

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Desempeño biológico y composición de ácidos grasos de
juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con dietas
naturales**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Abraham Enrique Atondo Grajeda

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Abraham Enrique Atondo Grajeda

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Dra. Ma. Elena Solano Arellano



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Abraham Enrique Atondo Grajeda** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Desempeño biológico y composición de ácidos grasos de juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con dietas naturales

Resumen aprobado por:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Directora de tesis

Los pulpos cuentan con un gran potencial para la acuicultura, sin embargo, los resultados de investigaciones y de cultivos experimentales no han logrado la producción en sistemas de cultivo. Las deficiencias nutricionales de las dietas han contribuido a los bajos porcentajes de supervivencia de paralarvas y juveniles tempranos, al no cumplir los requerimientos nutricionales que favorezcan su desarrollo. Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue evaluar el desempeño biológico y el contenido de ácidos grasos de juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con tres dietas naturales: D1 (dieta control) con un 80% de jaiba (*Callinectes sapidus*) y un 16% de mejillón (*Mytillus galloprovincialis*); D2 con 48% de jaiba y 48% de calamar (*Dosidicus gigas*) y D3 con un 48% de jaiba y 48% de anfípodos caprélidos. Se cultivaron 12 juveniles por tanque (9 tanques de 60 L cada uno) y se alimentaron con las diferentes dietas; cada tratamiento con tres replicas. Los juveniles fueron cultivados hasta los 45 días después de la eclosión, con un primer muestreo realizado a los 25 días de cultivo para la evaluación de ácidos grasos. Las concentraciones de ácidos grasos altamente insaturados, como el araquidónico (ARA, C20:4n6), eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6n3) presentaron diferencias significativas entre los organismos recién eclosionados y los cultivados a los 25 y 45 días. Las diferencias en concentraciones se observaron a los 25 días de cultivo entre los pulpos recién eclosionados y los alimentados con la D1 ($p < 0.026$). La mayor relación DHA:EPA (1.3) se presentó en los juveniles de la D2 ($p < 0.001$), así como una mayor concentración de DHA ($139.95 \pm 12.31 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$). A los 45 días los organismos de la D2 presentaron una ganancia en peso del 85% con respecto a su peso inicial. Los pulpos de la D3, a los 25 días perdieron el 47% de su peso con respecto a su peso promedio inicial ($p < 0.001$). La mayor supervivencia se obtuvo en los pulpos de la Dieta 2, con un 91.66% y 77.77% a los 25 y 45 días de cultivo, respectivamente.

Palabras clave: *Octopus bimaculoides*, juveniles, desempeño biológico, ácidos grasos, dieta

Abstract of the thesis presented by **Abraham Enrique Atondo Grajeda** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Biological performance and fatty acid composition of *Octopus bimaculoides* juveniles fed with natural diets

Abstract approved by:

Dr. Mónica Hernández Rodríguez
Thesis Director

Octopus have great potential for aquaculture, however, the results of research and experimental cultures have not achieved production in culture systems. The nutritional deficiencies of the diets have contributed to the low survival rates of paralarvae and early juveniles, by not meeting the nutritional requirements that favor their development. Therefore, the objective of the work was to evaluate the biological performance and the content of fatty acids of *Octopus bimaculoides* juveniles fed with natural diets. 12 juveniles per tank (9 tanks of 60 L each one) with three replicates by treatment were fed with three diets: D1 (control diet) with 80% crab (*Callinectes sapidus*) and 16% mussel (*Mytillus galloprovincialis*); D2 with 48% crab and 48% squid (*Dosidicus gigas*) and D3 with 48% crab and 48% caprellid amphipods. 12 juveniles were cultivated per tank (9 tanks of 60 L each) and they were fed with the different diets; each treatment with three replicates. The juveniles were cultivated until 45 days after hatching, with a first sampling carried out at 25 days of culture for the evaluation of fatty acids. The concentrations of highly unsaturated fatty acids such as arachidonic (ARA, C20:4n6), eicosapentaenoic (EPA, C20:5n3) and docosahexaenoic (DHA, C22:6n3) showed significant differences between newly hatched organisms and those cultured at 25 and 45 days. The differences in concentrations were observed after 25 days of culture between newly hatched octopuses and those fed with D1 ($p < 0.026$). The highest DHA:EPA ratio (1.3) was found in D2 juveniles ($p < 0.001$), as well as a higher concentration of DHA ($139.95 \pm 12.31 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$). At 45 days the D2 organisms presented a weight gain of 85% with respect to their initial weight. The D3 octopuses lost 47% of their weight after 25 days with respect to their initial average weight ($p < 0.001$). The highest survival was obtained in the octopuses of D2, with 91.66% and 77.77% at 25 and 45 days of culture, respectively.

Keywords: *Octopus bimaculoides*, juveniles, biological performance, fatty acids, diet

Dedicatoria

A mis padres Blanca y Enrique, hermanas Anahí, Julia y Paula, sobrinos Dante y Ricardo y mis abuelos.
Gracias por su apoyo y cariño.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por abrirme sus puertas y permitir mi ingreso a un posgrado en Acuicultura.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico durante los dos años de estudio y realización de maestría.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez, por permitirme desde el principio trabajar en su laboratorio, por permitirme realizar un trabajo que busqué durante mucho tiempo, por compartir sus experiencias, conocimientos y consejos, por su apoyo en la realización de este proyecto y su dedicación en la revisión de trabajo escrito y presentaciones y por su paciencia.

A mis sinodales, la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por permitirme trabajar en su laboratorio y por sus consejos y observaciones en este trabajo y a la Dra. Ma. Elena Solana Arellano, por sus acertadas observaciones en la realización de este trabajo, haciendo énfasis en la parte estadística y su apoyo y entusiasmo en la realización de este trabajo.

A los técnicos Luis Alberto Murillo Valenzuela, por su apoyo en la obtención de organismos, el mantenimiento de sistemas y su apoyo durante las biometrías realizadas. A Jesús Mariscal Medina, por su apoyo en las idas a San Quintín por organismos y a Abelardo Campos Espinoza, por su ayuda en el procesamiento, análisis de ácidos grasos de las muestras y en la interpretación de datos, también agradecer a la empresa AQUALAP y a su personal, a Alfonso Rosales y a la empresa Ostiones Bahía.

A todo el personal Docente del Departamento de Acuicultura, sobre todo a los cuales tuve el gusto de asistir a sus clases. Muchas gracias por su tiempo y su apoyo.

A mis compañeras de generación que siempre han apoyado, a mi compañera de laboratorio Candy Armuelles Bernal, por su ayuda, apoyo y sus consejos durante estos más de dos años.

Y sobre todo a mi familia, mis padres, hermanas, sobrinos y amigos, gracias por apoyarme y por su comprensión durante todo este tiempo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Pesquería de pulpo a nivel mundial y en México.....	1
1.2 Biología y alimentación de <i>Octopus bimaculoides</i>	3
1.3 Lípidos y ácidos grasos.....	6
1.4 Cultivo de <i>Octopus spp</i>	7
1.5 Cultivo de <i>O. bimaculoides</i>	12
1.6 Justificación.....	14
1.7 Hipótesis.....	15
1.8 Objetivos.....	15
1.8.1 Objetivo general	15
1.8.2 Objetivos específico.....	15
Capítulo 2. Metodología.....	16
2.1 Obtención de hembras grávidas.....	16
2.2 Mantenimiento de las hembras.....	17
2.3 Elaboración de las dietas.....	18
2.4 Extracción y análisis de ácidos grasos de las dietas.....	19
2.5 Diseño experimental.....	20
2.6 Cultivo de juveniles.....	21
2.7 Desempeño biológico y supervivencia de los juveniles.....	22
2.8 Aparición de los ocelos.....	23

2.9 Extracción y análisis de ácidos grasos en juveniles de pulpo.....	24
2.10 Análisis estadístico.....	24
Capítulo 3. Resultados.....	26
3.1 Estabilidad y lixiviación en dietas.....	26
3.2 Ácidos grasos en las dietas.....	26
3.3 Ácidos grasos en pulpos.....	28
3.4 Crecimiento en peso de los juveniles de <i>O. bimaculoides</i>	31
3.5 Presencia de ocelos en los juveniles de <i>O. bimaculoides</i>	35
3.6 Supervivencia.....	36
Capítulo 4. Discusión.....	37
Capítulo 5. Conclusiones.....	46
Capítulo 6. Recomendaciones.....	47
Literatura citada.....	48

Lista de figuras

Figura		Página
1	Distribución (línea roja) de <i>O. bimaculoides</i> desde San Simeón, California, hasta Guerrero Negro, Baja California Sur.....	3
2	Puesta de huevos de <i>O. bimaculoides</i>	4
3	Distribución de <i>O. bimaculatus</i> y <i>O. bimaculoides</i> en el noroeste de México.....	5
4	Patrón de los ocelos en las especies <i>O. bimaculoides</i> y <i>O bimaculatus</i>	5
5	Ganancia y pérdida en peso de los juveniles de <i>O. bimaculoides</i> alimentados con las tres dietas a partir del día 0 (n=108), hasta los 42 días de cultivo (n=26).....	33
6	Crecimiento en peso (mg) de los juveniles de <i>O. bimaculoides</i> a partir del día 0 de cultivo (día de eclosión) hasta los 42 días de cultivo, alimentados con las tres dietas.....	33
7	Juvenil recién eclosionado con un peso inicial de 61 mg y juvenil alimentado con la Dieta 2 (J+C) cultivado durante 45 días con un peso final de 144.8 mg.....	34
8	Ocelos presentes en juvenil de <i>O. bimaculoides</i> (45 días después de la eclosión) alimentado con Dieta 2 (jaiba + calamar).....	35

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Composición de las dietas por porcentaje de cada ingrediente para juveniles de pulpo.....	18
2	Concentraciones de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) en las dietas.....	27
3	Concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) en los juveniles recién eclosionados y en los alimentados con las dietas hasta los 25 días de cultivo.....	29
4	Concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) en los juveniles recién eclosionados y en los alimentados con las dietas hasta los 45 días de cultivo.....	30
5	Peso promedio (mg) de los juveniles de <i>O. bimaculoides</i> alimentados con las tres dietas experimentales.....	34
6	Supervivencia (%) de los juveniles de <i>O. bimaculoides</i> alimentados con las diferentes dietas.....	36

Capítulo 1. Introducción

1.1 Pesquería de pulpo a nivel mundial y en México

Los cefalópodos como los calamares, sepias y pulpos, representaron el 3.8% dentro de los principales grupos de especies en el comercio mundial de pescado y productos pesqueros, el cual representó el 6.4% del valor total de la producción pesquera en el mundo, con 171 millones de toneladas en 2016 (FAO, 2018). En dicho apartado la pesca del calamar *Dosidicus gigas*, alcanzó en 2016, una producción de 747 010 t. Cabe destacar que la pesca de cefalópodos se compone por aproximadamente 290 especies de calamares, de las cuales 30 o 40 especies se catalogan como las más representativas, por otra parte se reporta que cerca del 20 al 30% de los cefalópodos capturados no son identificados (Arkhipkin *et al.*, 2015; Domínguez-Contreras, 2015). En comparación con el calamar, la captura de pulpo no es tan significativa, debido a que su pesca no esta tan industrializada, y su mercado se dirige en gran parte a los proveedores locales, esta actividad se considera en algunos países como una pesca artesanal o local (Berkes *et al.*, 2001; Finkbeiner y Basurto, 2015; Domínguez-Contreras, 2015).

La producción mundial de la especie *Octopus vulgaris*, se ha incrementado de manera considerable, pasando de producciones aproximadas a las 3,500 t entre los años 1950 a 1970, a una producción promedio de 60,000 t anuales desde 1972 a 2015. Los países que contribuyen con la mayor producción de este recurso son México, España, Portugal e Italia (Domínguez-Contreras, 2015).

En los últimos años, China y Marruecos se convirtieron en los mayores exportadores de pulpo a nivel mundial, distribuyendo sus productos en el mercado europeo y norteamericano (FAO, 2018). En el período de 2014 a 2016, México se posicionó como el tercer mayor productor de pulpo (CONAPESCA, 2017), con un incremento en un 56% en el periodo de 2013 a 2016, y su valor aumentó en un 91%. La pesquería de pulpo la sustentan tres estados: Yucatán, Campeche y Baja California. La exportación de pulpo en 2016 se destinó a España, Japón, Italia y los Estados Unidos, generando un alto valor en el mercado internacional, mientras que las importaciones en ese año provenientes de España, Perú y Filipinas alcanzaron las 286 t (CONAPESCA, 2017).

En la costa del Pacífico mexicano, la captura es sostenida principalmente por las especies del género *Octopus* como *O. hubbsorum* (pulpo verde) y *O. bimaculatus* (pulpo de dos manchas o pulpo café), mientras que la pesca de la especie *O. bimaculoides* (pulpo ocelado enano) se considera una actividad

artesanal y local. Además, otras especies como *O. chierchiae*, *O. digueti*, *O. alecto*, *O. fitchi*, *O. veligero*, *O. rubescens* y *O. penicillifer*, no figuran como especies objetivo de las pesquerías, tanto a nivel comercial o artesanal (Domínguez-Contreras, 2015).

La pesca de *O. hubbsorum* se realiza principalmente durante el verano, mientras que la captura de *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* se da en el invierno. Los estados con mayor producción en el Pacífico son Jalisco (28%), Baja California Sur (25%), Sonora (15%) y Baja California (11%) (SEGOB, 2017). La pesquería de pulpo en México se sustenta principalmente en la captura de dos especies, *O. maya* (pulpo rojo) y *O. vulgaris* (pulpo patón), que se encuentran en el Golfo de México y en el Caribe. Esta se lleva a cabo en los estados de Yucatán donde su producción fue de 68.9% en 2017, Campeche con un 29.6% y los estados de Quintana Roo y Veracruz con un 1.1 y 0.4% respectivamente (SEGOB, 2017). La pesca se compone en un 74% de *O. maya* y un 26% de *O. vulgaris*, con fluctuaciones en el tiempo y tendencia al incremento en los últimos años (SEGOB, 2017).

Las especies de pulpo del Golfo de México y el Caribe cuentan con reglamentaciones sustentadas por el Diario Oficial de la Nación y dictámenes técnicos por parte de la Secretaría de Gobernación, como son la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SAG/PESC-2015, un plan de manejo pesquero para ambas especies, permisos de pesca comercial y concesiones de pesca, así como tallas mínimas de captura establecidas en 110 mm de longitud de manto para machos y 140 mm para hembras de *O. vulgaris* en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. En el resto del Golfo de México, las especies de pulpo deben tener una talla mínima de 110 mm de longitud de manto para ambos sexos. Además de períodos de veda del 16 de diciembre al 31 de julio para el pulpo maya en Campeche, Yucatán y Quintana Roo, y otros dos períodos que abarcan del 1 de enero al último día de febrero y del 1 al 30 de agosto de cada año en la zona del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. En torno a las especies de pulpo del Pacífico, no se cuenta con una reglamentación en la Norma Oficial Mexicana, ni un plan de manejo pesquero en vías de elaboración, como tampoco tallas mínimas de captura, las cuales solo aplican en Bahía de los Ángeles, Baja California, con 124 mm de longitud del manto o un peso de 757 g para los machos de todas las especies y una longitud del manto de 143 mm o un peso de 1029 g para las hembras (SEGOB, 2017).

En relación con la producción de pulpo por acuicultura, hasta el momento no hay un aporte significativo a nivel mundial, debido a que el ciclo de cultivo de estos organismos aún no se ha podido cerrar, no obstante países como España, Japón y Perú trabajan con procesos de engorda de juveniles silvestres en sistemas de jaulas para maricultura (Berger, 2010; García-García *et al.*, 2014).

Debido a la importancia del pulpo dentro de la producción pesquera mundial y a las características que sitúan a diversas especies como potenciales para la acuicultura, es importante continuar con estudios sobre la fisiología y nutrición de estos organismos (Lee *et al.*, 1995; Domingues *et al.*, 2007a; Gómez-Fierro, 2017), con la finalidad de desarrollar dietas y técnicas de alimentación que puedan promover su desempeño biológico reflejado en el crecimiento y en el bienestar de estos organismos en condiciones de cautiverio y cultivo (Gómez-Fierro, 2017).

1.2 Biología y alimentación de *Octopus bimaculoides*

La distribución de *O. bimaculoides* es desde las costas de San Simeón, California, hasta Guerrero Negro en Baja California (Figura 1) (Jereb *et al.*, 2014). El pulpo *O. bimaculoides* al igual que otras especies habitan en el intermareal costero y se refugian en cuevas entre rocas o en sustrato arenoso (Stoskopf y Oppenheim, 1996). En el medio natural estos organismos viven en promedio 1.5 años, alcanzan un peso de hasta 800 g, se reproducen una sola vez en su vida y producen huevos de gran tamaño (13 a 17 mm) (Solorzano *et al.*, 2009).

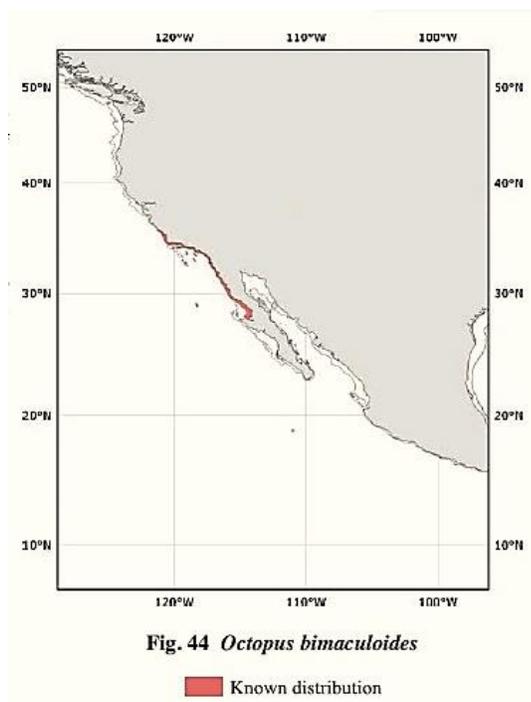


Figura 1. Distribución (línea roja) de *O. bimaculoides* desde San Simeón, California, hasta Guerrero Negro, Baja California Sur. (Imagen tomada de Jereb *et al.*, 2014).

