Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Incremento del crecimiento y la sobrevida de juveniles tempranos de la langosta de agua dulce "pinzas rojas" Cherax quadricarinatus (Parastacidae) mediante el mejoramiento de las prácticas de cultivo

Calvo, Natalia Soledad

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Calvo, Natalia Soledad. (2013). Incremento del crecimiento y la sobrevida de juveniles tempranos de la langosta de agua dulce "pinzas rojas" Cherax quadricarinatus (Parastacidae) mediante el mejoramiento de las prácticas de cultivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Calvo, Natalia Soledad. "Incremento del crecimiento y la sobrevida de juveniles tempranos de la langosta de agua dulce "pinzas rojas" Cherax quadricarinatus (Parastacidae) mediante el mejoramiento de las prácticas de cultivo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Incremento del crecimiento y la sobrevida de juveniles tempranos de la langosta de agua dulce "pinzas rojas" *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae) mediante el mejoramiento de las prácticas de cultivo.

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Lic. Natalia Soledad Calvo

Directora de tesis: Dra. Laura Susana López Greco
Consejera de estudios: Dra. Laura Susana López Greco
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2013

Incremento del crecimiento y la sobrevida de juveniles tempranos de la langosta de agua dulce "pinzas rojas" *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae) mediante el mejoramiento de las prácticas de cultivo.

La Dirección Nacional de Acuicultura propone la investigación de las especies exóticas ya introducidas y el mejoramiento de las tecnologías de cultivo actualmente utilizadas. Por esto, la presente tesis abordó dos temas principales para contribuir con información relevante al cultivo de *Cherax quadricarinatus*: el estudio de la vulnerabilidad nutricional de los juveniles en la fase de *hatchery* y la optimización del uso de refugios durante la fase de pre-engorde para disminuir el canibalismo. Se observó que los juveniles III (primer estadio de alimentación exógena) y 1 de gramo necesitan sólo 2 y 9 días de alimentación inicial, respectivamente, para acumular las reservas necesarias para mudar al estadio siguiente. El tiempo sin alimento que lleva a la muerte a los juveniles III y de 1 gramo sin poder mudar al estadio siguiente es de 9 y 51 días respectivamente, y son los valores más altos reportados para especies de decápodos. Durante largos periodos de inanición los juveniles consumen las reservas de proteínas y lípidos almacenadas en hepatopáncreas y músculo abdominal. Sin embargo, al suministrarles alimento los juveniles muestran gran capacidad de recuperación, reanudando su crecimiento rápidamente, completando sus reservas y generando nuevas reservas de glucógeno en el músculo abdominal. No se observó actividad enzimática asociada a la movilización de reservas y solo la actividad lipasa (digestiva) se mostró afectada por la inanición. Respecto del uso de refugios, por cada m^2 de tanque en la fase de pre-engorde, 2,55 m^2 de red cebollera colocada en forma aleatoria es suficiente para disminuir la mortalidad. Esta información constituye un avance en el conocimiento teórico y un aporte directo al mejoramiento de la producción de una especie con importancia para la acuicultura de nuestro país.

Palabras claves: Acuicultura, Decápodos, *Cherax quadricarinatus*, Nutrición, Punto-de-no-retorno, Punto-de-saturación-de-reserva, Hepatopáncreas, Enzimas digestivas, Refugios.

Increase in growth and survival of early juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae) through improved culture practices.

The Dirección Nacional de Acuicultura stimulates the research on introduced species and improvement of the aquaculture practices currently in use. In order to contribute with relevant information on *Cherax quadricarinatus* culture, the present thesis addressed two important topics: the study of the nutritional vulnerability in juveniles during the hatchery phase, and the optimization of shelter use to reduce cannibalism among juveniles during the nursery phase. Results showed that stage III (developmental stage from which juveniles feed exogenously) and 1 gram juveniles need to feed for a period not longer than 2 and 9 days, respectively, to accumulate enough reserves for successful molting to the following stage. A 9 and 51-day period of starvation leads to the death without molting of stage III and 1 gram juveniles, respectively, with these values being the highest ones reported for decapod species. Protein and lipid reserves are depleted in the hepatopancreas and abdominal muscle after a long starvation period. However, starved juveniles show a great ability to recover following a feeding period, quickly resuming their growth, replenishing their reserves and forming new glycogen reserves in the abdominal muscle. The enzymatic activity related to reserve mobilization was not observed and only lipase activity (digestive) was affected by starvation. On the other hand, 2.55 m^2 of randomly distributed onion mesh is recommended *per* meter of tank to decrease juvenile mortality during the nursery phase. This information provides theoretical knowledge that may directly contribute to improve the culture of a species commercially important for our country.

Key words: Aquaculture, Decapod, *Cherax quadricarinatus*, Nutrition, Point-of-no-return, Point-of-reserve-saturation, Hepatopancreas, Digestive enzymes, Shelters.

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por financiar el presente proyecto a través de los subsidios, UBACYT X458 (2008-2010), UBACYT 20020100100003 (2011-2014), PICT 01187 (2007), PIP 129 (2009-2011), PIP212 (2012-2014) otorgados a la directora de tesis.

A la Dra. Laura López Greco por su paciencia, especialmente del último año.

A la Dra. Fabiana Lo Nostro por introducirme al mundo de la histología, a la Dra. Juliana Giménez por prestarme su cámara, y a la Dra. Gladys Hermida por contestarme la lista interminable de preguntas!

A Carlos Anselmi del criadero Las Golondrinas y a Gustavo Wiki del CENADAC por donar los animales que fueron utilizados para la mayoría de los experimentos.

A Netting S.A. por donar las redes para los experimentos de refugios.

A Lío por la impresión de la tesis.

A mis compañeros del 4to piso, Hernán, Cinthia, Bea y Euge por la compañía en esta etapa!

A mis amigos de siempre, Adri, Caro, Valle, Diego, Damián, Kiri, Sole, Ali y Vani por seguir ahí!

A mis compañeros del labo, Silvia, Mede, Vero, Xime, Anouk, Agus, Malala, Fernanda, Lili, Lu, Juli, Hernán y Luis por aguantarme en todos mis estados de ánimo! Los voy a extrañar!!!

A Pipi y Fer por ayudarme en las tareas más tediosas de los experimentos y por cuidar de mis langostitas como si fueran suyas!

A mis compañeras del labo y amigas, Caro y Lia, por ser tan indispensables para mí como para esta tesis! No hubiera podido terminar esta etapa sin su apoyo incondicional, muchas gracias!!!

Índice

Introducción general **1**

La acuicultura en el mundo 2

La acuicultura en Argentina 3

Modelo de estudio: *Cherax quadricarinatus* 5

Nutrición 11

Objetivo general..... 15

Capítulo I: Punto de saturación de reserva **17**

Introducción 18

Objetivo 21

Hipótesis 21

Materiales y métodos 22

Obtención de los juveniles 22

Diseño experimental 23

Análisis estadístico 29

Resultados 30

Discusión 39

Capítulo II: Punto de no retorno **45**

Introducción 46

Objetivo 50

Hipótesis 50

Materiales y métodos 51

Obtención de los juveniles 51

Diseño experimental 51
Análisis estadístico 56
Resultados 57
Discusión 65

Capítulo III: Análisis bioquímicos **71**

Introducción 72
Objetivo 75
Hipótesis 75
Materiales y métodos 76
Obtención de los juveniles 76
Diseño experimental 76
Análisis bioquímicos 78
Análisis histológicos 81
Análisis estadístico 82
Resultados 83
Discusión 91

Capítulo IV: Mejoramiento de refugios **97**

Introducción 98
Objetivo 101
Hipótesis 101
Materiales y métodos 102
Obtención de los juveniles 102
Diseño experimental 102
Análisis estadístico 105

Resultados 106

Discusión 109

Discusión general **113**

Conclusiones **119**

Bibliografía **121**

Introducción General

La acuicultura en el mundo

La producción acuícola mundial de especies comestibles ha crecido casi 12 veces en las últimas tres décadas (1980-2010) a una tasa media anual del 8,8⁄ . En 2010, ésta alcanzó otro nivel máximo sin precedentes de 60 millones de toneladas, ascendiendo a 79 millones de toneladas si se incluyen las plantas acuáticas y los productos no alimentarios (125.000 millones de USD). Si bien la producción de la pesca de captura se mantiene estable, la producción acuícola sigue creciendo debido al crecimiento de la acuicultura. Ésta, en cuanto a la alimentación de la población, ha pasado de ser casi insignificante a equipararse a la producción de la pesca en el transcurso de medio siglo aproximadamente. Según las proyecciones realizadas por la FAO, la acuicultura seguirá siendo uno de los sectores de producción de alimentos de origen animal de más rápido crecimiento y, en la próxima década, la producción total de la pesca y la acuicultura superará a la de carne de vacuno, porcino y aves de corral.

En 2010, en América del sur, particularmente en Brasil y Perú, la acuicultura de agua dulce ha mostrado un crecimiento fuerte y continuo donde los crustáceos representan el 21,7⁄ (FAO 2012).

Teniendo en cuenta el aumento constante de la población humana a nivel mundial la producción acuícola debe iniciarse, potenciarse o bien mejorarse con la finalidad de contribuir a la producción de alimentos de excelente calidad. Así fue como se iniciaron investigaciones que permitieron el desarrollo de tecnologías de cultivo de varios crustáceos (camarones de agua dulce, camarones Peneidos y cangrejos marinos, así como langostas de agua dulce), numerosas especies de peces, moluscos bivalvos y no-

bivalvos, especies de anfibios y reptiles acuáticos, junto a las algas marinas y peces ornamentales (Luchini y Panné Huidobro 2008).

La acuicultura en la Argentina

La producción de la acuicultura en Argentina desde 1992 hasta el 2007 mostró una tasa de crecimiento anual del 16,6⁄ (Luchini y Panné Huidobro 2008). En el año 1992, en Argentina, solo se cultivaba la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) mientras que actualmente se producen un total de 21 especies. La trucha continúa liderando la acuicultura argentina seguida por el pacú (*Piaractus mesopotamicus*); en 2011 se obtuvieron 1364 y 1227 toneladas de estas dos especies. Las otras producciones abarcan una pequeña proporción aún y están representadas por ostra, mejillón, distintas especies de carpas, ranas, yacarés, tilapia, randia, dorado, sábalo, surubí, boga, esturión, y langosta de pinzas rojas entre otros (MINAGRI 2013).

El Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación Argentina: Innovadora 2020, propone al desarrollo de productos sustitutos de la carne vacuna a través de la producción animal no tradicional como un tema estratégico de la política científica para el periodo 2013-2015 (MINCyT 2012). Asimismo, la Dirección Nacional de Acuicultura propone la investigación experimental en campo, el avance en el desarrollo de especies autóctonas potencialmente aptas para producción acuícola, la adaptación de las especies exóticas ya introducidas y el mejoramiento de las tecnologías actualmente utilizadas. Particularmente, propone mejorar las metodologías para reducir los costos productivos y las tecnologías de manejo especialmente en el área de nutrición y sanidad para mantener la sustentabilidad

económica en acuicultura en el país. Dado que las investigaciones realizadas en otros países en el campo de la acuicultura no siempre son transferibles, solamente la investigación y el desarrollo tecnológico propio producirán un avance en el sentido deseado y correcto (Luchini y Panné Huidobro 2008).

Desde el 2007 el Plan Nacional de Sanidad Animal en conjunto con el Servicio Nacional de Calidad Agroalimentaria y las provincias realizan un estudio de clasificación de zonas aptas para cultivo. Además se realizan investigaciones para el mejoramiento de la producción de especies como besugo (especie marina), pacú, pejerrey, randia, langosta de pinzas rojas, amur, tilapia, carpa común por distintas instituciones dependientes del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca: Estación de Maricultura del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Acuícola (Mar del Plata), Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC, Corrientes), Instituto de Pesca y Biología Marina Alte. Storni (Río Negro), Universidad Nacional del Comahue (Chubut) e Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, Buenos Aires). A estos se suman otros grupos de investigadores que contribuyen directa o indirectamente al desarrollo de la acuicultura: Universidad Nacional del Noroeste (UNNE, Corrientes), Universidad Nacional de Misiones (UNAM, Misiones) Centro Nacional Patagónico (CENPAT, Chubut), Centro Nacional de Ecología Aplicada de Neuquén (CEAN, Neuquén), Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC, Tierra del Fuego), Universidad de Buenos Aires (Facultades de Ciencias Exactas y Naturales, de Agronomía y de Veterinaria, C.A.B.A), Universidad Nacional de Córdoba (UNC, Córdoba) y otros (Luchini y Panné Huidobro 2008).

La pesca y la acuicultura han mostrado la capacidad para proporcionar beneficios tanto económicos como sociales en los países de la región que se manifiestan por el ingreso

en divisas, incremento en el empleo, reducción en las migraciones rurales, alivio a la pobreza, aumento en ingresos familiares a nivel rural y mejora de la seguridad en cuanto a alimentación y aporte de proteína de calidad (FAO 2012). Por lo tanto, la disminución de los costos de producción permitiría una merma en los precios finales aumentando el público consumidor con acceso a dichos productos (Luchini y Panné Huidobro 2008).

Modelo de estudio: *Cherax quadricarinatus*

Cherax quadricarinatus es una especie de langosta de agua dulce de gran tamaño que pertenece a la familia Parastasidae con distribución natural exclusiva del hemisferio sur (Holdich 2002). Esta especie es endémica de los ríos del noroeste de Queensland, norte de Australia y el sureste de Nueva Guinea. Sin embargo, dada su importancia comercial, ha sido introducida para el cultivo intensivo y semi-intensivo en numerosos países (Taiwán, Japón, China, Vietnam, Tailandia, Malasia, Singapur, Indonesia, Nueva Caledonia, Israel, Grecia Italia, España, Zambia, Estados Unidos, México, Guatemala, Islas del Caribe, Jamaica, Puerto Rico, Costa Rica, Ecuador, Uruguay y Argentina), y ha establecido poblaciones salvajes en el sur de África, México, Jamaica y Puerto Rico (revisado por Saoud *et al*. 2013).

Su hábitat natural consiste en cuerpos de agua permanentes que se caracterizan por condiciones de estancamiento o flujo lento al menos en algunos periodos del año (Jones y Ruscoe 2001). En éstos, las langostas soportan altas temperaturas, baja concentración de oxígeno y alta variabilidad de pH (Masser y Rouse 1997). Esta especie

muestra la habilidad de sobrevivir y reproducirse en zonas tropicales y templadas con condiciones bióticas y abióticas significativamente variables (Jones 1995b; Karplus *et al.* 1998).

C. quadricarinatus, comúnmente llamada langosta de pinzar rojas, es un decápodo gonocórico que presenta dimorfismo sexual (Lawrence y Jones 2002). Los machos son más grandes que las hembras y poseen en el lado externo de las quelas un "parche" rojo responsable de su nombre común (Saoud *et al*. 2013). Durante la cópula el macho coloca un paquete espermático (espematóforo) en la parte ventral del cefalotórax de la hembra (López Greco y Lo Nostro 2008). La fecundación es externa y al oviponer, los huevos se adhieren a los pleópodos y son trasportados y ventilados por la hembra durante todo el desarrollo embrionario (Levi *et al*. 1999). Luego de la eclosión, los juveniles I y II (lecitotróficos) permanecen sujetos de los pleópodos de la hembra hasta que la reserva de vitelo se agota siendo el juvenil III el primer estadio de vida libre (Levi *et al*. 1999).

Además, es una especie robusta que presenta características biológicas, fisiológicas y comportamentales que la hacen interesante desde el punto de vista comercial (Lawrence y Jones 2002), entre otras:

- **Ciclo de vida simple con desarrollo directo.** Se reproduce fácilmente en cautiverio y su dimorfismo sexual facilita su manejo. Las hembras consiguen oviponer de 3 a 5 veces al año en zonas tropicales con una fecundidad de entre 100 a 1000 huevos por puesta dependiendo el tamaño de la hembra (Saoud *et al*. 2013). Además, la falta de estadios larvales planctónicos evita costosas inversiones en instalaciones (Jones 1995a; Masser y Rouse 1997; Saoud *et al*. 2013).

- **Es una especie tolerante a un amplio rango de condiciones de calidad de agua**. Puede desarrollarse en un rango de temperatura entre 24 y 30°C, bajas concentraciones de oxígeno (> 1ppm), rangos de dureza y alcalinidad en un rango de entre 20 y 300 ppm y alta variabilidad de pH (6,5-9) (Masser y Rouse 1997).
- **Crecimiento rápido.** Pueden alcanzar la talla comercial, de entre 70 y 120g en 6 o 9 meses siempre que el agua cumpla con las condiciones antes mencionadas (Lawrence y Jones 2002; Ghanawi y Saoud 2012).
- **Características comportamentales** que facilita las tecnologías de cultivo. No tiene comportamiento cavador, es gregaria y no agresiva tolerando relativamente altas densidades de cultivo en comparación con otras especies de crustáceos (Masser y Rouse 1997; Jones y Ruscoe 2000).

En Argentina la producción de *C. quadricarinatus* es del tipo semi-intensivo y abarca 4 fases: reproducción, *hatchery*, *nursery* o pre engorde y engorde (**Figura 1**). En la segunda y la tercera etapa los organismos son sembrados en alta densidad mientras que en la última se siembra con una densidad relativamente baja (Wicki *et al*. 2008).

Jones (1995a,b) realizó las primeras descripciones de las fases del cultivo para *C. quadricarinatus* basándose en experiencias realizadas en el clima tropical de Australia. Luego de que en la década del ´90 se introdujera la especie en Argentina con interesantes perspectivas (Luchhini 2004) se realizaron, en las instalaciones del Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), nuevas experiencias para adaptar las tecnologías al clima subtropical del norte del país (Wicki *et al*. 2008). Sin embargo, según Luchini y Panné Huidobro (2008) es necesario mejorar los índices reproductivos

y los de sobrevivencia en la fase juvenil, disminuyendo las pérdidas ocasionadas por el canibalismo para obtener lotes más numerosos y homogéneos.

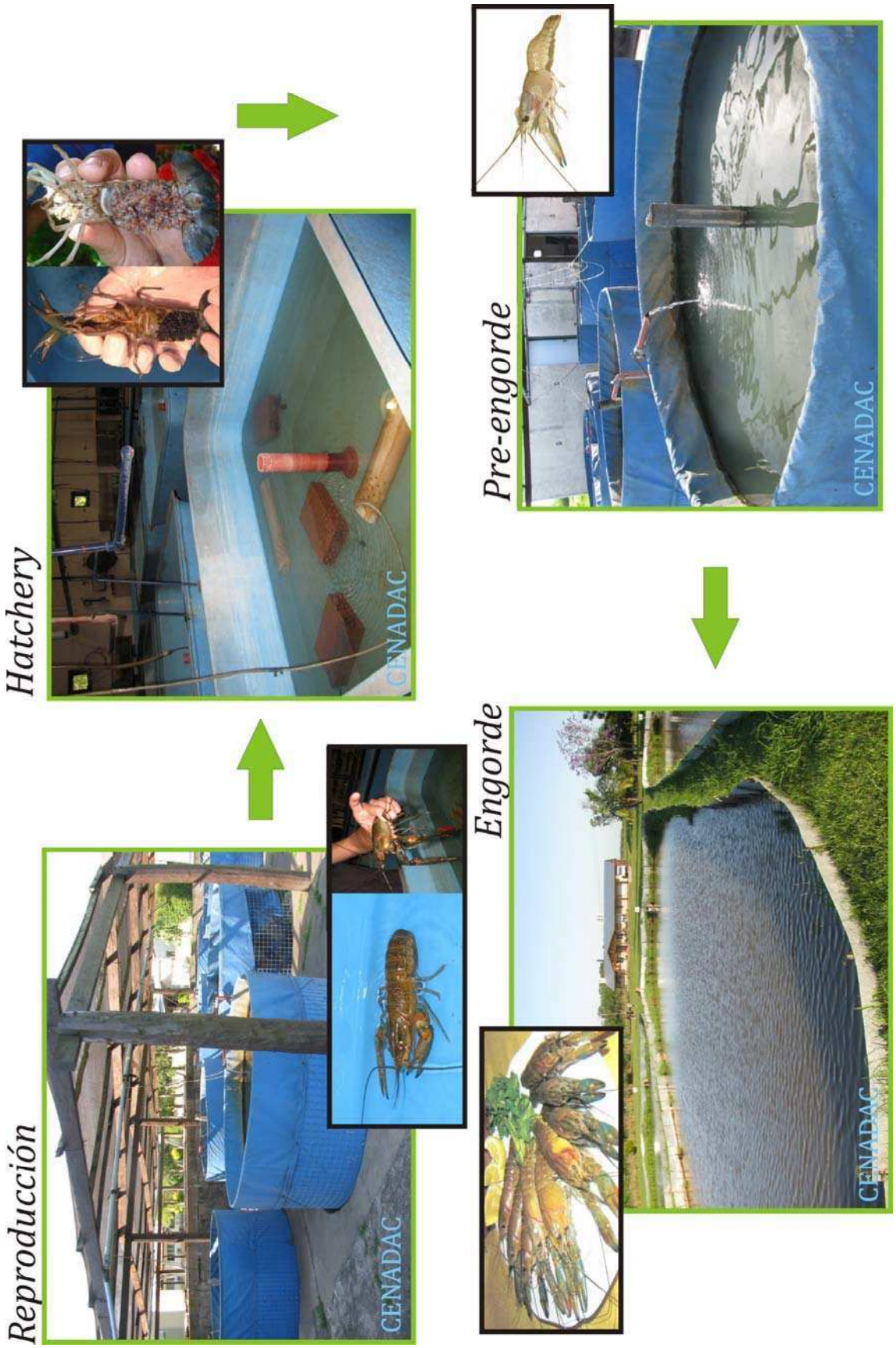
A continuación se describen las fases del cultivo según lo recomendado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MINAGRIP 2011):

- **Fase reproducción.** Se realiza bajo techo en tanques de fibra de vidrio o cemento de aproximadamente 2,5x2,5m. El nivel de agua se mantiene entre 30 a 45cm con recambio continuo y aireación constante. La densidad de siembra es de 3 a 6,5individuos/m^2 con una relación de 3 hembras por cada macho. Son alimentados diariamente con alimento balanceado con alto contenido proteico. Como refugios para los animales se utilizan generalmente tubos de PVC de 5cm de diámetro y 15cm de largo.
- **Fase de *Hatchery*.** Se realiza bajo techo en tanques de fibra de vidrio similares a los utilizados para la fase de reproducción. Las hembras ovígeras extraídas de los tanques de reproducción son mantenidas a una densidad 3 a 5individuos/m^2. Generalmente se agrupa a las hembras ovígeras en los tanques de acuerdo con la similitud en el desarrollo de los huevos, lo que puede observarse a simple vista por la coloración que adquieren durante el desarrollo embrionario. Una vez independizados los juveniles, se transfiere a las hembras nuevamente a los tanques de reproducción. Los juveniles son mantenidos a una densidad de aproximadamente 550juveniles/m^2 hasta que alcanzan 1g de peso. Se realiza recambio continuo de agua con aireación constante. Son alimentados diariamente con alimento balanceado con alto contenido proteico. Como refugios se utilizan tubos de PVC de 5cm de diámetro y 15cm de largo para las hembras y redes del tipo cebollera para los juveniles. Durante esta fase

los juveniles cambian su alimentación de endógena (vitelo) a exógena (alimento balanceado) siendo éste un punto crítico para la sobrevida en el cultivo.

- **Fase de *Nursery* o pre-engorde.** Se realiza bajo media sombra en tanques externos de cemento con una superficie de 20m^2, nivel de agua de aproximadamente 30cm y aireación constante. Son alimentados diariamente con alimento balanceado con alto contenido proteico. Durante esta fase los individuos adquieren la coloración propia de la especie y permanecen entre 20 y 30 días, hasta alcanzar entre 5 y 10 gramos de peso. La densidad de siembra es de aproximadamente 50 juveniles/m^2. Como refugios para los animales se utilizan tubos de PVC y redes del tipo cebollera. Las camadas crecen en forma asincrónica y el canibalismo entre juveniles es muy frecuente, por lo tanto la sobrevida en esta fase es crítica.
- **Fase de engorde.** Se realiza en estanques excavados en tierra, a cielo abierto con dimensiones de 50x80m y 1m de profundidad y con el agregado de alimento balanceado. Se siembran a densidades de 1 individuo/m^2 con ladrillos huecos de seis celdas o tubos de PVC como refugios, previendo que al menos exista una cavidad disponible para cada uno de los individuos sembrados al inicio.

Figura 1 Fases de cultivo de *Cherax quadricarinatus* en el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), Corrientes, Argentina.



Nutrición

C. quadricarinatus es una especie que naturalmente muestra un hábito de alimentación politrófico y ha sido descrita como depredadora, omnívora, y/o detritívora. Consume variedad de macrofitas, invertebrados bentónicos, algas y detritos (Jones 1990; Nyström 2002; Saoud *et al*. 2013). Su hábito de alimentación no selectivo permite la incorporación de una amplia gama de ingredientes a base de plantas y animales en formulaciones de los alimentos balanceados de dietas para la acuicultura (Jones 1990; Campaña-Torres *et al*. 2005, 2006, 2008). Esto podría estar relacionado con la gran variedad de enzimas digestivas (proteasas, lipasas y amilasas) encontradas en la glándula digestiva (Figueiredo *et al*. 2001), comúnmente llamada hepatopáncreas (Van Weel 1974).

Se han realizado numerosas Investigaciones sobre requerimientos nutricionales de *C. quadricarinatus* desarrolladas en juveniles de peso mayor a 1 gramo, preadultos y adultos (Villarreal 2002; Cortés-Jacinto *et al.* 2004a,b), sin embargo, no se registran investigaciones sobre la nutrición de juveniles más tempranos que involucra a los juveniles en estadio III (primer estadio libre) de 20 mg hasta los juveniles de 1 gramo. Estas tallas corresponden a la fase de *hatchery* (descripta previamente) en la que los juveniles cambian su alimentación de endógena (vitelo) a exógena (Levi *et al*. 1999) y donde la mortalidad puede alcanzar desde un 50⁄ hasta un 85⁄ (Jones 1995a; Masser y Rouse 1997). De esta manera estudiando la vulnerabilidad nutricional de estos juveniles podría disminuirse la mortalidad en la fase de *hatchery*.

La vulnerabilidad nutricional (Sulkin 1978) o flexibilidad nutricional (Sulkin y Van Heukelem 1980) durante el desarrollo temprano de los crustáceos decápodos ha sido

estudiada en cangrejos (Anger 1995a, 2003; Harris y Sulkin 2005; Figueiredo *et al*. 2008; Gebauer *et al*. 2010), camarones carideos (Thessalou-Legaki *et al*. 1999; Paschke *et al*. 2004; Zhang *et al*. 2009; Kumulu *et al*. 2010) y en langostas marinas (Mikami *et al*. 1993; Liddy *et al*. 2003) siendo cuantificada usualmente través de la estimación del punto-de-saturación-de-reserva (PSR) y del punto-de-no-retorno (PNR).

Los individuos llegan al PSR luego de un periodo de alimentación y se vuelven independientes del alimento en el resto del ciclo de muda. Por el contrario, periodos de alimentación más cortos que el PSR interrumpen el desarrollo impidiendo que muden al estadio siguiente. Por lo tanto se define PSR como el punto dentro del ciclo de muda en el cual los individuos alimentados han asimilado suficiente materia orgánica o energía (han saturado sus reservas) para desarrollarse exitosamente a través de la pre-muda y ecdisis independientemente de la presencia o ausencia de alimento (Anger 2001).

Del mismo modo, cuando el alimento falta transitoriamente desde el comienzo del ciclo de la muda se registra un retraso significativo del desarrollo y cuando el periodo de inanición inicial excede cierto límite, los individuos pierden su capacidad de recuperarse del periodo de estrés nutricional. Este punto crítico se denomina PNR. Se ha observado que pasado este punto los individuos, si son alimentados, pueden sobrevivir un largo tiempo variable aunque su desarrollo no es normal y mueren sin conseguir mudar al estadio siguiente (Anger 2001).

En los crustáceos, el hepatopáncreas es el sitio donde ocurre la digestión, absorción y reserva de nutrientes, y síntesis y secreción de enzimas digestivas (Icely y Nott 1992; Johnston *et al*. 1998; Sousa y Petriella 2000; García-Guerrero *et al*. 2003). Este órgano es utilizado en la acuicultura para monitorear la salud de los animales en cultivo (Vogt

et al. 1985) y se han observado alteraciones en los componentes elementales del hepatopáncreas por efecto de la inanición (Anger y Hayd 2009), de la dieta (Jones y Obst 2000) y por cambios en la salinidad (Li *et al*. 2008; Díaz *et al*. 2010; Longo 2012; Masson *et al*. 2012).

El hepatopáncreas es compacto, bilobulado y ocupa la mayor parte del cefalotórax. Histológicamente, presenta una estructura tubular (Cuartas *et al*. 2002; Sousa y Petriella 2006), formado por un epitelio con distintos tipo celulares. Las **células E** o embrionarias son escasas y se ubican en el extremo distal de los túbulos (**Figura 2a,b**). Presentan las características histológicas típicas de células indiferenciadas, y son el único tipo celular que sufre mitosis. Las células R, F y B presentan un ribete en cepillo conspicuo. **Las células R** o de resorción, son las células más comunes en el epitelio del hepatopáncreas y se encuentran en la zona media y proximal de los túbulos; son cilíndricas, presentan vacuolas sub-apicales características y su núcleo se ubica hacia la región basal de la célula. Su función es la reserva de lípidos y glucógeno que puede ser movilizada para proveer energía durante periodos de restricción de alimento, muda o reproducción. Las **células B** o "blisterlike" se encuentran en la zona media y proximal de los túbulos y presentan una gran vacuola central que desplaza al núcleo hacia su base. Estas células son responsables de la digestión intracelular, concentrando los materiales absorbidos del lumen en la gran vacuola. **Las células F** o fibrilares son menos frecuentes y se encuentran dispersas entre las células B y las R células a lo largo de las zonas media y proximal de los túbulos. Estas células son cilíndricas y se caracterizan por presentar un citoplasma basófilo y un gran núcleo basal con nucléolo evidente. Su función comprende la síntesis de enzimas digestivas (Gibson y Barker

1979; Al-Mohanna y Nott 1987; Caceci *et al*. 1988; Icely y Nott 1992; Franceschini-Vicentini *et al*. 2009) (**Figura 2c**).

