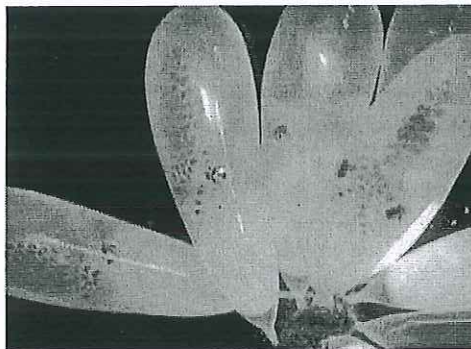


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**"AVANCES SOBRE EL CULTIVO Y NUTRICION DE PULPO
MANCHADO (*Octopus bimaculoides*) EN BAJA CALIFORNIA,
MÉXICO"**



T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

OC. YESIKA SOLORZANO SALAZAR

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

Septiembre 2009



RESUMEN

El pulpo manchado, *Octopus bimaculoides*, es una especie bentónica de aproximadamente 60 cm. de longitud en su etapa adulta, que se encuentra en la zona submareal e intermareal de las costas del Océano Pacífico. Se distribuye desde Santa Bárbara, California, EUA, hasta la Península de Baja California, México. Se pueden encontrar en zonas rocosas y generalmente a menos de 30 m de profundidad. *O. bimaculoides* crece 800 g como máximo y vive entre 1.0 a 1.5 años. Presenta huevos grandes y con desarrollo directo, sin pasar por estadio larval. Uno de los factores más importantes que han impedido el desarrollo de la acuicultura de cefalópodos a escala comercial es la dependencia a dietas naturales para su alimentación. Es de vital importancia conocer los requerimientos nutricionales de *O. bimaculoides* para poder explorar la posibilidad de que el pulpo de nuestras costas sea un recurso con factibilidad de cultivo comercial. En el presente trabajo se obtuvo información sobre: a) conducta de apareamiento; b) tiempo de animación de las hembras; c) número de huevos por puesta por hembra; d) periodo (número de días) en el cual los juveniles tempranos requieren de alimento vivo; e) preferencias alimenticias de juveniles en cautiverio; f) cultivo de juveniles tempranos de dicha especie.

Las puestas obtenidas en este trabajo se lograron en verano entre los meses de julio, agosto y septiembre del 2007, después de la colocación de la puesta por la hembra dentro del refugio, estos permanecieron al cuidado de la misma, la cual los limpio y aireó durante aproximadamente 2 meses de incubación, al eclosionar, los juveniles fueron alimentados con distintas presas tanto vivas como inertes (artemia adulta y recién eclosionada, miscidáceos congelados, jaiba fresca, pescado fresco, calamar congelado, mejillón), también se ofreció *Artemia salina* viva enriquecida (con Algamac 3050 o *Spirulina maxima*) y sin enriquecer durante los primeros 15 días después de la eclosión. Se pudo observar que a diferencia de otras especies como *Octopus vulgaris* y *Octopus maya* que necesitan zoea o miscidáceos vivos para sobrevivir los primeros días de vida, en el caso de *O. bimaculoides* se observó una mortalidad de 0 a 10% alimentando solo con artemia. Se midió la actividad enzimática de tripsina, quimiotripsina, amilasa, lipasa



y proteasas alcalinas totales a lo largo del experimento y se midió el perfil de aminoácidos presentes en el alimento vivo y los organismos después del periodo experimental. La actividad enzimática reflejó un comportamiento variable, a lo largo de 20 días de experimentación, mostrando una mayor actividad de tripsina, sobre la quimiotripsina. Sin embargo y a pesar de algunas deficiencias de aminoácidos esenciales (metionina y lisina) se obtuvieron crecimientos de hasta 5.6 ± 0.1 mg/día alimentando con artemia enriquecida con Algamac 3050, así como, bajas mortalidades (0%) para organismos alimentados con artemia sin enriquecer.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

**"AVANCES SOBRE EL CULTIVO Y NUTRICION DE PULPO
MANCHADO (*Octopus bimaculoides*) EN BAJA CALIFORNIA,
MÉXICO"**

T E S I S

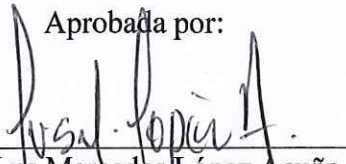
**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

YESIKA SOLORZANO SALAZAR

Aprobada por:



Dra. Lus Mercedes López Acuña

Director de tesis



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes

Sinodal



M.C. Conal David True

Sinodal



DEDICATORIA

A mi familia porque gracias a su apoyo incondicional he logrado salir adelante, gracias por el esfuerzo, por la educación y las palabras de aliento que siempre me brindaron. Sin su apoyo no estaría aquí.

Gracias por todo. LOS AMO



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de esta Maestría en Ciencias en Oceanografía Costera.

A la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC por todo el apoyo otorgado

A la Dra. Lus M. López Acuña por ser como mi segunda mamá por apoyarme en todos mis logros académicos y personales. Gracias Lucy.

Al Dr. Juan Gabriel Correa Reyes por los buenos consejos y comentarios durante estos años, por ser un gran amigo y jefe. Gracias Gabito.

Al Dr. Carlos Rosas por el tiempo, los comentarios y buenos consejos a esta tesis, por ayudarme tanto en la publicación del artículo.

A la Dra. María Teresa Viana por el apoyo incondicional en la realización de los análisis y la publicación del artículo, así como abrirme las puertas de su laboratorio.

Al M.C. Conal D. True por siempre apoyarme, permitirme estar en su laboratorio y por los buenos consejos.

Al M.C. Marco Aurelio por su enorme paciencia, dedicación y enseñanza en el laboratorio.

Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte por permitirme utilizar su equipo de laboratorio para los análisis de muestras.

A los Ocean. Javier García Pámanes y Luis Enrique García Pámanes por donar las microalgas y artemias que permitieron que este trabajo saliera adelante.

A los chicos del laboratorio de totoabas, Gerardo, Miguel, Ivan y Rafa por todo el apoyo y los buenos momentos.

A los chicos de servicio social y profesional, Karla y Christian, por su amistad y colaboración en el mantenimiento de los pulpos. A Miriam, Arturo y Griselda por su dedicación y apoyo.

Al M.C. Daniel Badillo, gracias por todo el apoyo, las alegrías y buenos momentos juntos.

A todos los buenos amigos de la Maestría. Gracias por los buenos ratos y locuras.

A TODOS MIL GRACIAS



INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
Características de la especie	4
Alimentación de cefalópodos	5
Antecedentes	13
Enzimas digestivas	14
Requerimientos de proteínas (Aminoácidos)	16
II. OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares	16
III. METODOLOGÍA	17
3.1 Adquisición de organismos y obtención de juveniles de <i>O. bimaculoides</i>	17
3.2 Preferencias alimenticias de juveniles (alimento vivo e inerte)	18
3.3 Análisis enzimático y perfil de aminoácidos de juveniles tempranos	20
Parámetros de crecimiento	21
Análisis químicos	21
Perfil de aminoácidos	23
Lípidos totales	24
3.4 Reproducción	24
3.5 Análisis estadístico	25
IV. RESULTADOS	26
4.1 Adquisición de organismos y obtención de juveniles de <i>O. bimaculoides</i>	26
4.2 Preferencias alimenticias de juveniles (alimento vivo e inerte)	31
4.3 Crecimiento de juveniles alimentados con <i>Artemia salina</i> enriquecida y sin enriquecer	32
4.4 Análisis enzimático y perfil de aminoácidos de juveniles tempranos	34
V. DISCUSIÓN	41
5.1 Preferencias alimenticias de juveniles (alimento vivo e inerte)	47
5.2 Crecimiento de juveniles alimentados con <i>Artemia salina</i> enriquecida y sin enriquecer	48
5.3 Análisis enzimático y perfil de aminoácidos de juveniles tempranos	51
VI. CONCLUSIONES	54
VII. LITERATURA CITADA	55



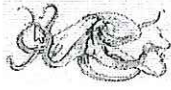
INDICE DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
Figura 1.	Foto tomada de www.cephbase.utmb.edu para mostrar la diferencia de tamaños entre especies con huevos pequeños (<i>O. bimaculatus</i> , A) y especies con huevos grandes (<i>O. bimaculoides</i> , B).	2
Figura 2.	Distribución geográfica de <i>O. bimaculoides</i> .	5
Figura 3.	Vasos plásticos de 1 L de capacidad con refugios en forma vertical.	19
Figura 4.	Estadios de desarrollo de <i>O. bimaculoides</i> obtenidos a partir del presente estudio. A) 14 días de edad; B) 31 días de edad; C) 45 días de edad; D) 54 días de edad.	26
Figura 5.	Huevos de <i>O. bimaculoides</i> unidos a un cordón mucilaginoso.	27
Figura 6.	Secuencia de cambios de coloración de <i>O. bimaculoides</i> sin eclosionar.	27
Figura 7.	<i>O. bimaculoides</i> recién eclosionado con saco vitelino sin reabsorber.	28
Figura 8.	Macho de <i>O. bimaculoides</i> (A) colocando su tercer brazo hectocolizado en la cavidad del manto de la hembra, quien estaba dentro del refugio.	30
Figura 9.	Imagen de una Hembra de <i>O. bimaculoides</i> protegiendo su puesta, dentro de un refugio (tubo de PVC de 2").	30
Figura 10.	Porcentaje de sobrevivencia de juveniles de 30 días de edad, alimentados con jaiba, mejillón, pescado y calamar.	32
Figura 11.	Actividad enzimática de quimiotripsina (U/mg/proteína/hr) en juveniles de <i>Octopus bimaculoides</i> alimentados con <i>Artemia salina</i> enriquecida (<i>Spirulina</i> sp y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días.	35
Figura 12.	Actividad enzimática de tripsina (U/mg proteína/hr) en juveniles de <i>Octopus bimaculoides</i> alimentados con <i>Artemia salina</i> enriquecida (<i>Spirulina</i> sp y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días.	36
Figura 13.	Actividad enzimática de proteasas alcalinas totales (%) en juveniles de <i>Octopus bimaculoides</i> alimentados con <i>Artemia salina</i> enriquecida (<i>Spirulina</i> sp y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días.	37
Figura 14.	Actividad enzimática de amilasa (mg/ml) en juveniles de <i>Octopus bimaculoides</i> alimentados con <i>Artemia salina</i> enriquecida (<i>Spirulina</i> sp y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días	38
Figura 15.	Actividad enzimática de lipasa (U/mg proteína/hr) en juveniles de <i>Octopus bimaculoides</i> alimentados con <i>Artemia salina</i> enriquecida (<i>Spirulina</i> sp y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días	39



INDICE DE TABLAS

Número	Descripción	Página
Tabla I.	Clasificación taxonómica de <i>Octopus bimaculoides</i>	4
Tabla II.	Cantidad de huevos colocados por puesta, pesos de hembras (g) y tiempo de anidación (días).	31
Tabla III.	Peso inicial y final (mg), tasa de crecimiento (mg/d), tasa de crecimiento específico (TCE, %/día), incremento total de crecimiento (%) y mortalidad (%) de juveniles de <i>Octopus bimaculoides</i> alimentados durante 20 días con <i>Artemia salina</i> enriquecida con AlgaMac-3050 (EA) o Spirulina (ES) y sin enriquecer (SinE).	33
Tabla IV.	Contenido de lípidos (% peso seco) del alimento vivo utilizado (<i>Artemia salina</i>) y de organismos enteros de juveniles de <i>Octopus bimaculoides</i> antes y después de ser alimentados con <i>Artemia salina</i> enriquecida (Spirulina (ES) o AlgaMac-3050 (EA)) y sin enriquecer (SinE).	34
Tabla V.	Perfil de aminoácidos esenciales (AAE) y no esenciales (AANE) (mg de AA/g proteína) de <i>Artemia salina</i> y juveniles de <i>Octopus bimaculoides</i> alimentados durante 20 días con <i>Artemia salina</i> enriquecida con Spirulina (ES) o AlgaMac-3050 (EA) y sin enriquecer (SinE).	40

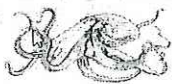


I. INTRODUCCIÓN

El pulpo es un molusco perteneciente a la clase de los cefalópodos, la cual incluye calamares, jibias, nautilus y sepias (Hickman *et al.*, 1999; Rocha, 2003). Los pulpos ocupan un importante papel en el ecosistema marino. Son depredadores activos de diversas especies de peces, crustáceos y otros grupos. Así mismo, ellos son depredados por mamíferos marinos, peces y aves, constituyendo un eslabón clave de las cadenas alimenticias. Todos los pulpos son organismos marinos, y los fósiles hallados indican que siempre lo fueron (Boyle, 1983; Hickman *et al.*, 1999; Rocha, 2003). En el presente ocupan todos los océanos y la mayor parte de los mares del mundo, desde la superficie hasta profundidades superiores a 7,000 m. (Rocha, 2003).

En general, se puede considerar a los cefalópodos como uno de los grupos que puede alcanzar las mayores tasas de crecimiento las cuales varían entre 3% y 10% de su peso al día en adultos (Lee, 1994; Lee *et al.*, 1991; Rocha, 2003) y de 10% a 20% por día en estadios tempranos de su ciclo de vida, pero con una esperanza de vida relativamente corta (Domingues *et al.*, 2001). La mayoría de las especies vive aproximadamente un año, aunque pueden darse casos de especies que se cree que viven hasta cinco. Tanto el crecimiento como la esperanza de vida parecen estar en directa relación con las variaciones de las condiciones ambientales (Rocha, 2003).

Los pulpos son carnívoros voraces que comen preferentemente por la noche. Para detectar las presas usan fundamentalmente los ojos, pero también el tacto, y sus técnicas de captura son diversas y se modifican en consonancia con el tipo de presas de que se trate (Rocha, 2003).



Se ha demostrado que los pulpos son altamente adaptables al ambiente del laboratorio (Boletzky y Hanlon, 1983), gracias a esto, y debido a sus altas tasas metabólicas, presentan tasas de conversión de alimento del 20 al 80%, siendo entre las más altas del reino animal (Van Heukelem, 1977; Rocha, 2003), lo que los convierte en organismos con una alta factibilidad para el cultivo a nivel comercial.

La mayoría de las especies de pulpos presentan huevos pequeños (Figura 1) y larvas planctónicas. Sin embargo, existen especies que presentan huevos grandes y con desarrollo directo y que además aceptan dietas inertes después de las primeras fases de desarrollo, lo que las hace atractivas para la acuicultura principalmente a nivel comercial.

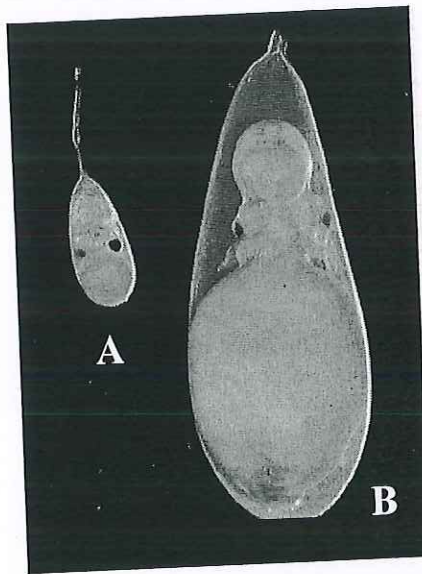


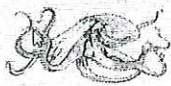
Figura 1. Foto tomada de www.cephbase.utmb.edu para mostrar la diferencia de tamaños entre especies con huevos pequeños (*O. bimaculatus*, A) y especies con huevos grandes (*O. bimaculooides*, B).