Después del proceso de fecundación, la hembra coloca sus huevos en sustratos rocosos (Figura 2) y durante el proceso de incubación, protege, ventila y limpia la puesta hasta el momento de la eclosión (Boletzky y Villanueva, 2014; Gómez Fierro, 2017). Al igual que *O. maya* y *O. pallidus*, *O. bimaculoides* tiene un desarrollo directo, es decir, que el organismo que eclosiona del huevo, es un juvenil de hábitos bentónicos, además de que su comportamiento y fisiología le permite alimentarse de presas vivas desde este estadio (Forsythe y Hanlon, 1988; Uriarte *et al.*, 2011). Dicho ciclo de vida difiere al de la mayoría de las especies como *O. vulgaris* y *O. bimaculatus*, entre otras, las cuales, al eclosionar, cuentan con un estadio de paralarva, etapa de hábitos planctónicos y una desproporción de brazos y manto como una de sus características físicas más notorias, por lo cual se modifica hasta que los organismos llegan a su etapa de juvenil temprano, los cuales son de hábitos bentónicos (Hanlon y Forsythe, 1985; Uriarte *et al.*, 2011).



Figura 2. Puesta de huevos de *O. bimaculoides*. Fotografía tomada por Enrique Atondo (2019).

Los pulpos con desarrollo directo como *O. bimaculoides* se adaptan fácilmente al cautiverio, alcanzan pesos similares al de organismos presentes en el medio natural, se adaptan al alimento congelado, son de fácil manejo y su ciclo de vida le confiere cualidades con gran potencial acuícola (Forsythe y Hanlon, 1988).

O. bimaculoides coincide en su distribución en la parte norte del Pacífico con la especie *O. bimaculatus* (Figura 3) y además comparten una morfología similar, destacando en ambas especies, la presencia de ocelos conocidos también como manchas de ojos falsos, que son pigmentaciones localizadas en ambos lados de la cabeza y los utilizan para mimetizarse y protegerse de depredadores (Jereb *et al.*, 2014). La coloración de los ocelos en ambas especies es de un azul iridiscente, sin embargo, una de las características que permiten la identificación entre estas dos especies es el patrón de estos, siendo en *O. bimaculoides*

un patrón más regular en forma de cadena, en comparación con un patrón irregular presente en *O. bimaculatus* (Figura 4) (Jereb *et al.*, 2014).

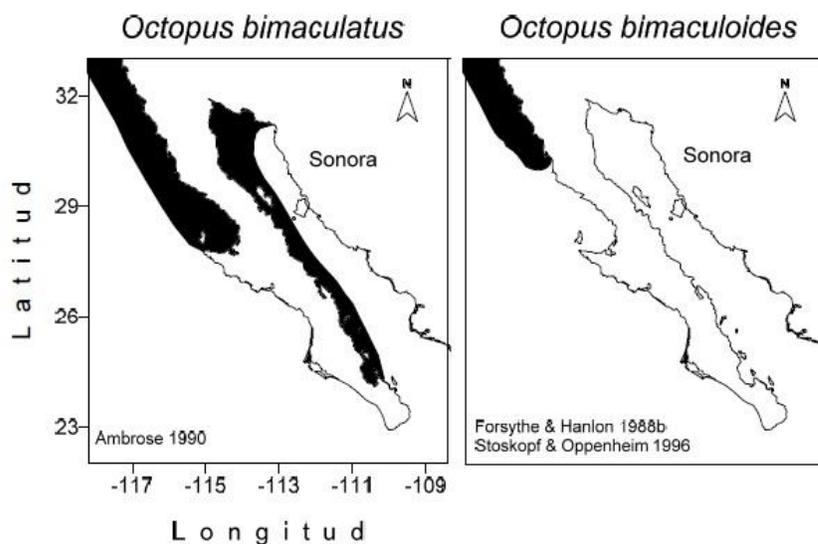


Figura 3. Distribución de *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* en el noroeste de México. Imagen tomada de Domínguez-Contreras, 2015.

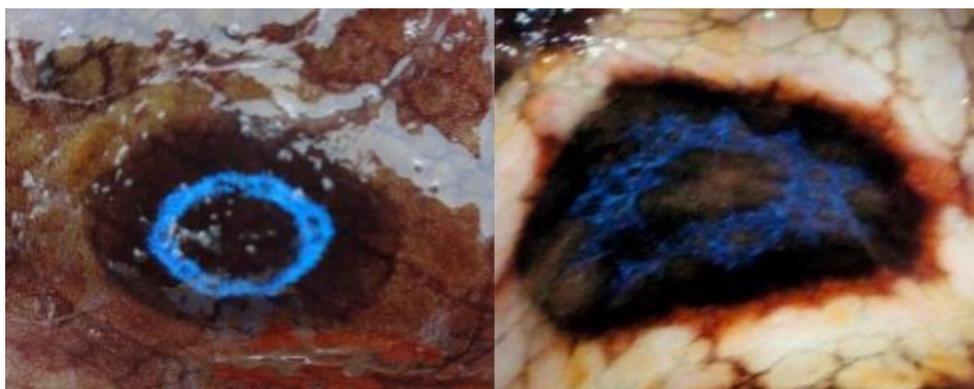


Figura 4. Patrón de los ocelos en las especies *O. bimaculoides* (izquierda) y *O. bimaculatus* (derecha). Imágenes tomadas de Mora-Zamacona, 2015.

Estos organismos en su etapa adulta basan su alimentación principalmente en el consumo de crustáceos, moluscos bivalvos y en ocasiones pequeños peces (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983; Ibarra-García, 2018); por otra parte, la alimentación de los juveniles está compuesta principalmente por zooplancton, donde se encuentran especies de isópodos, anfípodos y larvas de crustáceos (Van Heukelem, 1977).

1.3 Lípidos y ácidos grasos

Los lípidos tienen dos funciones principales en la nutrición acuícola, a) son la mayor forma de energía almacenada mediante las reservas de triglicéridos, y b) forman parte de los componentes de las membranas celulares, mediante los glicerofosfolípidos (Leaver *et al.*, 2008).

Los ácidos grasos son los componentes principales de todos los lípidos, sus características físicas y nutricionales dependen del grado de saturación y la longitud de las cadenas de carbono que componen a estas moléculas (Webster y Lim, 2002). La saturación se refiere al número de enlaces insaturados, presentes en la cadena de ácidos grasos. Estas moléculas al presentar solamente enlaces simples en su cadena carbonada, se clasifican como ácidos grasos saturados, si la cadena carbonada presenta una insaturación (un solo enlace) son monoinsaturados, y si la cadena presenta más de una insaturación (dos o más dobles enlaces) se clasifican como poliinsaturados; los ácidos grasos con un mayor número de enlaces insaturados se denominan como ácidos grasos altamente insaturados (Glencross, 2009). Además la longitud de estas moléculas se determina por el número de carbonos presentes en la cadena (Webster y Lim, 2002).

Los lípidos (triacilglicéridos y ácidos grasos) son importantes en la dieta por su uso como fuente de energía alternativa durante la eclosión de juveniles o en los períodos de ayuno de las paralarvas de algunas especies (Quintana *et al.*, 2006), así como participar en procesos fisiológicos y bioquímicos, los cuales comienzan con el proceso de ingestión y digestión de los alimentos, resaltando su influencia en el control de funciones metabólicas y endocrinas, así como el mantenimiento de la estructura de la membranas celulares (Phillips *et al.*, 2002; López-Peraza *et al.*, 2018). Destaca en particular el ácido eicosapentaenoico (EPA), importante en procesos como síntesis celular, desarrollo neuronal, control de funciones endocrinas, regulación iónica, procesos inmunológicos y reproductivos (Glencross, 2009).

En organismos marinos como peces y pulpos, los ácidos grasos de mayor importancia son los ácidos de 16 y 22 carbonos (Webster y Lim, 2002). En el caso de los cefalópodos como los pulpos, calamares y sepias, se ha demostrado que tienen la capacidad de convertir el ácido eicosatetraenoico (20:4n-3) en ácido eicosapentaenoico (20:5n-3), como también pueden convertir el ácido dihomo-gamma linolénico (20:3n-6) a ácido araquidónico (20:4n-6), el cuál es el precursor de una gran cantidad de derivados biológicos altamente activos, como son los eicosanoides, incluyendo prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas; derivados que cumplen funciones como hormonas autocrinas, regulando muchos procesos

fisiológicos como la hemostasia, reproducción, respuesta inmune e inflamatoria en organismos marinos (Ghioni *et al.*, 2002).

La capacidad de los pulpos para sintetizar ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's, por sus siglas en inglés), se ve limitada por la deficiencia en la síntesis endógena de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) C18 debido a que estos organismos carecen de las enzimas desaturadas Δ^{12} y Δ^{15} , por lo cual no pueden elongar y desaturar cadenas de ácidos grasos para obtener los ácidos grasos esenciales, entre los que destacan los poliinsaturados y altamente insaturados (Sargent *et al.*, 2002), en función también con la baja disponibilidad de sustratos adecuados (20:4n-3 y 20:3n-6) presentes en su dieta. Por ello los ácidos grasos altamente insaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA) son esenciales para estos organismos (Monroig *et al.*, 2012a, 2012b), debido a que son componentes principales de las membranas celulares y precursores de otras moléculas (Webster y Lim, 2002).

Debido a que los pulpos no pueden sintetizar ácidos grasos poliinsaturados, como los ácidos docosahexaenoico, eicosapentaenoico y araquidónico, estos deben ser incorporados en sus dietas, ya que son requeridos de manera esencial en estadios larvales y juveniles (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Seixas *et al.*, 2010).

1.4 Cultivo de *Octopus* spp.

Debido a su gran potencial acuícola, diversas especies de pulpo han sido objeto de investigación para poder determinar las condiciones óptimas que favorezcan su cultivo. Los avances de los estudios realizados en *O. vulgaris* y *O. maya*, han ayudado a comprender aspectos de la fisiología, nutrición, reproducción y manejo de estos organismos. Mientras tanto, diversos autores entre los que destacan Forsythe y Hanlon (1988), Sakurai *et al.* (1996), Noyola *et al.* (2013a, 2013b), consideran a la temperatura como un factor ambiental que controla en gran medida el desarrollo de especies como *O. bimaculoides* y *O. maya*.

En cuanto a las investigaciones realizadas, gran parte de la información y observaciones han sido sobre la especie *O. vulgaris*, debido al interés y esfuerzo de investigadores en resolver cuestionamientos sobre la reproducción, engorda, desarrollo, fisiología, nutrición, calidad del agua entre otras líneas de investigación. Todo ello con la finalidad de lograr avances en cuanto al cultivo de esta especie desde la

etapa de paralarva, y a su vez generar información que propicie el desarrollo del cultivo de otras especies de pulpo (Iglesias *et al.*, 2007).

Entre los resultados obtenidos para *O. vulgaris*, Móxica y colaboradores (2002) realizaron el cultivo intensivo de paralarvas de esta especie en tanques de 9 m³, en dicho cultivo la dieta fue *Artemia salina* y se complementó con zoeas de centolla (*Maja squinado*). Después de 56 días, las paralarvas alcanzaron un peso seco de 9.21 mg, presentaron entre 17 y 18 ventosas en cada brazo y se alcanzó una supervivencia final de 0.2%. A su vez, Navarro y Villanueva en 2003 alimentaron paralarvas con *Artemia* y dietas encapsuladas, haciendo énfasis en el perfil y uso de ácidos grasos en el tiempo por parte de los organismos. El perfil de lípidos y ácidos grasos de estos organismos fue diferente en comparación con los perfiles de paralarvas capturadas en el medio natural, lo que indicó la influencia del perfil de ácidos grasos de *Artemia* en las paralarvas cultivadas. Por otra parte Seixas y colaboradores (2010) cultivaron paralarvas con tres diferentes dietas, y obtuvieron la mayor supervivencia ($20 \pm 8\%$) con la dieta a base de juveniles de *Artemia* enriquecidas con emulsión lipídica, con la dieta de *Artemia* enriquecida con mezcla de microalgas (*Rhodomonas lens* e *Isochrysis galbana*) la supervivencia fue del $17 \pm 4\%$, y con la tercer dieta a base de *Artemia* complementada con dieta inerte, se logró una supervivencia del $13 \pm 5\%$, a los 15 días después de la eclosión. Además, en los tres grupos observaron una notable caída del porcentaje de ácido docosahexaenoico a partir del décimo día de cultivo.

Los resultados de estos estudios permitieron determinar el poco aporte de ácidos grasos altamente insaturados de dietas encapsuladas y de artemias enriquecida utilizadas en la alimentación de *O. vulgaris*, al propiciar un bajo crecimiento y supervivencia de las paralarvas y juveniles de esta especie (Navarro y Villanueva, 2003; Seixas *et al.*, 2010).

En búsqueda de dietas que brinden mejores resultados, Okumura y colaboradores en 2005, alimentaron paralarvas de *O. vulgaris* durante un mes con *Artemia* adulta y nauplios de *Artemia* complementado estas dietas con hojuelas congeladas del pez *Ammodytes personatus*. Entre sus resultados destacan supervivencias del 47.4 y 45.9% para el grupo alimentado con *Artemia* adulta en comparación con el 8.8% y 2.7% obtenido con el tratamiento a base de nauplios. El peso húmedo fue de 26.2 y 37.3 mg a los 25 y 32 días después de la eclosión en las paralarvas alimentadas con la dieta a base de *Artemia* adulta, así como también una relación DHA/EPA igual a 1.5 a los 32 días de edad, siendo este similar al de las paralarvas recién eclosionadas y a sub-adultos silvestres. Los autores consideraron que este resultado se debe al aporte del suplemento de hojuelas, ya que *Artemia* tuvo una cantidad mínima de DHA.

Iglesias y colaboradores en 2014, alimentaron a paralarvas de *O. vulgaris* con un esquema de alimentación a base de *Artemia* y zoeas de *Maja brachydactyla* (cangrejo araña) en relación 1:2. Las paralarvas presentaron un aumento promedio en su peso de $3.00 \pm 0.56 \text{ mg} \cdot \text{día}^{-1}$. Además de verse reflejado un aumento sustancial en ácidos grasos insaturados. Sin embargo, la supervivencia después de 30 días de cultivo fue de 1.75%. Por otra parte Garrido *et al.* (2016), analizaron el perfil de ácidos grasos de paralarvas silvestres, y observaron que las de 6 a 8 días de edad, tenían una composición de ácidos grasos similar al de las producidas en cultivo, sin embargo, al comparar los ácidos grasos de paralarvas cultivadas hasta los 20, encontraron en los organismos silvestres una mayor concentración de DHA, y contenidos más bajos de ácido oleico (C18:1n9), ácido linoleico (C18:2n6) y niveles insignificantes de ácido linolénico (C18:3n3).

En cuanto a la especie *O. bimaculatus* la cual comparte una distribución y características similares a *O. bimaculoides*, López-Peraza y colaboradores en 2018, obtuvieron supervivencias del 1.93% (n = 225) a los 17 días después de la eclosión, en paralarvas alimentadas con *Artemia franciscana* (8.2 ± 1.20 mm de longitud) enriquecidas con aceite de ojo de atún. Además, observaron un incremento en el número de ventosas de cinco al momento de la eclosión a nueve por cada brazo al día 17; mientras que las paralarvas alimentadas con la dieta control a base de *A. franciscana* no enriquecida, terminaron con solamente seis ventosas por cada brazo a los 11 días de cultivo y una supervivencia del 1.77% (n = 225). Los autores también mencionan que los ácidos grasos más abundantes fueron los saturados en una proporción del $41.87 \pm 13.73\%$, siendo para este grupo el ácido palmítico (C16:0) el más abundante (29.18 ± 13.78). El ácido elaídico fue el ácido graso monoinsaturado de mayor proporción ($16.33 \pm 9.13\%$), mientras que la proporción de ácido linoleico fue baja ($0.20 \pm 0.08\%$). En cuanto a los HUFA's n-3, el ácido EPA se detectó en una proporción del $9.46 \pm 4.53\%$ y el ácido DHA en un $18.76 \pm 2.80\%$, así mismo el ácido ARA se detectó en un $2.04 \pm 0.77\%$. Dichos resultados permitieron calcular la relación DHA/EPA y EPA/ARA, obteniendo valores de 1.99 y 4.63 respectivamente (López-Peraza *et al.*, 2018).

Las características (adaptabilidad al cautiverio, aceptación de alimento congelado, reproducción en cautiverio, etc.) que presenta *O. vulgaris* como un buen candidato para cultivo, también se han encontrado en especies con desarrollo directo como *O. maya* y *O. bimaculoides* (Mangold y Boletzky, 1973; Berger, 2010). En México el pulpo con mayor avance en investigación, es la especie *O. maya*. Los estudios realizados por Domingues *et al.* (2007a) y Rosas *et al.* (2007) con *O. maya*, demostraron que dietas peletizadas hechas con harina de pescado no promovían su crecimiento, sin embargo, los animales no perdían peso y consumieron regularmente todos los alimentos suministrados. Además, obtuvieron tasas

de alimentación superiores a las reportadas para dietas preparadas. En el trabajo de Domingues y colaboradores, se obtuvieron mayores tasas de crecimiento y energía asimilada al alimentar a los juveniles con cangrejos congelados, esto en comparación con el alimento seco, el cual contenía un alto nivel de lípidos (21%). Así mismo Rosas y colaboradores reportaron que el uso de alginato como aglutinante en las dietas artificiales, reducía la digestibilidad, debido a que esta especie carece de la capacidad de hidrolizar carbohidratos.