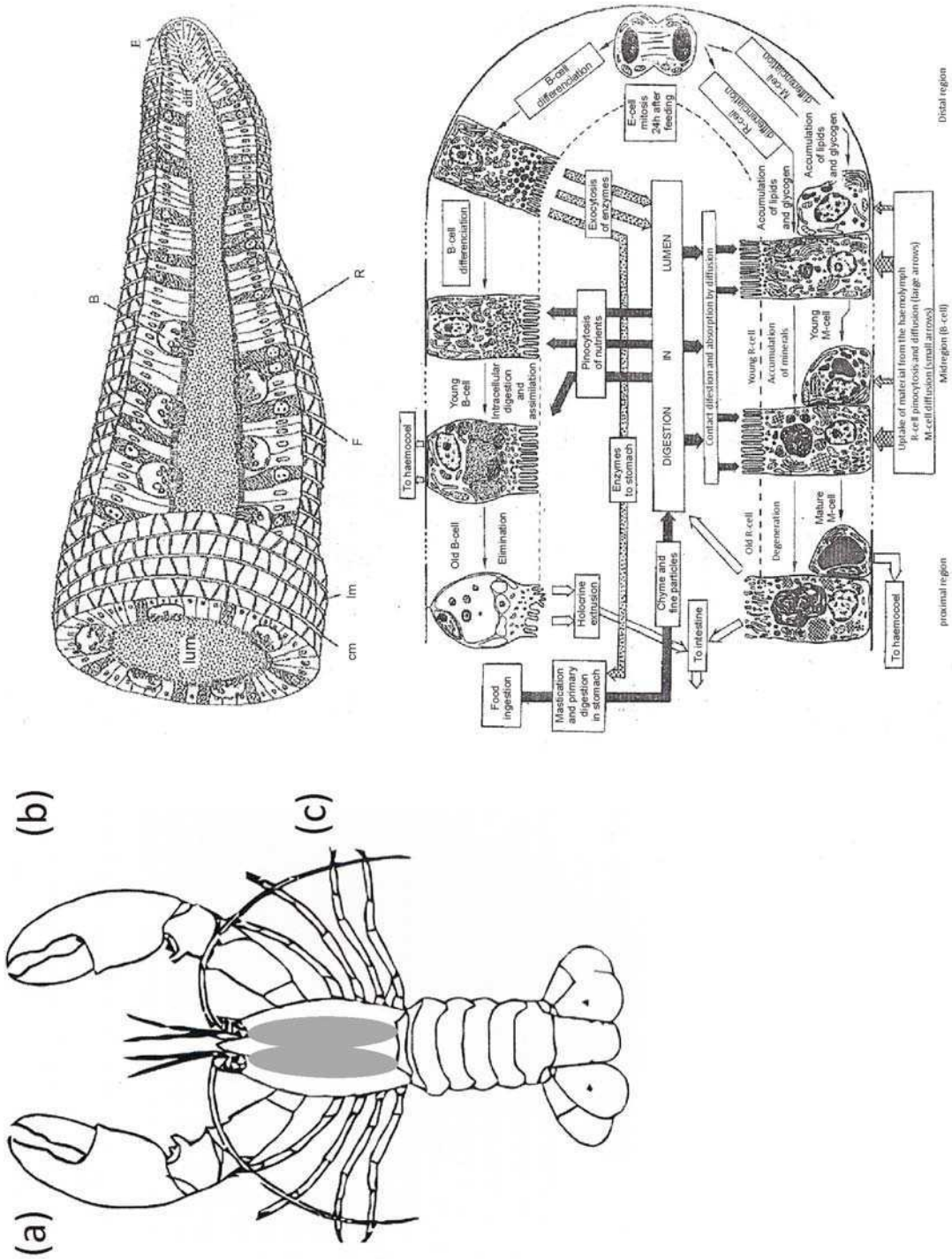


Figura 2 Esquemas de hepatopáncreas de *Cherax quadricarinatus* (a) Hepatopáncreas ocupando la mayor parte del cefalotórax, (b) estructura de un túbulo digestivo del hepatopáncreas (c) Detalle y función de los tipos celulares principales: Célula E (embrionaria), Célula B (blisterlike), Célula F (fibrilar) y Célula R (resortiva). Los esquemas (b), (c) fueron reproducidos de la figura 8.7 de Watling (2013).

En base a los antecedentes brevemente descriptos se plantea el siguiente objetivo general.

Objetivo general

Estudio de la vulnerabilidad nutricional y la utilización de refugios para maximizar el crecimiento y la sobrevida de juveniles tempranos de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*

Organización de la tesis

En función de lo descripto, la presente tesis abordará dos temas principales para contribuir con información relevante al cultivo de esta especie. El primero se refiere al estudio de la vulnerabilidad nutricional de los juveniles en la fase de *hatchery* (capítulos I a III). El segundo, se refiere a la optimización del uso del refugio ("red cebollera") durante la fase de pre-engorde para disminuir del canibalismo (capítulo IV)

Capítulo I

Estimación del Punto de Saturación de Reserva en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*

Los objetivos particulares del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Calvo NS, Stumpf L, Pietrokovsky S, López Greco LS. 2011. Early and late effects of feed restriction on survival, growth and hepatopancreas structure in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquaculture 319, 355–362.

Introducción

La “vulnerabilidad nutricional” (Sulkin 1978) o “flexibilidad nutricional” (Sulkin y Van Heukelem 1980) durante el desarrollo temprano de los crustáceos decápodos ha sido estudiada en cangrejos (Anger 1995a, 2003; Harris y Sulkin 2005; Figueiredo *et al*. 2008; Gebauer *et al*. 2010), camarones carideos (Thessalou-Legaki *et al*. 1999; Paschke *et al*. 2004; Zhang *et al*. 2009; Kumulu *et al*. 2010) y en langostas marinas (Mikami *et al*. 1993; Liddy *et al*. 2003) siendo usualmente cuantificada través de la estimación del punto-de-saturación-de-reserva (PSR) y del punto-de-no-retorno (PNR).

Anger y Dawirs (1981) definieron el punto-de-saturación-de-reserva 50 (PSR_{50}) como el tiempo de alimentación (en días) en el cual el 50⁄ de los individuos de un determinado estadio del desarrollo acumula las reservas necesarias para mudar al estadio siguiente. Los autores expusieron, basándose en los estudios de los dos estadios larvales del cangrejo *Hyas araneus* (zoea I y zoea II), que este punto ocurre alrededor del primer tercio de la duración del estadio. En el mismo estudio, se observó que la zoea I posee suficientes reservas para sobrevivir 2 semanas sin alimento, sin embargo aunque puede retrasar la ecdisis no consigue mudar al estadio siguiente sin alimentación. Otro trabajo realizado con larvas de *Sesarma curacaoense* mostró que la zoea I es totalmente independiente de fuentes de alimento externo; la zoea II consigue retrasar su desarrollo un largo periodo en ausencia de alimento y el estadio de megalopa puede mudar sin consumir alimento siempre que los estadios anteriores (zoea I y II) se hayan alimentado continuamente (Anger 1995a). Este mecanismo llamado lecitrotrofia

facultativa, permite acelerar la fase larvaria (planctónica y más vulnerable) en condiciones ambientales inestables. Gebauer *et al*. (2010) al comparar la variabilidad nutricional de distintas especies estudiadas concluyó que la dependencia nutricional de las larvas refleja no solo la calidad inicial de los individuos sino también las condiciones ambientales en las cuales éstos se desarrollan.

Trabajos posteriores demostraron que la flexibilidad nutricional en larvas está modulada por la filogenia (Mikami *et al*. 1993), el estadio de desarrollo (Giménez y Anger 2005), la temperatura (Anger *et al*. 2004), la salinidad (Giménez 2002), el momento de eclosión dentro del período reproductivo (Paschke *et al*. 2004) y el hábitat de los estadios adultos (Sulkin y McKeen 1999; Bas *et al*. 2008; Calado *et al*. 2010). Sin embargo, son escasos los estudios de la vulnerabilidad nutricional realizados en juveniles de decápodos.

Anger *et al*. (2004) estudiaron los efectos de la inanición a distintas temperaturas en larvas y juveniles del anomuro subantártico *Lithodes santolla.* Esta especie de interés comercial demostró una gran tolerancia al estrés por temperaturas bajas y a la limitación de alimento, condiciones que ocurren naturalmente en invierno. Zhang *et al*. (2009) estimaron la vulnerabilidad nutricional a través del PSR y PNR en los juveniles del camarón *Fenneropenaeus chinensis* de interés para la acuicultura y propusieron que esta información es útil para el diseño de regímenes de alimentación. Por otro lado, un estudio que comparó características de cangrejos grápsidos marinos, de agua dulce y terrestres encontró tendencias consideradas adaptativas para estos dos últimos ambientes. Entre estas tendencias se encuentran la baja fecundidad, el cuidado parental, el aumento del tamaño de huevo, la menor duración de la etapa

larval, la mayor tolerancia de las larvas al stress físico-químico y la mayor independencia nutricional (Anger 1995b).

Teniendo en cuenta las tendencias observadas en grápsidos es esperable que los juveniles de *Cherax quadricarinatus* sean más resistentes a la restricción de alimento (valores de PSR menor) que los juveniles de especies marinas estudiados y que esta información pueda ser utilizada para aumentar el rendimiento del cultivo.

Sin embargo la restricción del alimento podría tener un impacto directo en el crecimiento, en la composición de los juveniles o del abdomen (principal recurso aprovechable del animal).

Recientemente, estudios realizados en el laboratorio con *C. quadricarinatus* presentaron las primeras estimaciones de PSR_{50} en juveniles del estadio post-independencia materna de una especie de agua dulce y de desarrollo directo (Calvo *et al*. 2009a, b; Stumpf *et al*. 2010). El valor obtenido fue similar al 30% de la duración del estadio, pero se desconocen los efectos a largo plazo de esta restricción.

Se han observado alteraciones en los componentes elementales (Carbono, Hidrógenos y Nitrógeno) del hepatopáncreas por efecto de la inanición (Anger y Hayd 2009), de la dieta (Jones y Obst 2000) y la salinidad (Li *et al*. 2008; Díaz *et al*. 2010; Longo 2012; Masson *et al*. 2012). Sin embargo, hasta el momento no se han examinado histológicamente los efectos de la restricción del alimento en el hepatopáncreas de *C. quadricarinatus*.

Objetivo

Estimar el punto de saturación de reserva 50 (PSR_{50}) de juveniles de estadio III y de un gramo de *Cherax quadricarinatus* y evaluar los efectos de los protocolos de restricción de alimento cercanos al PSR_{50} sobre el crecimiento, la sobrevida y la estructura del hepatopáncreas.

Hipótesis 1: El valor estimado del PSR_{50} de los juveniles III y de 1gramo de la langosta de agua dulce *C. qudricarinatus* es similar o menor a un tercio de la duración del estadio.

Hipótesis 2: Los juveniles III y de 1gramo de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* sometidos a un protocolo de restricción de alimento igual al PSR_{50} presentan menor crecimiento que los juveniles alimentados diariamente y/o efectos en la estructura del hepatopáncreas.

Materiales y métodos

Para el desarrollo de los objetivos propuestos de este capítulo se realizaron 2 ensayos: el primero con juveniles III (denominados JIII) y el segundo con juveniles de 1gramo (denominados J1g). En ambos ensayos se expuso a los individuos a un periodo de restricción de alimento seguido de un período de realimentación y se evaluaron los efectos a corto y largo plazo basándose en los diseños experimentales de Anger y Dawirs (1981) y Paschke *et al*. (2004).

Obtención de los juveniles

Los juveniles utilizados para llevar a cabo este objetivo fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio, a partir de un lote de animales reproductores suministrado por el criadero Las Golondrinas, Entre Ríos, Argentina.

Los grupos reproductores, formados por 4 o 5 hembras y un macho cada uno, fueron mantenidos en acuarios de 60x40x30cm conteniendo 30L de agua corriente a pH 7,5-7,8, con temperatura (27±1ºC) y aireación constante. Los mismos fueron aclimatados al fotoperíodo (14:10hs luz:oscuridad) y alimentación utilizadas previamente para esta especie en el laboratorio (Vazquez *et al*. 2008, Sánchez De Bock y López Greco 2010). La alimentación consistió en *Elodea sp*. y alimento balanceado (Tetracolor, TETRA®) cuya composición aproximada es: 47,5⁄ de proteína bruta, 6,5⁄ de lípidos, 2,0⁄ de fibra, 6,0⁄ humedad, 1,5⁄ de fósforo y 100 µg/kg de vitamina C.

Los lotes de reproductores fueron revisados semanalmente para la detección de las hembras ovígeras. Una vez ovígeras, hembras de peso similar (54,2-67,1g) fueron colocadas en acuarios individuales de 33,5x25x19cm con condiciones iguales a las descriptas y controladas diariamente hasta la eclosión y posterior independencia de los juveniles. Se contaron los juveniles independizados de cada hembra y se seleccionaron aquellas cuyo número de crías obtenidas fue mayor a 150 juveniles.

Los JIII utilizados en el Experimento 1 fueron incorporados a los protocolos de alimentación descriptos más abajo el día que se independizaron de la hembra.

Los J1g utilizados en el Experimento 2 fueron obtenidos de los mismos grupos reproductores que los JIII; se mantuvieron en acuarios (60×40×30cm) hasta alcanzar el peso de 0,5g y luego dispuestos individualmente. Fueron pesados luego de cada muda y asignados a un tratamiento al azar al alcanzar un peso en el rango de 0,80g a 1,20g.

Diseño experimental

Experimento 1

Con el fin de estimar el PSR_{50} de JIII y evaluar los efectos de los protocolos de restricción se ensayaron tratamientos que fueron elegidos tomando como base varios ensayos realizados previamente donde se ajustaron las condiciones experimentales (Calvo *et al*. 2009 a, b; Stumpf *et al*. 2010).

El experimento consistió en exponer a los juveniles a diferentes tratamientos de alimentación, seguidos de días inanición hasta la finalización del estadio III ("periodo de restricción"). Luego de mudar al estadio IV, los juveniles fueron alimentados

diariamente hasta el día 60 ("período de realimentación") correspondiente a la finalización del experimento (**Figura 1.1a**).

Para este experimento, 210 juveniles provenientes de 5 madres diferentes fueron secados con papel absorbente y pesados (P_i) con una balanza de 0,1mg de precisión. Luego, cada juvenil fue asignado aleatoriamente a uno de 7 tratamientos. Uno con alimentación diaria (AC) y 6 con diferente número de días de alimentación (de 2 a 7 días denominados A2 hasta A7) seguido de días de inanición hasta la muda a JIV o su muerte (**Figura 1.1b**).

Cada tratamiento contó con 30 réplicas (6 juveniles de cada una de las 5 madres utilizadas). En los días de alimentación, teniendo en cuenta el protocolo, se ofreció a los juveniles alimento balanceado Tetracolor TETRA® (especificado previamente) *ad libitum*.

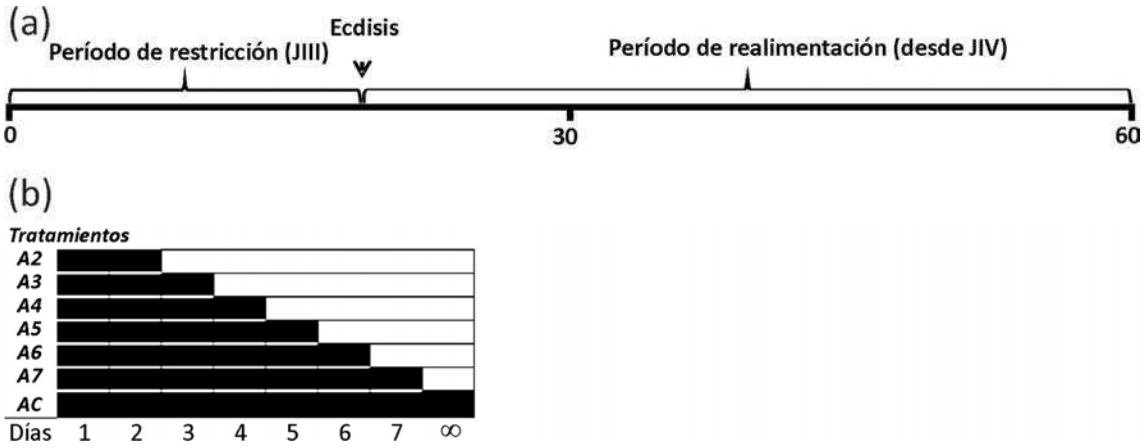


Figura 1.1 (a) Diseño del Experimento 1. (b) Protocolo de alimentación de los tratamientos aplicados a los juveniles del estadio III de *Cherax quadricarinatus* durante el periodo de restricción. ■ Simboliza días de alimentación y □ días sin alimentación.

Durante el experimento los juveniles fueron colocados en recipientes plásticos individuales de 500cm^3 conteniendo 350ml de agua declorada y una red plástica del tipo cebollera de 3X3cm. Estas condiciones fueron ajustadas en ensayos preliminares (Calvo *et al*. 2009a, b). Todos los individuos fueron mantenidos bajo condiciones de aireación y temperatura constante (27±1°C) como se indica en la **Figura 1.2**. Se recambió el agua de los envases tres veces por semana y los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados semanalmente manteniéndose dentro de los rangos óptimos recomendados para esta especie: oxígeno disuelto 5,6-7,74mg/l; pH 7,61-7,92; dureza 65-95 mg/l $CaCO_3$; nitritos <0,5mg/l de acuerdo a Jones (1997).

Figura 1.2 Dispositivo utilizado en ambos experimentos con aireación continua y temperatura constante (27±1ºC).

Se realizaron dos observaciones diarias (mañana y tarde) contabilizando el número de mudas y muertes. Se registró el número de juveniles que consiguió mudar al estadio IV en cada tratamiento, tiempo a la muda (duración del estadio III) y el peso de los juveniles luego de la ecdisis, a los 30 y 60 días.

Para estimar el PSR_{50} de los JIII se graficó el porcentaje de juveniles que consiguieron mudar al estadio IV en función de la cantidad de días que fueron alimentados durante el período de restricción (tratamientos). Se ajustaron los datos obtenidos a una curva sigmoidea utilizando la ecuación: $f=a/\{1+\exp.-[(x-x_0)/b]\}$ de acuerdo a Paschke *et al*. (2004). También se contabilizaron las muertes ocurridas durante el periodo de restricción (juveniles que murieron sin conseguir mudar al estadio IV) y la mortalidad acumulada al finalizar el ensayo (día 60). Además, se calculó el incremento porcentual del peso luego de la ecdisis y a los 60 días. El mismo se calculó para cada juvenil mediante la siguiente ecuación: $IP= 100\times((P_f- P_i)/ P_i)$. Siendo P_i y P_f los pesos inicial y final alcanzados por los juveniles.

Para evaluar el efecto de la restricción de alimento sobre la estructura del hepatopáncreas a corto y largo plazo fueron sacrificados 5 juveniles por tratamiento al día 30 y todos los sobrevivientes al finalizar el experimento (día 60). A cada juvenil sacrificado se le midió el largo total del cefalotórax (LT) desde el extremo anterior del rostro hasta el extremo posterior del cefalotórax. Se removieron y pesaron el abdomen y el hepatopáncreas de cada animal. Los hepatopáncreas fueron fijados con líquido de Bouin por 4 horas y luego conservados en solución de Etanol al 70⁄ . Posteriormente los hepatopáncreas fueron incluidos en Paraplast y se obtuvieron secciones de 7 µm que fueron coloreadas con Hematoxilina-Eosina (López Greco *et al.* 2007). Además, se calculó el índice hepatosomático (IHS = 100*peso húmedo del hepatopáncreas/peso húmedo total del cuerpo) y el índice abdominal (IA = 100*peso húmedo del abdomen/peso húmedo total del cuerpo).

Experimento 2

Con el fin de estimar el PSR_{50} de J1g y evaluar los efectos de los protocolos de restricción se ensayaron tratamientos que fueron elegidos tomando como base ensayos realizados previamente donde se ajustaron las condiciones experimentales (Calvo *et al*. 2009b).

El experimento consistió en exponer a los juveniles a diferentes tratamientos de alimentación, seguidos de inanición hasta la muda al estadio siguiente ("periodo de restricción"). Luego de mudar, los juveniles, fueron alimentados diariamente hasta el día 90 ("período de realimentación") correspondiente a la finalización del experimento (**Figura 1.3a**).

Para este experimento, 180 juveniles provenientes de 4 madres diferentes fueron secados con papel absorbente, y pesados (P_i) con una balanza de 0,1mg de precisión. Luego, cada juvenil fue asignado aleatoriamente a uno de 9 tratamientos. Uno con alimentación diaria (AC), y 8 con diferente número de días de alimentación (de 6 a 13 días denominados A6 hasta A13) seguido de días de inanición hasta la muda o muerte del juvenil (**Figura 1.3b**).

Cada tratamiento contó con 20 réplicas (5 juveniles de cada una de las 4 madres utilizadas). En los días de alimentación, teniendo en cuenta el protocolo, se ofreció a los juveniles alimento balanceado Tetracolor TETRA® (especificado previamente) *ad libitum*.

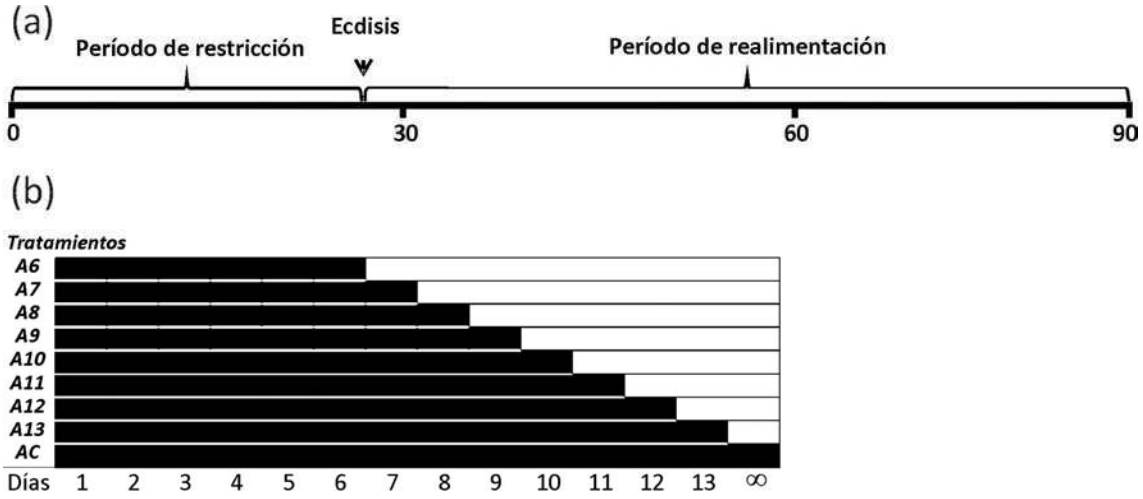


Figura 1.3 (a) Diseño del Experimento 2. (b) Protocolo de alimentación de los tratamientos aplicados a los juveniles de un gramo de *Cherax quadricarinatus* durante periodo de restricción. ■ Simboliza días de alimentación y □ días sin alimentación.

Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas para el experimento anterior (**Figura 1.2**). Se recambió el agua de los envases tres veces por semana y los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados semanalmente manteniéndose dentro de los rangos óptimos para esta especie (ver experimento anterior).

Se realizaron observaciones diarias contabilizando mudas y muertes. Se registró el número de juveniles que consiguió mudar al estadio siguiente en cada tratamiento, el tiempo a la muda y el peso de los juveniles luego de la ecdisis, a los 30, 60 y 90 días.

Para estimar el PSR_{50} de los J1g, al igual que en el experimento 1, se graficó el porcentaje de juveniles que consiguieron mudar al estadio siguiente en función de la cantidad de días que fueron alimentados durante el período de restricción (tratamientos). Se ajustaron los datos obtenidos a una curva sigmoidea utilizando la ecuación: $f=a/\{1+\exp.-[(x-x_0)/b]\}$ de acuerdo a Paschke *et al*. (2004).

Se contabilizaron las muertes ocurridas durante el periodo de restricción (juveniles que murieron sin conseguir mudar al estadio siguiente) y la mortalidad acumulada al

finalizar el ensayo. Además, se calculó el incremento porcentual del peso (IP) luego de la ecdisis y a los 90 días.

Todos los juveniles que sobrevivieron a los 90 días fueron medidos (LT) y sacrificados. Se removieron y pesaron el hepatopáncreas y el abdomen de cada animal. Los hepatopáncreas fueron fijados y procesados histológicamente como se describió anteriormente. Además se calculó el índice hepatosomático (IHS) y el índice abdominal (IA).

Análisis estadístico

Todas las variables fueron expresadas como media ± DE. Se realizó un análisis de varianza de 1 factor (ANOVA) para comparar el tiempo a la muda, el IP, el LT, el IHS y el IA, entre tratamientos. Posteriormente se realizaron contrastes utilizando el Test de Tukey. En aquellos casos en los que no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianzas (Test de Levenne) o normalidad, se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis y contrastes utilizando un Test homólogo a Tukey no paramétrico (Zar 2010). Se utilizó el análisis de varianza para medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas) para evaluar el peso en el tiempo (en ambos experimentos). La mortalidad de todos los tratamientos fue comparada contra AC utilizando un procedimiento no paramétrico análogo al Test de Dunnet para comparar proporciones (Zar 2010).

Resultados

3.1 Experimento 1

Los porcentaje de mudas obtenidos se ajustaron a una curva sigmoidea en función de la cantidad de días de alimentación durante el periodo de restricción. El valor de PSR_{50} obtenido de la curva sigmoidea fue de 2,1±0,1 días (**Figura 1.4 a)**.

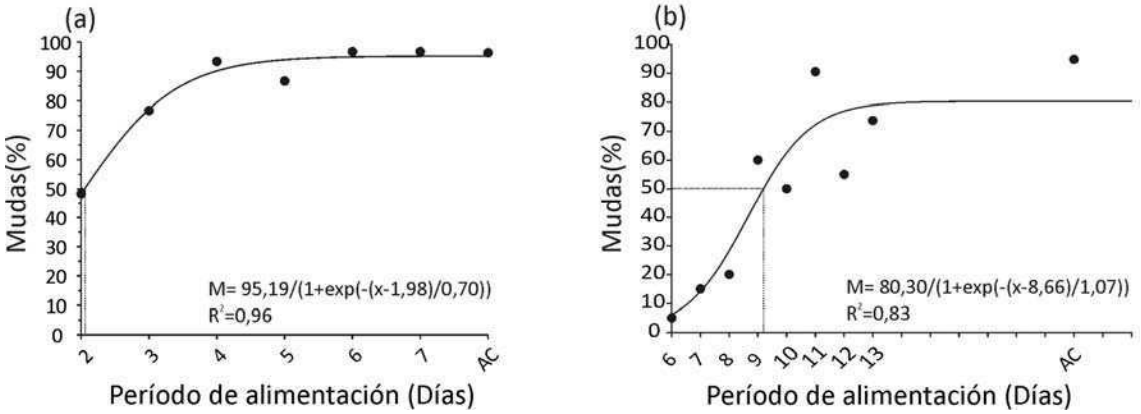


Figura 1.4 Porcentaje de mudas de (a) Juveniles III y (b) Juveniles de 1g de *Cherax quadricarinatus* en función de los días de alimentación durante el periodo de restricción en ambos experimentos. Los datos fueron ajustados a una curva sigmoidea ($M=a/\{1+exp.-[(x-x_0)/b]\}$).

El tiempo a la muda (de juvenil III a IV) registrado para los juveniles con alimentación diaria (AC) fue de 6,9±0,6 días (**Figura 1.5 a)** y no fue diferente entre tratamientos (Test Kruskal-Wallis; p=0,308).

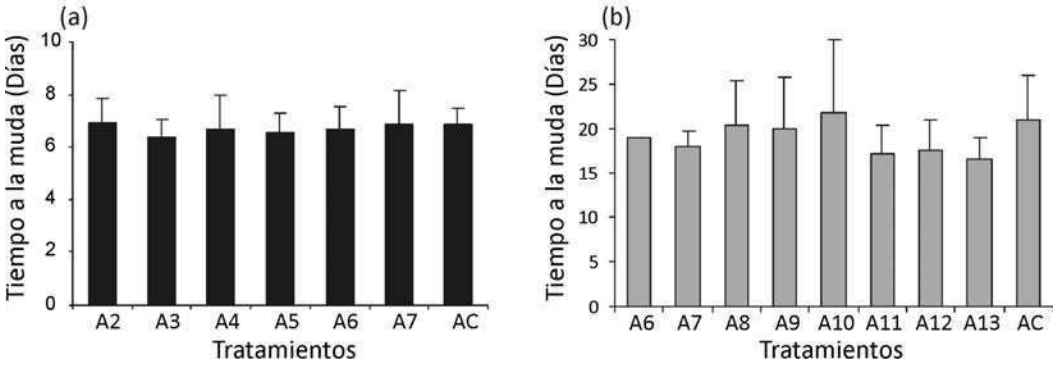


Figura 1.5 Tiempo a la muda (media+desvío estándar) de (a) Juveniles III y (b) Juveniles de 1g de *Cherax quadricarinatus* para cada tratamiento en ambos experimentos.

El incremento de peso (IP) alcanzado por los juveniles luego de mudar al estadio IV fue diferente entre tratamientos (ANOVA; p<0,0001) siendo los tratamientos A2, A3 y A4 significativamente menores que AC (**Figura 1.6a**). Sin embargo al finalizar el ensayo (día 60) no se encontraron diferencias entre tratamientos (ANOVA; p=0,050).

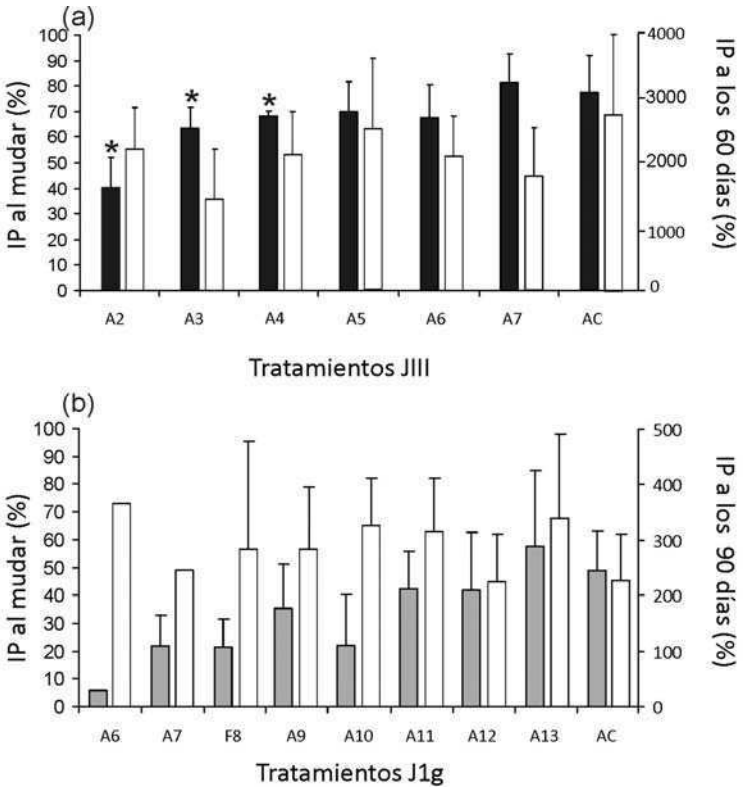


Figura 1.6 Incremento de peso (media+desvío estándar) alcanzado por (a) juveniles III y (b) juveniles de 1 gramo de *Cherax quadricarinatus* para cada tratamiento al mudar (barras negras y grises) y al finalizar el ensayo en ambos experimentos (barras blancas). (*) Indica diferencias significativas respecto de AC (p<0,05).

El peso de los juveniles en el tiempo no mostró diferencias entre tratamientos (ANOVA de medidas repetidas; p=0,310) (**Figura 1.7a**).

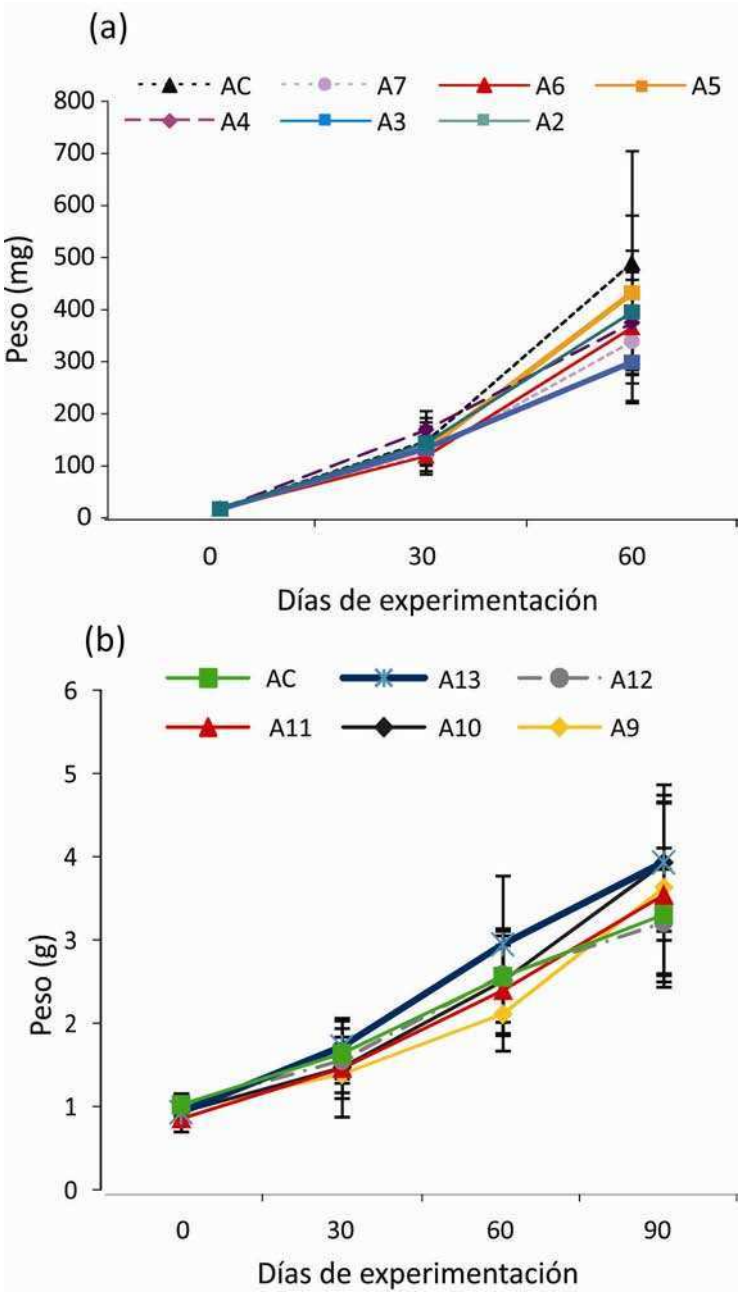


Figura 1.7 Peso medio a lo largo de los ensayos de (a) juveniles III y (b) Juveniles de 1 gramo de *Cherax quadricarinatus* en ambos experimentos.

