



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Modeladores de la calidad de progenie en un crustáceo de  
interés económico, el camarón ornamental “red cherry”  
*Neocaridina davidi* (Caridea, Atyidae)**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el area Ciencias Biológicas

**Lic. Daniela Eliana Sganga**

Director de tesis: Laura Susana López Greco

Consejero de estudios: Fabiana Lo Nostro

Lugar de trabajo: Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada,  
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias  
Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2019

Fecha de defensa: 22 de abril de 2019

# INDICE

RESUMEN.....	v
ABSTRACT .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	ix
1 Introducción general.....	1
1.1 Crustáceos ornamentales .....	3
1.2 Acuicultura de crustáceos ornamentales.....	3
1.3 Acuicultura de especies ornamentales en Argentina .....	5
1.4 Modeladores de la calidad de progenie .....	6
1.5 El camarón ornamental <i>Neocaridina davidi</i> .....	9
1.6 Objetivo general.....	11
1.7 Organización de la tesis .....	11
2 Variación en la forma del cefalotórax respecto al tamaño en hembras y machos de <i>Neocaridina davidi</i> .....	13
2.1 INTRODUCCIÓN.....	15
2.1.1 Dimorfismo sexual.....	15
2.1.2 Morfometría geométrica basada en landmarks .....	17
2.2 OBJETIVO .....	19
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.3.1 Condiciones de cría.....	19
2.3.2 Experimento 1 .....	20
2.3.3 Experimento 2.....	20
2.3.4 Captura de imágenes .....	22
2.3.5 Configuración de landmarks y análisis morfogeométricos.....	22
2.3.5 Análisis estadísticos .....	25
2.4 RESULTADOS .....	26
2.4.1 Experimento 1 .....	26
2.4.2 Experimento 2.....	28
2.5 DISCUSIÓN.....	36
3 Efecto del tamaño de los parentales sobre la producción de juveniles en el camarón ornamental <i>Neocaridina davidi</i> .....	41
3.1 INTRODUCCIÓN.....	43
3.2 OBJETIVO .....	46
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.3.1 Obtención de ejemplares.....	47
3.3.2 Diseño experimental .....	48

3.3.3	Determinaciones bioquímicas.....	50
3.3.4	Análisis estadístico .....	51
3.4	RESULTADOS .....	52
3.4.1	Desempeño reproductivo de las hembras .....	52
3.4.2	Calidad de progenie .....	54
3.5	DISCUSIÓN.....	60
4	Evaluación de la asociación entre la coloración materna y la calidad de progenie en el camarón ornamental <i>Neocaridina davidi</i> .....	65
4.1	INTRODUCCIÓN.....	67
4.2	OBJETIVO .....	69
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
4.3.1	Obtención de ejemplares .....	69
4.3.2	Diseño experimental .....	70
4.3.3	Captura de imágenes.....	71
4.3.4	Medición de la coloración .....	72
4.3.5	Determinaciones bioquímicas.....	74
4.3.6	Análisis estadístico .....	74
4.4	RESULTADOS .....	75
4.4.1	Desempeño reproductivo de las hembras .....	75
4.4.2	Calidad de progenie .....	76
4.5	DISCUSIÓN.....	81
5	Evaluación de la calidad del alimento sobre la calidad de progenie en el camarón ornamental <i>Neocaridina davidi</i> .....	87
5.1	INTRODUCCIÓN.....	89
5.2	OBJETIVO .....	92
5.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	92
5.3.1	Condiciones de cría .....	92
5.3.2	Diseño experimental .....	95
5.3.2.1	Experimento 1 .....	95
5.3.2.2	Experimento 2 .....	96
5.3.3	Composición proximal de los alimentos y determinación de ácidos grasos ....	98
5.3.4	Determinación del contenido de carotenoides.....	98
5.3.5	Adquisición de imágenes y medición del área del órgano perigástrico ocupada por gotas lipídicas .....	99
5.3.6	Análisis estadísticos.....	100
5.4	RESULTADOS .....	101
5.4.1	Alimentos.....	101
5.4.2	Experimento 1.....	103

5.4.3 Experimento 2.....	105
5.5 DISCUSIÓN.....	110
6 Consideraciones finales.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	125



Modeladores de la calidad de progenie en un crustáceo de interés económico, el camarón ornamental “red cherry” *Neocaridina davidi* (Caridea, Atyidae)

Resumen

*Neocaridina davidi* es una especie dulceacuícola comercializada mundialmente para acuarismo y cultivada actualmente en Argentina. Pero pese a su importancia económica, hasta el momento existen pocos estudios sobre su reproducción y su cría. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar las condiciones óptimas de cultivo de *N. davidi* que maximicen la producción de juveniles. Se evaluaron, entonces, tres factores que pueden ser manipulados en cultivo sobre la producción y la calidad de la progenie: el efecto del tamaño de las hembras y los machos del lote parental, el efecto de la coloración de la hembra, y la calidad del alimento del lote parental. Previo a evaluar el efecto del tamaño de los parentales, se estudió la variación en la forma del cefalotórax respecto al tamaño durante el crecimiento y hasta alcanzar la madurez sexual, mediante un análisis morfogeométrico. Se registraron cambios menores a lo largo de la ontogenia, relacionados al incremento en peso y se encontró un significativo dimorfismo sexual a partir de los 54 días de edad. Se encontró que el número de juveniles eclosionados de puestas provenientes de hembras grandes fue mayor al de las provenientes de hembras pequeñas. Sin embargo, no se observó asociación entre el tamaño paterno y el desempeño reproductivo de las hembras y la calidad de la progenie, sugiriendo que la contribución de los machos al desarrollo de la progenie es adecuada, independientemente de su tamaño. Por otra parte, la coloración materna está asociada negativamente a la cantidad de juveniles eclosionados por puesta, por hembra. Esto sugiere que en las hembras de esta especie hay un compromiso entre derivar carotenoides para la coloración del cuerpo y la reproducción. Por el contrario, no se encontró asociación entre la coloración materna y los otros parámetros de calidad de progenie. En cuanto a la calidad del alimento del lote parental, se ensayaron tres alimentos comerciales: un alimento para peces tropicales ornamentales utilizado previamente en la cría de *N. davidi* (T), un alimento

específico para crustáceos (C), y un alimento para peces ornamentales de menor costo que los otros (O). El número de huevos por puesta fue similar para todas las hembras. Sin embargo, el contenido de carotenoides de los huevos provenientes de hembras alimentadas con T fue el más alto. Esta diferencia podría suponer una mayor supervivencia de estos embriones. Acorde a esto, el número de juveniles eclosionados para las hembras alimentadas con T fue mayor que para aquellas alimentadas con C u O, aunque el área ocupada por la reserva de vitelo de los juveniles al eclosionar fue similar entre dietas. En suma, en base a estos resultados se proponen mejoras en las condiciones de cultivo de *N. davidi* contribuyendo al desarrollo de esta actividad en nuestro país. Además estos resultados son relevantes para el incremento del conocimiento teórico sobre los factores que modelan la calidad de progenie en crustáceos decápodos.

Palabras clave: *Neocaridina davidi*, producción de juveniles, desempeño reproductivo, calidad de progenie, tamaño materno, tamaño paterno, coloración materna, puestas sucesivas, dietas comerciales.

Offspring quality modellers in a crustacean of economic interest, the ornamental “red cherry”  
shrimp *Neocaridina davidi* (Caridea, Atyidae)

Abstract

*Neocaridina davidi* is a freshwater species that is commercialized worldwide for aquarium keeping and that is currently cultured in Argentina. But notwithstanding its economic importance, up to the present there are only few studies regarding its reproduction and culture. Therefore, the aim of this study was to evaluate the optimal culture conditions of *N. davidi* that maximise juvenile production. Three factors that can be manipulated in culture over production and offspring quality were tested: the effect of female and male broodstock size, the effect of maternal colouration, and broodstock diet quality. Prior to the evaluation of parental size effect, the variation in cephalothorax shape on size during growth and until shrimps reached sexual maturity, was studied by means of a geometric morphometric analysis. Subtle changes in carapace shape were recorded along the ontogeny, and were related to size increment. A significant sexual dimorphism was found from 54 days of age. The number of hatched juveniles from large females was higher than those from small females. However, paternal size had no effect on female reproductive output and offspring quality, suggesting that males' contribution to offspring development was adequate regardless of male size. On the other hand, maternal colouration was negatively associated to the number of hatched juveniles per brood per female. This suggests that females might trade off their carotenoid resources between body colouration and reproduction. In contrast, no association was found between maternal colouration and the other offspring quality variables studied. Regarding broodstock diet quality, three commercial diets were tested: a diet for tropical ornamental fish (T), a diet for crustaceans (C), and a diet for ornamental fish (O). The number of eggs per brood was similar for all females. However, the carotenoid content of eggs from females fed with T was the highest. This could translate in a higher embryo survival. Accordingly, the number of hatched juveniles from females fed with T

was higher than those fed with C or O, although the area occupied by yolk reserves of newly hatched juveniles was similar among diets. In sum, based on these results, many upgrades in *N. davidi*'s culture were proposed, contributing to the development of this activity in our country. Besides, these results increase the theoretical knowledge on the factors that model offspring quality in decapod crustaceans.

**Key words:** *Neocaridina davidi*, juvenile production, female reproductive performance, offspring quality, maternal size, paternal size, maternal colouration, successive spawnings, commercial diets.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires) y al Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental por permitirme llevar a cabo la presente tesis doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca que posibilitó la realización de esta tesis.

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 PICT 2012-01333, UBACYT 2014-2017 (20020130100186BA - Cs Agropecuarias y salud animal), PIP 2015-2017 n° 11220150100544, PICT 2016-0759 y UBACYT 2018-2021 (20020170100021BA - Cs Agropecuarias y salud animal).

A mi directora, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, guiarme a cada paso y brindarme sus conocimientos, y por su gran apoyo a lo largo de estos años.

A mi consejera de estudios, por acompañarme y aconsejarme en este camino recorrido.

A mi comisión de seguimiento de tesis, por enriquecer este trabajo con sus sugerencias y comentarios.

A Anita, Agus, Caro y Lia, por ser las mejores compañeras y amigas que podía pedir, por su invaluable ayuda, por tener siempre palabras de aliento y apoyo, y por ayudarme a ser cada día una mejor científica y una mejor persona.

A Amir, Ariadna, Leo, Nico, Sebas y Sofi, que con su alegría, sus chistes y su ayuda hicieron de cada día de trabajo un verdadero placer.

A Gabi, Ivi y Mede, por las horas compartidas de trabajo en el laboratorio y por estar siempre dispuestos a ayudarme en lo que necesitase.

A Lucas, Florencia y Marina, por su ayuda con los análisis estadísticos.

A Ari, por ser mi sostén y mi alegría, y por caminar junto a mí este hermoso camino que elegí.

A Juli, por su amor incondicional, sus sabios consejos, y por estar siempre a mi lado escuchándome, apoyándome e impulsándome a seguir adelante en todo lo que me propuse estos años.

A Pablo, por estar siempre presente y por transmitirme su pasión por la biología.

A mis padres, por brindarme su amor y su apoyo incondicional, que ayudaron a que logre llevar adelante esta tesis, y por hacerme sentir siempre cuán orgullosos están de mis logros, por más pequeños que éstos sean.

A Valen, por su amor, sus risas y su dulzura, que me dieron fuerzas para seguir adelante todos los días.

A Nadia y Ailo, por su apoyo, por escucharme hablar durante horas sobre mi tesis y darme siempre los mejores consejos.

A mis primos, tíos, sobrinos, suegros, cuñados y a Angélica por hacerme sentir siempre querida y acompañada.

A Laurita, Val, Cintia, Gabi, Flora, Marie, Gise, Rober y Marcos, mis grandes amigos, por acompañarme y apoyarme en este largo camino.

A Vir, Pau, Ailu y Pri, mis amigas y compañeras de pasillo, por prestarme siempre sus oídos, y por las charlas y los mates compartidos.

A Lu, Nanu, Lau, Henry, Jota, Rox, Javi, Maru, Martin, Ale, Vicky, Facu, Gise, Mau, Vane y Luis, mis compañeros de Poper, por acompañarme en la difícil tarea de comunicar la ciencia entre risas.

A Adri, por contribuir con su saber al desarrollo de esta tesis.

A Santino, por llenar mis días de amor y dulzura.

A Juli...

# CAPÍTULO 1

Introducción general



## 1.1 Crustáceos ornamentales

En los últimos años, los crustáceos decápodos se han convertido en uno de los grupos de invertebrados más populares en la industria del acuarismo, que es aquella que se ocupa del comercio de especies acuáticas ornamentales para uso recreativo. Se consideran especies ornamentales a aquellas que presentan entre otras características: (a) *coloraciones llamativas*, siendo las coloraciones rojizas intensas, anaranjadas o amarillas las preferidas por los acuaristas; (b) *comportamientos reproductivos inusuales o marcado dimorfismo sexual*, como los camarones marinos del género *Saron* cuyos machos presentan el primer par de quelípedos y el tercer par de maxilípedos agrandados; (c) *caracteres morfológicos distintivos*, como los quelípedos de los alfeidos o “camarones pistola” o los apéndices expandidos y en forma de hoja de los camarones del género *Hymenocera* o “camarones arlequín”; o (d) *contribuyen a la limpieza del acuario* controlando las algas, como los cangrejos ermitaños de los géneros *Clibanarius* y *Paguristes*, los cangrejos braquiuros del género *Mithraculus* y otros crustáceos herbívoros. Los decápodos más populares entre los acuaristas son los camarones carideos y estenopodideos (Calado, 2008; Calado *et al.*, 2017). Además de los populares camarones marinos limpiadores del género *Lysmata* y los “camarones boxeadores” del género *Stenopus*, hay numerosas especies de agua dulce de los géneros *Atya*, *Atyopsis*, *Atyoida*, *Caridina*, *Macrobrachium* y *Neocaridina* que son comúnmente comercializadas (Calado *et al.*, 2003, 2017; De Grave *et al.*, 2008; Heerbrandt & Lin, 2006).

## 1.2 Acuicultura de crustáceos ornamentales

La acuicultura de crustáceos es una industria que ha crecido notablemente en los últimos años. En 2014, la producción de crustáceos proveniente de la acuicultura alcanzó las 6,9 millones de toneladas, con un valor estimado de 36,2 billones de dólares (FAO, 2016). Los camarones marinos son los crustáceos más cultivados, representando el 66 % de la acuicultura de crustáceos

a nivel mundial en el año 2000. Las principales especies cultivadas son el camarón tigre *Penaeus monodon* Fabricius, 1798, el langostino chino *P. chinensis* (Osbeck, 1765) y el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), que en su conjunto constituyen el 86 % de la producción acuícola de camarones (Tacon, 2003). Además de ser cultivados para consumo humano, a partir de la acuicultura de crustáceos se generan diversos productos y actividades. Entre ellas podemos destacar el comercio de especies ornamentales para acuarismo, que ha crecido recientemente y se ha convertido en una actividad económica muy atractiva por el muy alto valor monetario de los ejemplares (De Grave *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2016; Wabnitz *et al.*, 2003). Por ejemplo, un camarón de la familia Alpheidae puede llegar a valer hasta 35 US\$ y un camarón del género *Lysmata* hasta 45 US\$ (Martínez-Guerrero & Cid-Rodríguez, 2010).