En 2008, Rosas y colaboradores evaluaron los efectos del tipo de aglutinante en la dieta, sobre el crecimiento, fisiología nutricional, digestibilidad aparente y el equilibrio energético en juveniles de *O. maya*. Los organismos fueron alimentados con *Artemia* y juveniles de camarón (*Palaemonete* sp.) por un periodo de 15 a 20 días, posteriormente realizaron el cambio de dieta y alimentaron con pasta fresca de carne de jaiba (*Callinectes sapidus*) con alginato al 1% o 2% de gelatina, y contrastaron con la dieta control a base de carne de cangrejo fresca. Estas dietas se administraron al 40% de la biomasa de los juveniles durante un período de 20 días. Los autores reportaron que la tasa de crecimientos de los juveniles fue afectada por el tipo de aglutinante, con un crecimiento negativo (cercano al -3% al día) en los juveniles alimentados con la dieta de cangrejo con alginato. Los juveniles alimentados con la dieta que contenía gelatina como aglutinante y la dieta control, mostraron un crecimiento positivo (aproximado al 2% diario), sin embargo, no encontraron diferencias entre las dietas. Además, la supervivencia fue superior al 80% en los juveniles alimentados con la dieta donde se utilizó gelatina como aglutinante y con la dieta control. Asimismo la ingesta de alimento no fue afectada por la composición de la dieta, con una media de 7.3% del peso del organismo y un consumo de energía de 731.5 J por día.

En esta misma especie, Quintana *et al.* (2011) evaluaron el efecto de la ración de alimento y las condiciones nutricionales en juveniles de 7 a 10 días de edad. Un grupo de juveniles fueron cultivados individualmente y se alimentaron con raciones de 10% de su peso húmedo y el cultivo en grupo se alimentó con una ración del 30%, en ambos casos, se utilizó una dieta de cangrejo aglutinada con gelatina y el grupo control fue alimentado con musculo de cangrejo. En los juveniles cultivados individualmente, obtuvieron un 100% de mortalidad, y en el caso del cultivo en grupo la supervivencia fue de un 20% a los 31 días de cultivo.

Rosas y colaboradores (2011) analizaron los efectos de dos niveles de proteínas en la dieta en el equilibrio energético y la capacidad digestiva del pulpo maya. Los juveniles fueron alimentados con pasta de cangrejo con 40 y 60% de proteína, y el grupo control con cangrejo congelado (*Callinectes* spp.). Los autores demostraron que el cangrejo es una de las mejores dietas para *O. maya*, además de que la dieta con un

60% de proteína producía un crecimiento positivo, pero lento y en ocasiones una respuesta fisiológica similar a la observada en los organismos alimentados con cangrejo. Así mismo concluyeron que los juveniles de esta especie ajustan sus enzimas digestivas a diferentes tipos de alimento y niveles proteicos en un proceso correlacionado con su crecimiento, y que la tasas de consumo de energía de $1,000 \text{ kJ semana}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, debería satisfacer su demanda fisiológica como lo observado en los organismos alimentados con cangrejo, sin embargo, los bajos valores de energía digerida por los juveniles alimentados con dietas artificiales sugieren la existencia de un factor que limita su digestibilidad.

En la búsqueda de otro tipo de dietas para *O. maya*, Baeza-Rojano *et al.* (2012) obtuvieron una supervivencia del $92.2 \pm 6.8\%$, y una tasa de crecimiento específico de $6.9 \pm 0.2\% \text{ día}^{-1}$ a los 30 días de cultivo, para juveniles alimentados con el anfípodo gammárido *Hyale media*, en comparación con los juveniles alimentados con *Artemia* sp. y el gammárido de agua dulce *Hyalella azteca*, con los cuales obtuvieron supervivencias del $74.5 \pm 23.8\%$ y $41.2 \pm 21.2\%$, y tasas de crecimiento específico de $4.8 \pm 0.2\%$ y $5.0 \pm 0.3\% \text{ día}^{-1}$. El contenido nutricional de anfípodos demuestra que son ricos en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, tales como el DHA y el EPA (Nair y Anger, 1980; Kolanowski *et al.*, 2007). Estos ácidos grasos se encargan de mantener la estructura y función de las membranas celulares, y son precursores de varios compuestos bioactivos tanto en vertebrados como invertebrados. Así mismo, en estudios sobre el perfil nutricional de anfípodos caprélidos, se han obtenido altos valores de ácidos grasos poliinsaturados y de proteínas (Kawashima *et al.*, 1999; Woods, 2009; Cook *et al.*, 2010).

Los resultados de Baeza-Rojano *et al.* (2012) sugieren que los anfípodos pueden suplir la necesidad de una gran cantidad de proteína para los cefalópodos en sus estadios juveniles, supliendo así a la *Artemia* y al uso de misidáceos y larvas zoeas como alimento vivo para estos organismos.

Los estudios más recientes en *O. maya*, destacan el efecto de las fuentes de proteína en la dieta sobre el crecimiento, supervivencia y la capacidad digestiva de los juveniles (Rosas *et al.*, 2013). En este trabajo los autores demostraron que las dietas frescas o liofilizadas producen mejores resultados en el crecimiento de los juveniles, además de que un requerimiento proteico entre el 80 y 86% favorece la digestión. A su vez, Martínez y colaboradores (2014) obtuvieron una supervivencia del 100% a los 55 días de cultivo en juveniles que fueron alimentados con una dieta a base de 50% músculo de cangrejo y 50% calamar liofilizados, con una tasa de crecimiento específico de $3.04 \pm 0.39\% \text{ día}^{-1}$ y un crecimiento promedio de $32.18 \pm 5.15 \text{ mg} \cdot \text{día}^{-1}$.

El pulpo *O. pallidus* es otra especie con desarrollo directo, algunos de los estudios han evaluado el crecimiento de los juveniles tomando en cuenta la temperatura y como alimento el cangrejo de porcelana (*Petrolisthes elongatus*) de diferentes tallas (Leporati *et al.*, 2007). Los autores documentaron una supervivencia del 78.12%, y los pulpos de menor talla fueron aquellos que experimentaron el régimen de temperaturas de primavera/verano (16 a 18°C). En esta misma especie, André y colaboradores (2008), estudiaron la relación entre la temperatura, la alimentación, la conversión alimenticia y el crecimiento en los juveniles de pulpo. Los organismos fueron cultivados en dos regímenes térmicos, el primero correspondía a la temperatura más cálida e incrementaron la temperatura de 16 a 18°C, el segundo fue la condición fría al disminuir la temperatura de 16 a 14°C, el alimento proporcionado fueron pequeños cangrejos (*P. elongatus*). La mayor supervivencia a los 143 días de cultivo fue en los juveniles del régimen de temperatura fría y las tasas de conversión alimenticia fueron de 0 hasta 23.9% por día. Los autores concluyen que al parecer existe una relación compleja entre las variables evaluadas, donde la tasa de conversión alimenticia se correlacionó negativamente con la tasa de alimentación y positivamente con la tasa de crecimiento, por lo que el aporte de este estudio es que los pulpos podrían crecer con gran eficiencia aún durante cortos períodos con poco alimento.

1.5 Cultivo de *O. bimaculoides*

El estudio precursor en el mantenimiento en cautiverio de *O. bimaculoides* fue realizado por Forsythe y Hanlon en 1988. El objetivo de la investigación era con fines biomédicos, y enfatizaron, que esta especie cuenta con “cualidades superiores para su cultivo en laboratorio”, debido a una tolerancia térmica entre los 18 y 23°C, en la cual además los organismos no presentan enfermedades. Así mismo la incidencia de canibalismo es baja y lograron pesos cercanos al de organismos silvestres, con pulpos que alcanzaron pesos de hasta 887 g, y un tiempo de vida en cautiverio entre los 12 y 14 meses. Además, reportaron la fase de crecimiento exponencial entre el 4 y 7% a partir del peso húmedo inicial (70 mg) de los juveniles, y una tasa de crecimiento del 2 al 4% en juveniles tardíos y adultos, con una eficiencia de conversión alimenticia entre el 40 y 60%.

DeRusha y colaboradores en 1989, cultivaron juveniles alimentándolos con cangrejos vivos (dieta control), camarón congelado (*Penaeus* spp.) y gusanos marinos (*Nereis virens*), obteniendo en sus resultados crecimientos similares entre los animales alimentados con la dieta control y los que recibieron el camarón congelado. En otros estudios, Cigliano (1993), observó que el factor dominante entre los organismos en

cautiverio influía directamente en la variabilidad de tallas en los juveniles, esto debido a factores de comportamiento de la especie.

Solorzano y colaboradores (2009) evaluaron el crecimiento en juveniles de *O. bimaculoides*, alimentando con *Artemia salina* enriquecida y no enriquecida, y obtuvieron tasas de crecimiento entre 0.74 y 0.88 mg•día⁻¹, y 100% de supervivencia en los pulpos alimentados con *Artemia* no enriquecida.

Las investigaciones en esta especie no solo se han centrado en temas de nutrición, también se han considerado aspectos de su biología térmica, como el estudio de Lecuanda-Ontiveros (2014), al evaluar el preferendum térmico en juveniles recién eclosionados y adultos de esta especie, mediante el método gravitacional y un fotoperiodo de 12:12 horas luz-oscuridad. En ambos estadios de vida, la temperatura preferencial fue de 16°C, con intervalos de 17.2 a 18.3°C en el día y de 14.7 a 16.7°C durante la noche. Por otra parte, Suárez-Salcido (2016), estudió el efecto de la temperatura de incubación sobre la tolerancia térmica y la composición de ácidos grasos de juveniles recién eclosionados, obteniendo una mayor concentración de DHA para los pulpos incubados a 16°C, mientras que para EPA el contenido más alto fue para los incubados a 18°C, y ARA se presentó en mayor porcentaje en los pulpos incubados a 20°C.

En un trabajo más reciente, Gómez-Fierro (2017), cultivó 144 juveniles de esta especie, los cuales fueron alimentados con dietas que contenían diferentes proporciones de jaiba (*Callinectes sapidus*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), añadiendo además aceite de ojo de atún en una de las dietas. La supervivencia fue del 97.92% a los 28 días de cultivo y del 95.65% a los 42 días después de la eclosión, alimentando a los organismos con una dieta a base de 80% carne de jaiba y 16% manto y gónada de mejillón. Los juveniles alimentados con esta dieta alcanzaron un aumento del 105% de su peso con respecto al inicial y un crecimiento de 2.54 mg•día⁻¹.

Las investigaciones sobre aspectos nutricionales y fisiológicos en las especies de pulpo con desarrollo directo como *O. bimaculoides*, muestran los diferentes resultados en crecimiento y supervivencia de los organismos cuando se les proporcionan las distintas dietas. Por lo anterior, es importante continuar generando el conocimiento que permita marcar las directrices en los requerimientos nutricionales de estos organismos reflejado en su mejor desempeño fisiológico.

1.6 Justificación

Los pulpos cuentan con un gran potencial para la acuicultura y con un alto valor comercial. La producción de este recurso depende en su totalidad de la pesca, debido a que resultados de investigaciones y de cultivos experimentales no han logrado desarrollar su producción en sistemas de cultivo.

Uno de los principales temas a investigar y desarrollar en acuicultura son los requerimientos nutricionales de estos organismos, sobre todo en fases de su desarrollo temprano y en etapa reproductiva. El gran problema al que diversas investigaciones se han enfrentado, son los altos porcentajes de mortalidad que se presentan en las etapas de paralarva y de juveniles tempranos en las diversas especies de pulpo que han sido objeto de estudio. Dichas mortalidades se asocian a las deficiencias nutricionales de las dietas suministradas a estos organismos, en especial debido al alto requerimiento proteico y de ácidos grasos esenciales para su desarrollo.

En México, desde hace varios años se ha trabajado en investigaciones para lograr el desarrollo acuícola de algunas especies de pulpo; dichos estudios han dado resultados positivos para *O. maya*, logrando un mejor desarrollo en cultivos experimentales de esta especie. En el Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, se ha trabajado con *O. bimaculoides*, especie con un ciclo de vida similar a *O. maya* y con un alto potencial acuícola, gracias a su adaptabilidad al cautiverio, su tolerancia a cambios de temperatura, su alta tasa de crecimiento en cautiverio, su fácil manejo y su desarrollo directo.

En el caso de *O. bimaculoides* es necesario generar más información sobre aspectos de la nutrición de esta especie, para poder determinar cómo las dietas y los nutrientes contenidos en estas, favorecen el crecimiento, desarrollo y supervivencia de estos organismos, haciendo énfasis en el efecto de los ácidos grasos esenciales, los cuales juegan un papel importante en el desempeño biológico y en el metabolismo de los octópodos. Esta temática es con la finalidad de poder desarrollar a futuro el cultivo de esta especie.

1.7 Hipótesis

El desempeño biológico y la supervivencia de juveniles de *Octopus bimaculoides* será mayor con la dieta que contiene 80% jaiba y 16% mejillón, lo que se verá reflejado en un contenido de ácidos grasos altamente insaturados similar al de organismos recién eclosionados.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Evaluar el desempeño biológico, supervivencia y la composición de ácidos grasos de juveniles de *O. bimaculoides*, alimentados con dietas a base de mejillón, jaiba, calamar y anfípodos.

1.8.2. Objetivos específicos

- Evaluar y comparar el perfil de ácidos grasos de tres dietas (D1: 80% jaiba – 16% mejillón; D2: 48% jaiba – 48% calamar, y D3: 48% jaiba y 48% anfípodos) proporcionadas a los juveniles de pulpo.
- Determinar la composición de ácidos grasos en juveniles de *O. bimaculoides* recién eclosionados y en los alimentados con las distintas dietas.
- Estimar el crecimiento de los juveniles de *O. bimaculoides* en función de la tasas de crecimiento instantáneo y específico, ganancia en peso y la aparición de los ocelos.
- Evaluar la supervivencia de los juveniles alimentados con las tres dietas.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención de hembras grávidas

La recolección de hembras grávidas se llevó a cabo durante el primer período reproductivo de la especie (febrero – abril, CONAPESCA, 2008). Se recolectaron 12 hembras de *O. bimaculoides*, en Bahía Falsa, San Quintín, Baja California (30°27'11.94"N y 116°0'24.36"O). Para la obtención de los organismos, se realizó un recorrido por la bahía cerca de la costa y durante la marea baja, en búsqueda de cuevas de pulpo. Para su localización se tomó en cuenta la presencia de orificios entre rocas y sustrato, la cantidad y limpieza de conchas incrustadas en los orificios y el movimiento de agua de manera ascendente y descendente producido por el accionar del sifón de los pulpos (Rosales com. pers., 2019).

En las cuevas donde se observaron las características mencionadas anteriormente, se inyectó agua de mar mezclada con sal con ayuda de botellas de plástico, para aumentar la salinidad del medio, y, de esta manera, estimular la salida de los organismos para su captura. En el lugar de muestreo se realizó la selección de pulpos para descartar a los machos dependiendo del tamaño de las ventosas alrededor de la boca y si presentaban el tercer brazo modificado, llamado hectocótilo (Stoskopf y Oppeheim, 1996; Gómez-Fierro, 2017).

Para el traslado de los organismos al Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, las hembras se colocaron de manera individual, en refugios elaborados con tubo de ABS de 6 pulgadas de diámetro dentro de un saco de malla sardinera, la cual se amarró en un extremo con hilo de nylon torcido para evitar que los organismos escaparan. Posteriormente los refugios se colocaron en bolsas de plástico con agua de la bahía, a las cuales se le suministró oxígeno a saturación, y se transportaron en hieleras de 100 litros. Cabe señalar que la temperatura del agua en la cual se mantuvo a las hembras fue de 18.4°C.

2.2 Mantenimiento de las hembras

Las hembras se colocaron de manera individual en tanques de 550 litros, conectados a un sistema de recirculación diseñado para el mantenimiento de reproductores de pulpo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2015). Dicho sistema se conforma de 14 tanques distribuidos en dos hileras, las cuales están conectadas de manera independiente a un biofiltro, que a su vez está conectado a una bomba de calor (AquaLogics Systems de 2HP) que mantiene la temperatura óptima para los pulpos.

La recirculación del agua es mediante elevadores de aire para su distribución a cada tanque del sistema, los cuales en el centro cuentan con un tubo central de PVC (2" de diámetro), que regula el nivel de agua y drena por un tubo recolector de agua de 3" de diámetro (tubo de ABS) conectado en cada hilera de tanques para ser retornada a los biofiltros (Gómez-Fierro, 2017). En cada tanque se colocó una olla de barro que sirvió como refugio para las hembras.

Durante el mantenimiento y anterior al período de desove, se alimentó a las hembras diariamente con mejillones frescos (*Mytilus galloprovincialis*), los cuales fueron proporcionados por la Empresa AQUALAP; para mantener su calidad los mejillones fueron almacenados a -4°C.

Diariamente se registraron la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, los cuales se midieron con un multiparámetro YSI Pro 2030, y de manera semanal se evaluó la concentración de nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal total (NAT) con kits de reactivos API®.

Al detectarse puestas de huevos de alguna de las hembras, estas fueron transportadas dentro de la olla de barro y con suficiente agua a tanques con capacidad de 400 litros, ubicados en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura. En estos tanques se llevó el seguimiento del período de incubación de las puestas con la finalidad de tener un mejor control en la revisión del desarrollo de los huevos; el agua tuvo una temperatura de $19.34 \pm 1.17^{\circ}\text{C}$ y concentración de oxígeno promedio de 6.91 ± 0.29 mg/L.

