totales (% PS) y clases lipídicas (% PS) de hepatopáncreas de machos de centollo silvestres y alimentados con diferentes dietas.

	Silvestre	Pienso	Mejillón Fresco	Mejillón Congelado	Cangrejo
<b>SM</b>	0.00 ± 0.00 a	0.01 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 a	0.33 ± 0.34 b	0.00 ± 0.00 a
<b>PC</b>	2.75 ± 0.25	1.31 ± 0.75	1.99 ± 0.32	3.54 ± 3.54	2.10 ± 0.50
<b>PS</b>	0.26 ± 0.10	0.22 ± 0.11	0.13 ± 0.12	0.53 ± 0.57	0.00 ± 0.00
<b>PI</b>	0.56 ± 0.12	0.27 ± 0.11	0.43 ± 0.03	0.60 ± 0.58	0.30 ± 0.04
<b>PE</b>	1.61 ± 0.26	0.81 ± 0.32	1.12 ± 0.14	2.12 ± 2.23	1.05 ± 0.33
<b>DAG</b>	0.24 ± 0.09 b	0.00 ± 0.00 c	0.40 ± 0.35 a,b,c	0.09 ± 0.15 b,c	0.74 ± 0.32 a
<b>CHO</b>	1.90 ± 0.10	1.36 ± 0.87	1.78 ± 0.15	3.11 ± 3.38	1.87 ± 0.45
<b>FFA</b>	0.43 ± 0.13	0.05 ± 0.05	0.38 ± 0.66	0.53 ± 0.28	0.95 ± 0.26
<b>TG</b>	17.32 ± 6.51 a	5.48 ± 7.94 b	17.64 ± 5.12 a	3.79 ± 3.33 b	26.80 ± 2.58 a
<b>EE</b>	10.34 ± 2.63 a	3.76 ± 3.47 c	9.26 ± 2.58 a,b	4.24 ± 0.54 b,c	9.96 ± 3.71 a
<b>LPT</b>	5.28 ± 0.65	2.81 ± 1.32	3.90 ± 0.56	7.18 ± 7.21	3.53 ± 0.86
<b>LNT</b>	30.23 ± 9.29 a	10.64 ± 12.23 b	29.46 ± 8.17 a	11.75 ± 2.08 b	40.33 ± 6.25 a
<b>LT</b>	35.67 ± 8.56 a,b	14.08 ± 13.65 c	33.61 ± 8.30 a,b	19.83 ± 9.40 b,c	44.51 ± 7.12 a

Los resultados se presentan como media ± S.D. SM: esfingomielina; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PE: fosfatidiletanolamina; DAG: diacilglicerol; CHO: colesterol; FFA: ácidos grasos libres; TG: triacilglicerol; EE: ésteres de esteroles; LPT: lípidos polares totales; LNT: lípidos neutro totales; LT: lípido total.

El caso de las hembras es completamente distinto. Las tablas 2 y 3 muestran el contenido en lípidos totales y clases lipídicas del hepatopáncreas y de la gónada, respectivamente, y lo primero que resalta es la escasa diferencia que existe entre las cuatro dietas entre sí y con el silvestre, tanto en el hepatopáncreas como en la gónada. En ningún caso las escasas diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), según lo cual, las cuatro dietas son de igual calidad alimenticia y similar a la silvestre. Esto contradice totalmente los resultados en machos, por lo que se abre un campo de investigación muy interesante para ver por qué en el caso de las hembras el contenido lipídico es independiente de la dieta o qué factor está interviniendo para enmascarar este efecto. La razón puede estar probablemente en el diferente estado de maduración de la gónada en el momento del sacrificio del animal. No se han encontrado referencias bibliográficas en crustáceos que relacionen el contenido en lípidos de la gónada femenina con su estado de madurez, pero numerosos autores han descrito en otras especies



que durante la ovogénesis se transfieren lípidos de la gónada a los ovocitos para formar el vitelo y, en consecuencia, el contenido lipídico de la gónada depende en gran medida de su estado de maduración.

Freire *et. al.* 2007 han descrito que en el medio natural las puestas de centollo se producen durante de todo el año, aunque con dos picos preferentes en primavera y otoño. Esto mismo lo hemos podido comprobar nosotros en cautividad, donde hemos logrado puestas espontáneas durante todos los meses del año (datos no publicados), lo que quiere decir que en cualquier momento podemos encontrar hembras en estados diferentes de maduración ovárica y, en consecuencia, con un contenido lipídico muy variable en la gónada. Este diferente estado de maduración puede ser la causa que está enmascarando el efecto de la dieta en el contenido lipídico de la gónada y un posible bajo contenido en lípidos puede ser consecuencia tanto de una mala nutrición como de un determinado estado de madurez. En estas circunstancias, no sería imposible encontrar hembras que aún estando bien nutridas presenten bajos valores de lípidos en la gónada.

En el caso del hepatopáncreas se reproducen estos datos, pudiéndose comprobar (tabla 2) que también existe una gran homogeneidad entre las distintas dietas sin que haya diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellas y con el silvestre. La correlación positiva entre este órgano y la gónada, puede ser la causa de este comportamiento similar si, como en otras especies, el hepatopáncreas actúa como órgano de reserva, transfiriendo lípidos hacia la gónada cuando ésta lo demanda. Tal hipótesis justificaría también la falta de diferencias significativas en el contenido lipídico del hepatopáncreas de hembras salvajes y las alimentadas con diferentes dietas.

Tabla 2. Composición en lípidos totales (% PS) y clases lipídicas (% PS) de hepatopáncreas de hembras de centollo silvestres y alimentados con diferentes dietas.

	Silvestre	Pienso	Mejillón Fresco	Mejillón Congelado	Cangrejo
<b>SM</b>	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.07	0.06 ± 0.06	0.11 ± 0.10	0.03 ± 0.05
<b>PC</b>	2.45 ± 0.29	1.56 ± 0.31	1.79 ± 0.54	2.41 ± 0.88	1.88 ± 0.15
<b>PS</b>	0.22 ± 0.03	0.29 ± 0.13	0.16 ± 0.14	0.33 ± 0.14	0.11 ± 0.10
<b>PI</b>	0.51 ± 0.01	0.28 ± 0.11	0.38 ± 0.05	0.50 ± 0.16	0.34 ± 0.06
<b>PE</b>	1.38 ± 0.20	0.95 ± 0.17	0.96 ± 0.15	1.36 ± 0.51	1.07 ± 0.07
<b>DAG</b>	0.31 ± 0.17	0.18 ± 0.20	0.01 ± 0.01	0.29 ± 0.28	0.12 ± 0.16
<b>CHO</b>	1.84 ± 0.18	1.28 ± 0.08	1.32 ± 0.34	1.58 ± 0.47	1.45 ± 0.04
<b>FFA</b>	0.59 ± 0.21	0.38 ± 0.23	0.29 ± 0.39	1.30 ± 0.79	0.28 ± 0.28
<b>TG</b>	15.38 ± 1.38	6.60 ± 3.51	7.63 ± 5.91	9.13 ± 7.01	9.78 ± 5.40
<b>EE</b>	11.52 ± 8.72	2.63 ± 1.21	3.90 ± 2.84	3.55 ± 2.72	4.84 ± 1.59
<b>TLP</b>	4.68 ± 0.50	3.44 ± 0.60	3.62 ± 0.78	4.15 ± 0.49	3.55 ± 0.13
<b>TLN</b>	28.13 ± 1.58	11.06 ± 5.18	13.13 ± 9.05	16.83 ± 11.64	16.47 ± 7.34
<b>TL</b>	33.07 ± 1.04	14.74 ± 5.63	16.85 ± 9.67	21.06 ± 11.51	20.25 ± 7.27

Los resultados se presentan como media ± S.D.. SM: esfingomielina; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PE: fosfatidiletanolamina; DAG: diacilglicerol; CHO: colesterol; FFA: ácidos grasos libres; TG: triacilglicerol; EE: ésteres de esteroles; LPT: lípidos polares totales; LNT: lípidos neutro totales; LT: lípido total.

Tabla 3. Composición en lípidos totales (% PS) y clases lipídicas (% PS) de gónada de hembras de centollo silvestres y alimentados con diferentes dietas.

	Silvestre	Pienso	Mejillón Fresco	Mejillón Congelado	Cangrejo
<b>SM</b>	0.15 ± 0.04	0.09 ± 0.07	0.25 ± 0.19	0.09 ± 0.08	0.14 ± 0.04
<b>PC</b>	3.90 ± 1.60	6.63 ± 1.71	4.54 ± 1.19	5.60 ± 3.07	3.98 ± 1.97
<b>PS</b>	0.20 ± 0.13	0.09 ± 0.08	0.23 ± 0.12	0.09 ± 0.08	0.14 ± 0.12
<b>PI</b>	0.28 ± 0.15	0.22 ± 0.06	0.35 ± 0.06	0.14 ± 0.12	0.27 ± 0.02
<b>PE</b>	1.99 ± 0.70	2.69 ± 0.61	2.20 ± 0.36	2.20 ± 0.93	1.75 ± 0.51
<b>DAG</b>	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.10	0.07 ± 0.06	0.10 ± 0.08	0.12 ± 0.02
<b>CHO</b>	1.76 ± 0.57	2.99 ± 0.59	2.43 ± 0.65	2.16 ± 0.78	1.98 ± 0.51
<b>FFA</b>	0.17 ± 0.05	0.09 ± 0.16	0.14 ± 0.24	0.10 ± 0.17	0.09 ± 0.07
<b>TG</b>	4.77 ± 2.34	5.54 ± 0.83	3.37 ± 1.05	4.28 ± 2.26	3.15 ± 1.89
<b>EE</b>	1.48 ± 0.33	1.65 ± 0.30	1.33 ± 0.48	1.23 ± 0.49	1.26 ± 0.72
<b>TLP</b>	6.57 ± 1.93	9.71 ± 2.34	7.79 ± 1.38	8.16 ± 3.72	6.38 ± 2.23
<b>TLN</b>	8.97 ± 4.19	10.38 ± 1.73	7.33 ± 1.38	7.87 ± 3.42	6.59 ± 3.04
<b>TL</b>	15.72 ± 6.06	20.34 ± 4.17	15.11 ± 2.75	16.07 ± 7.05	13.03 ± 5.21

Los resultados se presentan como media ± S.D.. SM: esfingomielina; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PE: fosfatidiletanolamina; DAG: diacilglicerol; CHO: colesterol; FFA: ácidos grasos libres; TG: triacilglicerol; EE: ésteres de esterol; LPT: lípidos polares totales; LNT: lípidos neutro totales; LT: lípido total.

Finalmente, comparando los valores medios de los distintos tejidos y sexos es interesante resaltar que los mayores valores medios de lípidos polares corresponden a la gónada de hembras ( $7,72 \pm 2,84$ ), seguido del hepatopáncreas de machos ( $4,54 \pm 3,23$ ) y el hepatopáncreas de hembras ( $3,89 \pm 0,67$ ). Estos datos se corresponden con las funciones atribuidas a los lípidos polares, pues como principales elementos integrantes de las paredes celulares, deben ser más notorios en órganos en crecimiento, como la gónada femenina, y menos abundantes en el hepatopáncreas, que sólo actúa como órgano de reserva. También concuerda el hecho de que el hepatopáncreas en hembras disponga de menos lípidos polares que en machos, pues la continua actividad de la gónada provoca a su vez una continua transferencia de lípidos polares y las hembras se ven por ello más mermadas en el hepatopáncreas, que los machos. Por el contrario para los lípidos neutros y los lípidos totales, los mayores valores corresponden al hepatopáncreas de machos, seguido del hepatopáncreas de hembras y de la gónada de hembras, lo que es coherente con las funciones de reserva de ese órgano.

En cuanto a los ácidos grasos, las tablas 4, 5 y 6 muestran la composición en ácidos grasos de los lípidos totales del hepatopáncreas de machos, hepatopáncreas de hembras y gónada de hembras. en las muestras de hepatopáncreas de centollos machos silvestres, alimentados con cangrejo y alimentados con mejillón fresco, presentan valores más altos y con diferencias significativas para los PUFA, n-3, n-6 y n-3/HUFA con respecto a los otros dos tratamientos alimentados con pienso y con mejillón congelado. Estos tres primeros grupos citados anteriormente son mayores al valor medio teniendo en consideración todos los tratamientos. Para el caso de las hembras, las diferencias significativas son más abundantes en los hepatopáncreas que en las gónadas.

Tabla 4. Composición en ácidos grasos del lípido total ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  PS) de hepatopáncreas de machos de centollo silvestres y alimentados con diferentes dietas.

	Silvestre	Pienso	Mejillón Fresco	Mejillón Congelado	Cangrejo	
<b>14:0</b>	4.36 ± 2.90	1.54 ± 1.87	3.95 ± 1.36	1.36 ± 0.88	5.21 ± 0.30	
<b>14:1</b>	0.31 ± 0.47	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.14	
<b>15:0</b>	2.03 ± 0.54	a 0.24 ± 0.27	c 1.23 ± 0.20	a,b 0.37 ± 0.24	c 1.03 ± 0.18	b
<b>16:0</b>	24.96 ± 13.62	a,b,c 11.41 ± 11.45	c 34.23 ± 9.40	a,b 16.24 ± 10.27	b,c 40.07 ± 6.01	a
<b>16:1n9</b>	1.19 ± 1.14	0.34 ± 0.37	1.70 ± 0.40	0.66 ± 0.43	1.35 ± 0.07	
<b>16:1n7</b>	9.57 ± 5.65	a,b 2.48 ± 2.07	b 12.19 ± 4.01	a 4.30 ± 2.73	b 15.15 ± 4.43	a
<b>16:1n5</b>	0.49 ± 0.21	a,b 0.17 ± 0.18	b 0.38 ± 0.21	a,b 0.17 ± 0.11	b 0.65 ± 0.12	a
<b>16:2n4</b>	0.83 ± 0.31	0.30 ± 0.30	0.35 ± 0.22	0.19 ± 0.12	0.56 ± 0.05	
<b>17:0</b>	1.73 ± 0.97	0.18 ± 0.16	0.95 ± 0.18	0.41 ± 0.26	0.64 ± 0.11	
<b>16:3n4</b>	1.39 ± 0.69	a 0.17 ± 0.15	c 0.58 ± 0.45	b,c 0.17 ± 0.11	c 1.02 ± 0.26	a,b
<b>16:4n1</b>	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.09	0.14 ± 0.24	0.04 ± 0.05	0.21 ± 0.08	
<b>18:0</b>	9.62 ± 1.60	a 2.87 ± 2.28	c 6.91 ± 1.45	a,b 4.60 ± 2.91	b,c 5.66 ± 1.02	b,c
<b>18:1n9</b>	21.64 ± 17.06	9.48 ± 8.65	11.46 ± 5.58	3.27 ± 2.07	24.44 ± 7.42	
<b>18:1n7</b>	4.86 ± 3.10	3.49 ± 3.50	5.69 ± 2.10	3.14 ± 1.99	9.77 ± 0.53	
<b>18:1n5</b>	0.31 ± 0.31	0.22 ± 0.13	0.45 ± 0.13	0.49 ± 0.31	0.73 ± 0.17	
<b>18:2n6</b>	1.83 ± 1.09	2.06 ± 1.90	0.68 ± 0.15	0.43 ± 0.28	1.51 ± 0.39	
<b>18:2n4</b>	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.17	0.68 ± 0.81	0.32 ± 0.21	0.42 ± 0.10	
<b>18:3n6</b>	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.11	0.08 ± 0.15	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
<b>18:3n4</b>	0.49 ± 0.46	0.18 ± 0.20	0.39 ± 0.34	0.30 ± 0.19	0.74 ± 0.20	
<b>18:3n3</b>	0.28 ± 0.32	0.18 ± 0.18	0.23 ± 0.20	0.18 ± 0.12	0.60 ± 0.13	
<b>18:4n3</b>	0.42 ± 0.58	0.08 ± 0.11	0.25 ± 0.05	0.17 ± 0.11	0.39 ± 0.14	
<b>18:4n1</b>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
<b>20:0</b>	0.94 ± 0.29	0.35 ± 0.39	0.41 ± 0.18	0.25 ± 0.16	0.64 ± 0.01	
<b>20:1n11</b>	4.51 ± 3.83	2.91 ± 3.77	3.03 ± 1.29	1.32 ± 0.84	4.51 ± 0.94	
<b>20:1n9</b>	3.53 ± 2.35	2.77 ± 2.99	6.58 ± 1.43	5.75 ± 3.68	7.85 ± 0.99	
<b>20:2n9</b>	0.60 ± 0.20	c 0.47 ± 0.55	a,b,c 2.55 ± 0.15	a 2.34 ± 1.48	a,b,c 1.85 ± 0.12	b
<b>20:2n6</b>	1.58 ± 0.90	b 0.85 ± 0.83	b 1.66 ± 0.62	b 1.37 ± 0.88	b 3.16 ± 0.46	a
<b>20:3n6</b>	0.00 ± 0.00	b 0.24 ± 0.30	b 0.23 ± 0.26	b 0.21 ± 0.14	b 0.61 ± 0.14	a
<b>20:4n6</b>	5.32 ± 1.00	a 1.65 ± 0.97	c 3.99 ± 1.36	a,b 2.07 ± 1.31	b,c 4.89 ± 0.56	a
<b>20:3n3</b>	0.22 ± 0.19	b 0.14 ± 0.16	b 0.25 ± 0.11	b 0.13 ± 0.15	b 0.78 ± 0.13	a
<b>20:4n3</b>	0.31 ± 0.39	0.25 ± 0.35	0.29 ± 0.17	0.13 ± 0.08	0.91 ± 0.11	
<b>20:5n3</b>	17.14 ± 4.46	a 3.70 ± 2.54	c 13.86 ± 5.03	a,b 6.45 ± 4.10	b,c 18.18 ± 4.75	a
<b>22:1n11</b>	1.11 ± 1.19	2.00 ± 2.40	0.68 ± 0.13	0.89 ± 0.66	2.21 ± 1.11	
<b>22:1n9</b>	1.15 ± 0.86	1.11 ± 1.26	1.38 ± 0.54	1.46 ± 1.01	1.75 ± 0.40	
<b>22:1n7</b>	0.96 ± 0.69	0.27 ± 0.27	0.55 ± 0.07	0.32 ± 0.24	0.81 ± 0.12	
<b>21:5n3</b>	0.26 ± 0.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
<b>22:4n6</b>	0.83 ± 0.40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
<b>22:5n6</b>	0.29 ± 0.35	0.04 ± 0.07	0.05 ± 0.09	0.11 ± 0.07	0.77 ± 0.09	
<b>22:5n3</b>	1.60 ± 1.20	a,b 0.30 ± 0.33	c 0.92 ± 0.14	b,c 0.48 ± 0.31	b,c 2.14 ± 0.40	a
<b>22:6n3</b>	16.31 ± 2.10	a,b 5.70 ± 3.56	c 18.86 ± 9.89	a,b 8.64 ± 5.49	b,c 27.40 ± 11.27	a
<b>Saturados</b>	43.64 ± 16.43	a,b 16.59 ± 16.30	c 47.68 ± 12.31	a,b 23.23 ± 14.69	b,c 53.24 ± 6.44	a
<b>Monoenos</b>	49.63 ± 30.80	25.42 ± 25.61	44.33 ± 13.98	21.84 ± 13.86	69.61 ± 12.19	
<b>PUFA</b>	50.68 ± 8.88	a,b 16.95 ± 12.47	c 49.56 ± 16.88	a,b 26.53 ± 16.76	b,c 67.46 ± 17.04	a
<b>n-3</b>	36.55 ± 6.13	a,b 10.36 ± 6.82	c 34.66 ± 15.23	a,b 16.13 ± 10.19	b,c 50.39 ± 16.47	a
<b>n-6</b>	9.85 ± 2.38	a,b 4.92 ± 3.96	b,c 6.71 ± 1.89	a,b,c 4.20 ± 2.66	c 10.95 ± 1.41	a
<b>n-9</b>	28.11 ± 20.35	14.17 ± 13.65	23.66 ± 7.35	13.47 ± 8.56	37.25 ± 8.02	
<b>n-3/HUFA</b>	36.05 ± 6.05	a,b 10.04 ± 6.51	c 34.18 ± 14.93	a,b 15.87 ± 10.02	b,c 49.01 ± 16.31	a
<b>n-3/n-6</b>	3.79 ± 0.80	2.64 ± 1.03	5.07 ± 1.71	4.46 ± 1.05	4.63 ± 1.41	
<b>EPA/DHA</b>	1.07 ± 0.36	0.62 ± 0.30	0.80 ± 0.19	0.89 ± 0.26	0.69 ± 0.12	
<b>AA/EPA</b>	0.33 ± 0.10	0.51 ± 0.15	0.30 ± 0.08	0.37 ± 0.10	0.28 ± 0.07	
<b>AA/DHA</b>	0.32 ± 0.02	0.29 ± 0.10	0.25 ± 0.12	0.28 ± 0.07	0.20 ± 0.09	
<b>Mon/n-3H</b>	1.35 ± 0.68	2.10 ± 1.15	1.39 ± 0.38	1.57 ± 0.38	1.49 ± 0.37	
<b>Mon/PUFA</b>	0.94 ± 0.42	1.28 ± 0.51	0.91 ± 0.16	0.94 ± 0.23	1.05 ± 0.16	
<b>Mon/Sat</b>	1.08 ± 0.26	1.43 ± 0.24	0.92 ± 0.07	1.08 ± 0.28	1.30 ± 0.10	

Tabla 5. Composición en ácidos grasos del lípido total ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  PS) de hepatopáncreas de hembras de centollo silvestres y alimentados con diferentes dietas.

	Silvestre	Piense	Mejillón Fresco	Mejillón Congelado	Cangrejo	
<b>14:0</b>	8.32 ± 0.72	2.93 ± 1.11	1.63 ± 1.23	2.78 ± 2.05	2.47 ± 1.80	
<b>14:1</b>	0.14 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
<b>15:0</b>	1.74 ± 0.34	a 0.36 ± 0.18	b 0.63 ± 0.49	b 0.99 ± 0.74	a,b 0.71 ± 0.40	b
<b>16:0</b>	38.80 ± 0.46	20.34 ± 8.90	19.44 ± 13.88	33.27 ± 24.26	22.45 ± 12.85	
<b>16:1n9</b>	2.61 ± 0.59	0.53 ± 0.20	1.69 ± 1.37	2.16 ± 1.50	0.75 ± 0.52	
<b>16:1n7</b>	9.60 ± 2.12	4.70 ± 1.94	5.49 ± 3.88	10.37 ± 7.47	8.06 ± 4.73	
<b>16:1n5</b>	0.50 ± 0.16	0.25 ± 0.10	0.19 ± 0.13	0.28 ± 0.22	0.40 ± 0.26	
<b>16:2n4</b>	1.42 ± 0.06	b 0.52 ± 0.12	a 0.20 ± 0.18	a 0.39 ± 0.32	a,b 0.33 ± 0.11	a
<b>17:0</b>	1.49 ± 0.35	a 0.17 ± 0.08	c 0.51 ± 0.33	b,c 0.90 ± 0.51	a,b 0.42 ± 0.13	b
<b>16:3n4</b>	1.38 ± 0.54	a 0.36 ± 0.17	b 0.13 ± 0.11	b 0.40 ± 0.23	b 0.68 ± 0.30	b
<b>16:4n1</b>	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.12	0.09 ± 0.09	0.13 ± 0.17	
<b>18:0</b>	9.91 ± 0.51	a 2.95 ± 0.97	c 4.58 ± 2.46	b,c 7.71 ± 3.66	a,b 4.16 ± 1.35	b,c
<b>18:1n9</b>	15.10 ± 6.81	a,b,c 20.07 ± 6.91	a,b 3.54 ± 2.46	c 8.15 ± 5.03	b,c 22.46 ± 10.65	a
<b>18:1n7</b>	13.08 ± 5.31	5.80 ± 2.11	3.13 ± 2.26	6.50 ± 4.63	7.18 ± 3.33	
<b>18:1n5</b>	0.59 ± 0.13	0.37 ± 0.15	0.26 ± 0.20	0.47 ± 0.42	0.49 ± 0.21	
<b>18:2n6</b>	1.12 ± 0.31	b 5.04 ± 1.65	a 0.49 ± 0.35	b 1.08 ± 0.67	b 1.69 ± 0.86	b
<b>18:2n4</b>	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.04	0.41 ± 0.42	0.47 ± 0.38	0.32 ± 0.05	
<b>18:3n6</b>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
<b>18:3n4</b>	0.21 ± 0.08	0.18 ± 0.09	0.29 ± 0.22	0.58 ± 0.42	0.59 ± 0.19	
<b>18:3n3</b>	0.39 ± 0.14	0.44 ± 0.18	0.18 ± 0.13	0.37 ± 0.27	0.55 ± 0.34	
<b>18:4n3</b>	0.92 ± 0.59	0.26 ± 0.12	0.21 ± 0.19	0.44 ± 0.38	0.21 ± 0.18	
<b>18:4n1</b>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.09	0.00 ± 0.00	
<b>20:0</b>	0.83 ± 0.12	b 0.22 ± 0.11	a 0.11 ± 0.10	a 0.21 ± 0.09	a 0.59 ± 0.29	a,b
<b>20:1n11</b>	6.75 ± 1.39	2.76 ± 1.07	1.35 ± 1.03	1.94 ± 1.60	2.84 ± 1.73	
<b>20:1n9</b>	4.03 ± 1.30	6.41 ± 2.35	4.48 ± 3.32	6.78 ± 5.40	5.23 ± 2.98	
<b>20:2n9</b>	1.14 ± 0.26	0.71 ± 0.25	2.67 ± 1.95	3.71 ± 2.90	1.94 ± 0.95	
<b>20:2n6</b>	1.64 ± 0.48	0.87 ± 0.31	0.59 ± 0.42	1.21 ± 0.91	2.18 ± 1.21	
<b>20:3n6</b>	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.06	0.08 ± 0.07	0.22 ± 0.20	0.46 ± 0.23	
<b>20:4n6</b>	3.82 ± 0.23	a 0.96 ± 0.40	b 2.08 ± 0.97	a,b 3.76 ± 1.35	a,b 3.81 ± 2.11	a,b
<b>20:3n3</b>	0.35 ± 0.13	0.17 ± 0.10	0.05 ± 0.08	0.19 ± 0.20	0.58 ± 0.42	
<b>20:4n3</b>	0.82 ± 0.25	a 0.29 ± 0.09	b 0.12 ± 0.08	b 0.33 ± 0.23	b 0.57 ± 0.41	a,b
<b>20:5n3</b>	19.25 ± 6.45	a 4.74 ± 1.67	b 5.78 ± 3.58	b 11.12 ± 6.21	a,b 7.30 ± 4.68	b
<b>22:1n11</b>	1.34 ± 0.51	b 3.70 ± 1.16	a 0.13 ± 0.13	c 0.14 ± 0.13	c 3.11 ± 1.41	a
<b>22:1n9</b>	1.87 ± 0.71	1.62 ± 0.55	0.71 ± 0.55	0.91 ± 0.83	1.08 ± 0.62	
<b>22:1n7</b>	0.55 ± 0.02	0.32 ± 0.12	0.29 ± 0.18	0.67 ± 0.50	0.76 ± 0.36	
<b>21:5n3</b>	0.58 ± 0.01	b 0.00 ± 0.00	a 0.00 ± 0.00	a 0.00 ± 0.00	a 0.00 ± 0.00	a
<b>22:4n6</b>	0.70 ± 0.26	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
<b>22:5n6</b>	0.36 ± 0.08	0.04 ± 0.04	0.11 ± 0.10	0.24 ± 0.22	0.58 ± 0.64	
<b>22:5n3</b>	1.72 ± 1.00	0.42 ± 0.17	0.48 ± 0.33	0.95 ± 0.57	1.29 ± 0.64	
<b>22:6n3</b>	15.52 ± 2.37	8.27 ± 3.71	5.63 ± 4.05	8.48 ± 5.29	8.22 ± 5.59	
<b>Saturados</b>	61.08 ± 0.30	26.98 ± 11.23	26.90 ± 18.47	45.86 ± 31.21	30.81 ± 16.79	
<b>Monoenos</b>	56.18 ± 4.37	46.67 ± 16.53	21.27 ± 15.30	38.36 ± 26.75	52.63 ± 26.78	
<b>PUFA</b>	53.01 ± 6.37	23.90 ± 8.91	23.77 ± 15.98	39.97 ± 24.71	33.15 ± 19.99	
<b>n-3</b>	39.54 ± 6.99	14.59 ± 5.86	12.45 ± 8.36	21.88 ± 12.68	18.72 ± 12.24	
<b>n-6</b>	7.64 ± 0.73	7.04 ± 2.41	3.35 ± 1.88	6.52 ± 3.31	8.72 ± 4.91	
<b>n-9</b>	24.76 ± 8.07	29.34 ± 10.24	13.10 ± 9.50	21.70 ± 15.53	31.46 ± 15.66	
<b>n-3 HUFA</b>	38.80 ± 7.09	13.98 ± 5.59	12.23 ± 8.21	21.32 ± 12.27	17.59 ± 11.49	
<b>n-3/n-6</b>	5.24 ± 1.29	a 2.05 ± 0.17	b 3.42 ± 0.84	b 3.22 ± 0.53	b 2.09 ± 0.24	b
<b>EPA/DHA</b>	1.28 ± 0.57	0.59 ± 0.15	1.19 ± 0.34	1.47 ± 0.45	0.91 ± 0.10	
<b>AA/EPA</b>	0.22 ± 0.09	b 0.20 ± 0.04	b 0.42 ± 0.14	a 0.38 ± 0.11	a,b 0.54 ± 0.06	a
<b>AA/DHA</b>	0.25 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.53 ± 0.33	0.57 ± 0.30	0.49 ± 0.06	
<b>Mon/n-3 H</b>	1.50 ± 0.39	b 3.38 ± 0.17	a 1.61 ± 0.35	b 1.62 ± 0.56	b 3.17 ± 0.60	a
<b>Mon/PUFA</b>	1.08 ± 0.20	c 1.97 ± 0.10	a 0.83 ± 0.16	c 0.88 ± 0.20	c 1.64 ± 0.19	b
<b>Mon/Sat</b>	0.92 ± 0.07	b 1.76 ± 0.19	a 0.75 ± 0.11	b 0.81 ± 0.09	b 1.73 ± 0.06	a

Tabla 6. Composición en ácidos grasos del lípido total ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  PS) de gónada de hembras de centollo silvestres y alimentados con diferentes dietas.

	Silvestre	Pienso	Mejillón Fresco	Mejillón Congelado	Cangrejo
<b>14:0</b>	2.06 ± 1.08	1.15 ± 0.21	1.02 ± 0.26	1.07 ± 0.55	1.34 ± 0.56
<b>14:1</b>	0.06 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<b>15:0</b>	0.58 ± 0.32	0.23 ± 0.10	0.34 ± 0.15	0.33 ± 0.21	0.19 ± 0.04
<b>16:0</b>	11.67 ± 4.36	11.08 ± 2.47	11.52 ± 3.68	12.71 ± 7.06	10.56 ± 2.41
<b>16:1n9</b>	0.74 ± 0.34	0.40 ± 0.07	0.92 ± 0.37	0.74 ± 0.48	0.37 ± 0.08
<b>16:1n7</b>	4.34 ± 1.99	3.76 ± 1.32	4.32 ± 1.21	4.27 ± 2.09	3.03 ± 0.81
<b>16:1n5</b>	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.05	0.13 ± 0.06	0.14 ± 0.10	0.13 ± 0.02
<b>16:2n4</b>	0.31 ± 0.18	0.03 ± 0.06	0.03 ± 0.06	0.09 ± 0.07	0.08 ± 0.08
<b>17:0</b>	0.74 ± 0.38	0.28 ± 0.16	0.43 ± 0.16	0.44 ± 0.24	0.19 ± 0.06
<b>16:3n4</b>	0.65 ± 0.28	0.30 ± 0.19	0.12 ± 0.07	0.16 ± 0.04	0.19 ± 0.10
<b>16:4n1</b>	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.10	0.07 ± 0.06	0.06 ± 0.08	0.12 ± 0.05
<b>18:0</b>	5.28 ± 1.53	3.77 ± 1.64	5.41 ± 1.32	4.69 ± 2.14	3.51 ± 0.80
<b>18:1n9</b>	9.64 ± 3.92	11.93 ± 3.93	5.08 ± 1.48	6.10 ± 1.81	12.79 ± 3.95
<b>18:1n7</b>	3.76 ± 1.09	3.44 ± 1.33	2.30 ± 0.54	2.67 ± 1.26	3.30 ± 0.97
<b>18:1n5</b>	0.16 ± 0.06	0.16 ± 0.09	0.08 ± 0.07	0.16 ± 0.08	0.17 ± 0.02
<b>18:2n6</b>	0.62 ± 0.39	1.08 ± 0.36	0.48 ± 0.19	0.53 ± 0.28	2.65 ± 2.08
<b>18:2n4</b>	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.07	0.13 ± 0.11	0.17 ± 0.10	0.18 ± 0.05
<b>18:3n6</b>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<b>18:3n4</b>	0.18 ± 0.14	0.31 ± 0.06	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.12	0.20 ± 0.10
<b>18:3n3</b>	0.18 ± 0.11	0.22 ± 0.10	0.14 ± 0.08	0.19 ± 0.12	0.25 ± 0.10
<b>18:4n3</b>	0.32 ± 0.22	0.03 ± 0.05	0.14 ± 0.08	0.13 ± 0.12	0.11 ± 0.08
<b>18:4n1</b>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<b>20:0</b>	0.23 ± 0.11	0.14 ± 0.12	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.08	0.20 ± 0.10
<b>20:1n11</b>	1.10 ± 0.70	0.59 ± 0.12	0.49 ± 0.19	0.43 ± 0.26	0.81 ± 0.52
<b>20:1n9</b>	0.66 ± 0.50	1.17 ± 0.41	1.61 ± 0.67	1.67 ± 1.18	1.48 ± 0.68
<b>20:2n9</b>	0.24 ± 0.14 b	0.29 ± 0.24 b	0.92 ± 0.29 a	0.75 ± 0.52 a,b	0.22 ± 0.06 b
<b>20:2n6</b>	0.42 ± 0.28	0.65 ± 0.28	0.33 ± 0.09	0.38 ± 0.20	0.52 ± 0.17
<b>20:3n6</b>	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<b>20:4n6</b>	2.90 ± 1.40	2.11 ± 1.55	2.48 ± 0.63	2.20 ± 0.99	1.32 ± 1.11
<b>20:3n3</b>	0.11 ± 0.06	0.10 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.06	0.12 ± 0.04
<b>20:4n3</b>	0.19 ± 0.08	0.19 ± 0.17	0.06 ± 0.05	0.13 ± 0.16	0.16 ± 0.08
<b>20:5n3</b>	11.53 ± 1.71	6.80 ± 3.51	10.47 ± 2.01	10.29 ± 4.85	7.11 ± 3.09
<b>22:1n11</b>	0.34 ± 0.24 b	0.44 ± 0.14 b	0.02 ± 0.04 a	0.02 ± 0.03 a	0.80 ± 0.50 b
<b>22:1n9</b>	0.32 ± 0.20	0.15 ± 0.05	0.17 ± 0.08	0.21 ± 0.10	0.34 ± 0.21
<b>22:1n7</b>	0.31 ± 0.03	0.18 ± 0.20	0.21 ± 0.06	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.11
<b>21:5n3</b>	0.19 ± 0.17	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<b>22:4n6</b>	0.35 ± 0.23	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<b>22:5n6</b>	0.22 ± 0.16	0.17 ± 0.16	0.09 ± 0.08	0.08 ± 0.08	0.09 ± 0.15
<b>22:5n3</b>	1.16 ± 0.60	0.54 ± 0.42	0.85 ± 0.32	0.79 ± 0.48	0.48 ± 0.23
<b>22:6n3</b>	7.78 ± 3.81	5.34 ± 1.56	6.92 ± 3.12	8.95 ± 5.27	6.07 ± 1.88
<b>Saturados</b>	20.56 ± 7.67	16.65 ± 4.32	18.83 ± 5.53	19.32 ± 10.13	15.99 ± 3.15
<b>Monoenos</b>	21.56 ± 8.86	22.40 ± 7.10	15.37 ± 4.76	16.61 ± 7.26	23.43 ± 7.26
<b>PUFA</b>	27.46 ± 9.55	18.45 ± 7.40	24.70 ± 7.21	25.99 ± 13.82	19.93 ± 7.01
<b>n-3</b>	21.45 ± 6.53	13.21 ± 5.47	18.58 ± 5.63	20.52 ± 10.96	14.30 ± 4.85
<b>n-6</b>	4.51 ± 2.37	4.07 ± 1.62	3.38 ± 0.96	3.19 ± 1.50	4.58 ± 1.86
<b>n-9</b>	11.59 ± 4.94	13.94 ± 4.17	8.69 ± 2.87	9.47 ± 4.07	15.20 ± 4.82
<b>n-3HUFA</b>	21.17 ± 6.37	12.89 ± 5.33	18.44 ± 5.55	20.30 ± 10.80	13.94 ± 4.73
<b>n-3/n-6</b>	5.37 ± 1.77 a,b	3.23 ± 0.07 a	5.49 ± 0.15 b	6.22 ± 1.23 a,b	3.18 ± 0.22 a
<b>EPA/DHA</b>	1.78 ± 0.92	1.24 ± 0.45	1.62 ± 0.36	1.25 ± 0.24	1.19 ± 0.51
<b>AA/EPA</b>	0.24 ± 0.10	0.27 ± 0.13	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.18 ± 0.12
<b>AA/DHA</b>	0.38 ± 0.06	0.36 ± 0.24	0.38 ± 0.06	0.28 ± 0.09	0.24 ± 0.25
<b>Mon/n-3H</b>	0.99 ± 0.15 b	1.80 ± 0.24 a	0.83 ± 0.01 b	0.88 ± 0.18 b	1.72 ± 0.33 a
<b>Mon/PUFA</b>	0.77 ± 0.08 b	1.25 ± 0.15 a	0.62 ± 0.01 b	0.68 ± 0.13 b	1.21 ± 0.25 a
<b>Mon/Sat</b>	1.03 ± 0.06 b	1.33 ± 0.15 a	0.81 ± 0.02 c	0.91 ± 0.14 b,c	1.45 ± 0.17 a

### Actividad 3.4: Descripción morfológica y ultraestructural del sistema reproductor masculino.

El estudio de la morfología y ultraestructura del aparato reproductor se ha realizado mediante técnicas histológicas de microscopía óptica, electrónica de transmisión y electrónica de barrido y ha sido publicada por Siméo et al (2009).