En el ámbito mundial el pulpo es de los recursos pesqueros más tradicionales, ha sido explotado por más de 2,000 años. En México la pesca comercial de pulpos se encuentra establecida fundamentalmente en las costas del Golfo de México y Mar Caribe; está basada principalmente en 5 especies: *O. maya* y *O. vulgaris* en el Golfo de México; *O. macrocopus*, *O. bimaculatus*, *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum* en el Pacífico (Voss y Solís, 1966; SEMARNAP, 1999; CONAPESCA e ITESM, 2004).

En el caso particular del Pacífico mexicano, no existen estudios biológicos ni de tecnología de captura, industrialización y comercialización por lo que no ha llegado a desarrollarse plenamente su pesquería.

Aunque en la mayoría de los casos los organismos se han adaptado al cautiverio, la alimentación es un aspecto fundamental en la sobrevivencia y crecimiento (Iglesias *et al.*, 2000). A pesar de la abundancia trófica, los bivalvos y crustáceos constituyen la dieta más importante de los pulpos y han sido ofrecidos exitosamente durante sus diferentes estadios de vida en los cultivos (Iglesias *et al.*, 2000, Aguila *et al.*, 2007).



Características de la especie

Tabla I. Clasificación taxonómica de *O. bimaculoides*.

Clasificación taxonómica	
Reino	<u>Animalia</u>
Phylum	<u>Mollusca</u>
Clase	<u>Cephalopoda</u> , Cuvier, 1798
Subclase	<u>Coleoidea</u> , Bather, 1888
Superorden	<u>Octopodiformes</u> , Young, 1998
Orden	<u>Octopoda</u> , Leach, 1818
Suborden	<u>Incirrina</u> , Grimpe, 1916
Familia	<u>Octopodidae</u> , Orbigny, 1845
Subfamilia	<u>Octopodinae</u> , Grimpe, 1921
Género	<u>Octopus</u> Cuvier, 1797
Especie	<i>Octopus bimaculoides</i> , Pickford/McConnaughey, 1949

El pulpo manchado, *O. bimaculoides*, es una especie bentónica, de aproximadamente 60 cm. de longitud en su etapa adulta, la cual se encuentra en la zona submareal e intermareal de las costas del Océano Pacífico. Se distribuye desde California, E.U. (Santa Bárbara) hasta la Península de Baja California, México (San Quintín) (Figura 2). Esta especie prefiere arenas y limos como hábitat, sin embargo, se pueden encontrar en zonas rocosas y generalmente a menos de 30 m de profundidad. *O. bimaculoides* crece 800 g como máximo y vive entre 1.0 a 1.5 años. Presenta huevos grandes y con desarrollo directo, sin pasar por estadio larval. Prefiere temperaturas entre 12-25°C con una temperatura óptima para la reproducción de 18°C (National Resource Center for Cephalopods; Forsythe y Hanlon, 1988 a, b).

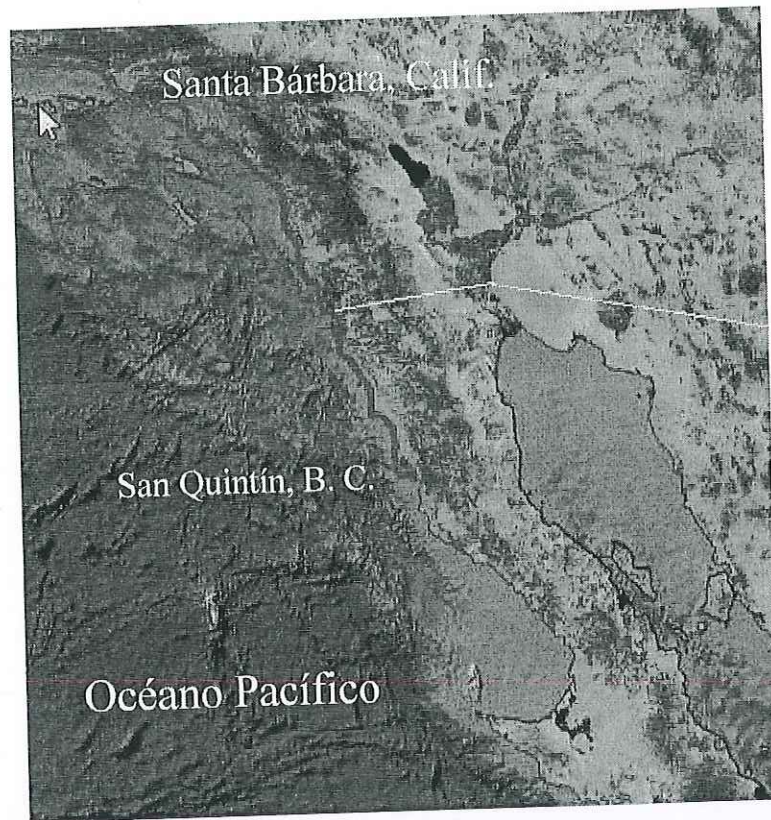
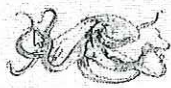
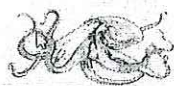


Figura 2. Distribución geográfica de *O. bimaculoides*.

Esta especie es capturada en las costas de Baja California por medio de la pesca artesanal, principalmente durante el periodo de invierno (Carta Nacional Pesquera, 2004). A pesar de soportar importantes pesquerías locales, los conocimientos sobre los aspectos generales del ciclo de vida son escasos.

Alimentación de cefalópodos

El alimento balanceado de estadios tempranos de cefalópodos está aún sin resolver y actualmente los cultivos a escala experimental usan presas vivas con el fin de



obtener éxito. Aunado a los problemas relacionados al tamaño y la cantidad de alimento, existen otros problemas asociados con la calidad del mismo. Estudios previos sobre la composición bioquímica de estadios tempranos de cefalópodos han sido llevados a cabo como primeras aproximaciones para determinar los requerimientos alimenticios en lo que respecta a lípidos y aminoácidos, tratando de enriquecer tanto presas vivas (artemia), como alimento formulado (microdietas), que cubran el comportamiento de alimentación y las necesidades nutricionales de las paralarvas (Villanueva, 1995; Villanueva *et al.*, 1996, 2004; Navarro y Villanueva, 2000 y 2003).

Por su parte, el pulpo común, *O. vulgaris* tiene una distribución cosmopolita y un alto precio en el mercado. Esta especie tiene un alto potencial para la acuicultura, sin embargo las técnicas de cultivo después de la eclosión (día cero, paralarva) y de asentamiento no han sido establecidas y esto ha limitado el desarrollo de la acuicultura de la especie (Iglesias *et al.*, 2000; Vaz-Pires *et al.*, 2004).

El cultivo de paralarvas es posible a escala de laboratorio siendo alimentadas con crustáceos del medio natural (Itami *et al.*, 1963) o cultivando zoeas de cangrejo (Villanueva, 1995), a pesar de esto, las razones de sobrevivencia durante el estadio de asentamiento son relativamente bajas (8.0% y 8.9%, respectivamente). Existen otras fuentes de alimento como la artemia, la cual está disponible para organismos acuáticos y que ha sido utilizada como alimento inicial en paralarvas de pulpo. Así, estudios donde se ha alimentado con artemia al final del estadio de paralarva han tenido éxito, sin embargo, se ha encontrado que alimentar solo con artemia provoca una baja sobrevivencia en los juveniles de pulpo (Hamasaki *et al.*, 1991; Hamasaki y Takeuchi, 2000).



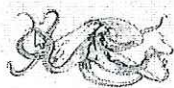
Uno de los factores más importantes que han impedido el desarrollo de la acuicultura de cefalópodos a escala comercial es la dependencia a dietas naturales vivas para su alimentación, ya que en su cultivo más del 50% del trabajo está asociado a la captura, mantenimiento y/o cultivo de las presas, sin embargo, si dichas presas se comercializan congeladas, el costo de la mano de obra se reduce hasta en un 30%, pero, no son muy bien aceptadas (Lee, 1994). El metabolismo de los cefalópodos es esencialmente proteico y muy distinto de los de los peces o crustáceos (Lee, 1994). El requerimiento en amino ácidos para la producción de proteínas es elevado (Houlihan *et al.*, 1990), y su metabolismo totalmente dependiente de proteínas (Lee, 1994). Las altas tasas de crecimiento resultan de una elevada tasa de síntesis de proteínas, siendo que por ejemplo, en el pulpo *O. vulgaris*, más del 90% de las proteínas sintetizadas son retenidas y utilizadas para el crecimiento (Houlihan *et al.*, 1990).

Los cefalópodos tienen un modo de digestión similar al de vertebrados, con secreciones pancreáticas de enzimas extracelulares y absorción tipo intestinal de pequeñas moléculas (en el ciego pilórico y el intestino); y algunas especies presentan digestión intracelular (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983).

Por lo que, el objetivo del presente trabajo fue evaluar técnicas de cultivo, conducta de apareamiento, tiempo de anidación de las hembras, número de huevos por puesta por hembra, periodo (no. días) en el cual los juveniles tempranos requieren de alimento vivo y preferencias alimenticias de los juveniles tempranos de dicha especie, así como conocer la sobrevivencia, crecimiento, actividad enzimática y perfil de aminoácidos, de juveniles tempranos de *O. bimaculoides* al ser alimentados con artemia enriquecida y sin enriquecer bajo condiciones de cultivo. Todo esto, con el fin de



contribuir con la información existente y explorar la posibilidad de que el pulpo de nuestras costas sea un recurso con factibilidad de cultivo comercial.



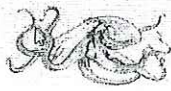
ANTECEDENTES

En los últimos años ha surgido el interés comercial por el cultivo del pulpo (*Octopus sp*), un producto con alta demanda comercial que se consume alrededor del mundo. Su fácil adaptación a la vida en cautiverio ha motivado el interés por el desarrollo de tecnologías para el cultivo de diferentes especies. *O. vulgaris* y *O. maya* han mostrado reunir características que los sitúan como candidatos al cultivo comercial: se adaptan fácilmente al cautiverio, tienen altas tasas de crecimiento y reproducción (Nixon, 1969; Iglesias *et al.*, 2004; Rosas *et al.*, 2005), aceptan alimento fresco congelado y presentan un alto precio en el mercado (Iglesias *et al.*, 2004).

Entre las especies de pulpos que presentan huevos grandes y con desarrollo directo (sin fase larval) se encuentran: *O. digueti*, *O. briareus*, *O. maya* y *O. bimaculoides*.

O. digueti, es una especie que se distribuye al Norte del Golfo de California, México, de tamaño pequeño (20-60 g, 80mm de longitud de manto) que presenta huevos grandes (7-9mm de largo), y los organismos recién eclosionados llegan a tener un peso húmedo de 40mg y una longitud de manto al eclosionar de 4.5 a 6mm con comportamiento bentónico, el número de huevos por puesta oscila entre los 50 a 150 y su desarrollo embrionario se logra en 42 días a 25°C (De Rusha *et al.*, 1987; Hanlon y Forsythe *et al.*, 1985).

O. briareus se distribuye en el Atlántico Noroeste, Bahamas y Mar caribe, es una especie de tamaño mediano (máximo 1000g), presenta huevos de 12 a 13mm de longitud, los organismos recién eclosionados pesan 95mg y miden de largo de manto 7mm, la

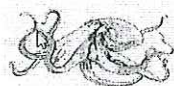


puesta de esta especie puede ser de 300 a 700 huevos y su periodo de desarrollo embrionario es de 60-70 días a 25°C. (Hanlon y Forsythe *et al.*, 1985; Hanlon y Wolterding, 1989).

O. maya se distribuye en la Bahía de Campeche y península de Yucatán, México, presenta huevos con una longitud de 11 a 17mm y 4.5mm de ancho, el peso de los juveniles al nacer es de 100mg, con una longitud del manto de 7mm, el número de huevos por puesta oscila entre 300 a 5000 y su desarrollo embrionario es de 45 días a 25°C (Hanlon y Forsythe *et al.*, 1985; Solís 1967; Van Heukelem, 1977).

El pulpo común (*O. vulgaris*, Cuvier) al igual que todos los cefalópodos tiene un ciclo de vida corto (12-18 meses), rápido crecimiento (arriba de 13% de su cuerpo por día) y altas razones de conversión alimenticia (15 a 43%) dependiendo de la temperatura del cultivo y la dieta (García-García y Aguado-Giménez, 2002). Acepta varios tipos de alimento y su carne tiene un alto contenido proteico (70-90% de peso seco), además de un bajo contenido de grasas (menos de 3%) en su composición corporal (Iglesias *et al.*, 2000).

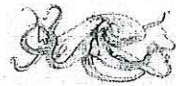
Los estudios con octópodos sobre crecimiento en acuario son clásicos y abundantes dada la facilidad para mantener ejemplares adultos en cultivo. Uno de los trabajos pioneros es el de Itami *et al.* (1963), obtuvieron juveniles de *O. vulgaris* de 33 días de edad, a una temperatura de 24.7°C y una sobrevivencia del 5% a los dos meses, utilizando como presas zoeas de camarón *Palaemon serrifer*. Muchos otros experimentos se han llevado a cabo con diferentes especies de octópodos, como *O. vulgaris*, *O. briareus*, *O. mimus* y *Eledone cirrhosa* (Mangold y Boletzky, 1973; Villanueva, 1995).



Forsythe y Van Heukelem (1987) establecieron razones de crecimiento en peso entre 2% y 4.65% en experimentos llevados a cabo a temperaturas entre 15°C y 25°C. Se han registrado pesos diarios de hasta 5% para especies pequeñas; otros estudios han reportado incrementos diarios en peso mayores al 13% (Vaz-Pires *et al.*, 2004). Por otro lado, especies de agua fría, tales como *Paraladene charcoti*, presentan razones de crecimiento diario desde 0.11% (Daly y Peck, 2000) y 0.18% en *Bathypolypus articus* (O'Dor y Macalaster, 1983). En el caso de *E. megalocyathus*, la razón de crecimiento diario fue de 2%, de acuerdo con los parámetros iniciales del organismo y la temperatura (que tuvo un máximo de 17°C durante el verano).

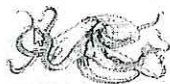
Aunque los requerimientos exactos se desconocen, parece que una dieta con una alta cantidad de lípidos y baja cantidad de proteínas provoca un bajo crecimiento (Semmens *et al.*, 2004). García-García y Aguado-Giménez (2002) alimentaron *O. vulgaris* con sardina y pez boga (*Boops boops*) y encontraron mejores resultados en crecimiento en los organismos alimentados con boga, que aquellos alimentados con sardina, lo que pudo deberse a la cantidad de lípidos que contiene la sardina, inclusive los pulpos alimentados con sardina producían heces que flotaban, sugiriendo que la digestión de lípidos fue baja e ineficiente. Estos mismos autores, alimentaron a *O. vulgaris* con boga y la compararon con organismos alimentados con cangrejo, comprobando que existe un mayor crecimiento y consumo alimenticio con una dieta compuesta de cangrejo comparada con una dieta elaborada con peces (Aguado-Jiménez y García-García, 2002).