2.3 Elaboración de las dietas

Las dietas fueron elaboradas con base en los estudios realizados en las especies *O. maya* (Martínez *et al.*, 2014) y *O. bimaculoides* (Gómez-Fierro, 2017).

La dieta 1 (dieta control, D1 J+M) se elaboró con un 80% de carne de jaiba (*Callinectes sapidus*) y un 16% de gónada y manto de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). La dieta 2 (D2 J+C), tuvo 48% de carne de jaiba y un 48% de manto de calamar (*Dosidicus gigas*), y la dieta 3 (D3 J+A), se elaboró con un 48% de carne de jaiba y 48% de anfípodos caprélidos. El 4% restante para cada dieta corresponde a la grenetina, la cual se utilizó como aglutinante (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de las dietas por porcentaje de cada ingrediente para juveniles de pulpo.

Dieta	Jaiba (J)	Mejillón (M)	Calamar (C)	Anfípodos (A)	Grenetina
1 (J+M)	80%	16%	-	-	4%
2 (J+C)	48%	-	48%	-	4%
3 (J+A)	48%	-	-	48%	4%

La dieta 1 y la dieta 2, fueron seleccionadas con base en los resultados de supervivencia mayores al 95% en estudios realizados con *O. bimaculoides* (Gómez-Fierro, 2017) y *O. maya* (Martínez *et al.*, 2014).

La dieta 3, se consideró en base a la alimentación de esta especie tanto en su etapa adulta como juvenil, siendo crustáceos como la jaiba su alimento principal en etapa adulta (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983; Ibarra-García, 2018) y los anfípodos constituyen parte de sus presas en su etapa juvenil (Van Heukelem, 1977).

Para evitar diferencias y asegurar que la calidad de las dietas sea la misma, la jaiba y el calamar se compraron de un mismo lote y los mejillones se obtuvieron de una misma extracción durante una temporada de cultivo, estos ingredientes fueron mantenidos a -80°C. Los anfípodos caprélidos se obtuvieron de canastas para cultivo de moluscos bivalvos, de dónde fueron extraídos para posteriormente ser mantenidos a temperatura de -4°C.

Las dietas se prepararon, triturando y mezclando los ingredientes con una batidora manual (Oster®). Posteriormente se almacenaron a -80°C en un ultracongelador Revco ExF (Thermo Scientific®),

empacándolas en porciones semanales para mantener la calidad de las dietas, las cuales se suministraron a los pulpos en forma de pasta.

Además se realizaron pruebas de estabilidad y lixiviación, para asegurar que el alimento se mantenga disponible para los juveniles en un determinado tiempo. Para la prueba de estabilidad, se colocaron muestras del alimento en conchas de mejillón, dentro de los refugios de pulpo y fueron colocadas en el sistema de cultivo con aireación durante 24 horas (Gómez-Fierro, 2017).

Para la prueba de lixiviación se utilizó la metodología de Obaldo *et al.* (2002) y Martínez *et al.* (2014), la cual consistió en colocar muestras de 2 gramos de pasta en conchas de mejillón, dentro de un vaso de precipitado con volumen de 250 ml con agua de mar del sistema de cultivo, en agitación horizontal a 100 rpm durante 16 horas en un agitador horizontal MaxQ4450 (Thermo Scientific®). Posteriormente, las muestras de agua fueron filtradas al vacío a través de filtros de papel Whatman No. 3, para ser colocadas al igual que la pasta remanente en las conchas de mejillón, en una estufa OvernSeries 9000 (Thermolyne®) a 60°C durante 48 horas, hasta obtener el peso seco constante. A continuación, los filtros y las muestras con pastas se enfriaron en un desecador para posteriormente ser pesadas en una balanza analítica ER-182A (AND®).

2.4 Extracción y análisis de ácidos grasos de las dietas

Las muestras de las dietas se liofilizaron por 24 horas, posteriormente fueron pesadas y colocadas en tubos de ensaye con rosca, para proceder con la extracción de ácidos grasos mediante la metodología propuesta por Folch *et al.* (1957), utilizando como solvente diclorometano:metanol en una relación 2:1 (Cequier-Sánchez *et al.*, 2008; López-Peraza *et al.*, 2018).

Posterior a la extracción de los lípidos, estos fueron saponificados con 100 µL de solución metanólica de KOH 0.3 N al 90%. El proceso de metilación de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante la adición del reactivo de esterificación de trifluoruro de boro al 14% en metanol.

Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad en una campana de extracción (Labconco). Posteriormente se agregó a cada tubo de ensaye 1 ml de hexano grado HPLC para extraer los ácidos grasos metil esterificados, a continuación las muestras fueron mezcladas en un agitador, para

retirar el sobrenadante tomando por completo la capa superficial. El sobrenadante de hexano se evaporó utilizando gas nitrógeno, después cada muestra se resuspendió en 100 µl de hexano y se trasladó a un vial de color ámbar con capacidad de 1.5 ml. Las muestras se evaporaron con nitrógeno gaseoso y fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis por cromatografía de gases.

Los ésteres de ácidos grasos fueron diluidos en hexano grado HPLC y las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890 A), el cual cuenta con una columna capilar (J&W DB-FFAP, 30 m de largo, 0.32 mm de diámetro y poro de 0.25 µm) y un detector de ionización por flama.

Para la identificación de los ácidos grasos se realizó una curva de calibración con la mezcla de 37 ácidos grasos metil esterificados (Supelco 47885-U) y se compararon los tiempos de retención de los picos de los ácidos grasos. Posteriormente los valores fueron interpolados en las curvas de calibración mediante el factor de corrección de cada uno de los ácidos, las concentraciones de ácidos grasos fueron expresadas en microgramo de ácido graso por miligramo de muestra.

2.5 Diseño experimental

En este trabajo se evaluó el desempeño biológico de juveniles de *O. bimaculoides*, alimentados con tres dietas. Para ello se utilizaron 9 tanques de 60 L, a los cuales se les asignó un tratamiento (dieta) mediante un diseño completamente aleatorizado, utilizando por tratamiento tres réplicas.

El sistema de cultivo utilizado en este trabajo, está compuesto por dos estantes con dos niveles y con 8 tanques de 60 L por estante. Es un sistema de recirculación, por el cual el agua sale por dos orificios de cada tanque para caer en un tanque de 100 litros de donde se dirige hacia el sistema de recirculación del Departamento de Acuicultura.

En cada tanque, se colocaron 12 refugios para juveniles, los cuales fueron elaborados con tubo de ABS de 4 pulgadas de diámetro, con 11 centímetros de longitud y dos orificios de 1.5 pulgadas de diámetro en lados opuestos de las paredes de los tubos. La base y los orificios estuvieron cubiertos con malla de 650 µm de luz, para permitir la circulación del agua y evitar que los juveniles de pulpo escapen (Gómez-Fierro, 2017). Cada tubo fue etiquetado para facilitar la identificación de los organismos, su manejo y alimentación de manera equitativa.

Durante el cultivo y mantenimiento de los juveniles, se registró todos los días, la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, los cuáles fueron medidos con un multiparámetro YSI Pro 2030; cada tercer día se registró el pH con un potenciómetro HANNA Checker y de manera semanal se evaluó la concentración de nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal total (NAT), con kits de reactivos API®.

2.6 Cultivo de juveniles

La fecundación, el desove de los huevos y la eclosión de los juveniles de pulpo, son procesos asincrónicos. Una vez realizado el desove, la incubación de los huevos fue dependiente de la temperatura del medio la cual fue de $19.34 \pm 1.17^{\circ}\text{C}$.

Los juveniles recién eclosionados, se pesaron y colocaron de manera individual y aleatoria dentro de cada refugio flotante, hasta tener 12 pulpos por tanque. En el experimento se utilizaron 108 juveniles recién eclosionados que provenían de dos puestas de huevos de diferentes hembras.

La temperatura del agua en el sistema de cultivo se mantuvo en promedio a $20.02 \pm 1.05^{\circ}\text{C}$ y corresponde a la temperatura ambiental del laboratorio, además se efectuó un recambio de agua en el sistema de cultivo de 360 ml/min para mantener un rango de temperatura similar al del medio natural con base en la preferencia térmica de la especie según Forsythe y Hanlon (1988). La salinidad se mantuvo en 35.2 ± 0.2 UPS y el oxígeno disuelto en 6.84 ± 0.26 mg/L.

Para el inicio del cultivo de cada organismo, se tomó en cuenta el día de su eclosión, con la finalidad de asegurar que cada juvenil en cada tratamiento, se alimentará en un mismo período de tiempo. El alimento se proporcionó diariamente en un porcentaje del 40% del peso de los pulpos y se modificó proporcionalmente al peso de los juveniles. Por otra parte, el alimento se suministró en un horario aproximado entre las 15:00 y 17:00 horas, debido a los hábitos de esta especie.

La alimentación se llevó a cabo con el método descrito por Gómez-Fierro (2017). Se colocó la pasta de alimento descongelada en conchas de mejillón con la ayuda de jeringas de 12.5 ml. La limpieza de los tanques se realizó por sifoneo de manera semanal para la extracción de materia orgánica y alimento remanente, también se limpiaron los refugios los cuales fueron lavados con agua dulce; durante este

proceso los organismos se colocaron en vasos de precipitado después de realizar las respectivas biometrías.

2.7 Desempeño biológico y supervivencia de los juveniles

Los juveniles fueron pesados el día de su eclosión y colocados en el refugio, el cual estaba etiquetado con un número para su identificación. Las biometrías se realizaron cada semana registrando el peso en una balanza analítica (AND ER18-2A), y la supervivencia se registró diariamente hasta el final del experimento. Los pulpos fueron extraídos con una red y colocados en un vaso de precipitado con agua del sistema de cultivo para su transporte al laboratorio analítico. Cada pulpo se colocó sobre papel secante para remover el excedente de agua presente en las ventosas y posteriormente el juvenil fue pesado en una balanza analítica para tener su peso, posteriormente cada juvenil se colocó en su respectivo refugio y tanque de cultivo.

Para la estimación de la tasa de crecimiento instantáneo (TCI) (Jover-Cerdá, 2000) y la tasa de crecimiento específico (TCE) (Soriano y Hernández, 2002), se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$TCI = (Ln Pf - Ln Pi) / N^{\circ} \text{ días}$$

Donde:

TCI = Tasa de crecimiento instantáneo

Pf = Peso final

Pi = Peso inicial

$N^{\circ} \text{ días}$ = Número de días

$$TCE = ((Ln Pf - Ln Pi) / (Tf - Ti)) \times 100$$

Dónde:

TCE = Tasa crecimiento específico

Ln Pf = Logaritmo natural del peso final

Ln Pi = Logaritmo natural del peso inicial

Tf = Tiempo final en días

Ti = Tiempo inicial en días

2.8 Aparición de ocelos

Dentro del desempeño biológico de los juveniles, se consideró la aparición de los ocelos para evaluar el estado de desarrollo de los organismos. Para detectar la presencia de ocelos se utilizó la metodología propuesta por Gómez-Fierro (2017), mediante la estimulación de los organismos a que cambiarán de color, colocando la mano sobre el vaso de precipitado al momento de su biometría semanal. Se registró la primera vez en que los ocelos fueron detectados, al observar las manchas circulares de color café presente en cada lado de la cabeza del organismo y cerca de los ojos.

La presencia de los ocelos se registró en porcentaje semanal en los pulpos, teniendo en cuenta a los organismos que ya habían presentado esta característica una semana antes. Esta metodología se llevó a cabo hasta que el 100% de los juveniles presentaron los ocelos.

2.9 Extracción y análisis de ácidos grasos en juveniles de pulpo

La composición de ácidos grasos se obtuvo de los juveniles recién eclosionados y en los alimentados con las diferentes dietas, los cuales fueron seleccionados de manera aleatoria. A los 25 días de cultivo se recolectaron 6 juveniles de cada tratamiento debido a que la mortalidad de los organismos de la D3 (J+A) supero el 69%, dicho muestreo se realizó para evitar la pérdida de información. Para las muestras de organismos recién eclosionados fueron tomados 6 juveniles de cada puesta (n=12). Los pulpos fueron sacrificados en frío (-80°C) y colocados en viales de 2.5 ml de peso conocido.

Para el análisis de los ácidos grasos en los juveniles se siguió la metodología descrita anteriormente para las dietas. Dicho proceso fue llevado a cabo mediante cromatografía de gases en un equipo Agilent Technologies 7890A en el laboratorio de Bioquímica del Departamento de Acuicultura de CICESE.

Anterior a su inyección a la columna del cromatógrafo, las muestras fueron resuspendidas en Hexano grado HPLC. El volumen de muestra inyectada a la columna (Agilent J&W DB-FFAP, 30 m de largo, 0.32 mm de diámetro y poro de 0.25 μm) fue de 1 μl .

2.10 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas y gráficos se realizaron con el programa *Statistica* versión 10.

Se verificó la normalidad de los datos de crecimiento en peso de los organismos, así como de los ácidos grasos de las dietas y los pulpos, con la prueba de Shapiro-Wilk. La prueba de Levene se utilizó para comprobar la homogeneidad de varianzas.

Se realizaron pruebas de Wilcoxon, para determinar las diferencias en peso entre cada biometría y tratamiento. Al cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, los datos del crecimiento de los juveniles se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$), y Kruskal-Wallis al no cumplirse los supuestos, para conocer las diferencias entre los tratamientos.

La evaluación del contenido de cada uno de los ácidos grasos presentes en las dietas, se realizó mediante pruebas de ANOVA de una vía, y en los casos que no cumplieron con los supuestos se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$).

El contenido de ácidos grasos en los pulpos a los 25 días, se realizó con la prueba de Kruska-Wallis, para los datos de los ácidos EPA, DHA y la relación entre ellos. Los datos del ácido graso ARA y la relación EPA/ARA fueron evaluados mediante ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$), al igual que los datos del contenido de ácidos grasos en los pulpos cultivados hasta los 45 días. Posteriormente se realizaron pruebas post-hoc de Tukey y comparaciones múltiples de los rangos de las medias para las diferencias entre tratamientos del peso y de los ácidos grasos en los juveniles de pulpo.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Estabilidad y lixiviación en dietas

La inclusión del 4% de grenetina en las dietas, favoreció una estabilidad mínima de 24 horas en las dietas, lo que aseguró que los organismos tuvieran el alimento a disposición y pudieran alimentarse de un día a otro. Por otra parte, los resultados de las pruebas de lixiviación, indicaron que la Dieta 1 (J+M) tuvo un 16.01% de lixiviación, mientras que las Dietas 2 (J+C) y 3 (J+A), obtuvieron un porcentaje de lixiviación de un 15.34 y 18%, respectivamente.

3.2 Ácidos grasos en las dietas

Los resultados del análisis de ácidos grasos en las dietas elaboradas, muestran que la Dieta 2 (J+C) contenía una mayor concentración de ácidos grasos totales $10.73 \pm 1.25 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, de los cuales $5.02 \pm 0.96 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ fueron ácidos grasos poliinsaturados, donde se destacan las concentraciones de ácidos grasos altamente insaturados como el DHA (C22:6n3) con $2.60 \pm 0.88 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, el EPA (C20:5n3) con $1.56 \pm 0.11 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $0.64 \pm 0.88 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ el ARA (C20:4n6) (Tabla 2). Las diferencias significativas se encontraron entre las concentraciones de ARA y DHA de las Dietas 1 y 2 ($p = 0.02$ y $p = 0.02$).

La relación DHA:EPA en la dieta 2 (J+C) fue de 1.7, mientras que en las dietas 1 (J+M) y 3 (J+A) fue 1.1 y 0.9 respectivamente. Por otra parte la relación EPA:ARA fue de 2.7 en la dieta 3, 2.5 en la dieta 2 y en la dieta 1 fue de 3.2. En el caso de las relaciones entre ácidos grasos altamente insaturados, se encontraron diferencias significativas en la relación de DHA:EPA entre las Dietas 2 y 3 ($p = 0.03$) (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) en las dietas. Las letras indican diferencias significativas con ($p < 0.05$) con ANOVA paramétrico (*) o Kruskal-Wallis. ND = No detectado. Dietas 1 (J+M), 2 (J+C) y 3 (J+A): J = jaiba; M = mejillón; C = calamar; A = anfípodos).

