

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



---

**Programa de Posgrado en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Efecto de la temperatura de incubación sobre la tolerancia  
térmica y composición de ácidos grasos de juveniles recién  
eclosionados de *Octopus bimaculoides***

Tesis

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

Presenta:

**Ana Lucía Suárez Salcido**

Ensenada, Baja California, México  
2016

Tesis defendida por

**Ana Lucía Suárez Salcido**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**  
Codirector de tesis

---

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Codirector de tesis

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**

**Dr. Luis Alberto Delgado Argote**



---

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Director de Estudios de Posgrado

*Ana Lucía Suárez Salcido © 2016*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor*

Resumen de la tesis que presenta **Ana Lucía Suárez Salcido** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

### **Efecto de la temperatura de incubación sobre la tolerancia térmica y composición de ácidos grasos de juveniles recién eclosionados de *Octopus bimaculoides***

Resumen aprobado por:

---

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**  
Codirector de tesis

---

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Codirector de tesis

Los cefalópodos y específicamente los pulpos, son un recurso económico importante en la industria pesquera a nivel mundial y nacional, debido a esto han sido explotados por años. Por lo anterior, es necesario generar información básica en especies con potencial, como *Octopus bimaculoides*, ya que eclosiona como juvenil totalmente desarrollado, a diferencia de las especies que tienen etapa de paralarva, esta característica podría facilitar su cultivo. En el presente trabajo se evaluaron tres temperaturas de incubación (16, 18 y 20°C) sobre la tolerancia térmica y el contenido de ácidos grasos de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides*. El tiempo de incubación de los huevos de *O. bimaculoides* mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. La duración de la incubación para los huevos mantenidos a 20°C fue de 65 días a diferencia de los huevos incubados a 18°C y 16°C, los cuales tuvieron una duración de 97 y 108 días respectivamente. En cuanto a la tolerancia térmica ésta se evaluó por el método dinámico, el cual consistió en colocar un pulpo recién eclosionado dentro de un acuario y se incrementó la temperatura del agua a una tasa constante hasta observar la pérdida de equilibrio, respuesta que caracteriza a la temperatura crítica máxima (TCMax). La tolerancia térmica estuvo en el intervalo de 29.7°C a 31.9°C con diferencias entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), lo que indica que por cada dos grados de incremento en la temperatura de incubación hubo un aumento de 1°C en la tolerancia térmica. La diferencia entre el valor de la TCMax y la temperatura de incubación de los organismos, mostró que los juveniles recién eclosionados e incubados a 16°C toleraron un mayor incremento de temperatura ( $13.7 \pm 0.10^\circ\text{C}$ ). El mayor peso seco se obtuvo en los pulpos incubados a 20°C ( $11.90 \pm 0.41$  mg) sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con los incubados a 18°C ( $11.06 \pm 0.62$ ), sin embargo, estos resultados difieren ( $p < 0.05$ ) del valor obtenido en los pulpos del tratamiento a 16°C ( $8.52 \pm 0.23$ ). Para la composición de ácidos grasos se analizaron juveniles recién eclosionados de las tres temperaturas de incubación. La concentración de DHA fue mayor ( $21.87 \pm 0.22\%$ ) en los pulpos incubados a 16°C con diferencias ( $p < 0.05$ ) con los demás tratamientos, mientras que para EPA el contenido superior fue para los pulpos incubados a 18°C ( $17.60 \pm 0.16\%$ ). ARA se presentó en mayor porcentaje en los incubados a 20°C ( $7.85 \pm 0.23\%$ ) sin diferencia ( $p > 0.05$ ) con los pulpos incubados a 18°C ( $7.74 \pm 0.18\%$ ). La información presentada en este estudio, contribuye a la generación del conocimiento del efecto de la temperatura de incubación en *O. bimaculoides* con el fin de poder orientar las condiciones idóneas para el desarrollo de un cultivo experimental.

**Palabras clave:** Tolerancia térmica, Ácidos grasos, Pulpo, *Octopus bimaculoides*.

Abstract of the thesis presented by **Ana Lucía Suárez Salcido** as a partial requirement to obtain the Master of Science in Aquaculture

**Effect of incubation temperature on the thermal tolerance and fatty acid composition of newly hatched *Octopus bimaculoides***

Abstract by:

---

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**  
Codirector thesis

---

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Codirector thesis

Cephalopods and specifically octopus are an important economic resource in the fishing industry at global and national level, due to this have been exploited for years. Therefore, it is necessary to generate basic information on species with potential as *Octopus bimaculoides*, which hatches as fully developed juvenile that could facilitate cultivation, unlike the species that present paralarva stages. In this study three incubation temperatures (16, 18 and 20°C) were evaluated on the thermal tolerance and fatty acid content of newly hatched juveniles of *O. bimaculoides*. The incubation period of the eggs of *O. bimaculoides* showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments. The duration of incubation for eggs held at 20°C was 65 days unlike to the eggs incubated at 18°C and 16°C, which lasted for 97 and 108 days respectively. As for thermal tolerance was asses by the dynamic method, which consisted of placing a newly hatched octopus inside an aquarium and the water temperature was increased at a constant rate until observing the loss of balance, response characteristic evaluated for critical maximum temperature (CTMax). Thermal tolerance was in the range of 29.7°C to 31.9°C with differences between treatments ( $p < 0.05$ ), indicating that for every two degrees of increase in the incubation temperature thermal tolerance was increased by 1°C. The difference between the value of the CTMax and the incubation temperature of the organisms showed that newly hatched juveniles and incubated at 16°C tolerated a further increase in temperature ( $13.7 \pm 0.10^\circ\text{C}$ ). The largest dry weight was obtained octopuses incubated at 20°C ( $11.90 \pm 0.41$  mg) with no significant difference ( $p > 0.05$ ) with incubated at 18°C ( $11.06 \pm 0.62$  mg), however, these results differ ( $p < 0.05$ ) the value obtained in octopuses treatment to 16°C ( $8.52 \pm 0.23$  mg). For fatty acid composition were analyzed newly hatched juveniles of the three incubation temperatures. DHA concentration was higher ( $21.87 \pm 0.22\%$ ) in octopuses incubated at 16°C with differences ( $p < 0.05$ ) with the other treatments, while content of EPA was higher for octopuses incubated at 18°C ( $17.60 \pm 0.16\%$ ). ARA showed higher percentage in the incubated at 20°C ( $7.85 \pm 0.23\%$ ) with no difference ( $p > 0.05$ ) with octopuses incubated at 18°C ( $7.74 \pm 0.18\%$ ). The information presented in this study contributes to the generation of knowledge of the effect of incubation temperature on *O. bimaculoides* in order to be able to target the right conditions for the development of an experimental culture.

**Keywords:** Thermal tolerance, fatty acids, Octopus, *Octopus bimaculoides*.

## Dedicatoria

A mi mamá

Por tu motivación, apoyo en todo momento, amor, trabajo y sacrificios en todos estos años, gracias a ti he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mi hermano

Que aunque no lo parezca... a su manera, me ha impulsado y ayudado siempre.

A ti Jorge

Por la ayuda incondicional, por los ánimos, por creer en mí, motivarme a seguir adelante y permitirme compartir contigo.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), y particularmente al Departamento de Acuicultura por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A mis directoras de tesis: Dra. Mónica Hernández Rodríguez y Dra. Beatriz Cordero Esquivel, gracias por sus consejos, comentarios y esfuerzo para la realización de este trabajo.

A mi comité de tesis: Dr. Benjamín Barón Sevilla y Dr. Luis A. Delgado Argote por sus recomendaciones y opiniones, que ayudaron a mi desarrollo académico, personal y a la conclusión de este trabajo.

Al personal técnico y administrativo del Departamento de Acuicultura: Luis Murillo Valenzuela, Adrián Celaya Ortega, José Espinoza Ibarría y Amparo Valverde, que me apoyaron durante mi maestría.

A la Dra. Bertha O. Arredondo Vega, del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR-La Paz, Baja California Sur), por su apoyo en los análisis de ácidos grasos a través de los proyectos: AC0.2: Productos de alto valor agregado a partir del cultivo de microalgas y cianobacterias y, 913-0: Desarrollo e implementación de una tecnología innovadora y eficiente para la fabricación de gomitas formuladas con ingredientes funcionales.

Al Laboratorio de Nutrición y Fisiología del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, por permitirme utilizar equipo para realizar parte de la metodología necesaria para este trabajo.

A mis amigas del alma Ruth Castillo y Maritza Escamilla que todo el tiempo han estado a mi lado brindándome su amistad, apoyo incondicional, palabras de ánimos, escuchando mis lloriqueos, desveladas haciendo “nada”, en fin agradezco enormemente su amistad. Las quiero muuucho!

A los “encantadores de pulpo” Alfredo, Ana Lillian, Luis y Jorge. Gracias por la ayuda en la recolección de pulpos.

A mis compañeros de generación Candy Armuelles, Fernando Meza, Carolina Romero, Ingrid Bautista, Denisse Chávez, Sara Enciso, Yessica Hernández, Romy Martínez, Héctor Ávila, Luis Madero, Connie Ochoa y Stefanny Córdova. Gracias por todos los momentos y experiencias que pase a su lado.

A mis compañeros de laboratorio y de generación Candycienta y Fercho por brindarme su amistad, consejos y pelear como hermanitos, para hacer divertidas esas horas “trabajando” en el lab.

A todas las personas, amigos y familiares que me apoyaron en algún momento a lo largo de esta etapa de mi formación académica. GRACIAS!!

## Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos .....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas .....	x
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1    Pesquería .....	3
1.2    Cultivo de pulpo.....	4
1.3 <i>Octopus bimaculoides</i> .....	5
1.4    Temperatura.....	6
1.5    Lípidos totales y ácidos grasos.....	8
<b>Capítulo 2. Antecedentes.....</b>	<b>10</b>
<b>Capítulo 3. Hipótesis .....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 4. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
4.1    Objetivo general .....	14
4.2    Objetivos específicos.....	14
<b>Capítulo 5. Materiales y Métodos .....</b>	<b>15</b>
5.1    Recolecta de organismos .....	15
5.2    Mantenimiento de Reproductores de Pulpo.....	16
5.3    Incubación .....	17
5.4    Tolerancia térmica en juveniles recién eclosionados (TCMax).....	18
5.5    Peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso orgánico (PO) .....	19
5.6    Análisis de ácidos grasos .....	20
5.7    Análisis estadístico .....	21

<b>Capítulo 6. Resultados</b> .....	<b>22</b>
6.1    Tolerancia térmica en juveniles recién eclosionados.....	23
6.1.1  Comportamiento durante el ensayo de temperatura crítica máxima ....	23
6.2    Peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso orgánico (PO) .....	25
6.3    Composición de ácidos grasos en juveniles de <i>O. bimaculoides</i> .....	28
<b>Capítulo 7. Discusión</b> .....	<b>31</b>
<b>Capítulo 8. Conclusiones</b> .....	<b>36</b>
<b>Lista de referencias bibliográficas</b> .....	<b>37</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Distribución geográfica de <i>O. bimaculoides</i> . Recuperado de <a href="https://maps.google.com.mx/">https://maps.google.com.mx/</a> .....	5
2. Ubicación del sitio de recolecta de los organismos <i>O. bimaculoides</i> en la Bahía de San Quintín, Baja California, México. Recuperado de <a href="https://maps.google.com.mx/">https://maps.google.com.mx</a> .....	15
3. Comportamiento de juveniles recién eclosionados de <i>O. bimaculoides</i> incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20°C) durante los ensayo de tolerancia térmica. Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes, encima de las barras indican diferencias significativas. EB: enroscamiento de brazos, CC: cambio de color, EM: espasmos musculares, PE: pérdida de equilibrio. ....	24
4. Tolerancia al incremento de temperatura de juveniles recién eclosionados de <i>O. bimaculoides</i> incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20°C). Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ....	25
5. Peso húmedo de juveniles recién eclosionados de <i>O. bimaculoides</i> incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20 °C). Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ....	26
6. Peso seco total (mg) de juveniles recién eclosionados de <i>O. bimaculoides</i> incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20 °C). Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ....	27
7. Peso orgánico (mg) de juveniles recién eclosionados de <i>O. bimaculoides</i> incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20 °C). Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas. ....	28

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Parámetros fisicoquímicos del agua durante el tiempo de incubación de los huevos de <i>O. bimaculoides</i> . Promedio $\pm$ desviación estándar. ....	18
2. Tiempo de incubación de huevos de <i>O. bimaculoides</i> y tamaño de puesta (número de huevos) a las diferentes temperaturas de incubación: T16, T18 y T20°C.....	22
3. Composición de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de juveniles de <i>O. bimaculoides</i> a las tres temperaturas de incubación 16°C (T16), 18°C (T18) y 20°C (T20). Error estándar entre paréntesis. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA). AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados, DHA: Ácido docosahexaenoico EPA: Ácido eicosapentaenoico ARA: Ácido araquidónico. ....	30

# Capítulo 1. Introducción

---

El Phylum Mollusca incluye distintos grupos con una gran diversidad de especies con diferentes formas y tamaños. Este Phylum contiene a la clase Cephalopoda, la cual a su vez está dividida en tres subclases, Ammonoidea actualmente extinta; Nautiloidea representada únicamente por el género *Nautilus*, que se caracteriza porque los organismos tienen dos pares de branquias y una concha bien desarrollada y la subclase Coleoidea que incluye organismos que tienen un par de branquias y una concha interna que en algunas especies puede estar ausente, en esta última subclase se ubican los calamares, sepias y pulpos (Boyle y Rodhouse, 2005; Hickman *et al.*, 2008).