Durante el período de restricción de alimento la mortalidad fue mayor en los tratamientos A2 y A3 (análogo al Test de Dunnet; p<0,05). Sin embargo al finalizar el experimento la mortalidad fue similar entre los tratamientos (**Figura 1.8a**).

Al día 30, no se encontraron diferencias entre tratamientos en el IHS, IA ni el LT (ANOVA; p=0,833, p=0,559, p=0,914, respectivamente). Al finalizar el ensayo (60 días), el IHS fue similar entre tratamientos (ANOVA; p=0,280) y se encontraron diferencias significativas en el IA (ANOVA; p=0,035), siendo A5 y A3 menores que AC, y en el LT (ANOVA; p=0,009), siendo A3 menor a AC (**Tabla 1.1**).

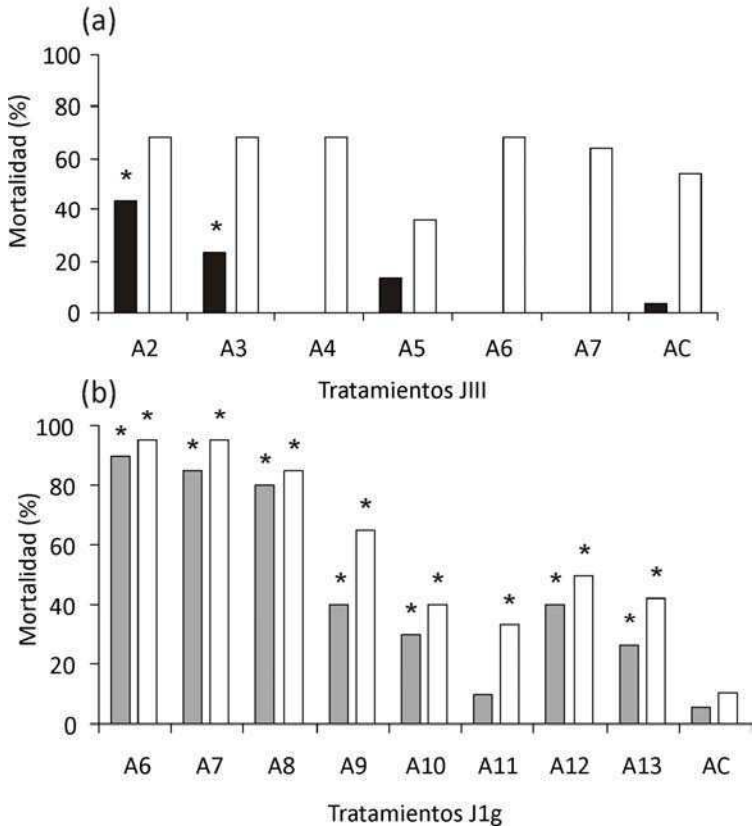


Figura 1.8 Mortalidad en juveniles de *Cherax quadricarinatus* en ambos experimentos. (a) Experimento 1: Durante el periodo de restricción (barras negras) y al finalizar del ensayo (barras blancas). (b) Experimento 2: Durante el periodo de restricción (barras grises) y al finalizar del ensayo (barras blancas). (*) Indica diferencias significativas respecto de AC (p<0,05).

Tabla 1.1 Índice hepatosomático (IHS), índice abdominal (IA) y largo total del cefalotórax (LT) de juveniles III de *Cherax quadricarinatus* bajo distintos tratamientos de restricción de alimento a la mitad (día 30) y al finalizar (día 60) el experimento. (*) Indica diferencias significativas respecto de AC (p<0,05).

Experimento 1 - Juveniles III						
	30 días			60 días		
Tratamientos	IHS (⁄)	IA (⁄)	LT(mm)	IHS (⁄)	IA (⁄)	LT(mm)
AC	6,63 ± 1,11	28,8 ± 1,4	9,06 ± 1,19	6,83 ± 1,47	32,8 ± 3,4	13,9 ± 1,9
A7	6,73 ± 1,70	25,9 ± 3,7	8,17 ± 1,59	7,71 ± 0,47	31,0 ± 1,9	12,0 ± 1,7
A6	6,74 ± 3,18	26,7 ± 2,4	8,59 ± 1,84	7,47 ± 1,02	29,8 ± 1,2	13,0 ± 1,5
A5	6,93 ± 1,13	28,3 ± 2,0	9,12 ± 1,27	7,43 ± 1,21	29,8 ± 2,4*	13,6 ± 1,8
A4	6,50 ± 2,12	26,9 ± 4,9	9,02 ± 2,07	7,41 ± 1,06	30,2 ± 1,9	12,9 ± 1,2
A3	6,64 ± 0,97	27,6 ± 0,6	9,35 ± 2,32	8,13 ± 0,97	29,0 ± 2,9*	11,0 ± 1,2*
A2	8,22 ± 2,43	28,6 ± 1,2	9,31 ± 0,50	7,03 ± 1,13	30,8 ± 2,1	13,7 ± 1,1

Experimento 2

Los porcentaje de mudas obtenidos se ajustaron a una curva sigmoidea en función de la cantidad de días de alimentación durante el periodo de restricción. El valor de PSR_{50} obtenido de la curva sigmoidea fue de 9,2±0,5 días (**Figura 1.4b**).

En los análisis estadísticos que figuran a continuación los tratamientos A6 y A7 fueron excluidos, ya que el número de individuos sobrevivientes resultaron insuficientes para las pruebas estadísticas utilizadas. Por el mismo motivo para el análisis de la varianza de medidas repetidas se excluyó además el tratamiento A8.

El tiempo a la muda registrado para los juveniles con alimentación diaria (AC) fue de 21,1±4,9 días (**Figura 1.5b)** y no fue diferente entre tratamientos (ANOVA; p=0,088).

El incremento de peso (IP) alcanzado por los juveniles luego de mudar y al finalizar el ensayo (**Figura 1.6b**) fue similar entre tratamientos (ANOVA; p=0,379 y p=0,114 respectivamente). Además el peso de los juveniles en el tiempo no mostró diferencias entre tratamientos (**Figura 1.7b**; ANOVA de medidas repetidas; p=0,310).

Durante el período de restricción de alimento la mortalidad registrada en todos los tratamientos excepto A11 fue mayor que en AC y al finalizar el experimento (día 90) la mortalidad de todos los tratamientos fue mayor que en AC (**Figura 1.8b**). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en IHS, IA ni el LT (ANOVA; p=0,155, p=0,282, p=0,511, respectivamente) a los 90 días (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2 Índice hepatosomático (IHS), índice abdominal (IA) y largo total del cefalotórax (LT) de juveniles de *Cherax quadricarinatus* de 1g bajo distintos tratamientos de restricción de alimento al finalizar el experimento (día 90).

Experimento 2- Juveniles de 1g			
	90 días		
Tratamientos	IHS (⁄)	IA (⁄)	LT(mm)
AC	7,33 ± 1,05	30,34 ± 2,15	26,1 ± 2,5
A13	7,13 ± 0,73	31,45 ± 1,13	28,1 ± 2,2
A12	7,50 ± 1,15	31,49 ± 1,80	26,4 ± 2,0
A11	6,97 ± 1,20	30,13 ± 2,63	26,5 ± 2,2
A10	6,33 ± 1,33	30,87 ± 1,21	27,7 ± 3,2
A9	7,77 ± 0,93	30,51 ± 1,05	26,8 ± 2,9
A8	7,77 ± 0,57	31,33 ± 1,25	26,3 ± 5,2
A7	7,77 ± 0,00	31,95 ± 0,00	26,9 ± 0,0
A6	7,56 ± 0,00	30,69 ± 0,00	34,7 ± 0,0

Estudio histológico del hepatopáncreas

La estructura del hepatopáncreas de *C. quadricarinatus* se asemeja a la de otros crustáceos decápodos. Está compuesto por numerosos túbulos ciegos (**Figura 1.9a,b**) y se pudieron identificar los cuatro tipos celulares principales del epitelio: células E,F,B y R. (**Figura 1.9c,d**)

En el experimento 1, los juveniles de los tratamientos A4, A3 y A2 sacrificados a la mitad del ensayo (día 30) mostraron las siguientes alteraciones en sus hepatopáncreas respecto a lo observado en AC:

1. Desorganización (parcial o total) de la estructura tubular (**Figura 1.10a, b**).

2. Ensanchamiento del lumen del túbulo resultado de la disminución en la altura del epitelio que dificultó ocasionalmente la identificación del tipo celular (**Figuras 1.10c y d**).
3. Hipertrofia de las células B cuyas vacuolas tienden a coalescer (**Figura 1.10e**).
4. Células R con vacuolas más grandes que las observadas en las células R de hepatopáncreas de juveniles alimentados continuamente (AC) (**Figura 1.10f**).

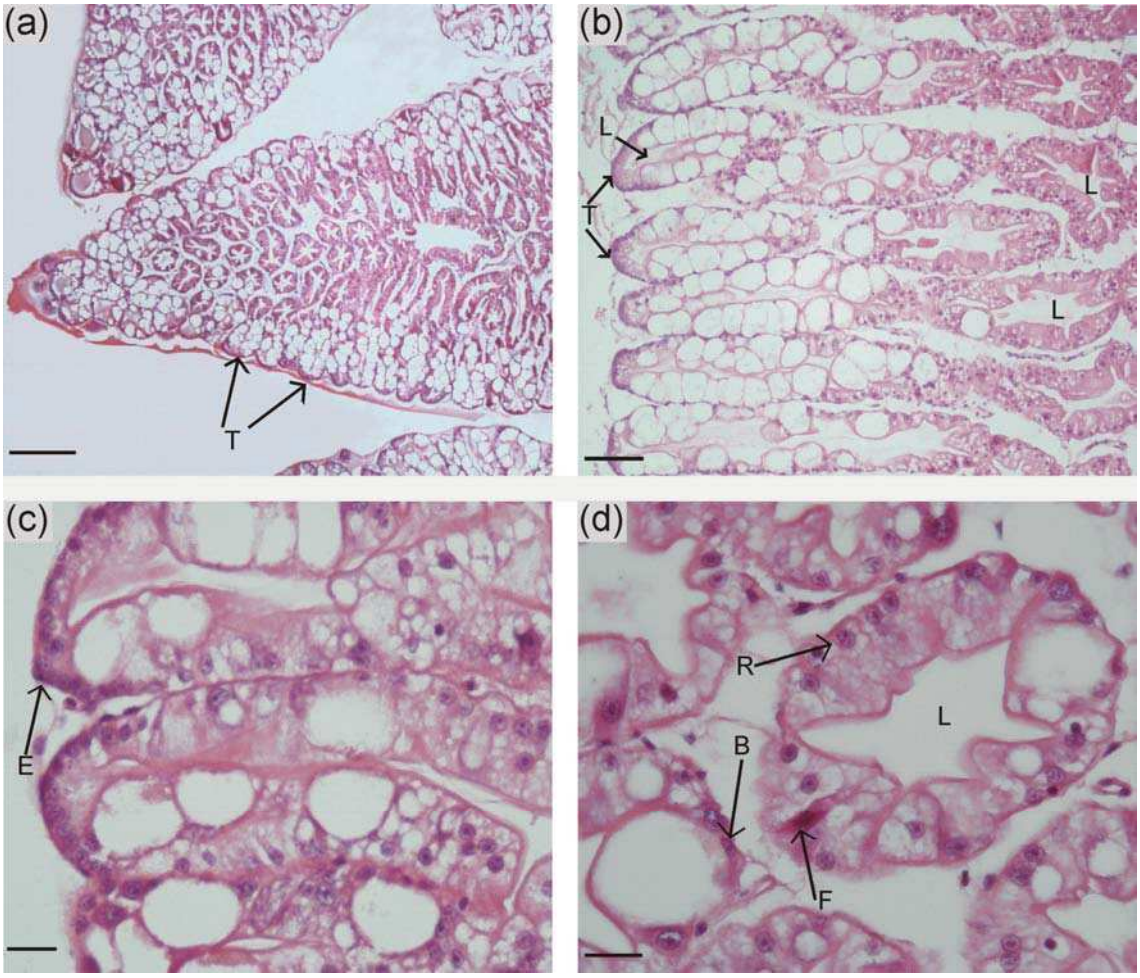
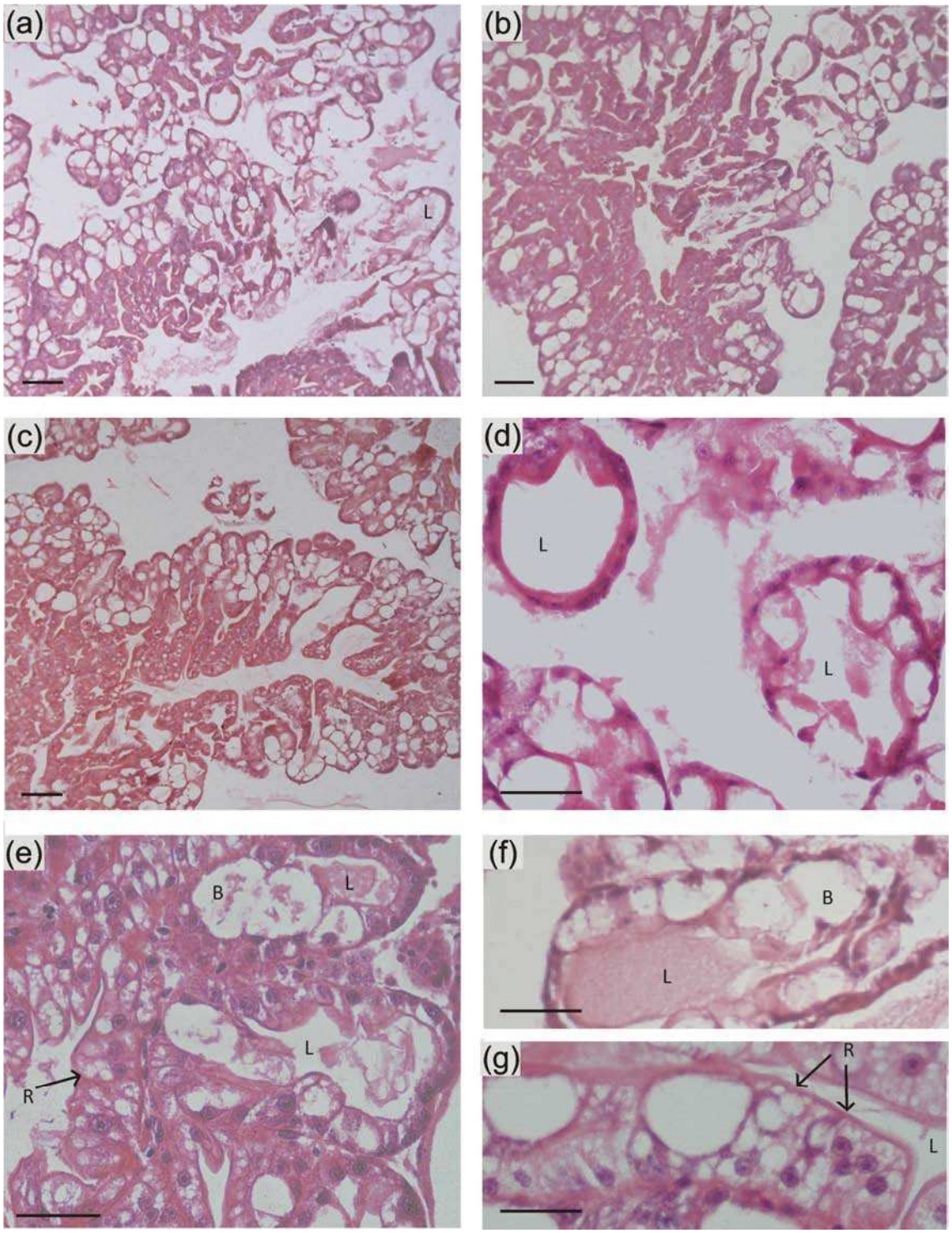


Figura 1.9 Secciones histológicas del hepatopáncreas de juveniles de *Cherax quadricarinatus* alimentado diariamente coloreadas con hematoxilina-eosina; (a) Vista general del hepatopáncreas; (b) Detalle de hepatopancreas con túbulos en corte longitudinal y transversal; (c) Células E ubicadas en la zona distal del túbulo; (d) Detalle de corte transversal de un túbulo del hepatopáncreas; Barras de escala: (A): 320µm; (B): 110µm; (C),(D): 30µm. B: célula B (blisterlike); E: célula E (embrionaria); F: célula F (fibrilar); L: Lumen del túbulo; R: célula R (resortiva).

Asimismo, las anomalías descriptas mostraron efectos más pronunciados en los juveniles del tratamiento A2. Al finalizar el experimento (día 60), sólo los tratamientos A3 y A2 mostraron desorganización parcial de la estructura tubular e hipertrofia de las células B.

En el experimento 2, los juveniles sacrificados al final del ensayo (día 90), mostraron las mismas 4 anomalías descriptas para el experimento 1 (**Figura 1.10**). Estas fueron encontradas exclusivamente en los juveniles alimentados por menos de 10 días durante el periodo de restricción de alimento (A9, A8, A7, A6). Dichas anomalías fueron más pronunciadas en los únicos sobrevivientes de los tratamientos A6 y A7. Los hepatopáncreas de los juveniles alimentados más de 9 días durante el período de restricción fueron similares a los de AC.

Figura 1.10 Secciones histológicas del hepatopáncreas de juveniles de *Cherax quadricarinatus* sometidos a restricción de alimento coloreadas con hematoxilina-eosina. (a) Desorganización total de la estructura tubular; (b) Desorganización parcial de la estructura tubular; (c) Corte longitudinal de un túbulo con ensanchamiento del lumen; (d) Corte transversal de un túbulo con ensanchamiento del lumen; (e) Hipertrofia de las células B y Células R con vacuolas más grandes; (f) Detalle de hipertrofia de las células B (g) Detalle de células R con vacuolas más grandes Barras de escala: (a),(b),(c): 100 µm; (d),(e): 50 µm; (d),(e), (f), (g): 25 µm. B: célula B (blisterlike); L: Lumen; R: célula R (resortiva).



Discusión

El presente trabajo representa la primera referencia de PSR_{50} en juveniles tempranos y avanzados de crustáceos decápodos de desarrollo directo. Además, la estimación de este parámetro en *Cherax quadricarinatus* también representa la primera referencia para una especie de agua dulce.

El PSR_{50} estimado para los juveniles de estadio III de *Cherax quadricarinatus* (2,1±0,1 días) corresponde aproximadamente al 30% de la duración del estadio (6,9±0,6 días). Esta información concuerda con los resultados obtenidos para la especie en estudios anteriores en el mismo estadio (Stumpf *et al.* 2010). Además, concuerda con otros obtenidos para larvas de cangrejo (zoea 1 de *Neohelice granulata*) cuyo PSR_{50} se encuentra entre el 21,6% y 44,2% dependiendo de la salinidad (Giménez 2002), con los obtenidos para el camarón *Crangon crangon* el cual se encontró entre 23% y 32% según la estación del año (verano o invierno) en la que eclosionan las larvas (Paschke *et al.* 2004) y dentro del rango hallado en langostas (phyllosomas de *Panulirus cygnus* y *Panulirus japonicus*) entre el 33,3% y el 57,5% de la duración del estadio (Mikami *et al.* 1993; Liddy *et al.* 2003 respectivamente).

El PSR_{50} estimado para J1g de *C. quadricarinatus* (9,2±0,5 días), por su parte, representó alrededor del 45% de la duración del estadio (21,1±4,9 días). Esto indicaría que los J1g necesitan, en proporción, más alimento que los JIII para saturar sus reservas y mudar al estadio siguiente. Sin embargo, el PSR_{50} resultó similar al estimado

para juveniles de 0,7g del camarón peneido *Fenneropenaeus chinensis* (11,55 días) (Zhang *et al*. 2009).

Si bien los JIII presentaron un PSR_{50} similar a un tercio de la duración de su estadio en concordancia con la propuesta de Anger y Dawirs (1981), los J1g mostraron un valor superior y por tanto **la hipótesis 1 planteada en este capítulo es rechazada.**

La carencia de trabajos realizados en distintas tallas de juveniles (tempranos y avanzados) en otras especies de crustáceos decápodos no permite evaluar si las diferencias en el valor de PSR_{50} son una particularidad de la especie. Por otro lado, la mayoría de los valores indicados en la literatura corresponde a estadios larvales de crustáceos decápodos (Anger y Darwis 1981; Mikami *et al*. 1993; Giménez 2002; Liddy *et al*. 2003; Paschke *et al*. 2004; Bas *et al*. 2008; Figueredo *et al*. 2008; Gebauer *et al*. 2010) posiblemente porque la resistencia a inanición temporal es considerada importante para el estudio de la ecología nutricional en larvas y la dispersión de aquellas especies cuyos adultos son bentónicos (Anger 1995b; Zheng *et al*. 2005).

Sin embargo, la información sobre el valor PSR_{50} no representa solo un aporte al conocimiento teórico sobre la resistencia a la inanición sino también es útil para el diseño de regímenes de alimentación en la acuicultura (Zhang *et al*. 2009), ya que el alimento en exceso suministrado a las crías aumenta los costos de producción (Cortés-Jacinto *et al*. 2005) y disminuye la calidad del agua en el cultivo (You *et al*. 2008).

El periodo de restricción igual al PSR_{50} y realimentación afectó de manera diferente a los dos grupos de juveniles de *C. quadricarinatus.* Los juveniles III fueron afectados en el crecimiento y la estructura del hepatopáncreas cuando la restricción de alimento fue igual al PSR_{50}. Los juveniles de 1g, por su parte, no mostraron efectos en el crecimiento

pero la estructura del hepatopáncreas se vio afectada cuando la restricción de alimento fue igual al PSR_{50}, por lo tanto **la hipótesis 2 es aceptada**.

De acuerdo con el valor estimado del $PSR_{50,}$ 2 días de alimentación serían suficientes para que el 50⁄ de los juveniles III consiga mudar exitosamente al estadio siguiente. Esto podría explicar porque los juveniles no han alterado el tiempo a la muda, sugiriendo que más de 2 días de alimentación son innecesarios para los juveniles de este estadio. Sin embargo, el porcentaje de juveniles que logró mudar, el IP y la presencia de anomalías en los hepatopáncreas de los juveniles del tratamiento A2 revelaron que éstos no se encontraban en condiciones óptimas.

Por otro lado, el análisis del peso evidenció que las diferencias de crecimiento observadas luego de la restricción fueron compensadas a los 30 días. Asimismo, los individuos del tratamiento A2 mostraron anomalías en la evaluación histológica a los 30 días que no se hallaron a los 60 días demostrando una importante recuperación. Esta capacidad de recuperación de los juveniles de *C. quadricarinatus* ha sido observada también por Stumpf *et al.* (2010, 2011) luego de una fase de restricción de alimento en protocolos de alimentación intermitente.

Al finalizar el experimento, todas las variables evaluadas en los JIII presentaron valores similares entre los tratamientos; y en particular la mortalidad observada en el tratamiento A2 luego de la restricción fue alcanzada también por los juveniles de los otros tratamientos. Esto sugiere que los JIII sometidos a una restricción de alimento cercana al PSR_{50} presentan aproximadamente la mortalidad que ocurriría en estadios siguientes, mientras que los sobrevivientes se recuperaron satisfactoriamente durante el periodo de realimentación.

En el cultivo de camarones peneidos se realizan habitualmente pruebas de estrés en larvas de los estadios tempranos para evaluar la calidad de la progenie. Estas pruebas consisten en exponer a los camarones a condiciones ambientales adversas como inanición o bajos niveles de salinidad, oxigeno disuelto o temperatura (Palacios *et al*. 1999; Racotta *et al*. 2003). Integrando los resultados obtenidos en este capítulo, la estimación del PSR_{50} en especies de importancia comercial podría ser usada como una prueba para evaluar la calidad de las progenies con el beneficio de reducir costos de mantenimiento de juveniles de baja calidad o sobrevida.

En el experimento con J1g, todos los tratamientos mostraron valores de mortalidad significativamente más altos que el observado para AC y al final del experimento se registró solo un sobreviviente en los tratamientos A6 y A7. Por otro lado, la evaluación histológica mostró anomalías en los hepatopáncreas de los juveniles de los tratamientos A8 y A9.

Estos resultados sugieren que los juveniles alimentados durante menos días que el valor estimado de PSR_{50} son muy afectados por esta restricción. Aunque una proporción mayor al 50% de los juveniles sometidos al tratamiento A9 consigue mudar al estadio siguiente, estos mueren posteriormente lo que se manifiesta en el gran aumento de mortalidad hacia el final del experimento. Sería necesario evaluar períodos de realimentación mayores a los ensayados para poder determinar si los juveniles pueden recuperarse del efecto de restricción de alimento y cual es el tiempo de realimentación necesario para que esto ocurra.

La estructura histológica observada en los hepatopáncreas de *C. quadricarinatus* fue similar a la estudiada anteriormente para otras especies (Gibson y Barker 1979; Al-Mohanna y Nott 1987, 1989; Caceci *et al*. 1988; Icely y Nott 1992; Johnston *et al*. 1998;

Sousa y Petriella 2000, 2006; Cuartas *et al*. 2002; Franceschini-Vicentini *et al*. 2009; Longo 2012). Este es el primer trabajo que estudió los efectos de la restricción de alimento en la estructura del hepatopáncreas en esta especie. Las anomalías identificadas podrían ser utilizadas para evaluar el estado nutricional de esta especie en cultivo, no obstante, son necesarios más estudios en esta área.

El IHS es considerado un buen indicador del estado nutricional. Sin embargo Jones y Obst (2000) hallaron que el IHS calculado en base al peso seco del hepatopáncreas se correlaciona con la cantidad de lípidos, proteínas y energía de este órgano mientras que el IHS calculado en base al peso húmedo se correlaciona pobremente con estas variables. En este estudio, el IHS fue similar entre tratamientos y entre los dos experimentos incluso cuando el análisis histológico mostró estrés nutricional. Además, los valores obtenidos fueron similares a los obtenidos por otros autores (Loya-Javellana *et al*. 1995; Jussila y Evans 1998; Rodríguez-González *et al*. 2006, 2009) indicando que el IHS estimado en base al peso húmedo del hepatopáncreas podría no ser un buen indicador nutricional para las condiciones experimentales de restricción de alimento.

Partiendo del hecho de que el alimento representa el papel principal en los costos operativos de la producción en acuicultura (Cortés-Jacinto *et al*. 2005; Thompson *et al*. 2005), un adecuado manejo, en términos de reducción en la cantidad de alimento y del uso de herramientas adecuadas para monitorear la salud del cultivo resultan esenciales para aumentar las ganancias además de hacer un uso más racional y sustentable del agua. En este contexto, la estimación de los valores de PSR_{50} en juveniles y la información aportada en este capítulo podrían ser herramientas útiles

para establecer nuevos esquemas de alimentación para la producción de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Capítulo II

Estimación del Punto de No Retorno en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

Los objetivos particulares del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Calvo NS, Tropea C, Anger K, López Greco LS. 2012. Starvation resistance in juvenile freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Aquatic Biology 16, 287–297.

Introducción

Debido a la variación estacional y distribución heterogénea del alimento, los invertebrados acuáticos pueden verse expuestos a periodos de inanición (Thorson 1950). Consecuentemente, éstos han desarrollado una amplia variedad de estrategias que les permiten sobrevivir bajo condiciones limitadas de alimento, incluyendo una reducción del gasto de energía metabólica (McCue 2010) y cambios comportamentales, como reducción de la locomoción o cambios en el patrón de alimentación (López y Levinton 1987; Taghon y Greene 1992; Zhao *et al*. 2011). Cuando las condiciones son favorables, la mayoría de los animales pueden acumular energía en órganos de reserva, garantizando el crecimiento y la reproducción durante los períodos de escasez de alimento (Nakaoka 1992; Brockington y Clarke 2001; Hu *et al*. 2011).

El hepatopáncreas de los crustáceos decápodos, como se indicó en la introducción general, no solo es el principal sitio de síntesis y secreción de enzimas digestivas, sino también el órgano de digestión, absorción y reserva de nutrientes que pueden ser utilizados durante periodos de baja disponibilidad de alimento (Icely y Nott 1992; Ong y Johnston 2006). La capacidad de un crustáceo decápodo de sobrevivir a la falta de alimento temporal y posteriormente recuperarse de esos períodos, depende de las características fisiológicas, comportamentales y particularmente de su capacidad de acumular energía. Esto varía en gran medida entre grupos filogenéticos, estadio del desarrollo, periodo reproductivo y hábitat de los adultos (Sulkin *et al*. 1998; Sulkin y

McKeen 1999; Paschke *et al*. 2004; Giménez y Anger 2005; Bas *et al*. 2008; Calado *et al*. 2010).

Una particular resistencia a la inanición ha sido observada en larvas de decápodos de agua dulce, en especies de altas latitudes, o en otros hábitats variables, donde la producción de plancton podría ser impredecible o escasa (Anger 1995a; Anger *et al*. 2004; Paschke *et al*. 2004; Auerswald *et al*. 2009). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre efectos nutricionales en decápodos se han focalizado en especies marinas (Giménez 2002; Liddy *et al*. 2003; Harris y Sulkin 2005; Bas *et al*. 2008; Figueredo *et al*. 2008; Zhang *et al*. 2009; Calado *et al*. 2010; Gebauer *et al*. 2010), y solo algunos, en especies de agua dulce (Jones y Obst 2000; Anger *et al*. 2007; Anger y Hayd 2009, 2010; Powell y Watts 2010; Stumpf *et al*. 2010).

Anger (1995b) cuando comparó características de cangrejos grápsidos demostró que las larvas de las especies terrestres y de agua dulce poseen mayor independencia nutricional. De este modo se esperaría que los juveniles de *Cherax quadricarinatus* sean más resistentes a la inanición que las especies marinas.

Utilizando como modelo las larvas del cangrejo araña *Hyas araneu*s, Anger y Dawirs (1981) demostraron, por primera vez en crustáceos, la existencia de dos puntos nutricionales críticos: el punto de saturación de reserva (PRS) y el punto de no retorno (PNR). El primero fue analizado en el capítulo I para los juveniles de *C. quadricarinatus* y el segundo, se define como el tiempo umbral sin alimento en el cual las larvas/juveniles pierden la capacidad de recuperarse del estrés nutricional, aunque posteriormente sean alimentadas *ad libitum*.

En este capítulo se estimará el PNR_{50} definido como el tiempo sin alimento en el cual el 50% de los juveniles muere sin poder mudar al estadio siguiente. Anger y Dawirs

(1981) expusieron que este punto ocurre alrededor de la mitad la duración del estadio, basándose en los estudio de los estadios larvales del cangrejo *Hyas araneus* (zoea I y zoea II).

Como se mencionó en el capítulo anterior estos dos puntos críticos han sido utilizados como índices experimentales para cuantificar la "vulnerabilidad nutricional" y la "flexibilidad nutricional" (para terminología ver Sulkin 1978; Sulkin y van Heukelem 1980) de un determinado estadio del desarrollo (ej. Anger 2001; Paschke *et al*. 2004; Figueiredo *et al*. 2008; Zhang *et al*. 2009; Gebauer *et al*. 2010; Stumpf *et al*. 2010).

El crecimiento de las langostas de agua dulce, en general, está influenciado por muchas variables ambientales. Factores abióticos como la temperatura, oxígeno disuelto, pH, niveles de nutrientes, calidad del agua y composición del hábitat y factores bióticos como el alimento, presencia de predadores y densidad de la especie son significativos moduladores del crecimiento (Reynolds 2002). Como parastácido, la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, frecuentemente experimenta escasez de alimento (Jones y Obst 2000), por lo que estaría adaptada a periodos de inanición extensos, y por lo tanto, podría ser considerado un modelo apropiado para estudios de flexibilidad nutricional.