Ácido graso	Dieta 1 (J+M)	Dieta 2 (J+C)	Dieta 3 (J+A)
C12:0	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00
C13:0	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.12	0.00 ± 0.00
C14:0	0.05 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.01 ^{ab}	0.18 ± 0.02 ^b
C14:1	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.00
C15:0	0.04 ± 0.00	0.09 ± 0.07	0.07 ± 0.01
C15:1*	0.01 ± 0.00	ND	0.02 ± 0.01
C16:0	0.79 ± 0.06 ^a	1.72 ± 0.35 ^b	1.19 ± 0.14 ^{ab}
C16:1	0.28 ± 0.02	0.36 ± 0.15	0.51 ± 0.06
C17:0	0.07 ± 0.00	0.18 ± 0.12	0.10 ± 0.01
C17:1	0.12 ± 0.03	0.24 ± 0.21	0.15 ± 0.03
C18:0*	0.37 ± 0.02 ^a	0.78 ± 0.22 ^b	0.51 ± 0.16 ^{ab}
C18:1n9	0.66 ± 0.02	1.08 ± 0.42	1.19 ± 0.20
C18:2n6c*	ND	0.16 ± 0.06	0.11 ± 0.08
C18:2n6t	0.14 ± 0.01 ^a	ND	ND
C18:3n6*	0.01 ± 0.00 ^a	ND	0.02 ± 0.00 ^b
C18:3n3	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.01
C20:0	0.09 ± 0.01	0.02 ± 0.03	0.12 ± 0.05
C20:1n9*	ND	0.32 ± 0.17	0.05 ± 0.01
C20:2*	0.06 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.04 ^a	0.10 ± 0.01 ^b
C20:3n6	0.05 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00
C21:0	0.01 ± 0.00 ^a	ND	0.02 ± 0.00 ^b
C20:4n6*	0.45 ± 0.01 ^a	0.64 ± 0.08 ^b	0.57 ± 0.05 ^{ab}
C20:3n3*	0.00 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.00 ^b
C20:5n3	0.88 ± 0.03	1.56 ± 0.11	1.56 ± 0.15
C22:0	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.12	ND
C22:1n9*	0.02 ± 0.01	ND	0.03 ± 0.01
C22:2	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.02	ND
C23:0	0.06 ± 0.00	0.36 ± 0.48	0.06 ± 0.01
C24:0	0.09 ± 0.00	0.13 ± 0.04	0.15 ± 0.01
C22:6n3	0.95 ± 0.03 ^a	2.60 ± 0.88 ^b	1.46 ± 0.13 ^{ab}
PUFA's	3.82 ± 0.62	5.02 ± 0.96	2.53 ± 0.37
C24:1*	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.02
Total	5.34 ± 0.22	10.65 ± 1.25	8.36 ± 0.82
DHA:EPA	1.1 ^a	1.7 ^{ab}	0.9 ^{ac}
EPA:ARA	3.2	2.5	2.7

3.3 Ácidos grasos en pulpos

El ácido linoleico (AL, C18:2n6c), como precursor de los ácidos grasos poliinsaturados, tuvo la mayor concentración en los juveniles alimentados con la Dieta 2 (J+C) con $8.89 \pm 0.44 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ a los 25 días de cultivo, siendo diferente significativamente al encontrado en los juveniles alimentados con la Dieta 3 (J+A) la cual fue de $2.61 \pm 0.51 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. ($p = 0.001$). En los juveniles alimentados con la Dieta 1 (J+M), la concentración fue de $7.6 \pm 0.83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Con respecto al contenido del ARA en *O. bimaculoides*, a los 25 días de cultivo, no se presentaron diferencias significativas entre los juveniles alimentados con las tres dietas ($p > 0.16$). Este ácido graso se encontró en concentraciones entre 23.97 ± 1.88 y $26.61 \pm 2.66 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Al realizar la comparación de la concentración de este ácido graso entre los juveniles cultivados y los recién eclosionados (JRE), no se presentaron diferencias en los tratamientos con la Dieta 2 y Dieta 3. Las diferencias significativas ($p = 0.03$) se obtuvieron entre los JRE y los pulpos alimentados con la Dieta 1 (Tabla 3).

En cuanto a la concentración del EPA, los JRE presentaron una concentración de $64.91 \pm 16.26 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, obteniendo diferencias significativas con los juveniles alimentados con la Dieta 1 ($p < 0.001$) con $120.66 \pm 10.54 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, y la Dieta 3 ($p = 0.03$) con $111.46 \pm 19.83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, a los 25 días de cultivo. La menor concentración de este ácido graso se presentó en los juveniles alimentados con la Dieta 2 con $111.25 \pm 4.69 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Tabla 3).

En relación al DHA, las diferencias significativas se encontraron entre los JRE y los organismos que fueron alimentados con las Dietas 1 y 2 (Dieta 1, $p = 0.03$ y Dieta 2, $p < 0.001$), debido a que los organismos de estos tratamientos, tuvieron concentraciones de 130.85 ± 9.77 y $148.13 \pm 7.1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivamente, en comparación con los $62.22 \pm 16.71 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ presentes en los JRE. En los organismos alimentados con la Dieta 3, la concentración promedio de este ácido graso fue de $122.27 \pm 19.2 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Tabla 3).

La relación DHA:EPA no presentó diferencias significativas ($p > 0.17$) en los pulpos alimentados con las diferentes dietas. En los JRE, esta relación solamente fue diferente significativamente con la dieta 2 que contenía jaiba y calamar ($p < 0.001$). Por otro lado, la relación EPA:ARA no presentó diferencias entre organismos alimentados con las diferentes dietas ($p \geq 0.96$), los valores fueron de 4.5 y 4.6. En los JRE, la

relación fue diferente significativamente ($p = 0.001$) con respecto a los pulpos alimentados con las tres dietas (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) en los juveniles recién eclosionados y en los alimentados con las dietas hasta los 25 días de cultivo. Las letras indican diferencias significativas con ($p < 0.05$) con ANOVA paramétrico (*) o Kruskal-Wallis. ND = No detectado. Dietas 1 (J+M), 2 (J+C) y 3 (J+A): J = jaiba; M = mejillón; C = calamar; A = anfípodos.

25 días de cultivo					
Ácido graso	P	JRE	Dieta 1 (J+M)	Dieta 2 (J+C)	Dieta 3 (J+A)
ARA *	0.026	15.08 ± 9.58 ^a	26.61 ± 2.66 ^b	23.97 ± 1.88 ^{ab}	24.49 ± 4.98 ^{ab}
EPA	< 0.001	64.91 ± 16.26 ^a	120.66 ± 10.54 ^b	111.25 ± 4.69 ^{ab}	111.46 ± 19.83 ^b
DHA	< 0.001	62.22 ± 16.71 ^a	130.85 ± 9.77 ^b	148.13 ± 7.1 ^b	122.27 ± 19.2 ^{ab}
DHA/EPA	< 0.001	1.0 ^a	1.1 ^{ab}	1.3 ^b	1.1 ^{ab}
EPA/ARA *	0.001	4.3 ^a	4.5 ^b	4.6 ^b	4.6 ^b

En los juveniles sobrevivientes que fueron alimentados con las dietas J+M y J+C hasta los 45 días de cultivo, la concentración del ácido linoleico en los pulpos de la Dieta 2 (J+C) fue de $7.97 \pm 0.78 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y de $5.18 \pm 0.16 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ en los juveniles alimentados con la dieta de jaiba y mejillón, con diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.00$).

En estos juveniles, no se encontraron diferencias significativas en la concentración del ARA entre los días de cultivo ($p = 0.10$) (Tabla 3 y 4). Los organismos alimentados con la Dieta 1 (J+M) disminuyeron su concentración de 26.61 ± 2.66 a $23.13 \pm 3.46 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, mientras que los alimentados con la Dieta 2 (J+C) pasaron de 23.97 ± 1.88 a $23.08 \pm 1.96 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Dichas concentraciones fueron mayores a la de organismos recién eclosionados ($15.08 \pm 9.58 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos al día 45 de cultivo y los pulpos recién eclosionados ($p = 0.10$) (Tabla 4).

Con respecto al EPA, también disminuyó las concentraciones al día 45 en los organismos alimentados con las dietas 1 y 2, con respecto al obtenido en los pulpos al día 25 de cultivo, siendo diferentes significativamente ($p = 0.006$ y 0.025) entre los días de cultivo. Los juveniles alimentados con la Dieta 1 (J+M) presentaron una disminución de 120.66 ± 10.54 a $90.02 \pm 16.16 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, y los alimentados con la Dieta 2 (J+C) de 111.25 ± 4.69 a $100.11 \pm 8.89 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Ambas concentraciones fueron mayores a la de pulpos recién eclosionados ($64.91 \pm 16.26 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), con diferencias significativas entre los tratamientos y los recién eclosionados ($p < 0.001$).

El contenido de ácido docosahexaenoico (DHA) disminuyó en un 20.25 y 5.52%, siendo diferente estadísticamente ($p = 0.01$) en los pulpos alimentados con Dietas 1 y 2 entre el día 25 y 45 de cultivo. La concentración de $104.36 \pm 16.28 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ se encontró en los pulpos de la Dieta 1 (J+M) y en los alimentados con la dieta a base de jaiba y calamar (D2) fue de $139.95 \pm 12.31 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. La concentración de DHA fue diferente significativamente entre los tratamientos ($p = 0.01$) y también con la concentración presente en los juveniles recién eclosionados ($62.22 \pm 16.71 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) ($p < 0.001$).

La disminución en la concentración de los ácidos DHA y EPA en los pulpos a los 45 días de cultivo, dio como resultado un aumento en la relación DHA:EPA. Los juveniles alimentados con la Dieta 1 (J+M) obtuvieron una relación de 1.2 y los alimentados con la Dieta 2 (J+C) fue de 1.4, en comparación con las relaciones 1.1 y 1.2 obtenidas con ambas dietas a los 25 días de cultivo. Las relaciones obtenidas al día 45 de cultivo fueron diferentes significativamente ($p < 0.001$) con la relación (1.0) de los juveniles recién eclosionados (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) en los juveniles recién eclosionados y en los alimentados con las dietas hasta los 45 días de cultivo. Las letras indican diferencias significativas con ($p < 0.05$) con ANOVA paramétrico. Dietas 1 (J+M) y 2 (J+C): J = jaiba; M = mejillón; C = calamar.

45 días de cultivo				
Ácido graso	P	JRE	Dieta 1 (J+M)	Dieta 2 (J+C)
ARA	0.287	15.08 ± 9.58	23.13 ± 3.46	23.08 ± 1.96
EPA	< 0.001	64.91 ± 16.26^a	90.02 ± 16.16^b	100.11 ± 8.89^b
DHA	< 0.001	62.22 ± 16.71^a	104.36 ± 16.28^b	139.95 ± 12.31^c
DHA/EPA	< 0.001	1.0^a	1.2^b	1.4^c
EPA/ARA	0.049	4.3^a	3.9^{ab}	4.3^b

3.4 Crecimiento en peso de los juveniles de *O. bimaculoides*

La primera parte de los resultados aborda el comportamiento del peso de los juveniles entre los días de cultivo, primero de cada tratamiento y posteriormente la comparación entre los tres tratamientos.

Para el análisis de datos se fijaron dos fechas de muestreo, la primera a los 25 días de cultivo donde se tomaron 6 juveniles del tratamiento 1 (J+M) y 2 (J+C), y 11 juveniles del tratamiento 3 (J+A), esto debido a que los pulpos alimentados con la dieta a base de jaiba y anfípodos mostraron una marcada pérdida de peso (47.53% con respecto al peso inicial al día 25) en comparación con los otros dos tratamientos. Este primer muestreo se realizó con la finalidad de evitar la pérdida total de los datos de este tratamiento. Por otra parte, el último muestreo se realizó al día 45, en el cual se muestrearon los cuatro organismos sobrevivientes del tratamiento 1 y nueve pulpos del tratamiento 2.

Los pulpos alimentados con la Dieta 1 no presentaron crecimiento durante los primeros 21 días de cultivo. Al día 7 de cultivo los organismos de este tratamiento presentaron un decremento en peso de 14.38% (-8.41 ± 6.65 mg) con relación al peso inicial promedio (58.48 ± 6.52 mg). La pérdida de peso al día 14 con respecto a la biometría anterior fue de 3.6% (-1.8 ± 6.10 mg) (Figura 5). Para la biometría al día 21, no se presentó un decremento ni ganancia en peso, debido a que el peso promedio se mantuvo en 48.27 mg respectivamente (Tabla 5).

Al día 28 se presentó una ganancia en peso de 22.4% (10.81 ± 4.91 mg) con relación al peso anterior; posteriormente al día 35 hubo un aumento del 1.8% (1.08 ± 4.66 mg) (Figura 5). Sin embargo, al día 42 de cultivo los pulpos presentaron un decremento de 15.33% (-9.22 ± 4.56 mg) con respecto al peso registrado en la biometría anterior. El peso final de los organismos al día 45 fue de 47.75 ± 10.95 mg (Tabla 6), lo cual mostró un decremento de 6.59% (-3.38 ± 2.04 mg) entre la biometría del día 42 y el muestreo final al día 45. Dentro de este tratamiento se encontraron diferencias significativas entre el peso de los organismos al día 0 y al día 7 de cultivo ($p < 0.001$), así como entre el peso promedio del día 35 y 42 de cultivo ($p = 0.043$). El decremento en peso diario fue de -0.49 mg•d⁻¹ durante los primeros 21 días de cultivo. Así mismo estos organismos obtuvieron una tasa de crecimiento instantáneo (TCI) negativa de -0.02 ± 0.01 mg•d⁻¹ y una tasa de crecimiento específico (TCE) de -1.86 ± 1.39 mg•d⁻¹.

Los juveniles alimentados con la Dieta 2 presentaron al día 7 de cultivo un decremento en peso de 2.22% (-1.3 ± 6.26 mg) de su peso inicial (58.36 ± 5.56 mg). Sin embargo, a partir del día 14 presentaron una

ganancia en peso de 15.05% (8.59 ± 6.85 mg) con respecto al peso de la biometría anterior, posteriormente el incremento fue de 10.87% (7.14 ± 7.39 mg) al día 21 (Figura 5).

Los organismos sobrevivientes al día 28 presentaron una ganancia en peso de 15.55% (11.32 ± 8.74 mg). A los 35 días de cultivo los organismos pesaron 96.14 ± 23.07 mg (Tabla 6), lo cual significó un incremento de 14.3% (12.03 ± 7.94 mg); posteriormente los juveniles alcanzaron un peso de 107.61 ± 28.48 mg, aumentando su peso en un 11.93% (11.47 ± 9.09 mg). El peso de los organismos sobrevivientes al día 45 de cultivo fue de 108.08 ± 29.33 mg, lo cual representó un aumento del 85.19% con respecto a su peso inicial. Las diferencias significativas ($p = 0.009$) se presentaron entre los pesos promedio desde el día 14 al día 35 de cultivo (Figura 6). El aumento de peso promedio diario fue de $1.34 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ desde el día 7 hasta el día 45 de cultivo, y las respectivas tasas de crecimiento instantáneo y específico fueron de $0.01 \pm 0.01 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ y $0.90 \pm 0.93 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ respectivamente.

En relación a los juveniles alimentados con la Dieta 3, el decremento en peso se presentó durante los 25 días de cultivo, al día 7 la disminución fue de 19.46% (-11.27 ± 3.42 mg) en relación a su peso inicial (57.90 ± 5.89 mg) (Tabla 6). Al día 14 la pérdida de peso fue de 11.52% (-5.37 ± 3.29 mg), la tendencia continuo al día 21 de cultivo, en el cual se obtuvo un 15.89% de decremento en peso con relación al peso anterior (-6.56 ± 2.72 mg) (Figura 5). El peso final de los organismos sobrevivientes al día 25 fue de 30.38 ± 3.75 mg, lo cual representó un decremento total de 47.57% en comparación con el peso promedio inicial, durante el período de cultivo.

Dentro de este tratamiento se presentaron diferencias significativas entre las mediciones de peso desde el día 0 al día 21 de cultivo ($p < 0.001$). Por otra parte el decremento promedio de peso diario fue de $-1.10 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ desde el día 0 hasta el día 25 de cultivo, lo cual a su vez produjo tasas de crecimiento instantáneo y específico negativas ($-0.03 \pm 0.01 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ y $-2.86 \pm 0.67 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$).

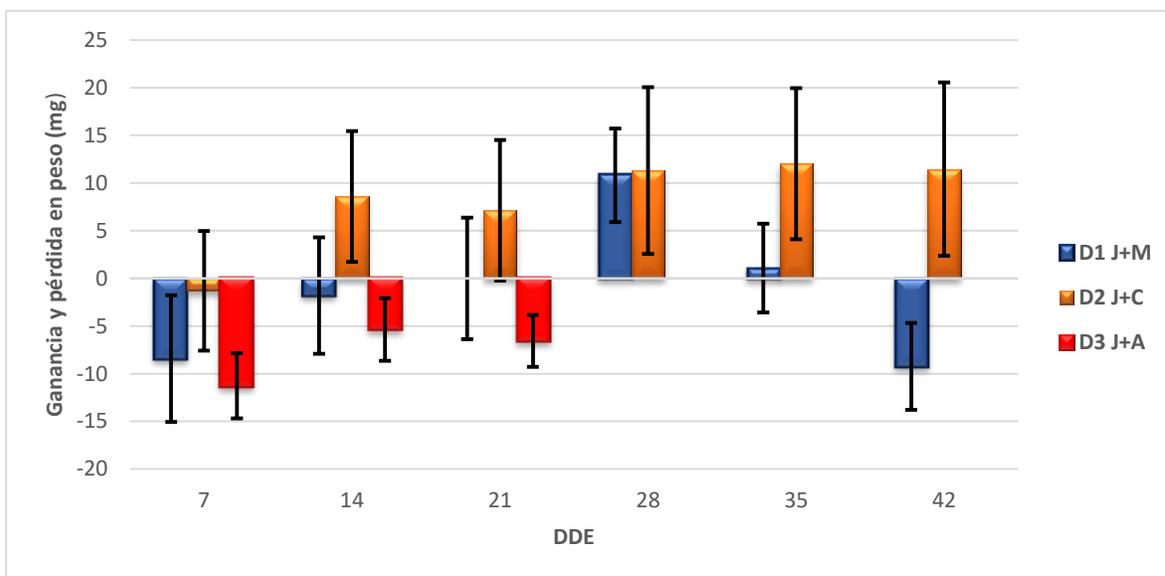


Figura 5. Ganancia y pérdida en peso de los juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con las tres dietas a partir del día 0 (n=108) hasta los 42 días de cultivo (n=26). D1 J+M (jaiba + mejillón), D2 J+C (jaiba + calamar) y D3 J+A (jaiba + anfípodos). DDE (días después de la eclosión). Las barras indican la desviación estándar.