Los pulpos pertenecen al orden Octopoda, carecen de concha y poseen ocho brazos (Borradaile *et al.*, 1961; Hickman *et al.*, 2008). Al igual que el resto de los cefalópodos, presentan simetría bilateral, su cuerpo está dividido en dos regiones: la anterior, en la que se encuentran la cabeza, los apéndices y el sifón y la región posterior, cubierta por el manto, donde se localizan las branquias y los diferentes órganos (Fuentes, 2004).

Los cefalópodos tienen los sentidos del tacto y de la vista muy bien desarrollados, poseen grandes ojos, que les facilitan la detección de sus presas y huir de depredadores (Boyle y Rodhouse, 2005; Jereb *et al.*, 2014).

Los cefalópodos son semelparos, es decir, solo se reproducen una vez en su ciclo de vida (Boyle y Rodhouse, 2005) y mueren al poco tiempo de la eclosión de los huevos (Jereb *et al.*, 2014), tienen sexos separados y la fecundación es interna (Fuentes, 2004). Los machos tienen un brazo modificado llamado hectocotilo, que es un canal con la punta en forma triangular cóncava (Jereb *et al.*, 2014), el cual transfiere los espermatozoides a las hembras cuando ocurre el apareamiento (Boyle y Rodhouse, 2005).

Los pulpos como todos los cefalópodos, tienen un desarrollo notable de las células pigmentarias de la piel, llamadas cromatóforos, las cuales están controladas por el sistema muscular y neural del individuo, muestran un patrón dinámico, preciso y complejo en la superficie del animal, al igual que en la textura del manto (Jereb *et al.*, 2014); esta es una característica de expresión en el grupo de los cefalópodos y es importante en

actividades como la reproducción y en la alimentación (Boyle y Rodhouse, 2005), esta capacidad, combinada con posturas o movimientos apropiados, logran un complejo efecto de camuflaje (Jereb *et al.*, 2014). Estos comportamientos pueden ser observados por los humanos como un patrón colorido, mientras que los cefalópodos no son capaces de observar colores, solamente blanco y negro o tonalidades grises, debido a que la retina de la mayoría de los cefalópodos posee solo un pigmento visual y no está estructurada con fotorreceptores, que potencialmente podrían dar la visión del color por absorción diferencial de la luz (Boyle y Rodhouse, 2005).

Los octópodos presentan ocho brazos, los cuales comúnmente varían en longitud entre los diferentes pares, pero entre los brazos del mismo par no existen diferencias, salvo el brazo hectocotilizado que es más corto (Fuentes, 2004). Los pulpos que habitan cerca de la zona costera, en su mayoría presentan reproducción estacional; en los pulpos los gametos son introducidos en el tracto genital de las hembras hacia las glándulas del oviducto (Boyle y Rodhouse, 2005).

Las hembras de pulpo colocan los huevos en sustratos rocosos o conchas y durante el periodo de incubación los cuidan y los mantienen limpios utilizando el sifón, con el cual expulsan agua para mantener los huevos oxigenados y libres de partículas que pudiera contaminarlos, también los mantienen protegidos hasta el momento de la eclosión (Jereb *et al.*, 2014), durante este tiempo, las hembras no se alimentan y mueren al finalizar esta etapa, con signos evidentes de pérdida de tejido muscular (Boyle y Rodhouse, 2005).

El desarrollo embrionario o el periodo de incubación varía según la temperatura en la cual se encuentren los huevos, ya que a mayores temperaturas, el metabolismo de los embriones se acelera y por lo tanto se reduce el tiempo de desarrollo (Boyle y Rodhouse, 2005 y Noyola *et al.*, 2013b).

Entre las de diferentes especies de pulpos se han observado dos tipos de desarrollo temprano, uno es directo, es decir, los organismos eclosionan como juveniles, con todos sus órganos desarrollados y adoptan el hábito bentónico de los adultos; en el segundo tipo los organismos tienen hábitos planctónicos de nado libre y por su grado de desarrollo se clasifican como “paralarvas” (Villanueva y Norman, 2008; Jereb *et al.*, 2014).

## 1.1 Pesquería

Los cefalópodos (calamares, sepias y pulpos) son un recurso importante en la industria pesquera a nivel mundial, en 2012 constituyeron el 3% del valor comercial de la pesca mundial (FAO, 2014). Los principales países consumidores e importadores de estos recursos son España, Italia y Japón, mientras que los principales exportadores de pulpo son Mauritania y Marruecos, este último, en 2012 registró una captura de 1'158,474 t. La demanda de este recurso se ha incrementado principalmente en países del Mediterráneo y Asia oriental en los últimos años (FAO, 2014); sin embargo, esta importante pesquería depende principalmente de la pesca artesanal, la cual no se controla en forma adecuada y por lo tanto no existe un conocimiento preciso del impacto ecológico que podría tener en un futuro en las poblaciones naturales (Boyle y Rodhouse, 2005).

En México la producción pesquera de pulpo ocupa el onceavo lugar de la producción de pescados y mariscos, con 24,847 toneladas para el año 2013 (CONAPESCA, 2013). Esta actividad pesquera se clasifica por regiones y en el caso de la pesquería del pulpo se encuentra en las regiones primera, segunda y cuarta. La primera región la componen los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit; la segunda región comprende a los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán y Oaxaca y la cuarta región está conformada por Yucatán, Campeche y Quintana Roo (SAGARPA, 2008; CONAPESCA, 2013), siendo ésta última región la de mayor producción, ya que los desembarques de Yucatán y Campeche son los mayores, con 14,719 y 8,337 t respectivamente, seguido por Jalisco con una producción de 612 t. Específicamente para el estado de Baja California, la producción de pulpo en el 2013 fue de 155 t y se posicionó en el séptimo lugar a nivel nacional (CONAPESCA, 2013).

En las regiones primera y segunda, las principales especies capturadas son *Octopus hubbsorum*, *O. macropus*, *O. bimaculatus* y *O. rubescens*, mientras que para la cuarta región las especies de pulpo que se capturan son *Octopus maya* y *O. vulgaris* (SAGARPA, 2008).

## 1.2 Cultivo de pulpo

Las primeras experiencias de cultivo de pulpo se realizaron desde 1995 con *O. vulgaris* en el Instituto Español de Oceanografía (IEO) de Vigo, España, los esfuerzos se centraron en el desarrollo del cultivo a escala comercial de esta especie. Hoy en día se dedican al engorde de juveniles capturados del medio natural, los cuales son colocados en jaulas flotantes y alimentados con productos congelados como sardina, jurel y mejillones. El proceso de engorde tarda aproximadamente 4 meses, por lo que al año se pueden obtener tres cosechas, con pulpos de tamaño comercial de 2.5-3 kg (Fuentes, 2004). El principal problema para cultivar esta especie se centra en el cultivo de sus paralarvas, las cuales tienen grandes mortalidades, principalmente debido a la carencia de dietas adecuadas (Fuentes, 2004). La dieta que comúnmente se utiliza para la alimentación de las paralarvas de los pulpos son los metanauplios o adultos de *Artemia*, debido a su disponibilidad y a su fácil cultivo, sin embargo, la artemia no cumple con los requerimientos nutricionales de las paralarvas, en particular en cuanto a la composición de lípidos (Izquierdo *et al.*, 2004). Recientemente, las experiencias de cultivo han proporcionado resultados alentadores, ya que los porcentajes de supervivencia de las paralarvas han aumentado a 31.5% al día 40 después de la eclosión, utilizando larvas zoeas del cangrejo centolla *Maja squinado* como complemento a la dieta de *Artemia*, no obstante Izquierdo *et al.* (2004), consideran que es necesario estudiar la composición de los nutrientes que contiene el cangrejo centolla para su inclusión en las dietas

En México a partir del 2013 y después de 10 años de investigaciones por parte de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-UNAM) y un grupo de mujeres del pueblo de Sisal, se logró el cultivo de pulpo *O. maya*, endémico del Estado de Yucatán; la especie tiene desarrollo directo, es decir, eclosiona como un organismo juvenil de hábitos bentónicos. Este éxito derivó en la instalación de una granja que actualmente se dedica al mantenimiento y crianza de los pulpos desde su eclosión hasta el tamaño comercial o “pulpo baby”, de aproximadamente 100 g, que se utiliza en la cocina gourmet. Cabe destacar que aunque la producción se hace a escala comercial, aún es un cultivo piloto (Campus México, 2013).

### 1.3 *Octopus bimaculoides*

*O. bimaculoides* también llamado pulpo de dos manchas, es un organismo que llega a medir 50 cm de longitud total y pesar hasta 800 gramos en el medio natural, sin embargo estudios recientes indican que esta especie puede alcanzar pesos de hasta 1360 gramos en Bahía Magdalena, B.C.S., México (Mora-Zamacona, 2015); habita la zona noreste del Pacífico, desde San Simón, California hasta Guerrero Negro en Baja California Sur (Figura 1) (Jereb *et al.*, 2014). Habitan desde la zona intermareal hasta los 20 metros de profundidad, en zonas rocosas, arenosas y lodosas. El intervalo de temperatura de las áreas donde habita es de 12 a 25°C. Esta especie utiliza conchas, rocas y algas como refugios; se alimenta de una gran variedad de presas, incluyendo cangrejos, camarones, moluscos bivalvos y gasterópodos (Forsythe y Hanlon, 1988; Jereb *et al.*, 2014).