Indonesia es uno de los principales exportadores de crustáceos ornamentales en todo el mundo, además de India, Malasia, Singapur, Taiwán, Tailandia, China, México y Fiji (Patoka *et al.*, 2015, Wabnitz *et al.*, 2003). Los mismos son exportados mayormente a Estados Unidos, Europa y Japón, y entre los países europeos, los de mayor volumen de importación son Alemania, Francia y Reino Unido. Alemania en particular, tiene un mercado ornamental creciente que ofrece una variedad notable de especies exóticas de crustáceos, especialmente de langostas, con más de 40 especies comerciadas. Además, los comercios alemanes distribuyen los ejemplares comprados a otros países dentro de la Unión Europea, convirtiéndose así en una puerta de entrada para estos animales en el territorio europeo. Aunque en menor medida, la República Checa es el segundo país europeo líder en el comercio de langostas de agua dulce, y también contribuye al ingreso de estos animales a Europa (Chucholl, 2013; Patoka *et al.*, 2015, 2016).

En nuestra región, Brasil lidera las exportaciones de especies ornamentales, con alrededor de 15 especies de crustáceos decápodos extraídas para su comercialización de hábitats intermareales y submareales poco profundos (Baeza *et al.*, 2013; Gasparini *et al.*, 2005).

### 1.3 Acuicultura de especies ornamentales en Argentina

El mantenimiento de especies ornamentales para acuarismo fue ganando popularidad en nuestro país en los últimos años. Durante el 2009 fueron introducidos más de 604.000 organismos acuáticos ornamentales, de los cuales 579.000 correspondieron a peces. De los 25.000 restantes, el 51 % fueron cnidarios, el 20 % crustáceos y el 16 % moluscos. Los géneros de crustáceos con mayor participación fueron *Neocaridina*, *Lysmata* y *Calcinus* representando el 20,56 %, 16,74 % y 10,36 % de los crustáceos importados en ese año (Panné Huidobro, 2010). El volumen de ornamentales importados fue similar en 2010 y 2011 (725.600 y 743.250 organismos, respectivamente), registrándose una baja notable en 2012, con solo 170.270 organismos ornamentales importados. Luego en 2013 y 2014 las importaciones ascendieron a 582.670 y 638.870, respectivamente. Sin embargo, el volumen de invertebrados ornamentales se mantuvo siempre por debajo del 5 % en todos los casos. Los camarones la familia Hippolytidae, y en particular los del género *Lysmata*, fueron los de mayor participación en las importaciones entre 2010 y 2014, aunque también se importaron crustáceos de las familias Diogenidae, Palaemonidae, Stenopodidae, Atyidae, Majidae, Rhynchocinetidae y Porcellanidae, entre otros. Además, varias especies de crustáceos decápodos son exportadas desde nuestro país, en particular, del género *Aegla* (Familia Aeglidae) que es capturado de su ambiente natural. Pero además se exportan crustáceos de los géneros *Neohelice*, *Palaemonetes* y *Macrobrachium* (Panné Huidobro, 2012, 2014, 2015).

A pesar de que la importación pueda resultar más fácil y más rentable que el cultivo en el corto plazo, existen ciertas desventajas como el costo elevado por unidad, la mortalidad debida a malas condiciones de mantenimiento y/o durante su traslado desde su lugar de origen, y los riesgos de introducción involuntaria de especies “polizontes” incluyendo posibles patógenos. A esto se suma que los ejemplares comercializados provienen actualmente en su mayoría de la recolección de especímenes silvestres, lo que ha llevado en muchos casos a la sobreexplotación y destrucción de sus hábitats, tanto marinos como de agua dulce. La acuicultura de crustáceos

ornamentales es una actividad que permitiría disminuir la captura de animales en el medio natural aliviando la presión de la pesca sobre las poblaciones. Además, contribuiría a un mejor control sanitario de las especies comercializadas, y ayudaría a la creación de empleos, dada la alta rentabilidad y constante expansión de esta industria (Calado *et al.*, 2017; Luchini & Panné Huidobro, 2008, Maceda-Veiga *et al.*, 2014; Patoka *et al.*, 2016). Es por este motivo que en las últimas décadas se han multiplicado las investigaciones que buscan contribuir a un cultivo más sostenible de las especies comerciadas para acuarismo. Tomando como ejemplo el caso de los peces ornamentales, se observa que aunque históricamente los ejemplares eran capturados de poblaciones silvestres, en la actualidad, el 90 % de las especies de peces ornamentales de agua dulce provienen de la acuicultura (Maceda-Veiga *et al.*, 2014). En el caso de los crustáceos ornamentales la falta de conocimiento sobre su biología reproductiva obstaculiza actualmente el desarrollo de los cultivos a escala comercial. En particular, es necesaria una producción continua de juveniles para un desarrollo exitoso de este tipo de cultivos. En este sentido, es de vital importancia conocer que factores manipulables en el cultivo de los reproductores afectan directamente la producción de crías, tanto cuantitativa como cualitativamente (Calado, 2008).

#### 1.4 Modeladores de la calidad de progenie

La calidad de progenie hace referencia en conjunto tanto a la calidad de los huevos como de las larvas. La calidad del huevo refiere a su capacidad para ser fecundado y desarrollarse (Holcomb *et al.*, 2004), mientras que la calidad larval hace referencia a la condición fisiológica de las larvas, su desempeño en términos de supervivencia y crecimiento, y a su resistencia a pruebas de estrés, ya sea estrés por manipulación, por las condiciones de cultivo o por la presencia de patógenos. La calidad de progenie depende tanto de la condición fisiológica de los reproductores como de las condiciones de cultivo (Andriantahina *et al.*, 2012; Racotta *et al.*, 2003). El tamaño de los reproductores es un factor que puede influir sobre el rendimiento reproductivo y la calidad de progenie. Esto se debe a que existen restricciones tanto morfológicas como fisiológicas a la

derivación de energía hacia la maduración gonadal y la producción de crías (Ramirez Llodra, 2002). Además, en la mayoría de los crustáceos, la calidad de la progenie disminuye con el aumento de la edad, lo cual suele ser atribuido al agotamiento de los recursos de la hembra (Fox & Czesak, 2000). Desde el inicio de la madurez sexual, la energía debe ser compartida entre el crecimiento y la reproducción. Cuando la energía disponible es limitante, un aumento en la energía derivada a la reproducción resulta en una reducción en la inversión somática. Este aumento en el rendimiento reproductivo se reflejaría en un aumento en la fecundidad o en un aumento en la supervivencia de la progenie como resultado de una mayor inversión energética por huevo (Attard & Hudon, 1987; Ramirez Llodra, 2002). Por el contrario, se espera que a calidad de progenie decrezca a lo largo de las puestas sucesivas, es decir, conforme aumenta la edad, dado que las hembras de mayor edad usualmente producen huevos de menor viabilidad (Darnell *et al.*, 2009).

La coloración materna podría también influenciar la calidad de la progenie en especies cuya coloración depende de la presencia de carotenoides, como ocurre en los crustáceos. Esto se debe a que al asignar carotenoides a su coloración, las hembras podrían reducir la cantidad de carotenoides que derivan al vitelo. Dado el alto poder antioxidante que presentan estas sustancias, una disminución en el contenido de carotenoides del embrión puede provocar un deterioro en su calidad (Britton, 2008; Nordeide *et al.* 2013).

La temperatura es un factor que puede afectar la calidad de la progenie en un cultivo. Un aumento o una disminución en la temperatura de cría de los reproductores puede acelerar o retardar, respectivamente, el desarrollo embrionario (Brillon *et al.*, 2005; Hamasaki *et al.*, 2003; Sachlikidis *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2002; Tropea *et al.*, 2015). Además, una aceleración en el desarrollo del embrión puede resultar en una eficiencia metabólica alterada, obteniéndose así una progenie de menor calidad. Esto se debe a que la cantidad de energía trasladada desde el embrión hasta la etapa larvaria depende de su eficiencia metabólica en el desarrollo (Fischer *et al.*, 2009).

Por otro lado, la nutrición de los reproductores afecta directamente el desempeño reproductivo de las hembras y la calidad de su progenie, como se ha observado en numerosas especies de crustáceos decápodos (Rodríguez-González *et al.*, 2011, 2014; Wu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2017). Esto se debe a que cualquier deficiencia o desequilibrio de la dieta puede impactar en la cantidad y calidad de los nutrientes que son derivados por la hembra al vitelo, que es la única fuente de nutrientes de los embriones y las larvas lecitotróficas (Harrison, 1990). El grupo mejor estudiado, en este sentido, son los camarones peneidos, dada su gran importancia económica. Si bien no son muy populares entre los acuaristas, estos camarones son intensamente cultivados para consumo humano (Calado, 2008). Por este motivo los esfuerzos se han dirigido a la identificación de los nutrientes que son importantes para lograr una óptima maduración gonadal, reproducción y calidad de la progenie (para una revisión ver: Harrison, 1990, Wade *et al.*, 2015 y Wouters *et al.*, 2001). Los camarones paleomónidos del género *Macrobrachium*, que son comercializados como ornamentales y como alimento, también han sido objeto de numerosos estudios nutricionales (Anger & Hayd, 2010; Aya *et al.*, 2015; Cavalli *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2017; Gupta, 2005; Gupta *et al.*, 2007; Hasanuzzaman *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2000; Kovalenko *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2018; Muralisankar *et al.*, 2017; Rasid *et al.*, 2017; entre otros). Sin embargo, los estudios enfocados en el resto de las especies ornamentales y en particular sobre el efecto de la nutrición sobre la reproducción, son considerablemente más escasos. Entre las especies estudiadas, podemos mencionar al camarón escarlata *Lysmata debelius* Bruce, 1983 donde se comparó la producción de larvas para reproductores alimentados con una dieta fresca mixta de poliquetos, moluscos y cangrejos frente a una dieta fresca de *Artemia* sp. (Simões *et al.*, 1998), el camarón limpiador del Pacífico *L. amboinensis* (de Man, 1888) en la cual se evaluaron diversas dietas para los reproductores, tanto frescas como comerciales, y la suplementación de *Artemia* sp. y calamar (Simoes *et al.*, 1998; Calado *et al.*, 2009; Tziouveli *et al.*, 2011), el camarón pimienta *L. wurdemanni* (Gibbes, 1850) para la cual se estudió la inclusión de *Artemia* sp. enriquecida en ácidos grasos altamente insaturados sobre su

desempeño reproductivo (Lin & Zhang, 2001), el camarón Monaco *L. seticaudata* (Risso, 1816) donde se evaluó el uso dietas frescas sobre la calidad larval (Calado *et al.*, 2005 a, b), el camarón rayado de la india *L. vittata* (Stimpson, 1860) en la cual se ensayó una dieta comercial y una de ingredientes frescos compuesta por pulpo, sepia, camarones y mejillones y se evaluó su efecto sobre el desempeño reproductivo (Santos e Almeida *et al.*, 2018) y el camarón boxeador dorado *Stenopus scutellatus* Rankin, 1898 para la cual se comparó el efecto de la alimentación con diferentes tipos de *Artemia* adulta congelada y moluscos sobre su desempeño reproductivo (Lin & Shi, 2002).

### 1.5 El camarón ornamental *Neocaridina davidi*

*Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Decapoda: Atyidae), nativo de China, Corea, Taiwán y Vietnam (Weber & Traunspurger, 2016), es una de las especies de camarones ornamentales más populares (Klotz *et al.*, 2013). *Neocaridina davidi* presenta una amplia variedad de colores, incluyendo: rojo (Camarón Red Cherry, Camarón *Sakura* y Camarón *Red Fire*), negro (Camarón *Black Sakura*), amarillo (Camarón Chocolate), naranja (Camarón *Orange*), amarillo (Camarón *Yellow Fire*), azul (Camarón *Blue*) y bandeado (Camarón *Rili*). El camarón Red Cherry es la variante favorita y exhibe diferentes variantes de coloración rojiza desde rojo oscuro a rojo claro, e incluso camarones blancuzcos o translúcidos (Barbier, 2010; Nunes Cabrita, 2012). Además de su llamativa coloración, posee otras características deseables para su cultivo como ornamental. Tiene una alta tolerancia a diferentes calidades y temperaturas de agua, y se reproducen con facilidad en cautiverio (Klotz *et al.*, 2013, Tropea *et al.*, 2015, Vázquez *et al.*, 2017).

*Neocaridina davidi* es una especie gregaria y gonocórica, con un marcado dimorfismo sexual: las hembras son más grandes que los machos y presentan un color rojo más intenso. Presentan un desarrollo sumamente abreviado, los huevos fecundados son llevados por la hembra sujetos a sus pleópodos por un material adhesivo mucilaginoso durante el período de incubación (Bauer, 2004), el cual dura aproximadamente 15 días, dependiendo de la temperatura (Tropea *et*

*al.*, 2015). Ecllosionan como decapoditos adaptados a un modo de vida bentónico. Los mismos tienen apéndices completamente desarrollados, ojos y sedas sensoriales en sus antenas, pero no poseen urópodos desarrollados (Barbier, 2010; Pantaleão *et al.*, 2017). El número de juveniles ecllosionados en un solo evento de desove varía entre 14 y 80 (Tropea *et al.*, 2015; Sganga, obs. pers.). Las hembras desovan varias veces a lo largo de su vida, cuyo promedio es de 1,5 años en condiciones de cultivo (Barbier, 2010; Marciano *et al.*, 2018). Las mismas pueden ser identificadas por sus ovarios amarillos o verdes, que se observan a través del caparazón translúcido a partir de un peso aproximado de 40 mg (Tropea *et al.*, 2015). Este peso se alcanza aproximadamente 45 días después de la ecllosión, aunque la duración de este período varía según la densidad del cultivo (Vázquez *et al.*, 2017). El ovario es una estructura unilobular con forma de U invertida (Tropea & López Greco, 2015). Ubicado dorsalmente al órgano perigástrico, el ovario maduro se extiende desde la porción media del cefalotórax, hasta el tercer segmento abdominal. Los oviductos se abren a ambos lados de la porción anterior del ovario, y desembocan en la base del tercer par de pereiópodos. Unos días después de la ecllosión de los juveniles se produce la remaduración ovárica, pudiendo ocurrir incluso durante la incubación de los embriones (Barbier, 2010; Tropea & López Greco, 2015). Los machos poseen un par de testículos altamente enrollados que se continúan con los vasos deferentes. Éstos se abren en los gonoporos que están ubicados en las coxas del quinto par de pereiópodos. Se ubican en la porción dorsal a dorsolateral del cefalotórax por encima del órgano perigástrico y por debajo del corazón, y se extienden hasta el tercer segmento abdominal (Tomas *et al.*, 2019). Durante la cópula, la porción final de los vasos deferentes se contrae y libera a través de cada gonoporo un cordón de espermatozoides que al encontrarse, se adhieren entre sí formando el espermatóforo. El mismo es colocado por el macho entre los gonoporos y el abdomen de la hembra utilizando el endopodito del primer par de pleópodos ensanchado en su parte distal en forma sub-circular y el *appendix masculina* del segundo par de pleópodos (Bauer, 2004). Aunque no se conoce el sistema de apareamiento para esta especie, las observaciones de laboratorio parecen indicar que

corresponde al sistema de apareamiento de "pura búsqueda" descrito por Correa y Thiel (2003). Los machos buscan activamente hembras receptivas con las que aparearse, e inmediatamente luego de la transferencia de esperma la pareja se separa. Los machos adultos liberan señales que estimulan la maduración ovárica, acelerando la tasa de crecimiento del ovario. En cambio las hembras adultas liberarían señales que retrasan la maduración en las hembras juveniles (Tropea *et al.*, 2018).