El aparato reproductor masculino se encuentra alojado en el cefalotórax, en posición dorsal al hepatopáncreas. Está formado por un par de testículos unidos a sus correspondientes conductos deferentes, que vierten los productos seminales al gonoporo por medio de un conducto eyaculatorio. Su morfología y ultraestructura general se describe en la figura 1.

Los testículos se encuentran en la parte anterior del cefalotórax y están formados por un único túbulo seminífero enrollado sobre sí mismo, y envueltos por una capa de tejido conjuntivo. La pared del tubo seminífero presenta un epitelio secretor. En el interior del tubo podemos encontrar células en diferentes estados de maduración, organizadas en tres compartimentos, delimitados por una capa de tejido conjuntivo: uno con células germinales primordiales, otro con diferentes fases de la espermiogénesis y un tercero con espermatozoides, que se continúa con el conducto deferente.

El conducto deferente ocupa la mitad posterior del cefalotórax. Se trata de un conducto heterogéneo, con una pared formada por un epitelio secretor de altura variable, envuelto de una capa de tejido conjuntivo, y en cuya luz se pueden observar diferentes contenidos. En función de criterios morfológicos y funcionales, se puede dividir en tres partes:

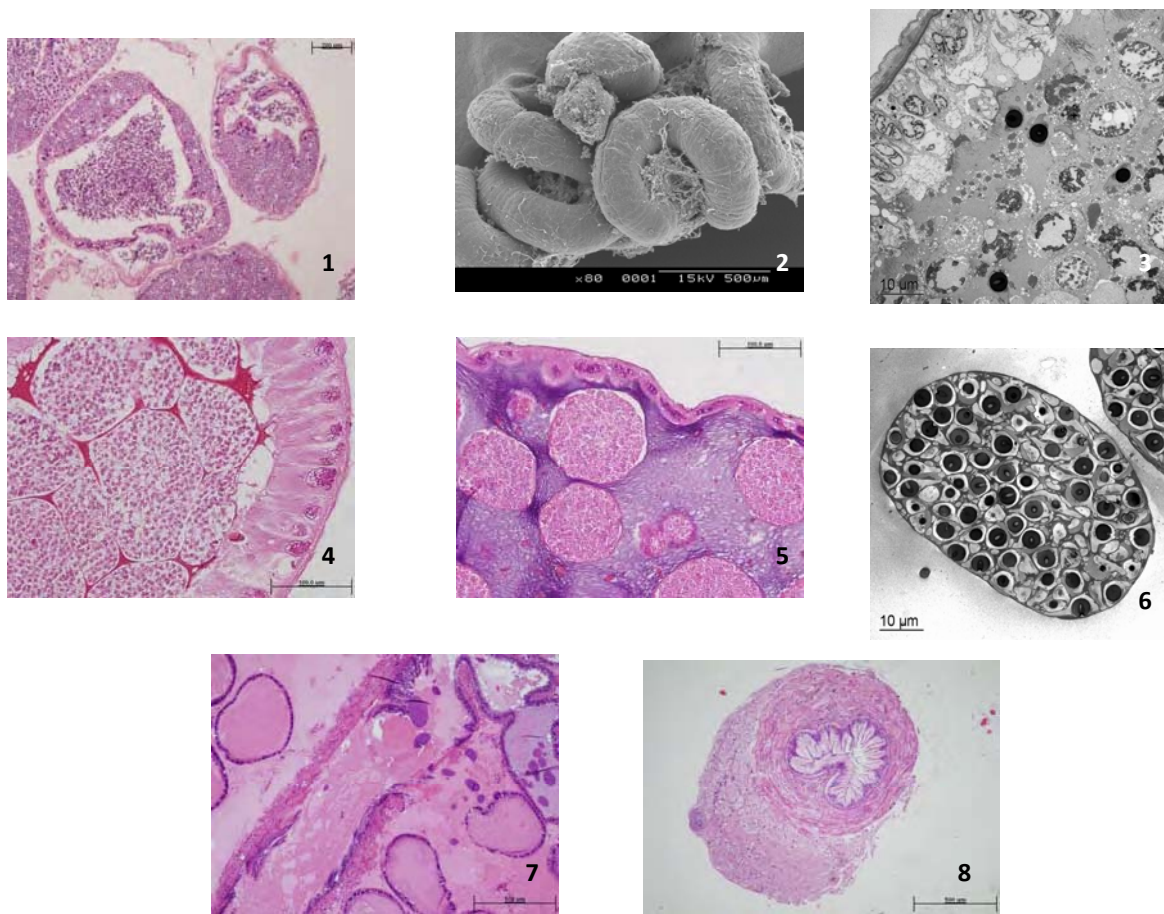
**Conducto Deferente Anterior:** a continuación del testículo, se trata de un tubo liso y enrollado sobre sí mismo en su parte anterior y sobre el que se desarrollan una serie de divertículos en la parte posterior, de un diámetro mayor que el testículo. Presenta un epitelio prismático altamente secretor, encargado de la secreción de dos sustancias de diferente naturaleza química que permiten la aglutinación de los espermatozoides e inician la formación de los espermátóforos.

**Conducto Deferente Medio:** se trata de un tubo recto que presenta gran número de divertículos de altura creciente. En su parte anterior, presenta un epitelio altamente secretor, donde se finaliza la formación del espermátóforo, mientras que en su parte posterior, la pared del conducto está formada por un epitelio cúbico, donde se almacenan los espermátóforos.

**Conducto Deferente Posterior:** presenta una glándula túbuloalveolar que se encarga de una secreción que será vertida al conducto deferente y que engloba a los espermátóforos que serán eyaculados durante la cópula.

Los espermátóforos y la secreción de la glándula del conducto deferente posterior son vertidos al gonoporo que se encuentra en el esternito correspondiente al quinto par de patas gracias al conducto eyaculatorio. Se trata de un conducto con una fuerte musculatura que envuelve un epitelio cuya luz se encuentra anastomosada, hasta el momento de la cópula, en el que se dilata para permitir el paso de los productos seminales.





**Figura 1.** Imágenes de microscopía óptica (MO) y electrónica (transmisión, TEM; barrido, SEM) de sistema reproductor masculino de la centolla. 1. Testículo, MO. 2. Testículo, SEM. 3. Testículo, TEM. 4. Conducto deferente anterior, MO. 5. Conducto deferente medio, MO. 6. Espermatóforo, TEM. 7. Conducto deferente posterior y glándula anexa, MO. 8. Conducto eyaculatorio y glándula andrógena, MO.

A nivel ultraestructural se realizó una descripción detallada en las diferentes regiones del conducto deferente y conducto eyaculador. La pared del conducto eyaculador está formada por 4 capas: una túnica adventicia externa de tejido conjuntivo, una capa de musculatura, una túnica propia y una capa epitelial interna. Esta estructura se mantiene constante aunque las diferentes capas pueden estar más o menos desarrolladas en función de la región del conducto deferente.

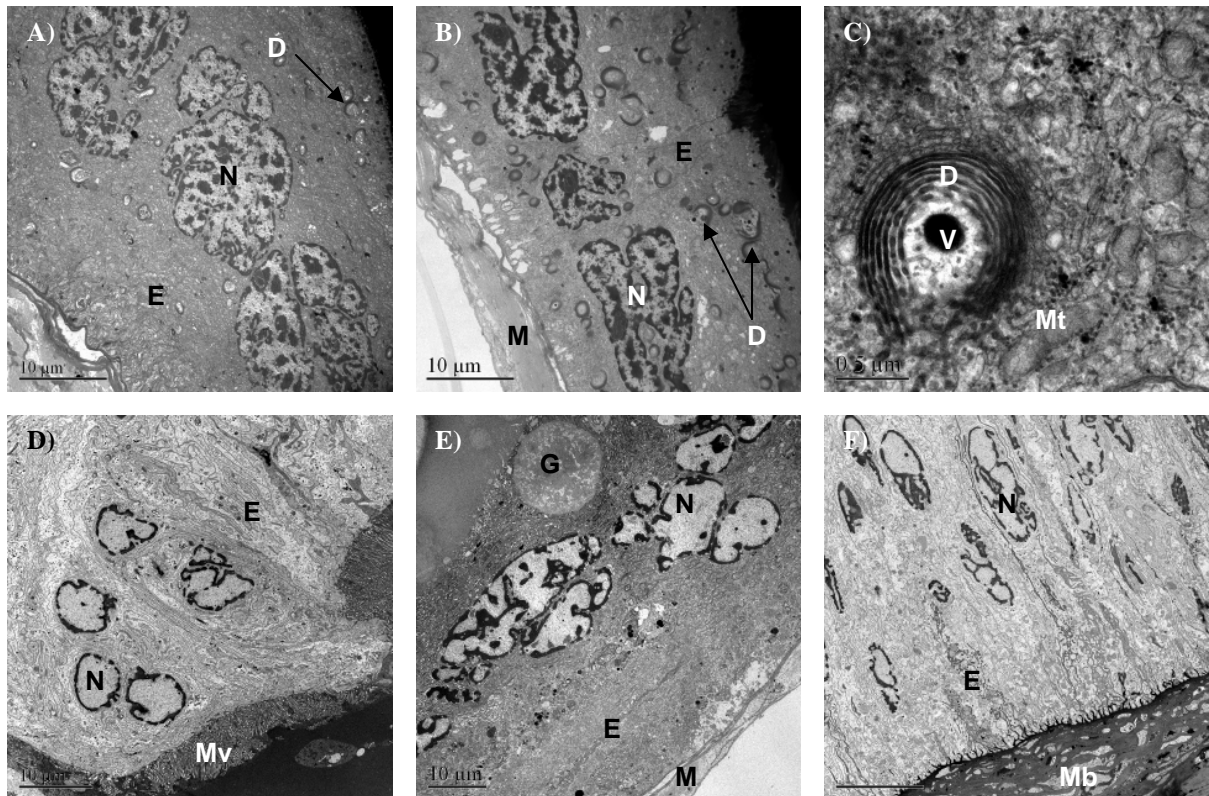
El conducto deferente anterior (CDA) presenta una capa de musculatura formada por haces aislados de musculatura estriada. La capa epitelial está formada por un epitelio monoestratificado de células prismáticas altamente secretoras (Figura 2A). Los núcleos de las células epiteliales son esféricos y basales, con la cromatina condensada en la periferia. En el citoplasma, el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi se encuentran bastante desarrollados. Los dictiosomas del aparato de Golgi producen unas vesículas de material altamente electrodenso que son vertidas en la zona apical de la célula. Estas secreciones son las responsables de la formación del espermatóforo. El extremo apical de las células presenta un borde en cepillo con microvilli cortos.



El conducto deferente medio (CDM) presenta una capa de musculatura formada por de fibras musculares dispersas. La capa epitelial está formada por un epitelio monoestratificado altamente secretor (Figura 2B). La altura de las células varía a lo largo del CDM, con células prismáticas en la zona anterior y células planas en la zona posterior. Los núcleos de las células epiteliales son muy prominentes y se encuentran localizados en la mitad basal. La cromatina aparece condensada en la periferia del núcleo. El citoplasma presenta gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso. Las mitocondrias son abundantes y generalmente se encuentran agrupadas entre las cisternas del retículo endoplasmático. El aparato del Golgi está altamente desarrollado, con múltiples dictiosomas, distribuidos por toda la célula, que producen vesículas de material muy electrodensos que son vertidas al conducto deferente (Figura 2C). Las secreciones del CDM envuelven los espermátóforos y de esta forma son almacenados hasta el momento de la transferencia a la hembra.

El conducto deferente posterior (CDP) es un conducto corto, que presenta una glándula accesoria muy desarrollada. El CDP presenta una capa de musculatura muy desarrollada, formada por múltiples capas de fibras de musculatura estriada orientadas en diferentes direcciones. La capa epitelial está constituida por un epitelio pseudo-estratificado con células altamente prismáticas (Figura 2D). Los núcleos de las células epiteliales son esféricos y la cromatina se encuentra condensada en la periferia. El citoplasma presenta pocos orgánulos. El retículo endoplasmático se encuentra muy reducido, el aparato de Golgi está poco desarrollado y las mitocondria son poco numerosas. La parte apical de las células presenta unos microvilli ramificados muy desarrollados. El bajo desarrollo de los orgánulos de síntesis (retículo endoplasmático y aparato de Golgi) indican que el CDP no presenta actividad secretora.

La glándula accesoria del CDP está formada por numerosos divertículos altamente ramificados. La pared de los divertículos presenta una capa de musculatura constituida por fibras musculares estriadas aisladas. La capa epitelial es monoestratificada y está constituida por un epitelio variable en altura (prismático a plano) debido a la pérdida del extremo apical de la célula como consecuencia de un modo de secreción apocrino. Las células prismáticas presentan un núcleo basal y lobulado, con la cromatina condensada en la periferia. El citoplasma presenta un retículo endoplasmático y aparato de Golgi relativamente desarrollados. Estos orgánulos de síntesis producen gran cantidad de material que se acumula en el citoplasma. Paralelamente a esta acumulación, la cromatina del núcleo aumenta su condensación. Finalmente, la cromatina se condensada en una fina capa muy electrodensa en la periferia del núcleo. En el citoplasma, el material sintetizado se ha agregado en el extremo apical de la célula en forma de un gránulo de grandes dimensiones, que es vertido a la luz del divertículo (Figura 2E). Como consecuencia, la célula pierde gran parte del citoplasma. La secreción del epitelio se almacena en la luz del divertículo hasta el momento de la transferencia a la hembra, en el que es vertido al CDP englobando los espermátóforos procedentes del CDM.

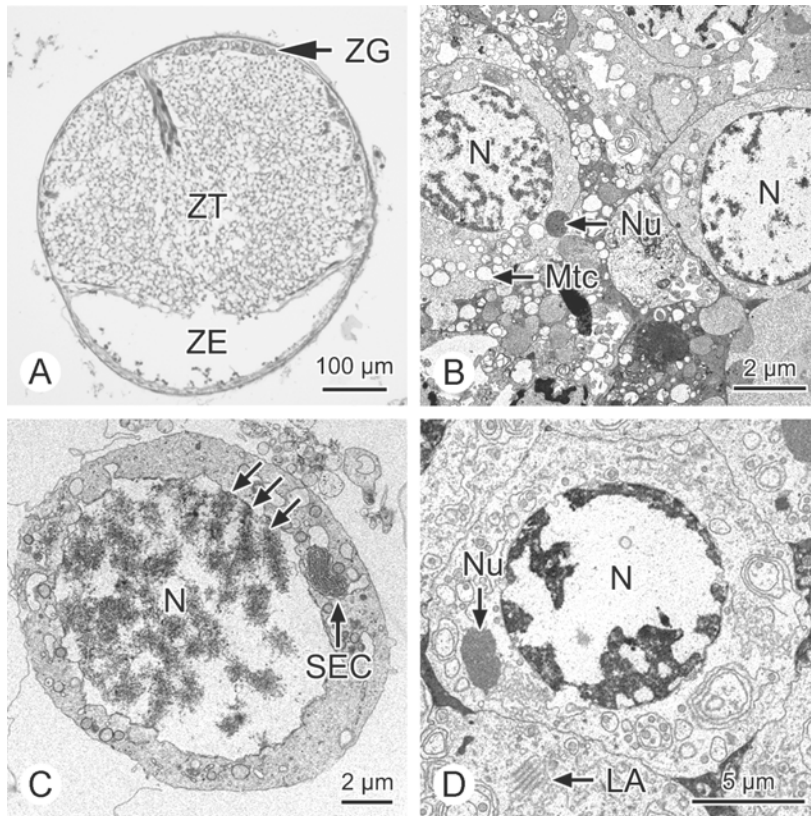


**Figura 2.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la pared de las diferentes regiones del conducto deferente. A) Conducto deferente anterior, B) Conducto deferente medio (CDM), C) Detalle de un dictiosoma de una célula epitelial del CDM, D) conducto deferente posterior (CDP), E) pared de la glándula del CDP y F) pared del conducto eyaculador. Abreviaturas: D: dictiosoma del aparato de Golgi, E: célula epitelial, G: gránulo, M: musculatura, Mb: membrana basal, Mt: mitocondrias, Mv: microvilli, N: núcleo, V: vesícula del aparato de Golgi. Escala: A, B, D, E, F: 10 µm, C: 0.5 µm.

El conducto eyaculador (CE) presenta una estructura semejante al CDP, con una capa de musculatura muy desarrollada formada por fibras musculares estriadas, orientadas en diferentes direcciones. La capa epitelial del CE está formada por un epitelio pseudo-estratificado (Figura 2F). Las células epiteliales presentan unos núcleos esféricos en la mitad basal con la cromatina está condensada en la periferia. El citoplasma contiene pocos orgánulos, principalmente mitocondrias y dictiosomas del aparato de Golgi de reducido tamaño. La ausencia de actividad secretora así como la morfología del conducto, con una musculatura muy desarrollada y luz anastomosada, indica que el CE se encarga de la transferencia de los espermátóforos embebidos en la secreción de la glándula accesoria hasta el gonoporo.

La espermatogénesis ocurre en los testículos. Su estudio ha sido publicado por Siméo et al. (2010a) y a continuación se resumen los principales resultados. Cada uno formado por un túbulo seminífero dividido en 3 zonas: germinal, de transformación y de evacuación (Fig. 3 A). Cada zona juega un papel diferente en la espermatogénesis. La zona germinal, localizada en un polo del túbulo seminífero, contiene las espermatogonias. La zona de transformación ocupa la zona central, y presenta diferentes estadios de maduración desde espermatocitos hasta espermatozoides, siendo, por lo tanto, la zona donde transcurre la mayoría de la espermatogénesis y donde se han centrado las observaciones. La zona de evacuación, en el polo opuesto a la zona germinal, contiene únicamente espermatozoides que son transportados al conducto deferente donde son empaquetados en espermátóforos.



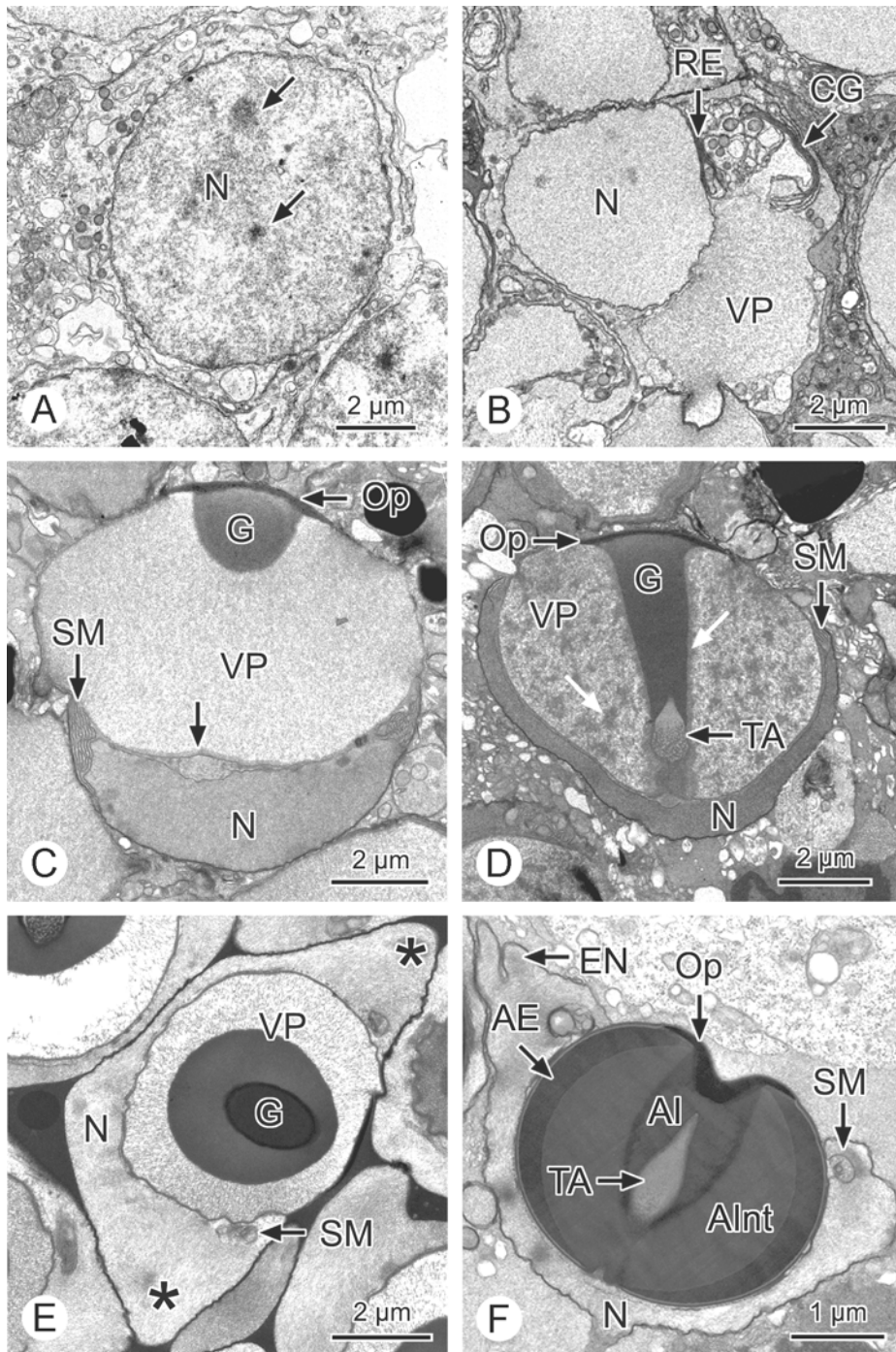


**Figura 3.** A. Túbulo seminífero (microscopia óptica, tinción de Mallory). Sección transversal dividida en 3 zonas: germinal, de transformación y evacuación. B-D. Espermatocitos (microscopia electrónica de transmisión). B, fase leptoteno; C: fase paquíteno: las flechas indican los complejos sinaptonémicos; D; fase diploteno.

Abreviaciones: LA: láminas anilladas; N, núcleo; Nu, *nucleolus-like body*; Mtc, mitocondrias; SEC, sistema de endomembranas concéntrico; ZE, zona de evacuación; ZG, zona germinal; ZT, zona de transformación.

Los espermatocitos (Figs. 3 B-C) son células esféricas con un núcleo voluminoso central, el cual presenta diferentes figuras típicas de los diferentes estadios de la primera división meiótica, como los complejos sinaptonémicos durante la fase paquíteno (flechas en Fig. 3 C). El citoplasma contiene mitocondrias, un *nucleolus-like body* o *nuage*, y un sistema de endomembranas (Figs. 3 B-C), que presenta unas cisternas aplanadas en disposición concéntrica y dilataciones laterales en la fase paquíteno (Fig. 3 C). Durante la fase de diploteno, el sistema de endomembranas adquiere su máximo desarrollo, presentando estructuras de tipo láminas anilladas (Fig.3 D). Tras la primera división meiótica, la fase de espermatocito secundario transcurre rápidamente, por lo que no ha sido posible obtener imágenes de este estadio.

Así, la descripción continua con la maduración de las espermátidas o espermiogénesis, proceso que se ha dividido en 3 fases (Fig. 4). La primera espermátida es esférica, con un núcleo voluminoso que contiene cromatina poco condensada (flechas en Fig.4 A). El citoplasma contiene unas pocas mitocondrias y un sistema de endomembranas poco desarrollado. El primer cambio que indica el paso a la espermátida intermedia es la decondensación de la cromatina, adquiriendo el núcleo un aspecto homogéneo (Fig. 4 B). En el citoplasma, el sistema de endomembranas se desarrolla y diferencia en el retículo endoplasmático y complejo o aparato de Golgi. Las vesículas producidas por el complejo de Golgi se fusionan en un polo de la espermátida, dando lugar a la vesícula proacrosómica, la cual contiene material granular poco electrodensamente distribuido (Fig. 4 B).



**Figura 4.** Espermioogénesis (microscopía electrónica de transmisión). A-E. Espermátidas. A. Primera espermátida: las flechas indican regiones de cromatina condensada. B. Espermátida intermedia. C-E. Sucesivos estadios de espermátida tardía. C: la flecha señala una capa de material granular en la base de la vesícula proacrosómica sobre la que se desarrolla el tubo acrosómico. D: las flechas blancas indican las agregaciones del material de la vesícula proacrosómica. E: los asteriscos indican las expansiones radiales del núcleo. F. Espermatozoide. Abreviaciones: AE, capa externa del acrosoma; AI, capa interna del acrosoma; Alnt, capa intermedia del acrosoma; CG, complejo de Golgi; EN, expansión nuclear; G, gránulo; N, núcleo; Op, opérculo; RE, retículo endoplasmático; SM, sistema de membranas; TA, tubo acrosómico; VP, vesícula proacrosómica.



Posteriormente, en el interior de la vesícula proacrosómica, aparece un gránulo electrodenso que se sitúa en el polo apical. El retículo endoplasmático y complejo de Golgi inician un proceso de degeneración, reduciendo su actividad y tamaño, dando lugar a un sistema de membranas que forma un anillo en la zona ecuatorial entre el núcleo y la vesícula proacrosómica. La espermátida tardía se encuentra altamente polarizada, con un núcleo en forma de media luna en un polo, y la vesícula proacrosómica esférica en el polo opuesto (Fig. 4 C). El citoplasma se encuentra muy reducido y contiene un sistema de membranas y mitocondrias simplificadas. En la vesícula proacrosómica, una banda muy electrodenso que dará lugar al opérculo, aparece sobre el gránulo apical. En la base de la vesícula, aparece una fina capa de material granular que envuelve una invaginación que dará lugar al tubo acrosómico del espermatozoide (flecha en Fig. 4 C) y que quedará envuelto por la extensión posterior del gránulo apical. Los cambios finales son la condensación concéntrica de los materiales de la vesícula alrededor del tubo acrosómico (flechas blancas en Fig. 4 D) y la extensión del núcleo, envolviendo la vesícula proacrosómica y desarrollando unos brazos radiales (asteriscos en Fig. 4 E).

El espermatozoide resultante (Fig. 4 F) presenta la típica estructura del grupo Brachyura, con un acrosoma globular, de estructura compleja dividida en 3 zonas, y un núcleo con 4- 5 expansiones radiales, que contiene cromatina ligeramente condensada. Un sistema de membranas se localiza en la base de las expansiones radiales y contiene mitocondrias degeneradas y microtúbulos. Detalles sobre la ultraestructura y funcionalidad del espermatozoide pueden encontrarse en Simeó et al. (2010b).

### Actividad 3.5: Ontogénesis del sistema reproductor y diferenciación sexual.

En los organismos con reproducción sexual, las células primordiales germinales (PGCs) se separan de la línea somática desde las primeras fases del desarrollo embrionario y forman las gónadas embrionarias que se desarrollarán hasta la maduración sexual del individuo, diferenciándose en gametos (Wylie 1999). *Vasa* ha sido caracterizado en algunas especies de interés acuícola (Fabioux et al. 2004, Aflalo et al. 2007, Nakkrasae y Damrongphol 2007, Nagasawa et al. 2009) para el control de la reproducción en cautividad.

El objetivo de este trabajo fue el aislamiento del gen *vasa* en la centolla, *Maja brachydactyla*, y la caracterización de su expresión durante las primeras fases del desarrollo postembrionario.

### **Muestras**

- Adultos: hepatopancreas (Hep), branqueas (G), corazón (H), ovario (Ov) i testículo (T) para la extracción de l'ARN, y músculo de los pereopodos para la extracción del ADN genómico (gDNA).
- Larvas y juveniles: zoea I (ZI), zoea II (ZII), megalopa (M) y primer cangrejo juvenil (C).

## Procesado de las muestras

- Extracción del ARN total con TRIZOL (Invitrogen), tratamiento con DNasa I (DNA-free, Ambion) y síntesis de cADN para la RT PCR, utilizando Superscript First-strand Synthesis kit (Invitrogen) con 1 µg de ARN.

## Aislamiento y clonaje de *Mb vasa*

- Aislamiento de *Mb vasa* con PCR utilizando 1 µL de cADN extraído del testículo, 200 µM de cada dNTP, 1 µM de cada encebador (Tabla 1).
- Condiciones de la PCR: 3 min a 94°C; 40 ciclos d'1 min a 94°C, 45 seg a 55°C, 1 min a 72°C; y extensión final de 5 min a 72°C.

## Seqüenciació gDNA

- Extracción del gADN con el kit de QIAGEN.
- Amplificación del gADN para la PCR con encebadores específicos (Tabla 1).

## Anàlisi filogenètic

- Àrbol filogenètic construïdo con el método de mínima evolución, con 1000 iteraciones con el software Mega 4.0 después del alineamiento de homólogos de *vasa* y *PL10* utilizando el algoritmo Clustal W.

## qPCR

- Método: cuantificación absoluta con SYBR green en un termociclador 7300 (Applied Biosystems) y utilizando  $\beta$ -actina (GenBank accession number: DQ 990372.1) como gen control.
- Amplificación: 1 µL de cADN, 0.5 µM de cada encebador (Tabla 1) y 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un volum final de 20 µL.
- Condiciones: 5 min a 95°C durant; 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 62°C, y 20 seg a 72°C, y ciclo final de dissociación.
- 3 qPCR de ambos genes con triplicados de todos los estadios (ZI, ZII, M y C) de cada puesta incluyendo el control interno y positivo (dos diluciones de ADN plasmídico).
- Anàlisi de datos: el nivel de expresión de *Mb vasa* de un estadio determinado corresponde a la media de la expresión relativa, calculada como la media de los 3 qPCR del número de copias de *Mb vasa* respecto al número de copias de  $\beta$ -actina, de las 3 puestas, y normalizadas por individuo.

## Anàlisi estadístic

- ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ) entre los estadios de desarrollo, seguido del test Holm-Sidak para las comparaciones múltiples.

Taula 1. Encebadores utilitzats per a l'aïllament, seqüenciació i expressió de *Mb vasa*.

Encebador	Sentit	Seqüència (5'→3')	Aïllament
dg Vasa F2	Forward	ACDGGMTCCGGMAAAACGGC	Aïllament
dg Vasa R3	Reverse	CCAATDCGRTGDACATAY	Aïllament
V79 F2	Forward	GAGAACTTGTCTGAGTATCTGCG	qPCR
V79R3	Reverse	AACACCTCGAATATCCAATCCTC	qPCR
BACTF1	Forward	CACGCCATCCTGCGTCTTGAC	qPCR
BACTR1	Reverse	GACCGTCAGGAAGCTCGTAGG	qPCR

1 TCAGGCAAGACAGCTGCCTTCCTATTGCCAATGCTGCATTACATACTAGA 50  
 51 GAATGACATAGAGCCATAGTATGAAGATGTGCCACGCCCTGCAGGAT 100  
 101 TGAATCTGGCCCAACCGAGAGCTGGCCATCCAGATCTACACAGAGGCC 150  
 151 CGCAAGTTTCTTTGGGACCGCTGTCAAGAAATGCTTGTATTTATGGAGG 200  
 201 AGTGGAAACCACTATCAGCTGAGGAATAGAGAGTGTCTTTCCCTTTG 250  
 251 TTTTCTTCT 300  
 301 TCAATTTGGTTAAGTAGTGTGTGACGCTTCCATCAGGATTTGGTCTGG 350  
 351 AAATATTCGCCCCCCCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 400  
 401 CT 450  
 451 CT 500  
 501 CT 550  
 551 GGGGGGAGGGGGGAGTAGAATAAATTTCTTTACTTCTCTCTCTCTCTCT 600  
 601 CTAACATCTGTAGTCAAGCAAAATTAAGAAAGAAACAATAATATGTGCG 650  
 651 TATGCCAGTGTGCTGTCTGTAATTCCTACCTCCATCACTCTCTATATT 700  
 701 TTTCTTTAATATGCTGTGGAGCCAAATTTGGTGTGCATTATTTGTCTCA 750  
 751 GCGAGAGTAGCAATGTTTATTTTCAGGAGCGAGGTTGTCTCAATATG 800  
 801 GCGACACACACAGGAAGCTGTCTTCTCTATAGGGCTTGGAAAGATCAG 850  
 851 CTGTGAAGGCTCAAGTCTCTGCTGTGATGAGGCTGATCGATGCTTG 900  
 901 ACATGGCTTCACTGACGACATGAGGAGCTTGTAGCAATCTCTGACATT 950  
 951 CCTCCTAAAGGGGAAACGCAAACTATGATGTTAGCCCAACTCCCAAG 1000  
 1001 GGAATGTGAGTGCAGTACATTTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 1050  
 1051 GTCGT 1100  
 1101 GTCCATGATCAGATGCTGCGTGTGCAACATTCGAAAGATTTTATATT 1150  
 1151 TTGACGGCAAGGGGTTCAATTCATCTTCAATAAACACTGTGGATGTGA 1200  
 1201 AGCAGGGAGAGAGTGGACATTCATGACAAAGTGTATGAAAGGGAAACG 1250  
 1251 TTCTTGTATCTGTCCAAATAGTAAACATCTTTGTAAATGATGTCACAGC 1300  
 1301 ACTACTCCCTCTCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 1350  
 1351 TTTGAGCAGCAGGTTTCAAGCATGTGCCCTGCGCTTCATGGCAACTACCT 1400  
 1401 TTTCTCTGTGCGGGACAAATGTTGTGCGAGCAACAGGACGTACATCAAA 1450  
 1451 CCATCATAGAAAGTTCGAAACACATGAGAGGATTTTGTGATATATTATT 1500  
 1501 TCGAAACCTTTGGAGGTTTGTCAAGTTTCAAGTAAATGATAGATTTGTCA 1550  
 1551 TGAATCTGTACAAAGGAAACCAATTTGAAGTACATTTTGTATATATTATT 1600  
 1601 ATTTTGTATTGAAAGTTTGCATATCAAGTTTAAATCTTTACAGCAAAAG 1650  
 1651 AGAAAGTGTGTGTGTGTGAAATGAAAGCTCAAGCAGATTTGTGGAA 1700  
 1701 AGCTATATCTCTGACAAACGCTTCCGGTCAAGCCACTCTTCAAGAGGTCG 1750  
 1751 CTCCAGAGCAGGCGAGGAGGCTTGTCTGCTTTAGATCTAGTCAAT 1800  
 1801 TCAAGTGTCTTGTGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 1850  
 1851 CCTAAAAAATAAATTCGTAAACATGTTAATGAGCACTCTGTCAATTA 1900  
 1901 ATCAGTGTGAAATCATCTTTGTATTGTGAAATGATGAAAGGCAATG 1950  
 1951 AATCCATGATGTTATCAGCCTTGTGTGTTAACATTTTATATATATGAT 2000  
 2001 TATAGATGCTGTATGTGATTTATATCTGTGTAAAGAGATTTATTTTG 2050  
 2051 CTGCGAGTTTATGTGATCACTCACTACGATCTACCGAAG 2100  
 2101 ACTGCCGAC 2109

Fig. 1. Seqüència parcial del gDNA de *Mb vasa*. Les parts codificants estan traduïdes a sota. Dominis de la família DEAD-box, subratllats; encebadors qPCR, groc.

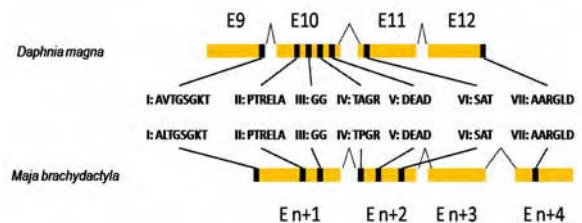


Fig. 2. Diagrama representant l'estructura del gDNA de *Mb vasa* i *Dmavas* (*D. magna*)



Un único fragmento de cADN de 865 pares de bases, denominado *Mb vasa* (GenBank accession number: EF 607281), fue aislado con cebadores degenerados. *Mb vasa* se encuentra dividido en 4 exons separados por 3 introns en el gADN (Fig. 1), dos de los cuales presentan 2 pares de microsatélites. La secuencia proteica deducida resulta en un fragmento de 293 aminoácidos, que contiene 7 de los dominios conservados en las proteínas de la familia DEAD-box, distribuidos principalmente en los exones n+1 i n+2, con una organización diferente a *Daphnia magna* (Fig. 2).

Los resultados del análisis BLAST, que muestra los mayores niveles de similitud con los homólogos de *vasa* de otros crustáceos decápodos, como *Litopenaeus vannamei* (55%) y *Fenneropenaeus chinensis* (54%), confirman el análisis filogenético (Fig. 3).

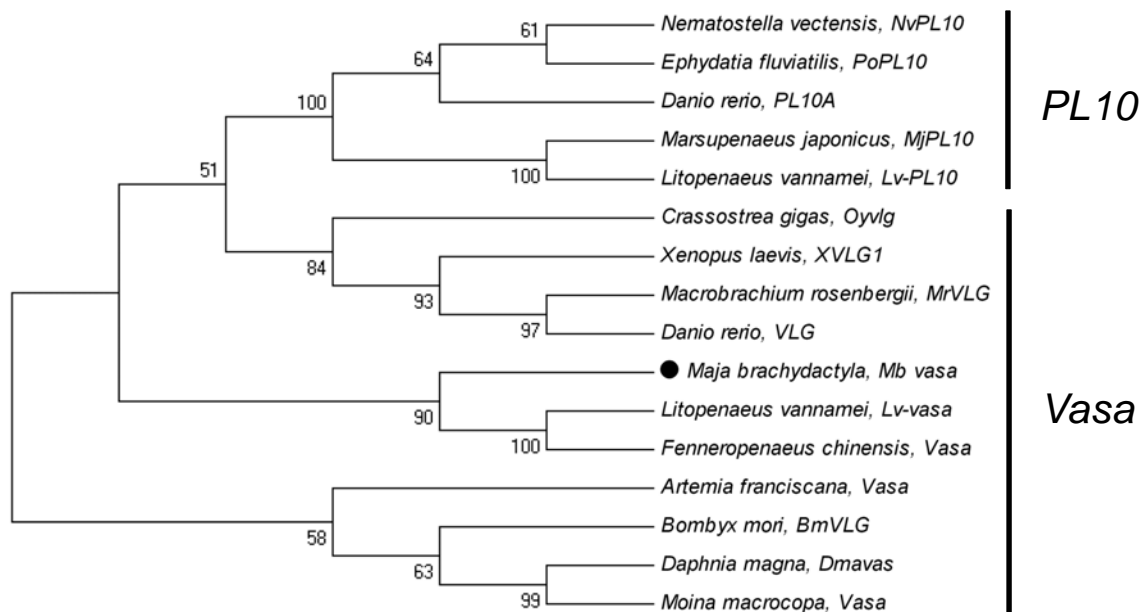


Fig. 3. Árbol filogenético de *vasa* y *PL10*.