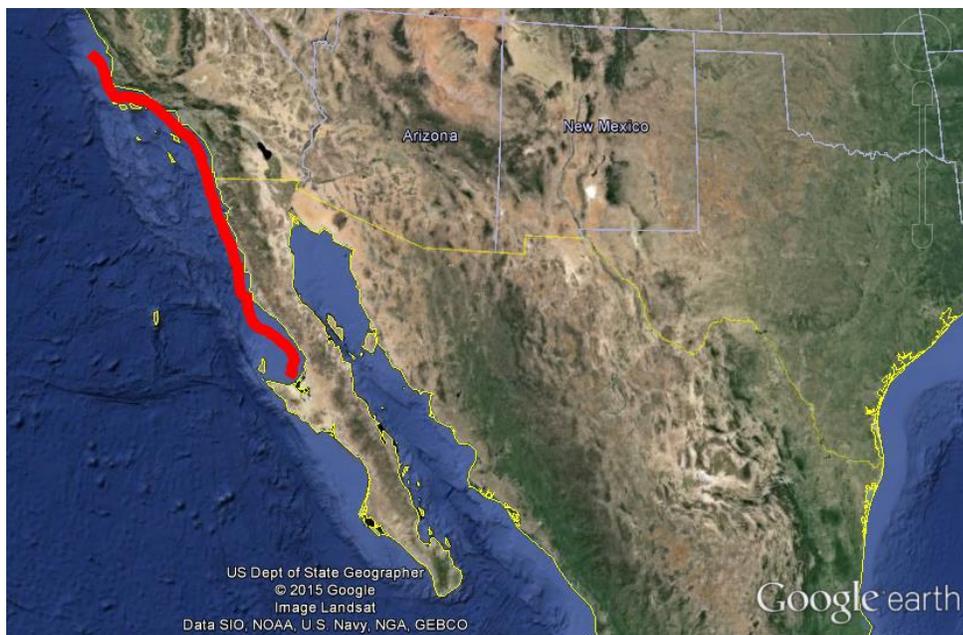


Figura 1. Distribución geográfica de *O. bimaculoides*. Recuperado de <https://maps.google.com.mx/>

La temporada de desove de *O. bimaculoides* es entre los meses de febrero y mayo, cada hembra deposita alrededor de 800 huevos, los cuales son relativamente grandes, de aproximadamente 13 mm de diámetro (Forsythe y Hanlon, 1988); su desarrollo es directo, por lo que eclosionan como juveniles de hábitos bentónicos (Jereb *et al.*, 2014) y pueden vivir de 1 a 1.5 años (Forsythe y Hanlon, 1988).

## 1.4 Temperatura

La temperatura ambiental es uno de los factores físicos más importantes que influyen en el desempeño de los organismos ectotermos, debido a que regula los procesos bioquímicos y fisiológicos (Clarke y Johnston, 1999; Beitinger *et al.*, 2000), afecta la locomoción, la función inmune, el cortejo y las tasas de alimentación y crecimiento (Lemus *et al.*, 1993; Angilletta *et al.*, 2002), también puede actuar como un estresor letal causando la muerte de los organismos (Beitinger *et al.*, 2000). Este factor actúa sobre las membranas, modificando su composición lipídica, lo que causa una respuesta de adaptación homeoviscosa modificando la fluidez (Hazel, 1995).

Los cefalópodos son organismos ectotermos, la temperatura del agua, influye en la velocidad del desarrollo y por lo tanto en la duración del periodo de incubación, en los patrones de crecimiento y en la reproducción, entre otros procesos (Boyle y Rodhouse, 2005; Noyola *et al.*, 2013b).

Uno de los factores que se evalúan en forma frecuente en los organismos poiquilotermos es la tolerancia térmica, la cual se puede conocer por medio de dos métodos, el estático y el dinámico, el primero se utiliza para caracterizar los límites letales, por medio de experimentos crónicos que tienen una duración de hasta 96 h. El segundo método se utiliza para conocer la tolerancia de los organismos y tiene como base el estudio de las temperaturas críticas, por medio del estrés térmico ascendente o descendente (Beitinger *et al.*, 2000).

Las temperaturas críticas máxima y mínima para una especie, se consideran un excelente indicador de los límites térmicos porque dependen de la temperatura a la que un organismo está aclimatado, lo que permite establecer sus áreas de distribución temporal y espacial, esta información se utiliza para hacer comparaciones entre las especies (Lutterschmidt y Hutchison, 1997). Esta respuesta fue definida por Cowles y Bogert (1944) como “el punto térmico en donde la actividad locomotora se desorganiza y el animal pierde la capacidad de escapar de las condiciones que lo llevarán rápidamente a la muerte”. Aunque esta respuesta ocurre a diferentes temperaturas según la especie, el comportamiento es similar entre las especies (Lutterschmidt y Hutchison, 1997).

El método para estudiar la temperatura crítica consiste en incrementar o disminuir gradualmente la temperatura a partir de la temperatura de aclimatación, generalmente a una tasa de  $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , aunque se utilizan diferentes tasas que van de  $0.5\text{-}1.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , dependiendo del tamaño de los organismos y de su edad (Beitinger *et al.*, 2000; Mora y Maya, 2006). Al incrementar la temperatura del agua, los organismos y específicamente los peces, usualmente presentan una secuencia de respuestas que incluyen el aumento de actividad, espasmos musculares, pérdida del equilibrio, coma y la muerte (Lutterschmidt y Hutchison, 1997).

Este método fue desarrollado por Cowles y Bogert (1944) para el estudio de reptiles, posteriormente se modificó por otros investigadores para trabajar con diferentes vertebrados ectotérmicos (Tsuchida, 1995; Beitinger *et al.*, 2000). La evaluación de este método, es un excelente indicador de estrés y de la capacidad de adaptación en los organismos, ya que por medio de esta técnica se puede evaluar su capacidad fisiológica para tolerar un incremento en la temperatura (Paladino *et al.*, 1980). La tolerancia de los organismos generalmente se ha evaluado cuando éstos han sido aclimatados a diferentes condiciones térmicas, sin embargo, resulta importante conocer los efectos de la temperatura de incubación de los huevos sobre la tolerancia térmica de los organismos recién eclosionados, como podría ser el caso de los pulpos y utilizar esta información como un indicador de su condición inicial. En este sentido, Martínez *et al.* (2014) incubaron huevos del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* a diferentes temperaturas (22, 24, 26, 28 y  $30^{\circ}\text{C}$ ) y observaron que la longitud de las larvas fue mayor en el cultivo a  $24^{\circ}\text{C}$  que en las condiciones de 22, 26, 28 y  $30^{\circ}\text{C}$ , lo que “*demuestra que la temperatura influye en la velocidad y eficiencia de los nutrientes*”.

## 1.5 Lípidos totales y ácidos grasos

Los lípidos son una diversidad de sustancias, que pueden ser encontradas tanto en el tejido animal como vegetal, son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (FAO, 1989; Randall *et al.*, 1998). Estas sustancias están conformadas por triglicéridos, fosfolípidos y esteroides. La función principal de estas sustancias, es que funcionan como reserva de energía y actúan como componentes estructurales de las membranas celulares (Randall *et al.*, 1998; Bureau y Cho, 1999).

Los ácidos grasos son biomoléculas de naturaleza lipídica que se clasifican en saturados e insaturados según la cantidad de dobles enlaces o insaturaciones en su estructura, los insaturados a su vez se dividen en monoinsaturados, como los de la serie oleica (n-9), los cuales presentan una sola insaturación y poliinsaturados con dos o más insaturaciones, como los de la serie linoleica (n-3) y linolénica (n-6) (FAO, 1989; Fahy *et al.*, 2005).

Los pulpos son incapaces de sintetizar los ácidos grasos esenciales, por lo que deben adquirirlos en la dieta, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, de la serie linolénica n-3 y linoleica n-6 (FAO, 1989; Bureau y Cho, 1999). Las deficiencias de estos ácidos grasos esenciales en los peces, ocasiona una reducción en la tasa de crecimiento, despigmentación, erosión de las aletas y miopatía cardíaca, entre otros (Bureau y Cho, 1999), así como afectar la reproducción (National Research Council, 2011).

Los lípidos son uno de los principales nutrientes en una dieta y dependiendo de la especie, son requeridos en diferentes cantidades, para el caso de los cefalópodos este requerimiento es poco conocido, pero se sabe que una deficiencia afecta el crecimiento y la supervivencia de los organismos (Iglesias *et al.*, 2014).

Los conocimientos que se tienen de los requerimientos de ácidos grasos de los cefalópodos provienen de estudios de su composición corporal y del alimento vivo utilizado durante ensayos de cultivos experimentales (Iglesias *et al.*, 2014). Los requerimientos de ácidos grasos de los pulpos en etapas tempranas (paralarvas), se basan principalmente por ácidos poliinsaturados como el ácido docosaheptaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y araquidónico (ARA) (Navarro y Villanueva, 2000 y 2003).

El balance inadecuado entre los lípidos y la composición de ácidos grasos como DHA, EPA y ARA en las dietas, puede ser la causa del alto porcentaje de mortalidad en los cultivos de pulpos (Iglesias *et al.*, 2014). Para entender las causas de estas altas mortalidades y diseñar procedimientos de cultivo exitosos, es necesario el desarrollo de investigaciones relacionadas con el efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos en organismos como los moluscos y en particular en los cefalópodos (Miliou *et al.*, 2006), donde también se debe considerar el efecto de esta variable en la incubación de los huevos y en la calidad de la progenie.

## Capítulo 2. Antecedentes

---

Los octópodos constituyen un grupo muy importante para el ambiente marino, por ser uno de los principales depredadores en el ecosistema (Jereb *et al.*, 2014). Al igual que muchas especies, el pulpo es un recurso económico importante en el país y su abasto es insuficiente por parte de la industria pesquera (SAGARPA, 2008).

Los estudios con octópodos son escasos (Jereb *et al.*, 2014) y en particular sobre el pulpo *O. bimaculoides*, pero es reconocida como una especie con potencial para cultivo, ya que como se ha mencionado anteriormente, tiene desarrollo directo lo que significa que eclosiona como juvenil totalmente desarrollado, lo que podría facilitar su cultivo (Uriarte *et al.*, 2011), a diferencia de las especies que tienen etapa de paralarva.

Existen pocos estudios relacionados con el pulpo *O. bimaculoides* y la información sobre el efecto de la temperatura en el contenido total de lípidos y en la composición de ácidos grasos en la etapa de incubación, es más escasa. En este sentido, Forsythe y Hanlon (1988) evaluaron la temperatura de 18° y 23°C sobre el crecimiento, la reproducción y la longevidad de *O. bimaculoides*, sus resultados muestran que en ambos sexos, los procesos de reproducción se aceleraron cuando la temperatura del agua fue de 23°C. También observaron que en ambas temperaturas, las hembras tuvieron un mayor peso en comparación con los machos y éstos crecieron más en talla (longitud del manto) y maduraron antes que las hembras.

La preferencia térmica, tolerancia y tasa de consumo de oxígeno fueron evaluadas por Noyola *et al.* (2013a) en pulpos juveniles de *O. maya* aclimatados a 18, 22, 26 y 30°C por 20 días. Los resultados indican que existe una relación directa entre la temperatura preferida y la de aclimatación, con un preferendum final de 23.4°C. En la evaluación de la tolerancia térmica, las temperaturas críticas máximas (TCMax) y mínimas (TCMin), se incrementaron conforme aumentó la temperatura de aclimatación, de 31.8 a 36.5°C y de 11.6 a 19.0°C respectivamente. Los autores definieron los puntos finales para evaluar estas respuestas como la liberación de tinta para el TCMax y el enroscamiento de los brazos para el TCMin. La tasa de consumo de oxígeno aumentó significativamente conforme la temperatura de aclimatación se incrementó.

Noyola *et al.* (2013b), evaluaron el efecto de la temperatura (18, 22, 26 y 30°C) sobre el balance energético y la composición de ácidos grasos de juveniles tempranos (1 día después de la eclosión) de *O. maya*, con el fin de conocer los mecanismos fisiológicos relacionados con la adaptación a temperaturas relativamente bajas para la península de Yucatán. Los autores observaron que las temperaturas entre 18 y 22°C favorecen el crecimiento, probablemente por diversos factores, como la reducción del metabolismo basal y consecuentemente una disminución en su actividad en general. La conclusión de este trabajo fue que los organismos tenían más tiempo para la digestión de los alimentos y como consecuencia una mejor utilización de los nutrientes, principalmente ácidos grasos.

*O. pallidus* es otra especie de pulpo en la que se ha estudiado la influencia de la temperatura (14 y 18°C) sobre el crecimiento de los juveniles y en general sobre la fisiología digestiva (consumo de alimento y conversión alimenticia) (André *et al.*, 2008). Sus resultados indicaron que la temperatura no tuvo un efecto en la conversión alimenticia ni en la tasa de crecimiento. Los autores concluyeron que la interacción entre la temperatura y el crecimiento es compleja, por lo que es necesario seguir investigando los efectos de la temperatura para comprender el crecimiento de los cefalópodos en etapas tempranas.