El pulpo *O. maya* presenta una fácil adaptación para vivir en cautiverio, tiene tasas de crecimiento muy elevadas, acepta alimento tanto balanceado como fresco y



posee un alto precio en el mercado (Voss y Solís, 1966; SEMARNAP, 1999). Esta especie produce huevos grandes y de desarrollo directo (Voss y Solís, 1966), los cuales pueden alcanzar 1 kg en 4 meses, y obtener pesos por arriba de los 3 kg en 9 meses, cuando son mantenidos a 25°C (Van Heukelem, 1977). Estudios de nutrición llevados a cabo en esta especie demostraron que cuando los pulpos son alimentados con un alimento balanceado para camarón (alto nivel de lípidos) enriquecido con calamar la tasa de crecimiento es prácticamente cero (Domingues *et al.*, 2007). En otro estudio también se observó que este tipo de dietas afecta el crecimiento debido a las alteraciones que provoca en la energía digestible (Rosas *et al.*, 2007). Entre los factores que han sido señalados como limitantes en la digestibilidad en cefalópodos se encuentra el aglutinante, el cual está estrechamente vinculado con la forma en que los nutrientes del alimentos son atacados por las enzimas para formar el quimo. En *O. maya* se observó que la grénatina (de naturaleza animal) es un aglutinante apropiado para los juveniles ya que permite que la carne de jaiba sea mejor digerida que cuando se aglutina con alginato de sodio, aglutinante de naturaleza vegetal comúnmente utilizado en la elaboración de dietas balanceadas (Rosas *et al.*, 2008b).

Los cefalópodos se componen mayoritariamente de agua (80%), las proteínas representan cerca de 16.6% del peso húmedo (Iwasaki y Harada, 1985), los carbohidratos representan cerca de 1% (Vlieg, 1984) y los lípidos menos de 2%. Ninguno de estos dos últimos componentes es utilizado para la producción de energía, ya que se ha analizado que son utilizados para formación de la membrana celular, colesterol y esteroides hormonales, en el caso de los lípidos, mientras que los azúcares son el resultado del catabolismo de aminoácidos o gluconeogénesis de aminoácidos



(Hochachka *et al.*, 1975, Lee, 1994). Así, las proteínas son la mayor fuente de energía para estos organismos (Lee, 1994).

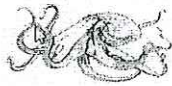
Enzimas digestivas

El conocimiento de la fisiología digestiva de nuevas especies para la acuicultura es esencial, una vez que pueden ayudar a la formulación de dietas inertes (Domínguez *et al.*, 2004).

Las paralarvas de algunas especies de cefalópodos, como el pulpo *O. vulgaris*, tienen la capacidad de ajustar sus enzimas digestivas a distintas dietas, y también a la cantidad de alimento. La actividad de enzimas proteolíticas se mantiene alta cuando la cantidad de dieta ingerida es elevada. La actividad de tripsina y quimiotripsina suelen mantenerse solo si el nivel de dieta se mantiene (Villanueva *et al.*, 2002). La disminución de su actividad se refleja en una dieta pobre o poco balanceada. La disminución de actividad de tripsina en el intestino y páncreas de larvas de peces no alimentadas fue observada por Zambonino-Infante *et al.* (1996) y por Gawlicka *et al.* (2000).

En comparación con larvas de peces, el nivel de actividad de tripsina en pulpos es más elevado (Villanueva *et al.*, 2002). Las paralarvas de *O. vulgaris* tienen muy bajo o indetectable actividad de amilasa (Boucaud-Camou y Roper, 1995), en concordancia con el bajo contenido en carbohidratos en cefalópodos, de menos de 1% (Lee, 1994).

Estudios realizados en *O. maya* demostraron que cuando los pulpos son alimentados con dietas deficientes en nutrientes esenciales como proteína, la quimiotripsina de la glándula digestiva se induce mientras que la tripsina se deprime,

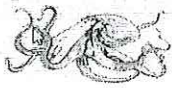


sugiriendo que los mecanismos de regulación de ambas enzimas son afectados de manera diferente por el alimento (Aguila *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2008b). Estudios recientes llevados a cabo en calamares mostraron que entre las principales enzimas digestivas de la glándula digestiva se encuentran la catepsina, las cuales son enzimas importantes en los procesos de digestión intracelular (Cardenas-Lopez y Haard, 2005; Cardenas-Lopez y Haard, 2009).

Requerimientos de proteínas (aminoácidos).

Con su metabolismo casi totalmente dependiente de proteínas (Lee, 1994), el requerimiento en amino ácidos para la producción de las mismas es muy alto (Houlihan *et al.*, 1990). Los cefalópodos utilizan directamente las proteínas del músculo para producir energía durante períodos en que no pueden alimentarse; el uso de proteínas como reserva de energía se debe a que no poseen grandes reservas de glicógeno o lípidos en sus tejidos (Storey y Storey, 1978).

El conocimiento de la composición en aminoácidos en cefalópodos fue determinado principalmente en adultos; se encuentran en la literatura la composición del músculo del manto y brazos (Iwasaki y Harada, 1985; Rosa *et al.*, 2002; Aguila *et al.*, 2007), ovario (O'Dor y Wells, 1973), huevos (Rossi *et al.*, 1985; Villanueva *et al.*, 2004), sistema nervioso (D'Aniello *et al.*, 1995), ojos (Siezen y Shaw, 1982; Seidou *et al.*, 1988), tinta (Shirai *et al.*, 1997), picos, concha y rádula (Hunt y Nixon, 1981). En paralarvas o juveniles, no existe mucha información sobre la composición de amino ácidos (Villanueva *et al.*, 2004).



Lee (1994) defiende que la relación P:E, normalmente usada en otros animales, para definir la calidad de una dieta no es fiable ni buena indicadora de una dieta apropiada para cefalópodos, y propone que el balance de amino ácidos en la dieta es el mejor indicador de una buena dieta. Por esto, es de vital importancia conocer la composición en amino ácidos de diversas especies de cefalópodos, principalmente de los de elevado potencial para acuicultura, como *S. officinalis* u *O. maya*, de desarrollo directo, o de *O. vulgaris*, con fases planctónicas, pero de elevado valor comercial en muchas partes del planeta (Domínguez *et al.*, 2004).



II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el crecimiento y sobrevivencia de juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con *Artemia salina* enriquecida y alimento inerte, así como obtener información sobre su biología general, conductas de apareamiento y reproducción.

Objetivos particulares

1. Observar la conducta de apareamiento
2. Evaluar el tiempo de incubación de las puestas, así como el número de organismos eclosionados por puesta.
3. Determinar el periodo que requieren los organismos recién eclosionados con alimento vivo.
4. Determinar las preferencias alimenticias de organismos juveniles en cautiverio.
5. Determinar la actividad enzimática de los organismos recién eclosionados y de juveniles, así como, el perfil de aminoácidos en organismo completo y alimento vivo enriquecido (artemia) de juveniles de *O. bimaculoides*.



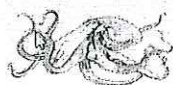
III. METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevo a cabo en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC. Los análisis enzimáticos, perfiles de aminoácidos y lípidos se realizaron en el Laboratorio de Nutrición y Fisiología del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

*3.1 Adquisición de organismos y obtención de juveniles de *O. bimaculoides**

Se obtuvieron 20 organismos adultos del medio ambiente natural, por medio de la pesca artesanal, los cuales fueron transportados al laboratorio de la UBP. Estos fueron sexados y colocados individualmente en estanques de 160 L capacidad de manera individual para después de unas semanas formar parejas. La separación por sexos se realizó mediante la oscultación y observación del extremo del tercer brazo derecho, al localizar el órgano masculino (hectocotilo). Durante todo este tiempo los organismos fueron alimentados con jaiba, mejillón y calamar crudos y congelados. La limpieza de los estanques se realizó diariamente por medio de sifoneo.

En ocasiones fueron capturadas hembras adultas fertilizadas y listas para la colocación de la puesta, mientras que en otras se formaron parejas (macho y hembra) con el fin de estimular el apareamiento asegurando así que la hembra depositara los huevos fecundados de manera natural, sin embargo no se pudo asegurar que las hembras fueron fertilizadas en el laboratorio o ya se encontraban fertilizadas al momento de la captura.



Los pulpos depositan sus huevos sobre una superficie en el interior de las grietas donde viven y los protegen durante la incubación, por lo que se colocaron tubos de PVC o ABS como refugio, con el fin de que las hembras se sintieran protegidas y colocaran los racimos de huevos.

Se colocaron parejas en los estanques y se observó el comportamiento que presentaron los organismos al estar en contacto con un organismo del sexo opuesto.

Además se determinó el tiempo de anidación de las hembras con las que se trabajó en este estudio, lo anterior se logró al obtener puestas viables en el laboratorio por medio de organismos adultos capturados del medio natural. Una vez obtenidas las puestas se determinó el número de huevos por puesta, contando la cantidad de racimos, así como huevos vacíos al final de la eclosión y corroborando con el número de pulpos eclosionados.

Se utilizaron estanques de 60 L de capacidad para la reproducción y alimentación de juveniles, en un sistema abierto, con temperatura controlada por medio de un calentador de titanio de 250W, fotoperiodo 12:12h (luz: oscuridad). Cada semana se sifoneo el fondo y se limpiaron los estanques. Se registró el peso individual (g, húmedo) de manera periódica en una balanza marca Sartorius CP224S con precisión de 0.0001g.

3.2 Preferencias alimenticias de juveniles (alimento vivo e inerte).

Previo al ensayo de alimentación de preferencias alimenticias de juveniles, se alimentó a organismos de la misma edad con miscidaceos congelados, alimento formulado para peces (húmedo y seco), mejillón, calamar, jaiba, pescado fresco y congelado, para determinar el alimento más aceptado. Después de la eclosión se



alimentó a los juveniles con presas vivas (*Artemia salina*), hasta que mostraron necesidad de alimentarse de otro tipo de alimento, logrando determinar el número de días que se requiere de alimento vivo después de la eclosión.

Se realizó un primer ensayo, en el cual se colocaron 10 organismos de 30 días de edad en vasos plásticos de 1 L de capacidad, los cuales contaban con 18 refugios en forma vertical (Figura 3), pegados en una base de plástico por ambos lados. Se ofrecieron diferentes productos frescos a saciedad (jaiba, mejillón, calamar y pescado, por triplicado), tres veces al día. Antes de alimentar se limpiaba el alimento remanente.

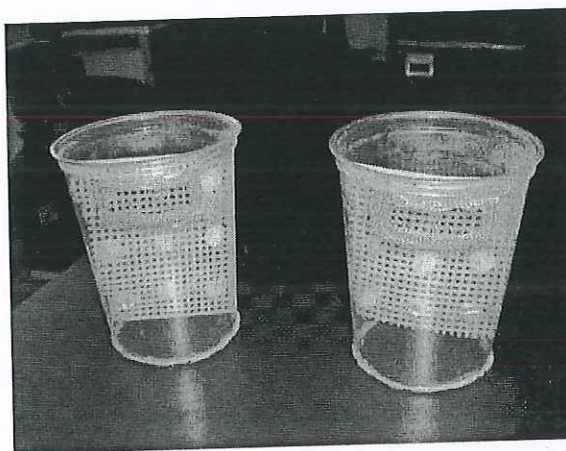


Figura 3. Vasos plásticos de 1 L de capacidad con refugios en forma vertical

La sobrevivencia fue calculada de la diferencia en el número de organismos al inicio y al final del ensayo.



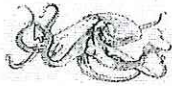
3.3 Análisis enzimático y perfil de aminoácidos de juveniles tempranos.

El segundo ensayo consistió en alimentar a juveniles de pulpo recién eclosionados durante un periodo de veinte días con *Artemia salina* pre-adulta (20 días de edad), cultivada a 27° C y alimentada con *Tetrasemis suecica* e *Isochrysis galbana*. La artemia fue ofrecida a los organismos después de ser enriquecida: A) Artemia sin enriquecer (SinE), B) Artemia enriquecida con Algamac 3050 (EA) (partícula 1.5mm, Aquafauna Biomarine Inc., Hawthorne, C.A. USA; proteína cruda: 17.6%, lípidos: 56.2%, carbohidratos: 15.9%, ceniza: 8.2%) durante 24 horas y C) Artemia enriquecida con *Spirulina maxima* (comercial) durante 24 horas (ES).

S. maxima y Algamac fueron emulsificados en agua de mar por medio de una licuadora por 2 min, antes de ser ofrecidos como alimento a la artemia a una razón de 0.081g/L y 0.2g/L para *S. maxima* y Algamac, respectivamente.

Se obtuvieron 120 juveniles tempranos de pulpo, de puestas obtenidas de organismos adultos mantenidos en el laboratorio. El sistema de cultivo fue compuesto de 9 cubetas circulares plásticas de 4 l de capacidad, las cuales estaban conectadas a un sistema abierto. Se mantuvieron condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y de fotoperíodo (12:12 h. luz:oscuridad), semejando las condiciones naturales en las que habita *O. bimaculoides*.

Cada unidad experimental fue asignada de forma aleatoria en el sistema de cultivo. Se colocaron 15 organismos por cubeta, además de 30 refugios por unidad experimental (conchas de gasterópodos de aproximadamente 2cm de longitud) para evitar el estrés de los pulpos.



Uno o dos juveniles de cada tratamiento experimental fueron muestreados en los días 0, 2, 6, 10, 15 y 20 y almacenados a -80°C para posterior análisis.

Parámetros de crecimiento

Se determinó el peso inicial y final de los organismos durante el periodo de experimentación, por medio de una balanza analítica marca Sartorius CP224S (0.0001g), para posteriormente calcular la tasa de crecimiento (mg/d), la cual fue determinada como la diferencia entre el peso inicial y el final; la tasa de crecimiento específico (TCE) fue calculada como:

$$\text{TCE: } ((\text{LnPf} - \text{LnPi})/t) * 100$$

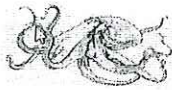
Donde Pf y Pi son los pesos finales e iniciales húmedos de los organismos, Ln, es el logaritmo natural y t, el número de días del ensayo (20 días).

Análisis químicos

Se elaboraron extractos crudos de los juveniles muestreados los días 0, 2, 6, 10, 15 y 20. Dichas muestras fueron homogenizadas en una solución fisiológica (NaCl, 0.9%) y centrifugados hasta obtener el extracto crudo. La concentración de proteína fue analizada de acuerdo a Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina como estándar para reportar las actividades por gramo de proteína.

Se hicieron determinaciones de actividad enzimática:

Las proteasas alcalinas totales fueron determinadas de acuerdo al método modificado de Sarath *et al.* (1989). La mezcla de incubación consistió en $80\mu\text{l}$ de 0.05M



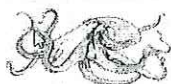
Tris-HCl/10mM CaCl₂ (pH 8.1) como buffer, 20μl de extracto crudo y 150μl de azocaseína 2% como sustrato. La reacción fue incubada a 37°C por 1h y detenida adicionando 750μl de ácido tricloroacético. La densidad óptica del sobrenadante fue medida a 360nm.

La tripsina fue determinada por el método de Erlanger *et al.* (1961), usando BAPNA (N α -benzoyl-L-arginine-4-p-nitroanilide hydrochloride) como sustrato y la cantidad de p-nitroanilina liberada por el BAPNA (pH 8.2; 25°C) fue medida a una absorbancia de 410nm.

La actividad de la quimiotripsina se determinó por el método de Hummel (1959), usando BTEE (N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) como sustrato. El incremento en absorbancia (256nm) resultado de la hidrólisis de BTEE a pH 8.1 y 25°C fue medido cada 2min. por un periodo de 6 min.