*Mb vasa* se expresa específicamente en las gónadas (Fig. 4).  $\beta$ -actina se expresa en todos los tejidos somáticos y en las gónadas.

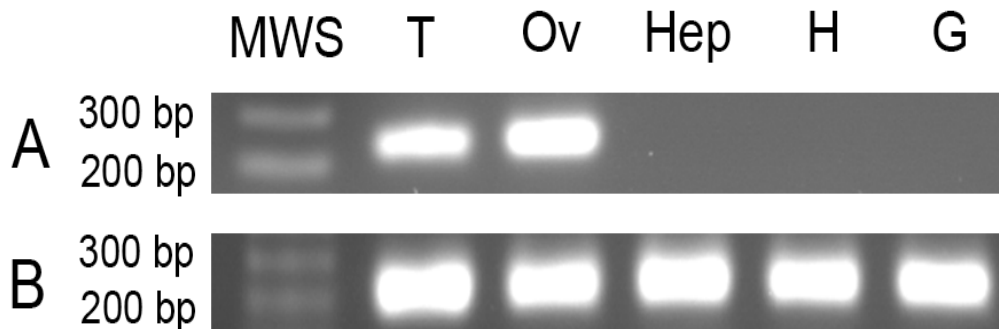
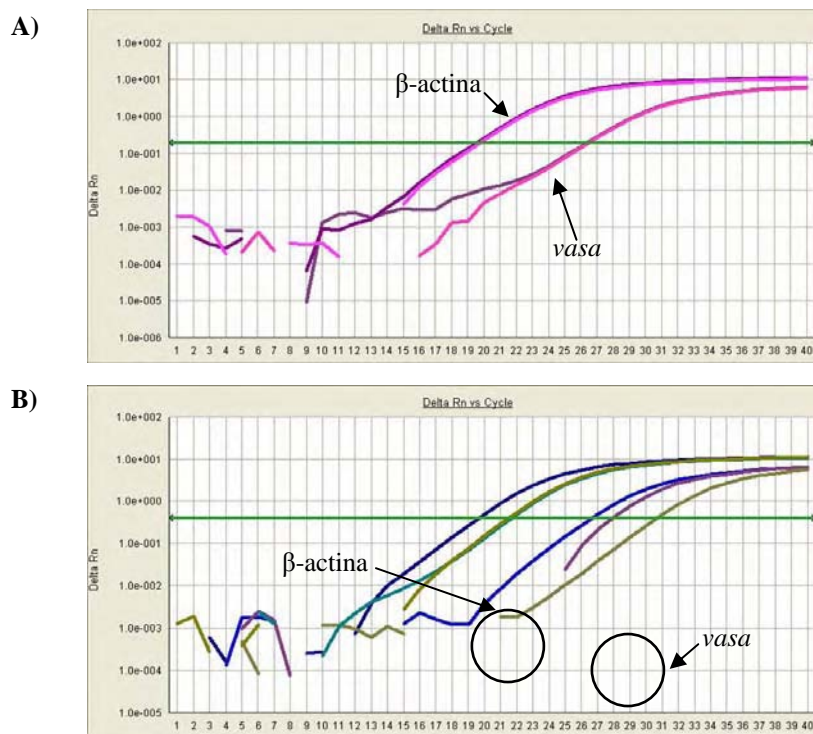
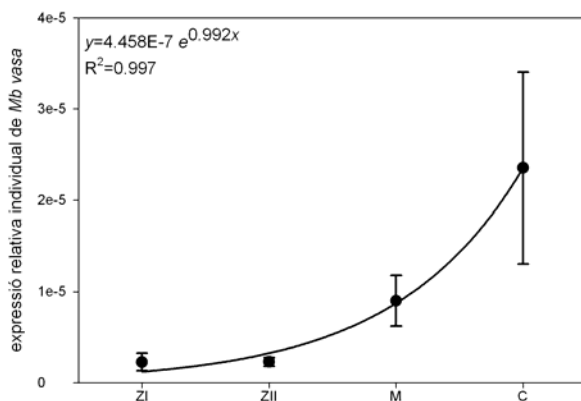


Fig. 4. Expresión tisular de *Mb vasa* y  $\beta$ -actina.

*Mb vasa* se expresa a niveles bajos pero detectables durante todos los estadios de desarrollo postembrionario (valoradas el número de copias respecto a la  $\beta$ -actina; Figura 5). *Mb vasa* se expresa en las larvas acabadas de eclosionar (ZI), y aumenta ligeramente durante los dos estadios posteriores larvarios. Con la metamorfosis a juvenil, la expresión es significativamente mayor respecto todos los estadios larvarios ( $F=10,777$ ;  $P= 0,003$ ). En conjunto, la expresión de *Mb vasa* durante las primeras fases del desarrollo postembrionario se ajusta a una curva de crecimiento exponencial (Fig. 6). Durante el desarrollo larvario de los braquiúros, las gónadas de las larvas difieren poco de la gónada embrionaria (Payen 1974, Lee et al. 1994), lo que explicaría el ligero incremento de la expresión de *Mb vasa* durante esta etapa.



**Figura 5.** A) gráfica de amplificación del gen *vasa* y  $\beta$ -actina en el ovario, B) gráfica de amplificación del gen *vasa* y  $\beta$ -actina en el testículo.



**Fig. 6.** Expresión de *Mb vasa* a lo largo del desarrollo de *Maja brachydactyla*.

#### Línea 4: Cultivo larvario.

Se ha llevado a cabo el cultivo larvario de *M. squinado* en Baleares y *M. brachydactyla* en Cataluña, Canarias y Andalucía alcanzando el primer juvenil o cangrejo 1. Los cultivos se han realizado en tanques diferentes en cada CA y se detallan en el punto 4.2. Todos los equipos consiguieron llevar a cabo con éxito el cultivo larvario, se probaron distintos tipos de tanques y de alimento. El uso de air-lifts y *Artemia* enriquecida parece ser la manera más simple de criar las larvas de centolla, aunque todos los experimentos realizados fueron satisfactorios. En este capítulo se incluye también parte de la experimentación con los primeros juveniles cuando no se adecuaron experimentos o estructuras específicas.

#### Actividad 4.1: Comparación del desarrollo larvario de *M. squinado* y *M. brachydactyla*.

Los estadios larvarios del májido *Maja squinado* son descritos a partir de material obtenido en el laboratorio de una hembra ovígera capturada en la Isla de Formentera (Mediterráneo occidental) en 2006 y descritos por Guerao et al. (2008). La morfología de las zoeas (I y II) y la megalopa es comparada con los estadios correspondientes de *Maja brachydactyla*, *M. goltziana* y *M. crispata*. Los estadios de zoea de *M. squinado* son muy similares a los correspondientes de *M. brachydactyla*, *M. goltziana* y *M. crispata* (Tabla I). La diferencia más importante se encuentra en la setación del tercer segmento del endopodio del segundo maxilípodo que es 4 en *M. squinado* y *M. brachydactyla*, y 6 en *M. goltziana* y *M. crispata* (Tabla I). La zoea I de *M. squinado* es prácticamente indistinguible de la de *M. brachydactyla*, mientras que la zoea II se diferencia únicamente por el número de setas del escafognatito de las maxilas (Tabla I).

Las megalopas de las cuatro especies también son muy similares; sin embargo, la presencia de espinas en el cefalotórax de *M. goltziana* y *M. crispata* las diferencia de *M. squinado* y *M. brachydactyla* (Rodríguez, 2002). La megalopa de *M. squinado* se diferencia de la de *M. brachydactyla* por la presencia de espinas coxales en los pereopodos 2-4 (Tabla II); estas espinas también están presentes en la megalopa de *M. goltziana* y *M. crispata*. La megalopa de *M. squinado* muestra un tamaño mayor (CL) que de *M. brachydactyla*.

Tabla I. Caracteres morfológicos y morfométricos de la zoea I y zoea II de *M. squinado* (presente estudio), *M. brachydactyla* (Clark, 1986), *M. crispata* (Rodríguez, 2002) y *M. goltziana* (Paula, 1988). En la zoea II sólo se muestran los caracteres que han cambiado respecto de la zoea I. Abreviaturas: a, astatecas; s, setas; sp, espinas; so, somitos; pv, margen postero-ventral; nd, sin datos.

Carácter	<i>M. squinado</i>	<i>M. brachydactyla</i>	<i>M. goltziana</i>	<i>M. crispata</i>
<b>Zoea I</b>				
RDL (mm)	1,90	1,95	2,03-2,15	1,4-1,5
CL (mm)	1,10-1,12	nd	1,00-1,08	nd
Cefalotórax pv (s)	1+5	1+6	1+5	1+5
Antenula (a+s)	4+1	4+2	4+1	4+0
Maxílula				
Endito coxal (s)	7	7	7	7
Endito basal (s)	7	7	7	7
Endopodio (s)	1,2+4	1,2+4	1,2+4	1,2+4
Maxila				
Endito coxal (s)	3+4	3+4	3+4	3+4
Endito basal (s)	5+4	5+4	5+4	5+4
Endopodio (s)	5	5	5	5
Escafognatito (s)	11-12+1	11-13+1	15	11-13+1
Maxilípodo 1				
Coxa (s)	1	nd	nd	1
Basis (s)	2+2+2+3	2+2+2+3	2+2+2+3	2+2+2+3
Endopodio (s)	3,2,1,2,5	3,2,1,2,5	3,2,1,2,5	3,2,1,2,5
Exopodio (s)	4	4	4	4
Maxilípodo 2				
Coxa (s)	0	nd	nd	0
Basis (s)	1+1+1	1+1+1	1+1+1	1+1+1
Endopodio (s)	0,1,4	0,1,4	0,1,6	0,1,6
Exopodio (s)	4	4	4	4
Pleon (s)	2,2,2,2,2	2,2,2,2,2	2,2,2,2,2	2+2,2,2,2,2
Telson (sp)	3+3	3+3	3+3	3+3
<b>Zoea II</b>				
RDL (mm)	2,10-2,17	2,10	2,03-2,27	1,61-1,72
CL (mm)	1,25-1,30	nd	1,19-1,27	nd
Cefalotórax margen			1+6	
pv (s)	1+7	1+7		1+6
Antenula (a+s)	7+0	6+3	7+2	8+0
Maxílula				
Endito basal (s)	9	9	9	9
Maxila				
Endito basal (s)	5+5	5+5	5+5	5+5
Escafognatito (s)	24-26	21	27	21-23
Pleon (s)	3,2+2,2,2,2,0	3,2+2,2,2,2,0	3,2+2,2,2,2,0	2+2,2,2,2,2,0

Tabla II. Caracteres morfológicos y morfométricos de la megalopa de *M. squinado* (presente estudio), *M. brachydactyla* (Clark, 1986), *M. crispata* (Rodríguez, 2002) y *M. goltziana* (Paula, 1988). Abreviaturas: sg, seta ganchuda; ver Tabla I.

<b>Caracter</b>	<i>M. squinado</i>	<i>M. brachydactyla</i>	<i>M. goltziana</i>	<i>M. crispata</i>
CL (mm)	1,87-1,92	1,40-1,50	1,79-1,91	1,72-1,90
Anténula				
Exopod (a+s)	0,8+1,4+1	0,8+1,4+1	9,5,1	0,8+1,4+1
Antena (s)	1,1,2-3,0,4,3	1,1,3,0,4,3	2,1,3,0,4,3	1,1,3,0,4,3
Maxílula				
Endito coxal (s)	11	11	10	11
Endito basal (s)	18	17	19	17
Maxila				
Endito coxal (s)	5+5	5+5	5+5	5+5
Endito basal (s)	6+6	6+6	6+7	6+6
Escafognatito (s)	42-45	36	48	38-42
Maxilípodo 1				
Endito coxal (s)	7	8	8	7
Endito basal (s)	12	12	15	12
Exopodio (s)	1,4	1,4	1,6	1,4
Epipodito	4	5	6	5
Maxilípodo 2				
Endopodio (s)	0,1,3,5	0,1,3,5	0,1,4,6	0,1,3,5
Maxilípodo 3				
Endopodio (s)	10,8,5,6,5	11,7,5,7,5	10,5,5,6,5	13,7,5,6,5
Epipodito (s)	10+3	7	8	10
Exopodio (s)	0,1+4	0,4	0,2+4	0,1+4
Pereiópodos 1-5				
Coxa (sp)	0,1,1,1,0	0,0,0,0,0	0,1,1,1,0	0,1,1,1,0
Isquio (sp)	1,1,1,0,0	0,1,1,1,0	0,1,1,1,1	1,1,1,0,0
Esternum (s)	6	6	nd	2
Pleon so 1-6 (s)	6,8,6,8,8,2	6,8,6,8,8,2	6,8,6,8,8,2	6,8,6,8,8,2
Telson (s)	2	2	2	2
Pleópodos				
Exopodio 1-4 (s)	12-13,12-13,12,11	12,12,10,10	11-12,12,12,10-11	11-12,11-12,10-11,9-10
Endopodio 1-4 (sg)	3,3,3,3	3,3,3,3	3,3,2,2	3,3,3,3
Urópodos (s)	5	5	5	5

Actividad 4.2: Alimentación larvaria I: Evaluación de diferentes tipos de alimento vivo.

### LIMIA-*Maja squinado*

El día 12 de junio de **2006**, dos meses después de la llegada al laboratorio, se obtuvo una puesta de 9.900 zoeas. La temperatura del agua en este momento era de 22,5°C.

Las zoeas se recogieron y, después de contarlas, se distribuyeron en un tanque de cultivo larvario de 1000 litros de capacidad a una concentración de 6,5 zoeas/L y en un tanque troncocónico de 350 litros de capacidad a 10 zoeas/L. Ambos tanques se equiparon con mallas de desagüe de 150 µm y se mantuvieron en circuito abierto con un caudal de renovación aproximado de 40 L/hora. A estos tanques se les añadió diariamente fitoplancton (*Nannochloropsis gaditana*) a una concentración aprox. de 400.000 cel/mL, rotífero (*Brachionus rotundiformis*) enriquecido con DHA protein selco a 0,5 r/ mL y metanauplius de *Artemia* enriquecida selco a 0,5 m/mL. Debido a la imposibilidad de controlar la temperatura del agua, el cultivo larvario se realizó en un rango de 22.5°C a 26°C. La luz se mantuvo en continuo durante las 24 horas.

El día 6 de edad comienzan a aparecer las primeras megalopas y a partir de este momento se observa un aumento de la mortalidad en el cultivo, que se atribuye al aumento de la temperatura a 24°C. En ningún momento se sifonó el fondo de los tanques para evitar el estrés derivado de esta operación. El día 13 de edad se observan los primeros individuos bentónicos. El día 18 de cultivo, la mortalidad es total.

En **2007** el LIMIA desarrollo mejores técnicas para el cultivo de larvas y juveniles de *M. squinado*. La metodología y los resultados obtenidos en supervivencia y crecimiento se describen a continuación.



Tanque larvario con upwellings



### Parámetros y estructuras empleadas.

Las zoeas se recogieron y, después de contarlas, se distribuyeron en un tanque de cultivo larvario de 1000 litros de capacidad, provisto de 6 upwellings de 15,5 L cada uno, tres de ellos con malla de 315  $\mu\text{m}$  y los otros tres con malla de 150  $\mu\text{m}$ . Este sistema de upwellings consiste en unos cilindros con malla en su base y un tubito en un lateral que le aporta aireación y flujo continuo de agua. El tanque se mantenía a una Tª de 18º C en circuito cerrado y mediante un dispositivo refrigerador conectado a un filtro biológico.

Las zoeas se estabularon a una densidad larvaria de 70 l/L en cada uno de los upwellings. El resto de las zoeas sobrantes se dispusieron en otro tanque larvario de 1000 L de capacidad, también equipado con malla de 150  $\mu\text{m}$  a una densidad de 89 l/L. Los dos tanques estuvieron expuestos a una fuente continua de luz.

Estas fueron las dos estructuras de cultivo empleadas hasta la transformación a centolla-1 (día 17). En este momento, y tras la baja supervivencia encontrada en el 2º tanque, los juveniles pasaron a un tanque de mayores dimensiones, para darles un mayor espacio, quedando distribuidos en un volumen de 800 L y a razón de 200 juveniles/m<sup>2</sup>. Esta manera no fue muy exitosa, y los juveniles supervivientes fueron trasladados a día 30 de edad al tanque de cultivo nº 1 que contenía los upwellings.

Con respecto al tanque de upwellings, éste ha seguido así hasta la fecha, con la peculiaridad que a día 40 de edad (y tras sucesivos contajes de supervivencia, y continuos episodios de canibalismo), se decidió destinar algunos de los ejemplares de que disponíamos, probando otra estructura de cultivo, con el fin de que dispusieran de más espacio, a unas cajas con el fondo de malla de 0,8 mm y dispuestas dentro un tanque rectangular con un volumen de agua de 800-1000 L.

Esta estructura tampoco resultó la mejor forma, y se idearon cajitas individuales, dentro del tanque rectangular también (dotadas de aireación, flujo de agua, filtro biológico y Tª 18º C), en las que se colocaron 30 juveniles a modo de prueba. Tampoco se logró supervivencia de esta manera, por un lado porque los juveniles lograban colarse hacia las celdillas de sus compañeros, y encontrábamos canibalismo, y por otro porque a pesar de conseguir en algunos casos la individualidad, también se dieron casos de mortalidad.



Cajitas individuales

El resto de los juveniles de centolla supervivientes hasta la fecha, siguen en los upwellings en el tanque larvario de 1000 L.

#### Alimentación de larvas y juveniles

Durante los 15 primeros días de edad, en los que las larvas pasaron por las fases de zoea I, zoea II, y megalopa, a los dos tanques se les añadió diariamente fitoplancton, a razón de 1% del volumen del tanque, quedando a densidad de 400.000 cél/ml de *Nanoclorosis gaditana* y 120.000 cél/ml de *Isochrysis galvana*. Cada día se suministraban dos tomas de metanauplios de artemia enriquecidos con Easy DHA Selco, ajustando cada toma a una dosis de 60 Mnp por larva.

En el primer tanque de upwellings, se mantuvo la alimentación anterior hasta el día 25 de vida, en el que los juveniles fueron alimentados también por mejillón y gamba a trocitos, y los metanauplios fueron suplementados progresivamente por artemia adulta. A los 38 días de edad la alimentación se componía exclusivamente de gamba y mejillón, y se renovaba cada 2 días.

En el 2º tanque y a partir del día 17 vida en el que los animales ya eran considerados juveniles, se optó por un cambio de dieta, a *Artemia* adulta enriquecida y mejillón en trozos pequeñitos.

Hasta la fecha, en el que los animales cuentan con algo más de 4 meses, la alimentación empleada sigue siendo gamba y mejillón congelado y troceado.

#### Muestreos y datos de supervivencia en las distintas fases

A medida que las larvas iban realizando el proceso de muda, e iban pasando al posterior estadio larvario, se fue calculando la supervivencia de cada upwelling en el tanque larvario de 1000 L, contando manualmente cada uno de los ejemplares de cada cubilete.

FASE (rango de días)	EDAD (Días)	SUPERVIVENCIA (%)					
		U1	U2	U3	U4	U5	U6
Zoea I (0-4)							
Zoea II (5-8)	5	97	93	95,6	89	80	75
Megalopa (9-15)	9	10,07	11,93	13,56	15,98	13,24	15,76
Juvenil (centolla-1) (16-24)	16	6,4	8	6,4	11	3,9	7,1
Centolla-2 (25-32)	25	5,3	7,33	5,31	9,58	2,83	6,17
Centolla-3 (33-42)	33	5,02	6,87	4,66	8,75	2,37	5,7
Centolla-4 (43- )	43	4,57	6,05	3,66	8,21	2,19	5,16



Zoea I



Zoea II



Megalopa



Juvenil (centolla-1)



Centolla-2 (25 días)



Centolla-3 (35 días)

Por otro lado, y a medida que fue siendo posible, se realizaron muestreos para el estudio de crecimiento larvario. Se calcularon pesos secos y frescos, y se guardaron individuos en formol, para el posterior calculo de longitudes.

## FASE LARVARIA

Pesos secos (mg)

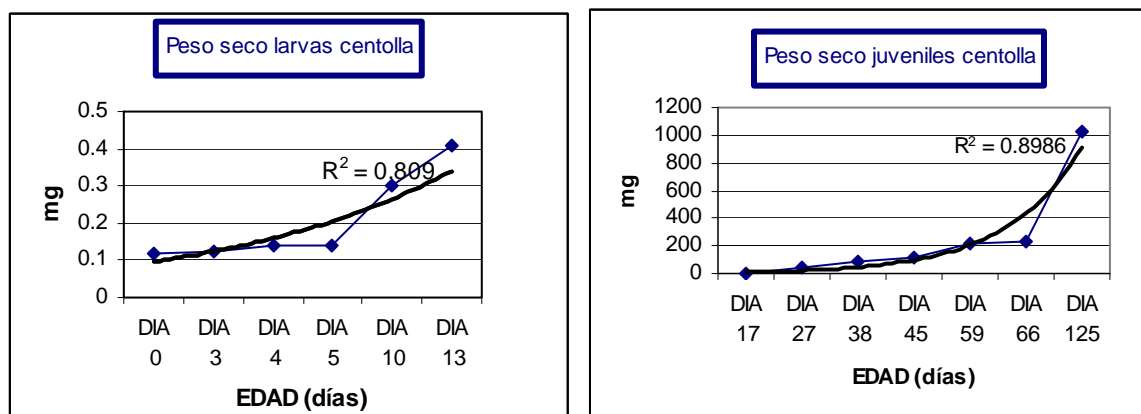
	DIA 0	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 10	DIA 13
PROMEDIO	0.12	0.122467	0.138267	0.140533	0.299967	0.411067
DESVEST	0	0.014236	0.010884	0.022712	0.05715	0.05091

## FASE JUVENIL

Pesos frescos (mg)

	DIA 17	DIA 27	DIA 38	DIA 45	DIA 59	DIA 66	DIA 125
PROMEDIO	4.52	36.46667	84.2	120.8	212.8333	232.2222	1027.1
DESVEST	0.76629	4.891148	18.70027	40.60323	101.3616	57.72516	450.7055

Las curvas de crecimiento de la fase larvaria y juvenil hasta la fecha se muestran a continuación:

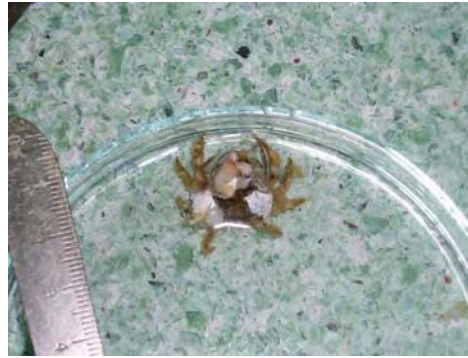


En cuanto a la metamorfosis que van experimentando las larvas de centolla, cabe decir que cronológicamente nuestra experiencia realizada a una temperatura de 18-19° C, cumple con lo publicado para *Maja brachydactyla* por Iglesias et al (2002) a una temperatura de entre 19-22 °C, puesto que el paso a megalopa tuvo lugar en 9 días, y la metamorfosis a juvenil bentónico ocurrió en 16 días (16-18 para Iglesias et al, 2002).

Por otro lado, la supervivencia obtenida este año durante nuestra experiencia, a los 25 días de edad, oscila entre el 2,8 y 9,5 %, mientras que Iglesias et al (2002) obtuvo para *M. brachydactyla*, a los 30 días de edad una supervivencia del 8 al 13 %. Urcera et al (1993), también para la especie atlántica, obtuvo una supervivencia a los 22-24 días del 18-46 %.

En cuanto a pesos durante el cultivo, ni Iglesias, ni Urcera publicaron datos. Y en cuanto a longitudes, en la actualidad (125 días de edad) nuestros individuos hacen una media de unos 12.5 ± 2.6mm, valor semejante al publicado por Iglesias et al (2002) para su cultivo intensivo, aprox 10-15 mm para la misma edad.





Juvenil de 125 días.

**2008. Métodos de cultivo: Parámetros y estructuras empleadas.**

Las zoeas se recogieron y, después de contarlas, se distribuyeron en diferentes sistemas de cultivo a lo largo de los cuatro meses que se obtuvieron puestas.

- Dos tanques de cultivo larvario de 1000 litros de capacidad, provistos de 9 upwellings de 15,5 L cada uno, todos ellos con malla de 315  $\mu\text{m}$  en la base del cilindro. El tanque se mantenía a una  $T^{\text{a}}$  de 20° C en circuito cerrado mediante un dispositivo refrigerador conectado a un filtro biológico. Dentro de estos tanques se ensayaron las distintas pruebas de cultivo desde zoea hasta cangrejo 2 que se relacionan más adelante.



Contaje y distribución de las zoeas en los upwellings de cultivo larvario.

- Dos tanques de 400 L de capacidad equipados con dos upwellings de 22 L de capacidad y 315  $\mu\text{m}$  de luz de malla en la base. El tanque funcionaba en circuito abierto a temperatura ambiente sin sistema de control de la temperatura.

## Ensayos realizados:

### **1) ENSAYO CON DIFERENTES ENRIQUECIMIENTOS.**

En este ensayo se probaron dos enriquecimientos distintos para metanauplios de *Artemia*, con los que se alimentaron las fases zoea y megalopa, con el fin de evaluar, los mejores resultados y diferencias en supervivencia y crecimiento, si las hubiera, en las distintas fases. Para ello, se utilizaron **6 upwellings**, en tres de ellos se alimentaron las zoeas y posteriormente las megalopas con metanauplios (Mnp) enriquecidos con EASY DHA SELCO, y en los otros tres con Mnp enriquecidos con la microalga *Rhodomonas salina*.

La densidad de cultivo en los seis upwellings se ajustó a 60 zoeas por litro, 930 zoeas por upw y **5580 zoeas en total**.

- **CONDICIONES** de cultivo:

- Duración de cultivo: 16-18 días.
- Tª cultivo: 20° C (máquina refrigeración).
- Fotoperíodo: Natural, 14h Luz/10 h Oscuridad.
- Densidad larvaria: 60 zoeas/litro.
- Enriquecimiento del medio con *Rhodomonas salina* 0,75.10<sup>5</sup>
- El caudal de entrada de agua en el tanque fue el siguiente:  
Desde el día 0 al día 9: 350 mL/min=50 % de renovación diaria (para mantener concentración de fitoplancton y la Tª establecida), a partir del día 9 hasta el 16, 700 mL/min= 100 % al día.

- **MUESTREOS**

- En cada fase zoea I (d0), Zoea II (d5), Megalopa (d9) y Centolla-1 (d16 -17).
- Muestreos de peso seco. De cada upwelling por triplicado (3 portas x 10 larvas en zoea y x 5 en megalopa y juvenil).
- Se tomaron muestras de 10 larvas en formol por upw, para posterior medida (CL y CW).
- En cada cambio de fase, (ZI, ZII, M y C) se contaron los individuos supervivientes en cada uno de los upwellings.

### **2) ENSAYO CON DIFERENTES DENSIDADES LARVARIAS**

En este ensayo se probaron diferentes densidades iniciales de siembra de larvas en upwellings, para evaluar de qué manera afecta a la supervivencia y crecimiento, en las distintas fases larvaria y bentónica. Para ello, se utilizó un tanque de 1000 L. Se probaron tres densidades larvarias iniciales diferentes con **9 upwellings** (triplicados) **30 zoeas/L** (1395 zoeas total), **60 zoeas /L** (2790 zoeas total), **120 zoeas /L** (5580 zoeas total). **TOTAL 9765**

La alimentación consistió para todos los tratamientos en metanauplios de *Artemia* enriquecidos con Easy DHA Selco, y se le añadió diariamente al tanque T-iso (cultivada) 1,2.10<sup>5</sup> y Nn (liofilizada) 4.10<sup>5</sup> cel /mL.

- **CONDICIONES** de cultivo:

- Duración de cultivo: 16-18 días.
- Tª cultivo: 20° C (máquina refrigeración).
- Fotoperíodo: Natural, 14h Luz/10 h Osc.
- El caudal de entrada de agua en el tanque fue el siguiente:



Desde el día 0 al día 9: 350 mL/min=50 % de renovación diaria (para mantener concentración de fitoplancton y la T<sup>a</sup> establecida), a partir del día 9 hasta el 16, 700 mL/min= 100 % al día. Las concentraciones de presas se variaron según la densidad larvaria, alimentando a 60 mnp/zoea.

- **MUESTREOS**

- En cada fase zoea I (d0), Zoea II (d5), Megalopa (d9) y Centolla-1 (d16-17).
- Muestreos de peso seco. De cada upwelling por triplicado (3 portas x 10 larvas en zoea y x 5 en megalopa y juvenil).
- Se tomaron muestras de 10 larvas en formol por upw, para posterior medida (CL y CW).
- En cada cambio de fase, (ZI, ZII, M y C) se contaron los individuos supervivientes en cada uno de los upwellings.

### **3) ENSAYOS DE CO-ALIMENTACION CON PIENSO Y PRUEBAS DE DESINFECCIÓN DE ZOEAS.**

Se realizaron unas primeras pruebas de co-alimentación al 50% pienso de langostino y 50% metanauplius de *Artemia* en dos upwelling de 22 L situados en un tanque troncocónico de 400 L de capacidad en circuito abierto y a temperatura ambiente con las mismas condiciones de cultivo que las alimentadas solo con *Artemia*. A pesar de no tener triplicados ni ser pruebas comparables, los resultados se adjuntan en la tabla como indicativas.

Se realizó también un estudio de dos desinfectantes Cloramina T y Oxaqua con el objeto principal de evaluar la resistencia de las zoeas a la desinfección. Los resultados de supervivencia a zoea II (Tabla III) indicarían que la utilización de este tipo de desinfectantes mejora la supervivencia. Deberán realizarse más ensayos para corroborar esta afirmación.

## **RESULTADOS**

La supervivencia de las puestas del 2008 fue mucho peor que las obtenidas el año 2007 ( a los 25 días de edad entre un 2,8 y un 9,5%), en todos los estadios de desarrollo, en principio lo atribuimos al transporte y al estado de las hembras obtenidas en Córcega y confiamos que las segundas puestas serían de mejor calidad. Por eso a la vista de los primeros malos resultados, los escasos individuos supervivientes de los upwellings se juntaron con la intención de comenzar de nuevo la prueba con otra puesta y aprovechar los individuos supervivientes para las pruebas de pre-engorde de juveniles.

La tabla III muestra los diferentes ensayos realizados y las supervivencias (%) obtenidas en estos en la fase de zoea ya que las supervivencias a megalopa y cangrejo 1 fueron tan bajas que no se han tenido en cuenta. La mejor puesta sembrada fue la del 16 de agosto con una supervivencia media total en la fase de megalopa de 6,2%. La rotura definitiva del equipo de refrigeración durante la primera quincena de septiembre con una subida de 2,5 °C en 24 horas y 1,5°C más en las siguientes produjo la mortalidad casi total de esta puesta.

PRUEBAS LARVIARIAS CENTOLLO 2008														
INICIO	PRUEBA LARVIARIA	♀	Tª MEDIA	FASE	SUPERVIVENCIA (%)									OBSERVACIONES
					U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	
21/05/2008	ENRIQUECIMIENTO	H1	20,6±0,3	zoea II	34,9	4,8	42,4	27,7	23,2	30,5				1, 2,3:Rhod. 4, 5,6:Selco.
21/05/2008	DENSIDADES	H1	20,48±0,4	zoea II	5,6	14,5	21,8	44,5	15,2	41,2	39,7	34,9	59,4	1,2,3: 30 larvas/L. 4,5,6: 60 larvas/L 7,8,9: 120 larvas/L
27/05/2008	ENRIQUECIMIENTO	H4	20,6± 0,4	zoea II	24,8	46,12	28,65	48,1	40,7	40,7	2,3	44,17		1, 2, 3,4:Rhod. 5, 6, 7,8:Selco.
27/05/2008	DENSIDADES	H4	20,7±0,7	zoea II	9,3	0	33,76		40,7	40,7	2,3	44,17		1,2,3: 120larvas/L 5,6,7,8: 60 larvas/L
27/05/2008	SELCO + PIENSO	H4	21,1± 0,4	zoea II	0	0								I2
05/06/2008	SELCO + PIENSO	H5	21,1± 0,4	zoea II	9,8	9								I2
05/06/2008	SELCO +CL-t y OXAQ	H5	21,1± 0,4	zoea II	46,5	36,7								U1 CL-t; U2 OXAQ (I3-I4)
05/06/2008	ENRIQUECIMIENTO	H5	20,9± 0,6	juvenil-1	1,2	1,6	1,7	0,8	0	0,6	0,48	0,96		solo SELCO
25/06/2008	ENRIQUECIMIENTO	H2	21,5±1,4	zI y zII	0	0	0	0	0	0	0	0		1,2,3,4:Rhod. 5,6,7,8:Selco.
16/08/2008	SELCO	H5	21,3±1,7	Mg	6	4,5	3,3	7	8,3	7,9	7,7	5,26	6,63	
16/08/2008	50% SELCO + 50% PIENSO	H5	20,8±1,4	Mg	4,5	6,3	4	4,6	6,42	8,6	9,36	6,7	4,7	

Tabla III. Relación de ensayos realizados con las distintas puestas obtenidas y los resultados de supervivencia obtenidos en la fase que se indica.

## ***Maja brachydactyla*-IRTA**

En el IRTA en 2006 ya se optimizó la densidad de presa y de larvas con metanauplios de *Artemia* enriquecidos con Super Selco (INVE, Bélgica) en aguas verdes (*Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*) y dichos resultados fueron publicados por Andrés et al. (2007).

Desde el inicio, se evitó el uso del rotífero como parte inicial de la dieta larvaria en el cultivo de *M. brachydactyla* debido al tamaño y voracidad que presentan las larvas recién eclosionadas (ZI) de esta especie, capaces ya de atrapar e ingerir nauplios de *Artemia* sin necesidad de pasar primero por presas de menor tamaño. Así, se simplifica la alimentación desde el punto de vista productivo, ya que el cultivo del rotífero es caro, laborioso e inestable (sujeto a disminuciones drásticas de población, muchas veces imprevisibles).

De este modo, la actividad se centró en la valoración de la eficacia de los nauplios de *Artemia* enriquecidos y sin enriquecer como alimento para las larvas desde el primer estadio (ZI recién eclosionadas) hasta el primer juvenil (cangrejo 1: C1) mediante la evaluación de su supervivencia, crecimiento (peso y talla) y contenido bioquímico (proteínas, lípidos y carbohidratos) en cada estadio de desarrollo.

## **Material y métodos**

### Origen de las larvas

Las larvas recién eclosionadas se recogieron en colectores preparados para tal fin situados en la salida de agua de los tanques de reproductores. Después del recuento de larvas y la recolección de muestras iniciales, las larvas fueron repartidas en los tanques de cultivo.

### Condiciones para el cultivo larvario

Las larvas se distribuyeron en cubiletes (cilindros de PVC de 35L con fondo de malla de 150  $\mu$ m) entre los tres tanques de cultivo de que dispone el centro. Cada tanque tiene capacidad para nueve cubiletes y cada cubilete tiene aireación independiente y una estructura de malla que permite la fijación de las larvas durante su desarrollo. La densidad de cultivo fue de 60 larvas/L (2100 larvas/cubilete), con una temperatura de 18°C; salinidad de 36‰ y foto período natural.

Las larvas fueron sometidas a tres tratamientos de alimentación distintos, distribuyéndose en cada tanque, tres cubiletes por cada tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Dieta a base de nauplios de *Artemia* (NA) durante todo el desarrollo larvario.
- Dieta a base de nauplios de *Artemia* enriquecidos (NAE) durante todo el desarrollo larvario.
- Dieta a base de nauplios de *Artemia* durante todo el desarrollo larvario con complemento de larvas de poliquetos en la fase de megalopa (NAP).

### Muestreo de las larvas

Para cada estadio en fase de intermuda (ZI a día 2 $\pm$ 1, ZII a día 7 $\pm$ 1 y Megalopa a día 12 $\pm$ 1) así como para larvas recién eclosionadas (ZI<sub>0</sub>), se tomaron muestras para análisis bioquímicos (2 eppendorfs para análisis de proteínas, carbohidratos y lípidos, guardados a -80°C) y biométricos (6 replicas x 5 larvas para peso seco y 10 larvas para medidas de longitud y anchura de caparazón). Las muestras se tomaron

para cada cubilete, así, por cada tratamiento y estadio, las muestras se obtuvieron por triplicado. Las larvas fueron lavadas en agua destilada y secadas en papel de filtro en cada muestreo.

### Análisis de muestras

**Peso seco:** se tomo el peso fresco (húmedo) de 5 larvas sobre portaobjetos previamente pesados. Después de 24h en una estufa a 60°C, los portaobjetos se volvieron a pesar y se determinó el peso seco individual para cada estadio y cada tratamiento.

**Talla:** los datos se obtuvieron mediante análisis de imagen de fotos obtenidas a través de una lupa binocular a partir de diez larvas por cada cubilete. Se midió la longitud del caparazón (Carapace length, CL) y su anchura (Carapace width, CW)

**Análisis bioquímicos:** Los análisis de contenido proteico se realizaron siguiendo el método de Bradford, M., 1976 y los carbohidratos se cuantificaron siguiendo el protocolo de Dubois, M. et al, 1956. La valoración de lípidos totales se realizó por gravimetría, siguiendo el método de Folch, J.M. et al. 1957.

### Resultados y discusión

Los resultados de los análisis biométricos y bioquímicos se resumen en la siguiente tabla:

	Supervivencia (%)			Peso Seco Ind. (µg)			Proteínas (µg/mg)			Carbohidratos (µg/mg)			Lípidos (µg/mg)		
	ZI	ZII	M	ZI	ZII	M	ZI	ZII	M	ZI	ZII	M	ZI	ZII	M
NA	87.9±1.0	62.6±6.6	30.2±8.3	119±20	217±11	468±70	355±14	378±62	375±78	121±41b	128±47	109±25 b	128±18	172±24	178±19 a
<b>Dieta</b>															
NAE	86.8±11.6	58.6±3.0	25.3±13.9	127±60	212±90	519±27	334±37	422±34	387±88	75±23 a	136±45	109±39 b	127±09	213±15	288±30 b
NAP	Nd	nd	37.8±4.0	nd	nd	478±13	nd	nd	451±47	nd	nd	66±09 a	nd	nd	203±14 a

En general, se observó un mejor rendimiento en el tratamiento con nauplios enriquecidos (NAE) respecto al de nauplios no enriquecidos (NA), tanto a nivel de crecimiento en peso como bioquímico (contenidos proteico y lipídico) a partir del segundo estadio larvario (Zoea II). A nivel de supervivencia, no se apreciaron diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Los poliquetos, se presentan en principio como un buen complemento a los nauplios de *Artemia* en las megalopas, ya que parecen aumentar su supervivencia y contenido proteico. Sin embargo, sus niveles de significación no son importantes comparados con la dieta a base de nauplios enriquecidos (solo en niveles de carbohidratos en megalopas, ver tabla anterior) y su obtención para grandes volúmenes de cultivo no rentable.