En relación con el efecto de la temperatura sobre la composición bioquímica de los pulpos, no existe mucha información, sin embargo, Navarro y Villanueva (2000) estudiaron en condiciones de cultivo, los requerimientos nutricionales de *Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris* y *Octopus vulgaris* en las etapas de paralarva y juveniles, así como la composición lipídica del alimento (crustáceos). De igual manera describieron la composición lipídica y de ácidos grasos de las paralarvas de *O. vulgaris* alimentadas con *Artemia* enriquecida y con una combinación de *Artemia* enriquecida y una dieta formulada. Los autores concluyeron que las paralarvas y juveniles de cefalópodos requieren una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, fosfolípidos y colesterol y un contenido moderado de lípidos neutros. Las paralarvas cultivadas hasta el día 30 después de la eclosión, tuvieron contenidos bajos de PUFA's, comparados con las recién eclosionadas. Navarro y Villanueva (2000) recomiendan alimentar a *O. vulgaris* con *Artemia* enriquecida con PUFA's junto con pellets formulados.

En un trabajo reciente, Lecuanda-Ontiveros (2014) evaluó la preferencia térmica y la composición lipídica de *Octopus bimaculoides* en dos estadios de su ciclo de vida. La temperatura preferida para los adultos fue de  $16.7 \pm 1.2^\circ\text{C}$  (con diferencias entre los sexos, ya que las hembras prefirieron una temperatura de  $17.8^\circ\text{C}$  en comparación con los machos que prefirieron  $16^\circ\text{C}$ ) y la de los juveniles recién eclosionados fue de  $16.0 \pm 1.5^\circ\text{C}$ . Respecto al contenido de lípidos totales se obtuvo un valor de 9.0% en los juveniles recién eclosionados y en los expuestos al gradiente térmico durante 4 horas. La información sobre el efecto de la temperatura en esta especie es escasa, por lo que es importante continuar con este tipo de estudios en *O. bimaculoides* para identificar los ajustes lipídicos a los cambios térmicos.

La tolerancia térmica de los organismos se utiliza como un indicador de su capacidad para adaptarse a condiciones de estrés térmico (Paladino *et al.*, 1980), en la presente investigación, se propone el uso de este indicador para conocer el efecto de diferentes temperaturas de incubación sobre la condición de los juveniles de pulpo recién eclosionados.

Es importante evaluar el efecto de la temperatura de incubación sobre la tolerancia térmica y la composición de ácidos grasos en etapas tempranas de *O. bimaculoides*, ya que este factor influye directamente sobre la mayoría de los procesos biológicos (Leporati *et al.*, 2008) y desde el punto de vista del conocimiento aplicado, esta información podría utilizarse para el desarrollo de un cultivo experimental, considerando que este pulpo es un recurso con potencial y que existe interés en su cultivo.

## Capítulo 3. Hipótesis

---

- Los juveniles de pulpo *O. bimaculoides* recién eclosionados de huevos incubados a 16°C tendrán una menor tolerancia térmica que los organismos de 18 y 20°C.
- Los juveniles de pulpo *O. bimaculoides* recién eclosionados de huevos incubados a bajas temperaturas tendrán un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados.

## Capítulo 4. Objetivos

---

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las temperaturas de incubación de los huevos de *Octopus bimaculoides*, sobre la tolerancia térmica y la composición de ácidos grasos de los juveniles recién eclosionados.

### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la tolerancia térmica de los juveniles recién eclosionados de los huevos de *O. bimaculoides* incubados a 16,18 y 20°C, mediante la prueba de estrés térmico ascendente.
- Evaluar el efecto de la temperatura de incubación de los huevos sobre el peso de los juveniles recién eclosionados.
- Evaluar el efecto de la temperatura de incubación de los huevos sobre la composición de ácidos grasos de los juveniles recién eclosionados.

## Capítulo 5. Materiales y Métodos

---

### 5.1 Recolecta de organismos

Los pulpos fueron recolectados en Bahía Falsa, en la zona ostrícola localizada en 30°27'12.42" latitud norte y 116° 0'21.44" longitud oeste en el poblado de San Quintín, al sur de Ensenada, Baja California (Figura 2).



**Figura 2.** Ubicación del sitio de recolecta de los organismos *O. bimaculoides* en la Bahía de San Quintín, Baja California, México. Recuperado de <https://maps.google.com.mx>

Se capturaron 16 pulpos de la especie *O. bimaculoides* (7 machos y 9 hembras), los cuales se localizaron en la zona intermareal, sobre un sustrato lodoso, la captura se realizó manualmente y los organismos se colocaron en recipientes plásticos de 20 litros, a los cuales se les realizaron recambios de agua para mantener una buena calidad de la misma y controlar las variaciones de temperatura.

Para el transporte de los organismos al Departamento de Acuicultura del CICESE, los pulpos se colocaron en refugios individuales hechos con tubos de ABS de 15.2x20 cm (diámetro y longitud respectivamente), rodeados con malla sardinera, la cual fue cerrada con hilo de polietileno en un extremo y posteriormente fueron colocados dentro de bolsas de plástico con agua de mar y oxígeno a saturación dentro de una hielera.

## 5.2 Mantenimiento de Reproductores de Pulpo

Una vez en el laboratorio, los pulpos se colocaron de manera individual en tanques de 500 l con recirculación de agua y sin control de temperatura. Las hembras de pulpo tenían un peso húmedo promedio de  $76.8 \pm 19.59$  g y los machos de  $115.1 \pm 41.8$  g. El sistema de mantenimiento y cultivo constó de 14 tanques con capacidad de 500 l, los cuales fueron distribuidos en dos grupos y conectados individualmente a dos biofiltros operados por dos bombas de tipo Air-lift (impulsores aire-agua) con las cuales se distribuyó el agua a cada uno de los tanques. El suministro de oxígeno se proporcionó mediante aireación constante con difusores de aire. En cada uno de los tanques se registraron diariamente la concentración de oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), salinidad (ups) y temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), los cuales oscilaron entre  $8.18 \pm 0.03$   $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $35.33 \pm 0.03$  ups y  $17.52 \pm 0.14^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, para tal fin se utilizó un medidor multiparámetro YSI modelo 85. Semanalmente se evaluó la concentración de compuestos nitrogenados con un colorímetro HACH modelo DR/890, los cuales tuvieron valores para amoníaco de  $0.12 \pm 0.016$   $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , nitritos  $0.03 \pm 0.005$   $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y nitratos  $30.93 \pm 1.35$   $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . La limpieza de los tanques de experimentación y la alimentación de los pulpos se realizó cada 2 o 3 días, lo que dependía del consumo de alimento por parte del organismo. La alimentación fue a base de mejillones frescos, los cuales se agregaron *ad libitum*.

Diariamente se revisaron los organismos para observar si alguna de las hembras iniciaba con la puesta e incubación de los huevos, con el fin de trasladarla a los tanques de incubación ubicados en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura. El tiempo de mantenimiento de los reproductores, desde su llegada al laboratorio, hasta que iniciaron la puesta de los huevos fue de alrededor de 5 días.

En experiencias previas en el manejo de estos organismos en el Departamento de Acuicultura del CICESE, se ha observado que el periodo de ovoposición en las hembras de pulpo tiene una duración de cuatro a cinco días.

### **5.3 Incubación**

Una vez que los organismos terminaron de colocar los huevos, las cuatro hembras dentro del refugio con las puestas, se trasladaron al interior del laboratorio húmedo del Departamento y se ubicaron aleatoriamente en cuatro tanques circulares de fibra de vidrio de 400 l; durante el proceso del incremento de temperatura para fijar las condiciones de aclimatación, una de las hembras murió, por lo que este estudio se realizó con una hembra en cada una de las temperaturas de incubación.

Las hembras con sus huevos se mantuvieron de manera independiente en cada una de las temperaturas (16, 18 y 20°C). La temperatura de 20°C se controló con un calentador de titanio de 1000 W conectado a una caja de control, en el caso de la condición de 16°C, se utilizó un enfriador (Aqualogic Delta Star modelo DS-4) y la temperatura de 18°C se mantuvo con el sistema de enfriamiento del laboratorio húmedo. La aireación se mantuvo constante por medio de piedras difusoras conectadas al sistema general que abastece de aire al laboratorio húmedo del Departamento.

El criterio para elegir las temperaturas de aclimatación fue con base en un estudio previo sobre la temperatura preferida de los organismos realizado por Lecuanda-Ontiveros (2014), así como por la temperatura en la cual se encontraban los organismos al momento de la recolecta en el campo, que fue en promedio de  $19.8 \pm 0.94^\circ\text{C}$ .

Los refugios se revisaron de 8 a 10 días después de la eclosión, se contaron todos los huevos eclosionados y aquellos en donde se detuvo el desarrollo con el objetivo de estimar el tamaño de la puesta.

El alimento proporcionado a las hembras que se encontraban incubando los huevos consistió de mejillón fresco, aunque en la literatura se menciona que las hembras dejan de consumir alimento, las experiencias en el mantenimiento de estos organismos en el

Departamento de Acuicultura, indica lo contrario, ya que se ha observado que las hembras sí se alimentan durante esta etapa (comentario personal Dra. Hernández).

Diariamente se limpiaron los tanques para remover el alimento remanente, así como las conchas de mejillón. Además se efectuaron recambios de agua del 15% y se midieron los mismos parámetros fisicoquímicos que fueron mencionados en el apartado de mantenimiento de los reproductores y semanalmente se midió la concentración de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), nitritos y nitratos (Tabla 1).

**Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del agua durante el tiempo de incubación de los huevos de *O. bimaculoides*. Promedio  $\pm$  desviación estándar.**

Temperatura de incubación (°C)	Oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Salinidad (ups)	Amoniaco ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Nitritos ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Nitratos ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )
16.35 $\pm$ 0.37	8.10 $\pm$ 0.17	33.41 $\pm$ 0.26	0.14 $\pm$ 0.09	0.23 $\pm$ 0.30	19.1 $\pm$ 6.40
18.06 $\pm$ 1.15	7.77 $\pm$ 0.14	33.70 $\pm$ 0.32	0.24 $\pm$ 0.08	0.17 $\pm$ 0.16	13.3 $\pm$ 3.90
20.20 $\pm$ 0.12	7.29 $\pm$ 0.13	33.84 $\pm$ 0.33	0.32 $\pm$ 0.15	0.25 $\pm$ 0.16	15.3 $\pm$ 5.90

#### **5.4 Tolerancia térmica en juveniles recién eclosionados evaluada con la Temperatura Crítica Máxima (TCMax)**

Para conocer el efecto de la temperatura de incubación sobre la tolerancia de los juveniles de pulpo recién eclosionados, se utilizó el método dinámico, el cual consiste en incrementar o disminuir la temperatura del agua a una tasa constante hasta observar una respuesta característica que indica el punto final o subletal, que ha sido descrita como la temperatura crítica máxima. En este trabajo se consideraron los criterios establecidos por Higgins *et al.* (2012) y Noyola *et al.* (2013a).

Se realizaron 15 bioensayos por tratamiento, donde los organismos recién eclosionados se colocaron de manera individual dentro de un recipiente plástico transparente, el cual a su vez fue colocado dentro de un acuario con un volumen de agua de 24 litros, a la temperatura de incubación correspondiente (16,18 y 20°C). El acuario contaba con un

calentador de titanio de 1000 W sujeto a una piedra de aireación para difundir homogéneamente el calor, antes de iniciar el experimento. El juvenil se mantuvo 10 minutos hasta que detuvo su actividad natatoria, posteriormente se incrementó la temperatura del agua a una tasa constante promedio de  $1.0 \pm 0.02^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  hasta observar la serie de conductas asociadas al estrés térmico ascendente. Los comportamientos que se caracterizaron fueron el enroscamiento de brazos, cambio de color, espasmos musculares (contracción muscular repentina) y la pérdida del equilibrio, esta última respuesta fue definida por Cowles y Bogert (1944) como “el punto térmico en donde la actividad locomotora se desorganiza y el animal pierde la habilidad de escapar de las condiciones que lo llevarán rápidamente a la muerte”, este comportamiento ha sido utilizado para caracterizar a la TCM<sub>max</sub> (Lutterschmidt y Hutchison, 1997).

Una vez concluido el bioensayo, cada organismo se colocó dentro de un refugio individual (elaborado con tubo ABS de 15.2 cm de diámetro) y se transfirió inmediatamente al tanque con la temperatura de incubación correspondiente, para evaluar la supervivencia después de 48 horas.