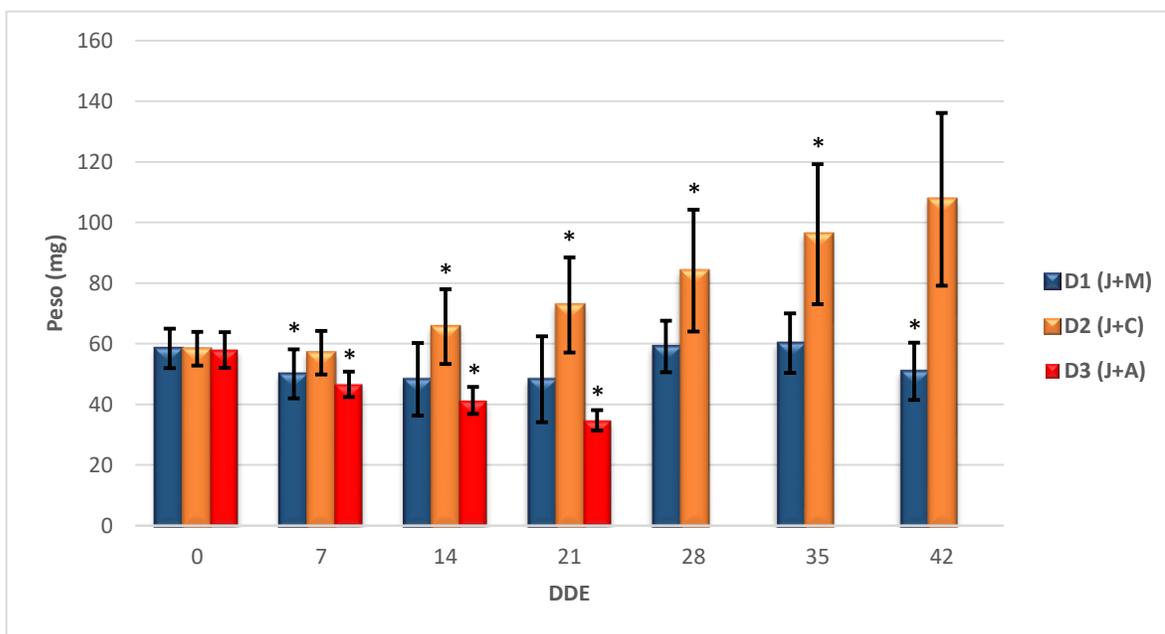


Figura 6. Crecimiento en peso (mg) de los juveniles de *O. bimaculoides* a partir del día 0 de cultivo (día de eclosión) hasta los 42 días de cultivo, alimentados con las tres dietas. (Wilcoxon; $\alpha = 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas con la biometría anterior. D1 J+M (jaiba + mejillón), D2 J+C (jaiba + calamar) y D3 J+A (jaiba + anfípodos). DDE (días después de la eclosión). La barra indica la desviación estándar.

Dentro de los tratamientos, al día 7 de cultivo los organismos alimentados con la Dieta 2 tuvieron un mayor peso (57.06 ± 07.20 mg) siendo estadísticamente diferente ($p < 0.001$) a lo obtenido en los pulpos de las Dietas 1 y 3 (Tabla 5). Dicha tendencia continuo al día 14 de cultivo ($p < 0.001$) cuando los organismos de la Dieta 2 (J+C) alcanzaron un peso promedio de 65.65 ± 12.37 mg. Al día 21 de cultivo se obtuvieron

diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p < 0.001$), siendo los organismos de la Dieta 3 los de menor peso (34.70 ± 3.36 mg), y los organismos de la Dieta 2 (72.79 ± 15.70 mg) los de mayor peso. A partir del día 28 y hasta finalizar el cultivo se obtuvieron diferencias significativas en el peso de los organismos de la dieta 1 y 2 (Tabla 5). Durante el cultivo, los organismos que obtuvieron el mayor peso fueron los alimentados con la Dieta 2 (Figura 7).

Tabla 5. Peso promedio (mg) de juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con las tres dietas experimentales. Las letras indican diferencias significativas entre las dietas ($p < 0.05$) con ANOVA paramétrico (*) o Kruskal-Wallis. (J, jaiba; M, mejillón; C, calamar; A, anfípodos). DDE: días después de la eclosión, n: número de organismos.

DDE	p	n	Dieta 1 (J+M)	Dieta 2 (J+C)	Dieta 3 (J+A)
0*	0.914	108	58.48 ± 6.52	58.36 ± 5.56	57.90 ± 5.89
7	< 0.001	108	50.07 ± 8.06^a	57.06 ± 7.20^b	46.63 ± 4.20^a
14	< 0.001	108	48.27 ± 11.92^a	65.65 ± 12.37^b	41.26 ± 4.47^a
21	< 0.001	91	48.27 ± 14.17^a	72.79 ± 15.70^b	34.70 ± 3.36^c
28*	0.002	35	59.08 ± 8.52^a	84.11 ± 20.10^b	---
35*	0.003	28	60.16 ± 9.81^a	96.14 ± 23.07^b	---
42	0.001	26	50.94 ± 9.45^a	107.61 ± 28.48^b	---
45	0.002	25	47.75 ± 10.95^a	108.08 ± 29.33^b	---



Figura 7. Juvenil recién eclosionado (izquierda) con un peso inicial de 61 mg y juvenil alimentado con la Dieta 2 (J+C) cultivado durante 45 días con un peso final de 144.8 mg.

3.5 Presencia de ocelos en los juveniles de *O. bimaculoides*

La mayoría de los juveniles reaccionaron al estímulo, lo que permitió observar los ocelos, sin embargo, no se detectó el patrón característico de la especie, ni la coloración azul o verde iridiscente. No obstante, se logró observar una estructura de forma redonda con pigmentación café oscuro característica de los ocelos (Figura 8).

A los 7 días después de la eclosión, los ocelos se observaron en el 81.48% de los juveniles (n=88) de los 108 pulpos cultivados, de los cuales 31 organismos pertenecían a la Dieta 1 (J+M), 31 a la Dieta 2 (J+C) y 26 a la Dieta 3 (J+A). A los 14 días de cultivo, el porcentaje acumulado de los organismos que presentaron los ocelos fue del 95.37% (103 juveniles) y al día 21, los ocelos se observaron en el 97.22% de los juveniles. A los 28 días de cultivo no fue posible detectar los ocelos en el 2.78% de los organismos (n=3), debido a que se encontraban débiles, no reaccionaban al estímulo y posteriormente no lograron sobrevivir para la siguiente biometría; este porcentaje corresponde a dos juveniles de la Dieta 1 y un organismo de la Dieta 3.



Figura 8. Ocelos presentes en juvenil de *O. bimaculoides* (45 días después de la eclosión) alimentado con Dieta 2 (jaiba + calamar).

3.6 Supervivencia

Al día 25 de cultivo, los juveniles alimentados con la Dieta 1 presentaron una supervivencia del 58.33%, los pulpos que recibieron la Dieta 2 alcanzaron un 91.66% de supervivencia y los organismos que fueron alimentados con la Dieta 3, presentaron la menor supervivencia con un 30.55% (Tabla 6).

Los organismos alimentados con la Dieta 3 y algunos organismos de la Dieta 1, presentaban un tamaño corporal reducido, su coloración había cambiado a un tono cenizo, mostraban debilidad al nadar, dificultad para adherirse a superficies y enroscamiento de los brazos. Las características descritas anteriormente, constituyeron el criterio en la toma de decisión para realizar el primer muestreo a los 25 días de cultivo.

Posteriormente con los organismos restantes (n=41), se obtuvo una supervivencia de 28.57% hasta el día 45 de cultivo con los juveniles de la Dieta 1. En este mismo período, la supervivencia de los organismos de la Dieta 2 fue de 77.77%.

Tabla 6. Supervivencia (%) de los juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con las diferentes dietas.

Tratamiento	Supervivencia (%)	
	25 días de cultivo	45 días de cultivo
Dieta 1 (jaiba + mejillón)	58.33	28.57
Dieta 2 (jaiba + calamar)	91.66	77.77
Dieta 3 (jaiba + anfípodos)	30.55	-----

Capítulo 4. Discusión

Los pulpos por su tipo de alimentación pertenecen al grupo de los carnívoros por lo que tienen una alta demanda de proteína durante su ciclo de vida (Houlihan *et al.*, 1990; Giménez y García 2002; Iglesias *et al.*, 2004; Águila *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2007a; Cerezo-Valderve *et al.*, 2008; Uriarte *et al.*, 2011), y a su vez una alta demanda por ácidos grasos altamente insaturados durante el proceso reproductivo, y en sus estadios de vida de paralarva y juvenil (Navarro y Villanueva, 2000; Iglesias *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2010; Farías *et al.*, 2011). Sin embargo, la dependencia del uso de dietas naturales para la alimentación en cefalópodos ha impedido y atrasado el desarrollo de cultivos de estos organismos a escala comercial (Lee *et al.*, 1991; O'Dor y Wells, 1987; Uriarte *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014).

Especies como *O. maya* y *O. bimaculoides* aceptan alimentos naturales en condiciones de cautiverio, al alimentarse con trozos de cangrejo congelado o con moluscos bivalvos, sin embargo, estas prácticas propician que el cultivo de pulpo sea costoso y poco práctico (Rosas *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2014). Por otra parte en las etapas tempranas del ciclo de vida de los pulpos, el alimento más utilizado ha sido la *Artemia* enriquecida y sin enriquecer para paralarvas y juveniles de *O. vulgaris* y en juveniles de *O. maya* y *O. bimaculoides*, sin embargo, su uso produce crecimientos y supervivencias deficientes para las paralarvas (Iglesias *et al.*, 2014), ocasionado por sus perfiles proteicos y lípidos inadecuados (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Villanueva *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2010; Viciano *et al.*, 2011).

Diversas investigaciones sobre el tipo de dietas suministradas a los pulpos, en las primeras etapas de su ciclo de vida, enfatizan que, para lograr un óptimo desarrollo de los organismos, es de suma importancia encontrar un alimento que pueda cubrir los requerimientos nutricionales, sobre todo en el contenido proteico y de ácidos grasos. Además, destacan que es importante desarrollar alimentos o dietas que sean de fácil manejo, con palatabilidad adecuada para los pulpos, un aglutinante que evite pérdidas de nutrientes y proporcione estabilidad al alimento (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Villanueva *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2007b; Rosas *et al.*, 2008; Solorzano *et al.*, 2009; Quintana *et al.*, 2008, 2011; García *et al.*, 2011; Viciano *et al.*, 2011; Gómez-Fierro, 2017).

En la búsqueda de alimentos que cumplan con estas características, el desarrollo del uso de alimento en forma de pasta ha sido una práctica utilizada para especies como *O. maya* y *O. bimaculoides*. Por otra parte, el uso de aglutinantes como gelatina ha demostrado crecimientos positivos y supervivencia mayores al 80%, como valores de concentración de lípidos y glucógeno (23.6 ± 8.0 y 0.19 ± 0.05 respectivamente)

similares en juveniles de *O. maya* alimentados con pastas elaboradas con gelatina o cuando son alimentados con cangrejo congelado (Rosas *et al.* 2008).

Las dietas utilizadas en el presente trabajo (D1: J+M, D2: J+C y D3: J+A), tuvieron una estabilidad de 24 horas en el agua, similar a la reportada por Gómez-Fierro (2017) en dietas elaboradas con diferente proporción de carne de músculo de jaiba y gónada de mejillón. La lixiviación a su vez fue mayor en la Dieta 3 (J+A) con un 18%, y en 15.34% en la Dieta 1 (J+M) y 16.01% en Dieta 2 (J+C). En otros estudios donde se han probado dietas a base de pasta en pulpos, no se reportan los porcentajes de alimento y nutrientes lixiviados que permitan comparar los resultados obtenidos en la presente investigación.

Los juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con la dieta 1 (J+M) y dieta 2 (J+C), consumieron la pasta de alimento desde los primeros días de cultivo, específicamente en los pulpos alimentados con la dieta 2 se observó que al momento de colocar el alimento se desplazaban rápidamente a alimentarse, lo cual podría ser un indicador de aceptación de la pasta. Estos resultados concuerdan con lo reportado en juveniles de *O. maya* (Domingues *et al.*, 2007a) y *O. bimaculoides* (Gómez-Fierro, 2017) en relación al estímulo percibido por los organismos para consumir dietas en pasta.

En el presente estudio, la pasta fue suministrada en un 40% del peso corporal de los juveniles cada 24 horas. Se ha reportado que tasas de alimentación del 30% producen crecimientos óptimos para los juveniles de *O. maya*, proporcionando el alimento dos veces al día (15% por ración) (Quintana *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014), al igual que si se utilizaran tasas de alimentación entre 30 y 50% para juveniles de *O. bimaculoides* (Gómez-Fierro, 2017).

Los juveniles alimentados con la dieta 1 (J+M), la cual contenía una mayor proporción de jaiba (80%), disminuyeron en peso desde el día 0 hasta el día 21 de cultivo, probablemente el bajo rendimiento en el desarrollo de estos organismos se deba al efecto de un bajo aporte de los ácidos grasos altamente insaturados por parte de la dieta (relación DHA:EPA de 1.1), así como a un desbalance de nutrientes, aunado a una baja proporción de proteínas. Para explicar los posibles efectos de las dietas a base de pasta sobre el desempeño de los juveniles de pulpo, se podrían incluir análisis de macro y micro nutrientes, así como de actividad enzimática, con el objetivo de integrar más información para comprender el comportamiento en crecimiento de *O. bimaculoides*.

Gómez-Fierro (2017), obtuvo un buen crecimiento en los juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con una dieta de las mismas proporciones que las utilizadas en este trabajo (80% jaiba + 16% mejillón) a partir del día 14 de cultivo, con una ganancia del 42.46% con respecto al peso inicial al día 28. En dicho estudio los juveniles alimentados con esta dieta alcanzaron un peso promedio final de 116.19 mg y una tasa de crecimiento de $0.86 \pm 0.09 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$.

Las diferencias entre los resultados del presente estudio y lo reportado por Gómez-Fierro (2017), probablemente pueda deberse a alguno de los siguientes factores: la diferencia en tiempo y lugar de pesca de las jaibas, la alimentación previa de estos organismos lo cual afecta directamente la composición de sus nutrientes, el estado de los mejillones en cuanto a la calidad de su gónada, su lugar de cultivo y mantenimiento en fresco una vez extraídos del mar, lo cual pudo ocasionar cambios en su composición proteica y lipídica.

Los pulpos alimentados con la dieta 2 (J+C), al finalizar el cultivo alcanzaron 85% de ganancia en peso, por lo que, resultó ser la dieta más eficiente propiciando un porcentaje de crecimiento diario de $1.32 \pm 1.25\% \cdot \text{día}^{-1}$. Este porcentaje es menor a lo reportado por Martínez *et al.* (2014) y Gallardo *et al.* (2020), quienes utilizaron esta dieta para juveniles de *O. maya* y obtuvieron porcentajes de crecimiento diario de $3.04\% \cdot \text{día}^{-1}$ y $3.4\% \cdot \text{día}^{-1}$ respectivamente. Martínez *et al.* (2014) sugieren que al combinar la carne de jaiba y de calamar, se produce en la dieta una sinergia entre sus componentes, los cuales proveen los elementos necesarios para producir un mayor crecimiento en pulpos, en comparación con otras dietas. Al igual que con la dieta a base de jaiba y mejillón, deben considerarse las diferencias entre la jaiba y calamar utilizados en la elaboración de la dieta (jaiba + calamar) en este trabajo y en lo reportado por Martínez *et al.* (2014), tomando en cuenta las diferentes características nutricionales que puedan aportar dichos productos, aunado también a las condiciones de temperaturas a las que se expusieron durante su pesca, procesado y almacenamiento.

Martínez *et al.* (2014), reportaron que después de 46 pruebas con alimentos proporcionados a juveniles, pre-adultos y adultos de *O. maya*, la proteína cruda que evaluaron proveniente de crustáceos marinos, produjo tasas de crecimiento mayores al $1.5\% \cdot \text{día}^{-1}$, en comparación con las tasas de crecimiento negativas obtenidas cuando la proteína provenía de almeja fresca, calamar, pescado y proteína cocida (Aguila *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2008, 2013). Resultados similares también han sido reportados para *O. vulgaris* (Prato *et al.*, 2010).

El porcentaje de crecimiento diario ($1.32 \pm 1.25\% \cdot \text{día}^{-1}$) en juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con jaiba y calamar (Dieta 2) en el presente estudio, es también menor al reportado por Quintana *et al.* (2011), dichos autores obtuvieron tasas de crecimiento de $3.1 \pm 1.1\% \cdot \text{día}^{-1}$ en juveniles de *O. maya* alimentados con pasta a base de cangrejo (*Callinectes* spp.) en una ración de 10% al día y un crecimiento de $3.8 \pm 1.3\% \cdot \text{día}^{-1}$ a una ración diaria de 30%. Solorzano *et al.* (2009), también documentaron mejores crecimientos en juveniles de *O. bimaculoides* (3.7 y $5.5 \text{ mg} \cdot \text{día}^{-1}$) cuando fueron alimentados con *Artemia* enriquecida con *Spirulina maxima*, con Alga-Mac-3050 y sin enriquecer.

La dieta a base de jaiba y calamar (Dieta 2) proporcionada a los juveniles de *O. bimaculoides*, promovió en algunos pulpos, un crecimiento con un peso final entre los 110.6 y 163.3 mg a los 45 días de cultivo; con base en estos resultados se sugiere continuar con las investigaciones incorporando otros componentes en la dieta, lo que podría apoyarse con estudios de actividad enzimática y digestibilidad, lo que complementaria la información relacionada con el comportamiento del crecimiento, así como poder establecer las directrices de las futuras investigaciones que ayuden a que en un futuro se pueda desarrollar su cultivo.