En vista de los resultados, cabe considerar la dieta a base de nauplios de *Artemia* enriquecidos como la más adecuada para el cultivo larvario de *M. brachydactyla* en condiciones de cultivo intensivo, debido a su buen rendimiento a lo largo de todo el desarrollo y su sencilla producción en masa respecto a la de otras presas vivas (rotífero, larvas de poliquetos, etc.).

### 2007. Experimento de inanición.

Las larvas recién eclosionadas fueron transferidas a los tanques de cultivo larvario donde se sometieron a 5 tratamientos distintos:

Control positivo (C+): larvas alimentadas desde día 0 (eclosión) en adelante a base de *Artemia* enriquecida (60 metanauplios por larva), durante todo el desarrollo larvario, hasta la metamorfosis a juvenil (día 20).

Control negativo (C-): larvas sometidas a ayuno desde día 0 (eclosión) hasta día 10.

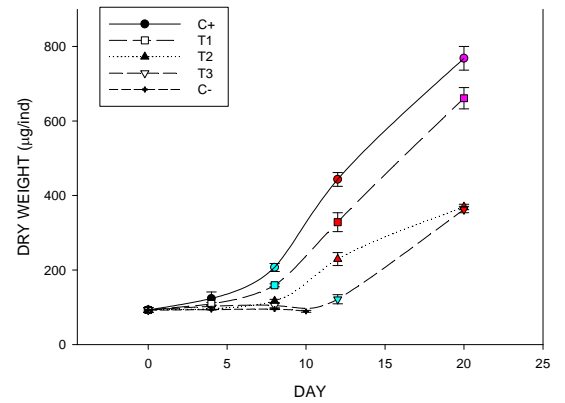
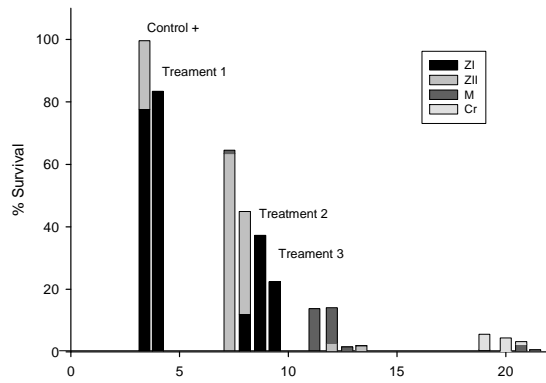
Tratamiento 1 (T1): larvas alimentadas desde día 2 en adelante a base de *Artemia* enriquecida (60 metanauplios por larva), durante todo el desarrollo larvario, hasta la metamorfosis a juvenil (día 20).

Tratamiento 2 (T2): larvas alimentadas desde día 4 en adelante a base de *Artemia* enriquecida (60 metanauplios por larva), durante todo el desarrollo larvario, hasta la metamorfosis a juvenil (día 20).

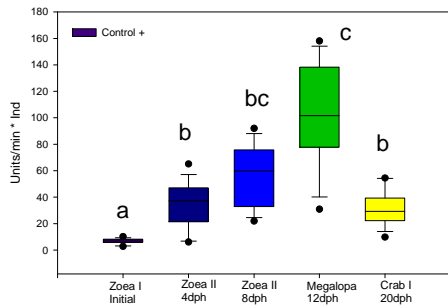
Tratamiento 3 (T3): larvas alimentadas desde día 6 en adelante a base de *Artemia* enriquecida (60 metanauplios por larva), durante todo el desarrollo larvario, hasta la metamorfosis a juvenil (día 20).

La densidad de cultivo se mantuvo en todos los casos a 60 larvas/L, la temperatura fue de  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  y la salinidad de  $36\pm 1\text{‰}$ . Los días de muestreo establecidos fueron: días 4, 8, 12 y 20 después de la eclosión (días estimados para muestrear las fases intermuda de cada estadio –ZI, ZII, M- y primer juvenil, respectivamente en nuestras condiciones estándar de cultivo). En los muestreos, se determinó la supervivencia y estado de desarrollo de cada tratamiento y se tomaron muestras para analizar su crecimiento, (talla y peso) y su contenido en enzimas digestivos ((proteasas totales, tripsina, amilasas y esterases inespecíficas). Los análisis de los enzimas digestivos se realizaron en una única larva por fluorimetría en colaboración con los doctores F.J. Moyano y M. Díaz de la Universidad de Almería.

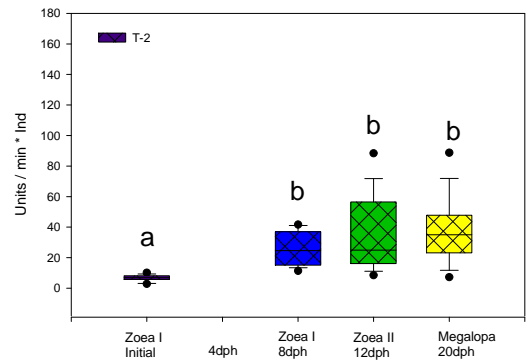
Las larvas sometidas a ayuno sobrevivieron hasta día 10, pero no consiguieron mudar a ZII, manteniéndose en el primer estadio larvario hasta la muerte. Las larvas control, obtuvieron la mayor supervivencia a día 8 comparada con el resto de tratamientos, pero sin embargo, en los muestreos posteriores (día 12 y 20), las larvas de los tratamientos 1 y 2 (retraso de la alimentación en 2 y 4 días respectivamente) se recuperaron mostrando la misma supervivencia que el control (incluso mayor), no siendo así en larvas del tratamiento 3 (no alimentadas hasta día 6), que a día 12 mostraban ya una baja supervivencia y un retraso en el desarrollo, puesto que la mayoría de ellas se encontraban aún en el segundo estadio. Así pues, se concluye que las larvas que no se alimentan sufren un retraso en el desarrollo, que consigue superarse si se vuelven a alimentar en un periodo de 2 días.



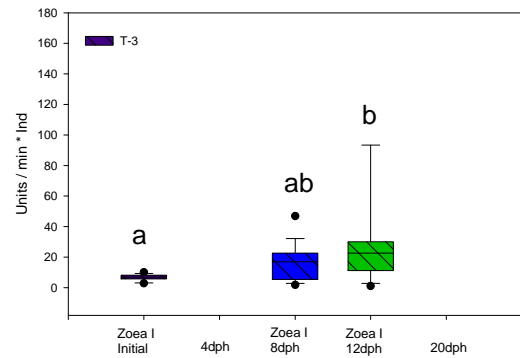
C+



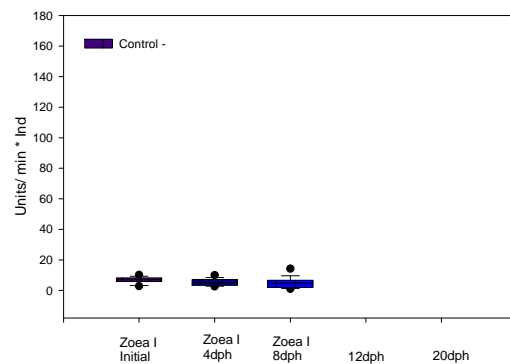
T2



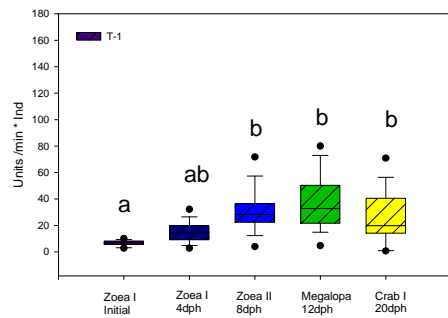
T3



C-



T1





Los análisis enzimáticos (proteasas totales, tripsina, amilasas y esterases inespecíficas) confirman estos resultados y demuestran que la amilasa es el mejor indicador nutricional en esta especie, cuyos resultados se exponen en la página anterior.

### ***Maja brachydactyla*-ICCM**

En el ICCM durante finales de **2006** principios de 2007 se realizaron varios experimentos para definir un protocolo de cultivo larvario con las algas de qué disponen. En ellos, han comparado resultados entre el uso de *Artemia* enriquecida con fitoplancton del género *Rhodomonas salina*, *Artemia* enriquecida con *Easy Selco* y *Artemia* recién eclosionada. El mejor resultado se obtuvo con metanauplios de *Artemia* enriquecida 24 horas con *Rhodomonas* (Figura 1), donde conseguimos un 26,9% de supervivencia final en el paso del estadio megalopa a juvenil, por lo que utilizaremos este método de enriquecimiento en futuras experiencias de cría larvaria para obtención de juveniles (para más datos, nos referimos a la comunicación “*Supervivencia de larvas de centollo Maja brachydactyla* Balss, 1922 alimentadas con dos dietas diferentes a base de *Artemia*”, publicada en el XI Congreso Nacional de Acuicultura).

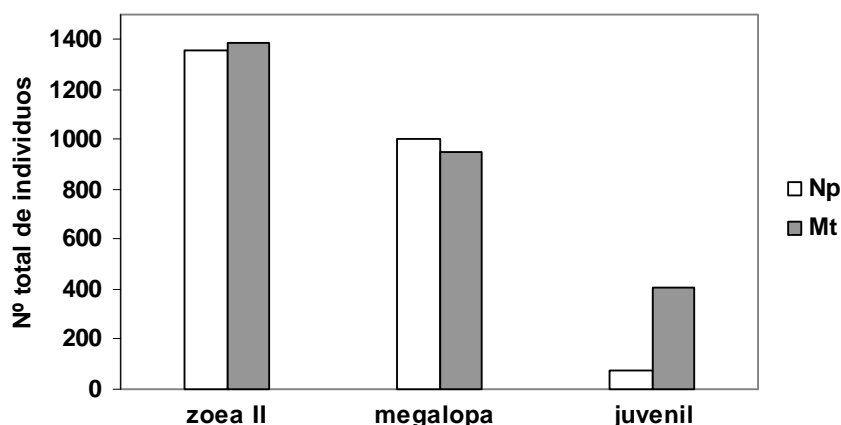


Figura 1. Número de individuos supervivientes en cada cambio larvario en los dos tratamientos.

Además, el ICCM ha probado con distintos sentidos de flujo de entrada de agua en los tanques de cultivo larvario: El diseño experimental presenta la entrada de agua desde el fondo del tanque, en sentido circular ascendente; se comparó con una entrada superior y tangencial. No se encontraron diferencias significativas entre un flujo y otro, pero a nivel de manejo, y en base a observaciones personales, elegimos el flujo ascendente porque permite la flotación de las larvas y una más homogénea distribución de las mismas a lo largo del tanque.

También hemos constatado que las larvas tienden a distribuirse por las zonas más iluminadas del tanque, por lo que hemos instalado dos filas de dos lámparas fluorescentes sobre el lineal de cultivo larvario.

Entre Octubre de **2007** y mayo de 2008 se realizaron varios experimentos de cultivo larvario:

**Primera serie:** El protocolo de alimentación fue el propuesto en la 2ª reunión del proyecto celebrada durante el Congreso Nacional de Acuicultura (Vigo). Se basa en los resultados obtenidos en experimentos anteriores reflejados en la comunicación presentada en dicho congreso.

Se utilizaron recipientes de 6 litros de capacidad con una siembra inicial de 100 larvas por litro. Se aplicaron los siguientes tratamientos:

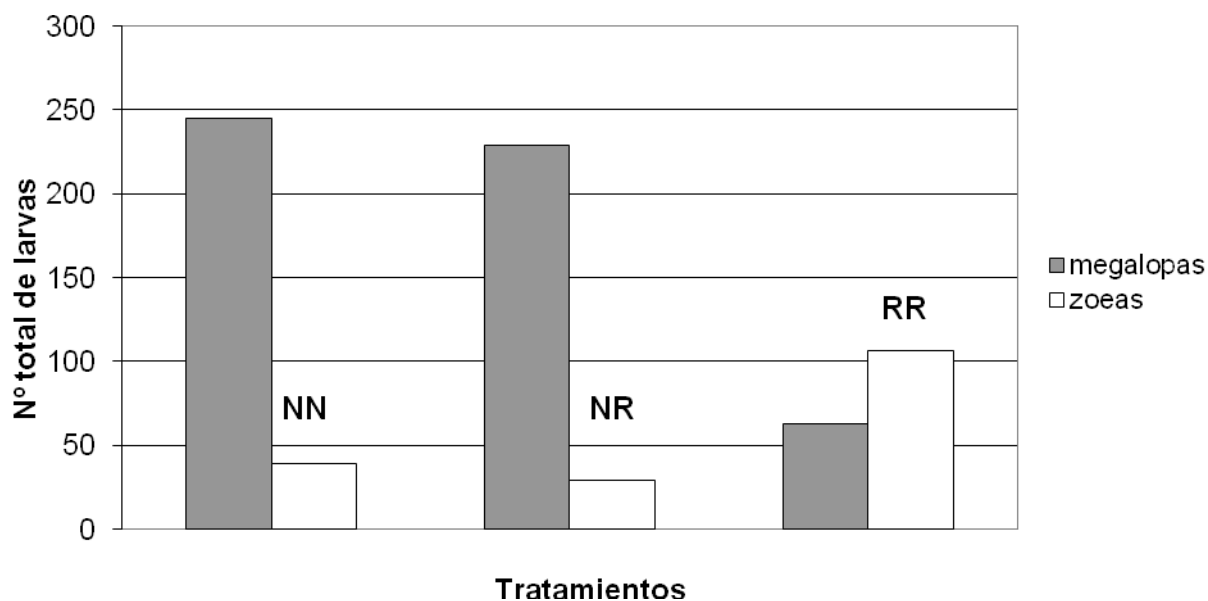
**NN.** Nauplios AF durante todo el desarrollo larvario.

**NR.** Nauplios AF durante las fases zoea I y II, y metanauplios alimentados con la microalga *Rhodomonas salina* durante 24 horas.

**RR.** Metanauplios alimentados con *Rhodomonas* durante todo el desarrollo larvario.

Se utilizaron 4 replicados por tratamiento.

Una vez alcanzada la fase megalopa (9º día) se hizo un recuento de cada replicado de cada tratamiento. Los resultados se expresan la figura siguiente:



A partir de ese momento se cambió la alimentación al tratamiento **NR**. Al día 16 de cultivo aparecieron los primeros juveniles. Los resultados finales fueron:

**NN:** 18 juveniles totales

**NR:** 16 „

**RR:** 4 „

Las diferencias del sistema con los experimentos similares anteriores fueron:

1. Manipulación de las larvas iniciales, ya que se contaron individualmente.
2. Tamaño de los metanauplios: 915 micras frente a las 650 anteriores.
3. Hembras progenitoras antiguas y puestas tardías frente a hembras nuevas y primeras puestas.

En octubre y primera quincena de noviembre de 2008 se realizaron nuevos cultivos larvarios a partir de hembras antiguas (2ª serie) y hembras nuevas pero fecundadas en cautividad (3ª serie). Debido a problemas con el cultivo de microalgas se utilizaron dietas inertes.

**2ª serie.** Se utilizaron 6 recipientes de 15 litros de capacidad (ver foto).



**Protocolo de alimentación:** Todos los replicados se alimentaron con nauplios AF durante las fases zoea I y II. El desarrollo hasta megalopa tuvo una buena supervivencia, aunque no se realizaron recuentos. A partir de ese momento se utilizaron dos tratamientos:

**AF.** Se continuó con nauplios AF

**DS.** Metanauplios alimentados con DHA-Selco (Inves)

Los resultados finales fueron:

**AF:** 0,5% de supervivencia

**DS:** 0,0% ,,

A partir de ese momento cambiamos el protocolo del cultivo larvario:

El desarrollo hasta la fase megalopa tiene lugar estanques de 500 litros de capacidad. Una vez alcanzada dicha fase larvaria se reparten las megalopas en los tanques de 15 litros aplicándose los tratamientos correspondientes.

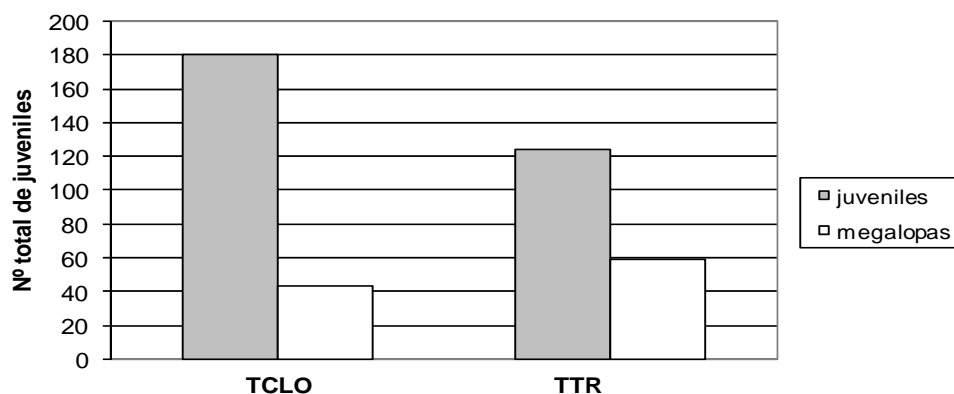
**3ª serie:** Se repartieron 6 grupos de 600 megalopas cada uno en 6 tanques de 15 litros (40 larvas por litro). El protocolo de alimentación fue el siguiente:

**TTR:** Metanauplios alimentados con *Tetraselmis* liofilizado (Easy algae). Tres replicados.

**TCLO:** Metanauplios alimentados con *Tetraselmis* liofilizado enriquecido con una emulsión de aceite de hígado de bacalao.

La dosificación era de 3 metanauplios por mililitro y día. Se hacían recambios de agua diarios del 400% del volumen.

Los resultados se expresan en la figura siguiente:



Durante **2009** se hicieron tres experiencias de cría larvaria.

### Primera prueba

Se hizo una primera evaluación de una dieta artificial para enriquecer *Artemia*. Se trata de *Spirulina* liofilizada enriquecida con una emulsión de aceite de hígado de bacalao con un 15% del peso seco de la cianobacteria.

El protocolo de cultivo larvario es el mismo que el empleado a lo largo de 2008, es decir, cultivo hasta fase de megalopa en tanques de 500 litros (figura 1a).



**Figura 1a.** Tanque de 500 litros empleado en la cría larvaria hasta la fase megalopa



**Figura 1b.** Tanques de 15 litros utilizados para la cría larvaria desde megalopa hasta juvenil

Una vez alcanzada la fase megalopa las larvas se establecen en tanques de 15 litros (figura 1b).

Alimentación: Desde zoea I hasta megalopa la alimentación fue a base de nauplios de *Artemia* (AF, Inves) a una dosis de 2 nauplios/mililitro recién eclosionados, en dos tomas diarias.

A partir de megalopa la alimentación fue a base de metanauplios de *Artemia* alimentadas, durante 24 horas, con *Spirulina* liofilizada enriquecida con una emulsión de aceite de hígado de bacalao. La dosificación fue de 2 metanauplios/mililitro/día.

Se introdujeron 150 megalopas por tanque, es decir, 10 megalopas por litro, con una temperatura media de 18,5° C. Tres replicados en total. En la tabla siguiente se muestran los resultados:

Fecha	Fase	Tanque 01	Tanque 02	Tanque 03
31-01-2009	Primeros juveniles	21	16	16
01-02-2009	Resto	29	34	31
02-02-2009	Resto	23	20	28
03-02-2009	finales	15	14	13
Totales		88	84	88
% Superv.		58,67	56,00	58,67

Conclusión: La supervivencia media final desde megalopa a juvenil, cercana al 60%, indica un buen resultado de la dieta artificial empleada. En las siguientes pruebas de cría larvaria se utilizó dicha dieta

### Segunda prueba

Se evalúa la supervivencia final de tres diferentes densidades larvarias iniciales. El sistema de cultivo, la dieta y los factores ambientales fueron los mismos de la primera prueba, de hecho, ambos cultivos coincidieron durante cuatro días. Se realizaron tres replicados por tratamiento y las concentraciones iniciales fueron:

100 megalopas totales (6,6 megalopas/litro)

200 „ „ (13,2 „ „ )

400 „ „ (26,4 „ „ )

Los resultados se muestran en la siguiente tabla en la que se expresan los juveniles aparecidos cada día en los diferentes replicados, los totales y el porcentaje de supervivencia final en cada tratamiento.

Tratamiento	A (6.6 M/L)			B (13.2 M/L)			C (26.4 M/L)		
Juveniles 06/02/09	0	3	5	3	3	11	8	5	16
Juveniles 07/02/09	16	5	17	7	12	23	7	28	15
Juveniles 08/02/09	8	10	17	10	19	29	21	49	24
Juveniles 09/02/09	5	5	12	10	14	25	12	25	27
Totales/replicado	29	28	51	30	48	88	48	107	82
Totales/tratamiento	108			166			237		
% Sup/tratamiento	36			27,6			19,7		

Conclusión: Como era de esperar la supervivencia, expresada en porcentaje, varía inversamente con respecto a la densidad larvaria inicial. Sin embargo, si expresamos la supervivencia en número total de juveniles finales sucede lo contrario. Si la disponibilidad de larvas no es un factor limitante se podría partir de concentraciones altas en sistemas relativamente pequeños.

### Tercera prueba

Las observaciones realizadas en todas las pruebas realizadas muestran cierto grado de canibalismo entre megalopas. Si bien no podemos precisar si las presas son larvas vivas o muertas.

Se hizo una evaluación del efecto que podía tener el aumentar el tamaño de la presa para disminuir el canibalismo y aumentar por tanto la supervivencia final.

El sistema de cultivo fue el mismo empleado anteriormente, la única diferencia fue el tamaño de la presa (1,6 mm. frente a 0,8 mm.), el número de replicados, cuatro por tratamiento y la renovación del agua de cultivo: 12 horas de circuito cerrado desde las 07:00 hasta las 19:00; doce horas de circuito abierto desde las 19:00 hasta las 07:00 del día siguiente. La densidad inicial era de 20 megalopas/litro: 300 megalopas por replicado

Los resultados finales se muestran en la tabla siguiente:

Tratamiento	A (Artemia de 0,8mm.)				B (Artemia de 1,6 mm.)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Replicados								
Totales/replicado	88	45	45	61	83	110	71	64
% sup/replicado	29,3	15,0	15,0	20,3	27,6	36,6	23,6	21,3
Totales/tratamiento	239				328			
% supervivencia	19,91				27,33			

Conclusión: Parece haber una mejora cuando se utiliza presa de talla mayor. Sin embargo el esfuerzo personal y material que supone llegar a ese tamaño puede que no compense el sistema propuesto.

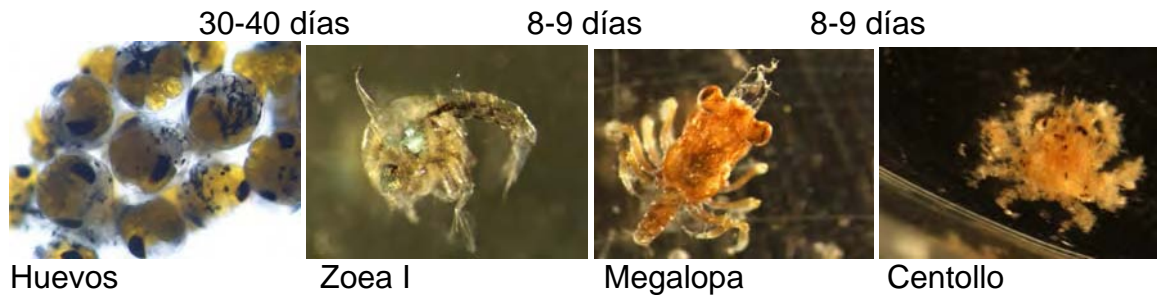
### ***Maja brachydactyla*-IFAPA Aguas del pino**

El número de larvas en cada puesta se estimó por volumetría, siendo muy variable de unas puestas a otras. La media fue de 83.884 larvas por puesta, con un máximo de 112.684 y un mínimo de 10.453 larvas. La supervivencia hasta centollo 1 también fue muy variable, oscilando entre el 3,64% en el mejor de los casos y el 0,04%. Existieron algunos casos en que no se completó el ciclo metamórfico, perdiéndose la totalidad de la puesta, si bien por causas accidentales, no imputables al sistema de cultivo. Sin embargo, la elevada variabilidad en la supervivencia hasta centollo 1, si se presume que es imputable a un sistema de cultivo todavía no afinado, por lo que deberá mejorar bastante, cuando se profundice en los requerimientos del cultivo de larvas, tanto en los aspectos nutricionales como en las condiciones de cultivo y manejo de larvas.

El desarrollo de las larvas siguió el patrón descrito en la bibliografía, según el cual, tras la eclosión de los huevos aparece una primera larva o zoea, de carácter planctónico con capacidad natatoria y un fuerte fototropismo positivo, que se va atenuando en las siguientes fases metamórficas. A los 7-8 días aparece una segunda larva o megalopa, también de carácter planctónico, si bien se aprecia ya una mayor tendencia a ocupar el fondo del tanque, al mismo tiempo que va desapareciendo la preferencia por las zonas más iluminadas del tanque. En este estadio aparece ya el primer par de apéndices diferenciado en forma de pinzas.



De nuevo a los 7-8 días se produce el cambio a centollo juvenil, completándose el proceso metamórfico.



Asimismo, el estadio de zoea se caracteriza por la existencia de dos formas distintas aunque muy similares entre si. Se las denomina zoea I y zoea II, cuya principal diferencia morfológica radica en la aparición de unos pequeños pleópodos en el abdomen de la segunda forma. El paso de una a otra forma se produce a los 4-5 días de la eclosión.

En cuanto a las condiciones de cultivo, las larvas se mantenían en los mismos tanques de puesta y se trasladaban los adultos, evitando así su manipulación en todo lo posible. Para el cultivo de larvas se mantenían, pues, las mismas condiciones que las de adultos, es decir, circuito abierto, fotoperiodo natural, 20°C de temperatura y salinidad entre 35 y 37‰.

Para su alimentación se siguió una dieta de nauplios de artemia (*Artemia salina*) enriquecida con SELCO®, empleándose a una tasa de 10 nauplios/mL para garantizar los encuentros predador-presa. Esta tasa se considera elevada y puede ser quizás una de las causas de la gran variabilidad en cuanto a grado de supervivencia que se ha obtenido en las distintas puestas. El exceso de nauplios de *Artemia* puede originar problemas de diversa índole, entre los que se pueden citar la degradación de la calidad del agua por aumento de excreciones, aumento del consumo de oxígeno al degradarse la materia orgánica procedente de la acumulación de cadáveres en el fondo del tanque y finalmente peor calidad del alimento disponible, pues la *Artemia* residual, que no es consumida, pierde enriquecimiento y queda como una presa de peor calidad que interfiere en el proceso de captura con la diaria recién añadida. En algunos casos, éstas han sido las principales causas de la alta mortalidad obtenida en algunas puestas y, mediante experimentos concretos, habrá que establecer unas pautas de cultivo que permitan conjugar ambos factores: por un lado, mantener una elevada densidad de artemia para facilitar su captura y, por otro, asegurarse de que ha sido eliminado el exceso de presas, antes de añadir la ración diaria correspondiente.

Hasta el momento, estos problemas los hemos tratado de evitar realizando el desagüe del tanque a través de una malla de 300 micras de luz, que permite el paso de los nauplios pero no de las larvas de centollo y así asegurar que la práctica totalidad de la artemia ha desaparecido por depredación o escape antes de añadir la dosis siguiente. No obstante, es frecuente que se llegue a colmatar la malla, produciendo reboses del tanque si no se limpia con frecuencia. Para el próximo periodo de puesta habrá que estudiar estos asuntos con más profundidad, determinando un tiempo de retención de presas en el tanque, que minimice la artemia residual. Esto se puede realizar incidiendo sobre tres factores:

la superficie de la malla, la tasa de renovación del agua y disminuyendo la densidad de artemia añadida hasta un punto que no incida negativamente sobre la frecuencia de encuentros depredador-presa.

#### Actividad 4.3: Alimentación larvaria II: Dietas inertes.

Durante el periodo de enero a julio de **2007** se llevaron a cabo 6 experimentos de cultivo larvario. Los tres primeros experimentos fueron encaminados a empezar con la fase principal de la aceptación de dieta inerte. Los otros tres evaluaron distintos niveles de sustitución de presa viva (25, 50 i 100%) con dietas artificiales en cada uno de los estadios larvarios del centollo (zoea I, zoea II y megalopa). A continuación se describen los detalles de cada experimento.

1. **Experimento con microdieta (1).** Con el fin de evaluar la aceptación de una dieta inerte por parte de las larvas de *Maja brachydactyla* para futuros experimentos nutricionales, se preparó una microdieta liofilizada (basada en una formulación existente en langostino) y se suministró a lo largo del desarrollo larvario. En este primer experimento, se introdujo la microdieta en dos modalidades distintas: en un 25% i un 50% de sustitución sobre la dieta de presa viva (nauplios de Artemia enriquecidos). El tercer tratamiento era un grupo control sin microdieta, con una alimentación común de 60 nauplios/larva. Las larvas fueron cultivadas con esta alimentación, desde el día tres después de su eclosión hasta su muda a juvenil (20 días aprox.). Para cada estadio de desarrollo y cada tratamiento se determinó la supervivencia y se tomaron muestras para analizar su crecimiento, (talla y peso) y su contenido bioquímico.
2. **Experimento con microdieta (2).** En este caso se aumentaron los porcentajes de sustitución de presas vivas por microdietas. Así, una nueva preparación de microdieta se probó al 50% y 75% de sustitución sobre la presa viva. De nuevo, se mantuvo un grupo control sin microdieta y con una alimentación de 60 nauplios/larva. Las condiciones de cultivo y toma de muestras se realizaron como en el experimento anterior.
3. **Experimento con microdieta (3).** Para finalizar con los experimentos de aceptación de microdieta de esta temporada, se probó una sustitución total de la presa viva por microdietas. En este caso, los tres tratamientos realizados fueron: 75% de sustitución, 100% de sustitución, y un control sin sustitución (60 nauplios/larva). Las condiciones de cultivo y toma de muestras se realizaron como en los experimentos anteriores.
4. **Experimento de sustitución en ZI.** Basándose en la misma formulación de dieta artificial del año anterior, se diseñaron los tres experimentos siguientes (uno por cada estadio larvario) para determinar el grado de sustitución de presa vivas por microdieta (MD) que tolera cada estadio larvario de manera independiente. Para el primer estadio (zoea I=ZI), las larvas recién eclosionadas fueron repartidas en los tanques de cultivo (60 larvas/L en todos los tratamientos) donde se les sometió a los distintos tratamientos:

Control positivo (T1): larvas alimentadas desde día 0 (eclosión) hasta fin del experimento (día 4) a base de presa viva (60 metanauplios *Artemia* enriquecidos= 60 MAE).

25% sustitución (T2): larvas alimentadas desde día 0 (eclosión) a día 4 (fin) con un 25% de sustitución de presa viva por microdietas (en base al peso, 41.55 µg MD/larva + 45 MAE/larva).

50% sustitución (T3): larvas alimentadas desde día 0 (eclosión) a día 4 (fin) con un 50% de sustitución de presa viva por microdietas (en base al peso, 83.1 µg/larva + 30 MAE/larva).

100% sustitución (T4): larvas alimentadas exclusivamente a base de microdieta (166.2 µg/larva) desde día 0 (eclosión) a día 4.

Control negativo (C-): larvas sometidas a ayuno desde día 0 (eclosión) hasta día 4.

En el muestreo final (día 4) se determinó la supervivencia y estado de desarrollo de cada tratamiento y se tomaron muestras para analizar su crecimiento, (talla y peso) y su contenido bioquímico (todos los parámetros por triplicado).

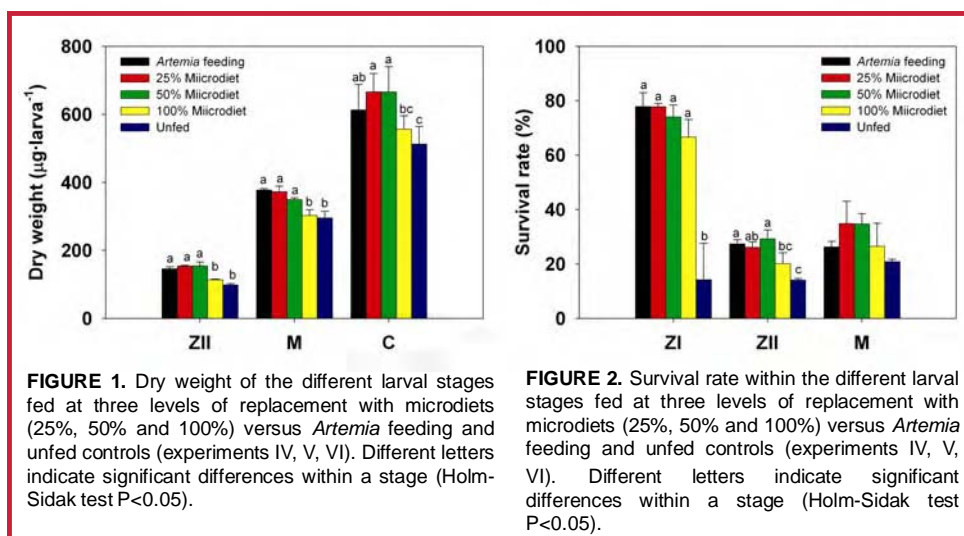
- 5. Experimento de sustitución en ZII.** Las larvas recién eclosionadas fueron cultivadas de manera estándar (60 larvas/L y alimentación a base de 60 MAE/larva) hasta día 7. Llegado ese día, las larvas se encuentran en el segundo estadio larvario (ZII) y se reparten en los tanques de cultivo experimental donde se les somete a los mismos tratamientos que el experimento anterior y bajo las mismas condiciones. El experimento finaliza el día 12 después de la eclosión (cuando se encuentran en fase megalopa=M) y se procede al mismo sistema de muestreo que en el experimento anterior
- 6. Experimento de sustitución en M.** Las larvas recién eclosionadas fueron cultivadas de manera estándar (60 larvas/L y alimentación a base de 60 MAE/larva) hasta día 8. Llegado ese día, las larvas se encuentran en el tercer estadio larvario (M) y se reparten en los tanques de cultivo experimental donde se les somete a los mismos tratamientos que el experimento anterior y bajo las mismas condiciones. El experimento finaliza el día 15 después de la eclosión (las larvas son ya juveniles) y se procede al mismo sistema de muestreo que en el experimento anterior.

## Resultados

- Experimentos con microdieta.** Se utilizó una microdieta modificada de Abramo et al. (2003) en relación a la composición de los alimentos (cangrejo, mejillón y calamar y del emulsionante (zeina en lugar de alginatos). La microdieta fue bien aceptada por las larvas de *M. brachydactyla* ya que su coloración anaranjada permitía ver su ingesta. Un 50% de sustitución no afecta significativamente el crecimiento ni la supervivencia en ninguno de los estadios del desarrollo. Un 100% de sustitución resultó en una disminución de peso seco pese a que la supervivencia se diferencia significativamente del grupo control no alimentado.

La tasa de crecimiento en megalopa fue significativamente menor ( $P < 0.001$ ) en los grupos que recibían el 75% y el 100% de sustitución comparado con el control. En el 25% y 50% de sustitución, la tasa de crecimiento es igual al grupo alimentado con presa viva. Los niveles de proteína decrecieron en el estadio megalopa en los grupos 75% y 100% de sustitución, sin embargo esta tendencia no se observa ni en zoea II ni en el primer juvenil.

- Experimentos de sustitución por estadios larvarios (Fig. 1 y 2).** En los tres experimentos realizados, se consiguieron supervivencias y pesos similares entre las larvas control y las sustituciones de 25 y 50%. Las larvas alimentadas al 100% de sustitución sufrieron una mayor mortalidad, aunque esta fue significativamente menor que en los controles negativos no alimentados. Esos resultados están en acuerdo con los del año pasado, en los que después de realizar los correspondientes análisis bioquímicos se observó una disminución significativa en la tasa de crecimiento y contenido proteico de las larvas alimentadas a niveles de sustitución mayores al 75%. Los tres estadios larvarios respondieron de manera similar a la sustitución aunque parece observarse un interés creciente en ella a medida que avanza el desarrollo, obteniéndose la mejor respuesta en el tercer estadio (megalopa).



- Experimento de niveles de colesterol en microdieta.** La mayor supervivencia a día 12 se obtuvo en las larvas alimentadas con MD<sub>altah</sub> (1% colesterol), sin embargo las larvas alimentadas con MD<sub>bajo</sub> fueron las que consiguieron ganar mas peso. A día 19 en cambio, la mejor supervivencia y peso se obtuvo en las larvas que se habían alimentado de la dieta base (MD<sub>base</sub>) con enriquecimiento de la *Artemia* (tratamiento 2). El hecho de que las modificaciones en la dieta hayan supuesto un cambio en su textura, puede ser el causante de estas contradicciones, sólo notables en el tercer estadio (megalopa). También cabe tener en cuenta las mortalidades a día 12, y el efecto que pueden ejercer en los sucesivos día (mayor mortalidad implica menor densidad de larvas restantes y por tanto mayor densidad de alimento).

Durante el primer trimestre de **2008**, y en base a la formulación usada en años anteriores, se realizaron modificaciones en la composición de las microdietas hasta conseguir un nivel mínimo de colesterol y una textura mejorada, de cara a utilizarla como base en los experimentos del presente año. Las modificaciones consistieron, básicamente, en la búsqueda y mejora de las materias primas de origen lipídico, de cara a reducir la carga no controlada de colesterol a introducir en la formulación, acompañando cada cambio en ésta, de un análisis específico para determinar los niveles de lípidos, colesterol y fosfolípidos en las dietas, y manteniendo los niveles de ácidos grasos prácticamente inalterados (cromatografías líquida en capa fina y de gases). Además, se introdujo almidón para mejorar la textura, ya que el hecho de reducir los lípidos provocaba una peor emulsión de la dieta y, como consecuencia, una mayor solubilidad de ésta en el agua, reduciéndose el tiempo de permanencia y la flotabilidad.

Finalmente la dieta base mejorada, contenía niveles de colesterol imperceptibles y una textura adecuada para su ingesta por parte de las larvas planctónicas. A partir de esta dieta base (proporción colesterol: fosfolípidos = 1:5), se formularon dos dietas más con niveles crecientes de colesterol (proporciones colesterol: fosfolípidos = 3:3 y 5:1, respectivamente) de cara a ensayar los tres niveles de colesterol (bajo, medio y alto) en el cultivo larvario de *M. brachydactyla*.