El hábitat natural de *C. quadricarinatus* consiste en cuerpos de agua permanentes que se caracterizan por condiciones de estancamiento o lento flujo al menos en algunos periodos del año (Jones y Ruscoe 2001). En éstos, las langostas soportan altas temperaturas (hasta 29°C), baja concentración de oxígeno (> 1ppm) y alta variabilidad de pH (6,5-9) (Masser y Rouse 1997). Esta especie sin embargo muestra la habilidad de sobrevivir y reproducirse en zonas tropicales y templadas con condiciones bióticas y abióticas significativamente variables (Jones 1995b; Karplus *et al.* 1998).

Los primeros estudios experimentales en laboratorio sobre vulnerabilidad nutricional de *C. quadricarinatus* demostraron que el valor de PNR_{50} en juveniles III (estadio post-independencia) fue similar al 50% de la duración del estadio pero se desconocen los efectos a largo plazo de la inanición. (Stumpf *et al*. 2010). Los experimentos de PSR (capítulo I) mostraron que los efectos de la restricción del alimento difirieron entre tratamientos y estuvieron modulados por el tiempo de alimentación durante el estadio. Sin embargo no existen, hasta el momento, experimentos llevados a cabo en otro estadio juvenil o a través de períodos de inanición más extensos.

Objetivo

Estimar el punto de no retorno 50 (PNR_{50}) de juveniles de estadio III y de un gramo de *Cherax quadricarinatus* y evaluar los efectos de la inanición cercanos al PNR_{50} sobre el crecimiento, la sobrevida y la estructura del hepatopáncreas.

Hipótesis 1: El valor estimado del PNR_{50} de los juveniles III y de 1 gramo de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* es similar o mayor a la mitad de la duración de su estadio.

Hipótesis 2: Los juveniles III y de 1gramo de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* sometidos a un protocolo de restricción de alimento igual al PNR_{50} presentan menor crecimiento que juveniles alimentados diariamente o efectos en la estructura del hepatopáncreas.

Materiales y métodos

Para el desarrollo de los objetivos propuestos de este capítulo se realizaron 2 ensayos: el primero con juveniles III y el segundo con juveniles de 1g. En ambos ensayos se expuso a los individuos a un periodo de inanición seguido de un período de alimentación y se evaluaron los efectos a corto y largo plazo.

Obtención de los juveniles

Los juveniles utilizados para llevar a cabo este objetivo fueron obtenidos bajo las condiciones de laboratorio descriptas en el capítulo I, a partir de un lote de animales reproductores suministrado por el criadero Pinzas Rojas, Tucumán, Argentina.

Diseño experimental

Experimento 1

Con el fin de estimar el valor del PNR_{50} de JIII y evaluar los efectos de la inanición se estudiaron tratamientos que fueron elegidos tomando como base ensayos realizados previamente (Calvo *et al*. 2009 a,c; Stumpf *et al*. 2010).

El experimento consistió en exponer a los juveniles de *C. quadricarinatus* a tratamientos con diferentes periodos de inanición seguidos de alimentación hasta la finalización del ensayo (60 días).

Para esto, 210 juveniles provenientes de 5 madres diferentes fueron secados con papel absorbente, y pesados (Peso inicial: P_i) con una balanza de 0,1mg de precisión. Luego, cada juvenil fue asignado aleatoriamente a uno de 7 tratamientos: uno con alimentación diaria (AC), uno con inanición continua (IC) y 5 con diferente número de días de inanición (de 4 a 8 días denominados I4 hasta I8) seguido de días de alimentación (**Figura 2.1**). Cada tratamiento contó con 30 réplicas (6 juveniles de cada una de las 5 madres seleccionadas). Los días de alimentación, teniendo en cuenta el protocolo, se ofreció a los juveniles alimento balanceado TETRA® Tetracolor (ver capítulo I) *ad libitum*.

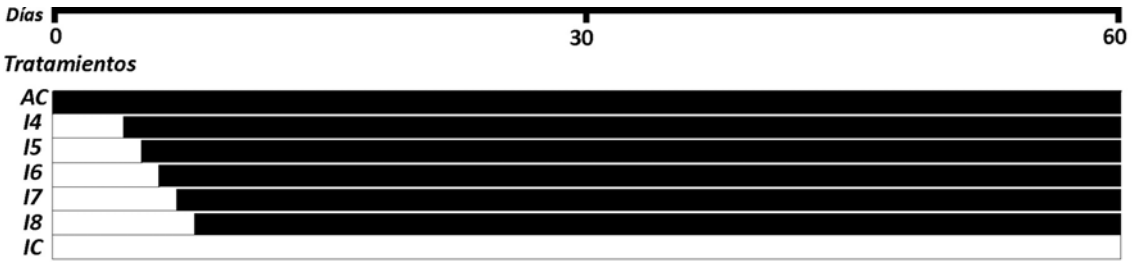


Figura 2.1 Diseño del experimento 1 y protocolo de alimentación de tratamientos aplicados a los juveniles del estadio III de *Cherax quadricarinatus*. ■ Simboliza días de alimentación y □ días sin alimentación.

Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas para el Experimento 1 del capítulo anterior (**Figura 1.2**). Se recambió el agua tres veces por semana y los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados semanalmente manteniéndose similar a lo registrado para el capítulo I y dentro de los rangos óptimos recomendados (Jones 1997).

Se realizaron 2 observaciones diarias (mañana y tarde) contabilizando las mudas y muertes y registrándose el número de juveniles que consiguió mudar al estadio IV, el

tiempo a la muda (duración del estadio III) y el peso de los juveniles luego de la ecdisis, a los 30 y a los 60 días.

Para estimar el PNR_{50} de los JIII se graficó la mortalidad durante el estadio III (el porcentaje de juveniles dentro de cada tratamiento que murió sin conseguir mudar al estadio siguiente) en función de la cantidad de días del periodo de inanición (tratamientos) y se ajustaron los datos a una función sigmoidea. Además, se calculó el incremento porcentual del peso (IP) luego de la ecdisis, a los 30 y 60 días ($IP= 100\times((P_f- P_i)/ P_i)$ siendo P_i y P_f los pesos inicial y final respectivamente alcanzados por los juveniles).

Para hacer una evaluación histológica del hepatopáncreas a corto y largo plazo fueron sacrificados 5 juveniles por tratamiento al día 30 y todos los sobrevivientes al finalizar el experimento (día 60). Se midió el largo total del cefalotórax (LT) y se removieron y pesaron el hepatopáncreas y el abdomen de cada animal. Los hepatopáncreas fueron fijados y procesados histológicamente (ver capítulo I).

En función de los resultados obtenidos en el capítulo 1 sobre el índice hepatosomático (en base húmeda), al final del ensayo se separaron 6 hepatopáncreas de cada tratamiento para determinar el peso seco colocándolos a 50°C durante 48 horas. Además se calculó el índice hepatosomático en base al peso húmedo del hepatopáncreas (IHS_H = 100*peso húmedo del hepatopáncreas/peso húmedo total del cuerpo), el índice hepatosomático en base al peso seco del hepatopáncreas (IHS_S= peso seco del hepatopáncreas (mg)/peso húmedo total del cuerpo (g)) de acuerdo a Jones y Obst (2000) y el índice del abdomen (IA=100*peso húmedo del abdomen/peso húmedo total del cuerpo).

Experimento 2

Con el fin de estimar el valor del PNR_{50} de juveniles de 1g y evaluar los efectos de la inanición se estudiaron tratamientos que fueron elegidos tomando como base ensayos realizados previamente.

El experimento consistió en tratamientos con diferentes periodos de inanición seguidos de alimentación hasta la finalización del ensayo (90 días). Para esto, 288 juveniles provenientes de 4 madres diferentes fueron secados con papel absorbente y pesados (peso inicial: P_i) con una balanza de 0,1mg de precisión. Luego, cada juvenil fue asignado aleatoriamente a uno de 12 tratamientos. Uno con alimentación diaria (AC), uno con inanición continua (IC) y 10 con diferente número de días de inanición (19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 41 y 51 días denominados I19, hasta I51; **Figura 2.2**). Cada tratamiento contó con 24 réplicas. En los días de alimentación, teniendo en cuenta el protocolo, se ofreció a los juveniles alimento balanceado TETRA® Tetracolor (capítulo I y experimento 1 del presente capítulo) *ad libitum*.

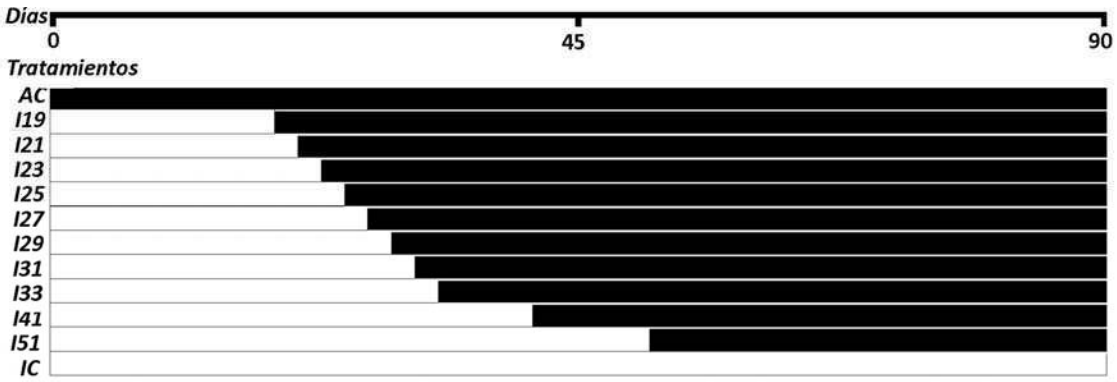


Figura 2.2 Diseño del experimento 2 y protocolo de alimentación de tratamientos aplicados a los juveniles de un gramo de *Cherax quadricarinatus*. ■ Simboliza días de alimentación y □ días sin alimentación.

Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas para el experimento anterior. Se recambió el agua tres veces por semana y los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados semanalmente manteniéndose dentro de los rangos óptimos recomendados.

Se realizaron observaciones diarias contabilizando mudas y muertes y se registró el número de juveniles que consiguió mudar al estadio siguiente en cada tratamiento, el tiempo a la muda y el peso de los juveniles luego de la ecdisis, a los 45 y 90 días.

Para estimar el PNR_{50} de los J1g se graficó el porcentaje de juveniles dentro de cada tratamiento que murió sin conseguir mudar al estadio siguiente (mortalidad) en función de la cantidad de días de inanición (tratamientos) y, al igual que en el Experimento 1, se ajustaron los datos a una función sigmoidea. Además, se calculó el incremento porcentual del peso (IP) luego de la ecdisis, a los 45 y 90 días.

Para hacer una evaluación histológica del hepatopáncreas a corto y largo plazo fueron sacrificados 4 juveniles por tratamiento al día 45 y todos los sobrevivientes al finalizar el experimento (día 90). Se midió el largo total del cefalotórax (LT) y se removieron y pesaron el hepatopáncreas y el abdomen de cada animal. Los hepatopáncreas fueron fijados y procesados histológicamente (capítulo I). Al final del ensayo se separaron 7 hepatopáncreas de cada tratamiento para determinar el peso seco colocándolos a 50ºC durante 48 horas. Luego se calculó el índice hepatosomático húmedo (IHS_H), el índice hepatosomático seco (IHS_S) y el índice del abdomen (IA).

Análisis estadístico

Todas las variables fueron expresadas como media ± DE. Se realizó un análisis de varianza de 1 factor (ANOVA) para comparar el tiempo a la muda, el IP, el LT, el IHS_H, IHS_S y el IA, entre tratamientos. Posteriormente se realizaron contrastes utilizando el Test de Tukey. En aquellos casos en los que no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianzas (Test de Levenne) o normalidad, se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis y luego un Test homólogo a Tukey no paramétrico (Zar 2010). Se utilizó un análisis de varianza para medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas) para evaluar el peso en el tiempo y posteriormente se realizaron contrastes utilizando el test de Dunnet (Zar 2010). Al final del cada ensayo la mortalidad final de todos los tratamientos fue comparada contra el tratamiento control AC utilizando un procedimiento no paramétrico análogo al Test de Dunnet para comparar proporciones (Zar 2010).

Resultados

Experimento 1

Las mortalidades antes de mudar obtenidas se ajustaron a una curva sigmoidea en función de la cantidad de días de inanición a los que fueron expuestos los juveniles. El valor de PNR_{50} obtenido de la curva sigmoidea que se muestra en la **Figura 2.3a** fue 8,7±0,3 días. Los juveniles JIII sometidos a inanición continua murieron a los 15,0 ± 2,6 días.

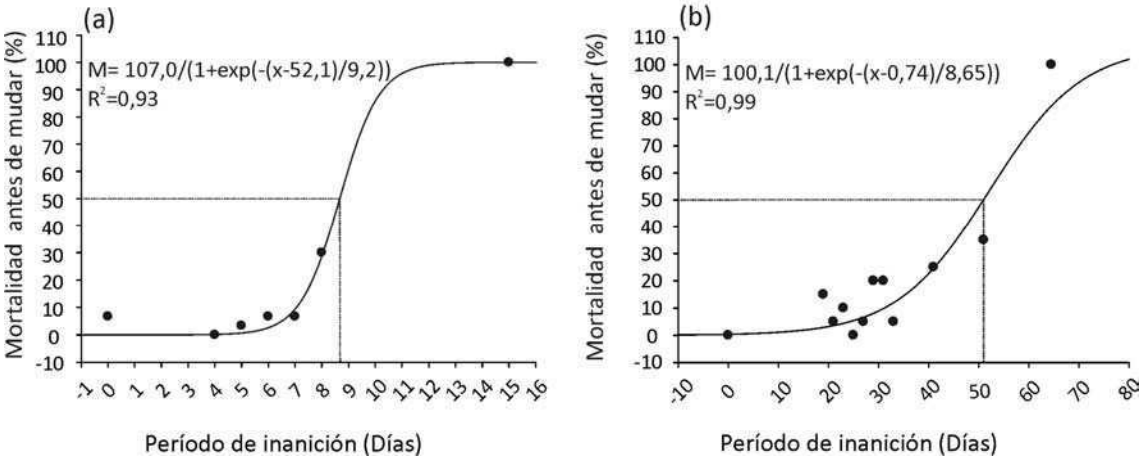


Figura 2.3 Mortalidad antes de mudar de (a) Juveniles III y (b) Juveniles de 1g de *Cherax quadricarinatus* en función de los días de inanición o de no alimentación en ambos experimentos. Los datos fueron ajustados a una curva sigmoidea ($M=a/\{1+exp.-[(x-x_0)/b]\}$).

El tiempo a la muda registrado para los juveniles fue diferente entre tratamientos (Test Kruskal-Wallis; p=0,001). Todos los juveniles que fueron expuestos a inanición extendieron el tiempo a la muda significativamente (**Figura 2.4a**). Los juveniles con

alimentación diaria (AC) mudaron a los 6,9±0,7 días y ningún juvenil logró mudar sin alimento (IC). El incremento de peso (IP) alcanzado por los juveniles luego de mudar al estadio IV fue similar entre tratamientos (ANOVA; p=0,177; **Figura 2.5a**).

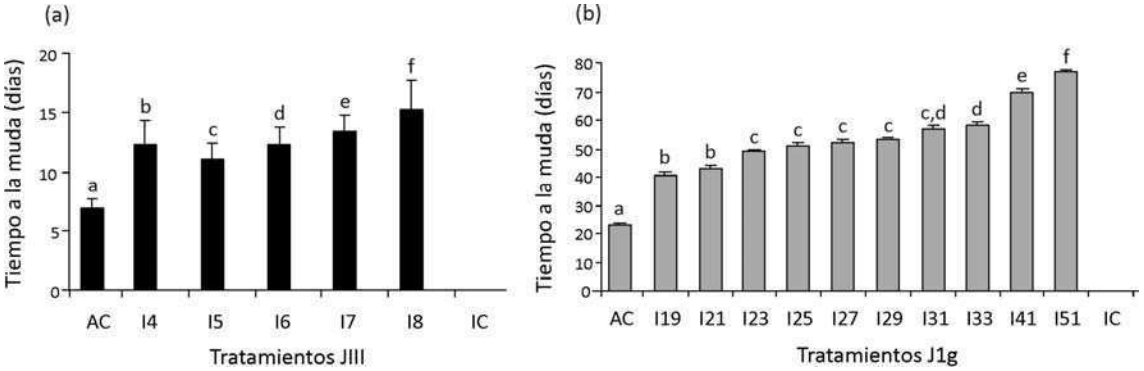


Figura 2.4 Tiempo a la muda (media+desvío estándar) registrado para (a) juveniles III y (b) juveniles de 1 gramo de *Cherax quadricarinatus* para cada tratamiento en ambos experimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

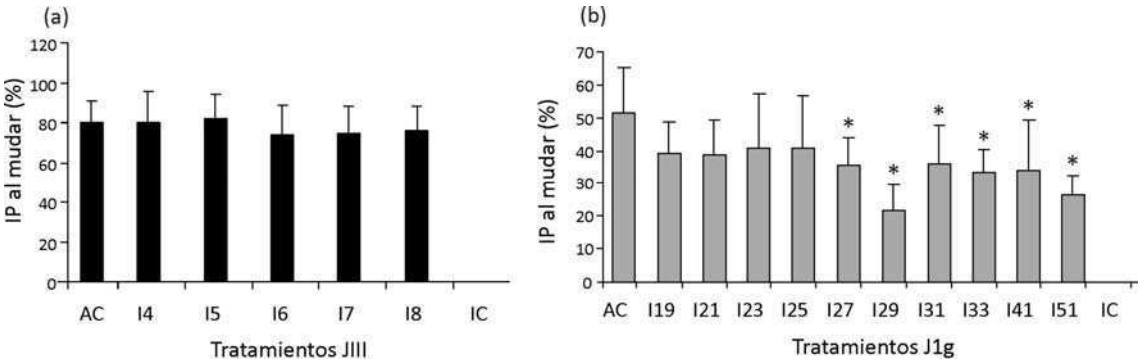


Figura 2.5 Incremento de peso al mudar (media+desvío estándar) registrado para (a) juveniles III y (b) juveniles de 1 gramo de *Cherax quadricarinatus* para cada tratamiento en ambos experimentos. (*) Indica diferencias significativas respecto de AC (p<0,05).

El peso de los juveniles en el tiempo no mostró diferencias entre tratamientos (ANOVA de medidas repetidas; p=0,183; **Figura 2.6a**). Sin embargo el incremento de peso (IP) mostró diferencias entre tratamientos a los 30 días (ANOVA; p=0,0009), siendo los

valores de los tratamientos I5, I7 e I8 significativamente menores que el de AC. A los 60 días los IP de todos los tratamientos fueron similares (ANOVA; p=0,204; **Tabla 2.1**).

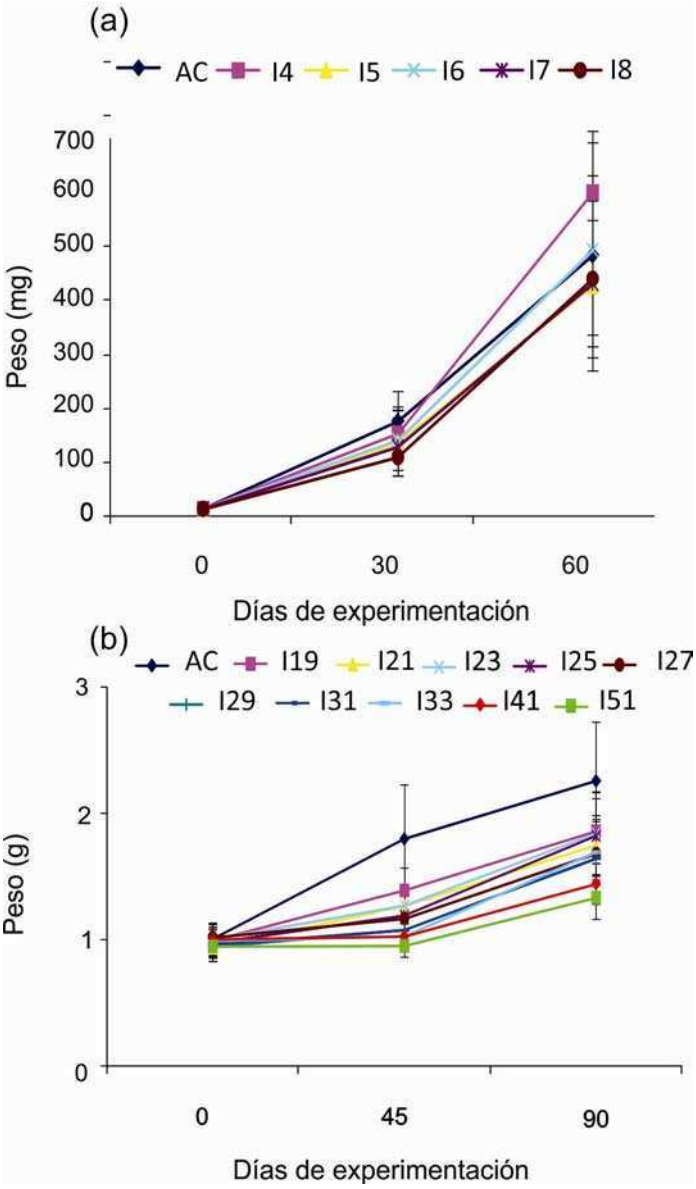


Figura 2.6 Pesos medios de (a) juveniles III y (b) juveniles de 1 gramo de *Cherax quadricarinatus* al inicio, a la mitad y al finalizar cada experimento.

A los 30 días no se encontraron diferencias entre tratamientos en IHS_H, IA ni el LT (ANOVA; p=0,148, p=0,519, p=0,878, respectivamente). Al finalizar el ensayo (día 60), los valores registrados para IA y LT fueron similares entre tratamientos (ANOVA; p=0,823, p=0,106, respectivamente), sin embargo se encontraron diferencias en el

IHS_H siendo el valor de I8 mayor que el de AC (ANOVA; p=0,006). El IHS_S no pudo ser comparado estadísticamente entre los tratamientos debido al insuficiente número de muestras (AC: n=5, I4: n=2, I5: n=2, I6: n=6, I7: n=6, I8: n=2, IC: n=0). Se agruparon los datos obtenidos (Grupo1: Ac; grupo 2: I4 e I5; grupo 3: I6; y grupo 4: I7 e I8) y no se encontraron diferencias entre grupos. A los 60 días solo la mortalidad final de IC resultó diferente de la mortalidad registrada en AC (**Tabla 2.1**).

Tabla 2.1 Incremento de peso (IP), Índice hepatosomático húmedo (IHS_H), índice abdominal (IA) y largo total del cefalotórax (LT) como media±desvío estándar de juveniles III de C*herax quadricarinatus* expuestos a tratamientos con distintos periodos de inanición, seguidos de alimentación a la mitad (día 30) y al finalizar (día 60) el experimento. Índice hepatosomático seco (IHS_s) y mortalidad final (M) a los 60 días. (*) Indica diferencias significativas respecto de AC (p<0,05).

Experimento 1 - Juveniles III

30 días

Tratamientos	IP (%)	IA (%)	LT (mm)	IHS_H (%)
AC	973 ± 354	28,3 ± 3,5	11,8 ± 2,7	5,4 ± 1,9
I4	760 ± 305	28,7 ± 4,4	9,8 ± 3,1	7,0 ± 1,4
I5	625 ± 284*	25,6 ± 5,7	9,6 ± 0,7	9,9 ± 4,6
I6	768 ± 330	26,1 ± 2,1	10,3 ± 1,0	7,4 ± 1,7
I7	648 ± 290*	29,6 ± 3,8	10,3 ± 1,4	7,1 ± 0,7
I8	458 ± 219*	30,1 ± 3,2	9,1 ± 2,0	7,7 ± 1,4
IC	-	-	-	-

60 días

	M(%)	IP (%)	IA (%)	LT (mm)	IHS_H (%)	IHS_S (mg/g)
AC	58	2641 ± 796	30,3 ± 1,8	14,2 ± 1,5	7,0 ± 0,7	12,25 ± 4,00
I4	68	3380 ± 794	29,4 ± 1,9	15,4 ± 0,7	7,6 ± 1,1	9,41 ± 1,50
I5	68	2382 ± 977	30,3 ± 2,0	13,3 ± 1,4	8,9 ± 1,7	15,88 ± 1,40
I6	44	2747 ± 1168	30,4 ± 2,5	14,0 ± 2,3	9,3 ± 2,0	15,92 ± 4,90
I7	32	2388 ± 669	29,7 ± 3,1	13,6 ± 1,3	9,3 ± 2,3	14,23 ± 3,50
I8	77	2490 ± 1113	29,7 ± 2,9	13,8 ± 2,0	10,1 ± 1,5*	8,07 ± 7,30
IC	100*	-	-	-	-	-

El análisis histológico del hepatopáncreas a los 30 días reveló desorganización parcial de los túbulos en juveniles del tratamiento I8. Además, todos los tratamientos

mostraron ensanchamiento del lumen del túbulo e hipertrofia de las células B. Al final del experimento (día 60) solo los tratamientos I7 e I8 mostraron ensanchamiento del lumen tubular (**Figura 1.10**, capítulo I).

Experimento 2

Las mortalidades antes de mudar obtenidas se ajustaron a una curva sigmoidea en función de la cantidad de días de inanición a los que fueron expuestos los juveniles. El valor de PNR_{50} obtenido de la curva sigmoidea que se muestra en la **Figura 2.3b** fue de 50,9±1,5 días. Los juveniles sometidos a inanición continua (IC) murieron después de 64,5 ± 16,1 días.

El tiempo a la muda registrado para los juveniles fue diferente entre tratamientos (Test Kruskal-Wallis; p=0,001), siendo éste mayor cuanto mayor fue el periodo de inanición (**Figura 2.4b**). Los juveniles con alimentación diaria (AC) mudaron antes que los demás tratamientos (22,8 ± 4,1 días) y ningún juvenil logró mudar sin alimento (IC). El incremento de peso (IP) alcanzado por los juveniles luego de mudar al estadio siguiente también fue diferente entre tratamientos (ANOVA; p<0,001). Los juveniles que fueron expuestos a más de 26 días de inanición alcanzaron un IP luego de la muda menor que los de AC (**Figura 2.5b**).

El peso de los juveniles en el tiempo no pudo ser analizado estadísticamente ya que los datos no cumplieron con los supuestos del método. Sin embargo, en la **Figura 2.6b** se observa que el peso de los juveniles del tratamiento control (AC) tiende a ser mayor que el de los demás tratamientos. A los 45 y 90 días el IP fue diferente entre

tratamientos (Test Kruskal-Wallis; p<0,001 para ambos tiempos), siendo los valores de todos los tratamientos con un periodo de inanición, menores que AC (**Tabla 2.2**).

A la mitad (día 45) y al finalizar el experimento (día 90) no se encontraron diferencias entre tratamientos en el IA (Test Kruskal-Wallis p=0,248; ANOVA; p=0,627 respectivamente). Sin embargo en ambos momentos (día 45 y 90) el LT mostró diferencias entre tratamientos (Kruskal-Wallis, p=0,009; ANOVA, p=0,005 respectivamente). Al día 45 los juveniles expuestos más de 24 días de inanición mostraron valores menores de LT que AC, mientras que al final del ensayo solo I51 fue menor que AC (**Tabla 2.2**).

A los 45 días el IHS_H fue diferente entre tratamientos (ANOVA, p<0,001); los valores de los animales de inanición continua (IC) fueron significativamente menores que de los de AC y ningún animal de IC sobrevivió al final del experimento. A los 90 días los IHS_H y IHS_S tendieron a aumentar con el incremento en los días de inanición de los tratamientos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas (ANOVA, p=0,055; ANOVA, p=0,051 respectivamente). Al finalizar el experimento solo la mortalidad de IC resultó diferente de la mortalidad final registrada en AC (**Tabla 2.2**).

Las observaciones histológicas revelaron en el hepatopáncreas diferencias estructurales entre el control (**Figura 2.7a, b, c**) y los tratamientos. En el día 45 se observó desorganización tubular y ensanchamiento del lumen en todos los tratamientos con algún periodo de inanición. Estas alteraciones fueron más pronunciadas en los tratamientos I51 e IC, donde los espacios intertubulares fueron mayores que en el control. No se reconocieron células R, E ni F, siendo solo las células B distinguibles de las otras. Además, la altura del epitelio fue cualitativamente menor que la del control (**Figura 2.7d, e, f**).

Al final del experimento todos los tratamientos mostraron hipertrofia de las células B. Asimismo, los juveniles de los tratamientos con periodos de inanición mayores a 24 días mostraron desorganización estructural de los túbulos y ensanchamiento del lumen tubular (**Figura 2.7g, h, i**).

Tabla 2.2 Incremento de peso (IP), Índice hepatosomático húmedo (IHS_H), índice abdominal (IA) y largo total del cefalotórax (LT) como media ± desvío estándar de juveniles de 1 g de C*herax quadricarinatus* expuestos a tratamientos con distintos periodos de inanición, seguidos de realimentación a la mitad (día 45) y al finalizar (día 90) el experimento. Índice hepatosomático seco (IHS_s) y mortalidad final (M) a los 90 días. (*) Indica diferencias significativas respecto de AC (p<0,05).