### **5.5 Peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso orgánico (PO) de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides***

El peso húmedo se midió a partir de una muestra de 30 organismos por temperatura de incubación (16, 18 y 20°C), a los cuales se les quitó el exceso de agua sobre papel secante, se colocaron individualmente en una navecilla previamente pesada, para posteriormente cuantificar el peso en una balanza analítica (marca AND modelo ER-182A).

El peso seco total se obtuvo utilizando cajas de aluminio previamente prequemadas a 490°C y pesadas, en las cuales se colocaron los pulpos. Estas cajas se introdujeron en una estufa (marca Thermolyne modelo Oven series 9000) a 70°C hasta obtener el peso seco constante en una balanza analítica (marca AND modelo ER-182A).

Una vez obtenido el peso seco, las muestras fueron incineradas a 490°C durante 12 horas, posteriormente se pesaron para cuantificar el contenido de cenizas. El peso seco orgánico de la muestra se obtuvo por diferencia entre el peso seco total y el peso de las cenizas.

## **5.6 Análisis de ácidos grasos**

El análisis de los ácidos grasos fue realizado con 12 juveniles recién eclosionados para cada temperatura de incubación. Las muestras fueron liofilizadas por 24 horas en un equipo marca Virtis modelo freezemobile 12EL, en el Laboratorio de Nutrición y Fisiología del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC.

Para la extracción de los ácidos grasos se utilizó la metodología de esterificación directa propuesta por Sato y Murata (1988) utilizando las muestras liofilizadas y pesadas previamente. Se sometieron a metanólisis (derivatización) adicionando 2.5 ml de HCl: CH<sub>3</sub> OH durante 2.5 horas en baño maría a 85°C. Se utilizaron 3 ml de hexano grado HPLC para la extracción de los ácidos grasos metil esterificados. Posteriormente, los extractos de hexano que contenía los ácidos grasos se colocaron en viales, se secaron con nitrógeno gaseoso, se sellaron con tapa de teflón y se almacenaron a -20°C, para su posterior análisis.

Los extractos de ácidos grasos fueron resuspendidos en 0.5 ml con hexano grado HPLC, para su análisis en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en La Paz, Baja California Sur.

El análisis de los ácidos grasos se realizó por medio de cromatografía de gases/espectrometría de masas, utilizando un Cromatógrafo de Gases Espectrómetro de masas GCD 1800B. En el equipo se inyectó 1µl de muestra y se utilizó helio de alta pureza como gas transportador en una columna de sílica de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película (Omegawax 250).

La identificación de los ácidos grasos de las muestras se realizó mediante la comparación entre los tiempos de retención (TR) de los picos en los cromatogramas con los TR de los

picos de un patrón de una mezcla comercial de 37 estándares metil esterificados (Supelco 47885-U). De igual manera, la identificación de los ácidos grasos para las muestras se corroboró a través de los espectros de masas característicos para cada grupo de ácidos grasos.

Para la cuantificación de los ácidos grasos en las muestras se integró el área bajo la curva de los cromatogramas con el software Wsearch32. Los valores integrados se interpolaron con la curva de calibración que anteriormente se había realizado, para obtener las concentraciones en  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

## 5.7 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de Kolmogorov-Smirnov para el análisis de normalidad y para analizar la homogeneidad de varianzas de los datos se utilizó la prueba de Levene's. Para analizar los valores de peso húmedo, peso seco total, peso orgánico, las temperaturas donde se observaron las respuestas de estrés térmico de los juveniles recién eclosionados y los valores de ácidos grasos, se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA).

En los casos donde se encontraron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se aplicó una prueba *a posteriori* de Tukey. Todos los análisis se trabajaron con un nivel de significancia de 0.05.

Se utilizó el programa estadístico Statistica 7, para el análisis de los datos y para elaborar las gráficas.

## Capítulo 6. Resultados

---

El tamaño de la puesta (número de huevos) de cada hembra, así como el tiempo de incubación de los huevos en las tres temperaturas (T16, T18 y T20°C) se muestran en la tabla 2.

De las cinco hembras de pulpo que fueron recolectadas, solamente cuatro desovaron, de las cuales se utilizaron tres para el presente estudio. La primera hembra murió debido a que hubo un incremento en la temperatura del agua debido a la falla en el controlador de temperatura, esta hembra colocó 36 huevos al día 10 de iniciada la puesta y contenía 108 huevos en el ovario, lo que da un total de 144 huevos. De las hembras utilizadas para el presente estudio, el mayor número de huevos (377), se registró en la hembra mantenida en la temperatura de 20°C y con un menor tiempo de incubación (65 días), mientras que la hembra de la temperatura de 16°C fue la que puso el menor número de huevos (149), con un tiempo de incubación mayor, de 108 días.

Después de 8-10 días de iniciada la eclosión de los juveniles de pulpo en las tres temperaturas de incubación, se revisaron los refugios para cuantificar el número de huevos no desarrollados, de los cuales la hembra que se mantuvo a 18°C tuvo el mayor número (25), mientras que la hembra de 20°C tenía cinco huevos y a 16°C solamente en dos huevos se detuvo el desarrollo.

**Tabla 2. Tiempo de incubación de huevos de *O. bimaculoides* y tamaño de puesta (número de huevos) a las diferentes temperaturas de incubación: T16, T18 y T20°C.**

Temperatura de Incubación (°C)	Tiempo de incubación (días)	Tamaño de la puesta (Número de huevos)
T16	108	149
T18	97	302
T20	65	377

## 6.1 Tolerancia térmica en juveniles recién eclosionados

### 6.1.1 Comportamiento durante el ensayo de temperatura crítica máxima

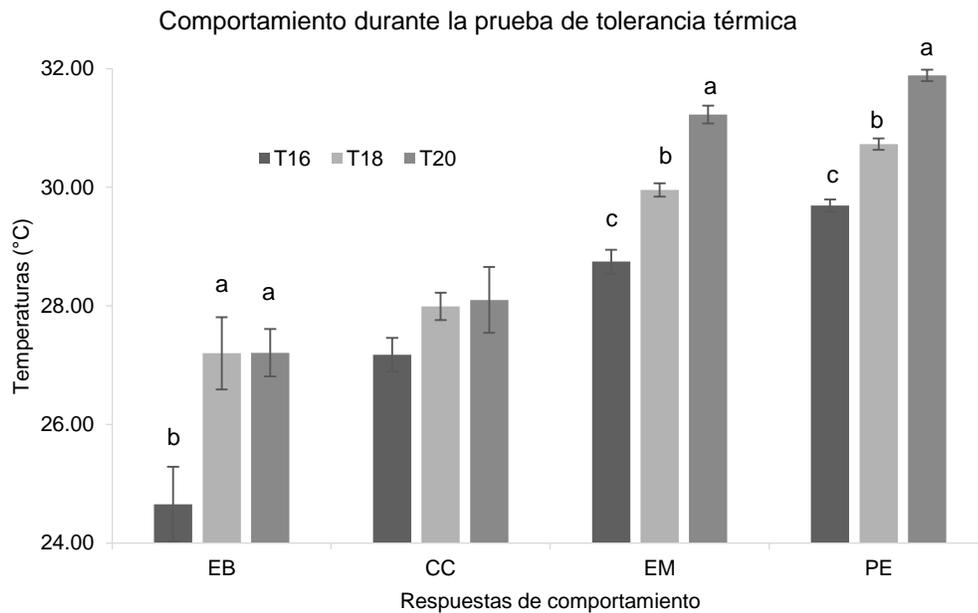
Durante los experimentos de tolerancia térmica, los organismos tuvieron una serie de comportamientos, de los cuales destacan el enroscamiento de los brazos (EB), cambio de color (CC), espasmos musculares (EM) y como punto final la pérdida de equilibrio (PE).

La primera conducta que se observó en respuesta al incremento de la temperatura fue el enroscamiento de brazos (EB), el cual se presentó en el 93.33% de los organismos. La temperatura promedio en la cual se observó este comportamiento para los organismos aclimatados a 16°C fue de 24.7°C (Figura 3). Este valor fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) del obtenido en los pulpos aclimatados a 18 y 20°C, que fue de 27.2°C, sin diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p > 0.05$ ).

El segundo comportamiento que se observó fue el cambio de color (CC) y se registró en el 80% de los pulpos expuestos al estrés térmico ascendente, a una temperatura promedio de 27.7°C, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los organismos incubados a 16, 18 y 20°C (Figura 3).

Los espasmos musculares (EM) se observaron en el 80% de los juveniles de pulpo; los valores muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tres temperaturas de incubación. En los organismos incubados a 16°C, los EM se observaron a una temperatura de 28.75°C, mientras que en los pulpos de 18 y 20°C, este comportamiento se observó en 29.95°C y 31.23°C respectivamente (Figura 3).

El último comportamiento que se observó y que se tomó como la respuesta que caracteriza a la TCMax de los juveniles del pulpo *O. bimaculoides*, fue la pérdida de equilibrio (PE); los valores muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tres temperaturas de incubación. La mayor tolerancia la tuvieron los organismos incubados a 20°C, ya que mostraron la PE a los  $31.89 \pm 0.10^\circ\text{C}$ , mientras que los pulpos de 18°C y 16°C presentaron este comportamiento a  $30.73 \pm 0.10^\circ\text{C}$  y  $29.69 \pm 0.10^\circ\text{C}$  respectivamente (Figura 3).



**Figura 3. Comportamiento de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20°C) durante los ensayo de tolerancia térmica. Promedio  $\pm$  error estándar. Letras diferentes, encima de las barras indican diferencias significativas. EB: enroscamiento de brazos, CC: cambio de color, EM: espasmos musculares, PE: pérdida de equilibrio.**

La TCMax de los juveniles de pulpo incubados a las tres temperaturas está separada, en promedio, solamente por 1°C, lo que indica que por cada dos grados de incremento en la temperatura de aclimatación hay un aumento de 1°C en la tolerancia térmica. Las diferencias térmicas entre la temperatura de incubación y el valor de la TCMax son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), los juveniles recién eclosionados e incubados a 16°C toleraron un mayor incremento de temperatura ( $13.7 \pm 0.10^\circ\text{C}$ ), mientras que en los de 18 y 20°C fue de  $12.7 \pm 0.09^\circ\text{C}$  y  $11.9 \pm 0.09^\circ\text{C}$  respectivamente (Figura 4).