En el primer experimento, se usó la dieta base (proporción 1:5) en cultivo individual para comprobar la aceptación de las larvas y compararla con la dieta usada en experimentos de sustitución de 2007 antes de pasar a las pruebas definitivas de cultivo en masa, probando las tres dietas con niveles crecientes de colesterol (ver apartado siguiente).

Con el fin de evaluar los requerimientos nutricionales durante la fase larvaria de *M. brachydactyla* a través de la formulación de microdietas artificiales, se diseñó un sistema de cultivo individual de las larvas, mediante un sistema de bandejas flotantes con vasos individuales (200 mL) conteniendo una larva cada uno en el que se utilizaban 8 tanques a 18°C de temperatura en los que se colocaba una bandeja con 24 vasos. Este sistema permite seguir la evolución diaria de la muda de cada larva y los efectos que en ella pueda ejercer la ingesta de microdietas con distintos niveles de colesterol. Para conseguir tal objetivo, los experimentos se dirigieron a un solo estadio (intermedio, zoea II) del desarrollo larvario de la especie, con intención de ampliar el diseño experimental a cultivos en masa y otros estadios con los resultados obtenidos. En este contexto, se realizó un experimento previo en cultivo individual que comparara las dietas de 2007, con la formulada en 2008 que se describe a continuación:

- **Experimento IA:** En inicio, las larvas recién eclosionadas de *M. brachydactyla* se cultivaron en masa (densidad de cultivo 60 larvas/L, alimentadas con metanauplios de *Artemia* sp enriquecida, 18°C) hasta alcanzar el segundo estadio Zoea II, momento en el cual se transfirieron a los vasos del cultivo individual y empezó el experimento. Las zoeas II fueron separadas en cuatro grupos (24 larvas individualizadas por grupo): un control positivo (C+) alimentado de metanauplios de *Artemia* enriquecidos (MAE), un control negativo (C-) mantenido en ayunas, un primer grupo al que se ofreció exclusivamente alimentación artificial formulada según la receta de 2007 (A base de huevo, conteniendo un 3.4% de colesterol y un 2% de lecitina/fosfatidilcolina: HUEVO2LEC) y otro grupo a base de alimentación artificial formulada según la



receta base obtenida este año (eliminación del huevo, conteniendo un 1% de colesterol y 2% lecitina: BASE). Cada día se realizaba el cambio de agua y comida en cada uno de los vasos de cada tratamiento, retirándose las muertas y anotando el momento de la muda a tercer estadio (megalopa). El experimento finalizó cuando todas las larvas del cultivo habían muerto o mudado a megalopa.

**Resultados:** Las larvas alimentadas con MAE obtuvieron una elevada supervivencia a megalopa (95.8%), mientras que las mantenidas en ayunas fueron incapaces de mudar y murieron todas en estadio Zoea II al cabo de 6-7 días de ayuno. Las larvas alimentadas a base de dietas artificiales, como era esperable, tuvieron una menor supervivencia a megalopa (15%). En las zoeas II de HUEVO2LEC y BASE que murieron sin lograr con éxito la muda se detectó la imposibilidad de llevarla a termino, pese a que las larvas llegaron al estadio de intermuda correspondiente al inicio de la muda, de manera que la muda llegó a iniciarse pero nunca llegó a finalizarse (observándose diversos grados de inicio de muda). En la bibliografía, éste problema se ha detectado en larvas de varias especies de crustáceos decápodos, con el nombre de síndrome de muerte en la muda (moult death syndrome, MDS en adelante), pero en pocas ha sido descrito con detalle ni las causas han sido esclarecidas. En cultivo en masa de *M. brachydactyla* realizados hasta el momento, nunca se había observado el problema, seguramente por no observar al detalle las mortalidades ocurridas. El cultivo individual permitió detectar este síndrome, que ocurrió masivamente (50% de los individuos) en larvas alimentadas con dietas artificiales, con una ocurrencia mínima (4%) en los controles alimentados y sin ocurrencia alguna en los controles no alimentados.

A partir de los resultados del experimento previo, se decidió replantear los experimentos propuestos de requerimientos, para centrarse en el diseño de experimentos encarados a solventar los problemas de muda aparecidos, ya que estos problemas pueden enmascarar los resultados de futuros experimentos nutricionales con microdietas. La bibliografía existente al respecto del MDS apunta, mayoritariamente, al déficit de fosfolípidos específicos (lecitinas) como posible causa del síndrome. En esta línea, se diseñó un nuevo experimento de cultivo individual, introduciendo nuevas formulas en las microdietas, que incluían niveles más elevados de fosfolípidos que los del anterior experimento y niveles sin fosfolípidos, con el objetivo de comprobar cual era el efecto en la muda en las larvas.

- **Experimento IB:** Se planteó un diseño experimental idéntico al experimento anterior (IA), pero con 5 grupos (24 larvas individualizadas por grupo): dos grupos control (C+ y C-, igual que en el anterior) y tres grupos alimentados con microdietas artificiales. Un primer grupo se alimentó con la microdieta base formulada para este año (BASE); al segundo grupo se le ofreció una dieta formulada con el doble de lecitina (BASE4LEC) y el tercer grupo se alimento a base de una dieta formulada sin lecitina (BASE0LEC)

**Resultados:** Las larvas alimentadas con presa viva continuaron presentando la mayor supervivencia a megalopa mientras que ninguna de las mantenidas en ayunas consiguió mudar. De entre las larvas alimentadas con microdietas, las alimentadas con altos niveles de lecitinas (fosfolípidos) consiguieron una mayor supervivencia, aunque el porcentaje de MDS continuó siendo elevado (mayor del 50%). Las larvas alimentadas lecitina, no sobrevivieron a megalopa, no

produciéndose en ningún caso la muda con éxito y presentando unos niveles de MDS de casi el 80% de los individuos observados. Los niveles de supervivencia a megalopa y MDS obtenidos con la BASE, fueron similares a los encontrados en el experimento anterior.

- **Experimento IC:** En este experimento, se planteó un objetivo doble, por una parte, descartar por completo que la falta de lecitina sea la causa de los problemas de muda y por otra, el estudio de una nueva hipótesis que consiste en que la causa del síndrome pueda tener origen en la falta de la forma activa de la hormona de la muda (ecdisona) en las larvas alimentadas con microdieta. Para tal fin, se planteó un diseño experimental idéntico al experimento anterior (IB), con los dos controles (C+ y C-), las tres microdietas con cantidad creciente de lecitina, más una dieta enriquecida con una emulsión de ecdisona (BASEECD). Además, la dieta con la mayor cantidad de lecitina en su composición, se reformuló para aumentar aún más la cantidad que contenía en el experimento anterior, de manera que su contenido fue 3 veces (BASE6LEC) la lecitina que contiene la microdieta base.

Resultados: Como ocurrió en los experimentos anteriores, las larvas alimentadas con presa viva continuaron presentando la mayor supervivencia a megalopa, mientras que ninguna mantenida en ayunas consiguió mudar. Pese a que la microdieta BASE6LEC consiguió la mayor supervivencia, ésta se mantuvo extraordinariamente baja comparada con los anteriores experimentos (9%) y el síndrome de muda continuó observándose en proporciones elevadas en las larvas alimentadas con dietas artificiales. No se observaron reducciones significativas en la incidencia del síndrome de muda en las larvas alimentadas con microdietas enriquecidas con ecdisona. Respecto a la lecitina, queda comprobado que aunque un aumento mejore la supervivencia de las larvas, sigue habiendo un problema en el uso de las microdietas que provoca el síndrome y lo mantiene en niveles demasiado elevados. Llegados a este punto, fue necesaria la elaboración de una nueva hipótesis.

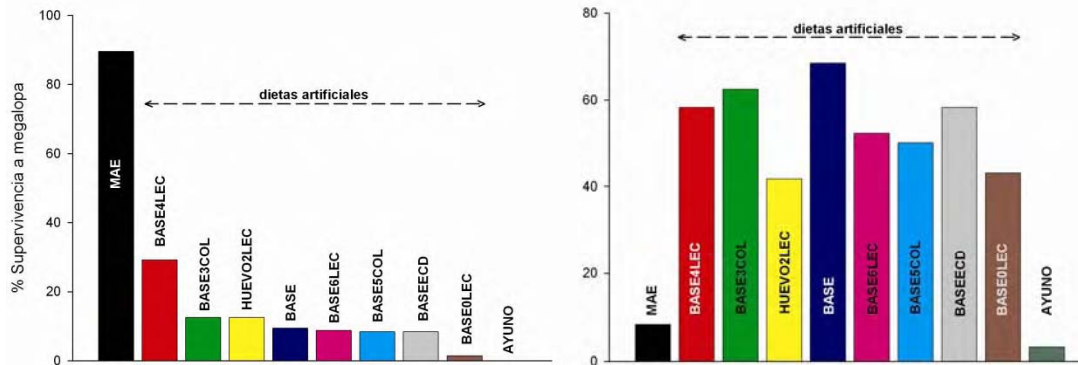
- **Experimento II:** La última hipótesis formulada consistió en atribuir el síndrome de muda no tanto a una falta de lecitina (LEC) como a un desequilibrio entre el colesterol (COL) y la LEC en las dietas artificiales. Así, se planteó un diseño experimental idéntico a los experimentos anteriores, incluyendo los dos controles (C+ y C-), una microdieta sin lecitina y trazas de colesterol (BASE0LEC), la microdieta base usada en todos los experimentos (BASE) y dos microdietas más con la misma lecitina que la base (2%), pero con valores crecientes de COL (3%: BASE3COL y 5%: BASE5COL respectivamente).

Resultados: Los controles siguieron comportándose como en los experimentos anteriores, mientras que de nuevo, ninguno de los tratamientos con microdietas consiguió obtener los niveles deseados de muda a megalopa y presentaron proporciones elevadas de problemas asociados con la muda.

Las figuras 3 y 4 resumen los resultados conjuntos de los cuatro experimentos realizados hasta el momento, mostrando los resultados de supervivencia e incidencia de MDS de cada una de las dietas probadas.

Del grupo de experimentos relacionados con los problemas de muda realizados hasta el momento, no se extrae ninguna conclusión clara sobre la causa de dichos problemas. Queda pendiente la profundización futura del tema mediante la

formulación de nuevas hipótesis, dirigidas hacia una visión del problema quizás desde un punto de vista de digestibilidad y/o no absorción de las dietas por parte de las larvas, dejando de lado su composición.



## Línea 5: Fase de pre-engorde.

### Actividad 5.1.: Alimentación de juveniles.

#### ***Maja squinado-LIMIA***

El objetivo de estos ensayos fue comparar tres dietas diferentes, dos naturales y una artificial en el crecimiento, supervivencia e intervalos de mudas en juveniles de centollo.

#### Material y métodos

Para la realización de estos ensayos se utilizaron tres grupos de cuarenta cilindros de 10 cm de diámetro (ver actividad 5.2, para más detalles sobre el sistema), identificados cada uno con una letra y un número, donde se estabularon 120 centollas juveniles de 25 días de edad. Los cilindros se colocaron en un tanque de 5000 L equipado con un sistema de mareas. Cada mañana se controló la temperatura y la presencia de bajas o mudas en cada uno de los cilindros. La duración de las experiencias fue de 70 días. No se realizaron muestreos hasta finalizar la experiencia para evitar cualquier tipo de estrés añadido a los juveniles. La alimentación se realizó cada dos días previa limpieza del fondo de los cilindros mediante un sifón para eliminar heces y restos de comida. Las mudas se guardaron etiquetadas en botes individuales para la medición de la longitud y anchura del caparazón.

Se ensayaron tres dietas:

Grupo A1: Mejillón fresco + erizo.

Grupo B1: pienso de langostino.

Grupo B2: Mejillón fresco.

#### Resultados

En la tabla IV se muestra un resumen de las pruebas realizadas y los resultados preliminares obtenidos.

Cabe destacar de los resultados preliminares, que la mejor supervivencia en el pre-engorde se ha obtenido en la prueba de nutrición alimentando a los juveniles con pienso de langostino (72,5%). Supervivencias similares entre sí, 62% y 60 %

se obtuvieron en el grupo C1 (densidad 254 ind/m<sup>2</sup>) con camuflaje y en la prueba de extensivo respectivamente. Estos resultados son importantes de cara avanzar en la optimización del pre-engorde de los juveniles ya que permiten en el caso de las ostreras y el camuflaje sacar en un mismo espacio un número mayor de juveniles simplificando el manejo.

Los datos de crecimiento que se muestran en el gráfico comparativo de todas las pruebas realizadas (Gráfico 1), se observa como los individuos del grupo C1, con camuflaje, fueron considerablemente más grandes que los demás del cultivo intensivo, quedando claramente reflejado que la presencia de camuflaje, en nuestro caso alga verde tipo *Ulva lactuca*, influye en gran manera en el crecimiento de los juveniles de la especie, ya sea debido al beneficio producido por la ingesta de este alga o a la influencia positiva que el camuflaje tiene sobre los individuos, eliminando el estrés que les produce el no tener refugio. Nuevas pruebas con camuflajes artificiales (no comestibles) deben realizarse para determinar la causa exacta de este mayor crecimiento.

Las variaciones de la temperatura debidos a los fallos en el sistema de refrigeración, afectaron también las mortalidades en el pre-engorde, pero al afectar a todos los grupos por igual, no se tiene en cuenta en caso de la comparación de un grupo con otro

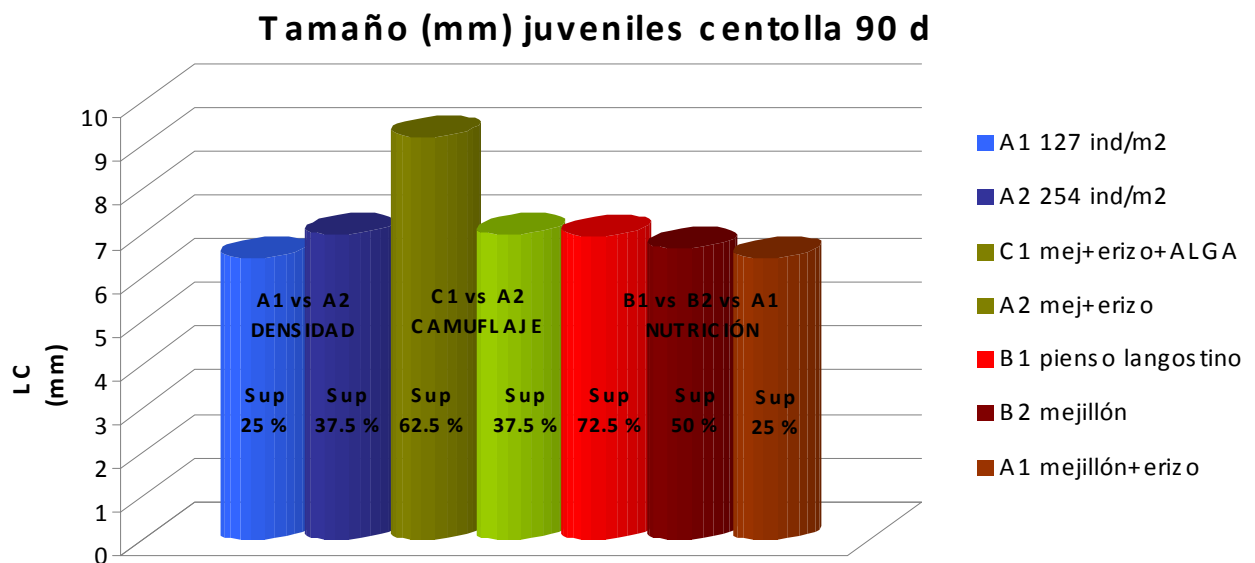


Gráfico 1. Comparación crecimiento y supervivencia en las diferentes pruebas intensivas.





## ENSAYOS DE PRE-ENGORDE 2008

	PRUEBA	PROCED	FECHAS	EDAD	RANGOT <sup>a</sup>	ALIMENTO	SUPV	rango LC	OBSERVACIONES
	<i>C. EXTENSIVO</i>	3 <sup>a</sup> puesta	08/06-3/09	32-90 d	26.1-27.6° C	extensivo	60,0 %	9.25±2.93 mm	larvario <i>Artemia</i>
<i>A1 vs A2</i>	<b>DENSIDAD</b>		15/06-26/08	25-97d	18-26 ° C	<b>ALIMENTO</b>			
A1	127 ind/m <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup> puesta				MEJ FRES+ERI	25,0 %	6,43±0,62mm	
A2	254 ind/m <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup> puesta				MEJ FRES+ERI	37,5 %	6,95±0,72mm	larvario <i>Artemia</i>
<i>C1 vs A2</i>	<b>CAMUFLAJE</b>		15/06-26/08	25-97d	18-26 ° C				
C1	alga verde	1 <sup>a</sup> puesta				MEJ FRES+ERI	62,5 %	9,18±1,77mm	larvario <i>Artemia</i>
A2	NO	1 <sup>a</sup> puesta				MEJ FRES+ERI	37,5 %	6,95±0,72mm	
<i>A1 vs B1 vs B2</i>	<b>NUTRICIÓN</b>					<i>DENSIDAD</i>			
B1	pienso langostino	3 <sup>a</sup> puesta	30/06-3/09	25-90d	18-26 ° C	127 ind/m <sup>2</sup>	72,5 %	6,93±1,05 mm	larvario coalimentación pienso/art
B2	mejillón fresco	3 <sup>a</sup> puesta	30/06-3/09	25-90d	18-26 ° C	127 ind/m <sup>2</sup>	50,0 %	6,63±0,76 mm	larvario <i>Artemia</i>
A1	mej fresco + erizo	1 <sup>a</sup> puesta	15/06-26/08	25-97d	18-26 ° C	127 ind/m <sup>2</sup>	25,0 %	6,43±0,62 mm	larvario <i>Artemia</i>

### ***Maja brachydactyla*-ICCM**

Los juveniles obtenidos se introducían en parideras flotantes en tanques de preengorde (Ver foto). La superficie del fondo de cada paridera es de 100 centímetros cuadrados. Los criterios utilizados fueron los siguientes:

1. Concentración: 1, 2 y 4 individuos por paridera.
2. Alimentación: Mejillón, choco y wakame (*Undaria pinnatifida*).

Los datos de estos experimentos no están aún disponibles.



### ***Maja brachydactyla*-IFAPA**

El trabajo desarrollado en 2006 fijó su punto de atención en dos líneas de investigación: la densidad del cultivo y la nutrición, que a nuestro juicio son las dos cuestiones que más pueden interesar desde el punto de vista de la cría industrial del centollo. Y en este sentido se han llevado a cabo los siguientes experimentos:

#### **Experimentos de densidades**

Uno de los factores clave en la acuicultura es optimizar el crecimiento en un mínimo de espacio (Iglesias *et al.*, 2002; Forsythe *et al.*, 2002; Domingues *et al.*, 2003) evitando una excesiva masificación de individuos, que puede tener efectos negativos en el crecimiento y el comportamiento de muchas especies. La densidad de cultivo es pues un factor muy importante en acuicultura (Sumpter, 1993). Aunque la manera más común de expresar la densidad óptima es la denominada capacidad de carga, definida ésta por el número máximo de individuos que pueden ocupar un espacio de manera sostenible, también pueden existir otros aspectos de máxima importancia para la evolución del cultivo, tales como alteraciones en el comportamiento por una alta masificación (Boal *et al.*,

1999). El objetivo de esta línea de trabajo ha sido determinar los efectos de una alta densidad de cultivo en el crecimiento y supervivencia de juveniles de centollo.

**Material y métodos:** En los dos experimentos se utilizaron juveniles de centollo nacidos en el propio Centro IFAPA, procedentes de puestas realizadas por hembras capturadas directamente del medio natural. Los juveniles usados en cada experimento eran todos de una misma puesta y, por tanto, de una misma edad. Los experimentos se realizaron con un fotoperiodo natural correspondiente a los meses de septiembre a diciembre de 2006, con una temperatura controlada entorno a los  $18\pm 2^{\circ}\text{C}$  y una salinidad de  $35\pm 2$ ppt. En ambos experimentos se utilizó como alimento mejillón (*Mytillus sp.*) cocido y congelado y tuvieron una duración de 60 días. Los pesos se tomaron con una balanza de precisión de tres decimales (COBOS CB compelt©), y la longitud del caparazón con un calibre electrónico de precisión (MITUTOYO Absolute coolant Proof. IP66©), de dos decimales.

En ambos experimentos se usó un sistema de bandejas de cultivo de  $0,28\text{ m}^2$  de superficie de fondo (80 cm x 35 cm) y una profundidad de agua de 15 cm (volumen total de 42 L). Se utilizó un flujo abierto de alto caudal (54 L/h), para asegurar una total renovación del agua en menos de una hora.

También en ambos casos se tomaron datos diarios sobre posibles mudas y existencia de mortalidad, para determinar algún tipo de relación entre ellas, bien por causas naturales (estrés durante el proceso de muda) o bien por canibalismo (tras la muda el animal queda indefenso frente a la depredación por otros centollos, hasta que se endurece el nuevo caparazón).

Las tasas individuales de crecimiento se calcularon tomando datos quincenales de peso y longitud del caparazón, de los centollos existentes en las 4 cubetas de baja densidad.

**Experimento I:** Se utilizaron un total de 68 juveniles de centollo, con un peso individual comprendido entre 0,2 y 1,2 g. Para determinar los efectos de la densidad sobre la supervivencia, estos individuos se distribuyeron entre 4 bandejas de cultivo con tres centollos cada una y otras 4 bandejas con 14 centollos cada una, dando como resultado densidades de 11 y 50 individuos  $\text{m}^{-2}$ , respectivamente. Diariamente se contaba el número de individuos en cada bandeja, para determinar la tasa de supervivencia, y se tomaban datos de la presencia de mudas y posibles restos de canibalismo.

No se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en cuanto al peso (g) y longitud del caparazón (mm) en ninguno de los replicados, utilizándose como alimento mejillón (*Mytillus sp.*) cocido y congelado, proporcionado *ad libitum*. Al final del experimento se realizaron pruebas estadísticas (t de student), para determinar diferencias en la supervivencia de ambos tratamientos (Zar, 1984).

**Experimento II:** Para este experimento se utilizaron un total de 54 juveniles de centollo de un mes de edad y un tamaño similar ( $p>0,05$ ), de  $0,014\pm 0,04$  g. Se hicieron 6 replicados en 6 bandejas distintas con 9 centollos cada una, resultando una densidad de 32 centollos  $\text{m}^{-2}$  en todas las bandejas. A 3 bandejas se añadieron macroalgas (*Ulva lactuca*) a modo de refugios para ocultar a los individuos recién mudados, protegiéndolos de la posible depredación de sus

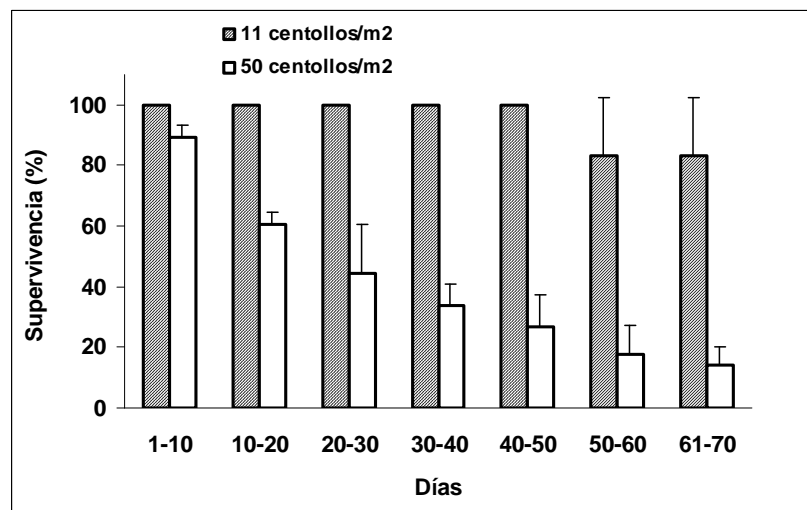
congéneres. El seguimiento que se realizó fue el mismo que en el experimento I, es decir, diariamente se contaba el número de individuos por bandeja y se tomaban datos de la presencia de mudas y posibles restos de canibalismo. También como en el caso anterior se proporcionó como alimento mejillón (*Mytillus sp*) cocido y congelado, proporcionado *ad libitum* y se realizaron pruebas estadísticas (t student) para determinar posibles diferencias en la supervivencia de ambos tratamientos (Zar, 1984).

**Experimento de crecimiento:** A su vez, los 4 replicados de 3 centollos por bandeja utilizados en el experimento I, se eligieron para determinar la tasa de crecimiento cuando se utiliza mejillón cocido y congelado como alimento. Cada 15 días se tomaban datos biométricos en cuanto a peso y longitud del caparazón, calculándose las tasas de crecimiento como:  $TC (\% \text{ peso/día}) = ((\ln P2 - \ln P1) / t) \times 100$ , donde  $\ln P$  es el logaritmo neperiano de los pesos inicial (1) y final (2) y  $t$  el tiempo transcurrido entre los momentos 1 y 2, expresado en días. El protocolo de pesada consistió en la captura del juvenil de centollo con una cucharilla, su depósito sobre un papel de filtro durante unos segundos para eliminar el exceso de agua y seguidamente proceder a determinar su peso en una balanza de precisión. Posteriormente los datos se trataron aplicando análisis estadísticos (ANOVA's) (Zar, 1984) para determinar posibles diferencias en el crecimiento de los juveniles de centollo.

## Resultados

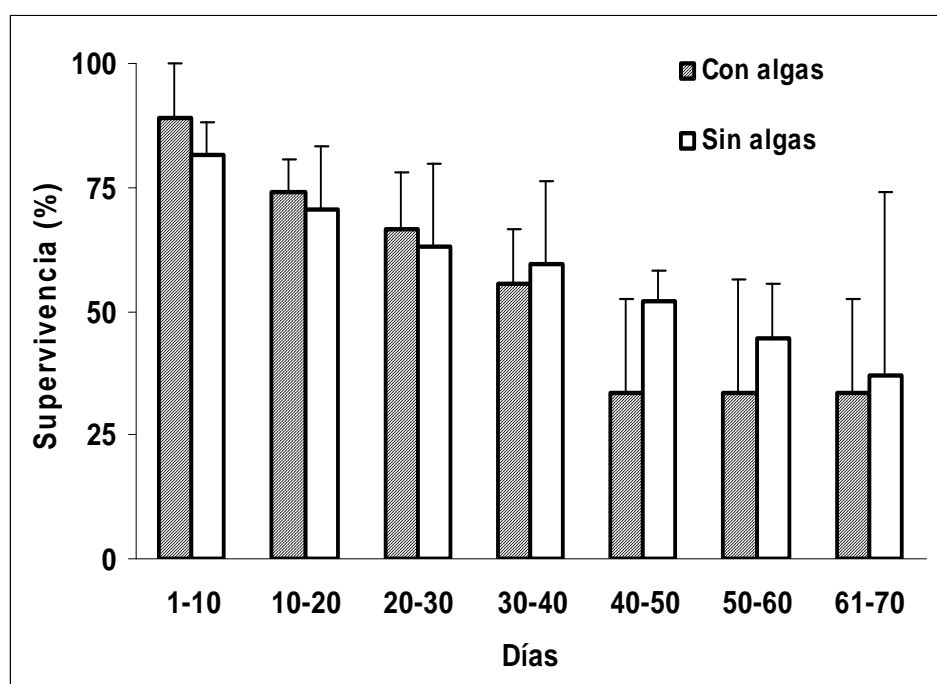
**Estudios de densidad:** La figura 1 muestra la supervivencia de los centollos en el experimento I, a las dos diferentes densidades de cultivo probadas: 11 centollos  $m^{-2}$  y 50 centollos  $m^{-2}$ . Hasta el día 50 la supervivencia a la más baja densidad fue del 100%; entre los días 50 y 60 murieron dos centollos en los replicados 1 y 2 y el experimento acabó con una supervivencia final de  $83,3 \pm 19,3\%$ , significativamente más alta ( $p < 0,05$ ) que la obtenida en el cultivo de alta densidad ( $14,3 \pm 5,8\%$ ). La relación entre los procesos de muda y la mortalidad fue muy baja en la prueba de baja densidad ( $13,0 \pm 16,0\%$ ), con escasa incidencia de procesos de canibalismo observados ( $< 5\%$ ). Por el contrario, la mortalidad después de la muda fue muy alta en la prueba de alta densidad ( $65,0 \pm 30,0\%$ ) y se observaron más casos relacionados con canibalismo (30%). Asimismo, la aplicación de análisis estadísticos concluyó que la mortalidad después de la muda fue significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) en las dos densidades probadas (11% y 50%).

Figura 1



La *figura 2* muestra la supervivencia de los juveniles de centollo en el experimento II, en el que se cultivaron juveniles de centollo con macroalgas y sin macroalgas para probar si éstas podían tener algún tipo de efecto protector para los centollos recién mudados. No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la supervivencia de los centollos en cada caso ( $33,3 \pm 19,2$  y  $37,0 \pm 37,0\%$ , respectivamente) y la relación entre los procesos de muda y la mortalidad fue similar en las bandejas con microalgas ( $20 \pm 13\%$ ) y sin macroalgas ( $29 \pm 11\%$ ), resultando esta diferencia estadísticamente no significativa ( $p > 0,05$ ). La mortalidad causada por el canibalismo después de la muda fue baja en ambos grupos ( $< 10\%$ ) y no estadísticamente diferente ( $p > 0,005$ ).

*Figura 2*



**Estudios de crecimiento:** Las tasas de crecimiento relativo al peso durante los 60 días del experimento, fueron de  $2,3 \pm 0,9\% P d^{-1}$ ;  $2,6 \pm 0,7\% P d^{-1}$ ;  $2,1 \pm 0,8\% P d^{-1}$  y  $2,4 \pm 0,6\% P d^{-1}$ , respectivamente para cada uno de los 4 replicados, no existiendo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas. De igual manera no han existido diferencias significativa ( $p > 0,05$ ) en las tasas de crecimiento relativas a la longitud del caparazón, siendo estas de  $0,6 \pm 0,2\% L d^{-1}$ ;  $0,7 \pm 0,3\% L d^{-1}$ ;  $0,8 \pm 0,2\% L d^{-1}$  y  $0,6 \pm 0,3\% L d^{-1}$ , para cada uno de los 4 replicados respectivamente. Los centollos incrementaron su peso desde  $0,3 \pm 0,1$  g hasta  $1,3 \pm 0,3$  g (*Figura 3*) y su longitud de caparazón (*Figura 4*) desde  $9,0 \pm 0,2$  mm hasta  $14,3 \pm 1,1$  mm, durante los 60 días de duración del experimento, sin que hubiera diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) ni en cuanto a peso ni en cuanto a longitud del caparazón al final del experimento, entre los 4 replicados.



Figura 3

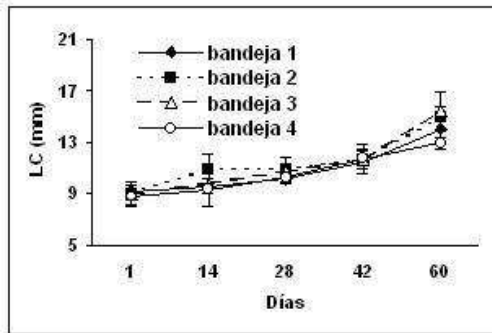
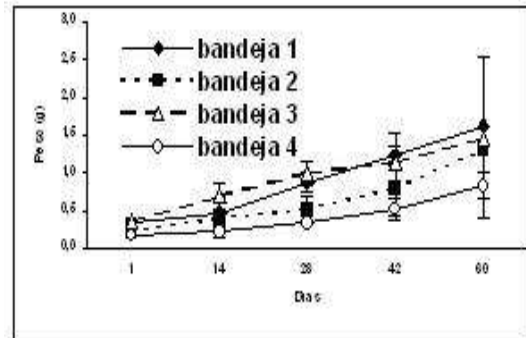


Figura 4



### Discusión

La determinación de los efectos de la densidad en un cultivo de especies marinas es de vital importancia, particularmente cuando se trata de especies con ciertas tendencias caníbales. El centollo *M. brachydactyla* presenta características caníbales tanto en los estados adultos como juveniles (Domingues, com. pers.) tras los procesos de muda, cuando el nuevo caparazón no está del todo endurecido y el animal está indefenso.

Durante el presente trabajo se observaron varios episodios de canibalismo relacionados con la densidad de cultivo, aunque la mortalidad total fue debida probablemente a dos factores. En primer lugar la tasa de mortalidad en un cultivo en bandejas aumenta por simple cuestión estadística, cuando hay más individuos por bandeja y, en segundo lugar, a mayores densidades se incrementa la probabilidad de encuentros, lo que hace más vulnerables a los animales recién mudados. De hecho, la mayoría de la mortalidad en las bandejas ocurrió después de la muda (96%), bien causada por episodios de canibalismo o bien causada por el propio estrés de la muda. Fue raro encontrar centollos muertos con el caparazón duro, es decir que la causa de la muerte no estuviera de alguna forma relacionada con el proceso de muda.

La mayoría de los animales (55%) que fueron encontrados muertos no mostraron señales de canibalismo, lo que indica que la mortalidad fue debida al estrés asociado al proceso de muda. No obstante, los episodios de canibalismo también fueron importantes, particularmente en las bandejas de alta densidad. De hecho, en las densidades de 11 centollos  $m^{-2}$ , fueron comidos por sus congéneres menos del 5% de los animales muertos, mientras que para las densidades de 32 centollos  $m^{-2}$  esta tasa se elevó hasta el 20% y para la más alta densidad, de 50 centollos  $m^{-2}$  la tasa de animales que presentaron signos de canibalismo fue del 30%. Existe pues una asociación directa entre el canibalismo y la densidad de cultivo.

Para los juveniles de centollo de menos de dos meses de edad y  $9,0 \pm 0,1$  mm de longitud del caparazón, como los utilizados en estos experimentos, la densidad de cultivo que ha dado mejores resultados se establece en torno a los 10 individuos por  $m^{-2}$ . La supervivencia en las bandejas de menor densidad (11 centollos  $m^{-2}$ )

fue alta (83%) después de dos meses de duración del experimento y la densidad final se centró en torno a este valor. Sin embargo, en las densidades más altas de 32 centollos  $m^{-2}$  y de 50 centollos  $m^{-2}$  la supervivencia fue inferior al 80% en el primer caso (tanto en presencia como ausencia de algas) y al 65% en el caso de la más alta densidad.

Como se menciona previamente, la más alta mortalidad en las bandejas de densidades elevadas se asocia al hecho de que la muda por si misma es la que la ocasiona en más del 95% de los casos, tanto por estrés, como por canibalismo. Por tanto, se espera que en los cultivos de más alta densidad la mortalidad también sea más alta, por el simple hecho de que al haber mayor número de individuos, hay mayor frecuencia de mudas. No obstante, el efecto del canibalismo por aumento de la densidad, también es muy claro, lo que indica que es un importante aspecto a tener en consideración en futuros cultivos a gran escala.

Hasta donde sabemos, no existen resultados disponibles sobre crecimiento de juveniles o adultos de centollo en laboratorio. Los únicos datos encontrados sobre este aspecto han sido ofrecidos por Iglesias *et al.*, (2002), que obtuvieron adultos (66% de supervivencia), con longitud del caparazón de  $6,5 \pm 0,8$  cm a los 9,5 meses de edad, en condiciones de cultivo semi-intensivo a temperaturas entre 15 y 18°C. Estos datos se corresponden con una tasa de crecimiento de  $0,5\% P d^{-1}$ , que es más bajo que la obtenida durante este experimento, el cual fue entre 0,6 y  $0,8\% P d^{-1}$ . No obstante, es conocido que animales pequeños como los utilizados en este experimento, tienen una tasa de crecimiento más alta que los individuos mayores, pues ésta disminuye progresivamente a medida que el individuo va creciendo, hasta hacerse muy pequeña al final del ciclo de vida. Por otro lado las temperaturas de cultivo utilizadas en nuestros experimentos (entorno a los 20°C) fueron más altas que las empleadas por Iglesias *et al.*, (2002), las cuales variaron entre 15 y 18°C. Posiblemente las temperaturas de cultivo más bajas puedan proporcionar mayor crecimiento a esta especie. En experimentos futuros estudiaremos el efecto de la temperatura en el crecimiento y supervivencia, así como el efecto de otras dietas, tanto naturales como artificiales en el crecimiento del centollo, para intentar optimizar el crecimiento.

No obstante, las tasas de crecimiento son lo suficientemente interesantes para avanzar en el conocimiento de esta especie y hacer de ella una candidata a su cultivo a gran escala, particularmente en regiones templadas, donde las bajas temperaturas del agua impiden una acuicultura competitiva cuando se trata de especies de peneidos u otros crustáceos de altas tasas de crecimiento en países de aguas tropicales. En próximos experimentos se probarán los efectos de diversas dietas naturales (frescas o congeladas) y artificiales (piensos comerciales), en el crecimiento, supervivencia y efectos sobre el proceso de muda.

## Experimentos de nutrición

**Objetivo:** Determinar los efectos de diferentes dietas, naturales y artificiales, en el crecimiento, supervivencia e intervalos de muda en juveniles de centollo.

**Material y métodos:** Los juveniles de centollo utilizados en los dos experimentos realizados sobre nutrición, nacieron en las propias instalaciones del IFAPA Centro Agua del Pino, procedentes de hembras ya fecundadas que fueron capturadas directamente del medio natural.

Los animales utilizados en cada experimento procedían de hembras distintas, sin embargo, en cada experimento por separado se utilizaron animales de la misma puesta.

Los individuos se cultivaron en celdillas individuales para impedir el contacto entre ellos y evitar el canibalismo, cuya práctica es frecuente en centollos (Domínguez, Com. Per.). Asimismo, los datos individuales son más potentes que los agrupados, pues la mortalidad que puede ocurrir durante el experimento, introducirá errores importantes si los datos son colectivos, mientras que podrán ser evitados si los datos son individuales.

Durante las fases larvarias, los individuos se cultivaron con nauplios de *Artemia* enriquecida con SELCO® y posteriormente, en estado de juveniles de centollo, se alimentaron con mejillón fresco, que se utiliza normalmente con buenos resultados para el cultivo de esta especie.

En cuanto a las condiciones de cultivo, durante los 95 días que duraron los experimentos, se controlaron diversos parámetros: la temperatura en torno a  $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ , salinidad de  $35\pm 2$  ppt y un ciclo de luz natural, de fotoperiodo correspondiente a los meses entre diciembre y marzo. Las mediciones de peso se realizaron con una balanza de precisión (COBOS CB complet©) con tres cifras decimales, mientras que la longitud del caparazón se midió con un calibre electrónico (MITUTOYO Absolute coolant proof IP66©), con dos cifras decimales.