Experimento 2 - Juveniles de 1g

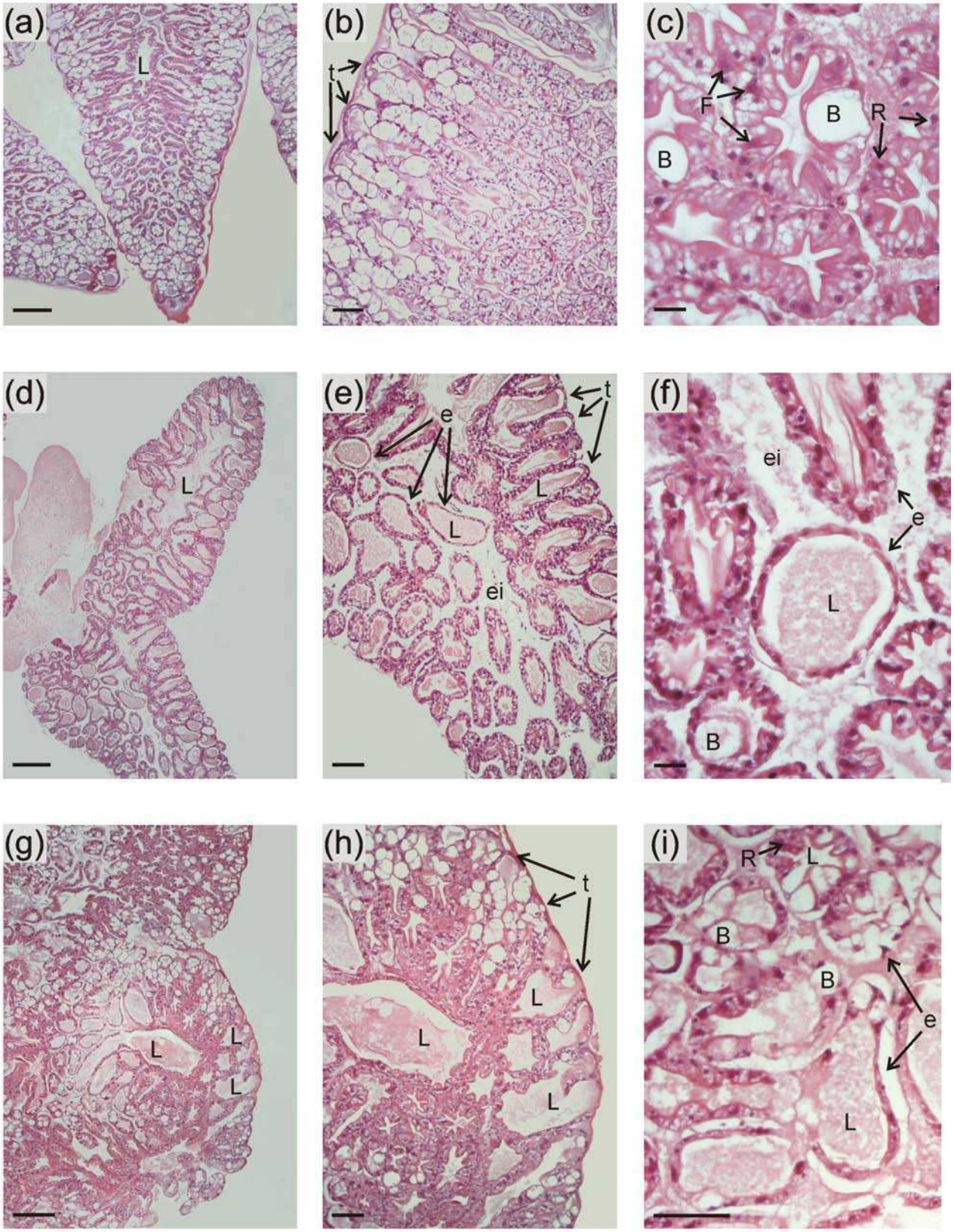
45 días

Tratamientos	IP (%)	IA (%)	LT (mm)	IHS_H (%)
AC	78,3 ± 40,9	28,4 ± 1,6	21,7 ± 2,4	8,6 ± 0,8
I19	39,9 ± 14,5*	29,8 ± 1,6	18,8 ± 1,2	8,2 ± 0,7
I21	38,1 ± 16,0*	30,5 ± 2,3	19,4 ± 0,5	8,6 ± 2,0
I23	24,5 ± 21,6*	31,9 ± 2,4	18,0 ± 3,1	7,8 ± 1,4
I25	20,8 ± 19,1*	27,4 ± 1,0	15,8 ± 2,8*	7,8 ± 3,4
I27	13,5 ± 16,8*	30,8 ± 2,1	18,0 ± 0,9*	8,4 ± 1,2
I29	16,7 ± 18,5*	28,6 ± 2,4	18,9 ± 0,3*	7,1 ± 1,1
I31	11,0 ± 13,5*	26,1 ± 7,3	17,5 ± 1,2*	8,6 ± 1,1
I33	3,20 ± 3,66*	30,1 ± 1,1	18,0 ± 0,6*	8,1 ± 0,8
I41	1,60 ± 3,19*	30,1 ± 1,0	18,0 ± 0,8*	6,5 ± 0,8
I51	0,79 ± 2,17*	29,3 ± 1,5	18,0 ± 1,1*	5,1 ± 1,5
IC	-1,74 ± 6,01*	29,0 ± 1,9	17,7 ± 0,7*	3,0 ± 0,8*

90 días

	M(%)	IP (%)	IA (%)	LT (mm)	IHS_H (%)	IHS_S (mg/g)
AC	15	126,0 ± 44,0	31,2 ± 7,2	23,2 ± 2,7	7,8 ± 1,3	14,14 ± 12,5
I19	20	91,1 ± 36,3*	30,6 ± 1,7	21,8 ± 1,1	7,7 ± 2,3	14,64 ± 23,1
I21	15	90,2 ± 39,0*	29,7 ± 2,1	21,0 ± 1,2	8,2 ± 1,5	13,20 ± 14,7
I23	15	87,9 ± 46,6*	30,6 ± 1,5	21,6 ± 1,2	7,8 ± 1,0	14,99 ± 10,2
I25	10	88,8 ± 38,7*	31,4 ± 2,1	21,3 ± 1,5	8,0 ± 1,2	12,90 ± 12,1
I27	5	68,9 ± 31,5*	28,8 ± 6,7	21,2 ± 0,8	8,6 ± 1,2	17,12 ± 12,3
I29	30	75,8 ± 33,5*	31,3 ± 3,0	20,8 ± 1,4	8,5 ± 1,0	16,63 ± 9,3
I31	20	72,1 ± 30,0*	30,1 ± 2,0	20,8 ± 1,3	8,4 ± 0,8	16,05 ± 7,5
I33	15	72,1 ± 28,8*	29,9 ± 1,5	21,2 ± 1,3	8,4 ± 1,4	16,30 ± 13,8
I41	30	44,5 ± 16,8*	30,8 ± 1,7	20,1 ± 0,8	9,3 ± 1,1	19,78 ± 11,0
I51	35	41,2 ± 15,7*	30,2 ± 1,4	19,2 ± 1,2*	9,0 ± 1,1	20,33 ± 11,1
IC	100*	-	-	-	-	-

Figura 2.7 (página siguiente) Secciones histológicas del hepatopáncreas de juveniles de *Cherax quadricarinatus* de 1 g coloreadas con hematoxilina-eosina; (a), (b), (c) Juveniles alimentados diariamente; (d), (e), (f) Juveniles expuestos a inanición durante 45 días; (g), (h), (i) Juveniles expuestos a inanición por 51 días y luego realimentados hasta los 90 días. Barras de escala: (a), (d), (g) 360µm; (b), (e), (h), (i): 110µm; (c), (f): 30µm. B: Célula B (blisterlike); E: célula (embrionaria); e: epitelio; ei: espacio intertubular F: célula F (fibrilar); L: Lumen del túbulo; R: célula R (resortiva), t: túbulo.


(a)
L
(b)
t
(c)
F
B
R
B
(d)
L
(e)
e
t
L
L
ei
(f)
ei
e
L
B
(g)
L
L
L
(h)
t
L
L
L
(i)
R
L
B
B
e
L

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, en comparación con otros decápodos, los juveniles de *C. quadricarinatus* poseen una alta resistencia a la inanición.

Los valores de PNR_{50} presentados en este capítulo son los más altos reportados para especies de decápodos (Giménez 2002; Paschke *et al*. 2004; Bas *et al*. 2008; Gebauer *et al*. 2010). Así mismo, estos valores son mayores que el total de la duración del estadio representando el 125 y el 220% de la duración del mismo para juveniles JIII y J1g respectivamente y por tanto se **rechaza la hipótesis 1** planteada en este capítulo.

Estos juveniles no son capaces de mudar sin alimentarse (Stumpf *et al*. 2010 y presente estudio). Sin embargo, de acuerdo a los resultados del capítulo I los JIII y J1g necesitan solo 2 o 9 días de alimentación inicial, respectivamente, para acumular las reservas necesarias para mudar al estadio siguiente (valores estimados de PSR_{50} en el capítulo I). Ambas tallas de juveniles con un corto periodo para llegar al PSR_{50} y un largo periodo para llegar al PNR_{50}, confirman que los juveniles de *C. quadricarinatus* son muy resistentes a la inanición transitoria en comparación con estadios tempranos de otros crustáceos decápodos.

Gebauer *et al*. (2010) propusieron el "índice de vulnerabilidad nutricional", definido como el cociente entre los dos punto críticos (IVN $=PSR_{50}/PNR_{50}$) y establecieron que valores menores que 0,5 representarían baja dependencia del alimento (baja vulnerabilidad nutricional), valores entre 0,5 y 1 representarían dependencia

intermedia y valores mayores a 1, alta dependencia (alta vulnerabilidad nutricional). Considerando los valores de PSR_{50} obtenidos previamente y los valores de PNR_{50} estimados en este capítulo, los valores del IVN para JIII y J1g de *C. quadricarinatus* serían 0,24 y 0,18 respectivamente. Ambos fueron menores a 0,5, sin embargo demuestran que la talla de los juveniles (tempranos o tardíos; JIII o J1g) influye en la vulnerabilidad nutricional y que los juveniles más avanzados de *C. quadricarinatus* serían menos vulnerables a las situaciones de estrés nutricional.

García-Guerrero *et al*. (2003) indicaron que los primeros dos estadios luego de la eclosión (juvenil I y II) presentan un aumento en la tasa de consumo de proteínas, probablemente relacionado con la gran demanda de energía para la diferenciación y crecimiento en estos estadios. Después de agotar las reservas de vitelo, el juvenil III (primer estadio de vida libre) debe alimentarse para mudar al estadio siguiente (Levi *et al*. 1999; Stumpf *et al*. 2010). Esto podría explicar la menor resistencia relativa a la inanición de los juveniles III con respecto a los de 1 gramo.

Los valores del IVN obtenidos para *C. quadricarinatus* en este estudio son similares a los obtenidos para larvas de crustáceos que se desarrollan en áreas con baja productividad (Bas *et al*. 2008; Paschke *et al*. 2004) y menor que varias especies marinas (Anger y Dawirs 1981; Mikami *et al*. 1995; Giménez 2002; Liddy et al. 2003; Gebauer *et al*. 2010).

De acuerdo con Gebauer *et al*. (2010), el desempeño de las larvas refleja no solo su "calidad inicial" sino también las condiciones bajo las cuales éstas se desarrollan. En su trabajo con larvas del cangrejo anomuro *Petrolisthes laevigatus* encontraron diferencias entre la vulnerabilidad nutricional de las larvas (IVN) eclosionadas en diferentes momentos del año (agosto, octubre, noviembre, enero). Esto también fue

observado por Anger y Dawirs (1981) en larvas del cangrejo májido *Hyas araneus* y por Paschke *et al.* (2004) en larvas del camarón *Crangon crangon*. Estos trabajos demostraron que los juveniles eclosionados en el momento del año con mayores fluctuaciones o escasez de plancton tendrían reservas energéticas más importantes o más eficientes permitiéndoles mayor resistencia a la inanición.

Jalihal *et al.* (1993) destacó en camarones carideos de agua dulce la tendencia a aumentar el tamaño de los huevos y mayor resistencia a la inanición, proponiendo un proceso evolutivo gradual de adaptación a los ambientes de agua dulce que denominó "freshwaterization". Patrones similares fueron observados en cangrejos grapsoideos (Anger 1995b). Es posible que en el ambiente de agua dulce al ser más inestable se hayan seleccionado características como la resistencia a la inanición o una menor vulnerabilidad nutricional en los decápodos como es el caso de la especie objeto de esta tesis, *C. quadricarinatus*. Dado que este estudio es el primero realizado en decápodos de desarrollo directo, son necesarios más estudios en modelos biológicos de agua dulce y de desarrollo directo para permitir conclusiones generalizadas en este contexto.

Los juveniles de *C. quadricarinatus*, fueron afectados por los periodos de inanición iniciales en ambos experimentos. Independientemente de la talla de los juveniles, el tiempo desde el comienzo del experimento hasta a la primera ecdisis (tiempo a la muda) se incrementó con el aumento del periodo de inanición. Este patrón también han sido documentado para larvas de varias especies de decápodos, pero en muchos casos el retraso de la ecdisis ha sido más importante que lo observado en *C. quadricarinatus* (Anger y Dawirs 1981; Giménez 2002; Paschke *et al*. 2004; Giménez y

Anger 2005; Bas *et al*. 2008; Gebauer *et al*. 2010) mostrando nuevamente la capacidad de resistencia a la inanición de la especie.

En el experimento de JIII, el retraso de la muda se asoció con una reducción en el incremento de peso al evaluarse al día 30. Sin embargo, estos juveniles se recuperaron durante el periodo siguiente de alimentación y a los 60 días mostraron un crecimiento similar que los que fueron alimentados diariamente (AC).

Esta capacidad de recuperación de los juveniles de *C. quadricarinatus* luego de una fase de restricción de alimento ha sido indicada anteriormente por Stumpf *et al.* (2010, 2011) en ensayos en que los juveniles fueron sometidos a alimentación intermitente. Sin embargo, el presente trabajo demuestra que los juveniles son capaces de compensar periodos de inanición mucho más extensos que los reportados anteriormente.

Un valor de IHS_H elevado observado al final del experimento podría reflejar la reposición de los nutrientes de reserva catalizados en el hepatopáncreas durante la inanición (Jones y Obst 2000). Esto también es sugerido por los cambios histológicos observados incluyendo la hipertrofia de las células B que intervienen en la absorción, digestión y acumulación de nutrientes, (Al-Mohanna y Nott 1986, 1987; Sousa y Petriella 2000) y las vacuolas de mayor tamaño observadas en las células R (responsables de la absorción y reserva de lípidos y glucógeno, Sousa y Petriella 2000). Sin embargo, dada la alta variabilidad observada entre los crustáceos en el patrón de movilización de reservas energéticas durante periodos de inanición (Sánchez Paz *et al*. 2006), es necesaria más información sobre el consumo de los nutrientes en los órganos de reserva para inferir qué características fisiológicas determinan el umbral en el cual los juveniles de *C. quadricarinatus* pierden la capacidad de mudar al estadio siguiente

(PNR). En particular, es necesario cuantificar el consumo de estos nutrientes y la actividad enzimática que los cataliza alrededor de este punto crítico.

En los juveniles avanzados (J1g), los periodos de inanición más extensos, afectaron el crecimiento más allá de la primera muda. Los valores de IP y LT medidos al final del experimento sugieren que el efecto de la inanición no pudo ser compensado completamente durante el periodo siguiente de alimentación. Sin embargo, al final del experimento, los valores de IHS_H y IHS_s, las observaciones histológicas y la mortalidad similar entre tratamientos (con excepción de IC), indicarían una recuperación notable de los juveniles. Considerando los efectos histológicos encontrados en los hepatopáncreas de ambos experimentos y las diferencias encontradas en el crecimiento del experimento 2, **se acepta la hipótesis 2.**

La capacidad de resistir largos periodos de inanición y la de recuperarse en un plazo relativamente corto, demostradas en este capítulo, se suman a otras características de la especie como el rápido crecimiento, la habilidad de generar múltiples desoves anuales y de sobrevivir y reproducirse en condiciones variables desde zonas tropicales hasta templadas (Jones 1995b; Karplus *et al.* 1998). En su conjunto, éstas hacen a la especie interesante desde un enfoque comercial por su importancia para la acuicultura (Cortés Jacinto *et al.* 2004). Pero, por otro lado, las mismas características hacen que esta especie sea potencialmente invasora y por lo tanto, una amenaza desde el punto de vista de la conservación. Crustáceos de agua dulce introducidos en varias partes del mundo que poseen grandes tasas de consumo y rápido crecimiento poblacional, frecuentemente causan un fuerte impacto en la estructura de cadenas tróficas acuáticas (Nystrom 2002). Dado que ya ha se ha reportado a *C. quadricarinatus* como una especie invasora en varios países (Ahyong y Yeo 2007; Jaklič y Vrezec 2011;

Snovsky y Galil 2011;) es necesario tomar las medidas necesaria como control de los criaderos o estudios de impacto ambiental al momento de introducir una especie con estas características.

Capítulo III

Análisis bioquímicos en juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* en la proximidad al Punto de No Retorno: Reservas energéticas y actividad de enzimas digestivas.

Los objetivos particulares del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Calvo NS, Stumpf L, Sacristán HJ, López Greco LS. (2013) Energetic reserves and digestive enzyme activities in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* nearby the point-of-no-return. Aquaculture. 416–417, 85–91

Introducción

El crecimiento de los crustáceos es el resultado de mudas sucesivas (ecdisis), un proceso complejo controlado hormonalmente que demora días o semanas y es acompañado por cambios morfológicos, fisiológicos y comportamentales (Anger 2001). Durante este proceso se evidencian periodos alternados de alimentación y no alimentación.

Cuando hay alimento disponible, los crustáceos pueden acumular reservas energéticas en órganos especiales. En los crustáceos decápodos el músculo y el hepatopáncreas son los principales órganos de reserva y movilización de sustratos. En el músculo se almacenan fundamentalmente glucógeno y proteínas, aunque también existen reservas de lípidos (Tse *et al*. 1983; Longo y Díaz 2011; Pinoni *et al*. 2011). El hepatopáncreas, como se describió en capítulos anteriores, no es solo el sitio más importante de síntesis y secreción de enzimas digestivas, sino también el principal órgano de digestión, absorción y acumulación de nutrientes (lípidos y en menor grado glucógeno), que pueden ser movilizados en periodos sin alimento (Icely y Nott 1992; Ong y Johnston 2006).

La revisión bibliográfica realizada por Sánchez Paz *et al*. (2006) ha demostrado que el patrón de movilización de reservas energéticas, y en particular la secuencia en que éstas son consumidas durante periodos de inanición cortos o largos, es altamente variable entre los crustáceos. De la **Figura 3.1** extraída de la publicación mencionada podría generalizarse que la mayoría de las especies que fueron expuestas a largos

periodos de inanición consumen principalmente lípidos, sin embargo no hay un patrón claro. Esta variabilidad podría ser el resultado de la vasta diversidad de ambientes que habitan los crustáceos y sus historias evolutivas (Sánchez Paz *et al*. 2007).

Bajo condiciones de inanición, la mayoría de los decápodos reducen su tasa metabólica y consumen las reservas de proteínas, glucógeno y lípidos (Vinagre y Da Silva 1992; Oliveira *et al*. 2004; Comoglio *et al*. 2005, 2008). La comprensión de las necesidades metabólicas de los crustáceos, especialmente de aquellos de importancia comercial, permitiría que las futuras investigaciones se centren en temas más complejos. El estudio de los genes implicados en el metabolismo energético y la respuesta de éstos a la inanición podría proporcionar una base para proponer estrategias que mejoren la salud y productividad de los crustáceos cultivados (Sánchez Paz *et al*. 2006).

Crustacean	Preferential energy supply depleted	Starvation period	Reference
Penaeus japonicus	Glycogen	28 days	Cuzon et al., 1980
Penaeus duorarum	Glycogen	—	Schafer, 1968
Crangon crangon	Glycogen		Cuzon and Ceccaldi, 1973
Palaemonetes argentinus	Carbohydrates	15 days	Neves et al., 2004
Stenasellus virei	Glycogen and arginine phosphate Triacylglycerides Proteins and lipids	120 days	Hervant and Renault, 2002
Calanus finmarchicus	Carbohydrates and lipids Protein	First 10 days Next 21 days	Helland et al., 2003
Penaeus esculentus	Proteins and lipids	14 days	Barclay et al., 1983
Jasus edwardsii[a]	Protein	8 days	Johnston et al., 2004
Hemigrapsus nudus	Protein	23 days	Neiland and Scheer, 1953
Jasus edwardsii[b]	Lipid	6–11 days	Ritar et al., 2003
Niphargus virei	Lipids	180 days	Hervant et al., 1999
Niphargus rhenorhodanensis	Lipids	180 days	Hervant et al., 1999

[a]Phyllosoma larval stages I and IV.
[b]Phyllosoma larval stages from hatching to stage VI.

Figura 3.1 Usos preferenciales de reservas energéticas de distintos crustáceos bajo condiciones prolongadas de inanición. Reproducido de Tabla 1 Sánchez Paz *et al*. 2006.

Como se ha demostrado en los capítulos anteriores, *Cherax quadricarinatus* es una especie robusta que posee una alta resistencia a la inanición. En el capítulo II se ha estimado el punto de no retorno (PNR) de los juveniles de esta especie y

particularmente de la **Figura 2.3b** se observa que el 25% de los juveniles de un gramo llega al PNR después de 40 días de inanición (PNR_{25} = 41,2 ± 0,1) y que el 50% de ellos lo hace luego de 50 días de inanición (PNR_{50} = 50,9±1,5 días). Esto hace a la especie un modelo interesante para estudiar el patrón de utilización de las reservas energéticas bajo períodos de restricción de alimento prolongado y su capacidad de recuperación al reanudarse la alimentación.

Objetivo

Caracterizar el uso de las reservas energéticas a través del análisis de la actividad de enzimas digestivas y de la concentración de lípidos, proteínas y glucógeno en el hepatopáncreas y músculo del abdomen, en la proximidad al PNR_{25} y PNR_{50} y después de un periodo de alimentación en juveniles de la langosta *C. quadricarinatus*.

Hipótesis 1: Las concentraciones de lípidos, proteínas y glucógeno en el hepatopáncreas y músculo del abdomen de juveniles de un gramo, después de 40 (PNR_{25}), 50 (PNR_{50}) días de inanición y después de un periodo de alimentación, son distintas a las concentraciones de estas reservas de animales alimentados diariamente.

Hipótesis 2: La actividad de las lipasas, proteasas y amilasas del hepatopáncreas de juveniles de un gramo después de 40 (PNR_{25}), 50 (PNR_{50}) días de inanición y después de un periodo de alimentación es distinta a la actividad de estas enzimas digestivas en animales alimentados diariamente.

Materiales y métodos

Para el desarrollo del objetivo propuesto de este capítulo se realizó un ensayo con juveniles de 1gramo. En éste se expuso a los individuos a un periodo de inanición seguido de un período de alimentación y se evaluaron los efectos a los 40, 50 y 90 días.

Obtención de los juveniles

Los juveniles utilizados para llevar a cabo este objetivo fueron obtenidos bajo las condiciones de laboratorio descriptas en el capítulo I, a partir de un lote de animales reproductores suministrado por el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), Corrientes, Argentina.

Diseño experimental

El experimento consistió en dos protocolos de alimentación basados en los resultados anteriores (capítulo II). Para esto, 240 juveniles (peso medio ± SD: 0,94 ± 0,13 g) provenientes de 4 madres diferentes fueron secados con papel absorbente y pesados con una balanza de 0,1mg de precisión. Luego, fueron asignados al azar a dos grupos (control y tratamiento).

Los juveniles del grupo control fueron alimentados diariamente durante los 90 días del experimento. Los juveniles del grupo tratados no fueron alimentados por 50 días y

luego fueron alimentados diariamente durante 40 días hasta finalizar el experimento. A los juveniles de cada grupo (120) se los asignó a 3 sub-grupos (de 40 cada uno) para ser sacrificados a los 40, 50 y 90 días. El periodo de 40 y 50 días corresponde a los puntos PNR_{25} y PNR_{50} respectivamente (capítulo II y **Figura 3.2**).

Durante el experimento los juveniles fueron mantenidos en recipientes individuales con temperatura y aireación constante como se describió en el capítulo I (**Figura 1.2**). Se recambió el agua tres veces por semana y los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados semanalmente manteniéndose similares a lo registrado para el capítulo I y dentro de los rangos óptimos recomendados (Jones 1997). En los días de alimentación, teniendo en cuenta el protocolo, se ofreció a los juveniles alimento balanceado TETRA® Tetracolor (ver capítulo I) *ad libitum*.

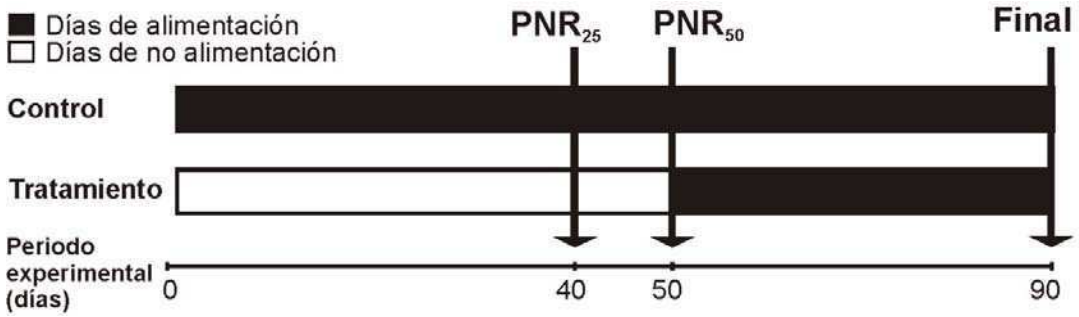


Figura 3.2 Esquema general de los protocolos de alimentación aplicado a juveniles de un gramo de *Cherax quadricarinatus*. Las flechas negras indican los momentos (días) en los que fueron sacrificados los juveniles.

En el día correspondiente (40, 50 o 90) los juveniles sacrificados fueron secados con papel absorbente, pesados y medidos (LT, ver capítulo I). Se cuantificó el crecimiento en términos de incremento de peso porcentual ($IP= 100\times((P_f - P_i)/P_i)$ siendo P_i y P_f los pesos inicial y final respectivamente alcanzados por los juveniles).

El hepatopáncreas y el abdomen fueron removidos y pesados separadamente. Del total de las 40 réplicas previstas para cada tiempo, 3 fueron secadas a 50°C para determinar el peso seco de ambos órganos; 3 fueron fijadas para los análisis histológicos; y el resto de las muestras fueron almacenadas a -80°C para los posteriores análisis bioquímicos.

Se calculó el índice hepatosomático en base al peso húmedo del hepatopáncreas (IHS_H=100*peso húmedo del hepatopáncreas/peso húmedo total del cuerpo), el índice hepatosomático en base al peso seco del hepatopáncreas (IHS_S=100*peso seco del hepatopáncreas/peso húmedo total del cuerpo), índice abdominal en base al peso húmedo del abdomen (IA_H=100*peso húmedo del abdomen/peso húmedo total del cuerpo) e índice abdominal en base al peso seco del abdomen (IA_S=100*peso seco del abdomen/peso húmedo total del cuerpo). Las variables IP, IHS_H y IA_H se calcularon para cada juvenil sacrificado, y IHS_S y IA_S se calcularon para los juveniles sacrificados para ese fin. No pudieron ser calculados para los juveniles tratados a los 50 días debido a que no hubo muestras suficientes.

Análisis Bioquímicos

Se estimó la concentración de lípidos totales y glucógeno en homogenatos de músculo del abdomen y del hepatopáncreas realizados cada uno a partir muestras de 2 o 3 juveniles. La concentración de proteínas totales se estimó en homogenatos de ambos tejidos realizados cada uno a partir de 5 juveniles.

De los mismos homogenatos de hepatopáncreas utilizados para medir la concentración de proteínas se obtuvo el extracto enzimático donde se cuantificó la

actividad lipasa, amilasa y proteasa. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado utilizando métodos espectrofotométricos. Todas las comparaciones fueron realizadas con al menos 3 y hasta 8 réplicas dependiendo de la sobrevida y el peso de los animales.

Los lípidos se extrajeron homogenizando el tejido en una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) según Folch *et al*. (1957). El homogenato se filtró para recuperar la fase líquida. Las muestras se lavaron con una solución de NaCl (0,9⁄) para obtener 2 fases. Luego, la determinación fue realizada usando el método de sulfovanilina que consiste en la digestión de los lípidos con ácido sulfúrico concentrado caliente y posterior adición de una solución de vanilina y ácido fosfórico. La reacción forma un complejo rojo que puede ser medido espectrofotométricamente a 530nm (Frings y Dunn 1970).

El glucógeno de extrajo de los tejidos siguiendo el método descripto por Van Handel (1965) y los niveles de glucógeno se determinaron como glucosa equivalente (método glucosa-oxidasa), posterior a la hidrólisis (HCl) y neutralización (Na_2CO_3) (Geary *et al*. 1981). La glucosa se cuantificó usando el kit comercial para glucemia Wiener-Lab AA® midiéndose espectrofotométricamente a 505nm.

Las proteínas solubles totales se determinaron con el método colorante azul de Coomassie, usando albúmina de suero bobino como el estándar (Bradford 1976) y midiéndose espectrofotométricamente a 595nm. Todas las concentraciones se expresaron en mg/mg de tejido.

Además, se determinó la actividad enzimática de lipasa, amilasa y proteasa del hepatopáncreas. La preparación enzimática consistió en homogeneizar el hepatopáncreas en un buffer Tris HCl (50mM, pH 7,5) en una proporción 1:4 y

centrifugar a 10000Xg por 30min a 4°C (Sacristán *et al*. 2012 en prensa). La capa de lípidos fue removida y el sobrenadante obtenido (extracto enzimático) se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

La actividad lipasa de cada extracto enzimático fue determinada de acuerdo a Versaw *et al*. (1989) con β -naftil caprilato [100mM en dimetil sulfóxido (DMSO)] como sustrato. Para esto se incubó por 30min a 25ºC 100µL de tauracolato de sodio (100mM), 920µL TRIS HCl (50mM, pH 8) y 10µL de extracto enzimático con 10µL de sustrato. Luego, se agregó 10µL de Fast Blue BB (100mM en DMSO) y la mezcla se incubó a la misma temperatura por 5min. Se detuvo la reacción agregando 100µL TCA (12⁄) y se clarificó con 1,35mL de acetato de etilo (1:1 v/v). Los tubos blanco para cada muestra fueron preparados siguiendo el mismo protocolo con la modificación de que el agregado extracto enzimático fue posterior a la solución de TCA.

La actividad lipasa se expresó como U lipasa/mg de prot*min, siendo una unidad lipasa la cantidad de enzima requerida para incrementar 0,01 la absorbancia (540nm) en un minuto (López-López *et al*. 2005).

La actividad amilasa de cada extracto enzimático fue determinada de acuerdo a Vega-Villasante *et al*. (1993) con modificaciones. Para esto se incubó por 10min a temperatura ambiente 500µL de solución amortiguadora Tris HCl (50 mM, pH 7,5), 5µL de extracto de enzima y 500µL de la solución de almidón (1⁄ en Tris HCl, 50 mM, pH 7,5). Luego, se cuantificó la producción de azúcares reductores por la hidrólisis del almidón como se explica a continuación. Inmediatamente después de la incubación se agregó 200µL de carbonato de sodio (2N) y 1,5mL del reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS) y se colocó en baño a 100°C por 15min. Se ajustó el volumen a 7,5mL con agua destilada y se midió en espectrofotómetro a 550nm. Los tubos blanco para cada

muestra fueron preparados siguiendo el mismo protocolo con la modificación de que el extracto enzimático fue agregado posteriormente al de la solución de DNS. La actividad de amilasa se expresó como U amilasa/mg de prot*min, siendo una unidad amilasa la cantidad de enzima requerida para incrementar 0,01 la absorbancia (550nm) en un minuto.

La actividad proteasa de cada extracto enzimático fue determinada de acuerdo a Vega-García-Carreño (1992), con azocaseína (0,5⁄ en Tris HCl (50mM, pH 7,5) como sustrato. Para esto se incubaron por 30min a temperatura ambiente 230µL Tris HCl (50mM, pH 7,5) y 20µL de extracto de enzima con 500ul de sustrato. Luego, se detuvo la reacción agregando 500µL de ácido tricloroacético (TCA 20⁄), se centrifugó por 5min a 10000xg y se midió en espectrofotómetro a 440nm. Los tubos blanco para cada muestra fueron preparados siguiendo el mismo protocolo con la modificación de que el agregado de extracto enzimático fue posterior al de la solución de TCA. La actividad de proteasa se expresó como U proteasa/mg de prot*min, siendo una unidad proteasa la cantidad de enzima requerida para incrementar 0,01 la absorbancia (440nm) en un minuto.

Análisis Histológicos

Los tejidos extraídos de 3 individuos por tratamiento (hepatopáncreas y músculo del abdomen) a los días 40, 50 y 90 se dividieron en 2 sub-muestras que fueron fijadas en solución de Baker y líquido de Bouin. Las sub-muestras fijadas en solución de Baker fueron incluidas en CRIOPLAST®, cortadas con crióstato en secciones de 10µm y coloreadas con la técnica de Sudán IV para detectar la presencia de lípidos. Las sub-

muestras fijadas con líquido de Bouin fueron incluidas en Paraplast, cortadas en secciones de 6µm y coloreadas con el método Ácido Peryódico-Schiff (P.A.S.) para detectar glicocconjugados o la técnica de carmín de Best para detectar glucógeno.

Análisis estadístico

Todas las variables fueron expresadas como media ± DE. Se realizó un análisis de varianza de 1 factor (ANOVA) para comparar todas las variables analizadas entre el control y el tratamiento a cada tiempo (Zar 2010).

Resultados

Los resultados mostraron que el incremento porcentual del peso (IP), el largo total (LT) y los índices hepatosomáticos (IHS_H, IHS_S) y abdominales (IA_H, IA_S) difirieron entre los grupos experimentales (ANOVA; $p<0,05$) durante el periodo de inanición (40 y 50 días) siendo mayores los valores registrados en los juveniles del control.

Al final del periodo experimental (día 90), los juveniles tratados mostraron un incremento en los valores de las variables antes mencionadas y no se encontraron diferencias significativas en IHS_H IA_H y IA_S (ANOVA; $p=0,683$, $p=0,755$, $p=0,389$, respectivamente) a los del control (**Tabla 3.1**).

Análisis bioquímicos

La concentración de lípidos totales fue significativamente menor (ANOVA; $p<0,05$) en el hepatopáncreas y el abdomen de los juveniles tratados a los 40 y 50 días. La misma mostró niveles similares entre los juveniles tratados y control luego de la alimentación (**Figura 3.3a,b**).

La concentración de glucógeno no mostró diferencias en hepatopáncreas ni en abdomen (ANOVA; $p>0,05$) entre los grupos experimentales durante el periodo de inanición (días 40 y 50). Sin embargo, luego de la alimentación (día 90) los valores de glucógeno en el abdomen de los juveniles tratados fueron significativamente superiores (ANOVA; $p=0,001$) a los registrados para el grupo control (**Figura 3.3c,d**).