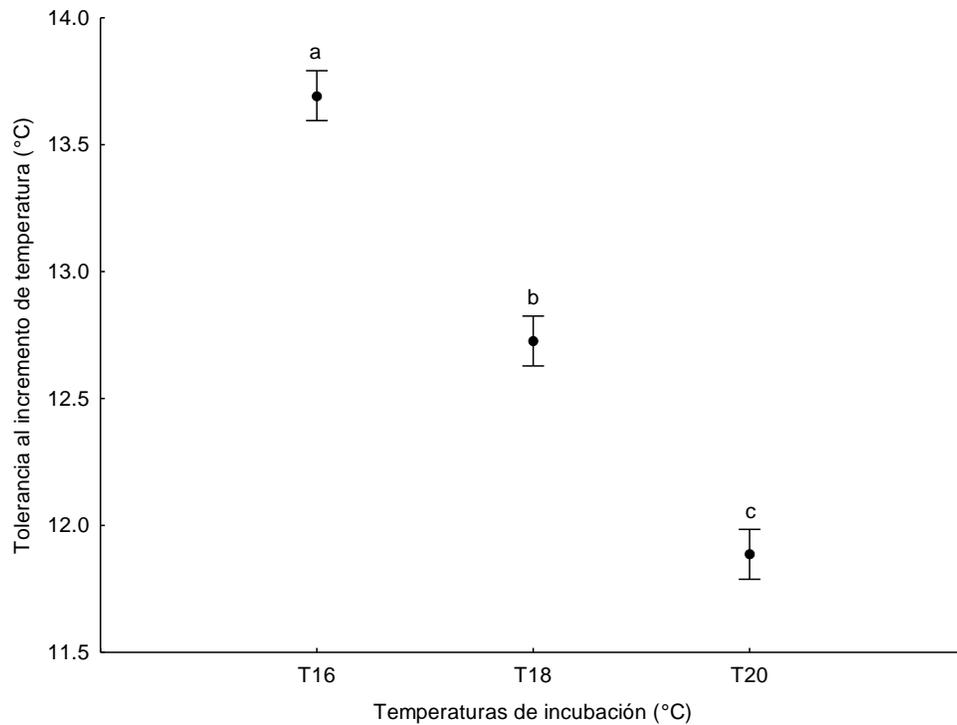
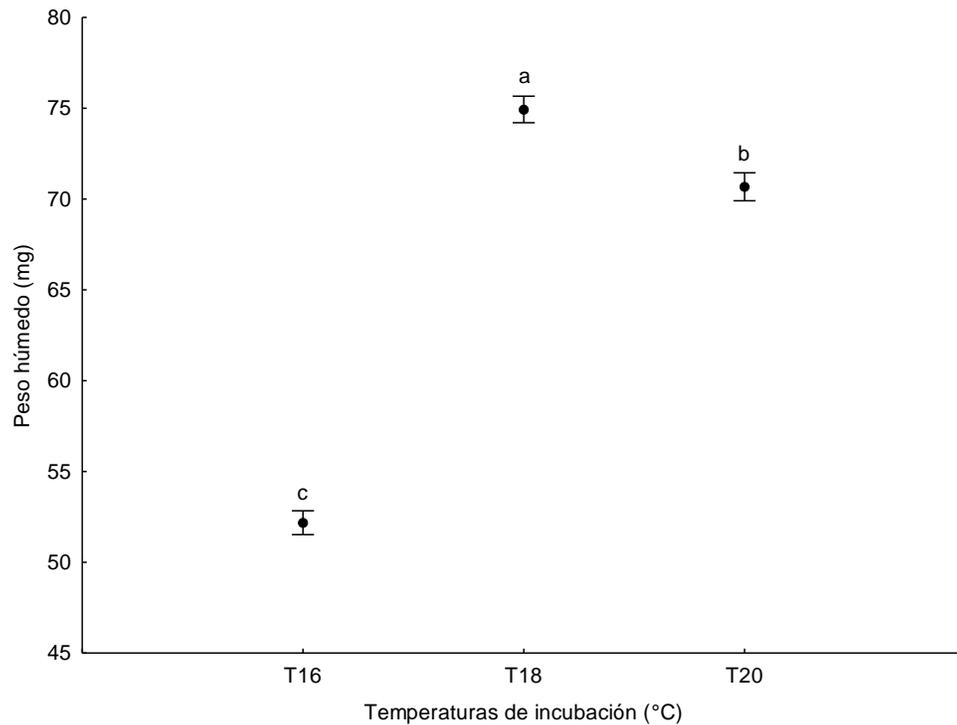


Figura 4. Tolerancia al incremento de temperatura de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20°C). Promedio  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas.

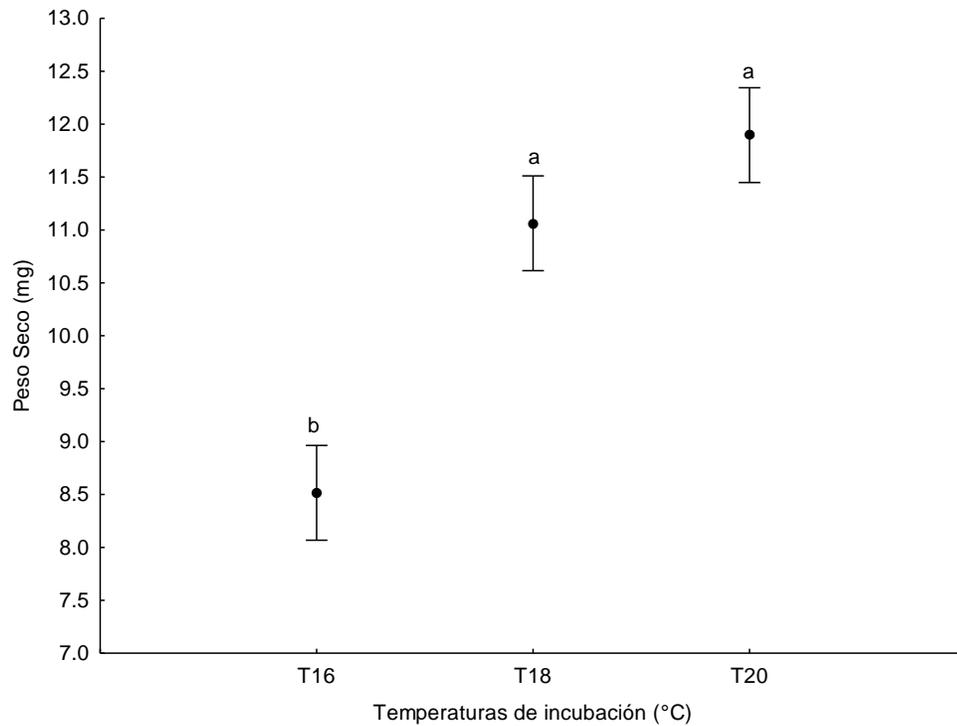
## 6.2 Peso húmedo (PH), peso seco total (PST) y peso orgánico (PO) de los juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides*

El peso húmedo (PH) de los juveniles recién eclosionados provenientes de huevos que fueron incubados a tres temperaturas mostró diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). En la temperatura de 16°C se observó el menor PH ( $52.2 \pm 0.53$  mg), el mayor peso se obtuvo en la temperatura de 18°C ( $74.9 \pm 0.90$  mg), mientras que a 20°C fue de  $70.7 \pm 0.74$  mg (Figura 5).



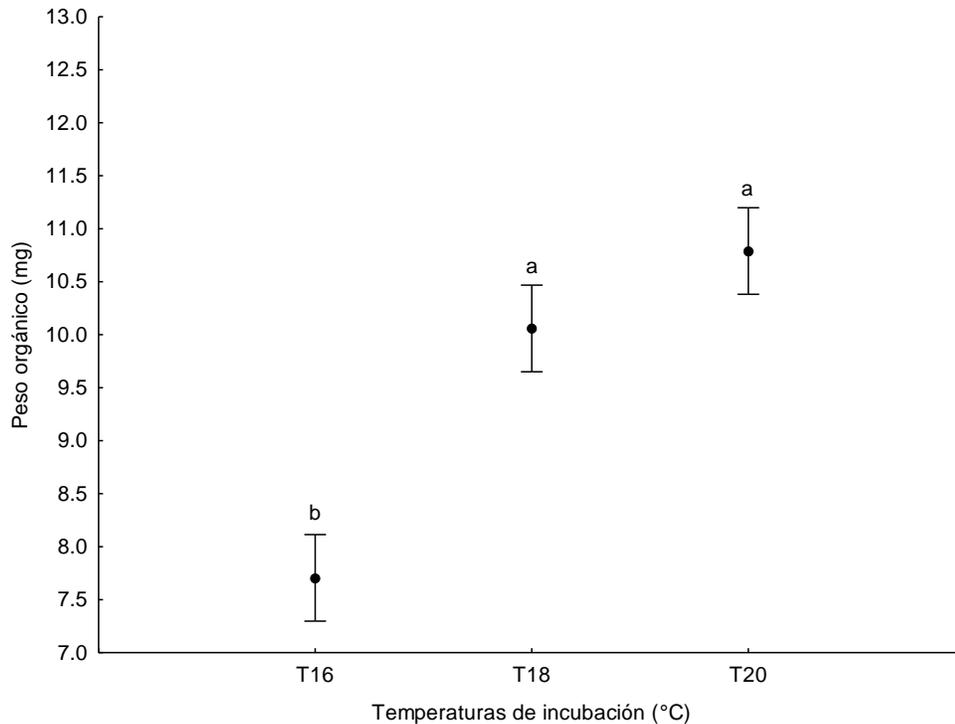
**Figura 5. Peso húmedo de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20 °C). Promedio  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas.**

En la Figura 6 se muestra el peso seco total de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* que fueron incubados a 16, 18 y 20°C. El menor PST promedio se obtuvo en la temperatura de 16°C, con  $8.52 \pm 0.23$  mg ( $p < 0.05$ ), mientras que en 18 y 20°C, el PST fue similar ( $11.06 \pm 0.62$  y  $11.90 \pm 0.41$  mg, respectivamente,  $p > 0.05$ ).



**Figura 6. Peso seco total (mg) de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20 °C). Promedio  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas.**

En la Figura 7 se muestra el peso orgánico (PO) de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* que fueron incubados a 16, 18 y 20°C. El peso orgánico promedio fue menor en los organismos incubados a 16°C, con  $7.70 \pm 0.20$  mg ( $p < 0.05$ ), mientras que en las temperaturas de 18 y 20°C el PO fue similar ( $10.06 \pm 0.56$  y  $10.79 \pm 0.39$  mg respectivamente,  $p > 0.05$ ).



**Figura 7. Peso orgánico (mg) de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* incubados a tres temperaturas (T16, T18 y T20 °C). Promedio ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas.**

### 6.3 Composición de ácidos grasos en juveniles de *O. bimaculoides*

En la tabla 3 se muestra el perfil y la concentración (porcentaje total) de los ácidos grasos identificados en los juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* para las tres temperaturas de incubación 16°C (T16), 18°C (T18) y 20°C (T20). Se presentan individualmente, así como en grupos, divididos en ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI).

La concentración de AGS, AGMI y AGPI en las tres temperaturas (T16, T18 y T20) no fueron estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ) (Tabla 3).

La concentración de ácido linoleico (18:2n6) fue menor en los organismos incubados a 16°C con un valor de 0.49% ( $p < 0.05$ ), con respecto a los tratamientos de 18 y 20°C, los cuales tuvieron valores similares, de 0.58% y 0.60% respectivamente.

El porcentaje del ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n3) fue mayor en T16 (21.87%) ( $p < 0.05$ ) que en las otras dos temperaturas, T18 y T20, que tuvieron concentraciones similares, 18.86% y 18.56% respectivamente (Tabla 3).

El contenido del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3) de los juveniles recién eclosionados fue mayor en la temperatura de T18°C (17.60%) que en la de T20°C (16.83%) ( $p < 0.05$ ). El contenido del tratamiento T16°C (17.46%) no tuvo diferencias significativas con respecto a los juveniles de los tratamientos T18 y T20 (Tabla 3).

La concentración del ácido araquidónico (ARA, 20:4n6) de los pulpos de los tratamientos T20 (7.85%) y T18 (7.74%) fue similar, pero mayor que los de la temperatura de 16°C (6.34%) ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

La relación DHA/EPA fluctuó en 1.07 y 1.25; mientras que la relación EPA/ARA estuvo en un intervalo de 2.14 a 2.75 en los organismos recién eclosionados e incubados a las tres temperaturas (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de juveniles de *O. bimaculoides* a las tres temperaturas de incubación 16°C (T16), 18°C (T18) y 20°C (T20). Error estándar entre paréntesis. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA). AGS: Ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados, DHA: Ácido docosahexaenoico EPA: Ácido eicosapentaenoico ARA: Ácido araquidónico.