En el experimento I se utilizaron 100 juveniles de centollo en 5 bandejas de 20 celdillas individuales cada una, de PVC, gris oscuro, de 6 x 8 cm y una profundidad de agua de 2,5 cm, con un volumen total de 0,14 litros. En el experimento II se utilizaron 20 individuos en 2 bandejas similares pero de 10 celdillas cada una y de dimensiones doble (12 x 16 cm, 6 cm de profundidad y un volumen total de 1,15L). En cada caso el flujo de agua fue muy alto, de  $6,9\text{ L h}^{-1}$  y  $8,5\text{ L h}^{-1}$ , para evitar la necesidad de aireación suplementaria, produciéndose la renovación total del agua en cada celdilla, en torno a un minuto y 8 minutos respectivamente.

Teniendo en consideración que la densidad de cultivo y el espacio disponible pueden afectar al crecimiento de los crustáceos, las dimensiones de las celdillas individuales se eligieron con suficiente espacio para minimizar el posible estrés.

Celdillas experimento I



Celdillas experimento II



Previamente al uso del agua en los experimentos, se le sometió a diversos tratamientos para mejorar su calidad: sucesivos filtrados a través de arena, malla de 25 m y filtro biológico y tratamiento antiséptico con luz ultravioleta.

En ambos experimentos se tomaban datos diarios sobre mudas y mortalidad, para determinar la posible relación entre ambas por el estrés asociado a estos traumáticos procesos.

En el experimento I, los centollos se pesaban individualmente cada 14 días y se registraba el peso de cada uno de ellos, mientras que en el experimento II, además del peso, se medía la longitud del caparazón. Estos datos se utilizaron para calcular la Tasa Diaria de Crecimiento, expresada como (% del peso o longitud del caparazón  $d^{-1}$ )  $=(\ln P2 - \ln P1)/t \times 100$ , donde P1 y P2 son los pesos inicial y final (o la longitud del caparazón, en su caso); Ln, el logaritmo neperiano y t el número de días del periodo considerado. Estas tasas se calculaban para cada intervalo de 14 días y para la totalidad del experimento.

Para determinar el peso, se recogía el individuo con una cucharilla, se depositaba durante unos segundos sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de agua y se procedía a la pesada en una balanza de precisión.

Los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significación de 0.05. Para el experimento I se realizó una prueba ANOVA's (Zar, 1984) para determinar las diferencias en el crecimiento de los centollos alimentados con cada dieta diferente y cuando se detectaron diferencias entre ellas, se realizó un test Tukey. Para el experimento II, las diferencias en crecimiento se determinaron aplicando una t-student. Asimismo, a las diferencias en la frecuencia de mudas también se les aplicó una ANOVA's en el experimento I y una t-student en el experimento II. Previamente a los análisis estadísticos se determinó para cada muestra la normalidad y homogeneidad de la varianza (Zar, 1984).

**Experimento I:** Al inicio del experimento no hubo diferencias significativas en cuanto al peso ( $p > 0,05$ ) entre cada una de los 5 grupos en que se dividieron los 100 individuos. Sólo se tomaron medidas de peso, pues debido a su pequeño tamaño (entre 0,011 g y 0,082 g) no se pudo medir la longitud del caparazón. Las 5 dietas (una por bandeja) utilizadas fueron: camarón congelado, *Palaemonetes pugio*; mejillón fresco, *Mytilus edulis*; pescado blanco, *Merluccius merluccius*; pescado azul, *Sardina pilchardus*; y un pienso comercial para crustáceos (Nippai® 3C,

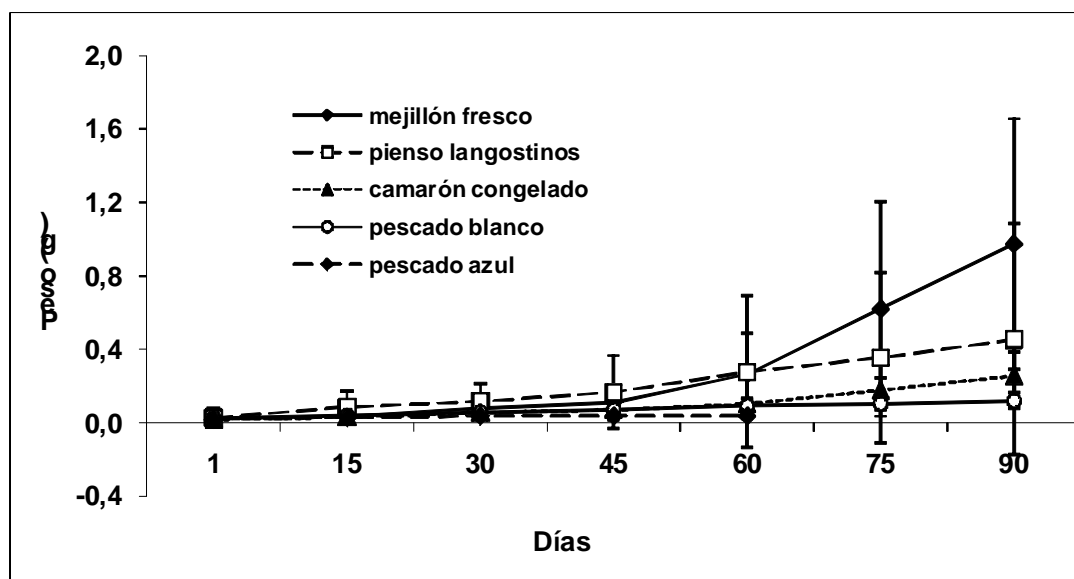
Nipón Formula Feed Manufacturing Co. Ltd.). Al final se determinaron los efectos de cada dieta en el crecimiento, supervivencia y frecuencia de muda. Los centollos fueron alimentados *ad libitum* durante todo el periodo del experimento y cada dos días se retiraba el alimento anterior y se sustituía por el nuevo.

**Experimento II:** En este experimento se utilizaron un total de 20 juveniles de centollo, distribuidos en dos grupos de 10, que ocupaban cada uno una bandeja de 10 celdillas. Cada celdilla contenía un centollo con un peso comprendido entre 0,35 y 1,67 g y una longitud de caparazón comprendida entre 7,3 y 17,6 mm, correspondiendo a animales de unos 4 meses de edad. Al inicio no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en cuanto al peso. Para su alimentación se emplearon dos dietas, una para cada grupo de 10 individuos, una mezcla de trozos de pescado blanco y azul (*Merluccius merluccius* y *Sardina pilchardus*), y un pienso comercial para peces (Skretting® Gemma Diamond 1.2). Al final se determinaron los efectos de cada dieta sobre el crecimiento individual de cada centollo, la supervivencia y el intervalo de muda. Los centollos se alimentaron *ad libitum*, reponiéndoles el alimento cada dos días.

### Resultados

**Experimento I:** La *figura 1* muestra el crecimiento de los juveniles de centollo alimentados con las 5 dietas experimentales. Los alimentados con mejillón fresco crecieron más ( $p < 0,05$ ) y mejor que los demás, alcanzando un peso final de  $0,98 \pm 0,69$  g. El pienso de crustáceos y el camarón congelado crecieron a tasas intermedias, sin que existieran diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ), siendo más pequeños ( $p < 0,05$ ) que los alimentados con mejillón fresco, pero mayores ( $p < 0,05$ ) que los alimentados con pescado blanco o azul. Los pesos finales para cada una de estas cuatro dietas, fueron:  $0,46 \pm 0,63$  g para los alimentados con camarón congelado,  $0,26 \pm 0,13$  g, para los alimentados con pienso de crustáceos;  $0,12 \pm 0,04$  g, para los alimentados con pescado blanco y  $0,04 \pm 0,02$  g, para los alimentados con pescado azul.

*Figura 1*



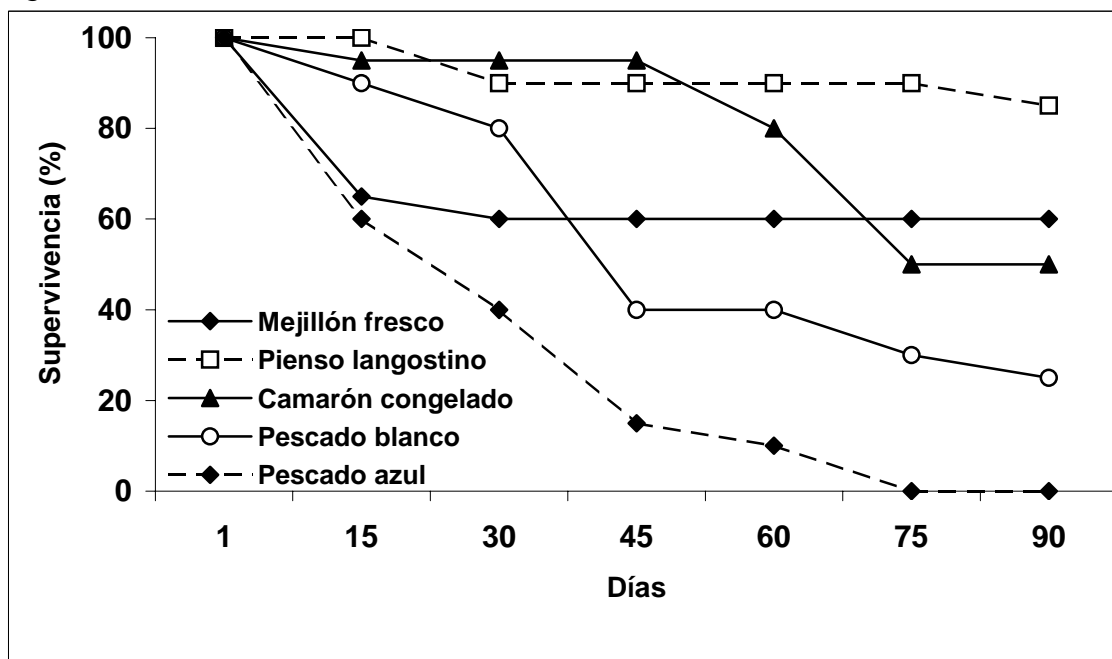


Las tasas de crecimiento totales se muestran en la *Tabla 1*. El grupo alimentado con mejillón fresco tuvo la más alta ( $p < 0,05$ ) tasa de crecimiento ( $4,0 \pm 0,7 \% P d^{-1}$ ), mientras que los pescados blanco y azul proporcionaron una tasa de crecimiento significativamente baja ( $p < 0,05$ ), comparada con las otras tres dietas, sin que hubiera diferencias significativas entre ellas. Las dos dietas intermedias (camarón congelado y pienso para crustáceos) proporcionaron tasas de crecimiento más bajas ( $p < 0,05$ ) que el mejillón fresco, pero más altas ( $p < 0,05$ ) que los dos peces, sin que hubiera diferencias ( $p > 0,05$ ) entre ellas.

*Tabla 1* – Promedio de la tasa de crecimiento total en peso ( $\% P d^{-1}$ ) para los experimentos 1 y 2 y en longitud del caparazón ( $\% L d^{-1}$ ) para el experimento 2. La letras a, b y c indican qué valores son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tasa Crecimiento	Peso (g)	Long. Cap. (mm)
<b>Exp.1</b>		
Mejillón fresco	$4,0 \pm 0,7$ a	-
Pienso para crustáceos	$2,6 \pm 0,5$ b	-
Camarón congelado	$1,7 \pm 0,7$ b	-
Pescado blanco	$1,1 \pm 0,6$ c	-
Pescado azul	$1,0 \pm 0,5$ c	-
<b>Exp. 2</b>		
Pescado blanco y azul	$1,2 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,1$
Pienso para peces	$0,9 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$

Figura 2



La *Figura 2* muestra la mortalidad entre dietas. La supervivencia más alta correspondió a los centollos alimentados con pienso para crustáceos (19, con sólo un muerto a lo largo del experimento), mientras que el mejillón fresco proporcionó una muy alta mortalidad durante las primeras dos semanas (7), pero una sola muerte en los siguientes 15 días y ninguna más hasta el final del experimento. Los grupos alimentados con los dos tipos de peces tuvieron la mortalidad más alta, y, por ejemplo, antes de finalizar el experimento, a los 60 días, habían muerto todos los 20 individuos que fueron alimentados con pescado azul.

La *Tabla 2* muestra la frecuencia total de mudas, correspondiendo la más alta ( $19 \pm 4$  días) a los alimentados con mejillón fresco, que fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) al resto de dietas, con excepción de los alimentados con pienso de langostinos ( $23 \pm 4$  días), con los que la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

*Tabla 2- Promedio en días de los intervalos de mudas para las diferentes dietas en los experimentos 1 y 2, para la totalidad de los experimentos. Las letras a y b indican que los valores son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).*

#### Exp.1

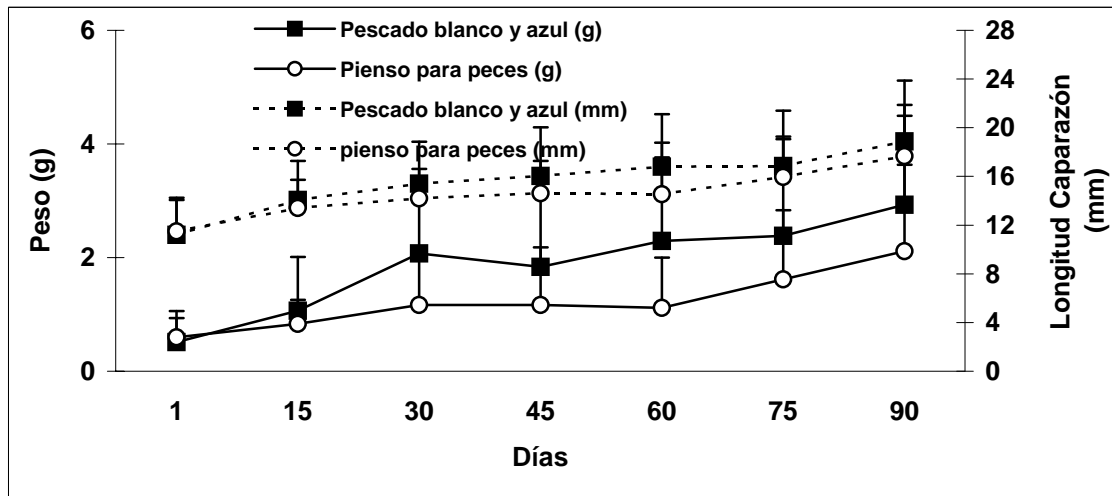
Mejillón fresco	$19 \pm 4$ a
Pienso para crustáceos	$23 \pm 4$ a
Camarón congelado	$28 \pm 9$ b
Pescado blanco	$30 \pm 10$ b
Pescado azul	$30 \pm 10$ b

#### Exp. 2

Pescado blanco y azul	$28 \pm 19$ a
Pienso para peces	$53 \pm 12$ b

**Experimento II:** La *Figura 3* muestra el crecimiento en peso (g) y longitud del caparazón (mm) de los centollos alimentados con las dos dietas probadas (mezcla de trozos de pescado blanco y azul y pienso comercial para peces). No hubo diferencias ( $p > 0,05$ ) en el crecimiento de los centollos a lo largo del experimento comparando las dos dietas, ni en cuanto al peso ( $2,9 \pm 1,8$  g y  $2,1 \pm 1,5$  g) ni en cuanto a la longitud del caparazón ( $18,9 \pm 0,5$  mm y  $17,7 \pm 3,3$  mm). De igual forma, no hubo diferencias en las tasas de crecimiento (*Tabla 1*), ni en peso ( $1,2 \pm 0,4$  % P d<sup>-1</sup> y  $0,9 \pm 0,3$  % P d<sup>-1</sup>) ni en longitud del caparazón ( $0,4 \pm 0,1$  % L d<sup>-1</sup> y  $0,4 \pm 0,2$  % L d<sup>-1</sup>). La mortalidad fue más baja que en el experimento I, dándose sólo tres casos, dos en los centollos alimentados con la mezcla de pescados blanco y azul (uno a los 30 días y otro a los 75 días), y uno en los centollos alimentados con pienso de peces (después de 75 días).

Figura 3



En la *Tabla 2* se muestra también la frecuencia de mudas en este experimento. La más alta frecuencia correspondió a los centollos alimentados con pescado ( $28 \pm 19$  días), siendo más alta ( $p < 0,05$ ) que los alimentados con pienso de pescado ( $53 \pm 12$  días). No obstante, a pesar de que los intervalos de muda fueron diferentes en los dos casos, tanto el crecimiento absoluto como la tasa de crecimiento fueron similares ( $p > 0,05$ ) para las dos dietas.

**Discusión:** A día de hoy hay pocos datos sobre crecimiento de centollos cultivados en condiciones de laboratorio. Además, la mayoría de los datos que existen se ocupan del crecimiento de adultos y vienen expresados en % de incremento en la longitud del caparazón. A nuestro entender, expresar los resultados sobre crecimiento en términos de longitud del caparazón, no es el mejor modo de hacerlo. Sería como tomar los datos de peso sólo cuando mudan y no a intervalos regulares con independencia de si han mudado o no. A la vista de nuestros resultados, la gran variabilidad en los períodos de muda (tanto entre diferentes dietas, como entre la misma dieta), dificultan observar la evolución del crecimiento, si los resultados se expresan en términos de incremento en la longitud del caparazón.

Los resultados que se ofrecen en el presente trabajo, con juveniles de centollo de 2 a 4 meses de edad, están expresados en incremento de peso durante un intervalo de tiempo, no entre mudas y, por tanto, no son posibles las comparaciones directas con los resultados de crecimiento de otros autores. No obstante, a fin de comparar resultados hemos hecho una aproximación para expresar nuestros datos en términos de incremento en la longitud del caparazón. En el experimento I se ha determinado el peso cada 14 días y los intervalos de muda para las 5 dietas y hemos estimado los incrementos de peso que se han producido durante el período de intermuda. Si estos periodos han sido de  $19 \pm 4$  días,  $23 \pm 4$  días,  $28 \pm 9$  días,  $30 \pm 10$  días y  $30 \pm 10$  días, respectivamente para las dietas mejillón fresco, pienso de langostinos, camarón congelado, pescado blanco y pescado azul, es posible estimar (peso total/período de intermuda) que durante el período de intermuda los centollos han aumentado en peso un 40,3%, 96,0%, 96,3%, 66,1% y 47,6% en cada caso. Es interesante resaltar que los centollos con

mayor crecimiento total y con la mayor tasa de crecimiento (los alimentados con mejillón fresco) son los que tienen menor incremento de peso en el periodo de intermuda, debido a que la frecuencia de mudas ha sido más alta y por tanto el peso total ha debido dividirse por un número mayor.

De igual forma, también hemos estimado los intervalos medios de muda en el experimento II, en centollos alimentados con pescado blanco y azul (28 días) y pienso para peces (58 días), donde si ha sido medida la longitud del caparazón. La tasa media de incremento del caparazón tras cada muda ha sido de 15,3% y 26%, para centollos alimentados con pescado blanco y azul y con pienso para peces, respectivamente, resultando valores más bajos que los aportados por Corgos, *et al.*, (2007) para cultivo de juveniles en laboratorio, también en similares condiciones de aislamiento. Los juveniles empleados eran mayores que los de nuestro experimento, por lo que podríamos esperar un mayor porcentaje de crecimiento intermuda en nuestro caso, pero contrariamente a ello, no fue así. Sólo Sánchez *et al.* (2007), aporta incrementos de intermuda (33,8 a 36,7%) para juveniles de *M. squinado* de tamaño similar a los empleados en este experimento y de igual manera tienen al final un crecimiento mayor que el nuestro.

También nuestros resultados son inferiores (en torno a un 30%) a otros publicados en la bibliografía especializada, para individuos silvestres y cultivados (Drach, 1939; Le Foll, 1993; González-Gurriarán *et al.*, 1995), además, siendo datos referidos a animales más grandes que los utilizados por nosotros. Todo esto indica que las dietas probadas en el experimento II (mezcla de trozos de pescado blanco y azul y pienso para peces), no son apropiadas para el cultivo del centollo. La composición de la dieta artificial, con un 20% de lípidos y elaborado inicialmente para peces, ha sido probablemente la principal razón del escaso rendimiento obtenido con esta dieta. Asimismo, en el caso de la mezcla de pescado, una de las razones de su bajo crecimiento, podría estar relacionada con el alto contenido lipídico de la sardina. A la vista de estos resultados, en un futuro se probarán dietas con menos del 10% de contenido lipídico, pero asegurando un alto contenido en HUFA.

El crecimiento de juveniles de centollo en grandes tanques también ha sido estudiado por Iglesias *et al.* (2002), obteniendo adultos con una supervivencia del 66% y  $6,5 \pm 0,8$  cm de longitud del caparazón, a los 9,5 meses de edad, en condiciones de cultivo semiintensivo y una temperatura entre 15°C y 18°C. Este incremento se corresponde con una tasa de crecimiento de  $0,5 \% L d^{-1}$ , que es más alta que la obtenida durante los 3 meses de duración del experimento II ( $0,4 \% L d^{-1}$ ), también en contra de lo esperado, ya que individuos más pequeños como los utilizados en el experimento II, deberían tener una tasa de crecimiento más alta, lo que no ocurrió. Se confirma de nuevo que los trozos de pescado y el pienso para peces no son una dieta apropiada para el cultivo de juveniles de centollo.

La temperatura de cultivo empleada en el experimento II fue más alta que la utilizada por Iglesias *et al.* (2002), la cual osciló entre 15 y 18 °C y similar a la empleada por González-Gurriarán *et al.*, (1995), aunque Corgos *et al.*, (2007), reseñan que la temperatura no parece ser un factor de influencia clave en el crecimiento.

El tamaño del tanque, el aislamiento y el tiempo de retención afectan al crecimiento de los centollos y otras especies de crustáceos (Wilber and Wilber, 1989; González- Gurriarán *et al.*, 1998), sin embargo, en el experimento I, el crecimiento en aislamiento y utilizando celdillas relativamente pequeñas, no ha sido impedimento para obtener un alto crecimiento cuando los individuos han sido alimentados con un buena dieta, como el mejillón fresco. La tasa de crecimiento obtenida (4% diario en peso) es muy satisfactoria y la buena calidad de esta dieta se ve reafirmada con un bajo periodo de intermuda, menor de 20 días, que es inferior al referido por Sánchez *et al.*, (2007), entre 20 y 40 días, para la misma especie cultivada en aislamiento y empleando animales de edades similares. Asimismo, Sánchez *et al.*, (2007), también obtiene un buen rendimiento en el crecimiento de juveniles de *M. brachydactyla*, cuando se les cultiva en aislamiento y se les alimenta con mejillón fresco o erizos de mar. Esto indica que el aislamiento no debe ser un factor tan limitante para esta especie como comúnmente se estima para crustáceos, sugiriendo que es necesario llevar a cabo estudios más en profundidad del efecto real del aislamiento sobre el crecimiento.

La alta mortalidad que ha afectado a los animales pequeños del experimento I, podría estar parcialmente asociada al estrés por la manipulación a la que se les ha debido someter durante los procesos para determinar el peso. Según Iglesias *et al.*, (2002), los efectos de la manipulación sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de centollo, son muy considerables durante los primeros estadios del ciclo de vida. También es llamativa la alta mortalidad en el grupo alimentado con mejillón fresco ocurrida sólo al inicio del experimento y desaparecida casi completamente en fases posteriores. Esto podría ser explicado por la simple resistencia física que opone el mejillón crudo (de tejidos duros y fibrosos) a ser troceado por centollos muy pequeños y con pinzas muy débiles, factor que va disminuyendo con el tiempo, al fortalecerse las pinzas con el crecimiento. Así, los animales pequeños habrían muerto simplemente por inanición, al no tener capacidad para ingerir el alimento.

En el **2008-2009** se realizaron dos experimentos de alimentación con juveniles de centolla. El primero sobre el efecto de la congelación de la dieta y el segundo sobre el efecto de la alimentación en las primeras fases del desarrollo en la muda terminal.

### **1.- Efecto de la congelación de la dieta sobre el crecimiento de juveniles de centollo**

El mantenimiento de un stock de mejillones vivos para su uso exclusivo como alimento de centollos, comporta varias dificultades por el espacio que ocupa en las instalaciones, la mano de obra que demanda, el consumo de recursos, etc, que podrían minimizarse utilizando mejillón congelado. El objetivo del presente trabajo ha sido determinar el efecto que puede tener el mejillón congelado sobre el crecimiento de juveniles de centollo, cuando se utiliza como fuente exclusiva de alimentos.



## Material y métodos

En los dos experimentos se utilizaron juveniles de centollos nacidos en nuestras propias instalaciones de Agua del Pino y procedentes de hembras capturadas en el medio natural, en las costas atlánticas de Marruecos. Tras unos días de adaptación a los tanques de cultivo siendo alimentados con mejillón fresco, se empezaron a producir puestas espontáneas de hembras que ya venían ovadas. En estas condiciones de cautividad una hembra puede tener hasta tres puestas consecutivas sin la intervención del macho (Iglesias *et al.*, 2002).

Los animales utilizados en ambos experimentos nacieron en estas condiciones. Fueron todos procedentes de una misma hembra y de una misma puesta en cada experimento, pero procedentes de hembras distintas si consideramos separadamente los experimentos I y II. El diseño experimental fue similar en ambos casos, manteniendo a los animales en aislamiento, sistema que se adoptó para eliminar las posibles pérdidas por canibalismo (Domingues y Alaminos, 2008), así como para hacer un seguimiento especialmente individualizado del crecimiento, número de mudas, mortalidad, etc.

Durante los estados larvarios previos a centollo, cada puesta se cultivó aislada de las demás a 20°C durante 14-16 días, alimentados con nauplios de artemia (*Artemia sp.*), enriquecida con SELCO® Completada la metamorfosis, los centollos del experimento I se alimentaron durante los 30 días previos al inicio del experimento con un pienso comercial para langostinos, al cabo de los cuales se les trasladó a celdillas individuales. Por su parte, los 16 juveniles del experimento II provenían de un experimento anterior ya finalizado, en el que habían recibido como alimento mejillón fresco, e igualmente se depositaron en celdillas individuales, aunque de mayor tamaño que las anteriores. Previamente a depositarlos en las celdillas, se pesaron individualmente todos los animales de ambos experimentos y en el experimento II, además, se midió la longitud del caparazón. El total de animales de cada experimento se dividió en dos grupos iguales, de 20 y 8 individuos, respectivamente, y cada grupo se alimentó de forma distinta, uno con mejillón fresco y el otro con mejillón congelado, dados en una sola dosis diaria y *ad libitum*. Diariamente se revisaba el cultivo para comprobar la mortalidad y cada 15 días se tomaban nuevos datos biométricos sobre el crecimiento de los animales, en cuanto a peso (experimento I) y en cuanto a peso y longitud del caparazón (experimento II). Los pesos se midieron con una balanza de precisión de tres decimales (COBOS CB complet©), y la longitud del caparazón con un calibre electrónico MITUTOYO Absolute coolant proof IP66©, de 2 decimales. Para proceder al pesaje de los animales, se los recogía de la celdilla con una cucharilla metálica, se los depositaba durante unos segundos sobre papel absorbente, para recoger el excedente de agua, y se procedía a su pesaje sobre el plato de la balanza. Después se les devolvía a la celdilla de la que habían sido extraídos. Las tasas de crecimiento instantáneas, se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$TC (\% \text{ peso o long cap. día}^{-1}) = (L_{np2} - L_{np1}) / t * 100$$

Donde:

TC: tasa de crecimiento, expresada como el porcentaje de incremento diario en peso o longitud del caparazón.

L<sub>np2</sub>: logaritmo neperiano del peso o longitud del caparazón final.

Ln<sub>p1</sub>: logaritmo neperiano del peso o longitud del caparazón inicial.  
t: tiempo, en días.

Los análisis estadísticos para el tratamiento de datos se realizaron con un nivel de significación de  $p < 0,05$ , aplicándose en ambos experimentos el test de la t de Student para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de los centollos para cada tratamiento.

El fotoperiodo se correspondió con el ciclo de luz natural propio del período de marzo a mayo en latitudes medias del suroeste español (16-8h). Temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  y salinidad de 35ppt; renovación de agua suficiente, inferior a 4 horas y sin aireación forzada. Las celdillas individuales del experimento I estaban fabricadas en PVC gris y dispuestas en bandejas de 20 compartimentos de 6 x 8 cm de área de fondo y 3,5 cm de profundidad. Para el experimento II se emplearon 16 celdillas individuales de 80x35 cm de fondo y 15 cm de profundidad. El tamaño de las celdillas se eligió en cada caso asegurándonos que los animales tenían suficiente espacio para moverse, dado que el espacio disponible es un factor que afecta a su crecimiento (Alaminos, 2008, datos no publicados).



Celdillas  
6x8 cm de fondo y 3,5 cm  
de profundidad



Celdillas  
12x16 cm de fondo y 7 cm  
de profundidad



Celdillas  
35x27 cm de fondo y 15 cm  
de profundidad

En ambos experimentos se utilizó agua de mar que había sido previamente tratada por decantación, filtrada a través de filtros biológicos de 25  $\mu\text{m}$ , de luz de malla, y esterilizada con luz ultravioleta.

### Resultados

La figura 1 muestra la evolución del crecimiento de los juveniles de centollo del experimento I. Los animales alimentados con mejillón fresco crecieron significativamente más ( $p < 0,05$ ) que los alimentados con mejillón congelado, alcanzando al final un peso medio total de  $302 \pm 118$  mg, frente a  $70 \pm 40$  mg, alcanzado por los alimentados con mejillón congelado, lo que supone al final que los primeros crecieron a una tasa de  $4,9 \pm 0,7$  %Pd<sup>-1</sup>, muy superior a la de  $2,7 \pm 0,7$  %Pd<sup>-1</sup>, alcanzada por los segundos. Asimismo, la mortalidad fue del 10 y el 25%, respectivamente para animales alimentados con mejillón fresco y mejillón congelado.

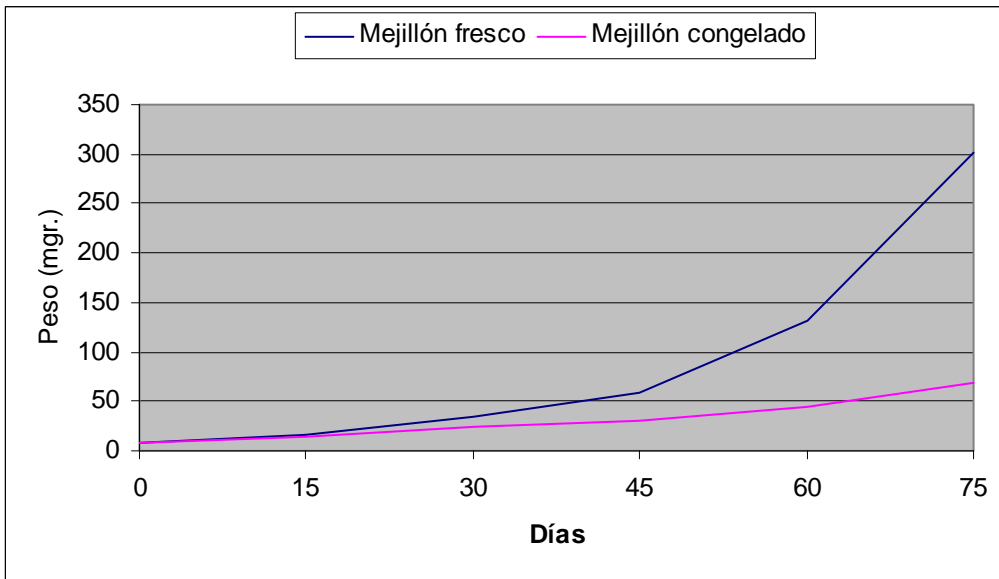


Figura 1

La figura 2 muestra el crecimiento en peso de los juveniles de centollo en el experimento 2. El grupo de animales alimentados con mejillón fresco creció significativamente más ( $p < 0,05$ ) que el grupo alimentado con mejillón congelado, alcanzándose, finalmente, pesos medios de  $92,53 \pm 38,6$  g y  $41,53 \pm 17,7$  g, respectivamente, tras los 84 días de duración del experimento. De forma similar, la tasa de crecimiento de los animales alimentados con mejillón fresco ( $3,3 \pm 1,0$  %Pd<sup>-1</sup>) fue más alta que los animales alimentados con mejillón congelado ( $2,4 \pm 1,4$  %Pd<sup>-1</sup>). No se produjeron muertes durante el período de experimentación, siendo la supervivencia del 100% en ambos tratamientos.

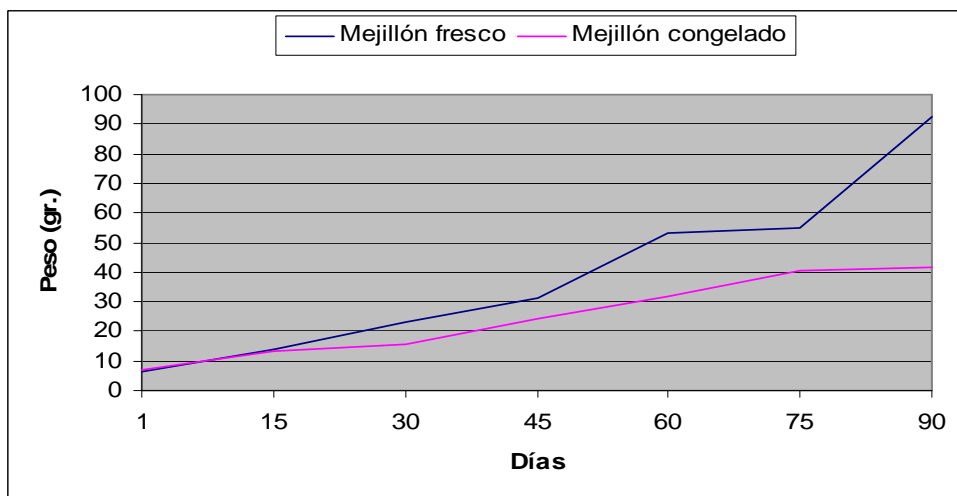


Figura 2

Finalmente, la figura 3 muestra el crecimiento de los juveniles de centollo del experimento II, con relación a la longitud del caparazón.

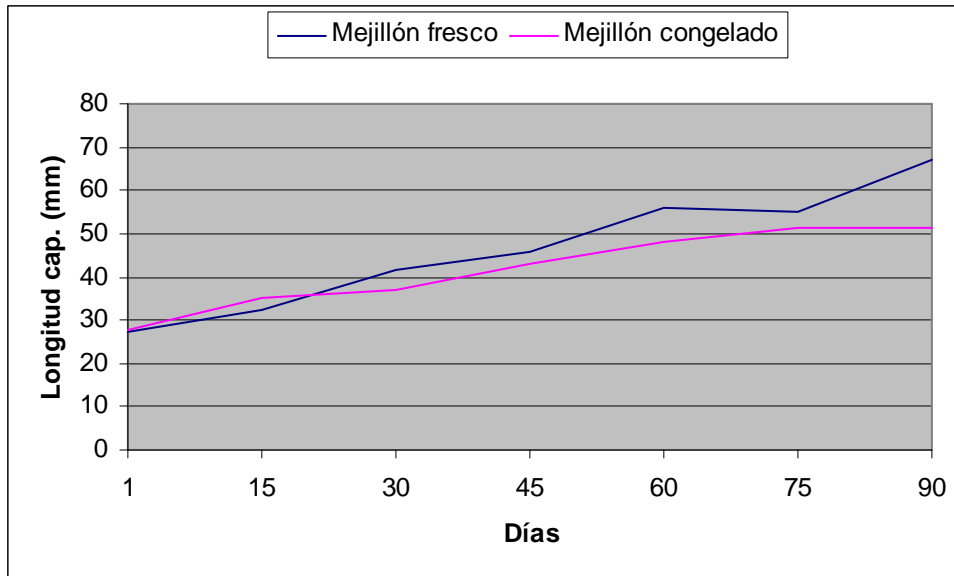


Figura 3

Atendiendo a este segundo parámetro, también se reproducen los resultados anteriores, es decir, los 8 animales alimentados con mejillón fresco crecieron significativamente más ( $p < 0,05$ ), que los alimentados con mejillón congelado, siendo sus tasas de crecimiento de  $1,1 \pm 0,3$  %LCd<sup>-1</sup> y de  $0,8 \pm 0,4$  %LCd<sup>-1</sup>, respectivamente, y alcanzando tamaños respectivos de  $66,9 \pm 10,4$  mm y de  $51,5 \pm 8,4$  mm, al cabo de los 84 días de duración del experimento.

### Discusión

La elección del mejillón (*Mytilus, sp*) para estudiar cómo afecta el proceso de congelación de la dieta sobre el crecimiento de juveniles de centollo, se adoptó en atención a los resultados alcanzados por Alaminos y Domingues, (2008), relativos a que el mejillón es la mejor dieta de las que se testaron para el crecimiento de juveniles de centollo criados en cautividad. Asimismo, la posibilidad de obtener datos directamente comparables, reforzó esta elección, pues los dos experimentos se realizaron en las mismas condiciones. En ambos experimentos (el de 2008 y el actual) se observan tasas de crecimiento con mejillón fresco altas y prácticamente iguales, de  $4,6 \pm 0,8$  %Pd<sup>-1</sup> y  $4,9 \pm 0,7$  %Pd<sup>-1</sup>, respectivamente, cumpliéndose el principio de reproducibilidad.

A la luz de los resultados obtenidos en los experimentos I y II, se puede concluir que el mejillón fresco, desprovisto de branquias y otras vísceras, es una buena dieta para el crecimiento de juveniles de centollo, pero su calidad nutritiva disminuye cuando se le somete a un proceso de congelación durante 21 días. Mientras que en el primer experimento, los animales alimentados con mejillón fresco crecieron a una tasa de casi 5 %Pd<sup>-1</sup>, alcanzando un peso medio de algo más de 300 mg, los que fueron alimentados con mejillón congelado crecieron a una tasa inferior al 3 %Pd<sup>-1</sup> y no llegaron a alcanzar los 50 mg de peso medio.

Igualmente ocurre en el experimento II, donde se usaron animales de mayor tamaño y edad, pues mientras que el grupo alimentado con mejillón fresco creció a una tasa superior al 3%pd<sup>-1</sup>, alcanzando un peso final de más de 90 g, los alimentados con mejillón congelado no llegaron a alcanzar la mitad de ese peso y una tasa de crecimiento inferior al 2,5%Pd<sup>-1</sup>.