Tabla 3.1 Mortalidad, incremento de peso (IP), largo total (LT), índice hepatosomático en base húmeda (IHS_H), índice hepatosomático en base seca (IHS_S), índice abdominal en base húmeda (IA_H) e índice abdominal en base seca (IA_S) calculados para juveniles de *Cherax quadricarinatus* del grupo control y tratado a los 40, 50 y 90 días. Sd significa sin determinar por falta de muestras. Los asteriscos (*) simbolizan diferencias significativas (p<0,05) entre el grupo control y el tratado para cada tiempo.

		Control	Tratamiento	
	Días			
Mortalidad (⁄)	40	5	0	
	50	10	15	
	90	30	25	
IP (⁄)	40	50,0 ± 21,7	-1,8 ± 6,7	*
	50	65,5 ± 37,8	3,4 ± 15,3	*
	90	149,8 ± 48,6	98,4 ± 29,7	*
LT (mm)	40	20,0 ± 1,1	17,7 ± 0,8	*
	50	20,5 ± 1,3	12,1 ± 1,0	*
	90	23,1 ± 1,3	15,3 ± 1,4	*
IHS_H(⁄)	40	7,2 ± 1,1	4,2 ± 1,1	*
	50	7,5 ± 1,5	4,2 ± 0,7	*
	90	7,8 ± 1,8	7,9 ± 0,9	
IHS_S(mg/g)	40	20,2 ± 6,7	3,9 ± 1,4	*
	50	22,0 ± 5,8	nd	
	90	35,7 ± 6,4	32,6 ± 6,4	*
IA_H(⁄)	40	29,7 ± 1,7	25,3 ± 7,2	*
	50	29,2 ± 4,0	25,7 ± 6,1	*
	90	29,1 ± 5,4	29,5 ± 1,1	
IA_S(mg/g)	40	661 ± 22,9	258,4 ± 23,7	*
	50	746 ± 79,5	nd	
	90	632 ± 147,6	715,6 ± 56,5	

La concentración de proteínas totales en el hepatopáncreas de los juveniles tratados (**Figura 3.3e**) fue significativamente menor que en los del grupo control a los 40 días (ANOVA; p=0,003), y luego alcanzó valores similares al control a los 50 y 90 días (ANOVA; p=0,088, p=0,327, respectivamente). En el músculo abdominal de los animales tratados los valores de concentración de proteínas fueron significativamente menores a los registrados en el grupo control durante el periodo de inanición (40 y 50

días; ANOVA; p=0,037, p=0,002, respectivamente), y al final del experimento en ambos grupos la concentración de proteínas fue similar (ANOVA; p=0,436; **Figura 3.3f**).

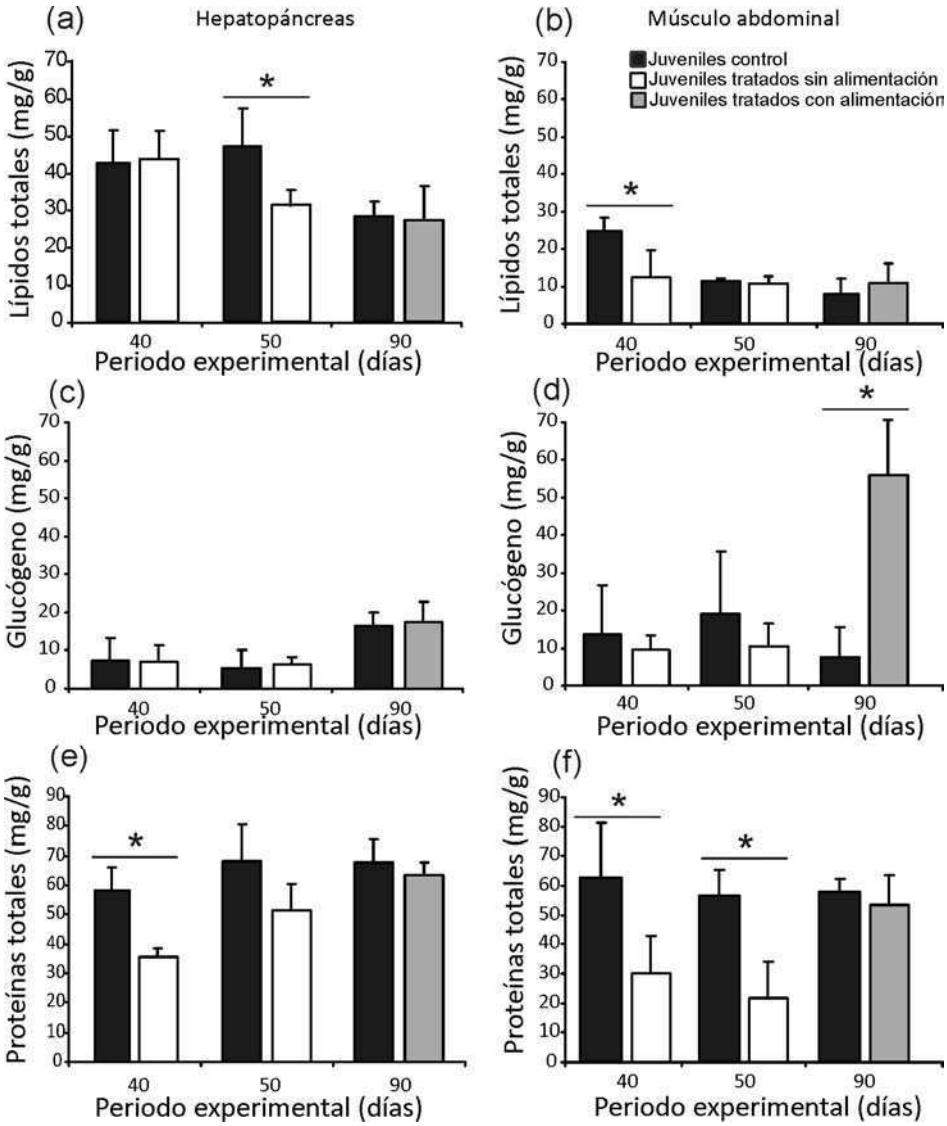


Figura 3.3 Concentraciones de lípidos totales, glucógeno y proteínas totales (media+desvío estándar) medidos en juveniles de *Cherax quadricarinatus* del grupo control y el grupo tratado a los 50, 40 y 90 días (*) Indica diferencias significativas entre grupos (p<0,05) para cada tiempo.

En referencia a las enzimas digestivas la actividad lipasa registrada en los juveniles tratados fue menor que la de los juveniles control durante el periodo de inanición (40 y

50 días; ANOVA, p=0,007, p=0,015, respectivamente), pero fue similar entre los grupos luego del periodo de alimentación (día 90; ANOVA; p=0,929; **Figura 3.4a**).

La actividad proteasa y la actividad amilasa registrada en ambos grupos fue similar (ANOVA; p>0,05) a lo largo del experimento (**Figura 3.4b,c)**.

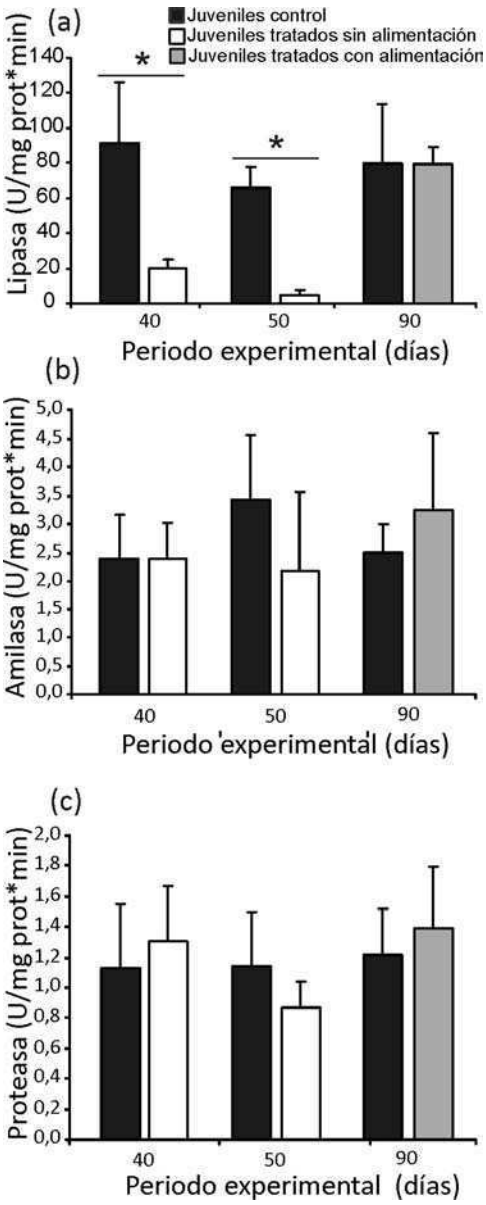


Figura 3.4 Actividad enzimática de lipasas, amilasas y proteasas (media+desvío estándar) medidos en hepatopancreas de juveniles de *Cherax quadricarinatus* del grupo control y el grupo tratado a los 50, 40 y 90 días (*) Indica diferencias significativas entre grupos (p<0,05) para cada tiempo.

Análisis histológicos

Las observaciones histológicas revelaron en el hepatopáncreas diferencias entre los animales del grupo control y los del grupo tratado (**Figura 3.5**). A los 50 días del experimento la coloración P.A.S. mostró pequeñas reservas de glicoconjugados neutros en las células F del hepatopáncreas de los juveniles control (**Figura 3.5c**) que no fueron observadas en los tratados a los 50 ni a los 90 días (**Figura 3.5d,e**).

El músculo, a los 50 días, mostró más depósitos de glicoconjugados en los animales control que en los tratados (**Figura 3.6a,b**). A los 90 días se observó un mayor número de depósitos de glicoconjugados neutros en el músculo de los juveniles tratados que en el del control (**Figura 3.6c,d**). La coloración con Carmín de Best confirmó que los depósitos de glicoconjugados observados en hepatopáncreas y en músculo corresponden a depósitos de glucógeno (**Figura 3.7**).

La coloración con técnica de Sudan IV mostró depósitos de lípidos en las vacuolas de las células R del hepatopáncreas. Estas fueron más grandes en los juveniles control que los tratados tanto a los 50 como a los 90 días (**Figura 3.8**). En el músculo esta técnica no detectó lípidos en los animales control ni en los tratados.

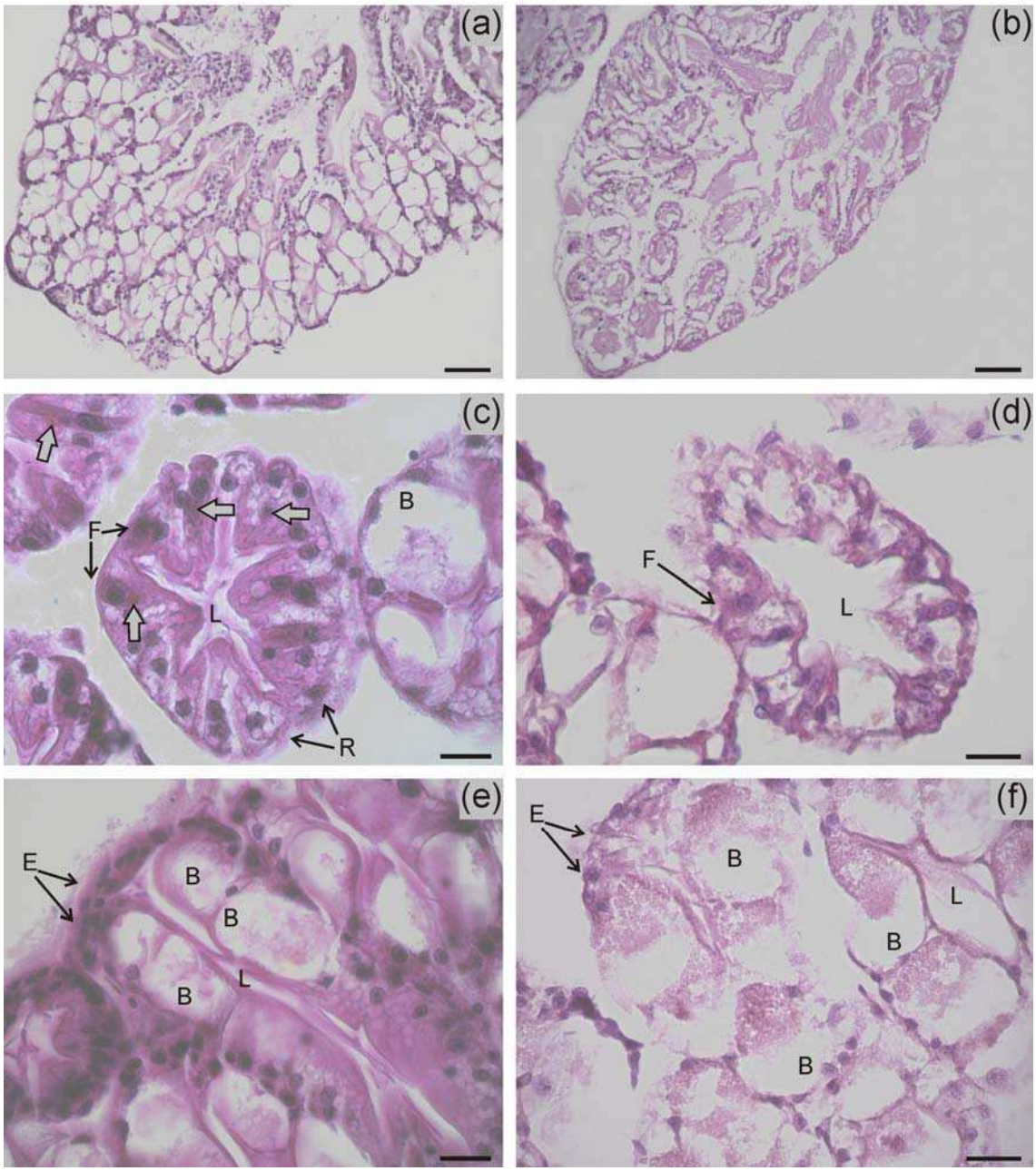


Figura 3.5 Secciones histológicas del hepatopáncreas de juveniles de *Cherax quadricarinatus* de 1g coloreadas con el método Ácido Peryódico-Schiff (P.A.S.); (a), (c), (d) Juveniles control; (b), (d), (e) Juveniles tratados; (a), (b), Vista general a los 50 días del experimento; (c), (d) Detalle de corte transversal de túbulos del hepatopáncreas a los 50 días del experimento; (e), (f) Detalle de corte longitudinal de túbulo de hepatopáncreas a los 90 días del experimento. Barras de escala: (a), (b): 100µm; (c), (d), (e), (f): 20µm; B: Célula B; E: célula; F: célula F; L: Lumen del túbulo; R: célula R; Flecha gris: vacuola con reserva de glicoconjugado neutro.

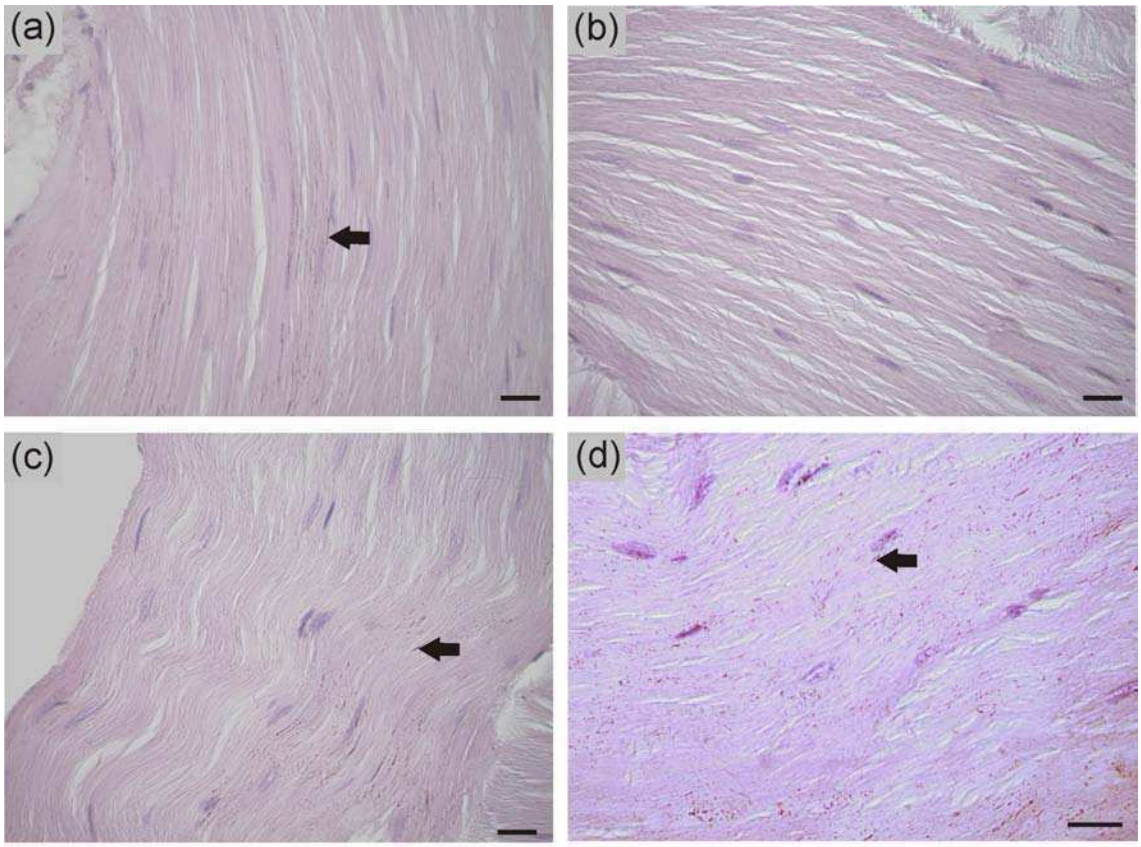


Figura 3.6 Secciones histológicas del músculo abdominal de juveniles de *Cherax quadricarinatus* de 1g coloreadas con el método Ácido Peryódico-Schiff (P.A.S.); (a), (c) Juveniles control; (b), (d) Juveniles tratados; Barras de escala: 20µm. La flecha indica la presencia de glicoconjugados neutros.

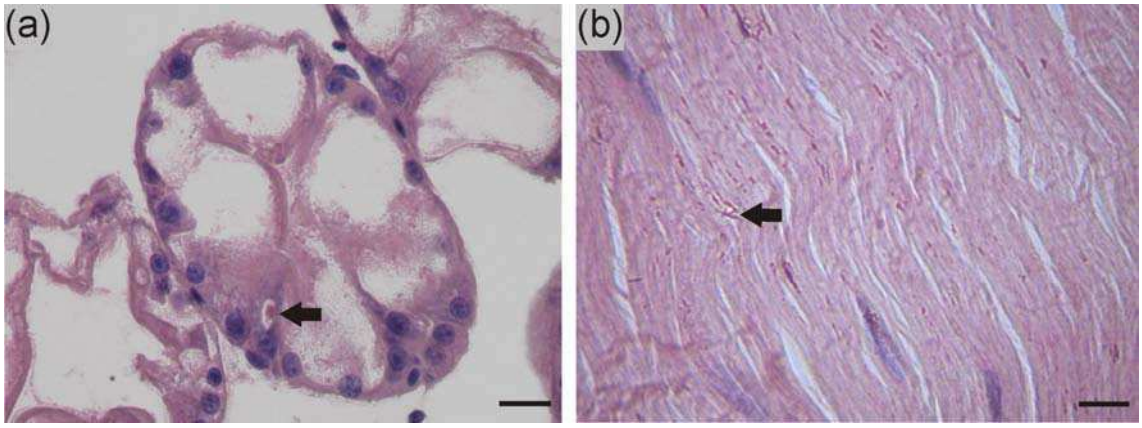


Figura 3.7 Secciones histológicas del (a) hepatopáncreas y de (b) músculo de juveniles de *Cherax quadricarinatus* de 1g coloreadas con Carmín de Best; Barras de escala: (a): 20µm, (a): 10µm. La flecha indica la presencia de depósitos de glucógeno.

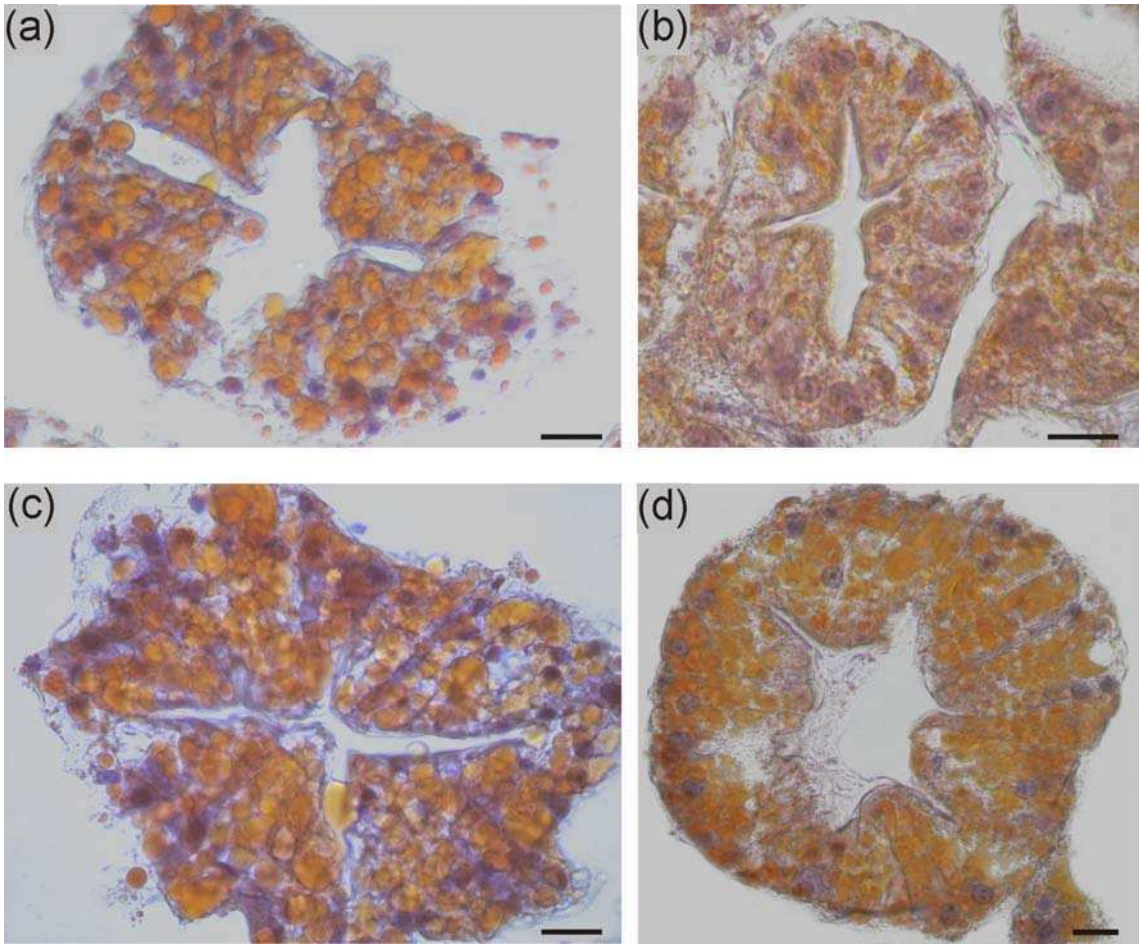


Figura 3.8 Secciones histológicas del hepatopáncreas de juveniles de *Cherax quadricarinatus* de 1g coloreadas con Rojo Escarlata (Sudán IV); (a), (c) Juveniles control; (b), (d) Juveniles tratados; (a), (b), Corte transversal de túbulo de hepatopáncreas a los 50 días del experimento; (c), (d) Corte transversal de túbulo de hepatopáncreas a los 90 días del experimento. Barras de escala: 20µm

Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que las reservas energéticas de los principales órganos de reserva de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* son afectadas de manera diferente por un periodo de inanición largo próximo al PNR_{50} (50 días).

El músculo abdominal fue más afectado en su reserva proteica mientras que el hepatopáncreas, en su reserva lipídica y ambos se recuperaron totalmente después de un periodo de alimentación. Esto podría explicar la alta tolerancia a la inanición de los juveniles demostrada en los capítulos anteriores. Además, los resultados de este capítulo muestran que el crecimiento (evaluado como IP y LT) se detiene durante el periodo de inanición. Incluso la locomoción de los animales tratados se redujo y la cutícula mostraba un aspecto más opaco que la de los animales control. Sin embargo, los juveniles reanudaron su crecimiento y mantuvieron una sobrevida alta cuando se les suministró alimento.

El hecho de que el incremento de peso de los juveniles tratados durante los 40 días de alimentación haya sido mucho mayor que el registrado para los juveniles control durante los primeros 40 días de experimento (98% y 50% , respectivamente), refleja su relativamente alta capacidad de recuperación (ver **Tabla 3.1**). Comoglio *et al*. (2004) y Pascual *et al*. (2006) estudiaron la respuesta fisiológica a la inanición en otras especies de crustáceos (*Lithodes santolla* y *Litopenaeus vannamei* respectivamente) y concluyeron que “guardar” la energía que invertirían en la ecdisis, como la utilizada

para movilizar reservas, para digerir quitina y la exuvia, es una adaptación para tolerar la inanición. De acuerdo con esto, *C. quadricarinatus* podría ahorrar energía de la ecdisis durante la inanición hasta tener disponibilidad de alimento.

Los índices hepatosomático y abdominal en base húmeda (IHS_H e IA_H) del grupo tratado decrecieron durante el periodo de inanición y alcanzaron los valores del control después de un periodo de alimentación. Sin embargo, los índices en base seca (IHS_S e IA_S) mostraron que si bien el abdomen recuperó materia orgánica consumida durante el periodo de inanición, el hepatopáncreas recuperó peso húmedo incrementando su contenido de agua. La absorción de agua como resultado de la utilización de la materia orgánica bajo condiciones de inanición, fue observada anteriormente en otros crustáceos como camarones (*Crangon septemspinosa*) y langostas marinas (*Panulirus longipes*) y de agua dulce (*Cherax destructor*) (Dall 1974; Wilcox y Jeffries 1976; Jones y Obst 2000).

Por otro lado, las concentraciones de las reservas energéticas analizadas fueron afectadas por la inanición y por lo tanto **la hipótesis 1 planteada en este capítulo es aceptada,** sin embargo el efecto fue diferente en relación a cada componente orgánico en particular. Mientras las concentraciones de glucógeno en el hepatopáncreas y en el abdomen de los animales tratados no variaron durante el periodo de inanición, las concentraciones de lípidos y proteínas en ambos órganos fueron menores que las del grupo control. Este patrón de utilización de reservas coincide con lo observado por Barclay *et al*. (1983) en las reservas del hepatopáncreas y del pleon de *Penaeus esculentus* y difiere de los estudiados por Cuzon *et al.* (1980) y Neves *et al.* (2002) en los camarones *Penaeus japonicus* y *Palaemonetes argentinus*.

El nivel de proteínas fue principalmente afectado en el abdomen, que es considerado el órgano más importante de reserva de proteínas en crustáceos (Barclay *et al*. 1983; Dall y Smith 1986). Tomando en cuenta el valor de PNR_{50} estimado en el capítulo II y el consumo de las reservas de proteínas demostrado en el presente capítulo parecería ser que cuando la mitad de los juveniles de *C. quadricarinatus* está cerca del PNR los órganos ricos en proteína, como el músculo abdominal, están siendo degradados.

Anger (1984) ha observado previamente en este punto crítico en larvas de *Hyas araneus* signos de atrofia epidérmica, desintegración de los tejidos y cambios en la superficie muscular. Otros autores propusieron que los crustáceos podrían tener la habilidad de usar proteínas como fuente energética para el crecimiento debido a su alto requerimiento proteico y a su capacidad limitada para reservar lípidos y carbohidratos (Dall y Smith 1986; Rosas *et al*. 2000; Sánchez Paz *et al*. 2006).

En el hepatopáncreas de los juveniles tratados se observó una baja concentración de lípidos con respecto a los juveniles control alrededor del PNR_{50}. Esto concuerda con las observaciones histológicas que permitieron confirmar que las vacuolas con reservas lipídicas coloreadas fueron menos y más pequeñas en los animales tratados. Anger *et al*. (1985) sugirieron que en el PNR_{50} los individuos presentan una pérdida irreversible de la capacidad para recuperar las reservas lipídicas consumidas durante el periodo de inanición. Posteriormente Anger (2001) reconoció tres fases diferentes durante la inanición en crustáceos: una inicial durante la cual las principales reservas movilizadas son los lípidos, siendo ésta la respuesta típica a la privación de alimento a corto plazo. Cuando gran parte de los lípidos accesibles han sido consumidos (privación de alimento de largo plazo), comienzan a utilizarse las proteínas. Una parte significativa de los lípidos están ligados a estructuras celulares cruciales como membranas, y por lo

tanto no están normalmente disponibles para el metabolismo energético. Esta fase en la que predomina el catabolismo de proteínas se refleja en la degradación de estructuras como el músculo y tejido nervioso. En la fase final de inanición, previa a la muerte del animal, los lípidos estructurales son también degradados; en esta condición los animales han pasado su PNR y no se recuperan aunque sean alimentados.

En el presente estudio, luego de 40 días de alimentación posteriores al PNR_{50} las reservas lipídicas y proteicas han sido repuestas totalmente. Esto sugiere que a los 40 y 50 días de alimentación los juveniles de *C. quadricarinatus* se encontrarían aún en la segunda fase del periodo de inanición.

Se ha reportado que la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) incrementa la glucemia como una respuesta adaptativa a situaciones de estrés como la inanición (Chang *et al*. 1999; Chang 2001) y por lo tanto se esperaría una disminución en la reservas de glucógeno. En contraposición, los niveles de glucógeno obtenidos no fueron afectados durante el periodo de inanición. Sin embargo cuando hubo alimento disponible, se disparó una acumulación pronunciada de este nutriente en el músculo abdominal. Ambas determinaciones concuerdan con las observaciones histológicas. Si en el hábitat natural de esta especie el alimento se presenta en una distribución de parches espacial o temporal, una gran reserva de glucógeno permitiría que los juveniles se desplacen en busca de otro parche de alimento. Son necesarios más estudio para poder abordar una conclusión más sólida.

Una respuesta similar fue observada por Mendez y Wieser (1993) en juveniles de *Rutilus rutilus* (Cyprinidae). En esta especie de pez la concentración de glucógeno decreció durante el periodo de falta de alimento e incrementó dramáticamente después de la realimentación sobrepasando los niveles de glucógeno de los peces

alimentados en forma continua. Esta estrategia fue propuesta como una forma de acumulación rápida de energía, la cual sería utilizada posteriormente para la recomposición de reservas y crecimiento somático de los individuos.

El análisis de las enzimas digestivas mostró que solo la actividad lipasa medida disminuyó significativamente y por lo tanto **la hipótesis 2 planteada en este capítulo es aceptada parcialmente.**

En general una disminución en las reservas energéticas está asociada con un incremento en la actividad enzimática, es decir que la alta actividad proteasa indicaría catabolismo de proteínas, la alta actividad lipasa la utilización de reservas lipídicas y la alta actividad amilasa la movilización de carbohidratos (Kamarudin *et al*. 1994; Rodríguez *et al*. 1994; Johnston 2003; Zhang *et al*. 2010). Sin embargo, en el presente estudio ambas, las reservas lipídicas y la actividad lipasa, disminuyeron después del periodo de inanición. Esta respuesta fue registrada anteriormente para dos especies de camarones del género *Penaeus* (Cuzon *et al*. 1980; Muhlia-Almazán y García-Carreño 2002). Además, Yudkovski *et al*. (2007) sugieren que la lipasa es secretada solo para la función digestiva debido a que encontró que en *C. quadricarinatus* los transcriptos de la enzima digestiva decrecen durante los estadios en que no se alimentan.

Rivera-Pérez y García-Carreño (2011) distinguieron en el camarón *Penaeus vannamei* dos tipos de lipasas con ocurrencia alternante. Los autores observaron que durante el periodo de inanición los transcriptos de la lipasa digestiva decrecen mientras que los transcriptos de la lipasa intracelular aumentan, sugiriendo que la lipasa intracelular es la responsable del catabolismo de las reservas lipídicas. Basados en estos estudios previos se propone que la actividad lipasa que se ha medido en este trabajo

correspondería a la lipasa digestiva que no es sintetizada cuando no hay alimento disponible y por lo tanto no es la responsable del catabolismo de las reservas.