Ácido graso	T16	T18	T20
	%		
C12:0	0.02 (0.00)	0.01 (0.00)	0.03 (0.02)
C14:0	1.06 (0.04)	1.21 (0.08)	1.39 (0.07)
C15:0	0.20 (0.01)	0.21 (0.01)	0.24 (0.01)
C16:0	16.5 (0.26)	16.00 (0.20)	15.22 (0.16)
C16:1n11	0.72 (0.01)	0.62 (0.01)	0.60 (0.01)
C16:1n9	0.32 (0.00)	0.25 (0.01)	0.25 (0.01)
C16:1n7	0.33 (0.01)	0.31 (0.02)	0.31 (0.02)
C16:1n5	0.24 (0.07)	0.15 (0.02)	0.21 (0.02)
aiC16:0	0.17 (0.00)	0.15 (0.00)	0.19 (0.01)
C17:0	1.4 (0.02)	1.47 (0.01)	1.31 (0.01)
C17:1n7	0.26 (0.02)	0.27 (0.02)	0.25 (0.01)
C18:0	9.38 (0.14)	9.19 (0.05)	9.28 (0.17)
C18:1n11	1.86 (0.04)	1.89 (0.03)	2.02 (0.03)
C18:1n9c+t	2.01 (0.02)	1.90 (0.03)	2.01 (0.15)
C18:1n7	1.55 (0.02)	1.45 (0.04)	1.70 (0.05)
C18:1n5	0.43 (0.01)	0.41 (0.01)	0.46 (0.01)
<b>C18:2n6</b>	0.49 (0.02) <b>b</b>	0.58 (0.02) <b>a</b>	0.60 (0.03) <b>a</b>
C19:0	0.14 (0.01)	0.19 (0.01)	0.19 (0.01)
C20:0	0.36 (0.04)	0.50 (0.04)	0.57 (0.05)
C20:1n11	1.28 (0.09)	1.40 (0.10)	1.59 (0.10)
C20:1n9	4.36 (0.07)	4.42 (0.04)	4.08 (0.07)
C20:1n7	0.43 (0.08)	0.54 (0.06)	1.19 (0.26)
C20:2n6	1.34 (0.20)	1.42 (0.19)	0.57 (0.04)
C20:2n3	0.37 (0.06)	0.78 (0.17)	1.29 (0.06)
<b>C20:4n6</b>	6.34 (0.18) <b>b</b>	7.74 (0.18) <b>a</b>	7.85 (0.23) <b>a</b>
C20:4n3	1.46 (0.19)	1.35 (0.11)	1.80 (0.27)
<b>C20:5n3</b>	17.46 (0.22) <b>ab</b>	17.60 (0.16) <b>a</b>	16.83 (0.16) <b>b</b>
C22:0	0.26 (0.00)	0.26 (0.00)	0.32 (0.01)
C22:1n11	2.56 (0.02)	2.58 (0.03)	2.41 (0.04)
C22:1n9	0.3 (0.01)	0.22 (0.00)	0.27 (0.01)
C22:2n6c	0.27 (0.01)	0.4 (0.01)	0.41 (0.01)
C22:2n6t	0.21 (0.01)	0.21 (0.01)	0.30 (0.01)
C22:4n6	0.71 (0.05)	1.29 (0.04)	1.06 (0.03)
C22:5n6	0.48 (0.05)	0.40 (0.01)	0.46 (0.02)
C22:5n3	1.92 (0.03)	2.99 (0.03)	2.95 (0.04)
<b>C22:6n3</b>	21.87 (0.22) <b>b</b>	18.86 (0.20) <b>a</b>	18.56 (0.18) <b>a</b>
C24:1n9	1.05 (0.06)	1.02 (0.06)	1.23 (0.05)
<b>Σ AGS</b>	29.49 <b>a</b>	29.20 <b>a</b>	28.74 <b>a</b>
<b>Σ AGMI</b>	17.71 <b>a</b>	17.43 <b>a</b>	18.58 <b>a</b>
<b>Σ AGPI</b>	52.93 <b>a</b>	53.62 <b>a</b>	52.68 <b>a</b>
<b>DHA/EPA</b>	1.25	1.07	1.10
<b>EPA/ARA</b>	2.75	2.27	2.14

## Capítulo 7. Discusión

---

Los estudios del efecto de la temperatura sobre la incubación de huevos de cefalópodos y en especial sobre el pulpo *O. bimaculoides* son escasos. En el presente trabajo se evaluaron tres temperaturas de incubación (16, 18 y 20°C) sobre la tolerancia térmica y el contenido de ácidos grasos de juveniles recién eclosionados.

El tiempo de incubación de los huevos está ligado con la temperatura en la cual se mantuvo la puesta, dado que conforme aumenta la temperatura, los días de incubación disminuyen (Boletzky, 1989). En este trabajo, los huevos de *O. bimaculoides* que fueron incubados a 16°C tuvieron un periodo de desarrollo de 108 días, en comparación con los que se mantuvieron a 18°C (97 días) y 20°C (65 días), lo que se debe a que la temperatura tiene una relación inversa en la duración del desarrollo embrionario de los cefalópodos (Caverivière *et al.*, 1999; Uriarte *et al.*, 2012), dado que la utilización de las reservas vitelinas es más lenta a temperaturas menores (Boletzky, 1994).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una tendencia similar a la observada para la duración del desarrollo embrionario de *O. vulgaris*, que tiene una clara relación inversa con la temperatura, dado que a 27°C la duración del desarrollo tuvo una duración entre 15 y 42 días, mientras que a 17°C la duración estuvo en el intervalo de 80 a 87 días (Caverivière *et al.*, 1999). De igual manera, en *O. mimus*, la duración del desarrollo embrionario y la cantidad de vitelo disminuyeron conforme aumentó la temperatura (Uriarte *et al.*, 2012).

En el pulpo *O. maya*, una especie que tiene desarrollo directo, como *O. bimaculoides*, se ha documentado que a mayores temperaturas de incubación el desarrollo se acelera; sin embargo, por encima de 26°C, al momento de la eclosión, los organismos tuvieron pesos menores, una mayor cantidad de vitelo remanente, así como una disminución de la tasa metabólica, lo cual indicó que esta temperatura afectó fisiológicamente el desarrollo del embrión, produciendo una eclosión prematura (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016). En los huevos de *O. bimaculoides* incubados a 16°C, se observó una eclosión prematura y algunos pulpos con vitelo remanente, es posible que durante la revisión de la puesta en las últimas semanas de incubación, los embriones que aún se encontraban dentro de los

huevos, percibieron el movimiento del refugio y este estímulo propició la contracción del organismo y el rompimiento del huevo.

La temperatura no solo afecta los procesos biológicos como los descritos anteriormente, también influye en la tolerancia de los organismos. En este sentido, se observó en los juveniles de *O. bimaculoides* que conforme la temperatura se incrementó en el ensayo de tolerancia térmica, los organismos mostraron una serie de conductas, como el enroscamiento de brazos, cambio de color, espasmos musculares y pérdida de equilibrio. Estos comportamientos fueron similares a los documentados para las paralarvas de *O. huttoni*, los cuales presentaron espasmos y cambio de color y de igual manera perdieron la habilidad de nadar a temperaturas de  $27.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$  (Higgins *et al.*, 2012).

En los juveniles de *O. maya*, Noyola *et al.* (2013a) describieron respuestas similares conforme se incrementó la temperatura, de las cuales eligieron como límite de tolerancia térmica el momento en que los organismos expulsaron tinta. En contraste, en *O. bimaculoides*, se definió la pérdida de equilibrio como el límite de la tolerancia, ya que esta especie no expulsó tinta durante los experimentos de estrés térmico ascendente. Probablemente la liberación de tinta que reportaron Noyola *et al.* (2013a) se presentó cuando el organismo se relajó totalmente porque ya estaba muerto. En el presente estudio con *O. bimaculoides*, se realizaron varios ensayos previos, con la intención de caracterizar las respuestas de comportamiento, algunos organismos se expusieron a temperaturas superiores al momento en el que se observó la PE y no se presentó la liberación de tinta. Además, para caracterizar la respuesta del TCMax en *O. bimaculoides*, se siguió el criterio de Beitinger y Bennet (2000), que hace mención del punto térmico, en donde la actividad locomotora se desorganiza y los pulpos pierden la habilidad de escapar de las condiciones que los llevarán rápidamente a la muerte.

Los resultados del presente trabajo y los reportados por diversos autores, han demostraron que la TCMax es especie específica y que depende de la temperatura de aclimatación; sin embargo, la serie de comportamientos que se desencadenan por el incremento de la temperatura, es similar entre los organismos (Lutterschmidt y Hutchison, 1997).

Los valores de temperatura donde se observó la PE y que caracteriza la TCMax de los juveniles recién eclosionados de *Octopus bimaculoides*, estuvo en el intervalo de 29.7°C a 31.9°C y están separadas en promedio 1°C entre las tres temperaturas de incubación. La diferencia entre el valor de la TCMax y la temperatura de incubación de los organismos, mostró que los juveniles recién eclosionados e incubados a 16°C toleraron un mayor incremento de temperatura ( $13.7 \pm 0.10^\circ\text{C}$ ), mientras que en 18 y 20°C fue de  $12.7 \pm 0.09^\circ\text{C}$  y  $11.9 \pm 0.09^\circ\text{C}$  respectivamente. Esta respuesta podría deberse a que los organismos mantenidos a bajas temperaturas tendrían un mayor margen de tolerancia térmica, lo cual en este caso en particular, pudiera conferir una ventaja para ocupar otros nichos térmicos. Sin embargo, hace falta complementar con estudios sobre el desempeño biológico de esta especie.

En los juveniles de *O. maya* aclimatados a 18, 22, 26 y 30°C, la TCMax caracterizada como la liberación de tinta, se observó a 31.8, 32.7, 34.8 y 36.5°C respectivamente (Noyola *et al.*, 2013a). Analizando estos datos, se observa que la diferencia entre los valores de TCMax fue de 0.9 a 2.1°C, destacando que los organismos aclimatados a 30°C mostraron una mayor tolerancia. Las diferencias entre la TCMax y la temperatura de aclimatación de *O. maya*, mostraron un patrón similar al de *O. bimaculoides*, es decir, la diferencia es más pequeñas conforme aumenta la temperatura de aclimatación.

Los juveniles de *O. bimaculoides* incubados a 18°C presentaron el mayor peso húmedo ( $74.9 \pm 0.90$  mg). Una tendencia similar fue observada por Caamal-Monsreal *et al.* (2016), quienes mencionan que el peso húmedo de *O. maya*, incubados a diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30°C) fue mayor en los pulpos mantenidos a 22°C, mientras que los organismos de 30°C presentaron el peso más bajo; los autores mencionan que esta temperatura puede causar modificaciones fisiológicas en el desarrollo de los embriones, como organismos con mayor contenido de vitelo y una tasa metabólica baja, lo cual ocasiona eclosiones prematuras.

Con respecto al peso seco total y orgánico de los organismos recién eclosionados, los resultados indican un menor PST y PO en los pulpos que provenían de huevos incubados a la temperatura más baja (16°C), los organismos mantenidos en esta condición, eran más pequeños, por lo que probablemente su metabolismo era más lento.

Con respecto a los valores obtenidos en la composición de ácidos grasos de los pulpos incubados en las tres temperaturas evaluadas, se puede observar que el ácido palmítico (16:0), EPA (20:5 n-3) y DHA (22:6 n-3) fueron los que se encontraron en mayor abundancia. Estos datos concuerdan con los trabajos de diversos autores para distintas especies de cefalópodos (Jangaard y Ackman, 1965; Culkin y Morris, 1970; Navarro y Villanueva, 2000). Navarro y Villanueva (2000) deducen que estos valores sugieren que los requerimientos de AGPI de cadena larga, como el EPA y DHA son muy altos para las paralarvas de *O. vulgaris*. Con base en este razonamiento, los resultados obtenidos en *O. bimaculoides*, podrían indicar en esta especie con desarrollo directo, sus requerimientos de AGPI de cadena larga son similares.

En el presente trabajo el 29% del total de ácidos grasos fueron saturados (AGS), mientras que 18% fueron monoinsaturados (AGMI) y 53% fueron poliinsaturados (AGPI). Datos similares fueron reportados por Navarro y Villanueva (2000) en tres especies de cefalópodos (*Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris* y *Octopus vulgaris*) incubados a 15.2°C en los que obtuvieron 25-35% de AGS, 9-14% de AGMI y 50% de AGPI.

El porcentaje de ácido linoleico (18:2 n-6) y ARA fue mayor en los pulpos incubados a 18 y 20°C y menor (0.49% y 6.34%) en los incubados a 16°C. Resultados similares fueron reportados para los juveniles de *O. maya*, el mayor contenido de ARA se registró con temperaturas de 22 y 26°C a diferencia de los organismos mantenidos a 18 y 30°C, por lo cual los autores sugieren que la demanda de este ácido graso fue menor en las temperaturas intermedias (22 y 26°C) (Noyola *et al.*, 2013b). Por su parte, Navarro y Villanueva (2000) observaron que cuando *O. vulgaris* se incubaba a 15.2°C su contenido de ARA es de 7.3%, similar al registrado en *O. bimaculoides*, sin embargo, sus resultados difieren para el ácido linoleico, el cual fue del 3.3%, lo cual podría indicar que el requerimiento de *O. bimaculoides* por éste ácido graso es menor al requerido por *O. vulgaris*, ya que este último presenta etapa de paralarva.