Respecto a que factores modelan la calidad de progenie en *N. davidi*, se han estudiado hasta el momento la temperatura (Tropea *et al.*, 2015), la edad (Marciano *et al.*, 2018) y el tamaño maternos (Tropea & López Greco, 2015), aunque este último factor solo fue abordado en relación a la calidad de los huevos.

## 1.6 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es contribuir al conocimiento de la biología reproductiva y la inversión materna en *N. davidi*, como base para evaluar las condiciones óptimas de cultivo que maximicen su producción y la calidad de sus juveniles. Se evaluarán 3 factores que pueden ser manipulados en cultivo sobre la producción de juveniles y la calidad de la progenie obtenida: el efecto del tamaño de las hembras y los machos del lote parental, el efecto de la coloración de la hembra y la calidad de alimento del lote parental.

## 1.7 Organización de la tesis

La tesis está organizada en 6 capítulos. En el capítulo 1 se resume brevemente la situación actual de la acuicultura de crustáceos en general, y de ornamentales en particular, haciendo hincapié en el comercio de ornamentales en Argentina. Asimismo, se describe la especie estudiada, se describen los potenciales factores que pueden modelar la calidad de su progenie y se plantean los objetivos generales de trabajo.

En el capítulo 2 se estudia la variación en la forma del cefalotórax respecto al tamaño durante el crecimiento y hasta alcanzar la madurez sexual, mediante un análisis morfogeométrico, con el fin de identificar posibles variaciones en la forma del cefalotórax que pudiesen afectar la fecundidad para un mismo tamaño de parentales.

En el capítulo 3 se evalúa el efecto del tamaño de los parentales sobre la calidad de progenie en *N. davidi*.

En el capítulo 4 se estudia la posible relación entre la coloración materna y la calidad de su progenie en dos puestas sucesivas en *N. davidi*.

En el capítulo 5 se evalúa el impacto directo de la calidad del alimento sobre la producción de crías en *N. davidi*, en tres alimentos comerciales para acuicultura de especies ornamentales.

Los capítulos 2 a 5 están estructurados de modo que cada uno contiene su propia introducción, materiales y métodos, resultados y discusión.

Por último, en el capítulo 6 se integran los resultados obtenidos en los capítulos anteriores en una discusión general. Finalmente se incluyen todas las referencias bibliográficas.

# CAPÍTULO 2

Variación en la forma del cefalotórax respecto al tamaño en  
hembras y machos de *Neocaridina davidi*.

Los resultados del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Sganga, D.E., Fernandez Piana, L. R. & López Greco, L.S.

Sexual dimorphism in a freshwater atyid shrimp (Decapoda: Caridea) with direct development: a geometric morphometrics approach.

Zootaxa. 2016. doi: 10.11646/zootaxa.4196.1.7



## 2.1 Introducción

### 2.1.1 Dimorfismo sexual

El dimorfismo sexual es un fenómeno generalizado entre las especies animales (Andersson, 1994; Wyman *et al.*, 2013). La evolución de los caracteres sexualmente dimórficos ha sido estudiada ampliamente y se ha explicado principalmente en función de los mecanismos de selección sexual, de las diferencias intrínsecas entre los roles reproductivos de hembras y machos y de causas ecológicas (Hedrick & Temeles, 1989; Herler *et al.*, 2010). Al mismo tiempo, se han hecho avances en cuanto a los métodos que se utilizan para medir la magnitud de estos dimorfismos. Los primeros enfoques se basaron en la morfometría tradicional, que consiste en el análisis de distancias medidas en individuos mediante métodos estadísticos bivariados y multivariados. Pero estos métodos no pueden recuperar la forma general de la estructura anatómica estudiada, y no tienen en cuenta las relaciones geométricas entre las medidas (Rohlf & Marcus, 1993). En las últimas décadas se han desarrollado métodos geométricos para intentar superar estas limitaciones. La morfometría geométrica basada en referencias anatómicas o *landmarks* es el análisis estadístico de la variación de la forma en función de las coordenadas de puntos morfométricos en el plano (2D) o en el espacio (3D) (Mitteroecker & Gunz, 2009). A diferencia de los enfoques métricos comunes, este método considera toda la geometría de las estructuras estudiadas y, por lo tanto, es capaz de proporcionar una medida precisa de la forma incluso cuando se analizan formas morfológicas complejas (Bertin *et al.*, 2002). La presencia de un esqueleto duro con espinas y suturas en crustáceos decápodos simplifica la tarea de definir *landmarks* homólogos, es decir, que se corresponden a lo largo de todos los animales estudiados. Por lo tanto, las técnicas morfogeométricas constituyen un enfoque válido para evaluar la variabilidad de la forma en este grupo (Trevisan *et al.*, 2012; Zimmermann *et al.*, 2012).

Se han realizado numerosos estudios aplicando técnicas de morfometría geométrica en crustáceos decápodos para evaluar el dimorfismo sexual (Accioly *et al.*, 2013; Barria *et al.*, 2011; Giri & Loy, 2008; Marochi *et al.*, 2016; Responte *et al.*, 2015; Rufino *et al.*, 2004; Scalici

& Gibertini, 2009; Trevisan *et al.*, 2012), lo que permite en algunos casos encontrar diferencias sutiles, pero significativas, entre estructuras incluso en casos donde la morfometría tradicional no era capaz de hacerlo (Accioly *et al.*, 2013; Barria *et al.*, 2011).

En cuanto al dimorfismo sexual en *Neocaridina davidi*, Liang (2002) enumeró el tercer y cuarto par de pereópodos como sexualmente dimórficos, siendo el tercer pereiópodo del macho más largo que el de la hembra. El autor también indicó que el propodo del macho es curvo, tiene forma de arco y se expande distalmente, y el margen posterior se cubre con espínulas, mientras que el dácilo presenta espínulas en forma de gancho distalmente. Más tarde, Klotz *et al.* (2013) informaron el número y la disposición de los dientes en el rostro de los camarones adultos de esta especie como un carácter ligeramente dimórfico (la mayoría de los machos muestran dientes dorsales más pequeños y más deprimidos en el rostro, en comparación con las hembras), y el tercer par de pereiópodos como un carácter distintivo sexualmente dimórfico (propodo del macho ligeramente curvado, dácilo más corto, con espinas más fuertes y más curvadas en el margen posterior que en la hembra). El tamaño también es sexualmente dimórfico en esta especie, con las hembras en promedio más grandes que los machos (Fig. 2.1) (Barbier, 2010). En relación a esto, Vazquez *et al.* (2017) encontraron en *N. davidi* un incremento en la tasa de crecimiento de las hembras respecto a los machos, relacionado a un crecimiento diferencial al alcanzar la madurez sexual. Sin embargo, no se han explorado aún las diferencias en la forma general del caparazón entre hembras y machos o a lo largo de la ontogenia. Por lo tanto, en el presente capítulo se aplicó una técnica cuantitativa, el análisis morfogeométrico, para investigar el posible dimorfismo sexual en la forma del caparazón de *N. davidi* a lo largo de su ontogenia.



Figura 2.1: Hembra (A) y macho (B) adultos de *Neocaridina davidi*.

### 2.1.2 Morfometría geométrica basada en *landmarks*

Un *landmark* es un punto cuyas coordenadas cartesianas,  $(x, y)$  en el espacio bidimensional y  $(x, y, z)$  en el tridimensional, describen la posición en el espacio de un rasgo en particular de un objeto. Cada *landmark* puede ser reconocido en todos los ejemplares estudiados y en su conjunto deben ser representativos de la forma a estudiar (Bookstein, 1991; Zelditch *et al.*, 2004). Bookstein (1991) define tres tipos de *landmark*: tipo I, II y III. Los *landmarks* de tipo I son puntos matemáticos cuya supuesta homología de un individuo a otro es respaldada por una sólida evidencia o significación biológica (por ejemplo una yuxtaposición de tejidos). En cambio para los *landmarks* de tipo II la supuesta homología de un individuo a otro es respaldada únicamente por la geometría y no por evidencia anatómica. Están ubicados en un mínimo o un máximo de curvatura. Los *landmarks* de tipo III o semilandmarks son aquellos que poseen al menos una coordenada deficiente y se utilizan para representar curvas homólogas por medio de series de

puntos. En primer lugar se distribuye el mismo número de *semilandmarks* a lo largo de la curva de cada ejemplar de la muestra en posiciones aproximadas. Luego se optimiza el espaciado de los *semilandmarks* a fin de remover el espaciado arbitrario inicial y establecer una correspondencia geométrica (Gunz & Mitteroecker, 2013). Para ello, los puntos se deslizan a lo largo de vectores tangentes a la curva hasta que su posición se alinea lo más cerca posible con el *semilandmark* en la curva correspondiente de una configuración de referencia. Esto se logra minimizando la energía de curvatura (*bending energy*) entre la referencia y el espécimen blanco (Adams *et al.*, 2013). A partir de este procedimiento los *landmarks* y *semilandmarks* pueden ser tratados de la misma manera en los análisis estadísticos subsecuentes (Gunz & Mitteroecker, 2013).

En morfometría geométrica los conjuntos de coordenadas corresponden a los datos primarios que luego serán sometidos a análisis. Pero los datos en forma de coordenadas de *landmarks* sin procesar no solo contienen información sobre la forma y el tamaño de la configuración de *landmarks*, sino que además contienen información sobre su posición y orientación (Mitteroecker *et al.*, 2013). Por lo tanto, las coordenadas de *landmarks* no pueden ser sujetas a análisis estadísticos sin antes separar la información de forma de los parámetros: traslación, rotación y escala, ya que los mismos no son de interés como descriptores de la variación en forma (Adams *et al.*, 2004; Rohlf, 1999; Mitteroecker & Gunz, 2009). La forma se define entonces como la información geométrica que permanece una vez eliminados del objeto los efectos de traslación, rotación y escala. Estos efectos son eliminados mediante un análisis generalizado de Procrustes. Este procedimiento consiste en trasladar, rotar y escalar todas las configuraciones de manera iterativa hasta obtener el mejor ajuste por cuadrados mínimos de todas las configuraciones a una configuración consenso (Rohlf & Slice, 1990). Las coordenadas alineadas de Procrustes describen la ubicación de cada ejemplar en un espacio que puede ser representado como la superficie de una (híper) hemiesfera de radio uno, relacionado al espacio de Kendall (Slice, 2001). Estas coordenadas son típicamente proyectadas ortogonalmente en un

espacio tangente lineal, obteniéndose así coordenadas en el espacio tangente al espacio de forma de Kendall. Esta proyección es de fundamental importancia ya que permite aplicar análisis multivariados estándar al análisis de forma (Kent & Mardia, 2001, Adams *et al.*, 2013).

## 2.2 Objetivo

Estudiar la variación en la forma del cefalotórax respecto al tamaño durante el crecimiento y hasta alcanzar la madurez sexual en hembras y machos de *N. davidi*, mediante un análisis morfogeométrico.

En el marco de dicho objetivo se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1: La variación en la forma del caparazón se asocia al dimorfismo sexual.

Hipótesis 2: La variación en la forma del caparazón se asocia a los cambios ontogenéticos.

## 2.3 Materiales y métodos

### 2.3.1 Condiciones de cría

A continuación se describen las condiciones de cría utilizadas para todos los ensayos descritos en este capítulo y en los subsiguientes. Los individuos fueron mantenidos en agua de clorada (pH: 7,5 y dureza: 80 mg CaCO<sub>3</sub>/L.), con aireación continua y a una temperatura constante de  $27 \pm 1$  °C mediante el uso de calentadores Atman® (75/ 100 w) sumergibles para acuarios. El fotoperíodo fue de 14 horas de luz: 10 horas de oscuridad. El agua fue reemplazada completamente una vez por semana. A cada acuario se le colocó una porción de musgo de Java (*Vesicularia* sp.), ya que el mismo es utilizado por los camarones como sustrato y parcialmente como alimento. Los camarones fueron alimentados *ad libitum* con un alimento balanceado comercial para peces tropicales (TetraColor®, Tetra GmbH, Melle, Germany), con la siguiente

composición proximal (g/100g de alimento): humedad:  $4,87 \pm 0,35$ ; cenizas:  $8,68 \pm 0,32$ ; proteínas:  $45,59 \pm 0,09$ ; lípidos:  $8,57 \pm 0,00$ ; hidratos de carbono:  $20,93 \pm 0,37$ ; fibras:  $8,529 \pm 2,03$  y un contenido de carotenoides totales de  $381,95 \pm 1,81$  mg/kg (para metodología ver capítulo 5). Su aporte calórico total es de: 422,57 kcal/100 g de alimento.

### 2.3.2 Experimento 1

El primer experimento se realizó a modo exploratorio y se llevó a cabo a partir de una muestra de *N. davidi* obtenida de un stock (proveedor comercial: acuario Acuamanus, Buenos Aires, Argentina) mantenido en el laboratorio en las condiciones descriptas anteriormente. Se seleccionaron al azar 92 individuos (57 hembras y 35 machos) para obtener imágenes del caparazón. La determinación del sexo de los ejemplares se basó en la morfología del primer y segundo par de pleópodos del macho (M). Las hembras fueron separadas en hembras juveniles (HJ) y adultas (H) por medio de la observación del ovario a través del caparazón semi-transparente. Se consideraron adultas a aquellas hembras que poseían un ovario completamente desarrollado (estadio IV según Tropea *et al.*, 2018) y a aquellas de talla similar o superior.

### 2.3.3 Experimento 2

Se colocaron juveniles recién eclosionados de *N. davidi* en acuarios plásticos (18 x 12,5 x 12 cm) conteniendo 2 L de agua de clorada a una densidad de 5 individuos/litro. Se analizaron en total 240 camarones: 130 hembras y 110 machos. Los mismos fueron pesados (precisión: 0,1 g) y fotografiados a los 18, 26, 34, 45 o 54 días de edad (Fig. 2.2, Tabla 2.1), que corresponden aproximadamente a los estadios 8, 10, 12, 14 y 16 descriptos por Pantaleão *et al.* (2017). Al igual que en el experimento 1, la determinación del sexo de los ejemplares se basó en la morfología del primer y segundo par de pleópodos del macho. La madurez sexual en hembras fue

determinada por medio de la observación del ovario a través del caparazón semi-transparente. Se determinó el estadio de desarrollo ovárico según Tropea *et al.* (2018):

Estadio I: ovario transparente a opalescente / blanquecino extendiéndose desde la porción posterior del cefalotórax hasta la porción inicial o media del segundo segmento abdominal.

Estadio II: ovario color crema que se extiende desde la porción posterior del cefalotórax hasta la porción media del segundo segmento abdominal.

Estadio III: ovario amarillo que se extiende desde la porción posterior del cefalotórax hasta el extremo posterior del segundo segmento abdominal.

Estadio IV: ovario amarillo fuerte que se extiende desde la porción media del cefalotórax hasta la porción inicial o media del tercer segmento abdominal (hembras sexualmente maduras).