La lipasa fue determinada por la hidrólisis de 4-nitrofenilcaproato (4-NPC) de acuerdo al método modificado descrito por Gjellesvik *et al.* (1992). La reacción fue iniciada adicionando el extracto enzimático a 0.5M Tris-HCl (pH 7.4) como buffer, 4-NPC (100mM en etanol, con una concentración final de 0.35mM). La temperatura fue mantenida a 25°C y el incremento en absorbancia fue medido a 400nm.

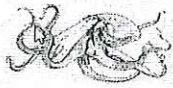
La actividad de la α -Amilasa fue determinada de acuerdo al método de Bernfeld (1955), usando almidón al 1% como sustrato. Una solución de 3-5 ácido dinitrosalicílico fue usado como agente ácido para determinar la cantidad de azúcar reducida (maltosa) producida, esto se determinó al medir la absorbancia a 540nm.



Una unidad (U) de actividad fue definida como la cantidad de enzima liberando 1 μmol de producto por minuto, bajo las condiciones descritas para cada ensayo enzimático.

Perfil de aminoácidos

Se determinó el contenido de aminoácidos de organismos muestreados al inicio y al final del periodo experimental. El perfil de aminoácidos del tejido total fue determinado después de la extracción de lípidos por medio del método de Folch *et al.* (1957). Las muestras de tejido fueron hidrolizadas con 200 μl de ácido clorhídrico 6N y fenol 0.06%, en un vial cerrado y calentado a 110°C por 24h. Las muestras hidrolizadas fueron secadas con nitrógeno y rehidratadas con 1ml de agua, posteriormente, fueron filtradas (0.45 μm) y refrigeradas. Las muestras fueron evaluadas en el Laboratorio de Nutrición y Fisiología del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, por medio de una columna de fase reversa (3.9 x 150mm.), 4 μm Nova Pak TM C-18, usando un gradiente de agua-acetonitrilo recomendado por el sistema Waters AccQ•Tag TM (Mildford Massachusetts, USA) a un Agilent HPLC (Santa Clara Ca, USA) equipado con un detector fluorescente (Agilent, 1100 series). La señal de calibración del HPLC y la curva estándar fueron obtenidas usando una solución estándar de aminoácidos que contenía de 18.75 a 150pmol de cada aminoácido.



Lípidos totales

Los lípidos totales se determinaron por extracción con diclorometano: metanol según el método modificado de Folch *et al.* (1957), el cual consistió en pesar 50mg de la muestra seca, a la cual se le agregaron 50 μ l de agua destilada y 500 μ l de diclorometano: metanol (relación 2:1), se agitó vigorosamente. Al finalizar la extracción se adicionó 1.5ml de NaCl al 0.7% dejando reposar para la separación de fases. Se separó la fase inferior de diclorometano y se colocó en un tubo previamente pesado, se evaporó el solvente (70° C) en una campana de extracción.

Se pesó el tubo + lípidos y se calculó el contenido de lípidos totales mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = (\text{Peso extracto lipídico} / \text{peso muestra}) \times 100$$

Se determinó la mortalidad de acuerdo al número final de organismos que debían sobrevivir al final del periodo experimental, considerando aquellos que fueron muestreados.

3.4 Reproducción

Se colocaron 5 parejas de organismos adultos en relación 1:1 (hembra:macho) en estanques de 160 L de capacidad, los cuales se mantuvieron a una temperatura que varió de 21° a 24°C, los estanques se mantuvieron con escasa luz (malla sombra 90%) para promover las puestas y se colocaron tubos de PVC de acuerdo al tamaño de los organismos. Con las puestas se determinó el número de huevos por desove, así como la cantidad de juveniles eclosionados en cada una de las puestas y el tiempo de anidación.

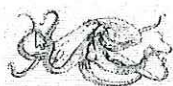


Las hembras fueron pesadas al inicio de la puesta por medio de una balanza granataria marca (0.00g).

Una vez obtenidas las puestas, se retiró al macho del estanque para evitar la predación de las puestas. La hembra permaneció sola al cuidado de los huevos fertilizados durante el periodo de incubación. Se ofreció alimento (mejillón y jaiba) a la hembra hasta que dejó de aceptarlo.

3.5 Análisis estadístico

Después de confirmar la normalidad y homogeneidad de varianzas, se compararon las medias entre los diferentes tratamientos, tanto del ensayo de alimentación con artemia viva como de alimentación inerte, por medio de un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando estadísticamente existieron diferencias significativas entre medias por tratamiento, estas se determinaron mediante comparaciones múltiples de Tukey. Se realizaron transformaciones de raíz cuadrada de arcoseno para el análisis de los resultados obtenidos en porcentaje. El nivel de significancia (α) en todas la pruebas fue de 0.05. Se reportan datos de media \pm desviación estándar.



IV. RESULTADOS

4.1 Adquisición de organismos, descripción del desarrollo embrionario y obtención de juveniles de *O. bimaculoides*.

O. bimaculoides es una especie de tamaño mediano y de aguas frías (18°C) que desarrolla huevos grandes ($13.36 \pm 0.45\text{mm}$ de largo y $4.47 \pm 0.29\text{mm}$ de ancho), piriformes y de color lechoso cuando son recién depositados, posteriormente y debido a la transparencia de los mismos es posible observar cada uno de los estadios de desarrollo. En los primeros estadios de vida, se puede observar que el saco vitelino ocupa la mayor parte del huevo, mientras el organismo se va desarrollando, el saco es reabsorbido hasta que está listo para eclosionar como un adulto pequeño (Figura 4).

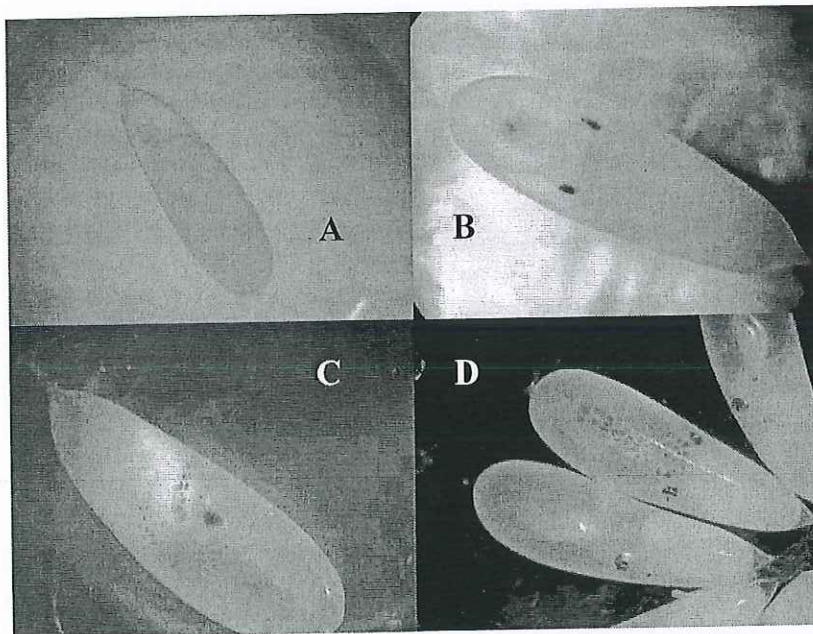
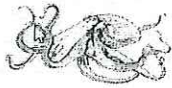


Figura 4. Estadios de desarrollo de *O. bimaculoides* obtenidos a partir del presente estudio. A) 14 días de edad; B) 31 días de edad; C) 45 días de edad; D) 54 días de edad.



La porción más estrecha se continua por un pedúnculo filamentososo, que se entrelaza con otros formando un cordón compacto, con un material mucilaginoso y algas verdes macroscópicas, al igual que en *O. maya* (Solís, 1967) (Figura 5).

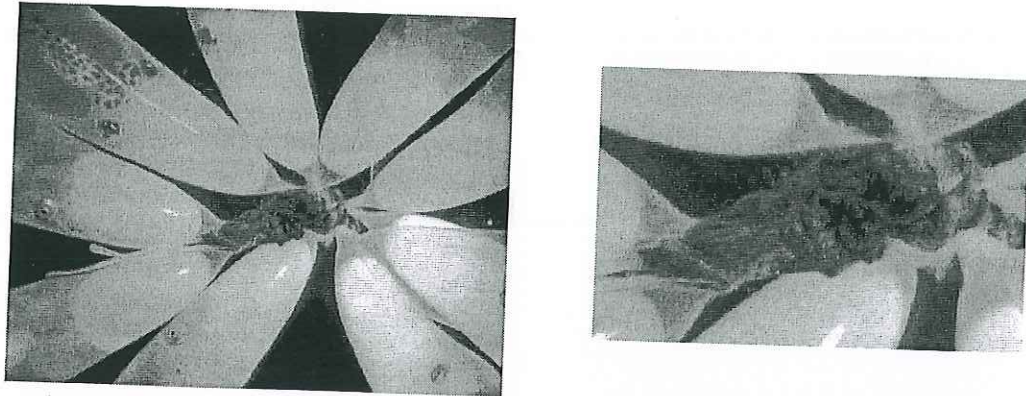


Figura 5. Huevos de *O. bimaculoides* unidos a un cordón mucilaginoso.

Al igual que los adultos, los organismos en el huevo y recién eclosionados presentan cambios de coloración (Figura 6) y son capaces de arrojar tinta, si son estresados.

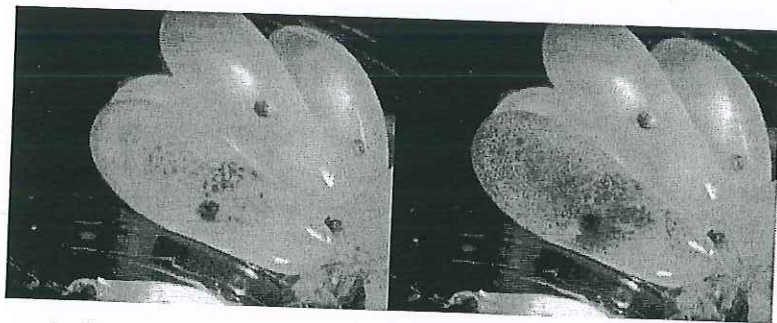


Figura 6. Secuencia de cambios de coloración de *O. bimaculoides* sin eclosionar.



Estudios previos han demostrado que la eclosión normal de la especie se efectúa por el extremo distal del huevo. La mayoría de los pulpos eclosionaron con el saco vitelino reabsorbido. Los que nacieron prematuramente, lo absorben parcialmente y se desprende a los pocos minutos de haber emergido del huevo (Figura 7). Al eclosionar un pulpo de esta especie, presenta las características de un adulto en pequeño, ya que *O. bimaculoides* tiene desarrollo embrionario directo, sin pasar por etapa larval (Figura 7) (Solís, 1967).

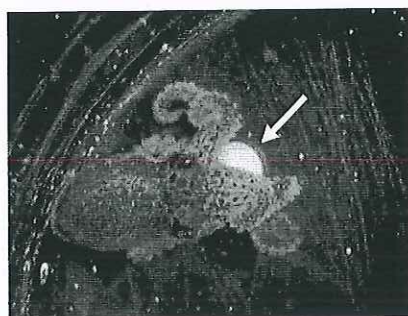
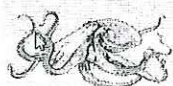


Figura 7. *O. bimaculoides* recién eclosionado con saco vitelino sin reabsorber

Los juveniles, presentan un comportamiento bentónico después de nacidos, lo que hace más accesible su alimentación. Al nacer pesan en promedio 0.122 ± 0.023 g (peso húmedo).

A lo largo de 8 meses de investigación se lograron obtener 3 puestas de las cuales se obtuvieron aproximadamente 600 juveniles, para alimentarlos durante los primeros días de vida se utilizó *A. salina* (recién eclosionada y adulta) y misidaceos congelados.



Después de los 15 días de vida, los pulpos fueron alimentados con mejillón, calamar, pescado blanco y jaiba.

Conducta de apareamiento

Del total de hembras observadas se observó que en el 90% de los casos los machos iniciaron la conducta de cópula inmediatamente después de colocarlos en el estanque de la hembra. Se observó que este proceso duró aproximadamente 30 minutos después de los cuales, el tercer brazo del macho buscó la cavidad del manto de la hembra (Figura 8) y colocó el brazo dentro de esta, permaneciendo en esta posición cerca de 2hrs. Posteriormente y en un periodo de alrededor de un día después de la fecundación, el 100% de las hembras colocó los huevos en el refugio. Por esta razón y con el fin de evitar destrucción del nido, el macho fue removido. Cabe aclarar que con estas observaciones no fue posible determinar si el macho fecundó a la hembra o esta ya se encontraba fecundada por otro macho del medio natural. El apareamiento se produjo después de un elaborado cortejo entre el macho y la hembra con cambios de coloración específicos y complejos junto a una serie de movimientos, con el objeto de identificar al sexo opuesto.

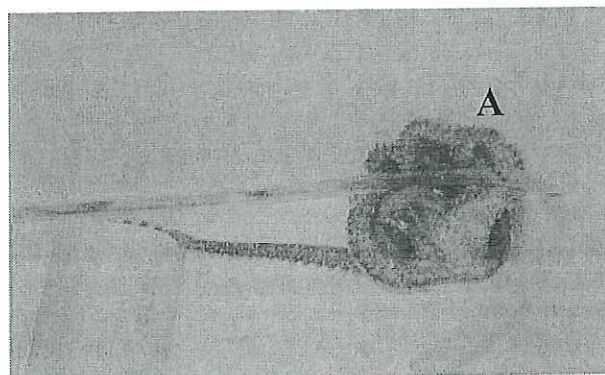
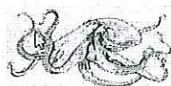


Figura 8. Macho de *O. bimaculoides* (A) colocando su tercer brazo hectocolizado en la cavidad del manto de la hembra, quien estaba dentro del refugio.

Inmediatamente después de que la hembra colocó la puesta en el refugio se procedió a contar los días de anidación, los cuales fueron de entre 54 a 60 días con temperaturas entre $22.5 \pm 2^\circ\text{C}$, las hembras colocaron la puesta completa en varios días (3 a 5 días) (Figura 9).



Figura 9. Imagen de una Hembra de *O. bimaculoides* protegiendo su puesta, dentro de un refugio (tubo de PVC de 2").

La cantidad de huevos en cada una de las puestas (Tabla II), muestra que la hembra 2 presentó el mayor número de huevos (316), siendo esta la que más peso



presentó al inicio de la incubación. El tiempo de anidación de cada puesta se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Cantidad de huevos colocados por puesta, pesos de hembras (g) y tiempo de anidación (días).

	Número de huevos (pulpos eclosionados)	Peso de hembras (g)	Tiempo de anidación (días)
Hembra 1	285	418.97	54
Hembra 2	316	686.70	56
Hembra 3	120	355.26	60

4.2 Preferencias alimenticias de juveniles (alimento vivo e inerte).

Se realizaron varios ensayos con alimento vivo, los organismos eclosionados fueron alimentados con artemia recién eclosionada en altas densidades y juveniles de artemia (*Artemia salina*, 15 días de edad). Se pudo observar que la artemia recién eclosionada fue ingerida por los pulpos, debido a que se el tracto digestivo se veía lleno y pigmentado. También se observó que los nauplios de Artemia eran más difícil de capturar (posiblemente debido al tamaño), a menos que esta se ofreciera en altas densidades, por lo que se procedió a ofrecerles artemia de mayor tamaño (15 días de edad). Después de un periodo de entre 15 a 20 días los juveniles perdían interés en el alimento vivo, momento en que se notó el canibalismo. Tomando en cuenta este comportamiento se estableció la edad de entre 15 y 20 días como aquella en la que es posible el cambio de alimento vivo a inerte.