Se puede pues concluir como cierta la hipótesis de que la congelación afecta a la calidad nutritiva del mejillón. Sin embargo, es de hacer notar que el efecto de la congelación en el experimento II, donde se utilizaron animales más grandes, es menos acentuado que en el experimento I, realizado con animales más pequeños. En efecto, en el experimento I, la *p* empieza a manifestar diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento ( $p < 0,05$ ) muy pronto, a los 30 días de inicio del experimento, con una  $p_{(I)} = 0,006$ , y llega a alcanzar valores muy bajos ( $p_{(I)} = 1 \times 10^{-7}$ ) al final del experimento (75 días). Sin embargo, en el experimento II no aparecen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), hasta los 84 días de experimento, donde  $p_{(II)} = 0,02$ , lo que indica que el efecto de la congelación de la dieta es más acusado en las fases más tempranas del crecimiento. Las figuras 2 y 3 reflejan bien esta situación pues la separación entre las curvas de crecimiento de mejillón fresco y de mejillón congelado se produce mucho antes en la figura 2, correspondiente a los animales pequeños.

A más abundancia, los animales pequeños crecen a mayor tasa que los grandes en las mismas condiciones de cultivo, sin embargo, en los experimentos I y II, los animales que recibieron mejillón congelado, crecieron a tasas casi idénticas, siendo los del experimento I más pequeños que los otros y contradiciendo lo anterior. Incluso el grupo alimentado con mejillón fresco del experimento II, creció a mayor tasa que el alimentado con mejillón congelado del experimento I, siendo igualmente mucho más pequeños. Cabe pues afirmar que el efecto de la congelación del alimento se deja sentir con más intensidad en animales pequeños, lo que a su vez sugiere que este proceso afecta con más intensidad a nutrientes esenciales en las primeras etapas de desarrollo. Hay varios hechos que apuntan a esta hipótesis.

Es conocido que el proceso de congelación afecta al músculo de las especies marinas, particularmente a la composición de las proteínas miofibrilares (Matsumoto, 1980; Shenouda, 1980). Ladicos y Lougovois (1990) y Mackie (1993), por su parte, describieron que la congelación produce desnaturalización de proteínas y ácidos grasos, particularmente de los ácidos grasos libres.

Asimismo, la congelación también produce cambios estructurales y fisiológicos en los componentes intracelulares, provocando la deshidratación del músculo, disminución de los lípidos polares y triglicéridos por hidrólisis, lo que produce un incremento en las concentraciones de ácidos grasos libres y diacigliceridos (Paredi *et al.*, 2006). Finalmente, también ha sido descrito en varias especies marinas el aumento de la concentración de ácidos grasos libres y la disminución de los lípidos polares durante los dos primeros meses de congelación (Beltrany Moral, 1991).

La sinergia entre todos los efectos anteriormente citados, es probablemente la causa del menor crecimiento de los centollos cuando se les da mejillón congelado, sin embargo no explican porqué este efecto se manifiesta con más



intensidad en animales pequeños. Los datos que ofrecen Paredi *et al.*, 2006 y Beltrany Moral, 1991, relativos a la disminución de lípidos polares, puede arrojar luz sobre esto y dar pie para abrir una interesante vía de investigación en este asunto. Los lípidos polares son los principales componentes de las paredes celulares y su falta o disminución en la dieta va a dificultar la división celular al impedir o relentizar la formación de nuevas membranas. Esto deberá reflejarse inevitablemente en un menor crecimiento del individuo y su efecto se dejará sentir con más intensidad durante el período de mayor tasa de crecimiento, es decir, cuando los animales son más pequeños.

En el momento actual, todavía no existen demasiados datos publicados sobre el crecimiento de centollos (*Maja Brachydactyla*) en laboratorio, ya sean juveniles o adultos (Alaminos y Domingues, 2008) y además, cuando existen, vienen referidos en términos de longitud del caparazón, lo que no es un buen índice de medida del crecimiento, dado que los centollos, y los crustáceos en general, crecen en tamaño sólo cuando cambian el exoesqueleto tras el proceso de la ecdisis (Chang, 1989, 1995), sin dar información de cómo evoluciona el crecimiento en los períodos de intermuda.

Tal es el caso de Iglesias *et al.*, 2002, que obtuvieron adultos de centollo, con una supervivencia del 66%, alcanzando una longitud de caparazón de  $6,5 \pm 0,8$  cm, a los 9,5 meses de edad, en condiciones de cultivo semintensivo, entre 15°C y 18°C, lo que se corresponde con una tasa de crecimiento de  $0,5 \text{ \%pd}^{-1}$ . En el segundo experimento, nosotros obtuvimos centollos con una longitud del caparazón de  $6,69 \pm 10,4$  cm y de  $5,15 \pm 8,4$  cm, respectivamente para animales alimentados con mejillón fresco y mejillón congelado, tras 84 días de cultivo, lo que se corresponde con unas tasas de crecimiento de  $1,1 \pm 0,3 \text{ \%LCd}^{-1}$  y de  $0,8 \pm 0,4 \text{ \%LCd}^{-1}$ . No obstante, a diferencia de Iglesias *et al.*, estos resultados se obtuvieron en cultivo intensivo y aislamiento.

La temperatura de cultivo en el presente experimento fue alta (18°C) comparada con la empleada por Iglesias *et al.*, (2002), que varió entre 15 y 18°C, aunque similar a la referida por González-Gurriarán *et al.*, (1995). Sin embargo, Corgos, *et al.* (2007), refieren que la temperatura no parece ser un factor clave en el crecimiento.

El tamaño del tanque y el aislamiento, también afectan al crecimiento de los centollos y otras especies de crustáceos (Wilber and Wilber, 1998; González-Gurriarán, *et al.*, 1998), sin embargo en nuestro trabajo tuvimos tasas de crecimiento muy altas (cercasas al  $5 \text{ \%Pd}^{-1}$ ), con los animales aislados en celdillas relativamente pequeñas, cuando se utiliza un buen alimento (mejillón fresco) como dieta. La calidad del mejillón fresco como dieta también viene avalada por el intervalo de muda ( $16,0 \pm 5,9$  días), inferior a los 20-40 días referidos por Sánchez *et al.* (2007), usando animales de la misma especie y edad, cultivados en aislamiento.

## **Observaciones sobre el comportamiento de los juveniles de centollo, con relación a la ingesta de alimentos, durante las fases previas y posteriores a la muda**

La ecdisis es un proceso muy importante en crustáceos y particularmente en centollos. Mientras dura, se producen gran variedad de cambios fisiológicos y morfológicos, que dejan al animal inerte frente a ataques exteriores y le provocan un gran aumento del estrés. Reconocer de una manera fácil el momento en que se va producir la muda, podría ser un importante factor de ayuda para su cría en cautividad, dado que permitiría al acuicultor adelantarse al evento y minimizar los efectos negativos que puedan derivarse del proceso. Por ejemplo, aislar al individuo unos días antes de la muda, sería una buena medida para evitar posibles pérdidas por canibalismo. En este sentido, se ha venido observado que en días anteriores y posteriores a la muda, el animal deja de comer temporalmente o al menos reduce de manera apreciable la ingesta de alimentos, por lo que se ha tratado de cuantificar este factor para comprobar si podría ser adoptado como un indicador fácilmente reconocible de que está cercano el proceso de la ecdisis.

### Material y métodos

La observación de la cantidad de alimento ingerida se llevó a cabo durante la realización del experimento sobre “*efecto del histórico de confinamiento en la muda terminal*”, que se detallará más adelante, por lo que las condiciones experimentales de cultivo son comunes en ambos casos y se describirán en ese experimento.

Los animales se cultivaron aisladamente en celdillas individuales y como alimento se ofrecía mejillón fresco, en una sola toma diaria y manteniendo el siguiente protocolo:

- \* Si el animal había comido todo o algo de la ración del día anterior, se le daba una ración completa para la siguiente toma.
- \* Si la ración del día anterior estaba completa, sin tocar, se la sustituía con media ración para el día siguiente. De esta manera nos asegurábamos de que aunque no comieran, tenían suficiente disponibilidad de alimentos. Diariamente se anotaba la cantidad añadida, si había ingerido todo o algo de la ración anterior y la posible existencia de mudas.

### Resultados y discusión

Se ha venido observando que la ingesta de alimentos de los juveniles de centollo criados en las condiciones experimentales descritas, es bastante irregular. Aleatoriamente se alternan períodos de gran voracidad y periodos en los que la ingesta disminuye o incluso desaparece completamente, sin que aparentemente existan causas que lo justifiquen. No obstante, en todos los casos, en el momento de la ecdisis, se produjeron períodos de ayuno asociados a la muda y en la mayoría de estos casos, este período se prolongó durante unos días después de la muda. La frecuencia de los períodos de ayuno antes y después de la ecdisis se da en la tabla 9.

**Tabla 9: Frecuencia de períodos de ayuno**

Días de ayuno	Casos de ayuno antes de la muda	Casos de ayuno después de la muda
0	0	8
1	4	18
2	8	25
3	10	12
4	6	8
5	7	2
6	10	1
7	9	0
8	10	2
9	7	0
10	3	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	1	0
15	1	0

Durante el período experimental, los 48 juveniles de centollo sometidos a observación mudaron en 76 ocasiones y en todos los casos se paralizó la ingesta de alimentos cuando el animal se está preparando para la ecdisis. Asimismo, en la mayoría de los casos (89%), este período de ayuno se prolongó más allá de producirse la muda. No obstante, este comportamiento frente a la alimentación varía de una manera estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) si consideramos las fases anteriores y posteriores a la muda, siendo el período medio sin ingesta antes de la muda de  $5,7 \pm 2,9$  días y de  $2,1 \pm 1,6$  días después de la muda. De igual manera, el comportamiento antes de la muda es más errático, pues mientras que el período sin ingesta varía en un arco de 1 a 15 días en la fase previa, el arco de variación se reduce entre cero y 8 días en las fases posteriores.

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de que la ingesta de alimentos se detiene como consecuencia de la muda, aunque también se ha comprobado que este comportamiento no es exclusivo de los animales que están preparándose para la ecdisis, lo que invalida este factor como un indicador fácilmente reconocible del inicio de la muda.

Actividad 5.2.: Tanques de cultivo de juveniles.

### ***Maja squinado*-LIMIA**

El trabajo desarrollado en el LIMIA con los juveniles de *Maja squinado* se ha centrado en dos líneas de investigación:

- 1.- Estudio de diferentes estructuras para la realización del pre-engorde.
- 2.- Estudio de densidades óptimas y efecto de la presencia de camuflaje.

## 1- ESTUDIO DE DIFERENTES ESTRUCTURAS DE PRE-ENGORDE

### Estructura individual cultivo intensivo

Siguiendo el modelo de los sistemas empleados en el IGafa de Galicia para el cultivo individual de bogavante y teniendo en cuenta la falta de espacio de nuestro centro, se ha diseñado un sistema de pre-engorde individual basado en cilindros de 10 cm de diámetro y 30 cm de altura con una base de malla de 500  $\mu$ m. Estas estructuras ensartadas de diez en diez en un tubo de 20 mm de diámetro se colgaron en un tanque de 5000 litros de capacidad equipado con un sistema de mareas diseñado con la ayuda de los técnicos del IGafa y adaptado a nuestras necesidades. Se fabricaron doscientos cilindros que se agruparon en 5 grupos de 40 cilindros identificados individualmente.



La marea del tanque se realiza aproximadamente en dos horas consiguiéndose de este modo la renovación total del volumen de agua dentro de los cilindros de diez a doce veces diarias. El tanque está equipado con un sistema de climatización con el objeto de mantener la temperatura en los valores deseados para la realización de las experiencias. El tanque se ha mantenido en circuito abierto con un caudal regular de 10L/min, previamente a su entrada en el tanque el agua ha pasado por un sistema de filtración a 10  $\mu$ m y un esterilizador por ultravioleta.

Este sistema a pesar de precisar de bastante tiempo para su control, limpieza y alimentación de los juveniles es una estructura excelente para la realización de ensayos con centollo ya que permite en un solo tanque la realización de varias pruebas distintas en las mismas condiciones exactas de calidad del agua, temperatura, contaminantes etc. evitando de este modo el efecto tanque. Permite el control individual de los individuos, seguimiento de los ciclos de mudas y evita los errores que introduce la mortalidad cuando los datos son colectivos, sin embargo es un sistema demasiado trabajoso en el caso de hablar de cultivos industriales.

Dentro de estas estructuras se realizaron los ensayos de nutrición, densidades y camuflaje.



## Estructura colectiva cultivo extensivo

Se ha realizado una primera prueba de siembra de juveniles de *M. squinado* en extensivo en estructuras flotantes en medio del mar. Para ello se dispusieron en mayo de 2008 colgadas de las jaulas de cultivo de peces en el puerto de Andratx, cuatro filas de cinco ostreras cada una, cada ostrera lleva cuatro cestillas con tapa. Se mantuvieron en el mar hasta el momento de la siembra con la intención de que se poblaran de "fouling".

El objetivo principal de esta prueba fue evaluar la supervivencia y el crecimiento de los juveniles en extensivo sin aporte de alimento y sujetos a las condiciones de temperatura, turbidez, corrientes, etc, del medio natural durante los meses que duró la experiencia (junio, julio y agosto) y observar el comportamiento de las estructuras y los problemas que se producían así como estudiar el mantenimiento y control necesarios.

Esta prueba, totalmente extensiva, se comparará con la intensiva, observando al final de la etapa de pre-engorde (día 90), el crecimiento y la supervivencia en este medio. Para ello, se dispusieron en cada cestillo 4 centollas (densidad 127 ind/m<sup>2</sup>) de 33 días, siete días más tarde que las que se colocaron en los cilindros de cultivo individual.

Semanalmente se muestrearon las ostreras para controlar la supervivencia y observar el estado de desarrollo del fouling. Los muestreos se realizaban in situ mediante una embarcación. La supervivencia a día 90 fue del 60%, las mayores mortalidades se dieron al principio de la experiencia pero a partir del día 60 de edad hasta el día 90 no se dieron más bajas.

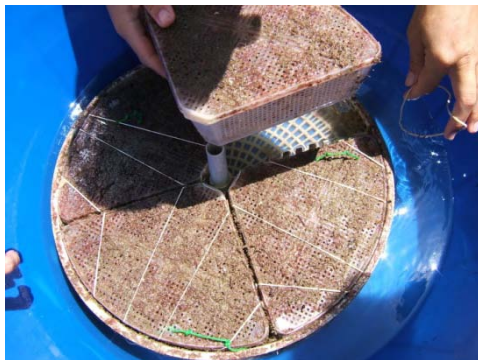


Fig. 1: Cestillos de cultivo extensivo



Fig. 2: Ostreras colgadas de las jaulas

Fig. 3: Detalle de un cuarteron ostrando un juvenil de centolla.





En el gráfico I se muestran los datos comparativos de crecimiento de los juveniles en fase de engorde, a partir de los 90 días de edad, dependiendo del sistema de preengorde utilizado. Como se puede observar el crecimiento de los ejemplares sometidos a preengorde y engorde en extensivo en las cestillas de las ostras es menor que en las otras dos experiencias. El mayor crecimiento se obtuvo en los juveniles mantenidos en cultivo intensivo y engordado en extensivo.

## Tamaño (mm) juveniles

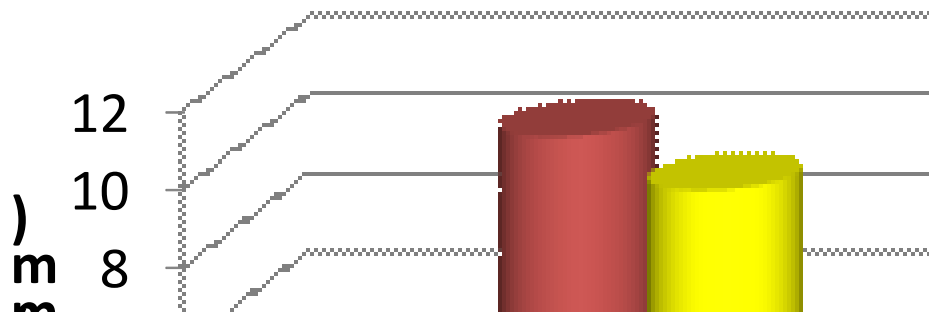


Gráfico I: comparación del crecimiento según el tipo de pre-engorde-engorde

### 2.-ENSAYOS DE DENSIDADES Y PRESENCIA DE CAMUFLAJE

El objetivo fue comparar dos densidades diferentes  $127 \text{ ind/m}^2$  frente a  $254 \text{ ind/m}^2$  y la influencia que podía tener en el crecimiento y la supervivencia final la presencia o no de camuflaje en el medio.

#### Material y métodos

Para este ensayo se utilizaron 200 juveniles de *M. squinado* procedentes de la misma puesta y tres grupos de 40 cilindros de 10 cm de diámetro. En un grupo (A1) se estabularon 40 centollas juveniles, una por cilindro, en el segundo grupo (A2) 80 juveniles, dos en cada cilindro sin camuflaje, en el tercer grupo (C1) se colocaron dos centollas por cilindro y camuflaje consistente en alga verde (*Ulva lactuca*) recolectada en la escollera del LIMIA. Los cilindros se colgaron en un tanque de 5000 litros equipado con un sistema de mareas que permite la renovación del agua en el interior de los cilindros 10-12 veces diarias. Diariamente se controló la temperatura del tanque y la presencia de bajas o mudas en los cilindros. La duración de las experiencias fue de 70 días. No se realizaron muestreos hasta finalizar la experiencia para evitar cualquier tipo de estrés añadido a los juveniles. La alimentación se realizó cada dos días previa limpieza del fondo de los cilindros mediante un sifón para eliminar heces y restos de comida. El alimento suministrado fue mejillón fresco más erizo en los tres grupos. Las mudas se guardaron etiquetadas en botes individuales para la posterior medición de la longitud y anchura del caparazón en cada estadio de muda.

## Resultados

Los centollos criados a mayor densidad (254 ind/m<sup>2</sup>) crecieron más que los centollos a menor densidad (127 ind/m<sup>2</sup>), longitud de caparazón entre 6.0-9.0 mm frente 5.5-7.5 mm, siendo los individuos criados con camuflaje los que presentaron mayor número de individuos de LC=9 mm. La supervivencia también fue mayor en aquellos juveniles criados con camuflaje (C1: 62.5% vs A1: 25% y A2: 37.5%).

### *Maja brachydactyla*-IRTA

Se ha estudiado el crecimiento y la supervivencia de los juveniles 1-8 del májido *Maja brachydactyla* (Balss, 1922) en un sistema semi-abierto de cultivo individual (Fig. 1). Los individuos adultos se han recolectado en el NE del Atlántico (Galicia). Las larvas de han cultivado hasta megalopa siguiendo el sistema de Andrés et al. (2007).

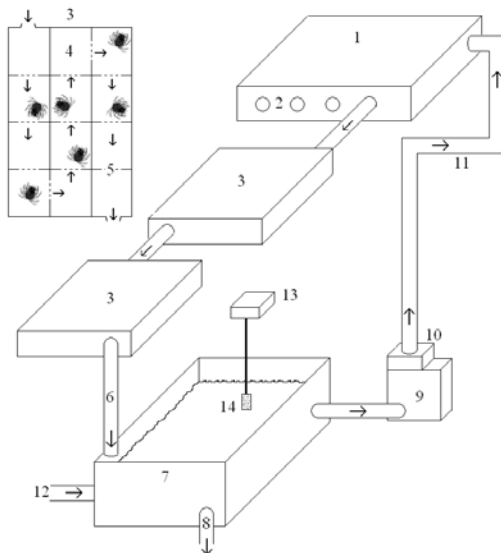


Figure 1. Sistema de cultivo: (1) tanque de distribución, (2) salida hacia los tanques de cultivo, (3) tanques de cultivo, (4) compartimentos individuales, (5) malla de 500 µm, (6) salida hacia los tanques de reserva, (7) tanque de reserva (500 L), (8) salida para la renovación del agua, (9) filtro, (10) bomba de agua, (11) salida hacia el tanque de distribución, (12) entrada de agua, (13) bomba de aire, (14) difusor.

El 48% de las megalopas mudaron a primer cangrejo (C1). El desarrollo juvenil hasta el cangrejo 8 (C1-C8) tardó  $117.5 \pm 7.5$  días (Tabla 1). La supervivencia fue elevada durante todo el experimento: el 43,75% de los C1 llegaron a C8 (Tabla 1). El incremento de talla en cada muda (%CL) fue similar en todos los estadios juveniles (28-37%). La duración del período de intermuda ( $9.37 \pm 1.04$  to  $33.5 \pm 2.64$  días) incrementa de forma importante a partir del cangrejo 6 (Tabla 1). El SGR disminuye debido al incremento de INT.

**Tabla 1**

Crecimiento, período de intermuda, y supervivencia de los juveniles de *Maja brachydactyla* después de 125 días (media  $\pm$  D.S). INT: periodo de intermuda en días; %CL: incremento de la longitud del cefalotórax; %WG: porcentaje de ganancia en peso fresco; SGR: "specific growth rate"; S: supervivencia; AS: supervivencia acumulada.

	C1-C2	C2-C3	C3-C4	C4-C5	C5-C6	C6-C7	C7-C8
<b>n</b>	151	137	134	134	133	115	84
<b>S (%)</b>	78.60	90.70	97.81	100.00	99.25	86.46	73.04
<b>AS (%)</b>	78.60	70.70	69.4	69.40	68.44	59.10	43.75
<b>%CL</b>	27.90 $\pm$ 0.97	36.06 $\pm$ 1.40	31.01 $\pm$ 3.96	31.93 $\pm$ 4.30	31.50 $\pm$ 4.51	37.04 $\pm$ 5.82	33.50 $\pm$ 5.50
<b>INT</b>	9.37 $\pm$ 1.04	9.88 $\pm$ 1.08	11.39 $\pm$ 1.03	11.64 $\pm$ 1.68	14.89 $\pm$ 2.47	24.71 $\pm$ 9.42	33.50 $\pm$ 2.64
<b>SGR</b>	7.16 $\pm$ 1.10	11.05 $\pm$ 1.32	6.38 $\pm$ 1.50	5.70 $\pm$ 0.95	7.30 $\pm$ 0.70	3.67 $\pm$ 1.30	2.90 $\pm$ 0.40
<b>%WG</b>	95.60 $\pm$ 17.70	198.07 $\pm$ 46.8	106.80 $\pm$ 29.10	96.25 $\pm$ 27.90	196.67 $\pm$ 47.80	147.90 $\pm$ 35.70	168.25 $\pm$ 66.40

El incremento medio del CL y WW durante el período estudiado se muestra en la figura 2. Del C1 hasta el C8, la CL media incrementa más de un 742 % (valor inicial 2.1  $\pm$  0.05 mm y valor final 15.6  $\pm$  1.06 mm). El WW incrementa rápidamente a partir del cangrejo 6, superando el 46.704,54 % el peso del C1 (peso del C1 2.2  $\pm$  0.14 mg y peso del C8 1027.5  $\pm$  215.09 mg).

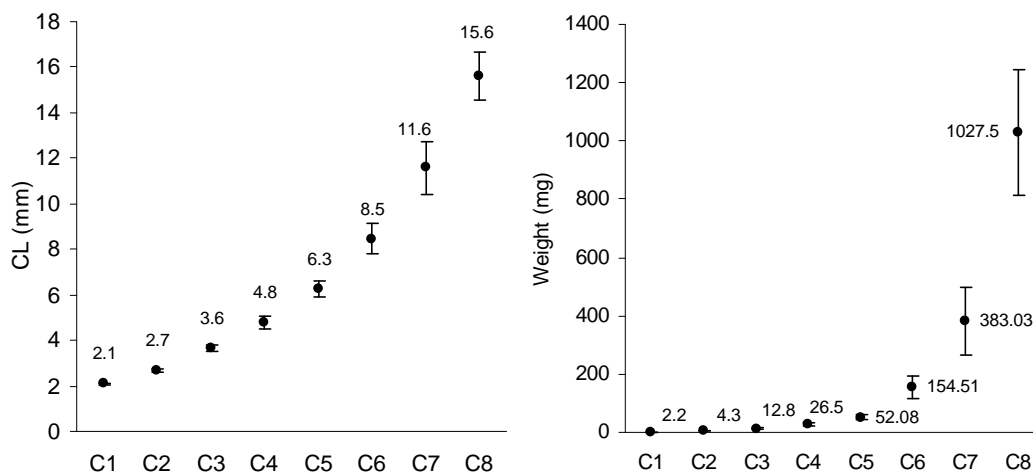


Figura 2. Crecimiento de los juveniles de *Maja brachydactyla* (C1-C8): (A) longitud del cefalotórax (CL); (B) peso fresco (WW).

La relación entre CL y WW, y entre CL y CW (anchura máxima del cefalotórax) se muestra en las figuras 3B y 3C respectivamente. El WW muestra crecimiento isométrico ( $b= 3.04$ ;  $H_0: b= 3$ ,  $t= -1.04$ ). El cociente CL/CW disminuye durante el desarrollo juvenil, observándose un crecimiento alométrico positivo del CW ( $b= 1.13$ ;  $H_0: b= 1$ ,  $t= -10.534$ ).

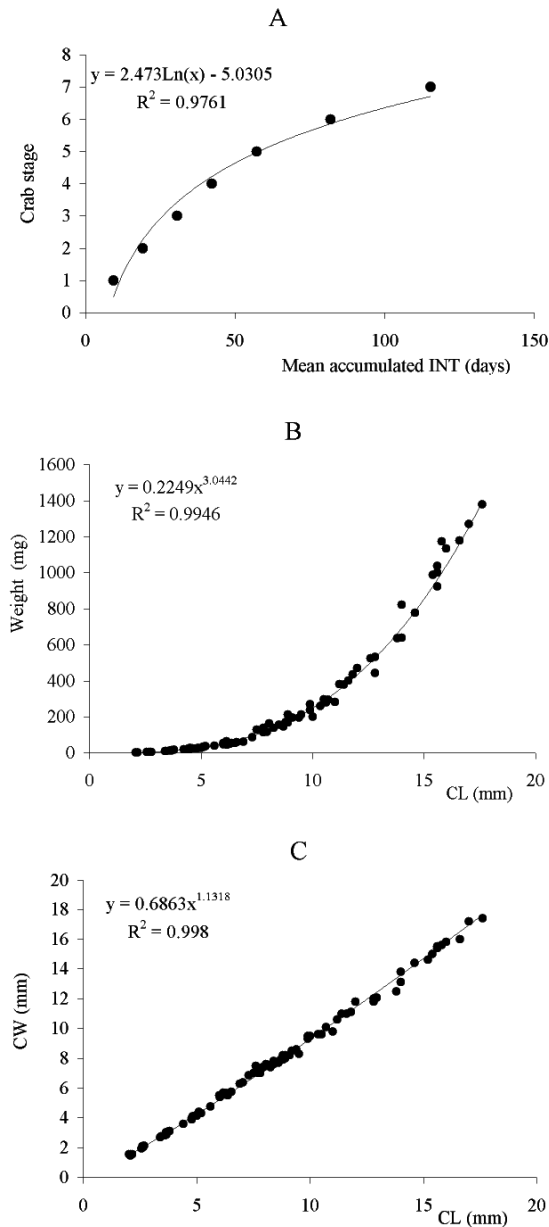


Figure 2. *Maja brachydactyla* juveniles. (A) tiempo de intermuda acumulado para cada estadio juvenil, (B) relación entre el peso fresco (WW) y la longitud del cefalotórax (CL); (C) relación entre la anchura del cefalotórax (CW) y la CL.

## ***Maja brachydactyla*-IFAPA Agua del Pino**

Antes de empezar a analizar los experimentos de confinamiento, se creyó necesario estimar el efecto de la muda sobre la longitud del caparazón y el peso, para determinar que medida era la más interesable a valorar.

### **Consideraciones sobre los parámetros de medida del crecimiento en crustáceos decápodos. Efecto de la muda sobre el peso y la longitud del caparazón**

Una de las cuestiones que se planteó inicialmente fue cómo medir el crecimiento de los juveniles de centollos para obtener la máxima información del proceso. La mayoría de investigadores miden el crecimiento en términos de longitud del caparazón, por lo que parece razonable utilizar este mismo parámetro para disponer de datos fácilmente contrastables con los de otros autores. Pero la longitud del caparazón permanece constante durante el período de intermuda y no ofrece información alguna del crecimiento en esta fase, por lo que estimamos que podría ser útil emplear otro parámetro, como el peso, que en principio varía de forma continua durante todo el período de crecimiento, con independencia de si ha habido muda o no.

No obstante, numerosos autores han descrito que los crustáceos absorben agua en el momento de la muda, tanto para facilitar el proceso, como para rellenar los huecos que quedan vacíos en el interior del nuevo caparazón, por lo que también el peso estaría afectado por la muda, y se reproduciría el mismo problema de discontinuidad en el crecimiento. Nosotros hemos abordado este problema para ver cómo influye la muda sobre el peso, con el fin de buscar un parámetro que refleje lo más exactamente posible la evolución del crecimiento.

### Material y métodos

A los 135 días de experimento (edad de 4,5 meses), se estableció un seguimiento especial sobre 15 individuos a los que diariamente se pesaban y, caso de aparecer exuvias, indicativas del proceso de la ecdisis, se medía la longitud del caparazón. Los animales estaban depositados en celdillas individuales de 12x16 cm de área de fondo y 7 cm de profundidad, para hacer un seguimiento particularizado de cada uno de ellos y eran individuos nacidos en nuestras propias instalaciones del IFAPA Agua de Pino y procedentes de una misma puesta. Los pesos se midieron con una balanza de precisión de tres decimales (COBOS CB complet©), y la longitud del caparazón con un calibre electrónico MITUTOYO Absolute coolant proof IP66©, de 2 decimales. Para proceder al pesaje de los animales, se los recogía de la celdilla con una cucharilla metálica, se los depositaba durante unos segundos sobre papel absorbente, para recoger el excedente de agua, y se procedía a su pesaje sobre el plato de la balanza. Después se les devolvía a la celdilla de la que habían sido extraídos.

Las tasas de crecimiento se calcularon mediante la fórmula:

$$TC = \frac{\ln(p_2) - \ln(p_1)}{d} * 100$$

Siendo :

TC : tasa de crecimiento, expresada como % de crecimiento en peso al día.



$\ln(p1)$ : Logaritmo neperiano del peso inicial.

$\ln(p2)$ : Logaritmo neperiano del peso final.

y los factores de crecimiento se calcularon como peso final/peso inicial ( $p2/p1$ ).

El tratamiento estadístico de datos se hizo aplicando la t-student para comparar crecimientos antes y después de la muda.

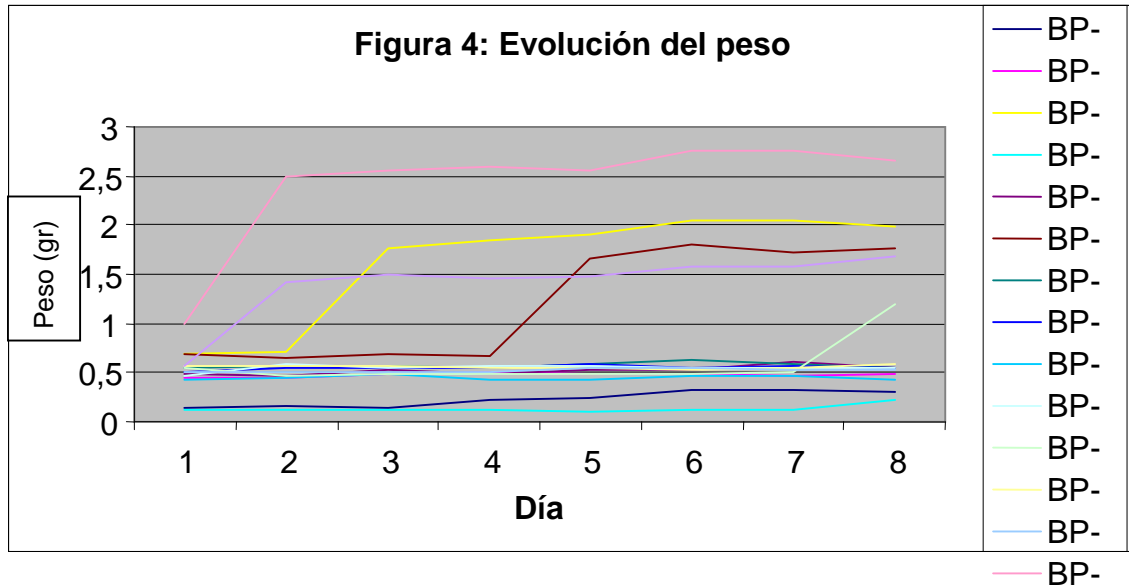
### Resultados

La tabla 7 muestra la evolución del peso durante los 10 días de duración del experimento y en la figura 4 se muestran estos mismos datos en forma de gráfico. Durante estos 10 días mudaron 7 animales, que incrementaron su peso en un  $30,3 \pm 7,6\%$ , correspondiéndose con una tasa de crecimiento de  $8,9 \pm 0,8\%pd^{-1}$  y un factor de crecimiento de  $2,46 \pm 0,7$ . Por su parte, los animales que no mudaron, aumentaron su peso en un  $5,8 \pm 5,5\%$ , con una tasa de crecimiento de  $0,6 \pm 0,6\%pd^{-1}$  y un factor de crecimiento de  $1,7 \pm 0,1$ .

Tanto en la tabla como en la figura se puede comprobar que en las celdillas donde no se registraron mudas (2, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 17 y 18), el crecimiento es continuo, mientras que en el resto (celdillas 1, 3, 4, 7, 14, 19 y 20), se produce un punto de discontinuidad en el peso en el día de la muda. En la tabla 8 se muestra el crecimiento de estos mismos juveniles de centollo, pero medido en términos de longitud del caparazón. Con relación a este parámetro, en los 10 días de experimento, los animales que mudaron aumentaron su tamaño en un  $29,3 \pm 4,2\%$ , mientras que los que no mudaron, aumentaron en un  $3,2 \pm 5,9\%$ , siendo las tasas de crecimiento respectivas de  $3,48 \pm 0,6\%LCd^{-1}$  y  $0,35 \pm 0,6\%LCd^{-1}$  y los factores de crecimiento de  $1,42 \pm 0,9$  y  $1,04 \pm 0,8$ . Comparando ambos parámetros, comprobamos que los animales que mudaron, crecieron un 30% en peso o en longitud del caparazón, mientras que los que no mudaron, no siguen un patrón, siendo el incremento en longitud del caparazón ( $3,2 \pm 5,9\%$ ), inferior al incremento en peso ( $5,8 \pm 5,5\%$ ).

**Tabla 7: Evolución del peso expresado en gramos**

celdilla/día	26-5-08	27-5-08	28-5-08	29-5-08	30-5-08	2-6-08	3-6-08	4-6-08	Muda
BP-1	0,148	0,154	0,145	0,231	0,251	0,326	0,333	0,305	29-5-08
BP-2	0,455	0,45	0,493	0,497	0,481	0,489	0,465	0,482	
BP-3	0,696	0,717	1,764	1,838	1,905	2,04	2,042	1,994	28-5-08
BP-4	0,118	0,112	0,115	0,116	0,104	0,113	0,115	0,223	4-6-08
BP-6	0,493	0,47	0,527	0,489	0,526	0,522	0,602	0,551	
BP-7	0,681	0,645	0,683	0,675	1,67	1,798	1,721	1,756	30-5-08
BP-8	0,542	0,57	0,571	0,548	0,578	0,619	0,582	0,552	
BP-10	0,513	0,549	0,538	0,552	0,583	0,54	0,559	0,547	
BP-12	0,435	0,446	0,485	0,426	0,423	0,467	0,462	0,433	
BP-13	0,46	0,586	0,538	0,558	0,559	0,539	0,555	0,552	
BP-14	0,555	0,465	0,496	0,483	0,495	0,491	0,501	1,191	4-6-08
BP-17	0,567	0,56	0,573	0,547	0,546	0,537	0,549	0,58	
BP-18	0,503	0,513	0,509	0,506	0,554	0,542	0,526	0,524	
BP-19	0,986	2,496	2,559	2,596	2,553	2,761	2,759	2,652	27-5-08
BP-20	0,561	1,422	1,497	1,456	1,482	1,584	1,572	1,692	27-5-08



**Tabla 8**

Longitud del caparazón (mm)

	Inicial	Final	Muda
BP-1	7,3	9,7	29-5-08
BP-2	9,7	11,7	
BP-3	12,6	19,6	28-5-08
BP-4	7,1	9,4	4-6-08
BP-6	9,7	10,2	
BP-7	12,6	18,6	30-5-08
BP-8	12,7	12,7	
BP-10	12,1	12,3	
BP-12	11,6	11,6	
BP-13	12,1	12,1	
BP-14	12,6	17,1	4-6-08
BP-17	12,5	12,8	
BP-18	12,4	12,4	
BP-19	14,9	21,6	27-5-08
BP-20	12,5	18	27-5-08

### Discusión

Según estos resultados, tampoco el peso resulta ser un buen parámetro para medir la evolución del crecimiento en centollos, pues se reproduce el problema de discontinuidad que teníamos con la longitud del caparazón, si hay muda previa. No obstante, durante el período de intermuda el animal crece en el interior de un caparazón rellenando huecos con nuevos tejidos, lo que se refleja en un aumento de peso del  $5,8 \pm 5,5\%$  y una tasa de crecimiento de  $0,6 \pm 0,6 \%Pd^{-1}$  en estos 10 días. de lo que se deduce que el peso si proporciona información sobre el crecimiento durante el período de intermuda, aunque sólo sea de manera parcial.

En cuanto a la longitud del caparazón, los datos obtenidos muestran que este parámetro también varía durante el periodo de intermuda y lo hace a una tasa de  $0,35 \pm 0,6\% \text{LCd}^{-1}$ , distinta de cero, lo que podría ser indicativo de crecimiento durante el período de intermuda. Pero en realidad este crecimiento no puede ser considerado como tal, sino que es consecuencia del estiramiento del nuevo caparazón, lo que se produce en los primeros días tras la ecdisis. En efecto, el nuevo caparazón es mas grande que el antiguo y está plegado en su interior hasta que se libera tras la ecdisis, por tanto inmediatamente después de este evento hay un proceso de estiramiento que dura solo unas horas y puede ser confundido con un crecimiento real. Una vez que el caparazón alcanza su tamaño definitivo, se endurece y no vuelve a variar hasta la siguiente muda. Esta hipótesis queda corroborada en la tabla 2, donde se observa que las diferencias entre las LC inicial y final son muy pequeñas en todos los casos, excepto en uno, el centollo de la celdilla 2, que con una diferencia de 2mm, es el causante de que la tasa de crecimiento entre los animales que no mudaron sea distinta de cero. Se da el caso de que este centollo había mudado inmediatamente antes de tomar la medida inicial del caparazón y el estiramiento posterior ha sido la causa de que la medida final fuera mayor que la inicial, dando una falsa impresión de crecimiento. Todos los demás centollos, habían mudado varios días antes de la medida inicial presentan diferencias de LC inicial y final, muy pequeñas y achacables solo a errores de medida.