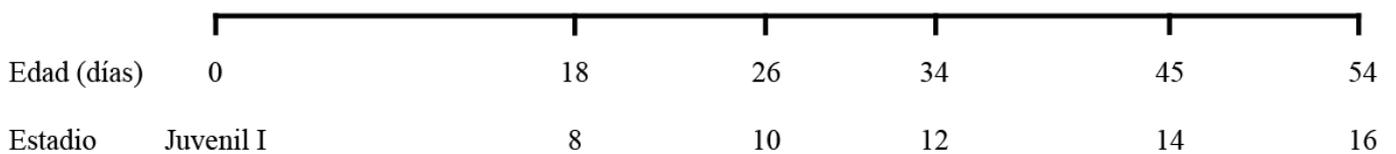


Figura 2.2: Esquema representando los días de medición para el experimento 2 y los respectivos estadios de *Neocaridina davidi* basados en Pantaleão *et al.* (2017)

Tabla 2.1: Número de ejemplares de *Neocaridina davidi* analizados en el experimento 2

Edad	Estadio	Sexo	Individuos
18	8	Hembras	28
		Machos	24
26	10	Hembras	29
		Machos	24
34	12	Hembras	24
		Machos	17
45	14	Hembras	27
		Machos	21
54	16	Hembras	22
		Machos	24

#### 2.3.4 Captura de imágenes

Se colocó un trozo de papel milimetrado junto a cada ejemplar para el posterior escalamiento de las imágenes. Todos los camarones fueron fotografiados en vista lateral izquierda con una cámara fotográfica Nikon Coolpix P340 (Nikon Imaging Japan Inc., Tokyo, Japan) bajo microscopio estereoscópico con un aumento de 1,25 – 3,2 x (Carl Zeiss Stemi 2000-C). Dado que presentan una elevada tolerancia a la permanencia fuera del agua, fueron fotografiados en seco retirando el exceso de agua del caparazón con un papel absorbente. Las fotografías fueron tomadas colocando el ejemplar en el centro de la imagen y dejando los márgenes libres a fin de evitar distorsiones debidas al error de paralaje. Este tipo de error, que surge de colocar la lente de la cámara a muy corta distancia del espécimen, produce una imagen deformada o distorsionada (Mullin & Taylor, 2002). El alineamiento de las espinas del ángulo pterygostomial izquierda y derecha fue utilizado como criterio para el posicionamiento del camarón bajo el microscopio.

#### 2.3.5 Configuración de *landmarks* y análisis morfogeométricos

La selección de los *landmarks* se basó en los trabajos de Bissaro *et al.* (2013) y Torres *et al.* (2014). Para el experimento 1 se digitalizaron seis *landmarks* y cuatro *semilandmaks* para el

caparazón (Tabla 2.2, Fig. 2.3). Mientras que para el experimento 2 cuatro *landmarks* y diez *semilandmarks* fueron digitalizados para dicha estructura (Tabla 2.3, Fig. 2.4), cubriendo de manera más exhaustiva la zona ventral posterior. Además, en base a los resultados obtenidos en el experimento 1, se decidió incluir menos *landmarks* en la región dorsal dado que se observó que dicha región no fue muy variable. En ambos casos los *landmarks* y *semilandmarks* fueron digitalizados utilizando los programas tpsDig 2.22 y tpsUtil 1.6 (Rohlf, 2004, 2005). Las coordenadas de *semilandmarks* fueron relajadas a lo largo de la tangente de la curvatura con el objetivo de minimizar la energía de torsión (*minimum bending energy*) utilizando el paquete geomorph (Adams *et al.*, 2018) para el software R (R Core Team, 2016).

El análisis generalizado de Procrustes fue realizado mediante el paquete geomorph (Adams *et al.*, 2018) para el software R (R Core Team, 2016).

Como medida de tamaño se utilizó el tamaño centroide. El tamaño centroide se calcula como la raíz cuadrada de la suma del cuadrado de las distancias entre todos los *landmarks* y el centroide (el centroide de una configuración de *landmarks* es la media aritmética de todos los *landmarks*).

Tabla 2.2: Identificación de los *landmarks* utilizados en ambos sexos de *Neocaridina davidi* en el experimento 1.

Landmark	Descripción
1	Punta del rostro
2	Curvatura máxima de la cavidad orbital
3	Angulo orbital inferior del caparazón
4	Punta del diente en el ángulo pterygostomial
5	Vértice posterodorsal del caparazón
6-9	<i>Semilandmarks</i>
10	Primer diente postorbital

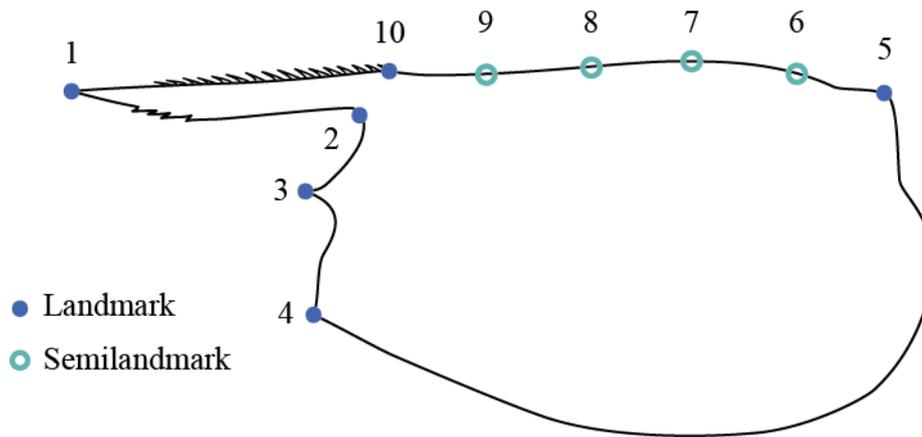


Figura 2.3: Localización de los *landmarks* y *semilandmarks* en el caparazón de *Neocaridina davidi*, para el experimento 1. Vista lateral izquierda.

Tabla 2.3: Identificación de los *landmarks* utilizados en ambos sexos de *Neocaridina davidi* en el experimento 2.

Landmark	Descripción
1	Primer diente postorbital
2	Ángulo orbital inferior del caparazón
3	Punta del diente en el ángulo pterygostomial
4-11	<i>Semilandmarks</i>
12	Vértice posterodorsal del caparazón

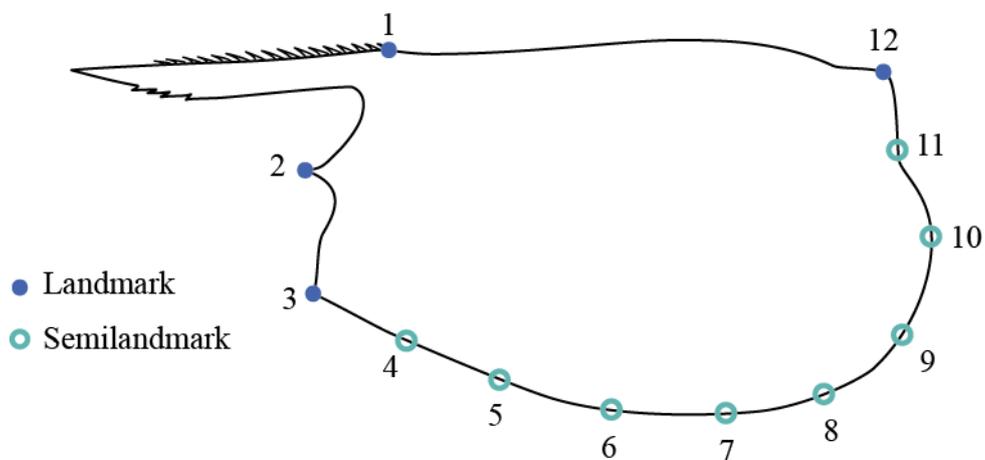


Figura 2.4: Localización de los *landmarks* y *semilandmarks* en el caparazón de *Neocaridina davidi*, para el experimento 2. Vista lateral izquierda.

### 2.3.5 Análisis estadísticos

En ambos experimentos, la variación en forma del caparazón fue analizada en primera instancia a modo exploratorio, por medio de un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) sobre las coordenadas de Procrustes, y se calcularon grillas de deformación para las configuraciones medias de cada grupo para visualizar los cambios en la forma. Para evaluar las diferencias en la forma para todas las edades y sexos, se realizó un análisis de la varianza de Procrustes seguido de comparaciones entre grupos. Este análisis utiliza las distancias de Procrustes entre los ejemplares para evaluar estadísticamente los términos del modelo mediante permutación, usando la suma de las distancias de Procrustes al cuadrado como una medida de la suma de cuadrados (Goodall, 1991).

La alometría, es decir, variación de la forma atribuible a la covariación con el tamaño, fue puesta a prueba por medio de una regresión multivariada de las coordenadas de Procrustes sobre el tamaño centroide. La significancia estadística de la regresión alométrica se puso a prueba por medio de un test de permutación contra la hipótesis nula de completa independencia entre la variable dependiente (coordenadas de Procrustes) y la independiente (tamaño centroide).

Para el segundo experimento, se calcularon las distancias de Procrustes entre las formas medias de cada clase de edad y sexo y se usaron para calcular un dendograma mediante método de pares de grupos no ponderados, usando promedios aritméticos (UPGMA, por sus siglas en inglés). Las formas medias grupales también se sometieron a un análisis de componentes principales. El dendograma y el PCA se utilizaron para resumir las relaciones de similitud entre los grupos. Se analizaron las diferencias de tamaño centroide y de peso entre edades y sexos ajustando modelos lineales por cuadrados mínimos generalizados. Dado que la interacción entre los factores edad y sexo fue estadísticamente significativa en ambos casos, se definió una nueva variable como la combinación de los niveles de todos los factores, y todas las comparaciones posibles fueron realizadas mediante una prueba de Tukey.

Los análisis estadísticos fueron realizados con los paquetes geomorph, nlme y multcomp (Adams *et al.*, 2018; Hothorn *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2017) para el software R (R Core Team, 2016). El nivel de significación empleado fue 0,05.

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Experimento 1

Se obtuvieron valores medios y de desviación estándar para el tamaño centroide del caparazón:  $4,87 \pm 0,86$  en hembras y  $4,32 \pm 0,35$  en machos. Se encontró una relación estadísticamente significativa entre las coordenadas de Procrustes y el tamaño centroide ( $Z = 3,9651$ ,  $p = 0,0002$ ). Para visualizar dicha relación alométrica, se calcularon los *regresion scores* para todos los ejemplares según Drake y Klingenberg (2008) (Fig. 2.5). El análisis de componentes principales (PCA) proporcionó una visualización gráfica de la variación general de la forma (Fig. 2.6). Los primeros 3 componentes principales representaron el 83,37% de la varianza total. Los machos y las hembras juveniles se agrupan, mientras que las hembras adultas se separan principalmente por el segundo eje. Las hembras adultas presentaron un rostro más largo que los machos y las hembras juveniles (landmarks 1 y 10) y su caparazón fue más largo (landmarks 3 a 5) (Fig. 2.7).

El análisis de la varianza de Procrustes arrojó diferencias significativas entre los grupos ( $Z = 3,6517$ ,  $p = 0,0002$ ). La forma del caparazón de las hembras adultas fue significativamente distinta de la forma del caparazón de las hembras juveniles ( $Z = 3,9987$ ;  $p = 0,0012$ ), y de los machos ( $Z = 6,3636$ ;  $p = 0,0002$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las hembras juveniles y los machos ( $Z = 1,4153$ ;  $p = 0,0930$ ).

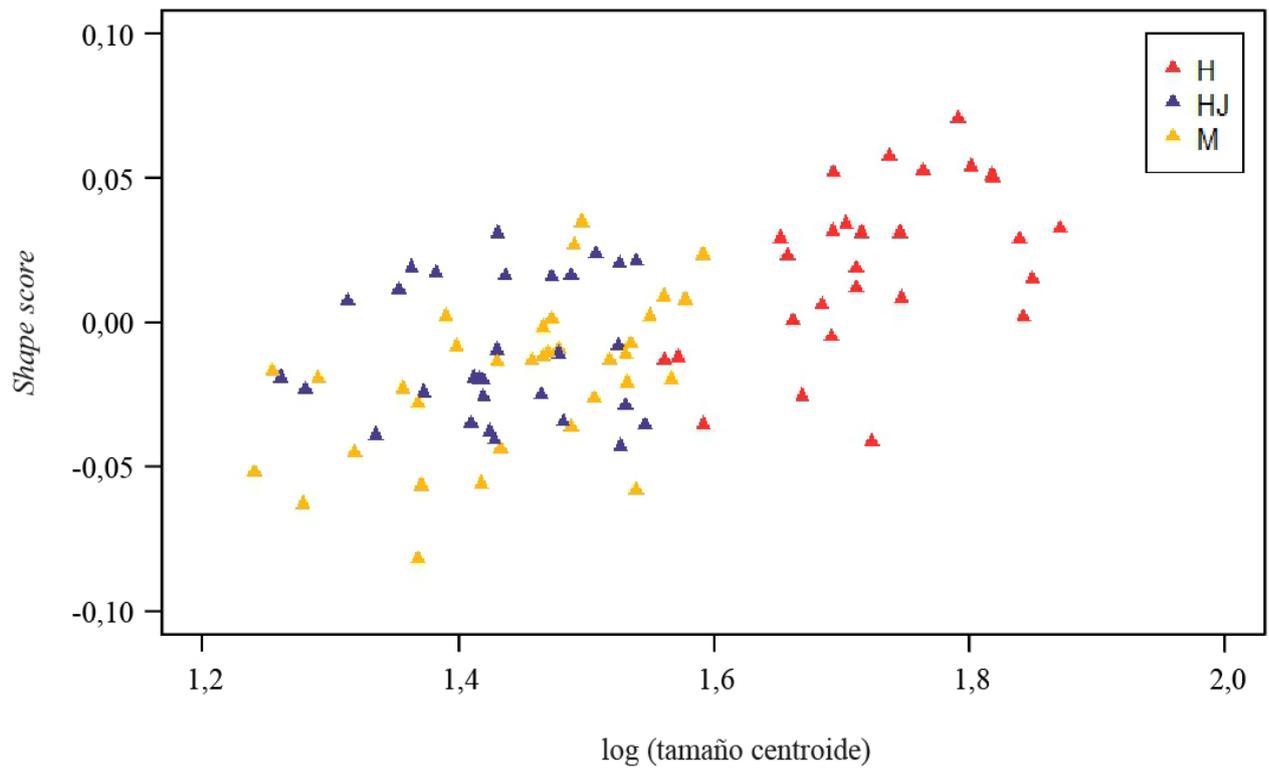


Figura 2.5: Alometría en el caparazón de *Neocaridina davidi*. Gráfico de dispersión de los *shape score* para cada individuo versus el tamaño centroide, para el experimento 1.