La mayor sobrevivencia se observó en organismos alimentados con calamar (93.3 ± 5.77), mientras que la menor, fue en organismos alimentados con mejillón (33.33 ± 11.55) (Figura 10).

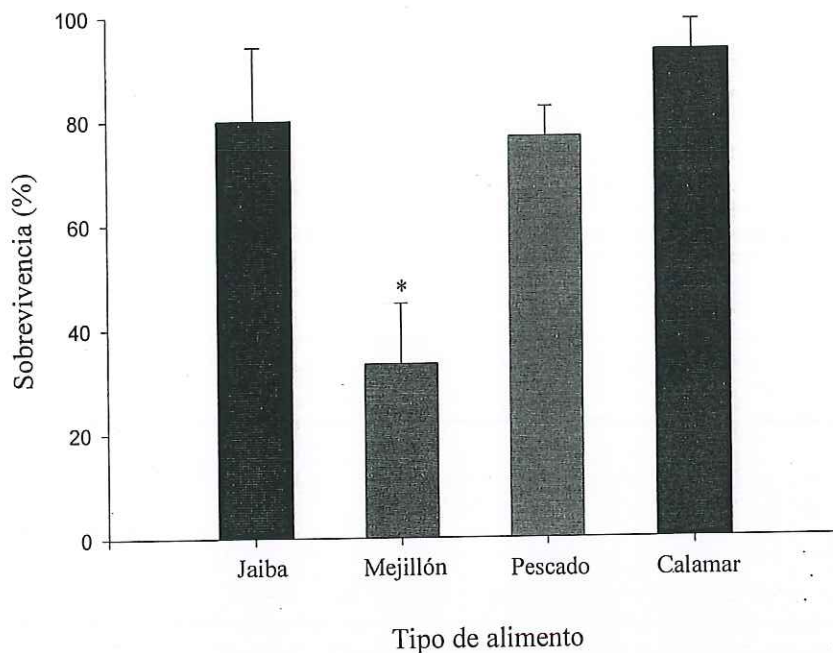
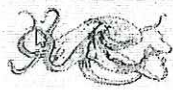


Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia de juveniles de 30 días de edad, alimentados con jaiba, mejillón, pescado y calamar.

4.3 Crecimiento de juveniles alimentados con Artemia salina enriquecida y sin enriquecer.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad durante los 20 días de experimentación. El tratamiento sin enriquecer (SinE) no mostró mortalidad, mientras que en el tratamiento EA se observó una mortalidad del $16.67 \pm 1.0\%$, seguido de ES con $27.78 \pm 1.5\%$.

La tasa de crecimiento (mg/día) y la TCE (%/día) mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre todos los tratamientos. Se observaron valores altos de TCE (4.05 ± 0.13 %/ día) para organismos alimentados con artemia enriquecida con



Algamac (EA), seguidos por aquellos alimentados con artemia sin enriquecer (SinE) y finalmente el crecimiento más bajo se observó en el tratamiento alimentado con *Spirulina* (ES) (Tabla III).

Tabla III. Peso inicial y final (mg), tasa de crecimiento (mg/día), tasa de crecimiento específico (TCE, %/ día), incremento total de crecimiento (%) y mortalidad (%) de juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados durante 20 días con *Artemia salina* enriquecida con AlgaMac-3050 (EA) o *Spirulina* (ES) y sin enriquecer (SinE).

	Tratamientos		
	ES	EA	SinE
Peso inicial (mg)	89 ± 0.01	89 ± 0.01	99 ± 0.02
Peso final (mg)	163 ± 0.01	200 ± 0.03	188 ± 0.02
Tasa de crecimiento (mg/día)	3.7 ± 0.12 ^c	5.6 ± 0.11 ^a	4.4 ± 0.19 ^b
TCE (%/ día)	3.02 ± 0.13 ^b	4.05 ± 0.13 ^a	3.20 ± 0.15 ^b
Incremento total de crecimiento (%)	183.1 ± 4.80 ^b	224.8 ± 5.96 ^a	189.9 ± 5.59 ^b
Mortalidad (%)	27.78 ± 1.5	16.67 ± 1.0	0.0

El contenido de lípidos en las artemias no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ninguno de los tratamientos experimentales. Además de que no se observaron diferencias significativas en el contenido total de lípidos en los juveniles de *O. bimaculoides* entre los diferentes tratamientos, sin embargo, los valores de contenido de lípidos totales observados en muestras finales de *O. bimaculoides* fueron mayores que en las muestras iniciales (Tabla IV).



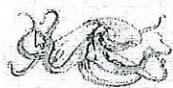
Tabla IV. Contenido de lípidos (% peso seco) del alimento vivo utilizado (*Artemia salina*) y de organismos enteros de juveniles de *Octopus bimaculoides* antes y después de ser alimentados con *Artemia salina* enriquecida (*Spirulina* (ES) o AlgaMac-3050 (EA)) y sin enriquecer (SinE).

<i>Artemia salina</i>	Lípidos (%)
Sp	6.72 ± 0.03
Alg	6.55 ± 0.22
Sin enriquecer	6.02 ± 0.80
Tratamientos	
Inicial	4.22 ± 0.90 ^b
ES	6.94 ± 0.33 ^a
EA	6.72 ± 0.5 ^a
SinE	5.75 ± 0.20 ^{ab}

Sp = *Artemia salina* enriquecida con *Spirulina maxima*; Alg = *Artemia salina* enriquecida con AlgaMac-3050; Sin enriquecer = *Artemia salina* sin enriquecer.

4.4 Análisis enzimático y perfil de aminoácidos de juveniles tempranos.

La actividad enzimática de *O. bimaculoides* en general mostró un comportamiento no lineal. La quimi tripsina presentó los picos más altos los días 1 y 10 para los organismos que fueron alimentados con artemia sin enriquecer, mientras que la actividad de los organismos que fueron alimentados con artemia enriquecida (EA y ES) mostraron un comportamiento similar entre ellos, es decir, presentaron valores altos los días 1 y 2, los cuales fueron disminuyendo con el paso del tiempo (Figura 11).



Quimiotripsina

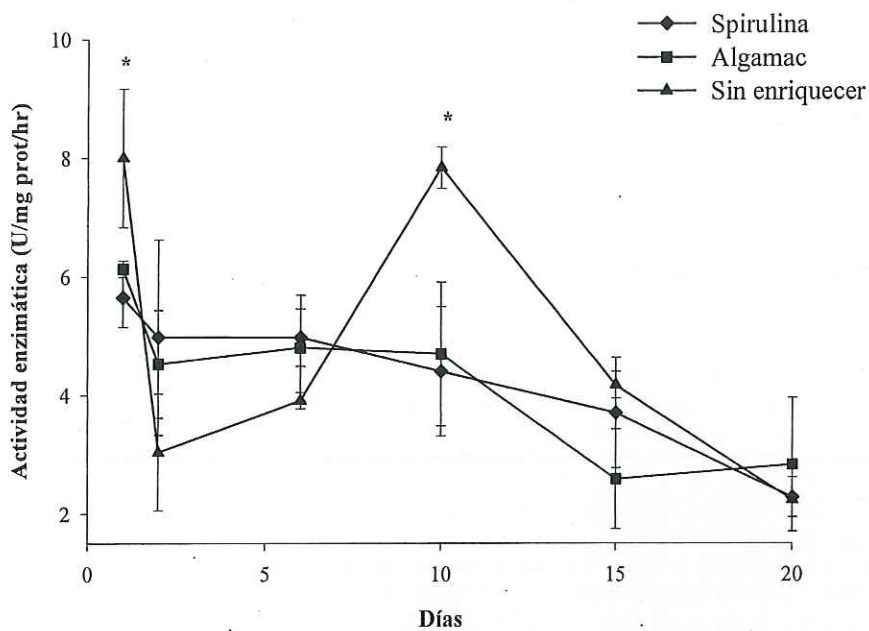


Figura 11. Actividad enzimática de quimiotripsina (U/mg proteína/hr) en juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con *Artemia salina* enriquecida (*Spirulina sp* y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días.

La actividad de la tripsina (Figura 12) presentó un comportamiento en el cual se observaron los picos más altos los días 6 y 15 en todos los tratamientos, los cuales presentaron un comportamiento no lineal.

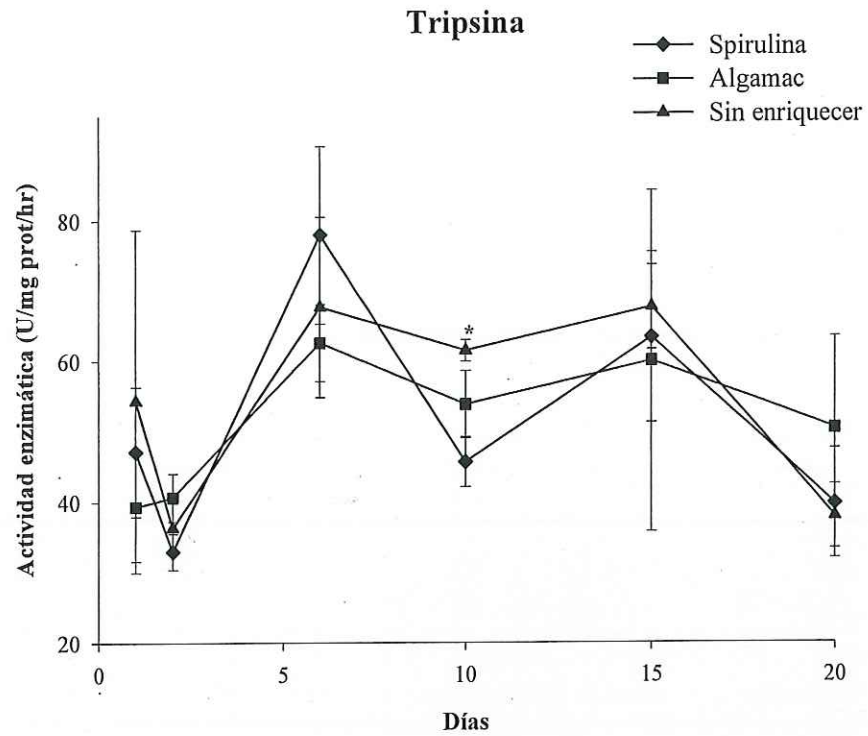
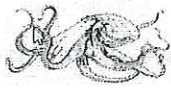
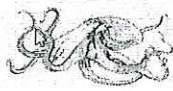


Figura 12. Actividad enzimática de tripsina (U/mg proteína/hr) en juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con *Artemia salina* enriquecida (*Spirulina sp* y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días.

La Figura 13 muestra la actividad enzimática de las proteasas alcalinas totales, las cuales presentan su pico más alto el día 6, para después mostrar una tendencia a estabilizarse para el día 20. En el caso de ES, el día 15 presentó un aumento en la actividad enzimática de tripsina.



Proteasas Alcalinas Totales

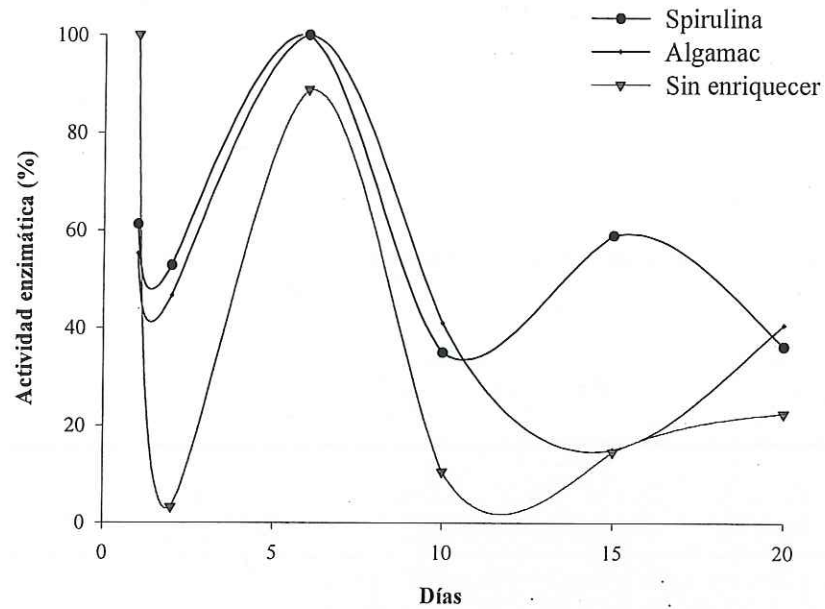
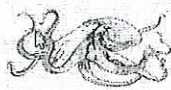


Figura 13. Actividad enzimática de proteasas alcalinas totales (%) en juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con *Artemia salina* enriquecida (*Spirulina* sp y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días.

La actividad de la amilasa muestra su pico más alto el día 6 para los tratamientos de *Spirulina* y Sin enriquecer, mientras que Algamac muestra su pico más alto el día 2, para posteriormente estabilizarse con el tiempo, al igual que los otros tratamientos (Figura 14).



Amilasa

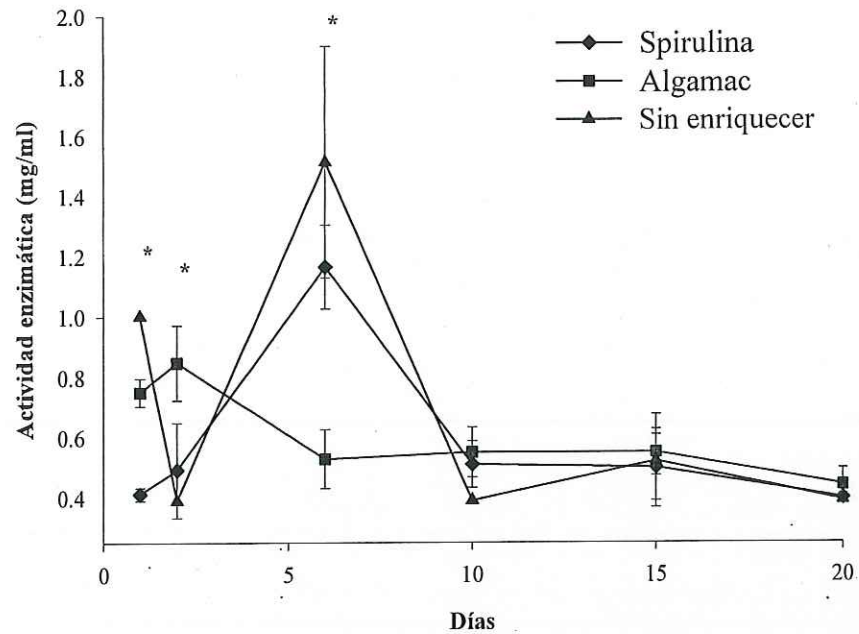


Figura 14. Actividad enzimática de amilasa (mg/ml) en juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con *Artemia salina* enriquecida (*Spirulina* sp y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días.

La actividad de la lipasa muestra su máximo para el día 10 en el caso del tratamiento sin enriquecer, mientras que para Algamac y Spirulina se presenta el día uno de experimentación (Figura 15).