Aunque la inanición no ha causado efectos en la actividad proteasa ni en la amilasa de los juveniles de *C. quadricarinatus,* ambas tendieron a disminuir alrededor del punto de no retorno (PNR_{50}, día 50) y a aumentar luego del periodo de alimentación (día 90).

La actividad amilasa medida en este estudio fue diferente a la reportada por Zhang *et al*. (2010) y Comoglio *et al*. (2004) quienes informaron una asociación entre el aumento de esta actividad enzimática y la falta de alimento. Por el contrario, la actividad proteasa en el presente estudio mostró un patrón similar a lo observado por Zhang *et al*. (2010). Es importante ser prudentes al comparar los resultados de este capítulo ya que los dos estudios antes mencionados han sido realizados en camarones marinos y no hay información disponible sobre mediciones de la actividad enzimática durante periodos de inanición en otra especie de agua dulce.

En este contexto, este capítulo provee información biológica nueva y relevante sobre las respuestas fisiológicas y bioquímicas de los crustáceos en la proximidad del PNR_{25} y PNR_{50}. Esta información refuerza el concepto de la importante resistencia a la inanición de *C. quadricarinatus* y contribuye a entender el uso de las reservas energéticas y actividad enzimática digestiva en una especie de importancia para la acuicultura mundial.

Capítulo IV

Disposición espacial y superficie de refugios

en el cultivo de juveniles de *Cherax quadricarinatus*

Los objetivos particulares del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Calvo NS, Tomas AL, López Greco L.S. 2012. Influencia de la disposición espacial y la superficie de refugios sobre la sobrevida y el crecimiento de juveniles de la langosta *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae) y su aplicación al cultivo intensivo. Lat. Am. J. Aquat. Res. 41(1), 732-738

Introducción

El encuentro agresivo entre animales de la misma especie se ha denominado comportamiento agonístico con el fin de diferenciar estas interacciones sociales de la agresión en la relación depredador-presa y otras interacciones no sociales. Las interacciones agonísticas se producen cuando los individuos compiten por los recursos, tales como alimento, pareja, hábitat ó refugio. El principal resultado de las interacciones agonísticas es el establecimiento de una relación de dominancia que puede alterar el acceso a los recursos (Moore 2007). Las langostas de agua dulce han sido observadas luchando por sus refugios (Moore 2007) y Hobbs (1991) incluso sugiere que la disponibilidad de refugios es el principal recurso "cuello de botella" en las poblaciones de langostas de agua dulce.

Cherax quadricarinatus, como se ha indicado en capítulos anteriores, posee numerosas características ventajosas para la acuicultura. Entre otras, se destaca que posee tecnologías de producción sencillas, que es una especie gregaria, no agresiva, no cavadora y tolerante a densidades de cultivo relativamente altas (Masser y Rouse 1997; Saoud *et al*. 2013). Sin embargo, es una especie que presenta cierto grado de canibalismo (Jones y Ruscoe 2000).

En condiciones de cultivo con alta densidad y sin limitantes de alimentación, se ha demostrado que la interacción social lleva a una disminución significativa de la sobrevida (Karplus y Barki 2004; Barki *et al*. 2006) y que puede inhibirse el crecimiento hasta en un 50⁄ (Karplus *et al*. 2004). Dado que *C. quadricarinatus* es una especie

bentónica de crecimiento rápido cuyos juveniles mudan frecuentemente y de modo asincrónico, su sobrevida no supera el 50% cuando el tamaño de siembra es menor a 1g en estanques externos (Mills y McCloud 1983; Jones 1995b; Parnes y Sagi 2002).

Para varias especies de decápodos de cultivo, entre ellas algunas langostas de agua dulce, se ha reportado que la presencia de refugios aumenta la supervivencia y el crecimiento (Mason 1978; Mills 1989; Du Boulay *et al*. 1993; Geddes *et al*. 1993; Karplus *et al*. 1995; Steele *et al*. 1997). Jones y Ruscoe (2001) demostraron que incrementando la complejidad del hábitat mediante la provisión de refugios se obtuvieron mejoras en la supervivencia y producción de individuos pre-adultos de *C. quadricarinatus.* Por lo tanto en la etapa de pre-engorde (juveniles de 1 a 10 g), el mejoramiento de los refugios sería una de las estrategias propuestas para obtener mayor crecimiento y minimizar el canibalismo entre los juveniles, ya que los protege en el momento de la ecdisis cuando son más vulnerables (Jones 1995b; Jones y Ruscoe 2001; Molony y Bird 2005; Wicki *et al*. 2008).

La selección de refugios adecuados que minimicen las interacciones agonísticas es de gran importancia en la fase de pre engorde del cultivo comercial de *C. quadricarinatus* ya que en esta fase las densidades de cultivo son altas (Naranjo-Páramo *et al*. 2004) y los juveniles mudan con frecuencia. Sin embargo, la provisión de un hábitat complejo para los animales cultivables será factible siempre que sea relativamente fácil de implementar y reducida en costos. Algunos productores de langostas han manifestado que los refugios pueden complicar innecesariamente la cosecha aumentando los costos operacionales (Fielder y Thorne 1990).

Al comparar distintos tipos de refugio, Viau (2010), observó que el tiempo consumido durante la limpieza de los acuarios y la cosecha de los juveniles de los hábitat más

complejos fue mucho mayor que el tiempo que demandaron hábitat más simples. En consecuencia, buscando optimizar el rendimiento del cultivo, es prioritario el mejoramiento de refugios económicos para no incrementar los costos de producción y que no compliquen la cosecha desde el punto de vista operativo.

Jones y Ruscoe (2001) compararon la mortalidad y productividad de juveniles de *C. quadricarinatus* (peso promedio 12,76g) en estanques (densidad de 12,5 juveniles/m^2) con distintos tipos de refugios: neumáticos, planchas prefabricadas de cemento simples o combinadas con tubos de PVC, tubos de PVC y grupos de redes. Todos los tipos de refugios mostraron un incremento en la producción de los animales y particularmente el último produjo un impacto positivo en la supervivencia.

La red de tipo "cebollera" junto con tubos de PVC son los tipos de refugios usualmente utilizado en juveniles de *C. quadricarinatus* desde los trabajos pioneros desarrollados en la especie (Jones 1995b; Masser y Rouse 1997). Estas redes se unen entre sí semejando plantas acuáticas y ocupando la columna de agua. En esta superficie, en estanques externos, se desarrolla y crece el biofilm que los juveniles utilizan como alimento (FAO 2010; Viau *et al*. 2012). Las redes también proporcionan una mayor superficie optimizando el espacio y protegiendo a los juveniles de otros de mayor tamaño. Sin embargo no existe información sobre la disposición u ordenamiento ni de la cantidad de red necesaria que se debe utilizar en la fase de pre-engorde de esta especie.

Objetivo

Proponer un hábitat más complejo que permita disminuir la mortalidad y mejorar el crecimiento en la fase de pre-engorde de *Cherax quadricarinatus* en condiciones de alta densidad a través de distintos diseños de disposición espacial y superficie de red cebollera.

Hipótesis 1: La disposición ordenada de la red cebollera, en forma horizontal o vertical, en comparación con su disposición al azar permite disminuir la mortalidad y mejorar el crecimiento de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* en la fase de pre-engorde en condiciones de alta densidad.

Hipótesis 2: A mayor densidad de red cebollera, los juveniles de *Cherax quadricarinatus* presentan menor mortalidad y mayor crecimiento en la fase de pre-engorde bajo condiciones de alta densidad.

Materiales y métodos

Para cumplir con los objetivos propuestos para este capítulo se realizaron 2 ensayos: el primero donde se puso a prueba la disposición espacial y el segundo donde se evaluó la superficie de red cebollera en cultivo con alta densidad (41,7 juveniles/m^2) de juveniles de *C. quadricarinatus*

Obtención de los juveniles

Los juveniles utilizados para llevar a cabo este objetivo fueron obtenidos bajo las condiciones de laboratorio descriptas en el capítulo I. El lote reproductor utilizado para el primer experimento fue suministrado por la granja Las Golondrinas de Entre Ríos, y el utilizado para el segundo, por el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC) de Corrientes, Argentina.

Diseño experimental

En ambos ensayos, cada unidad experimental consistió en un acuario de 60x40x30cm, conteniendo 48L de agua declorada, 6 refugios cilíndricos de PVC de 5cm de largo y 2cm de diámetro, y 10 juveniles. Los acuarios fueron mantenidos con aireación y temperatura constante (27±1ºC), y los juveniles alimentados diariamente con *Elodea sp.* y alimento balanceado *ad libitum* (Tetracolor, TETRA®) durante 60 días. Se

recambió el 50⁄ del volumen de agua las semanas impares (7, 21, 35 y 49días) y totalmente en las semanas pares (14, 28, 42 y 60días). Cada 14 días se registró el número y peso de los juveniles, y se calculó la mortalidad y biomasa (peso de todos los juveniles del acuario (g)/ volumen de agua (m^3)).

Experimento 1

Se seleccionaron 120 juveniles de 0,95±0,15 g (media±DE) que fueron distribuidos al azar en 12 acuarios cada uno de ellos conteniendo 0,612m^2 de red cebollera (mallas de alta densidad Netting®) con un tamaño de poro de 11mm.

Se pusieron a prueba 3 diseños ensayados por cuadruplicado que se describen a continuación.

- ✓ **Disposición vertical**: 6 paños de 60x17cm sostenidos en forma vertical por ventosas (**Figura 4.1a**).
- ✓ **Disposición horizontal**: 3 paños de 60x34cm sostenidos en planos horizontales por ventosas (**Figura 4.1b**).
- ✓ **Disposición Azar**: 3 paños de 60x34cm colocados en forma aleatoria (**Figura 4.1c**).

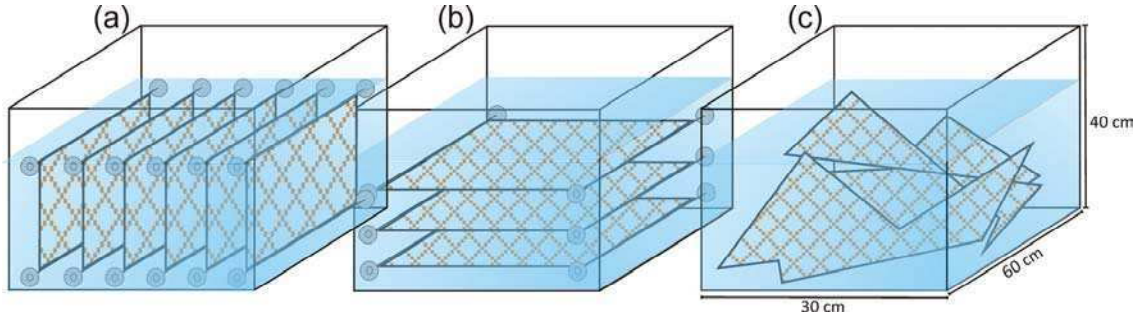


Figura 4.1 Esquema de las disposiciones de redes cebolleras ensayadas con juveniles de un gramo de *Cherax quadricarinatus* en el Experimento 1: diseño vertical (a), horizontal (b) y al azar (c).

Experimento 2

Se seleccionaron 120 juveniles de 0,93±0,13g (media±DE) que fueron distribuidos al azar en 12 acuarios conteniendo distintas superficies de red cebollera con un tamaño de poro de 1cm.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento anterior se pusieron a prueba 3 superficies de red colocadas al azar por cuadruplicado que se describen a continuación.

- ✓ **Densidad baja de redes:** 3 paños de 60x34cm (0,612m^2)
- ✓ **Densidad media de redes:** 6 paños de 60x34cm (1,224m^2)
- ✓ **Densidad alta de redes:** 9 paños de 60x34cm (1,836m^2)

Se comparó la mortalidad, el peso promedio de los juveniles y la biomasa por acuario (gramos de langosta/metros^2 de superficie) entre tratamientos en ambos experimentos. Además, para estimar las interacciones agonísticas entre los juveniles, al finalizar el segundo experimento (60 días) se contabilizó la cantidad de quelas

faltantes y la cantidad de juveniles con todos los apéndices (animales intactos) por acuario.

Análisis estadístico

Todas las variables fueron expresadas como media ± DE. La mortalidad, biomasa, número de juveniles sin lesiones por acuario y quelas faltantes por acuario en cada caso fueron evaluadas estadísticamente a los 60 días mediante ANOVA de 1 factor seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples (Zar 2010).

Resultados

Experimento 1

En el experimento 1, la mortalidad promedio registrada en el tratamiento con disposición al azar de redes tendió a ser menor a lo largo de todo el experimento (**Figura 4.2**) siendo significativamente menor a los 60 días (ANOVA; p=0,027).

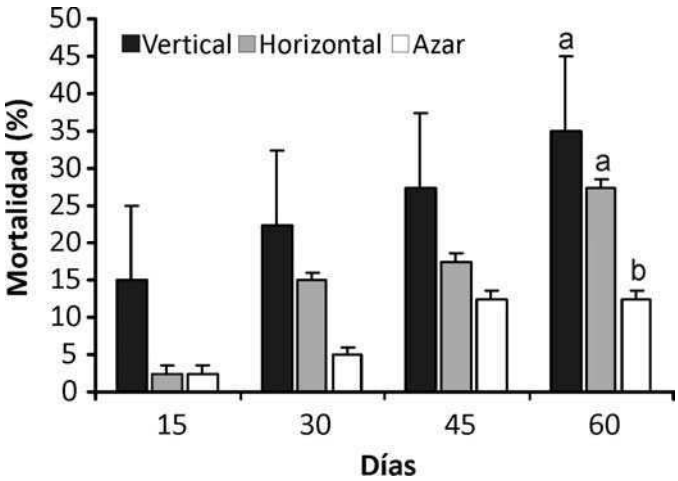


Figura 4.2. Mortalidad acumulada (media+DE) de juveniles de *Cherax quadricarinatus* mantenidos en acuarios con disposición vertical, horizontal y al azar de la red cebollera, a lo largo del periodo experimental (días).

La biomasa de este tratamiento también tendió a ser mayor a lo largo del experimento (**Figura 4.3**), sin embargo a los 60 días no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA; p=0,376). El peso promedio de los juveniles a los 60días fue de 6,52±0,55g para la distribución vertical, 5,93±0,26g para la distribución horizontal y 5,52±0,90g para la distribución al azar.

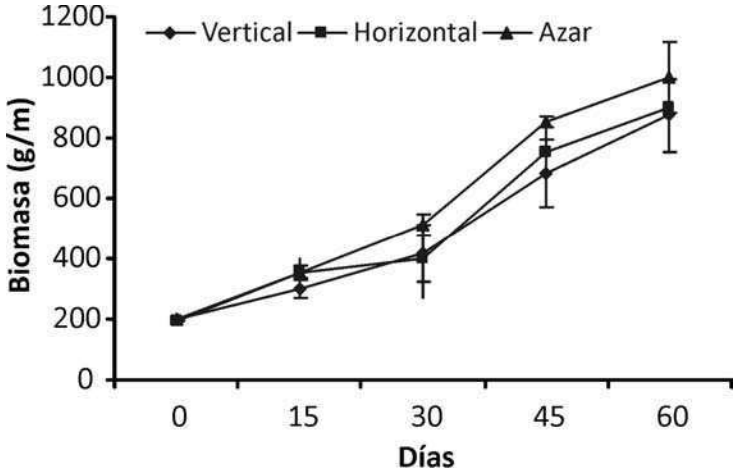


Figura 4.3. Biomasa (media±DE) de juveniles de *Cherax quadricarinatus* mantenidos en acuarios con disposición vertical, horizontal y al azar de la red cebollera, a lo largo del periodo experimental (días).

Experimento 2

La mortalidad promedio registrada en el tratamiento con baja densidad de redes tendió a ser menor a lo largo de todo el experimento (**Figura 4.4**) y a los 60días fue significativamente menor que el tratamiento con densidad alta (ANOVA; p=0,0367). La biomasa aumentó en forma similar entre tratamientos (**Figura 4.5**) y a los 60 días no se encontraron diferencias significativas (ANOVA; p=0,248).

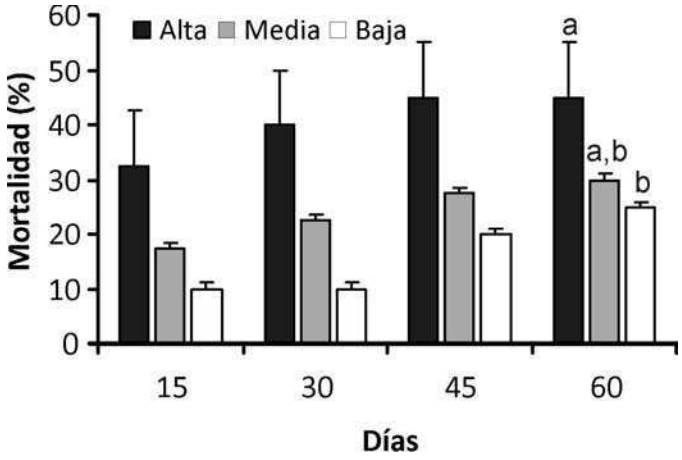


Figura 4.5. Mortalidad acumulada (media+DE) de juveniles de *Cherax quadricarinatus* mantenidos en acuarios con superficie alta, media y baja de la red cebollera, a lo largo del periodo experimental (días).

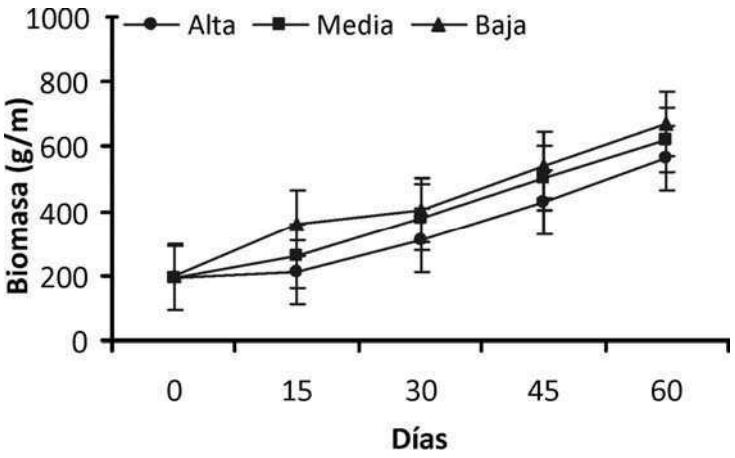


Figura 4.3. Biomasa (media±DE) de juveniles de *Cherax quadricarinatus* mantenidos en acuarios con superficie alta, media y baja de la red cebollera, a lo largo del periodo experimental (días).

El peso promedio de los juveniles a los 60 días fue de 4,93±0,38g para el tratamiento de densidad alta, 4,29±0,41g para el de densidad media y 4,28±0,41g para el de densidad baja (Tabla 4.1). No se encontraron diferencias en el porcentaje de juveniles p=0,855 respectivamente).

Tabla 4.1 Porcentaje de juveniles intactos de *Cherax quadricarinatus* y quelas faltantes (promedio ± DE) a los 60 días en acuarios con alta, media y baja densidad de red cebollera.

Densidad de redes	Peso de los juvenil (g)	Densidad (g/m^2)	Juveniles sin lesiones (✓)	Quelas faltantes (✓)
Alta	4,93 ± 0,38	31,71 ± 5,27	72,65 ± 22,66	14,29 ± 17,65
Media	4,29 ± 0,41	45,93 ± 5,33	61,81 ± 8,20	13,54 ± 10,42
Baja	4,28 ± 0,41	72,30 ± 8,90	60,06 ± 5,23	18,08 ± 5,07

Discusión

Los resultados indican que el ordenamiento espacial vertical u horizontal de la red cebollera no mejoran el crecimiento ni disminuyen la mortalidad de los juveniles de *C. quadricarinatus* durante la fase de pre-engorde, por lo tanto se **rechaza la hipótesis 1**. Si bien la producción fue similar entre tratamientos en términos de biomasa, la sobrevida fue superior con la disposición de redes al azar. Debido a que es recomendable la obtención de un mayor número de juveniles para la siembra en los estanques de engorde (Wicki *et al*. 2008) se sugiere la disposición a azar para el cultivo de juveniles de *C. quadricarinatus*. Además esta disposición es más económica en términos de costos de manejo (bajo costo de instalación), sencilla de colocar y facilita la cosecha de los animales.

Por otro lado, en el segundo ensayo se demuestra que si bien los refugios en cultivo maximizan la sobrevida y el crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus*, el exceso de red puede ser contraproducente. El desarrollo de los juveniles se ve afectado por los refugios impidiendo que éstos accedan fácilmente al alimento (observaciones de laboratorio) además de incrementar los costos de producción. De este modo **la hipótesis 2 es rechazada**, ya que a mayor densidad de red cebollera los juveniles de *C. quadricarinatus* presentan mayor mortalidad en la fase de pre-engorde en condiciones de alta densidad.

En este trabajo no hubo colonización de biofilm ya que los experimentos fueron realizados en condiciones controladas de laboratorio con recambio de agua y sin

exposición a la luz solar. Sin embargo el exceso de red también podría ser una desventaja para el cultivo a cielo abierto ya que impediría el paso de luz (Parnes y Sagi 2002) evitando que las comunidades de micro-organismos (biofilm) la colonicen, mejoren la calidad de agua y constituyan una fuente adicional de alimento para los juveniles (Viau *et al*. 2012).

El número de quelas faltantes y el de juveniles intactos fue similar entre tratamientos sugiriendo que la agresión entre juveniles no se vio afectada por la cantidad de refugios. *C. quadricarinatus* es considerada una especie relativamente no agresiva, sin embargo se ha observado una interacción negativa entre el aumento de la densidad y la mortalidad o el crecimiento (Jones 1997; Naranjo-Páramo *et al*. 2004). Se especula sobre algunos factores comportamentales que explicarían la disminución del crecimiento como el aumento del gasto energético (estrés) o interrupción en la alimentación (Jones y Ruscoe 2000). Esto explicaría por que a pesar de observarse diferencias en la mortalidad entre los tratamientos en ambos experimentos la biomasa final fue similar.

Por cada m^2 de fondo con la inclusión de los tubos de PVC (normalmente utilizados en estanques), 2,55 m^2 de red cebollera colocada en forma aleatoria sería suficiente como refugio para una densidad alta de juveniles (41,7 juveniles/m^2).

La mortalidad media observada en el tratamiento con estas condiciones (disposición al azar y densidad baja) fue de 12% para experimento 1 y de 25% para el experimento 2. Ésta fue similar a la observada por Viau y Rodríguez (2010) para juveniles de igual talla y mucho menor que la registrada por otros autores para la fase de pre-engorde y con alta densidad de cultivo (Jones 1995a,b; Karplus *et al*. 1995; Sagi *et al*. 1997; Manor *et al*. 2002, Naranjo-Páramo *et al*. 2004).

La necesidad de incrementar la producción implica, entre otros factores, el aumento de la densidad de cultivo en los estanques. Sin embargo, una mayor cantidad de organismos conduce al canibalismo y/o la disminución del crecimiento (Jones y Ruscoe 2000; Barki *et al*. 2006). Normalmente en los estanques se utilizan refugios de PVC para disminuir la probabilidad de encuentro entre los animales. Villarreal y Peláez (1999) mencionan que los juveniles viven exclusivamente en los refugios formados por las mallas plásticas durante los primeros 60 días. Futuros trabajos podrían determinar si en las condiciones del presente trabajo es prescindible la colocación de tubos de PVC que se utilizan como rutina en el cultivo de la especie. Entre tanto se recomienda agregar a los tanques de pre-engorde la red cebollera como refugio para juveniles ya que amplía la superficie del sustrato. Además, la red se distribuye por todo el volumen del tanque permitiendo la utilización completa de la columna de agua (Parnes y Sagi 2002).

Con el propósito de disminuir la mortalidad y mejorar el crecimiento en la fase de pre engorde en condiciones de alta densidad, este estudio determinó que el ordenamiento al azar de la red es la disposición más adecuada y económica para los juveniles de *C. quadricarinatus*, sin embargo el exceso de la misma podría perjudicar la sobrevida. Aún quedan por evaluar otros posibles factores como el tamaño de poro, materiales-texturas de la red o la combinación entre redes y disposiciones espaciales de tubos de PVC.

Discusión General

Este proyecto de investigación se propuso generar información y proponer herramientas para disminuir la mortalidad en las fases juveniles (*hatchery* y pre-engorde). Dado que en estas fases los juveniles pueden alcanzar altas mortalidades (Jones 1995a, Masser y Rouse 1997) el mejoramiento de las prácticas habituales de su cultivo es prioritario para obtener mayor número de semilla para los estanques de engorde.

En este contexto la presente tesis abarcó dos temas principales: el primero se refirió al estudio de la vulnerabilidad nutricional de los juveniles de 20mg (inicio del estadio de harchery) y de 1g (inicio del estadio de pre-engorde) información que puede ser utilizada para diseñar nuevos protocolos de suministro de alimento. El segundo se basó en el mejoramiento del sistema de refugios de cultivo en particular de la "red cebollera" en cuanto a su superficie y forma de colocación en los tanques a fin de reducir el canibalismo en la etapa de pre-engorde.

Para el estudio de la vulnerabilidad nutricional se determinó el punto-de-saturación-de-reserva y el punto-de-no-retorno. De los resultados obtenidos se desprende la gran capacidad de esta especie de tolerar largos periodos sin alimentación y de recuperar sus reservas nutricionales luego de un periodo relativamente corto de alimentación.

Los juveniles de *Cherax quadricarinatus* no son capaces de mudar sin alimentarse, sin embargo, de acuerdo con los resultados del capítulo I, los JIII y J1g necesitan sólo 2 y 9 días de alimentación inicial, respectivamente, para acumular las reservas necesarias para mudar al estadio siguiente (valores de PSR_{50} estimados en el capítulo I).

Además se demostró que una restricción de alimento similar al PSR_{50} en JIII podría ser utilizada como herramienta para evaluar la calidad de las progenies y para reducir costos de mantenimiento de juveniles de baja calidad ya que los JIII sometidos a este

protocolo de alimentación presentan aproximadamente la mortalidad que ocurriría en estadios siguientes (capítulo I).

Asimismo, el tiempo sin alimento que lleva a la muerte a los juveniles sin poder mudar al estadio siguiente (valores de PNR_{50} estimados en el capítulo II) es de los más altos reportados para especies de decápodos (Giménez 2002; Paschke *et al*. 2004; Bas *et al*. 2008; Gebauer *et al*. 2010).

Estos conocimientos adquiridos (valores de PSR_{50} y PNR_{50}) podrían ser utilizados para definir nuevos protocolos de manejo del cultivo en los que no se alimente diariamente. En la fase de hatchery, en la cual se alimenta diariamente con alimento balanceado de alto contenido proteico y el recambio de agua es continuo, la reducción de alimento suministrado a los juveniles permitiría disminuir significativamente la descarga de nutrientes. Esto reduciría el impacto ambiental del cultivo y bajaría de modo directo los costos operativos dentro de los cuales el alimento puede representar de un 50% a un 70% (Cortés-Jacinto *et al*. 2005; Thompson *et al*. 2005).

Una potencial estrategia para reducir el alimento ofrecido a los tanques es la alimentación intermitente (días de alimentación y días de no alimentación) que fue ampliamente estudiada en peces de interés comercial (Kindschi 1988; Turano 2007) y recientemente está siendo evaluado en crustáceos decápodos (Wu y Dong 2002; Mazlum *et al*. 2011), particularmente en *C. quadricarinatus* (Stumpf *et al*. 2010, 2011, 2012 y 2013).

El valor del índice de vulnerabilidad nutricional ($IVN=PSR_{50}/PNR_{50}$) obtenido en el capítulo II para *C. quadricarinatus* es similar a los obtenidos para larvas de crustáceos que se desarrollan en áreas con baja productividad (Bas *et al*. 2008; Paschke *et al*. 2004) y menor a los de varias especies marinas (Anger y Dawirs 1981; Mikami *et al*.

1995; Giménez 2002; Liddy *et al*. 2003; Gebauer *et al*. 2010). Es posible que en el ambiente de agua dulce, al ser más inestable, se hayan seleccionado características como la resistencia a la inanición (Anger 1995b) o una menor vulnerabilidad nutricional en esta especie. Debido a que este estudio representa la primera referencia de estos puntos críticos en juveniles de crustáceos decápodos de desarrollo directo y agua dulce, son necesarios más estudios para permitir conclusiones generalizadas sobre este aspecto. Aún así, se propone la utilización del IVN definido por Gebauer *et al*. (2010) como una herramienta de evaluación de robustez de una especie para seleccionar cultivos de alta resistencia, o del potencial impacto de una especie introducida (capítulo II).

La baja vulnerabilidad nutricional de la especie se podría explicar por su capacidad de "administrar sus recursos" mediante cambios comportamentales, morfológicos y fisiológicos. Bajo condiciones de inanición los juveniles de *C. quadricarinatus* detienen el crecimiento (redestinando la energía de la ecdisis), disminuyen la locomoción, cambian el aspecto de la cutícula y consumen las reservas de proteínas y lípidos almacenadas en el hepatopáncreas y músculo abdominal.

Del mismo modo, cuando el alimento está disponible los juveniles hambreados muestran gran capacidad de recuperación, reanudando su crecimiento rápidamente, completando sus reservas (hepatopáncreas y músculo) y generando nuevas reservas de glucógeno en el músculo abdominal (capítulo III).

No se observó actividad enzimática asociada a la movilización de reservas y solo la actividad lipasa (digestiva) se mostró afectada por la inanición. Sin embargo, queda pendiente el estudio de los genes implicados en el metabolismo energético y la respuesta de éstos a la inanición, lo que podría proporcionar una base para estrategias

que mejoren la salud y productividad de los crustáceos cultivados (Sánchez Paz *et al*. 2006).

Por otro lado, se han demostrado las falencias del IHS en base húmeda y la importancia de calcular el IHS en base seca para detectar efectos de la inanición (capítulo II). Además, se han descripto las alteraciones histológicas producidas por la restricción de alimento en el hepatopáncreas de *C. quadricarinatus* (capítulo I). De esta manera, se ha aportado información útil para detectar posibles efectos producidos por el estrés nutricional de las langostas siendo ésta una herramienta adecuada para monitorear la salud del cultivo.

En cuanto al segundo aspecto abordado en esta tesis, el mejoramiento de refugios de cultivo de la fase de pre-engorde, se demostró que 2,55 m^2 de red cebollera colocada en forma aleatoria por m^2 de tanque (con la inclusión de los tubos de PVC) sería suficiente como refugio para una densidad de 41,7 juveniles/m^2. Bajo estas condiciones, la sobrevida observada se mantuvo entre el 75 y el 78% , siendo muy superior que la registrada por otros autores para la fase de pre-engorde o con alta densidad de cultivo (Jones 1995a; Karplus *et al*. 1995; Sagi *et al*. 1997; Manor *et al*. 2002).

Es importante destacar que los resultados obtenidos en todos los experimentos de la presente tesis son relativos a las condiciones experimentales aplicadas en el laboratorio. Las mismas no son iguales a las condiciones de un criadero y por tanto son necesarios ajustes para hacer extensible estos resultados a la producción a mediana y gran escala.

En nuestro país, desde el Estado Nacional, se promueve el desarrollo de tecnologías para el cultivo de especies autóctonas y exóticas existentes. De esta manera, es

necesario considerar aquellas metodologías que reduzcan los costos productivos así como el mejoramiento de las tecnologías de manejo durante la producción para obtener una adecuada rentabilidad y mantener la sustentabilidad ambiental y económica en acuicultura (Luchini y Panné 2008).

En resumen, esta tesis constituye un avance en el conocimiento teórico de la vulnerabilidad nutricional de las especies de agua dulce en general y de *C. quadricarinatus* en particular, con una aplicación potencial a la acuicultura (fase de hatchery). Además representa un aporte directo al manejo de refugios en la fase de pre-engorde para el mejoramiento de la producción de una especie con importancia para la acuicultura de nuestro país.

Conclusiones

- Los juveniles III y de 1g de *Cherax quadricarinatus* necesitan sólo 2 y 9 días de alimentación inicial, respectivamente, para acumular las reservas necesarias para mudar al estadio siguiente (PSR_{50}) lo que permitiría reducir la cantidad de alimento suministrado.