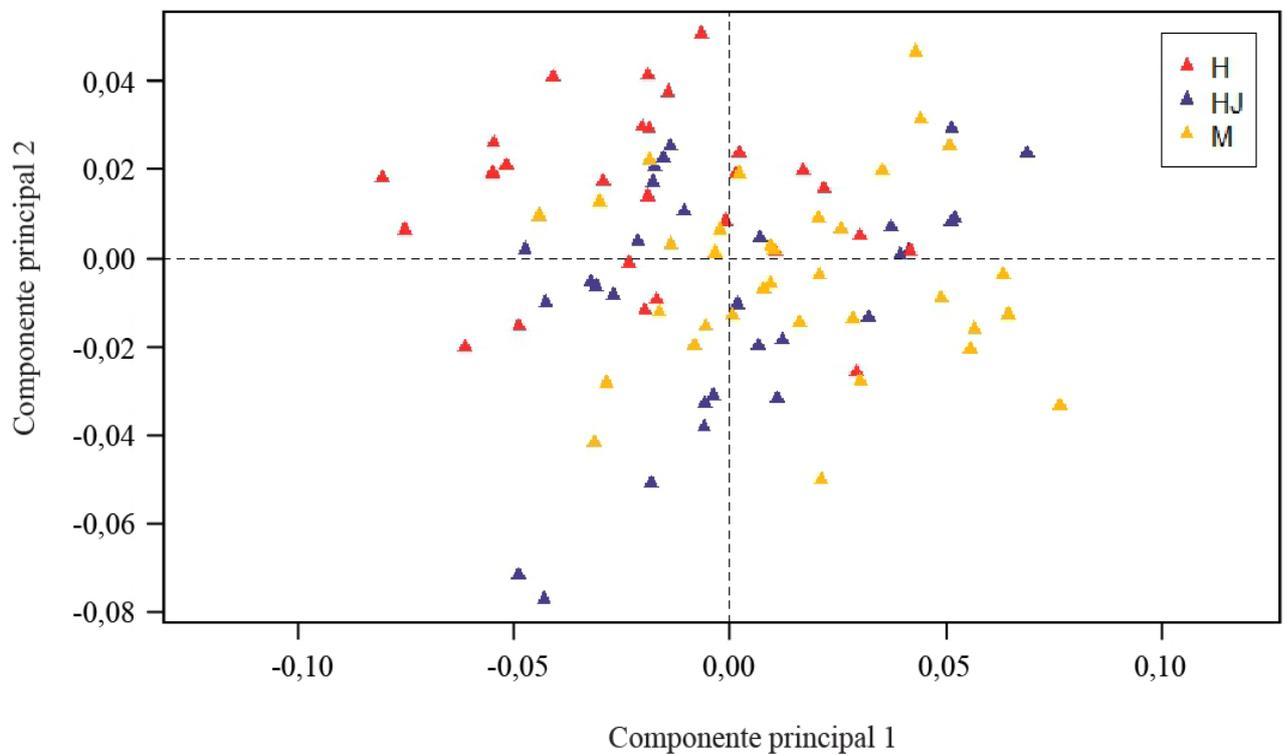


Figura 2.6: Gráfico de dispersión del primer versus el segundo componente principal para hembras adultas, hembras juveniles y machos de *Neocaridina davidi*, para el experimento 1

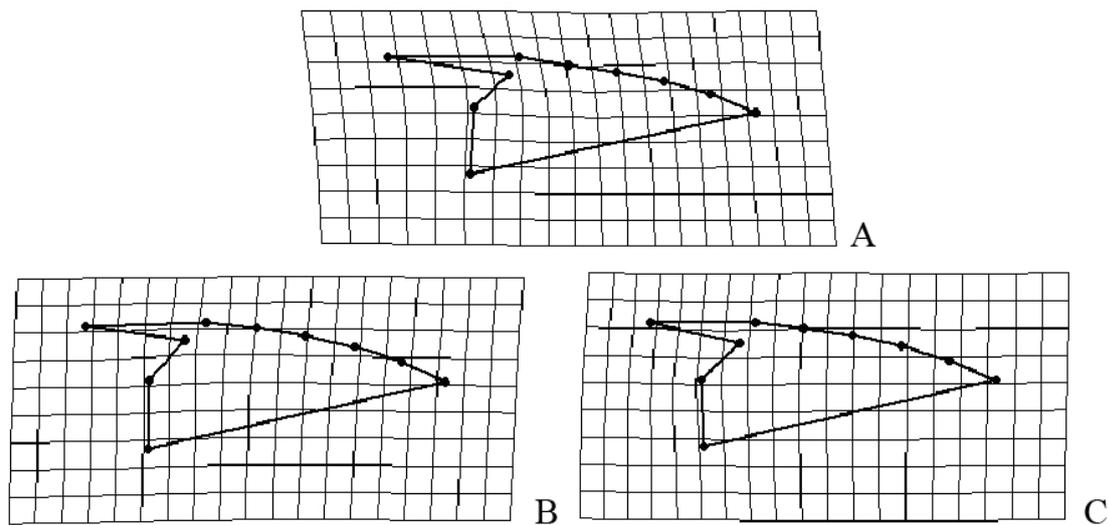


Figura 2.7: Grillas de deformación relativa que ilustran la variación en la forma media del caparazón para hembras adultas (A), hembras juveniles (B) y machos (C) de *Neocaridina davidi* para el experimento 1.

#### 2.4.2 Experimento 2

En cuanto al peso se encontró una interacción estadísticamente significativa entre los factores sexo y edad ( $F = 5,428$ ,  $p = 0,021$ ). El peso de las hembras fue similar al de los machos para las tres primeras edades analizadas ( $Z = 0,148$ ,  $p = 1,000$ ;  $Z = 0,221$ ,  $p = 1,000$ ;  $Z = -0,453$ ,  $p = 1,000$ , respectivamente), promediando  $6,09 \pm 2,73$  mg a los 18 días,  $10,89 \pm 4,05$  mg a los 26 y  $17,48 \pm 4,92$  mg a los 34. A partir de los 45 días se observa un aumento del peso más acelerado en las hembras aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $Z = -2,203$ ,  $p = 0,397$ ), siendo su promedio  $30,19 \pm 13,15$  mg, mientras que el de los machos fue  $23,52 \pm 7,63$  mg. El peso de las hembras a los 54 días fue significativamente mayor al de los machos ( $Z = -3,199$ ,  $p = 0,035$ ), promediando  $43,95 \pm 18,69$  y  $30,48 \pm 6,70$  mg, respectivamente (Fig. 2.8). A partir de los 34 días se pudo observar el comienzo del desarrollo ovárico, encontrándose ovarios maduros (estadio IV) a partir de los 54 días de edad (Fig. 2.9).

Para el tamaño centroide del caparazón, la interacción entre los factores sexo y edad fue estadísticamente significativa ( $F = 19,116$ ,  $p < 0,0001$ ), siendo el mismo similar entre hembras y

machos para las edades 18, 26 y 34 días ( $Z = 1,170$ ,  $p = 0,974$ ;  $Z = -0,220$ ,  $p = 1,000$ ;  $Z = -0,474$ ,  $p = 1,000$ ) y promediando  $3,68 \pm 0,44$ ,  $4,28 \pm 0,52$  y  $4,99 \pm 0,42$ , respectivamente. A partir de los 45 días se encontró una tendencia similar a la hallada para el peso, aunque nuevamente no se encontraron diferencias significativas para hembras y machos a esa edad ( $Z = -2,056$ ,  $p = 0,536$ ). Finalmente se encontró que el peso es sexualmente dimórfico a los 54 días de edad, siendo mayor para las hembras que para los machos ( $Z = -3,447$ ,  $p = 0,018$ ) (Fig. 2.10).

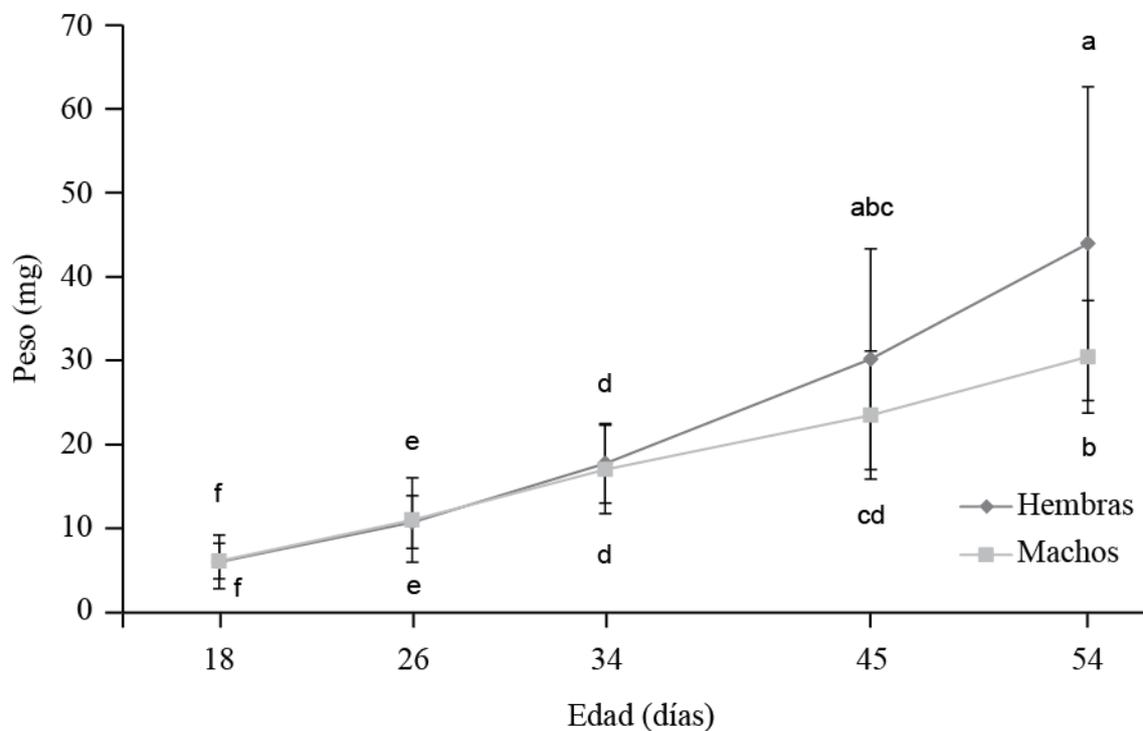


Figura 2.8: Peso de hembras y machos de *Neocaridina davidi* para las 5 edades analizadas en el experimento 2. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

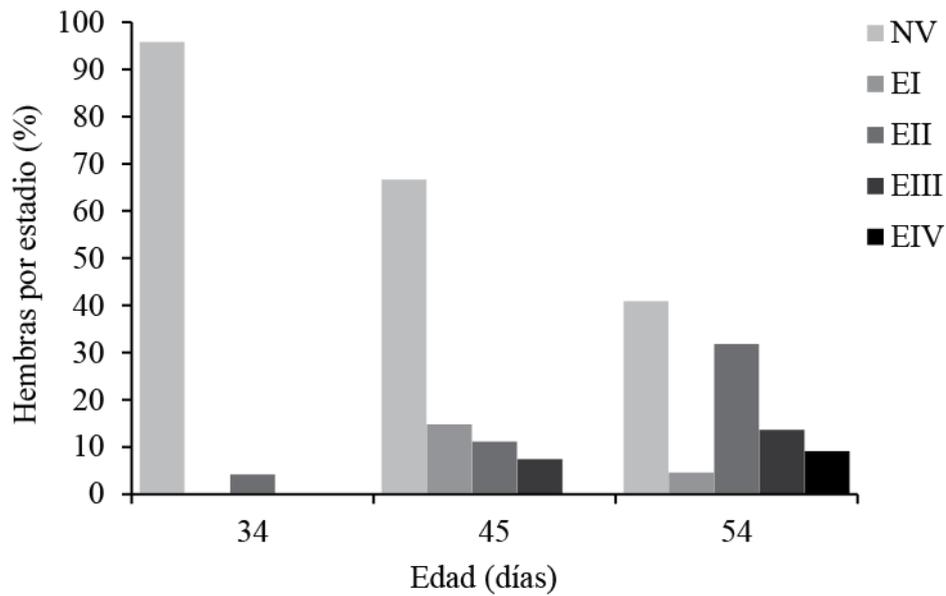


Figura 2.9: Porcentaje de hembras de *Neocaridina davidi* en cada estadio de la maduración ovárica. NV: no visible, EI: estadio I, EII: estadio II, EIII: estadio III, EIV: estadio IV.

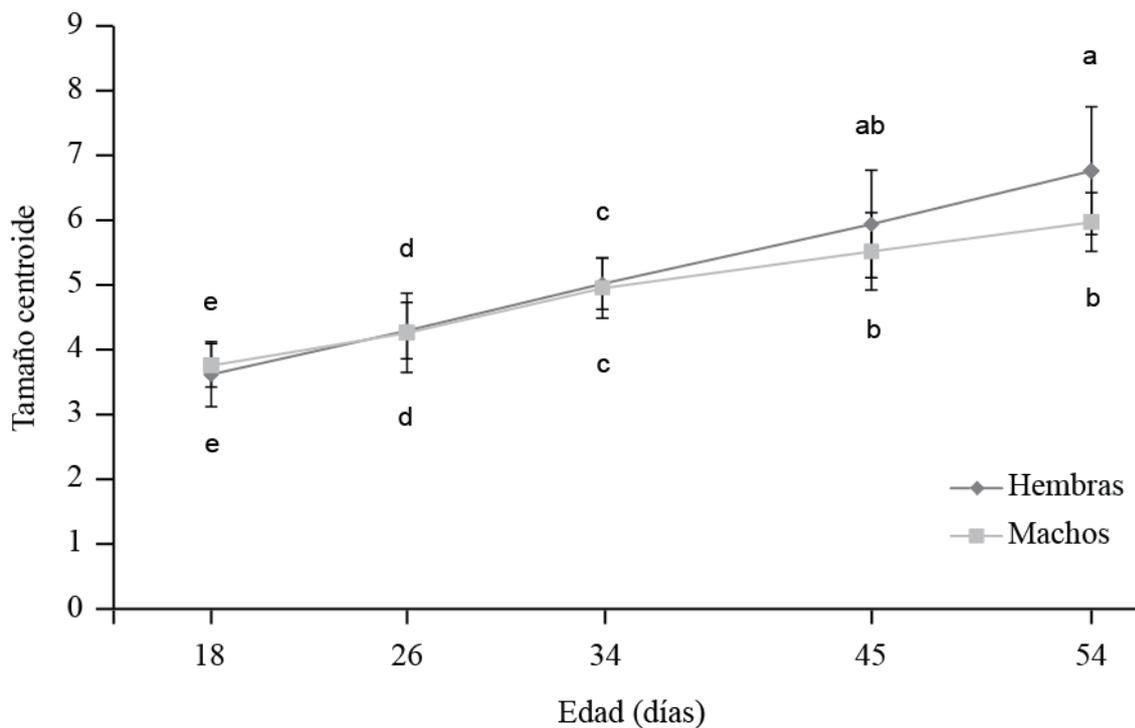


Figura 2.10: Tamaño centroide de hembras y machos de *Neocaridina davidi* para las 5 edades analizadas en el experimento 2. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

La relación entre las coordenadas de Procrustes y el tamaño centroide fue estadísticamente significativa ( $Z = 5,842$ ,  $p = 0,001$ ) (Fig. 2.11). La variación general de la forma fue visualizada mediante el análisis de componentes principales (Fig. 2.12). Los primeros 3 componentes principales representaron el 65,79% de la varianza total. Si bien los grupos se solapan, las hembras y los machos de 45 y 54 días de edad se separan parcialmente de las hembras y los machos de 18 y 26 días de edad a lo largo del segundo eje. Las hembras y los machos de 45 y 54 días de edad presentaron un caparazón ligeramente más ensanchado en la zona anteroventral que los de 18, 26 y 34 (landmarks 2 a 4) (Fig. 2.13).

En el análisis de la varianza de Procrustes se encontró que la interacción entre las variables explicatorias edad y sexo fue significativa ( $Z = 3,363$ ,  $p = 0,001$ ). Las comparaciones entre grupos fueron en su mayoría significativas (Tabla 2.4).

El dendrograma de las distancias de Procrustes realizado mediante el algoritmo UPGMA sobre las configuraciones medias de cada clase de edad y sexo separó dos grupos principalmente por su edad, agrupándose por un lado las hembras y los machos mayores a 45 días de edad, y por otro los menores a 26 (Fig. 2.14). Los machos de 34 días de edad se encuentran en el primer grupo, mientras que las hembras de esa edad se agrupan con el segundo. El análisis de componentes principales permitió visualizar la variación en las configuraciones medias de cada clase de edad y sexo (Fig 2.15). Los primeros 3 componentes principales representaron el 90,72 % de la varianza total. El primer componente principal, que representa el 57,80 % de la varianza total, separa a los camarones de 45 y 54 días de edad de los de 18, 26 y 34 (Fig. 2.16).