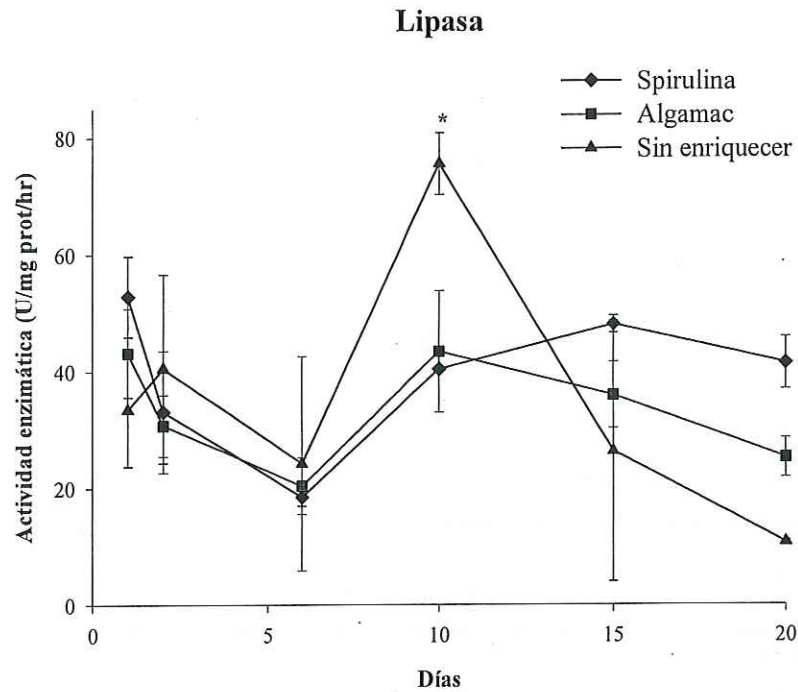
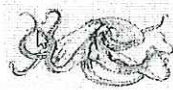


Figura 15. Actividad enzimática de lipasa (U/mg proteína/hr) en juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados con *Artemia salina* enriquecida (*Spirulina* sp y Algamac 2000) y sin enriquecer durante 20 días.

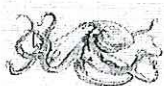
El contenido de aminoácidos presente en la muestras, mostró diferencias significativas entre tratamientos al final del periodo experimental con respecto a las muestras iniciales. Isoleucina, leucina y tirosina presentaron valores altos al inicio del periodo experimental, mientras que tirosina, alanina y glicina fueron altos al final de los 20 días (Tabla V).

Tabla V. Perfil de aminoácidos esenciales (AAE) y no esenciales (AANE) (mg de AA/g proteína) de *Artemia salina* y juveniles de *Octopus bimaculoides* alimentados durante 20 días con *Artemia salina* enriquecida con *Spirulina* (ES) o AlgaMac-3050 (EA) y sin enriquecer (SinE).

AAE (mg /g)	<i>Artemia salina</i> *			<i>Octopus bimaculoides</i>			
	Sp	Alg	SinE	Inicial	ES	EA	SinE
Arginina	45.3	45.7	39.5	47.5 ± 0.49	47.7 ± 0.20	47.0 ± 0.30	44.4 ± 0.03
Fenilalanina	106.1	104.7	106.6	91.8 ± 0.31	99.8 ± 0.50	96.2 ± 0.17	95.9 ± 0.08
Histidina	17.8	17.7	18.2	19.8 ± 0.05	19.5 ± 0.06	19.2 ± 0.05	19.9 ± 0.02
Isoleucina	122.3	119.1	125.6	127.4 ± 0.13 ^a	117.3 ± 0.32 ^b	119.4 ± 0.31 ^b	118.9 ± 0.19 ^b
Lisina	48.3	48.5	47.7	51.7 ± 0.08	51.5 ± 0.66	48.7 ± 0.42	51.0 ± 0.33
Leucina	175.4	172.3	179.5	188.3 ± 0.24 ^a	168.9 ± 0.30 ^b	171.6 ± 0.02 ^b	173.7 ± 0.10 ^b
Metionina	12.0	13.2	16.9	11.2 ± 0.79	14.4 ± 0.90	11.4 ± 0.08	14.1 ± 0.33
Treonina	53.7	51.8	44.5	51.9 ± 0.35 ^b	60.8 ± 0.06 ^a	60.0 ± 0.02 ^a	59.2 ± 0.07 ^a
Valina	99.0	97.9	99.1	97.4 ± 0.11 ^a	87.2 ± 0.15 ^b	86.8 ± 0.13 ^b	87.1 ± 0.04 ^b
AANE (mg /g)							
Ácido aspártico	49.4	50.1	48.8	48.1 ± 0.07	50.1 ± 0.24	50.5 ± 0.09	51.0 ± 0.08
Prolina	20.1	21.0	20.2	19.2 ± 0.03	19.3 ± 0.05	19.2 ± 0.01	19.4 ± 0.02
Tirosina	29.8	28.6	29.3	28.8 ± 0.003 ^a	27.1 ± 0.05 ^b	26.2 ± 0.04 ^b	26.5 ± 0.07 ^b
Alanina	71.4	71.1	67.2	59.4 ± 0.06 ^a	67.8 ± 0.32 ^b	70.2 ± 0.01 ^b	68.6 ± 0.02 ^b
Ácido glutámico	68.9	73.9	73.2	69.1 ± 0.42	66.8 ± 0.14	75.4 ± 0.09	70.7 ± 0.41
Glicina	43.1	45.7	44.3	44.7 ± 0.31 ^b	57.9 ± 0.12 ^a	55.2 ± 0.27 ^a	56.3 ± 0.11 ^a
Taurina	1.9	2.8	1.9	5.6 ± 0.06	5.7 ± 0.07	5.7 ± 0.06	5.9 ± 0.09
Serina	35.3	35.8	37.8	38.2 ± 0.05	38.1 ± 0.05	37.4 ± 0.19	37.6 ± 0.10

*Sp = *Artemia salina* enriquecida con *Spirulina maxima*, Alg = *Artemia salina* enriquecida con AlgaMac 3050, SinE = *Artemia salina* sin enriquecer.

Valores promedios en la misma fila con diferente letras son significativamente diferentes.



V. DISCUSIÓN

De manera similar con otras tres especies: *O. digueti*, *O. briaerus* y *O. maya*; *O. bimaculoides* presenta huevos grandes, que van desde 10-17mm, y los organismos recién eclosionados pesan de 70-100mg y una longitud de manto de 6 a 7mm. *O. bimaculoides* además presenta de 250 a 750 huevos por puesta y su desarrollo embrionario dura de 55 a 85 días a 24°C y 18°C, respectivamente (Hanlon y Forsythe, 1985).

Al hacer una comparación de las cuatro especies podemos observar que el tamaño de huevo va desde 7mm de largo en *O. digueti*, que es una especie pequeña, hasta 17mm de largo en especies de tamaño mediano o grande como lo son *O. bimaculoides* y *O. maya*, sin embargo y a pesar de la diferencia en tamaños, con respecto al huevo, los organismos de estas dos especies presentan juveniles que son bentónicos casi inmediatamente después de eclosionar, lo que los hace fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio. Las especies antes mencionadas presentan organismos recién eclosionados entre 6 y 7mm de largo (manto), sin embargo para el caso de *O. digueti* el peso de los organismo es menor (40mg), a diferencia de *O. briaerus*, *O. maya* y *O. bimaculoides* que presentan pesos de 95 a 100mg como máximo. Las diferencias con *O. digueti* podrían estar asociadas con el hecho de que los adultos de esta especie llegan a un peso máximo de 60g, mientras que los adultos de *O. bimaculoides* puede alcanzar hasta los 2kg de peso. La cantidad de huevos por puesta está relacionada directamente con el tamaño de los organismos adultos. De *O. briaerus* y *O. bimaculoides* se han reportado puestas de entre 250 y 750 huevos (Hanlon y Forsythe, 1985), hecho que contrasta con el máximo de 316 huevos que fueron obtenidos en el presente estudio. Posiblemente esto se pueda explicar a partir del hecho de que las



hembras utilizadas en este trabajo eran pequeñas (entre 350g y 690g). En el caso de *O. maya* los organismos adultos pueden llegar a tallas de 5,700g (Hanlon y Forsythe, 1985) por lo que la cantidad de huevos por puesta puede llegar hasta 5,000. Por el contrario, *O. digueti* es una especie pequeña que solo logra tener puestas de 50- 150 huevos (Hanlon y Forsythe, 1985).

El desarrollo embrionario de cada especie depende en gran medida de la temperatura de cultivo (Hanlon y Forsythe *et al.*, 1985). En el caso de *O. bimaculoides*, los juveniles fueron obtenidos en 55 días a 24°C mientras que se ha reportado que el desarrollo embrionario de esta especie se lleva a cabo durante 85 días a 18°C (Hanlon y Forsythe *et al.*, 1985). En el caso de las otras especies, tanto *O. maya*, como *O. digueti* presentan un desarrollo embrionario de 42- 45 días entre 24-26°C (Hanlon y Forsythe, 1985; Van Heukelem, 1983) y entre 50 y 65 días tanto en condiciones de laboratorio (24°C) como en el medio natural (Solis, 1967; Rosas *et al.*, 2008a). Ambas especies son de aguas cálidas, mientras que *O. briareus* y *O. bimaculoides* presentan desarrollos embrionarios de 55 hasta 85 días, ambas de aguas más frías (16-18°C).

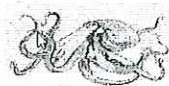
Al igual que *O. maya*, así como la mayoría de las especies de pulpo reportadas, *O. bimaculoides* presenta un avivamiento del huevo por el extremo distal del mismo. Hanlon y Wolterding (1989), reportaron que *O. briareus* se gira 180° hacia la parte distal del huevo, de dos a siete días antes de la eclosión. Esto mismo sucede en *O. bimaculoides*, sin embargo, el giro se hace en las primeras semanas de vida y no al final del desarrollo embrionario. Al mismo tiempo, en la mayoría de las ocasiones presenta una reabsorción total del saco vitelino antes de la eclosión, pero, algunas veces los organismos nacen con el saco aún unido a la boca, el cual tarda en desprenderse entre 15



y 60 min después de eclosionados dependiendo de la madurez del animal al momento de la eclosión. Existen evidencias que sugieren que la absorción del vitelo podría estar asociada con la temperatura y el movimiento del agua y el estrés, lo que puede provocar que los pulpos lleguen a nacer prematuramente (Hanlon y Wolterding, 1989). La estimulación física del huevo (por la madre o el experimentador) puede resultar en el incremento de la respiración y movimientos de los brazos, la expansión de cromatóforos en el embrión y ocasionalmente expulsión de tinta dentro del huevo. Este constante movimiento (y secreciones) pueden causar que la presión dentro del huevo provoque una expulsión del pulpo fuera de este, provocando una eclosión prematura (Hanlon y Wolterding, 1989), observaciones similares sucedieron en el presente estudio.

Al igual que *O. maya*, los juveniles de *O. bimaculoides* recién eclosionados presentan un peso promedio de 0.1 g (Van Heukelem, 1983; Hanlon y Forsythe, 1985), con características de un adulto pequeño. Estos animales son bentónicos, muestran cambios de coloración, expulsan tinta y pueden ingerir presas más grandes que ellos, esto debido a que al igual que *O. maya*, presentan un desarrollo directo, sin pasar por la etapa larval (Solís, 1967; Solís-Ramírez y Chávez, 1985; Rosas *et al.*, 2008a). En contraste *O. vulgaris* (con fase larval prolongada) presentan tallas de < 3mm al eclosionar (Villanueva, 1995).

O. bimaculoides parece tener un largo ciclo de vida para un pulpo, ya que se reporta que a los 18°C las hembras desovan a los 12.5 meses de vida (Forsythe y Hanlon, 1988a). Requieren entre 2 y 3 meses para cuidar la puesta, por lo que su ciclo de vida es aproximadamente de entre 15 y 17 meses. A 23°C las hembras desovan a los 10 a 12 meses, dando un ciclo completo con todo y puesta entre los 12 y 14 meses de vida,



después del cual mueren, debido al largo periodo que permanecen sin alimentarse limpiando y cuidando su puesta de posibles depredadores. Los machos, por su parte parecen vivir más que las hembras (Forsythe y Hanlon, 1988a), debido probablemente a que los machos no pasan por la etapa de inanición y por lo tanto son aproximadamente 3 meses más longevos que estas.

Entre las especies de pulpo con huevos grandes solo *Eledone moschata*, una especie del mediterráneo, tiene un ciclo de vida tan largo como *O. bimaculoides* (de 12 a 24 meses) dependiendo de la temperatura estacional (Forsythe y Hanlon, 1988a). El ciclo de vida de otras especies con huevos grandes es de 6 a 12 meses, como es el caso de *O. maya* que fue determinado por Hanlon y Forsythe (1985). Ellos determinaron un ciclo de vida entre 9 y 10 meses, para temperaturas de cultivo entre 25 y 30°C (Van Heukelem, 1983).

Por otro lado, especies que presentan ciclos planctónicos como *O. vulgaris* tienen ciclos ligeramente más largos (12 a 18 meses), debido a su fase planctónica, la cual puede llegar a durar de 1 a 3 meses (Forsythe y Hanlon, 1988a).

En la zona norte del estado de Baja California Sur, se ha observado que las hembras presentan estadios de madurez sexual durante los meses de febrero a abril (Carta Nacional Pesquera, 2004). Lo cual concuerda con el presente estudio, donde las puestas que se lograron obtener, ya sea por fecundación en el laboratorio o por hembras cargadas del medio natural, se dio en los meses de verano (julio, agosto y septiembre).

Al colocar una pareja de pulpos en un mismo estanque se produjo un cortejo entre el macho y la hembra que incluía abrazos, cambios de coloración y persecuciones. Esto probablemente con el objetivo de reconocerse entre sí. Esta observación concuerda



con lo reportado por Rocha (2003), quien menciona que el apareamiento puede producirse después de un elaborado cortejo entre el macho y la hembra con cambios de coloración específicos y complejos junto a una serie de movimientos, con objeto de identificar el sexo opuesto, después de lo cual el apareamiento comienza.

Los pulpos son animales solitarios que muestran cortejo antes de copular, la duración de la copula puede variar de media hora a dos horas, dependiendo de la especie (intervalos de un minuto a seis horas). Los mejores datos disponibles son para *O. vulgaris* y *O. cyanea*, donde *O. vulgaris* es una de las muchas especies que muestran un pequeño prelude antes de la cópula. Esta especie cópula en una de dos formas: el macho puede abrazar a la hembra, montándose sobre su manto, o puede permanecer cerca de la hembra y extender su tercer brazo hectocolizado (Hanlon y Messenger, 1999). En el presente estudio en la mayoría de los organismos utilizados, el macho de *O. bimaculoides* realizó la copula a "distancia". El macho, sin abrazar a la hembra, introdujo su brazo hectocotilizado en la cavidad de la hembra para así, probablemente, colocar los espermatozoides y que se lograra la fecundación. Esto concuerda con *O. maya* (Caamal, 2006). Cuando la hembra es fecundada, los espermatozoides y el semen pueden ubicarse en distintas partes del cuerpo de la hembra dependiendo de la especie. Algunas partes son: un receptáculo seminal en las glándulas oviductales, una bolsa situada debajo del ojo, un receptáculo seminal situado en los labios, una hendidura lateral localizada en la parte ventral anterior del manto, entre otros (Rocha, 2003). Sin embargo en este trabajo no fue posible determinar una copula, ya que no se realizaron observaciones para determinar si la hembra estaba fecundada por algún macho del medio natural, o fue fecundada en el momento en el que el macho colocó su brazo en la cavidad de la hembra.