- El tiempo sin alimento que lleva a la muerte a los juveniles III y de 1g sin poder mudar al estadio siguiente es de 9 y 51 días respectivamente (PNR_{50}), y son los valores más altos hallados para especies de decápodos.

- Ambos valores, PSR_{50} y PNR_{50} (y el estimado índice de vulnerabilidad nutricional a partir de ellos) demuestran la significativa tolerancia a la inanición de la especie.

- Las alteraciones estructurales principales asociadas a la restricción de alimento fueron: la desorganización de la estructura tubular, ensanchamiento del lumen del túbulo e hipertrofia de las células B, y podrían ser utilizadas para la evaluación de estrés nutricional en cultivo.

- Durante largos periodos de inanición (próximos al PNR_{50}) los juveniles consumen las reservas de proteínas y lípidos almacenadas en el hepatopáncreas y músculo abdominal.

- Los juveniles sometidos a estos períodos de inanición muestran gran capacidad de recuperación, reanudando su crecimiento rápidamente, completando sus reservas energéticas en hepatopáncreas y músculo y generando nuevas reservas de glucógeno en el músculo abdominal.

- No se observó actividad enzimática digestiva asociada a la movilización de reservas en los tiempos de restricción de alimento ensayados y solo la actividad lipasa (digestiva) se mostró afectada por la inanición.

- Por m^2 de tanque en la fase de pre-engorde, 2,55 m^2 de red cebollera colocada en forma aleatoria es suficiente para disminuir la mortalidad

- Las disposiciones espaciales de mayor complejidad (disposición vertical y horizontal) no mejoraron los resultados de la disposición al azar.

Bibliografía

Ahyong ST, Yeo DCJ. 2007. Feral populations of the Australian Red-Claw crayfish (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in water supply catchments of Singapore. Biol. Invasions 9, 943-946.

Al-Mohanna SY, Nott JA. 1986. B-cells and ingestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). J. Mar. Biol. Ass. UK. 66, 403-14.

Al-Mohanna SY, Nott JA. 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). Mar. Biol. 95, 129-137.

Al-Mohanna SY, Nott JA. 1989. Functional cytology of hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. Mar. Biol. 101, 535-544.

Anger K. 1995a. Starvation resistance in larvae of semiterrestrial crab, *Sesarma curacaoense* (Decapoda: Grapsidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 187, 161-174.

Anger K. 1995b. The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 193, 119-145.

Anger K, Dawirs RR. 1981. Influence of starvation on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda: Majidae). Helgol. Meeresunters 34, 287-311.

Anger K, Hayd L. 2009. From lecithotrophy to planktotrophy: ontogeny of larval feeding in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. Aquat. Biol. 7, 19-30.

Anger K, Hayd L. 2010. Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. Aquat. Biol. 9, 251-261.

Anger K, Lovrich GA, Thatje S, Calcagno JA. 2004. Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 306, 217- 230.

Anger K, Storch V, Anger V, Capuzzo J. 1985. Effects of starvation on moult cycle and hepatopancreas of stage I lobster (*Homarus americanus*) larvae. Helgol. Meeresunters 39, 107-116.

Anger K, Thatje S, Lovrich GA, Calcagno JA. 2003. Larval and early juvenile development of *Paralomis granulosa* reared at different temperatures: tolerance of cold and food limitation in a lithodid crab from high latitudes. Mar. Ecol. Prog. Ser. 253, 243-251.

Anger K, Torres G, Nettelmann U. 2007. Adaptive traits in ecology, reproduction and early life history of *Sesarma meridies*, an endemic stream crab from Jamaica. Mar. Freshw. Res. 58, 743-755.

Anger K. 1984. Influence of starvation on moult cycle and morphogenesis of *Hyas araneus* larvae (Deeapoda, Majidae). Helgol. Meeresunters 38, 21-33.

Anger K. 2001. The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean Issues, vol. 14. AA Balkema Publishers, Tokio. 419 pp.

Auerswald L, Pape C, Stübing D, Lopata A, Meyer B. 2009. Effect of short-term starvation of adult Antarctic krill, *Euphausia superba*, at the onset of summer. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 381, 47-56.

Barclay MC, Dall W, Smith SM. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn *Penaeus esculentus* Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68, 229-294.

Barki A, Karplus I, Manor R, Parnes S, Aflalo ED, Sagi A. 2006. Growth of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in a three-dimensional compartments system: Does a neighbor matter? Aquaculture 252, 348-355.

Bas CC, Spivak ED, Anger K. 2008. Variation in early development stages in two populations of an intertidal crab, *Neohelice granulata.* Helgol. Mar. Res. 62, 393-401.

Bradford MM. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brockington S, Clarke A. 2001. The relative influence of temperature and food on the metabolism of a marine invertebrate. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 258, 87-99.

Caceci T, Neck KF, Lewis DH, Sis RF. 1988. Ultrastructure of the hepatopancreas of the pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). J. Mar. Biol. Ass. UK. 68, 323-337.

Calado R, Pimentel T, Pochelon P, Olaguer-Feliú AO, Queiroga H. 2010. Effect of food deprivation in late larval development and early benthic life of temperate marine coastal and estuarine caridean shrimp. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 384, 107-112.

Calvo NS, Stumpf L, López Greco LS. 2009a. Effect of different feeding protocols in juveniles of the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus.* Libro de resúmenes de World Aquaculture 2009. 25 al 29 de septiembre, Veracruz, México.

Calvo NS, Stumpf L, López Greco LS. 2009b. Estimación del punto de saturación de reserva en juveniles de la langosta de pinzas rojas *Cherax quadricarinatus*. Libro de resúmenes de XII Congreso Nacional de Acuicultura. 24 al 26 de Noviembre, Madrid, España.

Calvo NS, Stumpf L, López Greco LS. 2009c. Determinación del punto de no retorno en juveniles de la langosta de pinzas rojas *Cherax quadricarinatus.* Libro de resúmenes de XII Congreso Nacional de Acuicultura. 24 al 26 de noviembre, Madrid, España.

Campaña-Torres A, Martínez-Córdova LR, Villarreal-Colmenares H, Civera-Cerecedo R. 2005. In vivo dry matter and protein digestibility of three plant-derived and four animal-derived feedstuffs and diets for juvenile Australian redclaw, *Cherax quadricarinatus.* Aquaculture 250, 748-754.

Campaña-Torres A, Martínez-Córdova LR, Villarreal-Colmenares H, Civera-Cerecedo R. 2006. Carbohydrate and lipid digestibility of animal and vegetal ingredients and diets for juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Aquac. Nutr. 12, 103-109.

Campaña-Torres A, Martínez-Córdova LR, Villarreal-Colmenares H, Civera-Cerecedo R. 2008. Carbohydrate and lipid digestibility of animal and vegetal ingredients and diets for the pre-adult redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). Aquac. Res. 39, 1115-1121.

Chang ES, Chang SA, Keller R, Reddy PS, Snyder MJ, Spees JL. 1999. Quantification of Stress in Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone, Stress Proteins, and Gene Expression. Am. Zool. 39, 487-495.

Chang ES. 2001. Crustacean Hyperglycemic Hormone Family: Old Paradigms and New Perspectives. Am. Zool. 41, 380-388.

Comoglio L, Goldsmit J, Amin O. 2008. Starvation effects on physiological parameters and biochemical composition of the hepatopancreas of the southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782). Revista de Biología Marina y Oceanografía 43, 345-353.

Comoglio L, Smolko L, Amín O. 2005. Effects of starvation on oxygen consumption, ammonia excretion and biochemical composition of the hepatopancreas on adult males of the False Southern King Crab *Paralomis granulosa* (Crustacea, Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. Part B 140, 411-416.

Comoglio LI, Gaxiola G, Roque A, Cuzon G, Amín O. 2004. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. Shellfish Res. 23, 243-249.

Cortés-Jacinto E, Villarreal-Colmenares H, Cruz-Suárez LE, Civera-Cerecedo R, Nolasco-Soria H, Hernández-Llamas A. 2005. Effect of different dietary protein and lipid levels on growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). Aquac. Nutr. 11, 283-291.

Cortés-Jacinto E, Villarreal-Colmenares H, Cruz-Suárez LE, Civera-Cerecedo R, Cruz-Suárez LE. 2004. Studies on the nutrition of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens): effect of the dietary protein level on growth of juveniles and pre-adults. Freshwater Crayfish 14, 70-80.

Cuartas EI, Díaz AC, Petriella AM. 2002. Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Bate) (Crustacea, Penaeoidea). Rev. Invest. Desarr. Pesq. 15, 5-13.

Cuzon G, Cahu C, Aldrin JF, Messager JL, Stephan G, Mevel M. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. Proc. World Maricult. Soc. 11, 410-430.

Dall W, Smith DM. 1986. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns *Penaeus esculentus* Haswell. Aquaculture 55, 23-33.

Dall W. 1974. Indices of nutritional state in the western rock lobster *Panulirus longipes* (Milne-Edwards): I. Blood and tissue constituents and water content. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 16, 176-180.

Díaz AC, Sousa LG, Petriella AM. 2010. Functional cytology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) under osmotic stress. Braz. Arch. Biol. Technol. 53, 599-608.

Du Boulay AJ, Sayer MD, Holdich DM. 1993. Investigations into intensive culture of the Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Freshwater Crayfish 9, 70-78.

FAO 2012. SOFIA - El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Disponible en http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf

Fielder DR, Thorne MJ. 1990. Are shelters really necessary? Aust. Fish. 49, 26-28.

Figueiredo AJ, Corral-Verdugo V, Frias-Armenta M, Bachar KJ, White J, McNeill PL. 2001 Blood, solidarity, status, and honor: The sexual balance of power and spousal abuse in Sonora, México. Evolution and Human Behavior 22, 295-328.

Figueiredo J, Penha-Lopes G, Narciso L, Lin J. 2008. Effect of starvation during late megalopa stage of *Mithraculus forceps* (Brachyura: Majidae) on larval duration, synchronism of metamorphosis, survival to juvenile, and newly metamorphosed juvenile size. Aquaculture 274, 175-180.

Folch J, Less M, Sloane G, Stanley H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 226, 497-509.

Franceschini-Vicentini IB, Ribeiro K, Papa LP, Junior JM, Vicentini CA, Valenti PMCM. 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. Int. J. Morphol. 27, 121-128.

Frings CS, Dunn RT. 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. Am. J. Clin. Pathol. 53, 89-91.

García-Carreño FL. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. Comp. Biochem. Physiol. Part B 103, 575-578.

García-Guerrero M, Racotta IS, Villarreal-Colmenares H. 2003. Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). J. Crustac. Biol. 23, 1-6.

Garvey JE, Stein RA, Thomas HM. 1994. Assessing how fish predation and interspecific prey competition influence a crayfish assemblage. Ecology 75, 532-547.

Geary N, Langhans W, Scharrer E. 1981. Metabolic concomitants of glucagon induced suppression of feeding in the rat. Am. J. Physiol. 10, 330-335.

Gebauer P, Paschke K, Anger K. 2010. Seasonal variation in the nutritional vulnerability of first-stage larval porcelain crab, *Petrolisthes laevigatus* (Anomura: Porcellanidae) in southern Chile. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 386, 103-112.

Geddes MC, Smallridge M, Clark S. 1993. The effect of stocking density, food type and shelters on survival and growth of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* in experimental ponds. Freshwater Crayfish 9, 57-69.

Ghanawi J, Saoud PI. 2012. Molting, reproductive biology, and hatchery management of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). Aquaculture 358-359, 183-195.

Gibson O, Barker PL. 1979. The decapod hepatopancreas. Oceanogr. Mar. Biol. An. Rev. 17, 285-346.

Giménez L. 2002. Effect of prehatching salinity and initial larval biomass on survival and duration of development in the zoea I of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* under the nutritional stress. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 270, 93-110.

Giménez L, Anger K. 2005. Effects of temporary food limitation on survival and development of brachyuran crab larvae. J. Plankton Res. 27, 485-494.

Harris B, Sulkin S. 2005. Significance of feeding to the development of postlarval megalopae in the free-living crab *Lophopanopeus bellus* and commensal crab *Fabia subquadrata*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 291, 169-175.

Hobbs HH. 1991. Adaptations and convergence in North American crayfishes. Freshwater Crayfish 2, 541-549.

Holdich DM. 2002. Biology of freshwater crayfish. Biology of freshwater crayfish, Blackwell science Ltd, Londres. 703 pp.

Hu M, Wang Y, Tsang ST, Cheung SG, Shin PKS. 2011. Effect of starvation on the energy budget of two Asian horseshoe crab species: *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda* (Chelicerata: Xiphosura). Mar. Biol. 158, 1591-1600.

Icely JD, Nott JA. 1992. *Digestion and absorption: digestive system and associated organs.* En: Harrison FW y Humes AG. (Eds) Microscopic anatomy of invertebrates: Decapod, Crustacea. Wiley-Liss Inc., NY. 147-201.

Jaklič M, Vrezec A. 2011. The first tropical alien crayfish species in European waters: the redclaw *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae). Crustaceana 84, 651-665.

Jalihal DR, Sankolli KN, Shenoy S. 1993. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium Bate*, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana. 65, 365-376.

Johnston DJ, Alexander CG, Yellowhees D. 1998. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda, Scyllaridae). J. Crustac. Biol. 18, 271-278.

Johnston DJ, Calvert KA, Crear BJ, Carter CG. 2003. Dietary carbohydrate/lipid ratios and nutritional condition in juvenile southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. Aquaculture 220, 667-682.

Jones CM. 1995a. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* von Martens. Decapoda, Parastacidae: I. Development of hatchery and nursery procedures. Aquaculture 138, 221-238.

Jones CM. 1995b. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae) II. Juvenile nutrition and habitat. Aquaculture 138, 239-245

Jones CM. 1997. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Department of Primary Industries, Queensland. 116pp.

Jones CM, Ruscoe IM. 2000. Assessment of stocking size and density in the production of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae), cultured under earthen pond conditions. Aquaculture 189, 63-71.

Jones CM, Ruscoe IM. 2001. Assessment of five shelter types in the production of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) under earthen pond conditions. J. World Aquac. Soc. 32, 41-51.

Jones PL, Obst JH. 2000. Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). J. Crustac. Biol. 20, 431-441.

Jussila J, Evans LH. 1998. Growth and condition of marron *Cherax tenuimanus* fed pelleted diets of different stability. Aquac. Nutr. 4, 143-149.

Kamarudin MS, Jones DA, le Vay L, Abidin AZ. 1994. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 123, 323-333.

Karplus I, Barki A, Cohen S, Hulata G. 1995. Culture of the Australian redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel. I. Polyculture with fish in earthen ponds. Isr. J. Aquac. Bamidgeh 47, 6-16.

Karplus I, Barki A. 2004. Social control of growth in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*: Testing the sensory modalities involved. Aquaculture 242, 321-333

Karplus I, Zoran M, Milstein A, Harpaz S, Eran Y, Joseph D, Sagi A. 1998. Culture of the Australian red-claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel III. Survival in earthen ponds under ambient winter temperatures. Aquaculture 166, 259-267.

Kindschi GA. 1988. Effect of intermittent feeding on growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Aquaculture and Fisheries Management 19, 213-215.

Kumlu M, Kır M, Yılmaz Ö, Göçer M, Eroldoğan OT. 2010. Growth of over-wintered and pre-seasonally produced post-larvae of *Penaeus semisulcatus* in the subtropics. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 10, 269-276.

Lawrence C, Jones C. 2002. *Cherax.* En: Holdich DM. (Ed) Biology of freshwater crayfish. Blackwell science Ltd, Londres. 635-670.

Levi T, Barki A, Hulata G, Karplus I. 1999. Mother-offspring relationships in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. J. Crustac. Biol. 19, 477-484.

Li E, Chen L, Zeng C, Yu N, Xiong Z, Chen X, Qin JG. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. Aquaculture 274, 80-86.

Liddy GC, Phillips BF, Maguire GB. 2003. Survival and growth of instar 1 phyllosoma of the western rock lobster, *Panulirus cygnus*, starved before or after periods of feeding. Aquac. Int. 11, 53-67.

Longo MV. 2012. Modificaciones del músculo de cierre de las quelas y del hepatopáncreas de los cangrejos *Neohelice granulata* (*Chasmagnatus granulatus*) y *Cryptograpsus angulatus* en respuesta a la salinidad. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata. 161pp.

Longo MV, Díaz AO. 2011. The claw closer muscle of two estuarine crab species, *Cyrtograpsus angulatus* and *Neohelice granulata* (Grapsoidea, Varunidae): histochemical fibre type composition. Acta Zool. 94, 233-239.

Lopez GR, Levinton JS. 1987. Ecology of deposit feeding animals in marine sediments. Q. Rev. Biol. 62, 235-260.

López Greco LS, Vazquez FJ, Rodríguez E. 2007. Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). Acta Zool. 88, 223-229.

López Greco LS, Lo Nostro F. 2008. Structural changes of the spermatophore in the freshwater ''red claw'' crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). Acta Zool. 89, 149-155.

López-López S, Nolasco H, Villarreal-Colmenares H, Civera-Cerecedo R. 2005. Digestive enzyme response to supplemental ingredients in practical diets for juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquac. Nutr. 11, 79-85.

Loya-Javellana GN, Fielder DR, Thorne ML. 1995. Foregut evacuation, return of appetite and gastric fluid secretion in the tropical freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Aquaculture 134, 295-306.

Luchini L, Panné Huidobro S. 2008. Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local Dirección de Acuicultura Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 98pp.

Luchini, L. 2004. Algo más sobre el cultivo de la red claw (*Cherax quadricarinatus*). 12pp. Disponible en http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/01=cultivos/01-especies/ index.php

MINAGRI 2011. Cultivo de la langosta australiana o Redclaw. Dirección de Acuicultura, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible en http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/01=cultivos/01-especies/index.php

MINAGRI 2013. Boletín Dirección de Acuicultura Marzo 2013. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 19pp. Disponible en http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/index.php

MINCyT 2012. Argentina innovadora 2020 plan nacional de ciencia, tecnología e innovación. Lineamientos estratégicos 2012-2015. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. 141pp. Disponible en http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/

Manor R, Segev R, Leibovitz MP, Aflalo ED, Sagi A. 2002. Intensification of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* culture II. Growout in a separate cell system. Aquac. Eng. 26, 263-276.

Mason JC. 1978. Effects of temperature, photoperiod, substrate and shelter on survival, growth, and yield accumulation of juvenile *Pacifastacus leniusculus* in culture. Freshwater Crayfish 4, 73-82.

Masser MP, Rouse DB. 1997. Australian red claw crayfish. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication No. 244. Southern Regional Aquaculture Center, Stoneville, MS. 8 pp.

Masson I, Díaz AC, Petriella AM. 2012. Effect of salinity changes on the midgut gland of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae). Lat. Am. J. Aquat. Res. 40, 358-366.

Mazlum Y, Güner Ö, Şirin S. 2011. Effects of feeding interval on growth, survival and body composition of narrow-clawed crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 juveniles. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 11, 283-289.

McCue MD. 2010. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. Comp. Biochem. Physiol. Part A 156, 1-18.

Mendez G, Wieser W. 1993. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). Environ. Biol. Fish. 36, 73-81.

Mikami S, Greenwood JG, Gillespie NC. 1993. The effect of starvation and feeding regimes on survival, intermoult period and growth of cultured *Panulirus japonicus* and *Thenus* sp., phyllosomas (Decapoda, Palinuridae and Scyllaridae). Crustaceana 68, 160-169.

Mills BJ. 1989. Australian Freshwater Crayfish Handbook of Aquaculture. Freshwater Crayfish Aquaculture Research and Management. Lymington, Tasmania. 116pp.

Mills BJ, McCloud PI. 1983. Effects of stocking and feeding rates on experimental pond production of the crayfish *Cherax destructor* Clark Decapoda: Parastacidae. Aquaculture 34, 51-72.

Molony BW, Bird C. 2005. Are marron, *Cherax tenuimanus* (Crustacea: Decapoda), populations in irrigation reservoirs habitat limited? A trial using artificial habitats. Lake Reserv. Manage. 10, 39-50.

Moore PA. 2007. *Agonistic behavior in freshwater crayfish. The influence of intrinsic and extrinsic factors on aggressive encounters and dominance.* En: Duffy JE y Thiel M. (Eds) Evolutionary ecology of social and sexual systems. Oxford University Press Inc. NY. 90-114.

Muhlia-Almazan A, García-Carreño FL. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. Part B 133, 383-394.

Nakaoka M. 1992. Spatial and seasonal variation in growth rate and secondary production of *Yoldia notabilis* in Otsuchi Bay, Japan, with reference to the influence of food supply from the water column. Mar. Ecol. Prog. Ser. 88, 215-223.

Naranjo-Páramo J, Hernández-Llamas A, Villarreal H. 2004. Effect of stocking density on growth, survival and yield of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in gravel-lined commercial nursery ponds. Aquaculture 242, 197-206.

Neves CA, Pastor MP, Nery LE, Santos EA. 2004. Effects of the parasite *Probopyrus ringueleti* (Isopoda) on glucose, glycogen and lipid concentration in starved *Palaemonetes argentinus* (Decapoda). Dis. Aquat. Org. 2-3, 209-213.

Nystrom P. 2002. *Ecology.* En: Holdich DM. (Ed) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science Ltd, Londres. 192-235.

Oliveira GT, Rossi IC, Kucharski LCR, Da Silva RSM. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. Comp. Biochem. Physiol. Part A 137, 383-390.

Ong BL, Johnston D. 2006. Influence of feeding on hepatopancreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. J. Shellfish Res. 25, 113-121.

Palacios E, Pérez-Rostro IC, Ramírez JL, Ibarra AM, Racotta IS. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. Aquaculture 171, 309-321.

Parnes S, Sagi A. 2002. Intensification of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* culture I. Hatchery and nursery system. Aquac. Eng. 26,251-262.

Paschke KA, Gebauer P, Buchholz F, Anger K. 2004. Seasonal variation in starvation resistance of early larval North Sea shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crangonidae). Mar. Ecol. Prog. Ser. 279, 183-191.

Pascual C, Sánchez A, Zenteno E, Cuzon G, Gaxiola G, Brito R, Gelabert R, Hidalgo E, Rosas C. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 251, 416-429.

Pinoni SA, Iribarne O, López Mañanes AA. 2011. Between-habitat comparison of digestive enzymes activities and energy reserves in the SW Atlantic euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata.* Comp. Biochem. Physiol. Part A 158, 552-559.

Powell ML, Watts SA. 2010. Response to long-term nutrient deprivation and recovery in the crayfishes *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus* (Crustacea, Decapoda): component and proximate analyses. J. World Aquac. Soc. 41, 71-80.

Racotta IS, Palacios E, Ibarra AM. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. Aquaculture 227, 107-130.

Reynolds JD. 2002. *Growth and reproduction.* En: Holdich DM. (Ed) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science Ltd, Londres. 152-191.

Rivera-Pérez C, Navarrete del Toro MA, García-Carreño FL. 2011. Digestive lipase activity through development and after fasting and re-feeding in the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 300, 163-168.

Rodríguez A, le Vay L, Mourente G, Jones DA. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. Mar. Biol. 118, 45-51.

Rodríguez-González H, Hernández-Llamas A, Villarreal H, Saucedo PE, García-Ulloa M, Rodríguez-Jaramillo C. 2006. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the Gonadosomatic Index at first maturation. Aquaculture 254, 637-645.

Rodríguez-González H, Villarreal H, García-Ulloa M, Hernández-Llamas A. 2009. Evaluation of practical diets containing different protein levels on gonad development of female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquac. Nutr. 15, 347-355.

Rosas C, Cuzon G, Gaxiola G, Pascual C, Brito R, Chimal ME, van Wormhoudt A. 2000. *El metabolismo de los carbohidratos de Litopenaeus setiferus, L. vannamei, y L. stylirostris.* En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar MA y Civera-Cerecedo R. (Eds) Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del Quinto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán. 340-359.

Sacristán HJ, Franco Tadic LM, López Greco LS. 2012. Influencia de la alimentación sobre el ritmo circadiano de las enzimas digestivas de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae). Lat. Am. J. Aquat. Res. (en prensa).

Sagi A, Milstein A, Eran Y, Joseph D, Khalaila I, Abdu U, Harpaz S, Karplus I. 1997. Culture of the Australian redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel, second growout season of overwintered populations. Isr. J. Aquac. Bamidgeh 49, 222-229.

Sánchez De Bock M, López Greco LS. 2010. Sex reversal and growth performance in juvenile females of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae): effect of increasing temperature and androgenic gland extract in the diet. Aquac. Int. 18, 231-243.

Sánchez-Paz A, García-Carreño F, Hernández-López J, Muhlia-Almazan A, Yepiz-Plascencia G. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 340, 184-193.

Sánchez-Paz A, García-Carreño F, Muhlia-Almazan A, Peregrino-Uriarte AB, Hernández-López J, Yepiz-Plascencia G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 241-249.

Saoud IP, Ghanaw IJ, Thompson KR, Webster CD. 2013. A Review of the culture and diseases of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). J. World Aquac. Soc. 44, 1-29.

Snovsky G, Galil BS. 2011 The Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Crustacea: Decapoda: Parastacidae) in the Sea of Galilee, Israel. Aquatic Invasions 6, 29-31.

Soderback B. 1995. Replacement of the native crayfish *Astacus astacus* by the introduced species *Pacifastacus leniusculus* in a Swedish lake: possible causes and mechanisms. Freshw. Biol. 33, 291-304.

Sousa LG, Petriella AM. 2000. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea). Biocell 24, 189-95.

Sousa LG, Petriella AM. 2006. Morphology and histology of *P. argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) digestive tract. Biocell 30, 287-294.

Steele C, Skinner C, Alberstadt P, Antonelli J. 1997. Importance of adequate shelters for crayfishes maintained in aquaria. Aquarium Sci. Conserv. 1, 189-192.

Stumpf L, Calvo NS, Castillo Díaz F, Valenti WC, López Greco LS. 2011. Effect of intermittent feeding on growth in early juveniles of the crayfish *Cherax quadricarinatus.* Aquaculture 319, 98-104.

Stumpf L, Calvo NS, Pietrokovsky S, López Greco LS. 2010. Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquaculture 304, 34-41.

Stumpf L, Castillo Díaz F, López Greco LS. 2012. Effects of intermittent feeding on compensatory growth and water quality in juveniles of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* under holding conditions. Libro de resúmenes del Crustacean Society Summer Meeting. 03 al 07 de junio, Atenas, Grecia.

Stumpf L, Tropea C, Castillo Díaz F, López Greco LS. 2013. Effects of two different diets on compensatory and catch up growth in juveniles of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae) reared in group. Libro de resúmenes del Summer Meeting of The Crustacean Society. 07 al 11 de julio, San José, Costa Rica.

Sulkin SD. 1978. Nutritional requirements during larval development of the portunid crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 34, 29-41.

Sulkin S, McKeen G. 1999. The significance of feeding history on the value of heterotrophic microzooplankton as prey for larval crabs. Mar. Ecol. Prog. Ser. 186, 219-225.

Sulkin SD, Lehto J, Strom S, Hutchinson D. 1998. Nutritional role of protists in the diet of first stage larvae of the Dungeness crab *Cancer magister*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 169, 237-242.

Sulkin SD, van Heukelem WF. 1980. Ecological and evolutionary significance of nutritional flexibility in planktotrophic larvae of the deep sea red crab *Geryon quinquedens* and the stone crab *Menippe mercenaria*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2, 91-95.

Taghon GL, Greene RR. 1992. Utilization of deposited and suspended particulate matter by benthic interface feeders. Limnol. Oceanogr. 37, 1370-1391.

Thessalou-Legaki M, Peppa A, Zacharaki M. 1999. Facultative lecithotrophy during larval development of the burrowing shrimp *Callianassa tyrrhena* (Decapoda: Callianassidae), Mar. Biol. 133, 375-398.

Thompson KR, Muzinic LA, Engler LS, Webster CD. 2005. Evaluation of practical diets containing different protein levels, with or without fish meal, for juvenile Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). Aquaculture 244, 241-249.

Thorson G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 25, 1-45.

Tse FW, Govind CK, Atwood HL. 1983. Diverse fiber composition of swimming muscles in the blue crab: *Callinectes sapidus*. Can. J. Zool. 61, 52-59.

Turano MJ. 2007. J Compensatory Growth of pond-reared hybrid striped bass, *Morone chrysops* X *Morone saxatilis*, Fingerlings. J. World Aquac. Soc. 38, 250-261.

Van Handel E. 1965. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. Anal. Biochem. 11, 256-265.

Van Weel PB. 1974. Hepatopancreas? Comp. Biochem. Physiol. Part A 47, 1-9.

Vazquez FJ, Tropea C, López Greco LS. 2008. Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Invertebr. Biol. 127, 433-443.

Vega-Villasante F, Nolasco H, Civera R. 1993. The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*: I-properties of amylase activity in the digestive tract. Comp. Biochem. Physiol. Part B 106, 547-550.

Versaw WK, Cuppett S L, Winters DD, Williams LE. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. J. Food Sci. 54, 1557-1568.

Viau VE, Ostera JM, Tolivia A, Ballester ELC, Abreu PC, Rodríguez EM. 2012. Contribution of biofilm to water quality, survival and growth of juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Aquaculture 324-325, 70-78.

Viau VE. 2010. Optimización del crecimiento y la supervivencia de juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* mediante el mejoramiento del hábitat. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 209pp.

Viau VE, Rodríguez EM. 2010. Substrate selection and effect of different substrates on survival and growth of juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868) (Decapoda, Parastacidae). Aquac. Int. 18, 717-724.

Villarreal-Colmenares H. 2002. *Avances en Nutrición Acuícola.* En: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Gaxiola-Cortés MG y Simoes N. (Eds) Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, Quintana. Roo, México. 114-142.

Villarreal H, Peláez A. 1999. Biología y cultivo de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapada Parastacidae). Manual de producción, CIBNOR, México. 150pp.

Vinagre AS, Da Silva RSM. 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. Comp. Biochem. Physiol. Part A 102, 579-583.

Vogt G, Storch V, Quinitio ET, Pascual FP. 1985. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). Aquaculture 48, 1-12.

Watling L. 2013. Feeding and digestive system. En: Watling L, Thiel M. (Eds) Functional morphology and diversity. Oxford University Press, NY. 237-260.

Wicki G, Rossi F, Merino O, Luchini L. 2008. Engorde de la langosta de pinzas rojas (*Cherax quadricarinatus*), en el subtrópico argentino: primeros resultados. Disponible en: http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/01=cultivos/01-especies/index.php

Wilcox JR, Jeffries HP. 1976. Hydration in the sand shrimp *Crangon septemspinosa*: relation to diet. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab 150, 522-530.

Wu L, Dong S. 2002. Effects of protein restriction with subsequent realimentation on growth performance of juvenile Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Aquaculture 210, 343-358.

You K, Ma C, Gao H, Li F, Zhang M, Qiu Y, Wang B. 2008. Food intake rate and delivery strategy in aquaculture. Chin. J. Oceanol. Limnol. 26, 263-267.

Yudkovski Y, Shechter A, Chalifa-Caspi V, Auslander M, Ophir R, Dauphin Villemant C, Waterman M, Sagi A, Tom M. 2007. Hepatopancreatic multitranscript expression patterns in the crayfish *Cherax quadricarinatus* during the moult cycle. Insect Biochem. Mol. Biol. 16, 661-674.

Zar JH. 2010. Biostatistical Analysis, Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA. 944pp.

Zhang P, Zhang X, Li J, Gao T. 2010. Effect of refeeding on the growth and digestive enzyme activities of *Fenneropenaeus chinensis* juveniles exposed to different periods of food deprivation. Aquac. Int. 18, 1191-1203.

Zhang P, Zhang X, Li J, Gao T. 2009. Starvation resistance and metabolic response to food deprivation and recovery feeding in *Fenneropenaeus chinensis* juveniles. Aquac. Int. 17, 159-172.

Zhao Q, Cheung SG, Shin PKS, Chiu JMY. 2011. Effects of starvation on the physiology and foraging behaviour of two subtidal nassariid scavengers. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 409, 53-61.

Zheng HP, Ke CH, Zhou SQ, Li FX. 2005. Effects of starvation on larval growth, survival and metamorphosis of Ivory shell *Babylonia formosae habei* Altena et al., 1981 (Neogastropoda: Buccinidae). Aquaculture 243, 357-366.