En relación a la dieta a base de jaiba y anfípodos (Dieta 3), no proporcionó los mejores resultados para el crecimiento de los pulpos, los cuales tuvieron una pérdida de peso desde la primera semana hasta los 25 días de cultivo, cuando se realizó el primer muestreo. En este período los pulpos tuvieron una tasa de decremento en peso de $-1.00 \pm 0.29 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, equivalente a $-2.09 \pm 0.41 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$. La pérdida de peso en los juveniles alimentados con esta dieta fue mayor a lo documentado para *O. maya* ($-0.43\% \cdot \text{d}^{-1}$) cuando se alimentó a juveniles de esta especie con una dieta que contenía 40% de proteína a base de harina y aceite de pescado, suero y vitaminas (Rosas *et al.*, 2011).

Se ha documentado que la pérdida de biomasa, reducción de tamaño del organismo y un limitado movimiento pueden deberse a un aporte bajo de proteína en la dieta para cefalópodos (O'Dor *et al.*, 1984). Dichas características se presentaron en los juveniles de *O. bimaculoides*, donde también se observó enroscamiento de brazos, cambio de coloración y dificultad para nadar y adherirse a superficies.

La característica adicional que se tomó en cuenta para establecer el desarrollo de los organismos fue la presencia de los ocelos, particularidad de esta especie, los cuales se distinguieron desde el día 7 de cultivo en el 81.48% del total de organismos y a los 21 días esta característica estaba presente en el 97.22% de los juveniles.

A los 28 días de cultivo esta característica no se pudo detectar en tres juveniles (2.78% de la población total), de los cuales dos organismos pertenecían al tratamiento con la dieta 1 (J+M) y un pulpo de la dieta 3 (J+A). Al igual que lo reportado por Gómez-Fierro (2017), estos juveniles no reaccionaron al estímulo y permanecían inmóviles, además de un notorio cambio en su coloración. Este autor también reportó la presencia de ocelos en el 90% de los organismos, a los 28 días de cultivo, por lo que sugirió el uso de descripciones histológicas que ayuden a detectar con exactitud el momento en el que los ocelos se presentan en los juveniles de *O. bimaculoides*. Este aspecto es importante debido a que indicaría el estado y el desarrollo de los juveniles en cultivo.

En relación a la supervivencia, los mayores porcentajes se presentaron en los juveniles alimentados con la dieta 2 (jaiba + calamar), a los 25 días de cultivo fue del 91.6% y de 77.7% al día 45. Estos porcentajes podrían estar relacionados al aporte de ácidos grasos altamente insaturados proporcionados por la dieta, la cual presentó mayores cantidades de DHA, EPA y ARA, además de una relación DHA:EPA de 1.7, la cual fue cercana al valor 1.5 recomendado para especies marinas por Okumura *et al.* (2005). Asimismo, el aporte lipídico pudo ser utilizado por los pulpos a corto plazo para canalizar las proteínas presentes en la carne de calamar y en la grenetina (Gómez-Fierro, 2017) para su uso como reserva energética y en el crecimiento (O'Dor *et al.*, 1984; Gómez-Fierro, 2017).

Martínez *et al.* (2014), obtuvieron con juveniles de *O. maya* a los 55 días de cultivo un 100% de supervivencia utilizando una dieta a base de jaiba y calamar. Por su parte, Gallardo *et al.* (2020) obtuvieron con esta dieta un 100% de supervivencia al día 60 y un 75% al día 90 de cultivo, los mismos porcentajes de supervivencia se presentaron en juveniles alimentados con una dieta a base de 60% calamar y 40% jaiba, sin embargo, a un mayor porcentaje de calamar en las dietas (80 y 90%), las supervivencias al día 60 de cultivo fueron de 80 y 85% y de 10 y 20% a los 90 días después de la eclosión. Las diferencias entre la supervivencia de juveniles de *O. maya* y *O. bimaculoides* alimentados con la dieta a base de jaiba y calamar, podrían relacionarse a cuestiones como la alimentación previa de los juveniles de *O. maya* con nauplios de *Artemia salina* sin enriquecer, la diferencia de pesos al eclosionar entre las especies (más de 90 mg promedio en *O. maya*), una ración alimenticia distinta, y la diferencia de temperaturas óptimas para cada especie, con temperaturas entre 24 y 27°C reportadas para *O. maya* y un $20.02 \pm 1.05^\circ\text{C}$ para *O. bimaculoides* en esta investigación, las cuales podrían interferir en los procesos metabólicos de los organismos.

En función de la temperatura y su efecto en el consumo de alimento, Leporati y colaboradores (2007) reportaron en juveniles de *O. pallidus*, que la ganancia en peso promedio de 0.2774 a 1.938 gramos, fue mayor en el tratamiento de 18 a 14°C (verano/otoño) con una tasa de crecimiento diaria de 1.73%. En esta misma especie, André *et al.* (2008), reportaron tasas de conversión alimenticia de -8.10 a 70.10% día⁻¹ con temperaturas cálidas (18-16°C), además de una tasa de crecimiento de 1.67% día⁻¹ con el régimen de temperatura fría. En el presente estudio con *O. bimaculoides*, se trató de mantener la temperatura con poca variación (20.02 ± 1.05°C) para evaluar solamente el efecto de la dieta sobre el crecimiento.

Los juveniles alimentados con la dieta que contenía jaiba y mejillón (Dieta 1), obtuvieron porcentajes de supervivencia de 58.3% y 28.5% a los 25 y 45 días de cultivo. Estos porcentajes probablemente sean reflejo de la composición de ácidos grasos de la dieta, la cual presentó una relación DHA:EPA de 1.1, similar a la obtenida por los juveniles alimentados con la dieta 3 (J+A), en donde la supervivencia fue de 30.5% a los 25 días de cultivo. El porcentaje de supervivencia obtenido con la dieta 1 (J+M), contrasta con lo reportado por Gómez-Fierro (2017), al reportar supervivencias de 97.9% y 96.6% a los 28 y 42 días después de la eclosión. La diferencia en los porcentajes de supervivencia entre el presente estudio y lo reportado por Gómez-Fierro (2017) podría deberse a la calidad y cantidad de ácidos grasos presentes en cada dieta, ya que la relación DHA:EPA fue de 1.46 para la dieta (jaiba + mejillón) utilizada por el autor, la cual fue mayor a la relación 1.1 obtenida en este estudio para la misma dieta.

En estudios con alimento vivo, Baeza-Rojano *et al.* (2012) obtuvieron una supervivencia de juveniles de *O. maya* alimentados con el anfípodo gammárido *Hyale media* de 92.2% a los 30 días de cultivo y de 41.2% en aquellos alimentados con el gammárido de agua dulce *Hyalella azteca*. En sus resultados destacan que los juveniles mantenidos con el anfípodo *H. azteca* presentaron grandes concentraciones de proteínas, acilglicérols y colesterol en la glándula digestiva y bajos niveles de glicógeno en el musculo, lo cual indicaba que la dieta suministrada no cubría adecuadamente los requerimientos nutricionales de los pulpos, por lo que obtuvieron un bajo crecimiento y una mayor mortalidad.

La diferencia en la supervivencia con la dieta 3 (J+A) utilizada en *O. bimaculoides*, con lo reportado por Baeza-Rojano *et al.* (2012) podría deberse a la composición en lípidos y proteínas entre anfípodos caprélidos y gammáridos, así como el suministrar un alimento vivo o un alimento elaborado en pasta. Por otra parte, las diferencias en cuanto a la supervivencia obtenida con la dieta 1 (J+M) y lo reportado por Gómez-Fierro en 2017, podría deberse, como se mencionó anteriormente a las diferencias en la composición bioquímica entre las jaibas y mejillones usados en la elaboración del alimento, su calidad, los

diferentes tiempos de pesca y cosecha de estos organismos y las temperaturas a los cuales estos productos pudieron ser expuestos. Por último, las diferencias entre la supervivencia de los juveniles que recibieron la dieta 2 (J+C) y lo reportado para *O. maya* (Martínez *et al.* 2014), pudieron ser ocasionadas por las características nutricionales entre ambos alimentos en pasta, la alimentación previa de los juveniles de *O. maya* con alimento vivo, así como al efecto de la dieta parental. Estas variables y factores como el tamaño de los pulpos al eclosionar y el aporte de ácidos grasos de las dietas, podrían explicar las diferencias en las supervivencias obtenidas en este trabajo en comparación con los estudios anteriormente mencionados.

Los juveniles de *O. bimaculoides* son organismos que requieren grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, como el DHA, debido a su importancia en la formación de las membranas lipídicas de las células que forman los tejidos como el neuronal (Navarro y Villanueva, 2000; Salem *et al.*, 2001; Seixas *et al.*, 2010; Tocher, 2010). De las tres dietas utilizadas en esta investigación, la dieta 2 (J+C) tuvo las mayores concentraciones en ácidos grasos como ARA, EPA y DHA. Dicha dieta resultó ser la más indicada para el desarrollo de estos organismos, debido a que los juveniles se mantuvieron en crecimiento alcanzando al día 45 de cultivo un aumento del 85.19% con respecto a su peso inicial.

Los juveniles de este tratamiento obtuvieron relaciones DHA:EPA, de 1.3 y 1.4 a los 25 y 45 días de cultivo respectivamente, siendo estos valores los más cercanos a la relación recomendada para especies marinas (Okumura *et al.*, 2005), lo cual podría resultar en beneficio para el crecimiento con una tasa constante de $1.34 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ y mayores tasas de supervivencia.

Gómez-Fierro (2017) reportó que el uso de los ácidos grasos es importante durante los primeros 28 días de cultivo, lo cual se puede confirmar con las concentraciones presentes en los juveniles a los 25 días de cultivo en este estudio, donde se obtuvieron las mayores concentraciones de ARA, EPA y DHA, en comparación con su concentración a los 45 días. Lo anterior podría indicar que después de los 25 días de cultivo, los juveniles pudieron sintetizar los lípidos de mejor manera (Gómez-Fierro, 2017), y a su vez disminuir los requerimientos de estos nutrientes conforme a su crecimiento (Lee *et al.*, 1995; Seixas *et al.*, 2010).

En relación a las concentraciones de ácidos grasos en los juveniles alimentados con las dietas de jaiba con mejillón (Dieta 1) y jaiba con anfípodos (Dieta 3) hasta los 25 días de cultivo, estos tuvieron una mayor concentración de ARA y EPA en comparación con los pulpos de la dieta 2 (jaiba+calamar), además las concentraciones de DHA no presentaron diferencias significativas con esta dieta. Sin embargo, la relación

DHA:EPA fue de 1.1 para ambas dietas, lo cual podría indicar un desbalance en la proporción entre estos dos ácidos grasos poliinsaturados.

En los organismos alimentados con la dieta 1 (J+M) hasta el final del cultivo, al igual que con la dieta 2 (J+C), se presentó una disminución en las concentraciones de ARA, EPA y DHA, además de un aumento en la relación DHA:EPA a 1.2 en esta dieta (J+M). Aun así, los resultados obtenidos en crecimiento y supervivencia con la dieta, podrían deberse a un desbalance de nutrientes y micronutrientes, principalmente en proteínas y en lípidos.

Los organismos alimentados con las tres dietas a los 25 y 45 días obtuvieron en ambos periodos concentraciones más altas de ARA, EPA y DHA que las dietas formuladas. En los juveniles recién eclosionados, las concentraciones de los ácidos grasos presentaron mayor similitud con los organismos alimentados con la dieta 3, sin embargo, esta dieta no benefició el crecimiento en los juveniles. Además la relación DHA:EPA de esta dieta y de la dieta 1 (J+M), las cuales fueron de 1.1, se acercaron a la relación presente en los organismos recién eclosionados (1.0).

Las concentraciones de ARA, EPA y DHA de los pulpos fueron más altas que las reportadas por Gómez-Fierro (2017) para la misma, quien encontró valores de ARA de $2.62 \pm 0.20 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, EPA de $14.77 \pm 1.28 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y DHA de $29.82 \pm 2.89 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, con una relación DHA:EPA de 2.01 ± 0.06 . En el presente estudio, la relación DHA:EPA fue de 1.0 y EPA:ARA de 4.3. Estas diferencias en los ácidos grasos poliinsaturados, podría interpretarse como un efecto de la dieta parental, lo cual según algunos autores, ocasiona cambios en el contenido de lípidos y en la composición de ácidos grasos en los organismos (Caamal-Monsreal *et al.*, 2015; Tercero *et al.*, 2015).

La temperatura de incubación pudo ser un factor relevante en las concentraciones de los ácidos grasos poliinsaturados de los pulpos. Las puestas de huevos utilizadas en este estudio fueron incubadas a temperaturas promedio de 19.4°C , con duración de 87 y 76 días respectivamente. Suárez-Salcido (2016) reportó el efecto de la temperatura de incubación en el perfil de ácidos grasos de los juveniles, obteniendo una mayor concentración de DHA en los incubados a 16°C , mayores concentraciones de EPA a 18°C y a 20°C los organismos tuvieron un mayor porcentaje de ARA.

Los resultados obtenidos en la composición de ácidos grasos de los pulpos, al igual que los reportados por Gómez-Fierro (2017), sugieren que posiblemente los juveniles de *O. bimaculoides* al igual que *O. vulgaris*,

puedan producir de novo ácidos grasos como ARA y EPA a partir de sustratos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) como el ácido eicosatetraenoico (20:4n-3) y el ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3n-6) (Monroig *et al.*, 2012b), debido a que en resultados anteriores los organismos presentan un mayor contenido de estos ácidos grasos en comparación con su contenido presente en el alimento que les fue suministrado. Es por ello que es importante continuar evaluando el efecto de diferentes dietas en forma de pasta en el desempeño biológico de los pulpos, con la finalidad de comprender el comportamiento y el uso de los ácidos grasos altamente insaturados.

Los resultados de este trabajo sugieren que el tipo y la calidad de los nutrientes presentes en las dietas, así como los efectos de las dietas parentales, pudieron influir en el desempeño y la supervivencia de los juveniles de *O. bimaculoides*.

Capítulo 5. Conclusiones

- El mayor crecimiento de *O. bimaculoides* se obtuvo con la dieta 2, a base de 48% jaiba y 48% calamar, debido a que se obtuvo una ganancia del 85% del peso inicial (58.36 mg) hasta los 45 días de cultivo y una supervivencia de 91.6% a los 25 días después de la eclosión y de 77.7 % a los 45 días de cultivo.
- El desarrollo de los ocelos el cual se utilizó como un indicador para evaluar el desarrollo de los organismos fue influenciado por la calidad de la dieta suministrada, observando esta característica en el 95.37% de los juveniles a los 14 días de cultivo. Los organismos que recibieron la dieta que contenía jaiba y calamar contribuyó con el porcentaje más alto (33.33%) del total de pulpos con ocelos.
- Los resultados de la composición de ácidos grasos, sugiere que los organismos recién eclosionados de *O. bimaculoides* requieren de una mayor cantidad y proporción de ácidos grasos durante los primeros días de cultivo, específicamente en los ácidos ARA, EPA y DHA.
- Las concentraciones de DHA y EPA, así como su relación en los diferentes tipos de dietas influyeron directamente en el crecimiento y supervivencia de los juveniles de *O. bimaculoides*.

Capítulo 6. Recomendaciones

- Continuar con el uso de estas dietas en futuras investigaciones, ya sea en la misma o diferente proporción, además de obtener su composición de proteínas, lípidos, perfil de ácidos grasos, carbohidratos, perfil de aminoácidos y energía, de las dietas, así como de los juveniles recién eclosionados y en cultivo, con la finalidad de encontrar dietas de mejor calidad que sean utilizables durante todo el cultivo o por períodos donde sus propiedades puedan beneficiar el desarrollo de los pulpos.
- Estandarizar nuevas técnicas para la detección de los ocelos en los juveniles, realizar análisis parciales entre biometrías para conocer con exactitud el momento de su aparición y además analizar mediante histología el desarrollo y aparición de esta característica.
- Realizar análisis del perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres, con la finalidad de comprender sus requerimientos nutricionales y con ello poder formular mejores alimentos que beneficien el desempeño biológico y supervivencia de los juveniles cultivados.
- Complementar la información sobre el uso de ácidos grasos en los juveniles de esta especie, con un análisis de organismos en período de inanición.
- Realizar estudios e investigaciones dónde se utilice alimento vivo como anfípodos para poder analizar sus efectos y beneficios en el desarrollo de los juveniles de pulpo. Además, promover cultivos experimentales donde una fase de alimentación sea con alimento formulado en pasta y otra fase con alimento vivo.
- Realizar pruebas moleculares en organismos recién eclosionados y cultivados, con la finalidad de entender con mayor precisión la función de las enzimas desaturasas y elongasas que participan en la síntesis de los ácidos grasos altamente insaturados.