Los pulpos incirrados (pertenecientes al suborden Incirrata, sin cirros (papilas sensoriales), ni aletas como *O. vulgaris*, depositan sus huevos sobre una superficie en el interior de las grietas donde viven y los protegen durante la incubación. La colocación puede durar desde algunos días hasta semanas dependiendo del número de huevos, el tipo de puesta y la temperatura. Las hembras cuidan, limpian continuamente y protegen los huevos de la depredación así como de posibles infecciones bacterianas y fungales durante toda la duración del desarrollo del embrión (Rocha, 2003). Lo mismo ocurrió en el presente estudio, las hembras de *O. bimaculoides* colocaron sus puestas en las superficies de los refugios (tubos de PVC o ABS), donde se encargaron de cuidarlos y protegerlos hasta que los organismos estuvieron listos para eclosionar (Figura 9). Al igual que *O. maya*, esta especie permanece con su puesta sin alimentarse y limpiándola continuamente (Caamal, 2006).

Esto provoca la muerte de la hembra por inanición durante los dos meses que permanece al cuidado de los huevos. Aún después de que el último organismo eclosiona, la hembra puede llegar a sobrevivir hasta dos semanas más o morir cuando el último pulpo ha eclosionado. Si la hembra sobrevive algún tiempo después de que el último pulpo ha eclosionado, esta no acepta alimento alguno (observaciones del presente estudio).



5.1 Preferencias alimenticias de juveniles (alimento vivo e inerte).

Después de alimentar 15 días a juveniles de *O. bimaculoides* con artemia adulta, los organismos dejaban de aceptar dicho alimento, debido probablemente a que su mayor demanda metabólica es proteica y por lo tanto, su requerimiento de proteínas y aminoácidos es alto (Lee, 1994). Es posible establecer que de los resultados obtenidos en el presente estudio las artemias ya no cubrían los requerimientos necesarios para que los pulpos siguieran desarrollándose, lo cual provocó el canibalismo, comportamiento muy común en cefalópodos (Rocha, 2003; Rosas *et al.*, 2005; Iglesias *et al.*, 2000). Entre las características que destacan a los octópodos se encuentra el ser depredadores oportunistas: La dieta del pulpo depende de las presas disponibles, pudiéndose considerar un depredador oportunista que, con cierta frecuencia, puede alimentarse de cadáveres frescos a su alcance. Normalmente se alimentan de crustáceos (cangrejos fundamentalmente), peces, moluscos (sobre todo bivalvos) y poliquetos (Rocha, 2003; Hanlon y Forsythe, 1985). Debido a esta característica se le ofreció alimento fresco (mejillón, jaiba, pescado y calamar) después de los primeros 15 días de vida y se pudo observar que el tratamiento que mayor sobrevivencia presentó fue el de calamar, seguido por pescado, jaiba y finalmente mejillón, se esperaba que debido a las características de la jaiba, y a que es un alimento preferido por adultos de pulpo (Hanlon y Forsythe, 1985), fuera este el tratamiento con mayor sobrevivencia, sin embargo no fue así, esto pudo deberse quizá a estrés y bajo consumo del alimento. En el caso del mejillón, se pudo observar que de los 4 tratamientos, fue el alimento menos aceptado, lo cual se reflejó en el porcentaje de sobrevivencia. Por lo que, el calamar fue el alimento que mejor respuesta a los parámetros de crecimiento arrojó, con 93.33% de sobrevivencia.



5.2 Crecimiento de juveniles alimentados con Artemia salina enriquecida y sin enriquecer.

En el presente estudio juveniles de *O. bimaculoides* fueron capaces de crecer y desarrollarse siendo alimentados con *A. salina*, como único alimento, los primeros 20 días de vida, mostrando altas tasas de crecimiento (5.6 ± 0.11 , 4.4 ± 0.19 y 3.7 ± 0.12 mg/día en peso húmedo), con respecto a otras especies de pulpo.

Aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos los animales alimentados con Artemia enriquecida con *Spirulina maxima* (ES), mostraron tendencia hacia una mayor mortalidad mientras que en los organismos alimentados con artemia sin enriquecer (SinE) no se observaron mortalidades. Es interesante hacer notar que las mortalidades que se presentaron en los diferentes tratamientos fueron observadas después del día 15 de vida, lo que sugiere que la artemia como alimento debería de ser utilizada únicamente dentro de ese lapso, con el fin de evitar la mortalidad asociada con el canibalismo. Así mismo estos resultados sugieren que un cambio en los requerimientos nutricionales ocurre después de los 15 días de vida lo cual pudiera estar asociado con el inicio del crecimiento exponencial característico de estos organismos (Leporati *et al.*, 2007; André *et al.*, 2009). Otros reportes señalan que el canibalismo puede aumentar cuando se presentan altas densidades de cultivo y baja cantidad de refugios, y además la calidad del alimento es deficiente (Socorro *et al.*, 2005). Cualquiera que sea la razón, el hecho de que algunos organismos se coman unos a otros puede generar un fuerte impacto en las tasas de crecimiento. Las tasas de crecimiento fueron más altas que las reportadas por otras especies de edades similares, indicando que



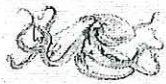
la artemia sin enriquecer es una fuente de alimento prometedor para ser utilizada en el crecimiento de esta especie durante los primeros 20 días de vida de *O. bimaculoides*.

El tratamiento EA fue el que mayor crecimiento arrojó, este alimento se enriqueció con Algamac, producto comercial que contiene altos porcentajes de lípidos y DHA (ácido docosahexaenoico), mientras que *Spirulina*, usada en el tratamiento ES, es conocido por su contenido de aminoácidos y ácidos grasos, entre los que se encuentran el ácido γ -linolenico y el ácido araquidonico (Belay *et al.*, 1996). Contrario a lo que se esperaba, la artemia sin enriquecer (SinE) y enriquecida con *Spirulina* (ES), presentaron tasas de crecimiento más bajas que las observadas en los organismos alimentados con artemias enriquecidas con Algamac (EA). Rosas *et al.* (2007) observó que una dieta con alto contenido de lípidos tiene un efecto negativo en *O. maya*. Por lo tanto, no hay una razón aparente para enriquecer artemia con productos con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), sin embargo, aunque no es necesario proporcionar un alto nivel de lípidos (Navarro y Villanueva, 2000), si es recomendable proporcionar a los organismos un buen perfil de ácidos grasos esenciales para lograr los requerimientos nutricionales. Navarro y Villanueva (2000), determinaron que de los ácidos grasos en larvas de *Sepia*, pulpos y calamares en específico los PUFA's son muy elevados, estando el ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) presente en 20 a 30% de los ácidos grasos de los lípidos totales. En juveniles de *O. vulgaris* salvajes, los lípidos varían entre 6.6 y 12.5% del peso seco, disminuyendo con el tamaño del organismo. Cerca de 50% de los ácidos grasos son PUFA's y de estos, los n-3 son 6 veces más abundantes que los n-6 (Navarro y Villanueva, 2000, 2003). Estudios en *Eledone moschata*, *Sepia officinalis* y *Todarodes sagittatus* mostraron grandes cantidades de PUFA's (Sinanoglou y



Miniadis-Meimaroglou, 1998). Así, se reporta que los *n*-3 PUFA, y en particular el DHA, colesterol y fosfolípidos son de vital importancia para el desarrollo de las primeras fases de la vida de cefalópodos (Villanueva, 1994, 1995).

Las tasas de crecimiento observadas en el presente estudio (3.0 a 4.5%/ día, 3.7 a 4.4mg/ día peso húmedo) son similares a los reportados por *O. maya* recién eclosionados y alimentados con artemia (4 a 5%/ día, Rosas *et al.*, 2008), sugiriendo que ambas especies, *O. maya* y *O. bimaculoides*, tienen un gran potencial en la acuicultura. Durante el crecimiento exponencial de los pulpos, las tasas de crecimiento instantáneas relativas (% de incremento en peso o longitud por día, TCR) siguen un comportamiento exponencial lo cual se ve reflejado en una TCR constante. Esta tasa generalmente baja cuando el crecimiento pasa a una forma potencial (Leporati *et al.*, 2007). Los organismos doblan su peso de una manera constante (por ejemplo, cada 14 días un 50%/día o cada 7 días un 10%/ día). Cuanto más grande es el tamaño final de una especie, más larga es la fase de crecimiento exponencial, y por lo tanto son capaces de doblar su peso un mayor número de veces, durante esta fase (Forsythe, 1984; Forsythe y Van Heukelem, 1987). *O. maya* logra un tamaño de adulto de aproximadamente 1kg. de peso con tasas de crecimiento de alrededor del 9%/ día, doblando su peso total en los primeros 100 días de su fase exponencial (Van Heukelem, 1976), mientras que *O. digueti* quien crece a un tamaño máximo de menos de 100g, solo logra 6.5%/ día, doblando su peso total en 70 días, que es lo que dura su fase exponencial (DeRusha *et al.*, 1989). Sin embargo, la gran ventaja, al igual que otros cefalópodos, *O. bimaculoides* alimentado con artemia puede alcanzar el doble de su peso vivo, sugiriendo, también, un



crecimiento en fase exponencial, al menos durante los primeros 15 días, cuando no se observa mortalidad.

La razón por la que *O. bimaculoides* podría ser alimentado con artemia concuerda con lo reportado por Hanlon y Forsythe (1985), quienes encontraron que pulpos recién eclosionados son capaces de atacar y capturar fácilmente una gran cantidad de presas de distintos tamaños, inclusive de 1 a 2 veces más grandes que la longitud de su manto. Durante el desarrollo de este estudio se pudo observar que los juveniles de *O. bimaculoides* recién eclosionados empiezan a capturar presas de 10 a 12hrs. después de eclosionar. Así mismo, ha sido observado que *O. maya* fácilmente captura adultos de artemia, debido a su nado lento, capturándolas cuando nadan en el fondo del estanque, comportamiento similar observado en *O. bimaculoides*. Los datos obtenidos por *O. maya* muestran que durante los primeros 10 a 15 días después de la eclosión, los juveniles presentan un comportamiento epipelágico, indicando cierta habilidad para capturar presas epibénticas como misidaceos o estadios de mysis de camarón o adultos de artemia (Moguel *et al.*, en prensa).

5.3 Análisis enzimático y perfil de aminoácidos de juveniles tempranos

El perfil de aminoácidos obtenido de los tratamientos con artemia, indican que la arginina y treonina fueron más bajas en SinE que en ES y EA, mientras que metionina fue la más alta. Algunos aminoácidos mostraron diferencias significativas entre las muestras al inicio y al final del periodo experimental, a pesar de esto, estos mismos aminoácidos al final del periodo experimental no muestran diferencias entre tratamientos.



El contenido de aminoácidos esenciales (AAE) en la artemia, como fenilalanina, isoleucina, leucina y valina fue limitada. Cuando los perfiles de AAE de la artemia son comparados con los de *O. bimaculoides* alimentados durante 20 días, estos resultan en mayor concentración que los del cuerpo entero de pulpo. Sin embargo, los niveles del resto de los AAE (arginina, histidina, lisina, metionina y treonina) permanecieron constantes, pero bajos, al inicio y después de que los pulpos fueron alimentados con artemia. Estos resultados sugieren que *O. bimaculoides* tuvo la capacidad de crecer, a pesar, de ciertas deficiencias en alguno aminoácidos esenciales en la dieta, como el caso de metionina y lisina. Estos resultados sugieren que, además de la artemia los pulpos deberían de ser alimentados con algún otro alimento que complemente los AA deficientes. En estudios llevados a cabo en *O. maya* se ha sugerido el uso de pasta de jaiba como complemento nutricional durante las primeras etapas de vida (Rosas *et al.*, 2008b). Por otra parte, aunque el papel de los AAE aún no está definido en *O. bimaculoides*, los resultados obtenidos en paralarvas de *O. vulgaris*, sugieren que la lisina, la arginina, y la isoleucina podrían desempeñar un papel protagónico en el metabolismo de la proteína de los cefalópodos (Villanueva *et al.*, 2004). Por ejemplo, la arginina se metaboliza fuertemente en los cefalópodos (Hochachka *et al.*, 1983). Durante el trabajo anaerobio, la fosfato arginina es hidrolizada, incrementando la disponibilidad de esta para la condensación con glucosa derivado de piruvato para formar octopina. La octopina es el principal producto del metabolismo anaeróbico, que se acumula en cefalópodos adultos durante periodos de ejercicio y estrés (Hochachka *et al.*, 1976; Storey y Storey, 1978). Por otro lado, la lisina ha sido identificada como el promotor del crecimiento en *Sepia officinalis* (Domínguez, 1999), sugiriendo que, no solo se necesita



una alta concentración, sino que también podría tener un rol en el metabolismo. Esto podría explicar porqué *O. bimaculoides*, en este estudio conservó sus niveles de la lisina y de la arginina, a pesar de que la artemia era deficiente en estos.

La actividad enzimática registrada durante este experimento, muestra un comportamiento variable, donde la tripsina desempeña un papel fundamental en la actividad enzimática entre las proteasas alcalinas. A diferencia de *Sepia officinales* y *O. vulgaris* donde la enzima proteolítica principal es la quimiotripsina (Boucaud-Camou y Roper, 1995). En comparación con larvas de peces, el nivel de actividad de tripsina en pulpos es más elevado (Villanueva *et al.*, 2002). La actividad de tripsina y quimiotripsina suelen mantenerse solo si el nivel de dieta se mantiene (Villanueva *et al.*, 2002). La disminución de su actividad refleja una dieta pobre o poco balanceada (Domingues *et al.*, 2004). Además, la actividad de la lipasa tiende a estabilizarse después del día 15, con un pico en actividad en el día 10.

La inducción de enzimas digestivas ha sido observada en paralarvas y juveniles de *O. vulgaris* y en adultos de *O. maya* (Villanueva *et al.*, 2004; Rosas *et al.*, 2008b). Aunque es difícil relacionar la inducción de enzimas digestiva con la tasa de crecimiento o la sobrevivencia, las proteasas alcalinas, la quimiotripsina y las lipasas mostraron mayor actividad en los juveniles alimentados con artemia sin enriquecer (SinE), sugiriendo que esta artemia puede ser mejor digerida, realzando la digestibilidad y al final la biomasa. Un comportamiento similar fue observado cuando pre-adultos de *O. maya* fueron alimentados con dietas que contenían niveles altos de lípidos (Domingues *et al.*, 2007).



VI. CONCLUSIONES

O. bimaculoides es una especie prometedora para el cultivo comercial, puesto que sus tasas de crecimiento son comparables a las de otras especies de importancia comercial. Aunque se pudieron obtener buenos resultados en este estudio, alimentando solo con artemia, es necesario seguir experimentando con otras fuentes naturales de alimento y con dietas formuladas, para obtener un perfil del aminoácidos y ácidos grasos, que permita maximizar el crecimiento de *O. bimaculoides*.

Al igual que otros autores (Hanlon y Forsythe, 1985) en este trabajo podemos concluir que las ventajas de cultivar especies de huevos grandes sería que: 1) presentan desarrollo directo, sin estadio larval o fase planctónica, 2) los organismos recién eclosionados son de tamaño grande y completamente desarrollados, 3) se alimentan inmediatamente con presas relativamente grandes, 4) presentan un comportamiento bentónico casi inmediatamente después de eclosionar y buscan refugio rápidamente, 5) presentan un crecimiento rápido con un relativamente corto ciclo de vida, 6) se adaptan fácilmente al ambiente de laboratorio y 7) se reproducen en cautiverio.