El ácido graso más abundante para los pulpos incubados a las tres temperaturas fue el DHA con 21.87% en los pulpos incubados a 16°C y en menor porcentaje en los incubados a 20°C, en los cuales fue del 18.56%. Navarro y Villanueva (2000) reportan un 21.2% de este ácido graso en juveniles de *O. vulgaris* recién eclosionados e incubados a 15.2°C y

mencionan que es importante para el desarrollo y sobrevivencia de esta especie. El DHA es importante en los organismos marinos y dulce acuícolas, debido a que es necesario para el desarrollo neuronal en etapas tempranas (Sargent *et al.*, 1999).

En este trabajo se observó una disminución de DHA y EPA conforme la temperatura de incubación aumento (20°C), sin embargo, autores como Miliou *et al.* (2006) en un trabajo con *O. vulgaris* observaron lo contrario, conforme la temperatura disminuyó el DHA y EPA disminuyeron en los pulpos de mayor crecimiento. Los autores atribuyen este resultado a que existe una mayor demanda de estos ácidos grasos para la síntesis de membranas y no para el mantenimiento de la permeabilidad de la membrana y su plasticidad. Al parecer el efecto que tiene la temperatura sobre la tasa de crecimiento es de suma importancia en la composición de ácidos grasos en los pulpos (Miliou *et al.*, 2006; Noyola *et al.*, 2013b). Por lo tanto, en este trabajo el peso de los pulpos *O. bimaculoides* al parecer juega un papel importante en la composición de ácidos grasos, al menos de DHA y EPA.

De igual manera, en *O. maya* la temperatura (18, 22, 26 y 30°C) tuvo un efecto en la composición de ácidos grasos, principalmente en los AGPI y particularmente DHA y ARA ya que fueron los que se encontraron en mayor porcentaje en los pulpos expuestos a 22°C y 26°C. Es posible que estas temperaturas ocasionaran una menor demanda por estos AG, en comparación con los pulpos mantenidos a 18°C y 30°C (Noyola *et al.*, 2013b).

En cuanto a la proporción DHA/EPA los pulpos de *O. bimaculoides* mostraron una relación de 1.07-1.25, la cual fue menor a la observada por otros autores (Miliou *et al.*, 2006; Navarro y Villanueva, 2000, 2003), quienes obtuvieron valores de 1.5 a 1.9 para *O. vulgaris*. En este sentido Okumura *et al.* (2005) mencionan que la proporción de DHA/EPA de 1.5 es la ideal para el crecimiento y desarrollo de las paralarvas de *O. vulgaris*, conclusión obtenida con base en estudios con pulpos silvestres y paralarvas alimentadas con diversas fuentes de alimento.

## Capítulo 8. Conclusiones

---

- La temperatura de incubación de 20°C redujo la duración del desarrollo embrionario de *Octopus bimaculoides* y propició la eclosión de juveniles con mayor peso seco y orgánico.
- La temperatura crítica máxima, caracterizada por la pérdida del equilibrio, fue de 29.7, 30.7 y 31.9°C para los juveniles de pulpo recién eclosionados provenientes de huevos incubados a 16, 18 y 20°C respectivamente.
- Los pulpos incubados a 18°C tuvieron el mayor peso húmedo ( $74.9 \pm 0.9$  mg), mientras que los organismos incubados a 16 y 20°C tuvieron pesos de  $52.2 \pm 0.53$  y  $70.7 \pm 0.74$  mg respectivamente.
- La concentración de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) en las tres temperaturas (16, 18 y 20°C) no fueron significativamente diferentes.
- Las temperaturas de incubación tuvieron un efecto en la composición de los AGPI. El porcentaje promedio de ARA (7.8%) fue mayor en los pulpos incubados a 18 y 20°C, el EPA registró el menor valor (16.8%) en los organismos incubados a 20°C y los juveniles de pulpo incubados a 16°C presentaron el valor más elevado para DHA (21.87%).

## Lista de referencias bibliográficas

- André, J., Pecl, G. T., Semmens, J. M. y Grist, E. P. (2008). Early life-history processes in benthic octopus: relationships between temperature, feeding, food conversion, and growth in juvenile *Octopus pallidus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 354(1), 81-92.
- Angilletta, M. J., Niewiarowski, P. H. y Navas, C. A. (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Thermal Biology*, 27(4), 249-268.
- Beitinger, T. L., Bennett, W. A. y McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental biology of fishes*, 58(3), 237-275.
- Boletzky, S. V. (1989). Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. *Adv. Mar. Biol.*, 25, 85-115.
- Boletzky, S. V. (1994). Embryonic development of cephalopods at low temperatures. *Antarctic Science*, 6(02), 139-142.
- Borradaile, L.A., Potts, F.A., Eastham, L.E.S., Saunders, J.T. y Kerkut, G.A. (1961). *The Invertebrata A manual for the use of students*. Fourth edition. Cambridge University Press. 820 p.
- Boyle, P. R. y Rodhouse, P.G. (2005). *Cephalopods: ecology and fisheries*. Blackwell Publishers. 452 p.
- Bureau, D.P. y Cho, C.Y. (1999). *Nutrition and feeding of fish*. OMNR Fish Culture Course, University of Guelph, Guelph, Ontario. 36 p.
- Campus México. (2013). El UMDI logra la cría de pulpos en Sisal. Recuperado de: <http://campusmexico.mx/2013/07/18/el-umdi-logra-la-cria-de-pulpos-en-sisal/>
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Díaz, F., Sánchez, A., Re, D. y Rosas, C. (2016). Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture*, 451, 156-162.
- Caverivière, A., Domain, F. y Diallo, A. (1999). Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). *Aquatic Living Resources*, 12(02), 151-154.
- Clarke, A. y Johnston, N.M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J. Animal Ecology*, 68, 893-905.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2013). *Anuario estadístico de acuacultura y pesca*. 295 p.
- Cowles, R.B. y Bogert, C.M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 83, 261-296.

- Culkin, F. y Morris, R. J. (1970). The fatty acids of some cephalopods. In *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* (Vol. 17, No. 1, pp. 171-174). Elsevier.
- Díaz Herrera, F., Sierra Uribe, E., Buckle Ramírez L.F. y Garrido Mora, A. (1998). Critical thermal maxima and minima of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae). *J. Thermal Biology*, Vol. 23, (No. 6,): pp 381-385 p.
- FAO. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados manual de capacitación. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/AB492S00.htm#TOC>
- FAO. (2014). El estado mundial de la Pesca y la acuicultura. Roma. 253 p.
- Folch, J., Lees, N. y Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 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.
- Fuentes, L. (2004). Técnicas de cultivo, marcado y repoblación del pulpo *Octopus vulgaris*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo. Galicia, España. 211 p.
- Hazel, J.R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation. *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 19-42.
- Hickman, C.P., Roberts, L.S., Keen S.L., Larson, A., l'Anson, H. y Eisenhour, D.J. (2008). *Integrated Principles of Zoology*. 14th ed. McGraw-Hill. 910 p.
- Higgins, F. A., Bates, A. E. y Lamare, M. D. (2012). Heat tolerance, behavioural temperature selection and temperature-dependent respiration in larval *Octopus huttoni*. *J. Thermal Biology*, 37(1), 83-88.
- Iglesias, J., Fuentes L. y Villanueva, R. (2014). *Cephalopod culture*. Springer. 494 p.
- Izquierdo, J., Otero, J.J., Moxica, C., Fuentes, L. y Sánchez F.J. (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture international*, 12, 481-487.
- Jangaard, P. M. y Ackman, R. G. (1965). Lipids and component fatty acids of the Newfoundland squid, *Illex illecebrosus* (Le Sueur). *J. Fisheries Board of Canada*, 22(1), 131-137.
- Jereb, P., Roper C. F. E., Norman, M.D. y Finn J. K. (2013). *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3. Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. Rome, FAO, 370p. Revisado 26 de Enero 2014 en: <http://www.fao.org/docrep/019/i3489e/i3489e.pdf>*

- Lecuanda-Ontiveros, M. (2014). Preferencia térmica del pulpo *Octopus bimaculoides*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 41 p.
- Lemus, M.J., Chung, K.S. y Holt, G.J. (1993). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de juveniles de *Petenia kraussii* (Pisces: Cichlidae): Relación ARN/ADN. *Revista Biología Tropical*, 41(1), 45-48.
- 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(4), 375-385.
- López, L. (2000). Estudian mejoras en pulpo. Pesca. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Gaceta Universitaria en; <http://www.gaceta.udg.mx/Hemeroteca/paginas/148/10-148.pdf>
- Lutterschmidt, W.I. y Hutchison, V.H. (1997). The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian J. Zoology*, 75, 1561-1574.
- Martínez, M.R., Lango, R.F., Castañeda, C.R., Duma, S., Zavala, L.I., Contreras, O.M., Flores M.L. y Moguel H.I. (2014). Efecto de la temperatura en el desarrollo larvario del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* en cautiverio. En: Gaspar-Dillanes, M.T., Huidobro-Campos, L., Ramírez-Santiago, C.E. y Mallen-Rivera, C. Editores. 2014. Memorias de la Reunión Nacional de Innovación Acuícola y Pesquera. Octubre 2014. Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 129 p. Recuperado el 7 de Abril del 2015 de [http://reunionesnacionales.org.mx/2014/docs/memorias/memoria\\_acuicola.pdf](http://reunionesnacionales.org.mx/2014/docs/memorias/memoria_acuicola.pdf)
- Miliou, H., Fintikaki, M., Tzitzinakis, M., Kountouris, T. y Verriopoulos, G. (2006). Fatty acid composition of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. *Aquaculture*, 256, 311-322.
- Mora, C. y Maya, M.F. (2006). Effect of the rate of the temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *J. Thermal Biology*, 31, 337-341.
- Mora-Zamacona, P. (2015). Estimación de edad y crecimiento de *Octopus bimaculoides* (Pickford y Mcconnaughey, 1949) con base en la lectura de marcas de crecimiento en picos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 57 p.
- NRC (National Research Council). (2011). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academic Press, Washington, DC 360 pp.
- 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), 161-177.
- Navarro, J.C. y Villanueva, R. (2003). The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation 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. *J. Thermal Biology*, 38, 14-19.
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A. y Rosas, C. (2013b). Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition or early juveniles of *Octopus maya*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 445, 156-165.
- Paladino, F. V., Spotila, J.R., Schubauer, J.P. y Kowalski, K.T. (1980). The critical thermal maximum: a technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fishes. *Can. Biol Rev.*, 39, 115-122.
- Randall, D., Burggren, W. y French, K. (1998). Fisiología animal. Cuarta edición. Mcgraw-Hill Interamericana. 790 p.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., y Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177(1), 191-199.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), (2008). Programa Rector Nacional de Pesca y Acuicultura Sustentables, Recuperado de: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/programa\\_rector\\_nacional\\_de\\_pesca\\_y\\_acuicultura\\_su](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/programa_rector_nacional_de_pesca_y_acuicultura_su)
- Tsuchida, S. (1995). The relationship between upper temperature tolerance and final preferendum of Japanese marine fish. *J. Thermal Biology*, 20, 35-41.
- Uriarte, I., Iglesias, J., Domingues, P., Rosas, C., Viana, M. T., Navarro, J. C., y Godoy, F. (2011). Current status and bottle neck of octopod aquaculture: the case of American species. *Journal of the world aquaculture society*, 42(6), 735-752.
- Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M., Zúñiga, O., Olivares, A., Carbonell, P., y Rosas, C. (2012). Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 416, 168-175.
- Villanueva, R. y Norman, M.D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanography and marine biology: An annual review*, 46, 105-202.