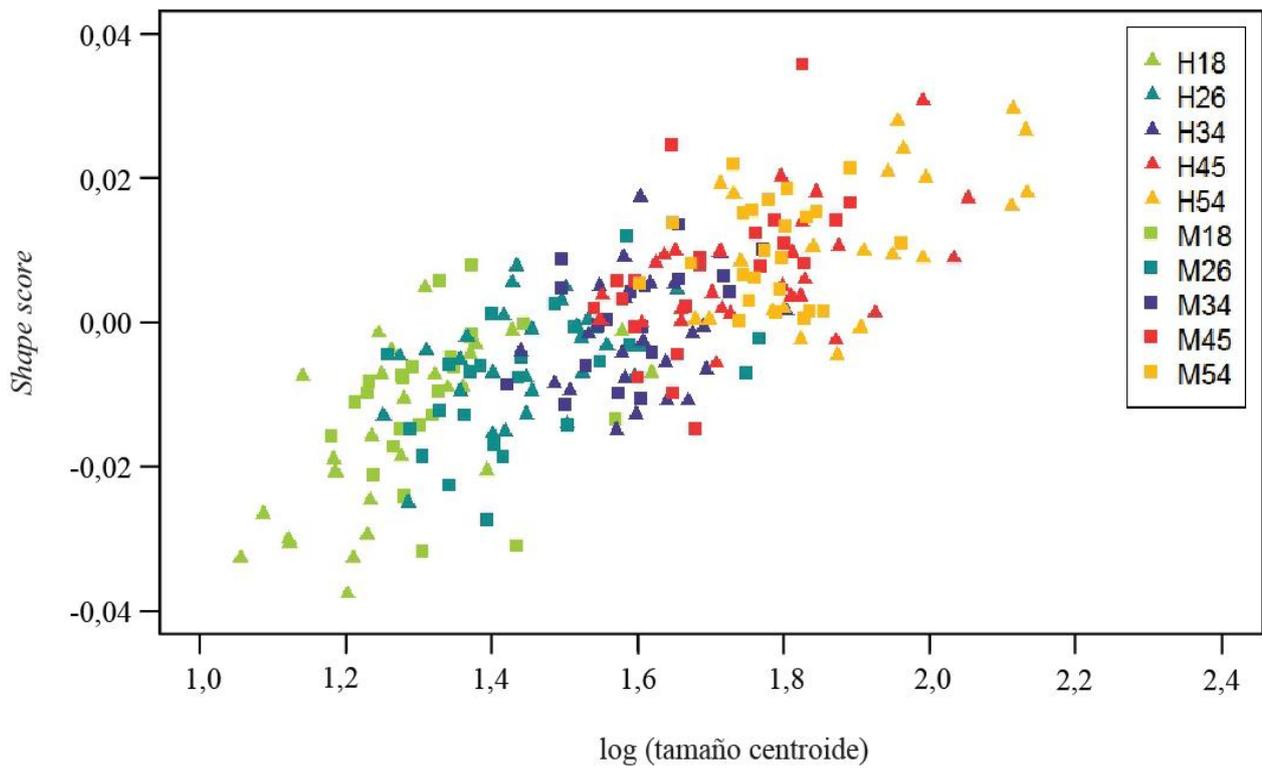


Figura 2.11: Alometría en el caparazón de *Neocaridina davidi*. Gráfico de dispersión de los *shape score* para cada individuo versus el tamaño centroide, para el experimento 2.

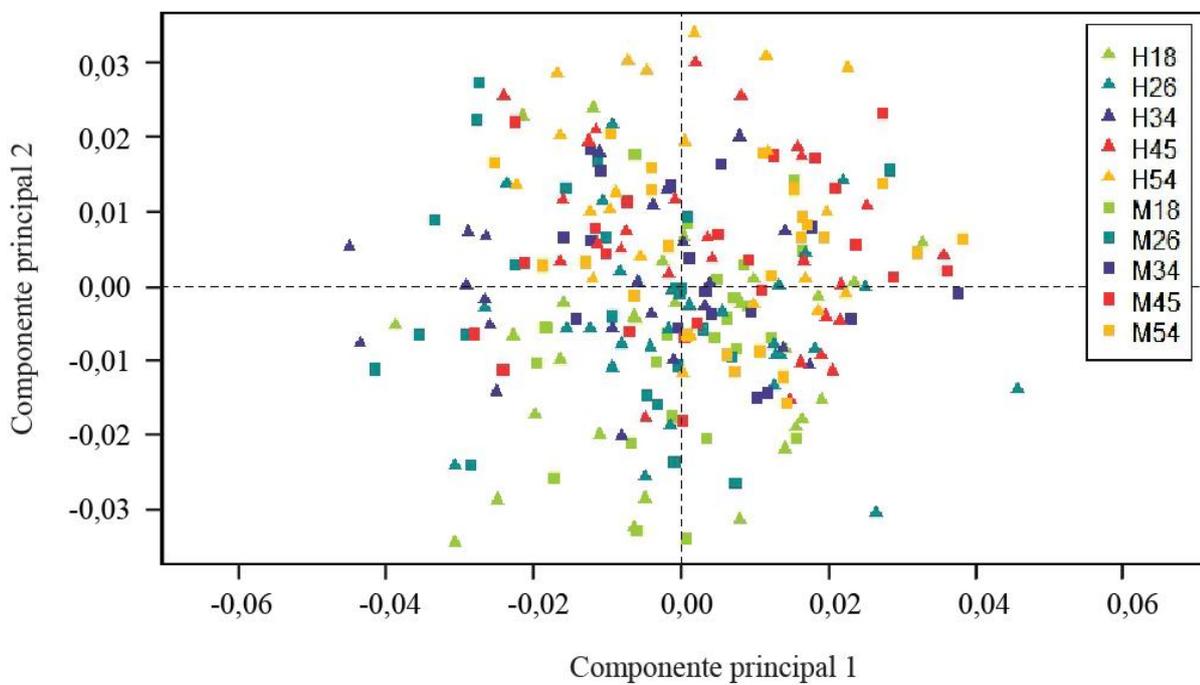


Figura 2.12: Gráfico de dispersión del primer versus el segundo componente principal para hembras y machos de *Neocaridina davidi* de 18, 26, 34, 45 y 54 días de edad, para el experimento 2.

Tabla 2.4: Resultados de las comparaciones entre grupos divididos por edad (18, 26, 34, 45 y 54 días) y sexo (hembras y machos). Los valores p para cada comparación se indican por encima de la diagonal (\*  $p < 0,05$ ), mientras que los valores z se muestran por debajo de la misma.

	H 18	H 26	H 34	H 45	H 54	M 18	M 26	M 34	M 45	M 54
H 18		0,0068*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,3109	0,0134*	0,0032*	0,0002*	0,0002*
H 26	2,9339		0,0106*	0,0044*	0,0004*	0,0400*	0,0008*	0,0874	0,0028*	0,0002*
H 34	5,1510	2,7268		0,0010*	0,0022*	0,0004*	0,0344*	0,0048*	0,0014*	0,0004*
H 45	7,0542	3,1186	4,4919		0,1550	0,0004*	0,0004*	0,4961	0,4411	0,1984
H 54	8,4907	4,9528	3,5109	0,9887		0,0002*	0,0002*	0,0164*	0,0462*	0,0298*
M 18	0,4062	1,9588	4,6482	4,5246	7,0369		0,0272*	0,1290	0,0012*	0,0002*
M 26	2,6862	4,1925	2,0360	5,5786	5,9291	2,1768		0,0106*	0,0002*	0,0002*
M 34	3,3680	1,4403	3,1177	-0,0963	2,5297	1,1176	2,6736		0,5599	0,1718
M 45	6,5224	3,5505	3,6259	0,0527	1,8235	3,7332	4,2037	-0,2636		0,8322
M 54	7,9550	4,5025	5,1957	0,8237	2,1249	5,2320	6,2978	0,9314	-0,9542	

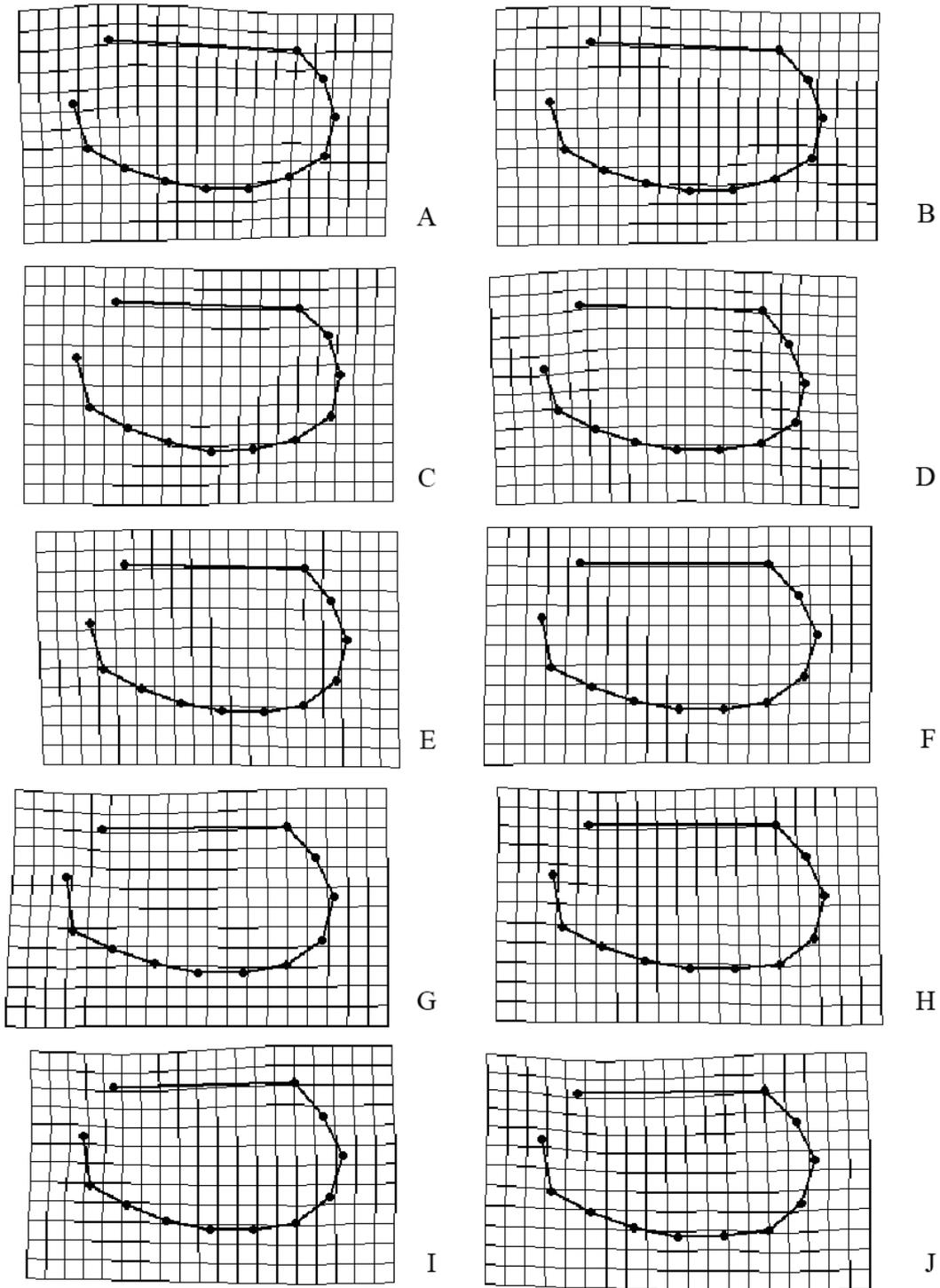


Figura 2.13: Grillas de deformación relativa que ilustran la variación en la forma media del caparazón para hembras de 18 días (A), machos de 18 días (B), hembras de 26 días (C), machos de 26 días (D), hembras de 34 días (E), machos de 34 días (F), hembras de 45 días (G), machos de 45 días (H), hembras de 54 días (I) y machos de 54 días (J) de edad de *Neocaridina davidi* para el experimento 2.

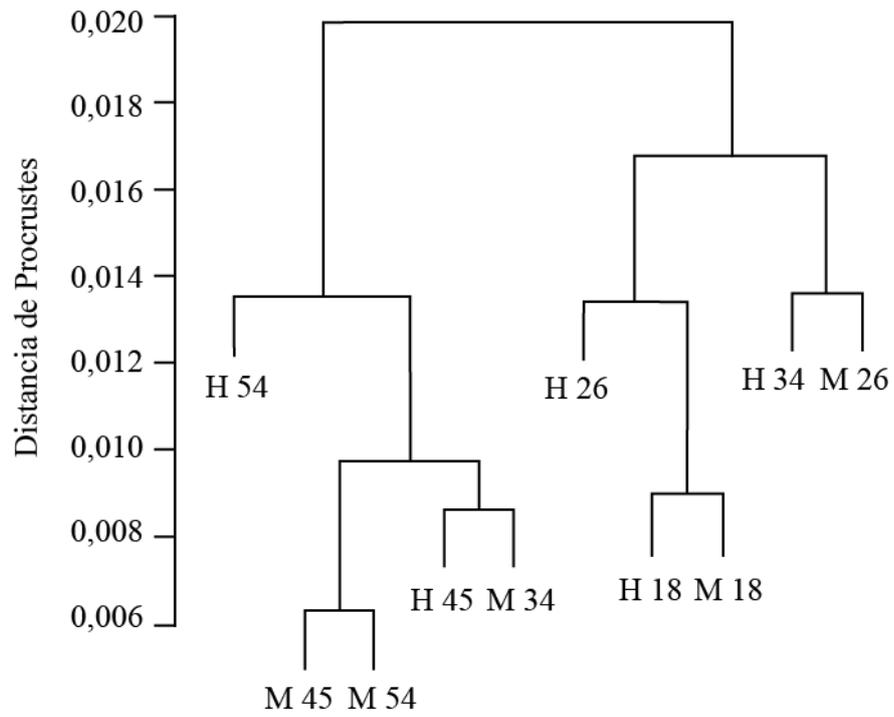


Figura 2.14: Dendrograma (algoritmo UPGMA) de las distancias de Procrustes para hembras y machos de *Neocaridina davidi* de las 5 edades analizadas en el experimento 2.