El potencial de cultivo de *O. bimaculoides* es excelente ya que presenta altas tasas de crecimiento y desarrollo directo. Sin embargo, es necesario seguir realizando investigación para lograr que una gran cantidad de organismos de esta especie puedan alcanzar una talla comercial, y buscar a través de ciclos de temperatura y luz, la producción de puestas a lo largo de todo el año. Además de seguir buscando dietas formuladas que puedan sustituir organismos vivos marinos y crustáceos para mantener el crecimiento de juveniles y adultos de la especie.



VII. LITERATURA CITADA

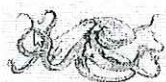
- Aguado-Giménez, F. y García-García, B. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*. 10:361-377.
- Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., y Rosas, C., 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273, 641-655.
- André, J., Grist, E.P.M., Semmens, J.M., Pecl, G. y Segawa, S., 2009. Effects of temperature on energetics and the growth pattern of benthic octopuses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 374, 167-179.
- Belây A., Kato, T. y Ota, Y. 1996. *Spirulina (Arthrospira)*: Potential application as an animal feed supplement. *J. Appl. Phycol.* 8, 303-311.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β : colorimetric assay method. In: *Methods in Enzymology* (Colowich, S.P., Kaplan, N.O. eds). Academic Press, New York, 149-157 pp.
- Boletzky, S.V. y Hanlon, R. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod mollusks. *Memoirs Natl. Mus. Vict.* 44, 147-187.
- Boucaud-Camou, E. y Boucher-Rodoni, R. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. In: *The Mollusca*, Vol. 5, Academic Press, 149-187.
- Boucaud-Camou, E. y Roper, C.F.E. 1995. Digestive enzymes in paralarvae cephalopods. *Bull. Mar. Sci.* 57, 313-327.
- Boyle, P.R. 1983. Cephalopods life cycles. Volume I. Species accounts. Academic Press. London. 475 pp.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.



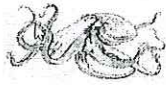
- Caamal, M.C.P. 2006. Efecto del tipo de alimento sobre el desove y eclosión del pulpo (*Octopus maya*), en condiciones controladas. Tesis de licenciatura. Instituto tecnológico de Conkal, Yucatán, México. 48 pp.
- Cardenas-Lopez, J.L. y Haard, N.F., 2005. Cystein proteinase activity in jumbo squid (*Dosidiscus gigas*) hepatopacreas extracts . *Journal of Food Biochemistry* 29, 171-186.
- Cardenas-Lopez, J.L. y Haard, N.F., 2009. Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidiscus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. *Food Chemistry* 112, 442-447.
- Carta Nacional Pesquera, 2004. 2da Sección. Publicada en el Diario Oficial de la Federación. Última actualización 27 de Junio 2008. Instituto Nacional de Pesca. SAGARPA.
- CONAPESCA e ITESM. 2004. Características generales, aspectos oceanológicos y geográficos del pulpo. SAGARPA. 175 pp.
- Daly, H.I. y Peck, L.S. 2000. Energy balance and cold adaptation in the octopus *Pareledone charcoti*. *J. Exp. Mar. Biol. Ec.* 245, 197-214.
- D'Aniello, A., Nardi, G., De Santis, A. Vetere, A., di Cosmo, A., Marchelli, R., Docenas, A. y Fisher, G. 1995. Free L-amino acids and D-aspartate content in nervous system of cephalopoda. *A. Comparative Study. Comp. Chem. Physiol.* 122, 661-666.
- DeRusha, R.H., Forsythe, J.W. y Hanlon, T.R. 1987. Laboratory growth, reproduction and life span of the Pacific Pygmy Octopus, *Octopus digueti*. *Pac. Sci.* 41, 104-121.
- DeRusha, R., Forsythe, J.W., DiMarco, F.P. y Hanlon, R.T. 1989. Alternative diets for maintaining and rearing cephalopods in captivity. *Lab. Anim. Sci.* 39, 306-312.
- Domingues, P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. University of the Algarve, Portugal, 1-95 pp.



- Domingues, P.M., Kingston, T., Sykes, A. y Andrade, J.P. 2001. Growth of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) at the upper end of the biological distribution temperature range. *Aquacult. Res.*, 32, 923-930.
- Domingues, P., López, N., Muñoz, J.A., Maldonado, T., Gaxiola, G., y Rosas, C. 2007. Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aqua. Nut.* 13, 273-280.
- Domínguez, P., Gaxiola Cortés, G. y Rosas Vázquez, C. 2004. Alimentación y Nutrición de Moluscos Cefalópodos: Avances Recientes y Perspectivas Futuras. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19. Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Erlanger, B.F., Kolowsky, N. y Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Folch, J., Lee, M., y Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Forsythe, J.W., 1984. *Octopus joubini* (Mollusca:Cephalopoda): a detailed study of growth through the full life cycle in a closed seawater system. *J. Zool. lond.* 202, 393-417.
- Forsythe, J.W. y Hanlon, R.T. 1988a. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Mar. Biol.* 98, 369-379.
- Forsythe, J.W. y Hanlon, R.T., 1988b. Behavior, body patterning and reproductive biology of *Octopus bimaculoides* from California. *Malacologia.* 29, 41-55.
- Forsythe, J.W. y Van Heukelem, W.F., 1987. Growth. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod life cycles*. Academic Press, London, 135-155 pp.
- García-García, B. y Aguado-Gimenez, F. 2002. Influence of diet on ongrowing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211: 171-182.
- Gawlicka, A., Parent, B., Hom, M.H., Ross, N. y Opsdad, I. and Torrissen, O.J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of atlantic halibut (*Hippoglossus*



- hippoglossus*). Indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184, 303-314.
- Gjellesvik, D.R., Lombardo, D., y Walther, B.T. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 123-134.
- Hamasaki, K., Fukunaga, K., Yoshida, Y. y Maruyama, K., 1991. Effect of marine microalgae *Nannochloropsis sp.* on survival and growth on rearing pelagic paralarvae of *Octopus vulgaris*, and results of mass culture in the tank of 20 metric tons. *Saibai-Giken* 19, 75-84. (in Japanese).
- Hamasaki, K. y Takeuchi, T., 2000. Effects of the addition of *Nannochloropsis* to the rearing water on survival and growth of planktonic larvae in *Octopus vulgaris*. *Saibai-Giken* 28, 13-16. (in Japanese).
- Hanlon, R.T. y Forsythe, J.W. 1985. Advances in the laboratory culture of Octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*. 35, 33-40.
- Hanlon, R.T. y Wolterding, M.R. 1989. Behavior, body patterning, growth and life history of *Octopus briareus* cultured in the laboratory. *American Malacological Bulletin*. 7(1), 21-45.
- Hanlon, R.T. y Messenger, J.B. 1999. *Cephalopod Behaviour*. Cambridge University Press, 248 pp.
- Hickman, C.P., Larry, S.P., Parson, A. 1999. *Principios integrals de Zoología*. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid. pp. 921.
- Hochachka, P.W., Moon, T. W., Mustafa, T. y Storey, K.B. 1975. Metabolic sources of power for mantle muscle of a fast swimming squid. *Comp. Biochem. Physiol.* 52B, 151-158.
- Hochachka, P.W., Hartline, P.H., y Fields, J.H.A., 1976. Octapine as an end product of anaerobic glycolysis in the chambered nautilus. *Science*. 195, 72-74
- Hochachka, P.W., Mommsen, T.P., Storey, J., Storey, K.B., Johansen, K. y French, C.J. 1983. The relationship between arginine and proline metabolism in cephalopods. *Mar. Biol. Lett.* 4, 1-21.



- Houlihan, D.F., McMillan, D.N., Agnisola, C., Genuino, I.T. y Foti, L. 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.*, 106, 251-259.
- Hummel, B. C. W. 1959. The modified spectroscopic determination of chymotrypsin, trypsin and thermolysin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 1393-1399
- Hunt, S. y Nixon, M. 1981. A comparative study of protein composition in the chitin-protein complexes of the beak, pen, sucker, radula and oesophageal cuticle of the cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 68, 535-546.
- Iglesias J., Sánchez F.J., Otero J.J. y Moxica C. 2000. Culture of octopus *Octopus vulgaris*, (Cuvier): present knowledge, problems and perspectives. *Cahier Options Mediterraneennes* 47, 313-321.
- Iglesias J., Otero J.J., Moxica C., Fuentes L. y Sánchez F.J. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using artemia and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International* 12: 481-487
- Itami, K., Izawa, Y., Maeda, S. y Nakai, K., 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 29, 514-519. (in Japanese with English abstract).
- Iwasaki, M. y Harada, R. 1985. Proximate and amino acid composition of the roe and muscle of selected marine species. *J. Food Sci.* 50, 1585.
- Lee, P.G. 1994. Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.*, 25, 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. *Bull. Mar. Sci.*, 49, 362-372.
- Leporati, S., Pecl, G.T., Semmens, J.M., 2007. Cephalopod hatchling growth: the effects of initial size and seasonal temperatures. *Mar. Biol.* 151, 1375-1383.
- Mangold, K. y S.V. Boletzky 1973, New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.*, 19:7-12.
- Moguel, C., Mascaró, M., Avila-Poveda, O.H., Caamal-Monsreal, C., Sanchez, A., Pascual, C. y Rosas, C. 2009. Morphological, physiological, and behavioral



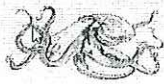
- changes during postembryonic development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Mar. Biol.* (En prensa).
- Navarro, J.C., y Villanueva, R. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*. 183, 161-177.
- Navarro, J.C. 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.
- Nixon, M. 1969. The lifespan of *Octopus vulgaris*. *Proceedings of Malacology Society of London*. 38:529-540
- National Resource Center for Cephalopods. <http://www.utmb.edu/nrcc/CephInfoRes.htm>.
- O'Dor, R. K. y Macalaster, E.G., 1983. *Bathypolypus arcticus*. In: Boyle, P.R. (Ed.), Cephalopod Life Cycles, Species Accounts, Vol. I, Academic Press, London, pp. 401-410.
- O'Dor, R. K. y Wells, M.J. 1973. Yolk protein synthesis in the ovary of *Octopus vulgaris* and its control by the optic gland gonadotropin. *J. Exp. Biol.* 59, 665-674.
- Rocha, F. 2003. Biología, ecología, cultivo y pesquerías de cefalópodos. Curso de postgrado. Universidad Austral de Chile e Instituto de Investigaciones Marinas. Vigo, España.
- Rosa, R., Nunes, L. y Sousa Reis, C. 2002. Seasonal changes in the biochemical composition of *Octopus vulgaris* Cuvier 1797, from three areas of the Portuguese coast. *Bull. Mar. Sci.* 71, 739-751.
- Rosas, C., Chay, D., Caamal, C., Tut, J., Rodríguez, D. y Romero, M. 2005. Bases biológicas para el cultivo del pulpo *Octopus maya*. Fortalecimiento de la operación e infraestructura para la reproducción de especies cultivables. Fondo de Fomento Agropecuario del estado de Yucatán. Informe Técnico. UNAM. México.
- Rosas, C., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., López, N., Maldonado, T. y Domingues, P., 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab and artificial diet. *Mar. Biol.* 152, 371-378.



- Rosas, C., Sanchez, A., Caamal, C., Cázares, R., Rodriguez, D., Romero, M., Chay, D., 2008a. Manual para el cultivo del pulpo *Octopus maya*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P., Cuzon, G., 2008b. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*. 275, 291-297.
- Rossi, F., Nardo, G., Palumbo, A. y Grotta, G. 1985. 5-Thiolhistidine, a new amino acid from eggs of *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80, 843-845.
- Sarath, G., De La Motte, R.S., y Wagner, F.W. 1989. Protease assay methods, In: *Proteolytic enzymes: A practical approach* (Beynon, R. and Bond, J., eds.), IRL Press. 25-56 pp.
- SEMARNAP. 1999. Estadísticas pesqueras básicas, Dir. Gral. De Informática y Reg. Pesq. México. pp. 125.
- Semmens, J.M., Pecl, G.T., Villanueva, R., Jouffre, D., Sobrino, I., Wood, J.B. y Rigby, P.R. 2004. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. *Marine and Freshwater Research*. 55:367-377.
- Siezen, R.J. y Shaw, D.C. 1982. Physicochemical characterization of lens proteins of the squid *Nototodarus gouldi* and comparison with vertebrate crystallins. *Biochim. Biophys. Acta* 704, 304-320.
- Sinanoglou, V.J. y Miniadis-Meimaroglou, S. 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Res Int.* 31, 467-473.
- Seidou, M., Kubota, L. Hiraki, K. y Kito, Y. 1988. Amino acid sequence of the retinal binding site of the squid visual pigment. *Biochim. Biophys. Acta* 957, 318, 321.
- Shirai, T., Kikuchi, N., Matsuo, N., Inada, H., Suzuki, T. y Hirano, T. 1997. Extractive componentes of the squid ink. *Fish. Sci.* 63, 939-944.
- Socorro, J., Roo, J., Fernández-López, A., Guirao, R., Reyes, T., Fernández-Palacios, y H. e Izquierdo, M.S. 2005. Engorde de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 en jaulas flotantes alimentado exclusivamente con boga *Boops boops* (L., 1758) de descarte de la acuicultura. *Bol. Inst. Esp. Oceanog.* 21 (1-4):189-194.



- Solis, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis. Inst. Nacional Investig. Biol. Pesqueras (México), Publicación Num. 18, 90 p.
- Solis-Ramírez, M. J. y E.A. Chávez. 1985. Evaluación y régimen óptimo de pesca del pulpo en la Península de Yucatán. An. Inst. Cien. Mar Limnol. Centro De Investigaciones pesqueras y de estudios avanzados del IPN. 13: 1-18.
- Storey K.B. y Storey J.M. 1978. Energy metabolism in the mantle muscle of the squid, *Loligo pealei*. *J. Comp. Pysiol.* 123B, 311-319.
- Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Univ. Hawaii, 1-224 pp.
- Van Heukelem, W.F. 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing, and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Lab. Anim. Sci.* 27(5), 852- 859.
- Van Heukelem, W.F. 1983. *Octopus maya* In: Boyle, P.R. (Ed.), Cephalopod Life Cycles. Vol. I. Academic Press, London, pp: 311-323.
- Vaz-Pires, P., Seixas, P. y Barbosa, A., 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture* 238, 221- 238.
- Villanueva, R. 1994. Decapod crab zoeae as food for rearing cephalopod paralarvae. *Aquaculture* 128, 143-152.
- Villanueva, R., Nozais, C. y Boletzky, S.V. 1996. Swimming behaviour and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* Cuvier from hatching to settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 208, 169-184.
- Villanueva, R. 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 2639- 2650.
- Villanueva, R., Koueta, N., Riba, J. y Boucaud-Camou, E. 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture* 205, 269-286.
- Villanueva, R., Riba, J., Ruíz-Capillas, C., González, A. V. y Baeta, M. 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effects of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture.* 242, 455-478.



- Vlieg, P. 1984. Proximate composition of New Zealand squid species. *N. Z. J. Sci.* 27, 45-150.
- Voss, G.L. y Solís, M.J. 1966. *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche. *Bulletin of Marine Science* 16:615-625.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., Quazuguel, P. y Le Gall, M.M. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: Growth, páncreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139, 129-138.

1

2

3

4

5
6