Literatura citada

- Águila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T. y Rosas, C. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss y Solis) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 273:641-655.
- André, J., Pecl, G. T., Semmens, J. M. y Grist, E.P.M. 2008. Early life-history processes in bethic octopus: Relationships between temperature, feeding, food conversion, and growth in juvenile *Octopus pallidus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 354, 81-92.
- Arkhipkin, A.I., Rodhouse, P.G.K., Pierce, G.J., Sauer, W., Sakai, M., Allcock, L., Arguelles, J., Bower, J.R., Castillo, G., Ceriola, L., Chen, C.S., Chen, X., Díaz-Santana, M., Downey, N., González, A.F., Granados Amores, J., Green, C.P., Guerra, A., Hendrickson, L.C., Ibañez, C., Ito, K., Jereb, P., Kato, Y., Katugin, O.N., Kawano, M., Kidokoro, H., Kuli, V.V., Laptikhovsky, V.V., Lipinski, M.R., Liu, B., Mariátegui, L., Marin, W., Medina, A., Miki, K., Miyahara, K., Molstchaniwskyj, N., Moustahfid, H., Nabhtabhata, J., Nanjo, N., Nigmatullin, C.M., Ohtani, T., Pecl, G., Pérez, J.A.A., Piatkowski, U., Saikliang, P., Salinas-Zavala, C.A., Steer, M., Tian, Y., Ueta, Y., Vijai, D., Wakabayashi, T., Yamaguchi, T., Yamashiro, C., Yamashita, N. y Zeidberg, L.D. 2015. World Squid Fisheries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23, 92-252.
- Baeza-Rojano, E., Domingues, P., Guerra-García, J.M., Capella, S., Noreña-Barroso, E., Caamal-Mosreal, C. y Rosas, C. 2012. Marine gammarids (Crustacea: Amphipoda): a new live prey to culture *Octopus maya* hatchlings. *Aquaculture Research*, 1-11.
- Berger, E. 2010. Aquaculture of *Octopus* species: present status, problems and perspectives. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1), 384-399
- Berkes, F., Mahon, R., McGonney, P., Pollnac, R. y Pomeroy, R. 2001. Managing small-scale fisheries, alternative directions and methods. International Development Research Centre, Ottawa.
- Boucaud-Camou, E. y R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. *The Mollusca*. Academic Press. New York, U.S.A. pp. 149-187.
- Boletzky, S. V., Villanueva, R. 2014. Cephalopod Biology. *Cephalopod Culture* (pp. 3 – 16). Editorial Springer. Netherlands.
- Caamal-Monsreal, C., Mascaró, M., Gallardo, P., Rodríguez, S., Noreña-Barroso, E., Domingues, P. y Rosas, C. 2015. Effects of maternal diet on reproductive performance of *Octopus maya* and its consequences on biochemical characteristic of the yolk, morphology of embryos and hatchling quality. *Aquaculture*, 441, 84-94.
- Cequier-Sánchez, E.C., Rodríguez, C., Ravelo, A.G. y Zarate, R. 2008. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4297-4303.
- Cerezo-Valverde, J., Hernández, M. D., Aguado-Giménez, F. y García-García, B. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common Octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture* 275:266-273.

- Cigliano, J. A. 1993. Dominance and den use in *Octopus bimaculoides*. *Animal Behaviour*, 46, 677-684.
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca). 2008. Diagnóstico y Planificación Regional de la Pesca y Acuacultura en México. Región I: Pacífico Norte. Recuperado el 18 de marzo de 2019 de: <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/programa-rector-nacional-de-pesca-y-acuacultura-sustentables>.
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca). 2017. México, tercer productor mundial de pulpo, "un manjar de los mares". Recuperado el 18 de febrero del 2019 de: <http://www.gob.mx/conapesca/articulos/mexico-tercer-productor-mundial-de-pulpo-un-manjar-de-los-mares>.
- Cook, E.J., Shucksmith, R., Orr, H., Ashton, G.V. y Berge, J. 2010. Fatty acid composition as a dietary indicator of the invasive caprellid. *Caprella mutica* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology*, 157: 19-27.
- DeRusha, R.H., Forsythe, J.W., DiMarco, F.P. y Hanlon, R.T. 1989. Alternative diets for maintaining and rearing cephalopods in captivity. *Laboratory Animal Science*, 39, 306-312.
- Domingues, P.M., López, N., Muñoz, J.A., Maldonado, T., Gaxiola, G. y Rosas, C. 2007a. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13, 1-9.
- Domingues, P.M., López, N., Muñoz, J.A., Maldonado, T., Gaxiola, G. y Rosas, C. 2007b. Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13(4), 273-280.
- Domínguez-Contreras, J. 2015. Distribución actual y conectividad genética de poblaciones de pulpo en el noroeste de México. Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. 169 pp. México.
- Durazo, E. 2014. Los lípidos en la nutrición del abulón azul, molusco con potencial de cultivo. *Entreciencias* 2(4), 125-135.
- FAO. 2018. SOFIA: State of world fisheries and aquaculture. Rome Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farías, A., Navarro, J. C., Cerna, V., Pino, S. y Uriarte, I. 2011. Effect of broodstock diet on the fecundity and biochemical composition of eggs of the Patagonian red Octopus (*Enteroctopus megalocyathus* Gould 1852). *Ciencias Marinas* 37: 11-21.
- Finkbeiner, E.M. y Basurto, X. 2015. Re-defining co-management to facilitate small-scale fisheries reform: An illustration from northwest Mexico. *Marine Policy* 51, 433-441.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Forsythe, J. W. y Hanlon, R. T. 1988. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Marine Biology*, 98, 369-379.

- García, S., Domingues, P., Navarro, J. C., Hachero, I., Garrido, D. y Rosas, C. 2011. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 174-187.
- García-García, J., Luaces, M., Veiga, C. y Rey-Méndez, M. 2014. Farming costs and benefits, marketing details, investment risks: The case of *Octopus vulgaris* in Spain. En *Cephalopod Culture* (149-161). Springer Netherlands.
- Gallardo P., Villegas, G., Rosas, C., Domingues, P., Pascual, C., Mascaró, M., Sánchez-Arteaga, A., Estefanell, J. y Rodríguez, S. 2020. Effect of different proportions of crab and squid in semi-moist diets for *Octopus maya* juveniles. *Aquaculture* 524.
- Garrido, D., Navarro, J.C., Perales-Raya, C., Almansa, E., Nande, M., Martín, V., Iglesias, J., Bartolomé, A., Roura, A., Varó, I., Otero, J.J., González, Á. y Rodríguez, C. 2016. Fatty acid composition and age estimation of wild *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture* 464.
- Ghioni, C., Porter, A.E.A. y Taylor, G.W. 2002. Metabolism of 18:4n-3 (stearidonic acid) and 20:4n-3 in salmonid cells in culture and inhibition of the production of prostaglandin F 2 α (PGF 2 α) from 20:4n-6 (arachidonic acid). *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(1), 81-96. DOI: 10.1023/B:FISH.0000021866.78048.45
- Giménez, F. A. y García, E. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International* 10:361-367.
- Glencross, B. D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture* 1, 71 – 124.
- Gómez-Fierro, A. 2017. Crecimiento y supervivencia de juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con dietas naturales. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). México. 69 pp.
- Hanlon, R.T. y Forsythe, J.W. 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*, 35(1), 33.
- Hernández Rodríguez, M., Bückle Ramírez, L. F., Murillo Valenzuela, L. A., Flores Acevedo, N., y Valenzuela Buriel, F. 2015. Sistema hidráulico impulsado por aire a presión para el mantenimiento de *Octopus bimaculoides* y *O. bimaculatus*. *Entreciencias: Diálogos en la Sociedad del Conocimiento*, 3(8), 289-295. (ID: 19630).
- Houlilan, D. F., McMillan, D. N., Agnisola, C., Genoino, T. I. y Foti, L. 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Marine Biology* 106: 251-259.
- Ibarra-García, L. E. 2018. Fisiología digestiva y nutrición del pulpo *Octopus bimaculoides*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), S.C. La Paz, Baja California Sur, México.
- Iglesias, J., Otero, J. J., Fuentes, L. y Sánchez, F. J. 2004. The completed life cycle of the Octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarvar rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12:481-487.

- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L. y Villanueva, R. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 266, 15.
- Iglesias, J., Pazos, G., Fernández, J., Otero, F., Domingues, P. y Linares, F. 2014. The effects of using crab zoea (*Maja brachydactyla*) on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) paralarvae. *Aquaculture International* 22(3): 1041-1051.
- Jereb, P., Roper, C. F. E., Norman, M. D. y Finn, J. K. 2014. *Cephalopods of the World: an annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date*. Vol. 1.
- Jover-Cerdá, M. 2000. Estimación del crecimiento, tasa de alimentación y producción de desechos en piscicultura mediante un modelo bioenergético. *Revista Aquatic* No. 9.
- Kawashima, H., Takeuchi, I. y Ohnishi, M. 1999. Fatty acid compositions in four caprellid amphipod species (Crustacea) from Otsuchi and Mutsu bays in northern Japan. *Journal-Japan oil chemists society*, 48: 595-600.
- Kolanowski, W., Stolyhwo, A. y Grabowski, M. 2007. Fatty acid composition of selected fresh water gammarids (Amphipoda: Crustacea): a potentially innovative source of omega-3 LC PUFA. *Journal of the American Chemical Society*, 84: 827-833.
- Leaver, M., Bautista, J., Bjornsson, B., Jonsson, E., Krey, G., Tocher, D. y Torstensen, B. 2008. Towards fish lipid nutrigenomics. *Reviews in Fisheries Science*, 16, 73-94.
- Lecuanda-Ontiveros, M. 2014. Preferencia térmica de pulpo *Octopus bimaculoides*. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). México. 41 pp.
- Lee, P. G. 1995. Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25 (1-3) 35-51.
- Lee, P.G., Forsythe, J.W., DiMarco, F.P., DeRusha, R. y Hanlon, R.T. 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bulletin of Marine Science* 49, 362-372.
- Leporati, S.C., Pecl, G.T. y Semmens, J.M. 2007. Cephalopod hatchling growth: the effects of initial size and seasonal temperatures. *Marine Biology*, 151, 1375-1383.
- Leporati, S.C., Pecl, G.T. y Semmens, J.M. 2008. Reproductive status of *Octopus pallidus*, and its relationship to age and size. *Marine Biology*, 155, 375-385.
- López-Peraza, D.J., Hernández-Rodríguez, M. y Barón-Sevilla, B. 2014. Ontogeny of the digestive system of the *Octopus bimaculatus* paralarvae (Verrill, 1883). *SpringerPlus* 3:1-10.
- López-Peraza, D.J., Hernández-Rodríguez, M. y Barón-Sevilla, B. 2018. Fatty acid profile, proteolytic activity and survival of *Octopus bimaculatus* paralarvae fed with enriched *Artemia franciscana*. *Molluscan Research*. Volumen 38, 227-237. Recuperado de DOI: 10.1080/13235818.2018.1428485
- Mangold, K. y Boletzky, S. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19, 7-12.

- Martínez, C., Martínez, R., Gallardo, P., Pascual, C., Navarro, J., Sánchez, A., Caamal-Monsreal, C. 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, 426, 310-317.
- Monroig, Ó., Guinot, D., Hontoria, F., Tocher, D. R. y Navarro, J. C. 2012a. Biosynthesis of essential fatty acids in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797); Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of a fatty acyl elongase. *Aquaculture* 360-361, 45-53.
- Monroig, Ó., Navarro, J. C., Dick, J. R., Alemany, F., Tocher, D. R. 2012b Identification of a $\Delta 5$ -like fatty acyl desaturase from the cephalopod *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) involved in the biosynthesis of essential fatty acids. *Marine Biotechnology*, 14, 411-422.
- Mora-Zamacona, P. 2015. Estimación de la edad y crecimiento de *Octopus bimaculoides* (Pickford y McConnaughey, 1949) con base en la lectura de marcas de crecimiento en picos. Tesis de Licenciatura en Biología Marina. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 67 páginas.
- Móxica, C., Linares, F., Otero, J. J., Iglesias, J. y Sánchez, F. J. 2002. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797, en tanques de 9m³. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 18(1-4): 31-36.
- Nair, K. K. C. y Anger, K. 1980. Seasonal variation in population structure and biochemical composition of *Jassa falcata* (Crustacea, Amphipoda) off the island of Helgoland (North Sea). *Estuarine and Coastal Marine Science*, 11: 505-513.
- Navarro, J. C. y Villanueva, R. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: An approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, 183(1-2): 161-177.
- Navarro, J. C. y Villanueva, R. 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: Derivation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 219: 613-631.
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A. y Rosas, C. 2013a. Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 38, 14-19. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.09.001> el día miércoles 20 de febrero de 2020.
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D. y Rosas, C. 2013b. Effect of temperatura on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 455, 156-165. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.008> el día miércoles 20 de febrero de 2020.
- Obaldo, L. G., Divakaran, S. y Tacon, A. G. 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. *Aquaculture. Res.* 33: 369-377.
- O'Dor, R. K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M. J. y Wells, J. 1984. Nutrition absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 11(3): 239-258.
- O'Dor, R. K. y Webber, D. M. 1986. The constraints on cephalopods: why squid aren't fish. *Canadian Journal of Zoology*, 64(8): 1591-1605. <https://doi.org/10.1139/z86-241>

- O'Dor, R. K. y Wells, M. J. 1987. Energy and nutrient flow in cephalopods. En P. Boyle, (Ed.) Cephalopod cycles Vol. II, p. 109-133. London. Academic Press.
- Phillips, K. L., Nichols, P. D., Jackson, G. D. 2002. Lipid and fatty acid composition of the mantle and digestive gland of four Southern Ocean squid species: implications for food-web studies. *Antarctic Science*, 14: 212-220.
- Prato, E., Portacci, G., Biandolino, F. 2010. Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 309: 203-211.
- Quintana, D., Márquez, L., Almansa, E., Bolanos, A. y Lorenzo, A. 2006. Efecto de la dieta de reproductores de pulpo común (*Octopus vulgaris*) en la composición bioquímica de paralarvas bajo condiciones de inanición. En: Cruz-Suárez *et al.* (Eds.), VIII International Symposium on Aquatic Nutrition, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, L.E. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Quintana, D., Domingues, P. y García, S. 2008. Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of commun Octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture* 280, 161-164.
- Quintana, D., Rosas, C. y Moreno-Villegas, E. 2011. Relationship between nutritional and rearing parameters of *Octopus maya* juveniles fed different rations of crab paste. *Aquaculture Nutrition*, 17, 379-388.
- Rosas, C., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Chay, D., López, N. y Domingues, P.M. 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152, 371-381.
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C. y Cuzon, G. 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275(1), 291-297.
- Rosas, C., Maldonado, T., Domingues, P.M., Sánchez, A., Pascual, C. y Aguila, J. 2011. Effects of two dietary protein levels on energy balance and digestive capacity of *Octopus maya*. *Aquaculture International*, 19(1), 165-180.
- Rosas, C., Valero, A., Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Gallardo, P., Sánchez, A. y Domingues, P. M. 2013. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research* 44, 1029-1044.
- Sakurai, Y., Bower, J. R., Nakamura, Y., Yamamoto, S. y Watanabe, K. 1996. Effect of temperature on development and survival of *Todarodes pacificus* embryos and paralarvae. *American Malacological Bulletin*, 13, 89-95.
- Salem Jr, N., Litman, B., Kim, H. Y. y Gawrish, K. 2001. Mechanisms of action of docosahexanoic acid in the nervous system. *Lipids* 36, 945-949.
- Sargent, J. R., Tocher, D.R. y Bell, G. 2002. The lipids. En J. E. Halver y R. W. Hardy (Eds.), *Fish nutrition* (3rd ed, pp. 181-253).

- Secretaría de Gobierno (SEGOB). 2017. Diario Oficial de la Nación, Carta Nacional Pesquera. 106 páginas. Recuperado el 20 de enero de 2020 de: www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/334832/DOF_-_CNP_2017.pdf
- Segawa, S. y Hanlon, R. T. 1988. Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lollingucula brevis* (Molluscs: Cephalopoda). *Marine Behavior Physiology* 13, 389-400.
- Seixas, P., Otero, A., Valente, L. M. P., Días, J. y Rey-Méndez, M. 2010. Growth and fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae fed with enriched *Artemia* or co-fed with an inert diet. *Aquaculture International*. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10499-010-9328-5>
- Shiau, S. Y. 1998. Nutritional requirement of penaeid shrimps. *Aquaculture*, 164, 77-93.
- Solorzano, Y., Viana, M. T., López, L. M., Correa, J. G., True, C. C., y Rosas, C. 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: Growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. *Aquaculture*, 289 (1-2), 84-90.
- Soriano, M. y Hernández, D. 2002. Tasa de crecimiento del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Cichlidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Universitaria* Vol. 12. Guanajuato, México.
- Stoskopf, M. K. y Oppenheim, B. S. 1996. Anatomic features of *Octopus bimaculoides* and *Octopus digueti*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicina*, 27(1), 1-18.
- Suárez-Salcido, A. L. 2016. Efecto de la temperatura de la incubación sobre la tolerancia térmica composición de ácidos grasos de juveniles recién eclosionados de *Octopus bimaculoides*. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). México. 51 pp.
- Tercero, J. F., Rosas, C., Mascaro, M., Poot, G., Domingues, P., Noreña, E., Camaal-Monsreal, C., Pascual, C., Estefanell, J. y Gallardo, P. 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture*, 448, 234-242.
- Tocher, D. R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Res.* 41, 717-732.
- Uriarte, I., Rosas, C., Viana, M. T., Navarro, J. C., Seixas, P., Vidal, E. y Zúñiga, O. 2011. Current Status and Bottle Neck of Octopod Aquaculture: The Case of American Species. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(6), 735-752.
- Van Heukelem, W. F. 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Laboratory Animal Science* 27 (5) Pt. II: 852 – 859.
- Viciano, E., Iglesias, J., Lago, M. J., Sánchez, F. J., Otero, J. J. y Navarro, J. C. 2011. Fatty acid profile of polar and neutral lipid fractions of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1979 paralarvae reared with enriched on-grown *Artemia*. *Aquaculture Research*, 42(5), 704-709.
- Villanueva, R., Sykes, A. V., Vidal, E. A., Rosas, C., Nabhitabhata, J., Fuentes, L. y Iglesias, J. 2014. *Cephalopod Culture*. Springer Netherlands.

- Webster, C. D. y Lim, C. 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. Aquaculture Research Center. Kentucky State University and Fish Diseases and Parasites Research Laboratory, Auburn Alabama, USA. 448 pp.
- Woods, C. M. C. 2009. Caprellid amphipods: An overlooked marine finfish aquaculture resource. *Aquaculture*, 289: 199-211.