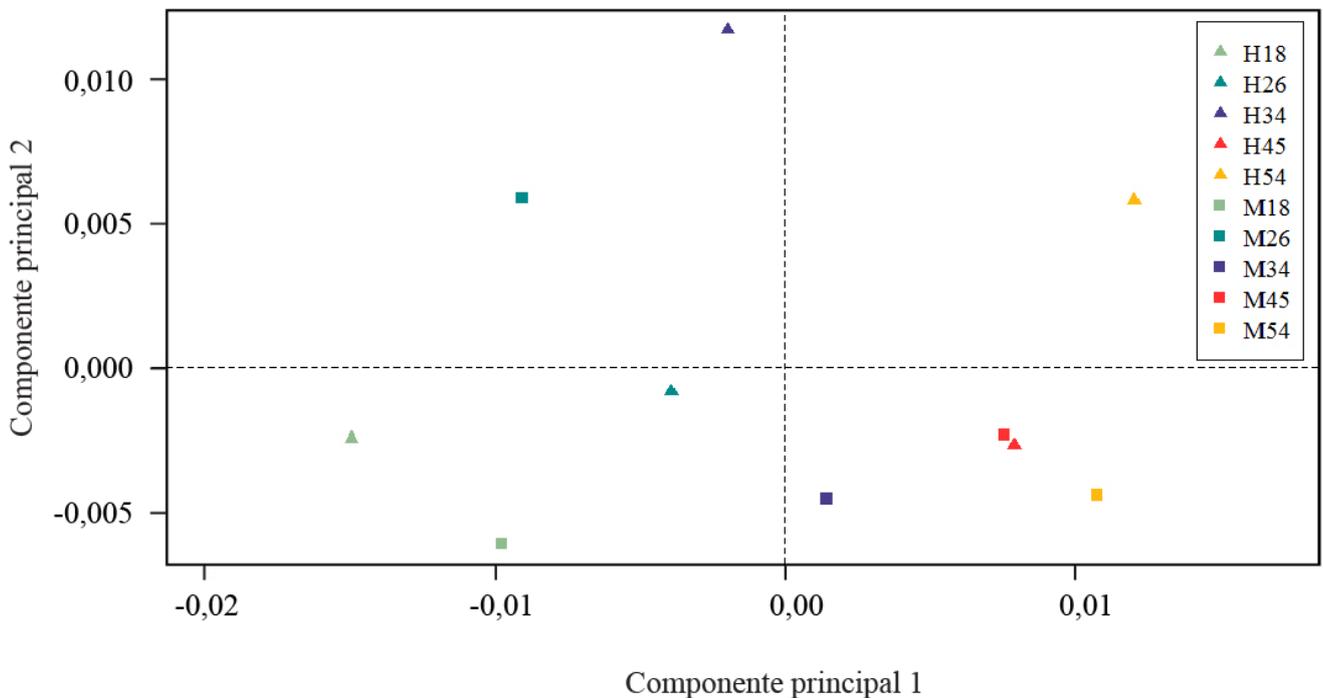


Figura 2.15: Gráfico de dispersión del primer versus el segundo componente principal para las configuraciones medias de cada clase de edad y sexo de *Neocaridina davidi* analizado en el experimento 2.

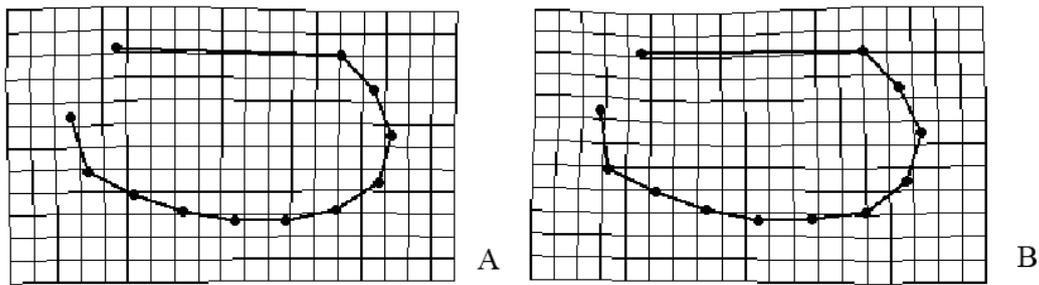


Figura 2.16: Grillas de deformación relativa para las configuraciones medias de los grupos: 18, 26 y 34 días de edad (A) y 45 y 54 días de edad (B) para el caparazón de *Neocaridina davidi*.

## 2.5 Discusión

En el experimento 1, las hembras adultas de *N. davidi* presentaron un caparazón más alargado que los machos. Sin embargo, al analizar la forma del caparazón en hembras juveniles, éstas no se distinguían de los machos. Scalici y Gibertini (2009) encontraron resultados similares en el cangrejo de río *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), donde las hembras y los machos solo mostraron diferencias significativas en la forma de caparazón después de alcanzar la madurez sexual. Los autores lo atribuyeron a presiones selectivas similares en hembras y machos juveniles, frente a diferentes necesidades en la reproducción y selección sexual en hembras adultas. Por lo tanto, la evolución de la forma del cuerpo no solo estaría impulsada por diferentes presiones evolutivas en cada sexo, sino también en diferentes etapas. La presión de selección debida a la fecundidad en las hembras se puede reflejar en los fenotipos específicos del sexo, particularmente en la región que contiene órganos reproductivos (Cheng & Kuntner, 2015). Por lo tanto, las características reproductivas de las hembras podrían estar modulando la variación intraespecífica encontrada en la forma del cefalotórax en *N. davidi*, una especie con huevos de gran volumen, desarrollo directo con una primera etapa lecitotrófica (Pantaleão *et al.*, 2017) y un desarrollo ovárico rápido con un período corto de interpuesta (Tropea & López Greco, 2015). Las gónadas femeninas completamente desarrolladas se extienden dorsalmente en el cefalotórax y alcanzan la primera porción del pleon. Por lo tanto, las diferencias en la forma del caparazón entre hembras adultas y hembras juveniles, y entre hembras adultas y machos también podrían

estar relacionadas con cambios en el inicio de la madurez sexual. En la muda previa al desove, las hembras adquieren una serie de caracteres llamados *breeding dress*. Se agranda el espacio debajo del abdomen, en el que luego se depositará la masa embrionaria durante el desove. A su vez, la pleura de los tres primeros segmentos abdominales aumenta de tamaño y los esternos de estos segmentos se ensanchan. Estos cambios se asocian al desove, la adhesión y la incubación de los embriones debajo del abdomen (Bauer, 2004).

El dimorfismo sexual en la forma del caparazón no se observa en el experimento 2, ya que en el mismo solo se analizaron individuos en los dos primeros meses de vida, es decir, hasta el inicio de la madurez sexual. Sin embargo se observan ligeros cambios en la forma del caparazón a lo largo de la ontogenia, ensanchándose el mismo en la parte ventral a partir de los 45 días de edad que coincide con el inicio del desarrollo gonadal en hembras. Si bien no se pudo observar el desarrollo del testículo en machos, se esperaría que ocurriese en el mismo período, ya que a partir de los 45 días de edad se comenzaron a observar machos con el vaso deferente lleno de espermatozoides.

El tamaño también es sexualmente dimórfico en esta especie, con las hembras en promedio más grandes que los machos (Barbier, 2010), como lo demuestran las diferencias significativas encontradas en el tamaño centroide para el caparazón y en el peso corporal entre sexos. Asimismo, se observó que para una misma edad, la variación en tamaño en las hembras es mayor que en los machos. En los decápodos, se considera que el dimorfismo sexual del tamaño es un buen predictor de los sistemas de apareamiento (Rasch & Bauer, 2016). En un sistema de apareamiento de "pura búsqueda" (promiscuo), según lo descrito por Wickler y Seibt (1981), los machos buscan hasta que encuentran una hembra receptiva, y después de que el macho transfiere el espermatóforo, las parejas se separan. La única forma de competencia entre machos para las hembras receptivas es una búsqueda rápida y eficiente (Bauer *et al.*, 2014). Por lo tanto, los machos pequeños, crípticos y ágiles tendrían una ventaja en la búsqueda en comparación con los más grandes. De este modo, los machos alcanzarían su máximo éxito reproductivo en tallas

pequeñas (Correa & Thiel, 2003; Rasch & Bauer, 2016). Por otro lado, Anderson (1994) señala dos circunstancias en las cuales la selección sexual podría derivar en un dimorfismo sexual, con machos de menor tamaño: poblaciones con alta densidad donde la búsqueda sería más ventajosa que la defensa dada la presencia de numerosos competidores, y la presencia de predadores, en cuyo caso las cópulas breves podrían evitar que las parejas de reproductores queden expuestos.

Rasch & Bauer (2016) estudiaron el sistema de apareamiento del camarón carideo *Ambidexter symmetricus* Manning & Chace, 1971. Esta especie tiene poblaciones de individuos móviles de gran densidad y dimorfismo de tamaño sexual, con hembras más grandes que los machos y poco o ningún dimorfismo sexual en armamento, similar a *N. davidi*. Sus observaciones del comportamiento de apareamiento apoyaron la hipótesis de un sistema de apareamiento de “pura búsqueda”, ya que los machos mostraron poco interés antes de la muda parturial femenina, y copularon con hembras solo después de la misma.

En base a los resultados obtenidos, la hipótesis 1 que dice que la variación en la forma del caparazón se asocia al dimorfismo sexual, es parcialmente rechazada, ya que se observó un dimorfismo sexual solo luego de alcanzada la madurez sexual. En cambio no se rechaza la hipótesis 2, que predice que la variación en la forma del caparazón estará asociada a los cambios ontogenéticos.

En conclusión se evidenciaron diferencias en la forma general del caparazón entre hembras y machos adultos de *N. davidi* y se registraron cambios pequeños a lo largo de la ontogenia y hasta el inicio de la madurez sexual, relacionados al incremento en peso.

Se encontró también que el dimorfismo sexual respecto al tamaño comienza a observarse a partir de los 45 días y es significativo a partir de los 54 días de edad, siendo el peso total y el tamaño centroide del caparazón de las hembras más variable que el de los machos. En promedio las hembras de 54 días de edad pesaron

43,95 ± 18,69 mg (rango: 22,7 - 84,1), mientras que los machos promediaron 30,48 ± 6,7 mg (rango: 18,3 - 51,3).



# CAPÍTULO 3

Efecto del tamaño de los parentales sobre la producción de juveniles en el camarón ornamental *Neocaridina davidi*.

Los resultados del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Sganga, D.E., Tropea, C., Valdora, M., Statti, M.F. & López Greco, L.S.

Large mothers, but not large fathers, influence offspring number in a caridean shrimp.

Canadian Journal of Zoology. 2018. doi: 10.1139/cjz-2017-0315



### 3.1 Introducción

Cuando los recursos disponibles son limitados, los individuos pueden asignarlos diferencialmente al crecimiento, al mantenimiento somático o a la reproducción. Esos recursos limitados pueden ser repartidos de distintas maneras en la producción de progenie. En este contexto, se ha observado en numerosas especies de invertebrados un compromiso entre el número y el tamaño de la progenie: las madres pueden producir una gran cantidad de progenie pequeña, o un número pequeño de progenie de gran tamaño (ver Fox & Czesak, 2000 y Ramirez Llodra, 2002 para revisión).

La teoría clásica de Smith y Fretwell (1974) predice que, dado un ambiente determinado, todas las hembras producirán progenie del mismo tamaño, pero aquellas madres con acceso a una mayor cantidad de recursos podrán producir una mayor cantidad. El tamaño y el número de huevos producidos pueden estar también determinados por restricciones fisiológicas, como por ejemplo la eficiencia con la cual los organismos incorporan nutrientes que puedan luego derivarse al crecimiento y a la reproducción. Dicha eficiencia está determinada por procesos fisiológicos en el sistema digestivo y podría limitar la energía disponible para la producción de huevos. También pueden ser morfológicas: como la estructura ovárica, que al estar directamente relacionada a la oogénesis determina en última instancia la tasa de producción de oocitos, la frecuencia de las puestas y el tamaño y el contenido energético de los huevos; y el tamaño del parental, especialmente en aquellos invertebrados que incuban sus huevos (Fox & Czesak, 2000; Ramirez Llodra, 2002). Generalmente en crustáceos, y particularmente en los camarones carídeos, las madres grandes producen una mayor cantidad de huevos por camada que las hembras pequeñas. Por ejemplo, se encontró una correlación positiva entre el tamaño de la hembra y la fecundidad en el Alvinocarididae *Mirocaris fortunata* (Martin & Christiansen, 1995) (Ramirez Llodra *et al.*, 2000), en el Atyidae *Neocaridina denticulata denticulata* (De Haan, 1844) (Oh *et al.*, 2003), en el Campylonotidae *Campylonotus vagans* Spence Bate, 1888 (Thatje *et al.*, 2004), en el Crangonidae *Notocrangon antarcticus* (Pfeffer, 1887), en los Hippolytidae

*Eualus gaimardii gaimardii* (H. Milne-Edwards, 1837) y *Chorismus antarcticus* (Pfeffer, 1887), en el Nematocarcinidae *Nematocarcinus lanceopes* Spence Bate, 1888 (Clarke, 1993), en los Oplophoridae *Acanthephyra pelagica* (Risso, 1816), *A. purpurea* H. Milne-Edwards, 1881 y *A. kingsleyi* Spence Bate, 1888 (Ramirez Llodra, 2000), en los Palaemonidae *Palaemon northropi* (Rankin, 1898), *P. pandaliformis* (Stimpson, 1871), *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), y *M. olfersii* (Wiegmann, 1836) (Anger & Moreira, 1998), y en los Pasiphaeidae *Systemaspis debilis* (A. Milne-Edwards, 1881) y *Parapasiphae sulcatifrons* Smith, 1884 (Ramirez Llodra, 2000). La relación entre el tamaño corporal y la fecundidad podría estar relacionada con el límite físico que es impuesto por la cámara de incubación a los huevos, limitando así el número de embriones a ser incubados (Ramirez Llodra, 2002; Guay *et al.*, 2011) y por el tamaño del ovario maduro dentro del cefalotórax o pleon. En cangrejos brachiuros, por ejemplo, el espacio disponible para la acumulación de vitelo en el cefalotórax limita el tamaño de la puesta, el cual corresponde aproximadamente al 10 % del tamaño de la hembra (Hines, 1982, 1991).

En cuanto al tamaño del macho, se ha encontrado una correlación positiva entre dicha variable y el tamaño del eyaculado en algunas especies de crustáceos decápodos, como las langostas espinosas *Panulirus argus* (Latreille, 1804), *P. guttatus* (Latreille, 1804) y la langosta de las rocas *Jasus edwardsii* (Hutton, 1875), lo que llevaría en ciertos casos a la limitación espermática. Esto podría tener una influencia en el tamaño de la puesta aún mayor que el tamaño de la hembra (MacDiarmid & Sainte-Marie, 2006; Butler *et al.*, 2015). Tanto la fecundidad como el tamaño de los huevos son características comúnmente utilizadas para evaluar la calidad de la progenie. Este término hace referencia a un conjunto de parámetros que tienen un valor predictivo para identificar tempranamente animales fuertes y sanos, preferidos para el cultivo a gran escala. Podemos agrupar los criterios para evaluar la calidad de progenie en distintas categorías según su enfoque: *morfológicos*, *bioquímicos*, *comportamentales*, *de supervivencia a pruebas de estrés* y *de rendimiento de la producción*. Entre los morfológicos encontramos la

fecundidad y el tamaño de los huevos que fueron previamente mencionados, a los que se suman el volumen de los huevos, el tamaño y peso de las larvas o juveniles, su color, la presencia de deformidades, la morfología de las branquias y del sistema digestivo, la relación músculo/tubo digestivo y ocasionalmente también se utiliza la presencia de bacterias, hongos, protozoos y virus (Racotta *et al.*, 2003, 2004). La composición bioquímica es otro de los criterios predictivos utilizados. La calidad de la progenie está fuertemente influenciada por la cantidad de recursos que las hembras derivan a sus embriones, entre los que podemos nombrar a las proteínas, los lípidos, los carbohidratos, aminoácidos libres y los antioxidantes, como los carotenoides (Tropea & López Greco, 2015; Weiss *et al.*, 2011). Los lípidos y proteínas tienen un rol estructural y de reserva energética durante el desarrollo embrionario y larval, y su concentración ha sido asociada a la calidad de progenie. Los carbohidratos también son otra fuente de reserva energética pero se encuentran en menos cantidad. Sin embargo, dado su rol en la síntesis de quitina, podrían influenciar el desempeño de las crías durante los ciclos de muda. En último lugar, los criterios de producción agrupan a la fecundidad, la tasa de fecundación y de eclosión y la supervivencia de las larvas o juveniles (Calado 2008; Bray & Lawrence, 1992; Palacios *et al.*, 2001; Racotta *et al.*, 2003, 2004).