Atendiendo a estos resultados, podemos afirmar que la longitud del caparazón refleja mal el proceso de crecimiento de los juveniles de centollo y peor que el peso. Es además un parámetro de difícil medida en las primeras etapas de desarrollo del animal, pues el calibre puede provocar daños irreparables cuando el animal es muy pequeño y es desaconsejable su uso. Para estos casos es preferible acudir a una lupa binocular acoplada con un sistema de software, que pueda medir el caparazón sin provocarle daño. Expresar el crecimiento mediante incremento en peso es más adecuado, puesto que es un parámetro de fácil medida y proporciona una cierta información del período de intermuda, durante el que crece a una tasa de  $0,6 \pm 0,6\% \text{Pd}^{-1}$ .

### **Efecto del confinamiento en espacios reducidos sobre el crecimiento de juveniles de centollo**

Son numerosos los autores que han expresado que el aislamiento y el confinamiento en espacios reducidos es un factor que incide de manera negativa en el crecimiento de los crustáceos decápodos, pero no se ha cuantificado hasta qué punto afectan estas situaciones. En el centro IFAPA Agua del Pino se ha llevado a cabo un experimento en el marco del proyecto JACUMAR-Centollo para ver cómo afecta el espacio disponible en el crecimiento de juveniles de centollo.

#### Material y métodos

Los animales que se usaron en el experimento nacieron en las propias instalaciones del IFAPA Agua del Pino, procedentes de puestas de hembras silvestres que habían sido capturadas en estado ovígero, en la costa atlántica marroquí. Tras un período de adaptación alimentadas con mejillón fresco en

tanques de 1x1 m y 0,5 m de profundidad, se produjeron puestas espontáneas que se recogían con un salavar de malla fina y se trasladaban a tanques larvarios circulares de 80 cm de diámetro y 30 cm de profundidad. Cada puesta se disponía en un tanque distinto a fin de no mezclarlas y durante el desarrollo larvario se alimentaron con nauplios de artemia (*Artemia sp.*) enriquecidos con SELCO®.

Tras la metamorfosis final, los juveniles se alimentaron con un pienso comercial para langostinos, fabricado por la empresa Taiwán Hung Kuo Industrial CO., LTD. y al cabo de 15 días se tomaron 150 individuos de una misma puesta, con pesos comprendidos entre 6 y 10 mg. Se formaron tres grupos de 50 animales cada uno y cada grupo se depositó en celdillas individuales de tres tamaños distintos: pequeñas, medianas y grandes. La elección de un sistema de cultivo individual y aislado fue para evitar posibles episodios de canibalismo, que podrían interferir en los resultados del experimento, así como para disponer de datos individualizados, que reforzarían las conclusiones finales.

Las celdillas pequeñas se fabricaron en PVC gris y estaban dispuestas en bandejas de 20 compartimentos, de 6x8cm de fondo y 3,5 cm de profundidad, las medianas también estaban fabricadas en PVC gris y dispuestas en 10 compartimentos de 12x16cm de fondo y 7 cm de profundidad y las grandes eran bandejas de cultivo fabricadas en poliéster, con su interior pintado en negro y dos láminas de PVC gris, de separación vertical, que la dividían en tres compartimentos aislados de 35x27cm de fondo y 15 cm de profundidad. Las láminas de separación estaban provistas de orificios para la libre circulación de agua entre los tres compartimentos.

Como alimentación se dio mejillón fresco (*Mytillus galloprovincialis*) troceado y desprovisto de branquias y otras vísceras, proporcionado a saciedad y en una sola toma al día. Diariamente se registraba la mortalidad y existencia de mudas y cada 15 días se pesaban individualmente cada uno de los individuos con una balanza de precisión de tres decimales (COBOS CB complet©) y se medía el caparazón con una lupa binocular NIKKON SMZ 800 provista de un dispositivo óptico NIKKON acoplado a un monitor DIGITAL SIGHT DS-L1, con software incorporado para medir tamaños pequeños. Cuando el tamaño de los animales fue más grande que la amplitud de campo (lo que ocurrió entorno a los 8 mm de caparazón), se empleó un proyector de perfiles NIKKON 6C-2 y finalmente, cuando el tamaño de los animales se juzgó suficiente para soportar la agresividad del calibre, se empleó un calibre electrónico MITUTOYO Absolute coolant proof IP66©, de 2 decimales. La longitud del caparazón se definió como la distancia en línea recta entre la base de la V que forman las dos espinas frontales y el punto que existe entre las dos protuberancias traseras que se forman justo donde el abdomen se pliega sobre el cefalotórax. Para pesar a los animales, se los recogía de la celdilla con una cucharilla metálica, se los depositaba durante unos segundos sobre papel absorbente, para recoger el excedente de agua, y se procedía a su pesaje sobre el plato de la balanza. A continuación se procedía a medir la longitud del caparazón mediante la lupa y software integrado, el proyector de perfiles o el calibre, según el caso, y se les devolvía a la celdilla de la que habían sido extraídos. Las tasas de crecimiento instantáneas, se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$TC (\% \text{ peso o long cap. día}^{-1}) = (Lnp2 - Lnp1) / t * 100$$

Donde:

TC: tasa de crecimiento, expresada como el porcentaje de incremento diario en peso o longitud del caparazón.

Lnp2: logaritmo neperiano del peso o longitud del caparazón final.

Lnp1: logaritmo neperiano del peso o longitud del caparazón inicial.

t: tiempo, en días.

Las condiciones experimentales fueron fotoperiodo natural correspondiente al invierno en nuestras latitudes, temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  y salinidad de 35ppt. Sistema de cultivo en circuito abierto, con período de renovación inferior a 4 horas, y utilizando agua de mar que había sido previamente tratada por decantación, filtrada a través de filtros de  $25 \mu\text{m}$ , de luz de malla, y esterilizada con luz ultravioleta.

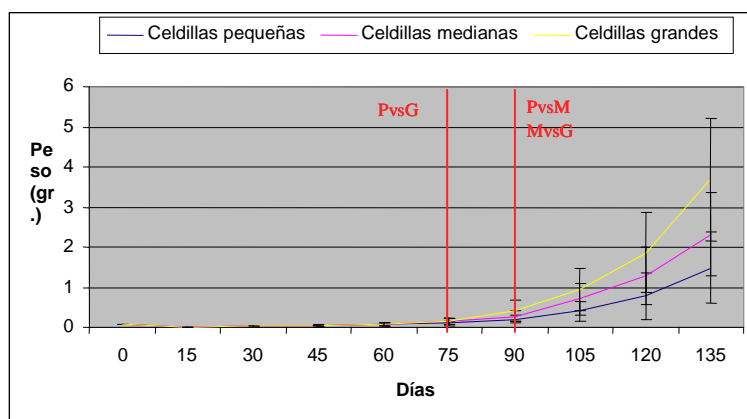
### Resultados y discusión

En la tabla 10 y figura 5 se muestran los resultados de cómo fue evolucionando el peso cada 15 días, durante los 135 días de experimento.

Tabla 10: Crecimiento en peso

	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	TC
Pequeñas	0,07	0,013	0,022	0,039	0,066	0,106	0,196	0,399	0,791	1,489	3,7
Medianas	0,07	0,013	0,021	0,032	0,066	0,134	0,268	0,701	1,292	2,321	4,4
Grandes	0,07	0,014	0,020	0,035	0,068	0,153	0,426	0,944	1,867	3,681	4,6

Figura 5: Crecimiento en peso





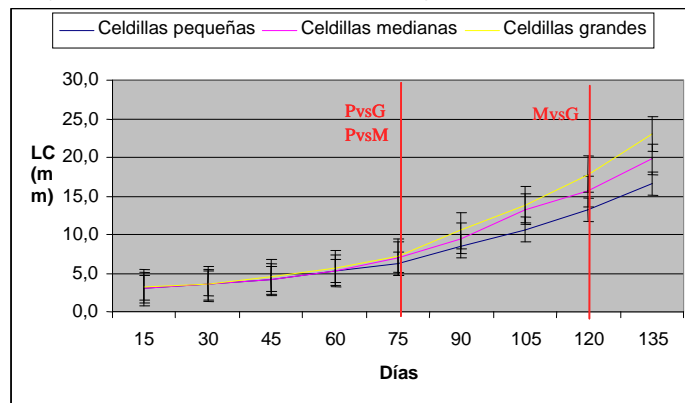
Hasta los 60 días el crecimiento en cada grupo de celdillas fue muy similar y a los 75 empiezan a aparecer diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los dos grupos de celdillas más extremos, las P y G. Durante los 15 días siguientes (90 días de experimento) las diferencias se hacen ya estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tres grupos de celdillas tomados dos a dos, correspondiendo el mayor crecimiento a las celdillas G, seguidas por las M y las P, y alcanzándose unos pesos medios de  $3,681 \pm 1,5$  g,  $2,321 \pm 1,1$  g y  $1,489 \pm 0,9$  g, respectivamente. Al final del experimento, las tasas de crecimiento fueron de  $4,6 \pm 0,4$  %Pd<sup>-1</sup>, para las celdillas grandes,  $4,3 \pm 0,4$  %Pd<sup>-1</sup> para las medianas y  $3,7 \pm 0,5$  %Pd<sup>-1</sup>, para las pequeñas.

En cuanto al crecimiento considerando la longitud del caparazón, los resultados se muestran en la tabla 11 y figura 6.

Tabla 11: Crecimiento en longitud del caparazón

Días:	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	TC
Pequeñas:	2,6	3,1	3,7	4,2	5,3	6,3	8,5	10,7	13,2	16,6	1,3
Medianas:	2,6	3,1	3,6	4,2	5,3	7,0	9,5	13,3	15,6	19,8	1,5
Grandes:	2,6	3,1	3,6	4,5	5,6	7,1	10,5	13,8	17,8	23,0	1,6

Figura 6: Crecimiento en longitud del caparazón



Al igual que el peso, los resultados referentes a la longitud del caparazón también muestran diferencias en el crecimiento entre las diferentes celdillas, si bien, estas diferencias se manifiestan estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tres grupos, de forma más tardía, a los 120 días de inicio del experimento. Sin embargo, en las celdillas pequeñas el efecto es más manifiesto, pues a los 75 días de cultivo también aparecen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con las celdillas medianas, no solo con las grandes.

La supervivencia fue muy similar en los tres tipos de celdillas, 68%, 70% y 72%, respectivamente para las celdillas P, M y G, no así el número medio de veces que mudaron, que fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en las celdillas P (5,0 mudas/individuo) que en las M y G (5,7 y 6,0, respectivamente). En concordancia con lo anterior, el intervalo medio de mudas, es decir, el número medio de días transcurridos entre dos mudas consecutivas, fue menor en las celdillas G ( $15,9 \pm 5,7$  días), que en las M ( $17,6 \pm 5,6$  días) y P ( $18,6 \pm 5,3$  días), siendo éste intervalo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) entre las celdillas G y P, no así en las celdillas M, cuya diferencia no es estadísticamente significativa ni con las celdillas P ni con las G.

Como conclusión se puede decir que el confinamiento en espacios reducidos tiene un efecto limitante sobre el crecimiento de los juveniles de centollo, manifestándose éste tanto en peso como en longitud del caparazón.

### **Influencia del histórico de confinamiento sobre el tamaño alcanzado en la madurez, tras la muda terminal**

El experimento anterior sobre efecto del confinamiento en espacios reducidos, tenía inicialmente un segundo objetivo: Determinar si este confinamiento en las fases previas del crecimiento, terminaba afectando al tamaño final del adulto, tras la muda terminal. Así, una vez determinado que el espacio disponible afecta al crecimiento en las etapas juveniles, se pretendía seguir manteniendo las mismas condiciones de cultivo en las mismas celdillas, a fin de forzar lo más posible el efecto del espacio reducido sobre el crecimiento.

Cuando ya no fuera posible mantener a los animales en las celdillas pequeñas, por simples razones de espacio físico, se trasladarían a un mismo tipo de celdilla (las celdillas grandes) con suficiente espacio para su desarrollo, hasta que alcanzaran la madurez. No obstante, ocurrieron diversos episodios ajenos al experimento que causaron mortandades masivas (subidas repentinas de temperatura o cortes en el suministro de agua) y escapes de celdillas, que aumentaron la mortalidad y provocaron la pérdida de control sobre la identidad individualizada de algunos animales, aunque pudo mantenerse la certeza de su procedencia (celdillas pequeñas, medianas o grandes). Estos episodios, obligaron a replantear el experimento como un experimento nuevo, con los 49 individuos que habían sobrevivido y mantenido su historial de confinamiento.

### **Material y métodos**

Los 49 juveniles de centollo empleados en el experimento, provenían del experimento anterior, relativo a efecto del confinamiento en espacios reducidos sobre el crecimiento de juveniles de centollo, por lo que este apartado de material y métodos es el mismo que el descrito en ese primer experimento: Animales

nacidos de una misma puesta en las propias instalaciones del IFAPA. Edad: ocho meses y medio (260 días) durante los que habían permanecido confinados en celdillas individuales de tres tamaños:

A) 9 individuos, con un peso medio de  $26,84 \pm 10,8$  g, procedentes de las celdillas pequeñas.

B) 26 individuos, con un peso medio de  $33,28 \pm 10,8$  g, procedentes de las celdillas medianas.

C) 14 individuos, con un peso medio de  $43,92 \pm 10,6$  g, procedentes de las celdillas grandes.

El inicio del experimento, comenzó a día cero trasladando todos los animales a las celdillas grandes y a partir de ese momento siguiendo la evolución del cultivo mediante el mismo método que en el experimento anterior. El final se determinó cuando el último centollo alcanzó la madurez, definida ésta por la muda terminal. El reconocimiento de esta última muda no presenta grandes dificultades en hembras, pues el opérculo se hace notoriamente más redondeado y abombado e incluso era frecuente encontrar hembras que habían realizado una puesta aún sin haber sido fecundadas, señal inequívoca de que habían alcanzado la madurez sexual. En machos la muda terminal es menos notoria, pero existen diferencias entre el subadulto y el adulto que son más o menos reconocibles a simple vista. Cambia la proporción entre los artejos del primer par de patas, donde el artejo distal (pinzas), se hace considerablemente mayor que los demás y el abdomen se hace más largo y estrecho. Aunque no se han tomado medidas biométricas que ratifiquen estas observaciones, lo acertado de las mismas queda ratificado en que posteriormente a determinar la muda terminal a ojo vista, no se produjeron más mudas a pesar de que los animales se mantuvieron en cultivo durante seis meses, aún después de finalizar el experimento.

### Resultados y discusión

La supervivencia obtenida al final del experimento fue del 89%, 56% y 79%, respectivamente para los animales con estancias previas en las celdillas pequeñas, medianas y grandes, sin embargo, en todos los casos la mortalidad detectada fue inducida por causas ajenas al experimento, principalmente por escapes de la bandeja que provocaron la muerte por caída al suelo o por asfixia al permanecer fuera de la bandeja durante un período largo, por lo que hay indicios para suponer que las condiciones experimentales no influyeron en la supervivencia final y esta fue muy similar en los tres casos y cercana al 100%. En cuanto al último período de intermuda, definido como el inmediatamente anterior a la muda terminal, fue de  $60 \pm 12$  días,  $68 \pm 12$  días y  $72 \pm 17$  días, respectivamente para los centollos procedentes de las celdillas pequeñas, medianas y grandes, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos. La edad a la que cada grupo alcanzó la muda terminal fue de  $397 \pm 47$  días,  $417 \pm 42$  días y  $389 \pm 40$  días, respectivamente, sin que tampoco hubiera diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas. Tomando el conjunto de los animales, la edad media a la que se alcanzó la madurez fue de  $404 \pm 43$  días (unos 13,5 meses). El primer centollo que alcanzó la madurez fue a la edad de 331 días (11 meses), y procedía de las celdillas pequeñas y el último a los 517 días (17

meses), procedente de las celdillas medianas. La media de peso de los centollos antes de la muda terminal fue respectivamente de  $229\pm 93$  g,  $274\pm 71$  g y  $232\pm 79$ , siendo en conjunto la media de peso antes de la muda terminal de  $252\pm 79$  g.

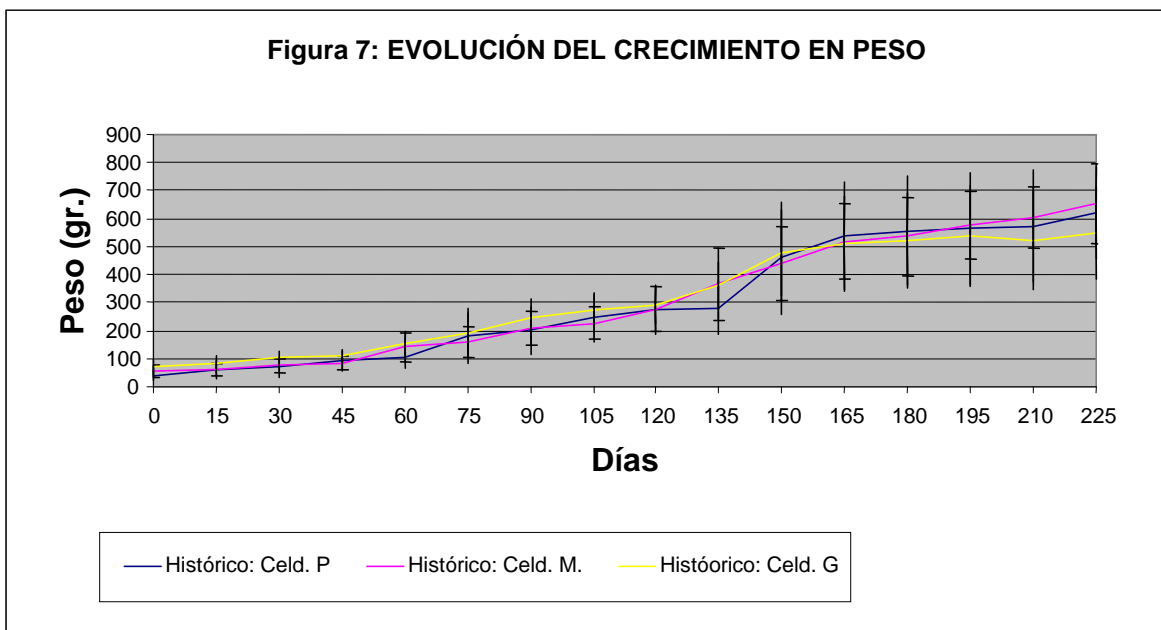
Inmediatamente después de esta muda se alcanzaron pesos de  $482\pm 199$  g,  $593\pm 136$  g y  $492\pm 156$  g, y una media de  $540\pm 160$  g, que dobló el peso antes de la muda. En concreto, el incremento final de peso tras la última muda fue de  $260\pm 67$  g, que se corresponde con un 103% de incremento. La evolución del crecimiento durante estos 225 días de duración del experimento se muestra en la tabla 12 y la figura 7, con datos relativos al peso y la tabla 13 muestra cómo ha ido variando el estadístico p en cada uno de los días de muestreo, marcándose en rojo cuando había diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabla 12: Evolución del crecimiento en peso hasta la muda terminal

Edad (días)	260	275	290	305	320	335	350	365	380	395	410	425	440	455	470	485
Muestreo	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225
Celd. P	40,8	59,7	70,5	91,5	104,7	178,9	200,6	244,8	273,4	282,0	459,9	535,3	556,1	562,7	571,9	619,4
Celd. M	54,7	61,9	74,2	85,0	141,6	158,5	209,9	225,8	275,9	366,7	437,5	518,4	537,2	575,8	603,2	652,3
Celd. G	73,0	83,8	103,6	109,4	152,0	193,1	245,6	273,2	292,4	362,6	478,1	510,5	522,0	536,3	520,6	548,4

Tabla 13: Evolución del estadístico p

	p																	
	-30	-15	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225
PvsM	0,145	0,023	0,074	0,855	0,780	0,628	0,041	0,571	0,765	0,560	0,942	0,055	0,763	0,824	0,808	0,867	0,691	0,646
PvsG	0,002	0,014	0,003	0,075	0,026	0,216	0,016	0,717	0,200	0,408	0,595	0,056	0,822	0,770	0,694	0,769	0,573	0,370
MvsG	0,006	0,552	0,037	0,013	0,000	0,006	0,516	0,134	0,117	0,024	0,512	0,909	0,438	0,890	0,798	0,511	0,188	0,110



Los resultados muestran que partiendo de tres poblaciones de centollo significativamente distintas ( $p < 0,05$ ), el estadístico p va variando y mostrando diferencias puntuales en el crecimiento, que aparecen y desaparecen aleatoriamente en función del número de mudas que se producen en cada período de intermuestreo, hasta que a partir del día 120 de experimento, correspondiente a los 380 días de vida de los animales, deja de fluctuar y de mostrar diferencias entre los tres grupos, lo que ya se mantiene constante hasta que los centollos alcanzan la madurez al final del experimento.

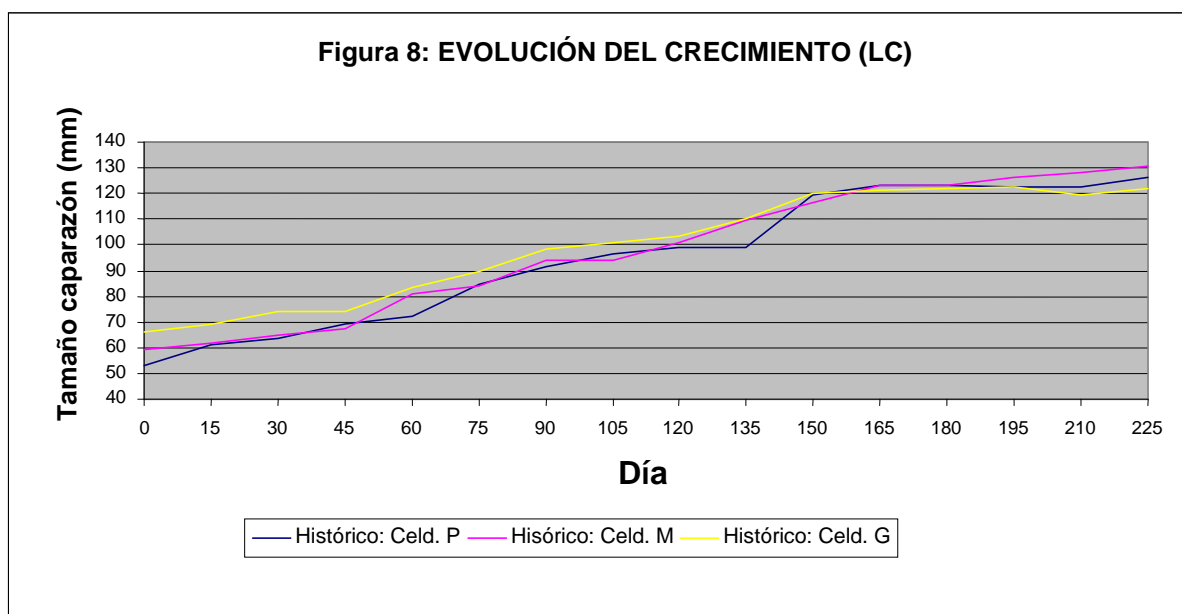
Con relación a la longitud del caparazón, las tablas 14 y 15 muestran la evolución del crecimiento atendiendo a este parámetro y la variación del estadístico p en cada uno de los días de muestreo. La figura 8 muestra los datos de la tabla 14 en un gráfico.

**Tabla 14: Evolución del crecimiento en longitud del caparazón hasta la muda terminal**

Edad (días):	260	275	290	305	320	335	350	365	380	395	410	425	440	455	470	485
Muestreo:	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225
Celd. P	53,1	61,1	63,9	69,4	72,4	84,9	91,6	96,3	99,3	99,2	119,8	123,2	123,5	122,8	122,7	126,4
Celd. M	59,3	61,8	65,0	67,6	81,3	84,1	94,0	94,3	100,7	109,8	116,5	123,5	123,2	126,5	128,1	130,4
Celd. G	65,9	69,1	74,0	74,0	83,3	89,7	98,5	100,8	103,3	110,3	120,3	121,6	122,0	122,3	119,5	121,7

**Tabla 15: Evolución del estadístico p**

	p															
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225
PvsM	0,081	0,874	0,82	0,63	0,046	0,90	0,62	0,66	0,77	0,047	0,63	0,95	0,96	0,49	0,32	0,39
PvsG	0,003	0,102	0,06	0,21	0,02	0,49	0,21	0,32	0,41	0,04	0,95	0,81	0,81	0,93	0,61	0,38
MvsG	0,032	0,016	0,00	0,01	0,55	0,16	0,20	0,02	0,37	0,90	0,44	0,69	0,80	0,37	0,07	0,06





Los resultados obtenidos reproducen los del peso, es decir, partiendo de tres poblaciones de centollos significativamente distintas ( $p < 0,05$ ), el estadístico  $p$  fluctúa aleatoriamente en función del número de mudas que se producen en cada período de intermuestreo, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos, que aparecen y desaparecen en función del número de mudas que se haya producido en ese período de intermuestreo en cada grupo.

No obstante, a partir del día 150 de experimento (410 días de vida), el estadístico deja de fluctuar y adquiere siempre valores superiores a 0,05, lo que indica que las tres poblaciones de centollo dejan de ser diferentes y se igualan en el crecimiento.

En cuanto a la longitud del caparazón justo antes de la muda, en cada grupo fue de  $97,5 \pm 9,6$  mm,  $98,9 \pm 8,5$  mm y  $94,2 \pm 11,4$  mm, respectivamente para los centollos procedentes de las celdillas P, M y G, siendo la media para el conjunto de  $96,9 \pm 9,6$  mm. Inmediatamente después de la muda, la medida del caparazón fue de  $127,0 \pm 12,7$  mm,  $129,5 \pm 9,6$  mm y  $123,2 \pm 12,9$  mm, respectivamente para los centollos procedentes de las celdillas P, M y G, siendo la media del conjunto, de  $127,2 \pm 3,6$  mm. Esto supone un incremento del caparazón tras la muda terminal de  $31,3 \pm 4,8$  mm,  $30,6 \pm 2,4$  mm y  $29,0 \pm 4,1$ , respectivamente y de  $30,3 \pm 3,6$  para el total de los centollos, lo a su vez, significa que tras la muda terminal se produce un considerable aumento de tamaño del animal, que ronda los tres cm de longitud.

#### Línea 6: Repoblación y seguimiento.

Se seleccionaron la reserva marina de Puerto Cristo y el Parque Nacional de Cabrera para realizar las pruebas de repoblación. Se adquirieron marcas T y ultrasónicas y receptores para el seguimiento de los individuos. Se realizó un intenso trabajo de difusión de las actividades de repoblación por las cofradías de la isla, explicándoles la importancia de este proyecto, y solicitándoles toda la ayuda que nos pudieran ofrecer. El póster que se muestra abajo se elaboró para tal fin.

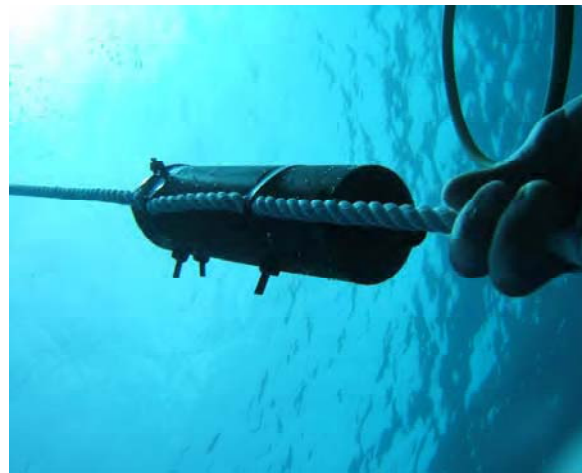


De los 25 ejemplares soltados (20 machos y 5 hembras), todos se marcaron con marcas externa en T, y 10 machos y las 5 hembras fueron además marcados con marca ultrasónica. La marca ultrasónica fue pegada con un pegamento especial en aproximadamente la mitad del cefalotórax de la centolla, zona que previamente había sido limpiada y secada. Estas marcas ultrasónicas fueron previamente pasadas por su receptor para el almacenaje de los datos de las marcas.

Para la suelta de los ejemplares se escogió una zona protegida, con fondo aproximado de 30 m, de *Posidonia*, y cercano a la costa. El receptor fue colocado mediante sistema de boya en el lugar donde fueron soltados los animales.



Marcaje de adultos



Receptor de marcas ultrasónicas



Transporte de centollas hacia Cabrera



Centolla en fondo de *Posidonia*

Las zonas de captura han sido diversas, y a diferentes distancias de la zona de suelta, el arte de captura en la mayoría de los casos han sido redes langosteras, y la profundidad de captura ha rondado entre los 55 y los 115 m.

El receptor de las marcas ultrasónicas solo captó datos durante la primera semana después de la suelta, después de ese tiempo, ya no recibió ninguna señal, coincidiendo con los datos que nos arrojaron algunas de las capturas de los pescadores artesanales, que indicaban distancias de al menos 3 millas y 115 m de profundidad.

## 2.5. CONCLUSIONES

En noviembre de 2009 dos de los equipos de investigación del proyecto hicimos presentaciones en el “International Symposium on Aquaculture, Biology and Management of Commercially Important Crabs” con una buena aceptación por parte de los investigadores y empresas participantes. En este congreso se hicieron presentaciones sobre cultivo de varias especies de crustáceos (*Eriocheir sinensis*, *Portunus pelagicus*, *Callinectes sapidus* y *Scylla sp.*) cuyas investigaciones empezaron en los años 80s y que actualmente se están produciendo comercialmente de manera viable. El proyecto centolla ha servido para ver la factibilidad del cultivo de la centolla pero la viabilidad del cultivo pasa por la mejora de su alimentación y para ello debe seguirse investigando, tal y como han hecho los países asiáticos que ahora producen cangrejos comercialmente. En la tabla que se presenta a continuación se indican los avances hacia el cultivo integral de la centolla.

	Antes PN CENTOLLA	Después PN CENTOLLA
<b>FISIOLOGIA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Consumo de oxígeno puntual. Sólo adultos y a temperatura concreta.</li> <li>-Variaciones cíclicas en el consumo de oxígeno.</li> <li>-Disminución del consumo de oxígeno a menor salinidad.</li> <li>-Efecto negativo de la temperatura sobre la oxigenación de la hemocianina.</li> <li>-Producción de amonio: efecto de la emersión/inmersión en ejemplares adultos en verano e invierno.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Caracterización metabolitos y bacterias en la hemolinfa.</li> <li>-Caracterización enzimática.</li> <li>-Consumo de oxígeno en función del peso, temperatura, sexo y fase del día (luz-oscuridad). Ayunas y raciones máximas.</li> <li>-Producción de amonio en función del peso, temperatura e ingesta de proteína.</li> <li>-Niveles crítico y letal de oxígeno y crítico de amonio. Efectos del peso y temperatura.</li> </ul>
<b>REPRODUCCIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ciclo reproductor.</li> <li>-Estados de desarrollo ovárico.</li> <li>-Puestas consecutivas (2-3); primavera-verano.</li> <li>-Elevada fecundidad.</li> <li>-Descripción morfológica de la embriogénesis.</li> <li>-Diferenciación sexual; crecimiento alométrico en sub-adultos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Proceso de elaboración del vitelo.</li> <li>-Descripción del sistema reproductor masculino y espermatogénesis.</li> <li>-Proceso de fecundación.</li> <li>-Fotoperiodos desfasados.</li> <li>-Diferenciación sexual en C4.</li> </ul>
<b>LARVARIO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Descripción morfológica <i>Maja brachydactyla</i>.</li> <li>-Efecto temperatura cultivo larvario.</li> <li>-No presentan canibalismo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Descripción morfológica <i>Maja squinado</i>.</li> <li>-Optimización cultivo larvario con MAE + fitoplancton.</li> <li>-50% sustitución dietas inertes.</li> </ul>

<p><b>PRE-ENGORDE</b></p>	<p>-65% supervivencia en cultivo semi-extensivo (50-120 días).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-50% sup. cultivo ind. (15-120 días; C1 a C8) con <i>Artemia</i>, krill y mejillón.</li> <li>-72% sup. Cultivo ind. (30-90 días) con pienso de langostino.</li> <li>-60% supervivencia cultivo en ostreras (30-90 días).</li> <li>-Influencia positiva camuflaje con algas en sup. y crecimiento.</li> <li>-Alimentación: <b>mejillón fresco</b>, mejillón congelado y pienso de langostino.</li> <li>-Reducción del canibalismo, buen alimento y camuflaje.</li> <li>-El tamaño de las celdillas limita el crecimiento en los primeros estadios pero no tiene efecto en la muda terminal.</li> <li>-404 días talla comercial.</li> </ul>
---------------------------	--	--

## 2.6. VALORACIÓN

Las características biológicas de la centolla, básicamente la alta fecundidad, un desarrollo larvario breve y un crecimiento relativamente rápido, así como un elevado valor comercial, indican la potencialidad de dicha especie para el cultivo intensivo. Investigadores españoles de 5 comunidades autónomas aunaron sus esfuerzos y han trabajado conjuntamente durante los últimos cuatro años en el Plan nacional Centolla financiado por la Junta de Cultivos Marinos. Los resultados obtenidos en este proyecto confirman la elección de la centolla como una especie muy interesante para la diversificación del cultivo de especies marinas en nuestro país así como para la repoblación de la especie mediterránea.

La centolla presenta en el litoral español dos especies, *Maja brachydactyla* de distribución atlántica que explota el 90% del reclutamiento en el noroeste peninsular donde es abundante y *Maja squinado* de distribución mediterránea que se encuentra en peligro de extinción. El mantenimiento de adultos y subadultos en cautividad no presenta grandes complicaciones siempre y cuando se mantengan temperaturas inferiores a 24 °C, niveles de nitrógeno amoniacal total inferiores a 0,5 mgTAN/h y oxígeno por encima del 60 % de saturación, si bien estos valores dependen de la temperatura y el tamaño de los individuos. La reproducción en cautividad ha sido un éxito en todos los laboratorios manteniendo las condiciones ambientales de cada zona, observándose un pico de producción de puestas en primavera-verano, tal y como ocurre en el medio. Fotoperiodos fijos y salinidades elevadas tienen un efecto negativo en la cantidad y calidad de las puestas. Desfases en los fotoperiodos naturales no han permitido aumentar la producción y la calidad de las puestas en cautividad durante todo el año, pero tampoco han sido perjudiciales. La mejora en la alimentación de los reproductores podría permitir que el desfase de fotoperiodos permitiera un desfase de las puestas en cautividad.



En estos cuatro últimos años se ha estandarizado el cultivo larvario de la centolla en condiciones intensivas, pudiendo usarse una densidad mínima de 100 larvas/L alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos a una densidad de 60 nauplios/larva, manteniendo las siguientes condiciones de cultivo: temperatura de 18°C; salinidad de 36‰ y fotoperíodo natural. En estas condiciones se obtiene una supervivencia larvaria del 25% y se alcanza en promedio el estadio megalopa a los doce días de vida. En este periodo el peso se triplica y el contenido en lípidos se duplica. La supervivencia durante la metamorfosis es ligeramente inferior al 50% tanto en sistema de cultivo comunitario como individual. El primer juvenil es semejante al adulto y sólo se observan pequeñas variaciones morfológicas. La supervivencia promedio de los juveniles en cultivo individual es del 90% y más del 40% alcanza el estadio 8 (C8). La diferenciación sexual por caracteres sexuales secundarios se observa a partir del estadio C4 cuando aparecen los gonoporos. El espacio es un factor limitante en el crecimiento de los juveniles, así un individuo criado en un tanque pequeño realizará el mismo número de mudas que un individuo criado en un tanque grande pero crecerá tres veces menos. El mejillón fresco y el pienso de langostino parecen ser los mejores alimentos probados hasta la fecha en comparación con el mejillón congelado, el pescado o el calamar. Estudios preliminares en ostras (cubanitos) en el mar muestran un 60% de supervivencia en el pre-engorde de 30 a 90 días.

La alimentación parece ser la clave para que el cultivo de centolla en cautividad sea rentable. Los juveniles presentan un grado reducido de canibalismo que se hace prácticamente nulo con un buen alimento, aunque su comportamiento agonístico debe tenerse en cuenta a la hora de estabularlos ya en el pre-engorde. El pre-engorde en el mar o en tres dimensiones en instalaciones en tierra aprovechando mejor el espacio permitirá la rentabilidad de esta fase de cultivo. La mejora en la alimentación de la población reproductora permitirá no depender de la pesca para la obtención de centollas y cerrar completamente el ciclo.

## 2.7. DIFUSIÓN

Los resultados se han divulgado tanto a nivel social como científico. Para el gran público se ha realizado diversos programas de televisión regional: TV3 (Thalassa), TVE Canal Internacional, TV Mallorca, IB3 Televisión de les Illes Balears y Canal Sur Televisión; y varios artículos en la prensa: mispecies, europa press, El mundo, Diari de Mallorca y última hora.

A nivel científico se han difundido en:

Congresos nacionales: XI-Vigo y XII-Madrid Congreso Nacional de Acuicultura, 13 presentaciones; Simposio Ibérico de Estudios de Biología Marina, Barcelona, 1 presentación; Simposio Español de Microbiología, Valencia, 1 presentación; X Jornades de la Secció de Biologia de la Reproducció, Barcelona, 1 presentación.



Congresos internacionales: World Aquaculture Society (Florencia-Italia, Adelaide-Australia, Hanoi-Vietnam y Cracovia-Polonia), 6 presentaciones; 11th International Congress on Invertebrate Reproduction & Development, Panamá City, 2 presentaciones e International Symposium on Aquaculture, Biology and Management of Commercially Important Crabs, Shanghai-China, 3 presentaciones.

Artículos de divulgación: ipac.acuicultura (1) y Ruta pesquera (1).

Artículos en revistas científicas: Aquaculture (3), Aquacult. Inter. (1), J. Exp. Biol. Ecol. (1), J. Morphol. (2), J. Nat. Hist. (1), Rev. Biol. Mar. Oceanogr. (1) y Sci. Mar. (2), Tissue & Cell (1).

Formación: DEA (2), Tesis de máster (1), Trabajo fin de Carrera (2) y tesis doctorales en elaboración (3).

## 2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

Ninguna.

## 2.9. BIBLIOGRAFÍA



| -