El desempeño reproductivo y la calidad de progenie pueden verse afectados entonces tanto por las condiciones de cultivo de los reproductores como por efectos maternos (Racotta *et al.*, 2003). Hasta el momento solo algunos estudios han abordado esta relación en *Neocaridina davidi*. Tropea *et al.* (2015) y Baliña *et al.* (2018) evaluaron el efecto de la temperatura del agua sobre el crecimiento, la reproducción y la calidad de progenie de esta especie. Namaei Kohal *et al.* (2017) estudiaron el efecto de la inclusión en la dieta de *Arthrospira (Spirulina) platensis* Gomont, 1892 sobre el crecimiento, la supervivencia y la reproducción de *N. davidi* y posteriormente Marciano *et al.* (2018) analizaron la relación entre la edad materna, el desempeño reproductivo y la calidad de su progenie. En particular, aunque se ha observado una relación entre la calidad y cantidad de huevos producidos por esta especie y el tamaño materno (Tropea &

López Greco, 2015; Tropea *et al.*, 2018), aún resta dilucidar en qué medida influye el tamaño parental sobre la progenie en el tiempo.

En crustáceos decápodos usualmente se estudian los efectos maternos sobre la calidad de progenie en los estadios iniciales del desarrollo, como embriones o larvas (Attard & Hudon, 1987; Gardner, 1997; Moland *et al.*, 2010; Sato & Suzuki, 2010; Swiney *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2017 entre otros). Sin embargo, se ha observado en algunas especies de vertebrados, como el ave *Ficedula albicollis* (Temminck, 1815) y la salamandra *Ambystoma talpoideum* (Holbrook, 1838), e incluso en el crustáceo branchiopodo *Daphnia magna* Straus, 1820, que la influencia parental sobre la progenie podría continuar durante un período prolongado, persistiendo a lo largo de la ontogenia e inclusive afectando a las generaciones subsiguientes (Bernardo, 1996; Qvarnström & Price, 2001). Por lo tanto, sería importante extender el análisis de la relación entre el tamaño parental y la calidad de progenie, tanto a juveniles como a adultos de la siguiente generación, para evaluar así como impacta dicha variable sobre la calidad de las siguientes camadas de reproductores en el cultivo de *N. davidi*.

### 3.2 Objetivo

Evaluar el efecto del tamaño de los parentales (machos grandes y chicos, y hembras grandes y chicas) sobre la producción de juveniles de tal modo de definir un rango óptimo de tamaño de parentales que permita obtener el mayor número de juveniles y de mejor calidad.

En el marco de dicho objetivo se plantearon las siguientes hipótesis:

**Hipótesis 3:** El desempeño reproductivo de las hembras, en términos de su fecundidad actual, se incrementa con el tamaño parental.

**Hipótesis 4:** La calidad de la progenie difiere para distintos tamaños de reproductores.

### 3.3 Materiales y métodos

#### 3.3.1 Obtención de ejemplares

Se obtuvo un lote de reproductores de *N. davidi* de un proveedor local (Acuario Acuamanus, Buenos Aires, Argentina). Los juveniles obtenidos a partir de dicho lote fueron colocados en acuarios plásticos conteniendo agua de clorada, y mantenidos en las condiciones descritas en el capítulo 2. Los mismos fueron observados diariamente y las hembras fueron separadas de los machos al observarse los ovarios incipientes a través del cefalotórax (aproximadamente a partir de los 30 días). De esta manera se aseguró que al comienzo del experimento todos los individuos fuesen vírgenes. Dado que en los camarones el tamaño y la edad están relacionados, y que ambos pueden afectar el desempeño reproductivo tanto en hembras como en machos, es importante separar los efectos de estos factores para su estudio (Crococ & Coman, 1997; Marshall *et al.*, 2010). Por este motivo se procuró utilizar individuos de la misma edad. Además, solo se utilizaron aquellos individuos que alcanzaron la madurez sexual, lo cual ocurrió alrededor de los 60 días. La misma fue evaluada externamente observando a través de la cutícula translúcida el ovario de color amarillo intenso extendiéndose desde la parte media del cefalotórax hasta el tercer segmento abdominal (estadio IV de la maduración ovárica, según Tropea *et al.*, 2018) (Fig. 3.1A) en las hembras, y en los machos el vaso deferente distal que se observa como un tubo blanquecino posicionado dorsolateralmente respecto al órgano perigástrico en el cefalotórax (Tomas *et al.*, 2019) (Fig. 3.1 B). A continuación, hembras y machos fueron pesados en una balanza Mettler AE 160 (precisión: 0,01 mg) y divididos en cuatro grupos según su peso: hembras pequeñas (40-70 mg), hembras grandes (80-110 mg), machos pequeños (20-30 mg) y machos grandes (36-50 mg).

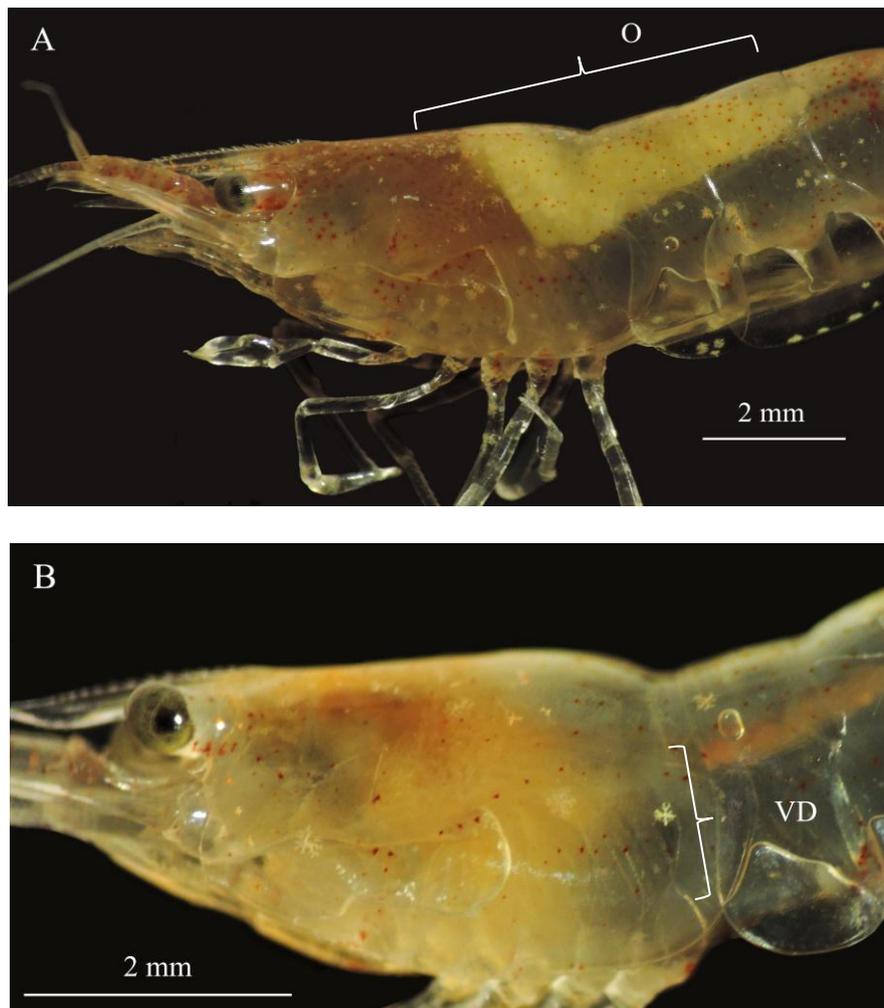


Figura 3.1: Madurez sexual en *Neocaridina davidi*: el ovario maduro puede observarse de color amarillo intenso a través de la cutícula, extendiéndose desde la parte media del cefalotórax hasta el tercer segmento abdominal de la hembra (A), la porción distal del vaso deferente se observa en la parte posterior del cefalotórax del macho como un tubo blancucino (B). O: ovario; VD: vaso deferente.

### 3.3.2 Diseño experimental

Cada réplica estaba conformada por una hembra y un macho de la misma edad y colocados en un acuario plástico (18 x 12,5 x 12 cm) conteniendo un volumen de 2 L de agua dechlorada (Fig. 3.2). Las parejas de reproductores ( $n = 40$ ) contemplaban todas las combinaciones de tamaños de parentales, es decir: hembras pequeñas con machos pequeños, hembras pequeñas con machos grandes, hembras grandes con machos pequeños y hembras grandes con machos grandes. Las mismas fueron revisadas diariamente a fin de determinar la presencia de hembras ovígeras. Luego de la eclosión, la pareja de reproductores fue pesada (peso materno y peso paterno). Se

registró la fecha de desove y de eclosión de los juveniles para cada réplica. Ambas fechas fueron utilizadas para calcular la DURACIÓN DEL PERÍODO DE INCUBACIÓN de cada puesta. El número de juveniles eclosionados (Juveniles I: JI) fue contado como medida de la FECUNDIDAD ACTUAL (número de juveniles eclosionados por puesta por hembra). Se tomó una muestra al azar de 10 JI de cada puesta, la misma fue pesada (precisión: 0,01 mg) y se calculó el PESO PROMEDIO DE LOS JI dividiendo el peso total por el número de JI (peso inicial). Si bien los primeros estadios post-eclosión de *N. davidi* no pueden ser sexados, Pantaleão *et al.* (2017) observó que el tamaño de las hembras y los machos son similares en los primeros estadios del desarrollo. Por lo tanto, se asumió que el peso inicial de las hembras y el peso inicial de los machos eran iguales (peso inicial de las crías hembras = peso inicial de las crías machos = peso inicial). Otra muestra de 15 JI por puesta fue seleccionada al azar y colocada en un acuario plástico (18 x 12,5 x 12 cm) en las condiciones de cría descritas anteriormente para evaluar su crecimiento durante un período de 60 días. Al finalizar este período se registró la SUPERVIVENCIA de las crías. Los individuos fueron sexados y pesados (precisión: 0,01 mg) y se calculó en promedio el peso final de las crías hembras y peso final de las crías machos. El *incremento en peso* fue calculado para machos y hembras de manera separada según la siguiente fórmula:

$IP = 100 \times [(P_f - P_i) / P_i]$ , donde  $P_f$  es el peso final de las crías y  $P_i$  es el peso inicial de las crías.

Luego de ser pesados, las crías de 60 días de edad fueron anestesiadas por inmersión en agua a 0 °C y luego sacrificadas y almacenadas a -20 °C para determinaciones bioquímicas. Hembras y machos fueron analizados por separado. Se calculó la PROPORCIÓN DE SEXOS dividiendo la cantidad de hembras por muestra sobre el total.

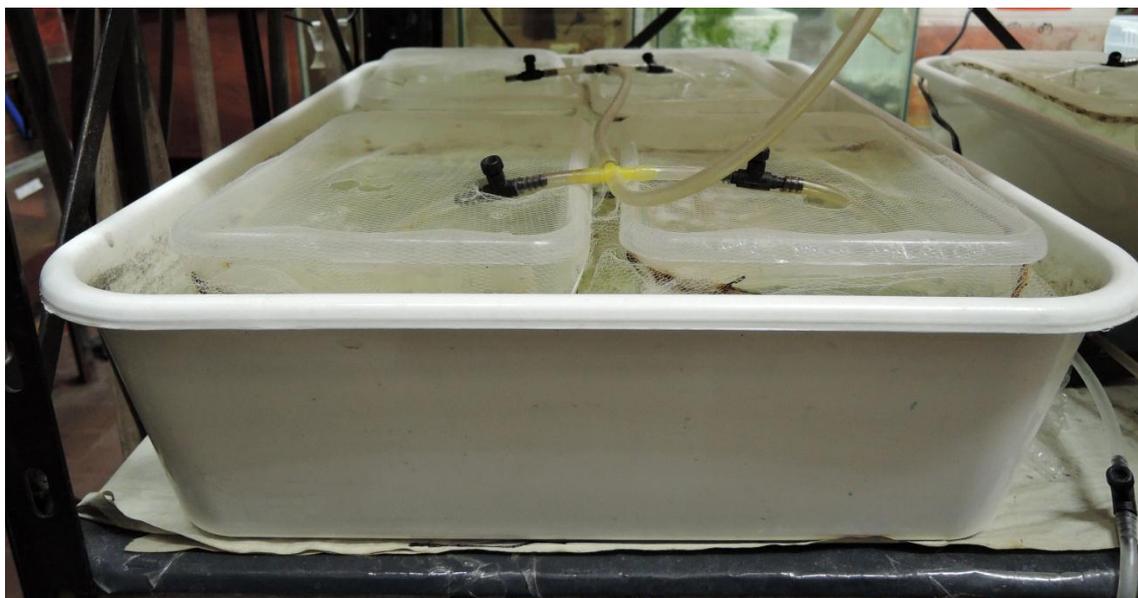


Figura 3.2: Bandeja conteniendo 4 acuarios plásticos (cada una es una réplica), cada uno de ellos con una pareja de reproductores de *Neocaridina davidi*.

### 3.3.3 Determinaciones bioquímicas

El CONTENIDO DE PROTEÍNAS, LÍPIDOS y GLUCÓGENO en los camarones fue determinado espectrofotométricamente, según los métodos descritos por Bradford (1976), Folch *et al.* (1951, 1957), y Van Handel (1965), respectivamente, y modificados para la especie por Tropea *et al.* (2015).

Para la determinación de proteínas, se pesaron muestras de tejido de entre 20 y 100 mg y se homogeneizaron en buffer Tris-HCl 50 mM y pH 7,5 en una proporción de 4:1 volumen: peso. Luego fueron centrifugadas a 10.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4 °C por 30 minutos. El contenido total de proteínas fue medido en el sobrenadante por medio del ensayo de Bradford o azul brillante de Coomassie G-250. La absorbancia fue leída a 595 nm y comparada contra un patrón acuoso de albúmina de suero bovino (fracción V, Standard®) (concentración: 1 mg/mL). Para la determinación del contenido lipídico, muestras de entre 50 y 200 mg fueron homogeneizadas en una mezcla de cloroformo y metanol (2:1, v/v) en una proporción 20:1 volumen: peso. Luego fueron lavadas con NaCl 0,9 % en una proporción de 1:5 volumen: volumen y centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos para separar la fracción lipídica. El lavado y

el centrifugado fueron repetidos 2 veces. Se cuantificó el contenido total de lípidos por el método sulfo-fosfo vainillina, utilizando un reactivo de fosfovainillina modificado: fosfato de potasio monobásico 0,44 M y vainillina 0,016 M en agua destilada. Se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico a una alícuota de 20  $\mu$ l de la fracción lipídica y luego 2,5 mL del reactivo de fosfovainillina. Se midió la absorbancia a 530 nm, utilizando como patrón aceite de oliva extra virgen diluido en etanol absoluto (concentración: 1 mg/mL). Para la determinación del contenido de glucógeno, se pesaron muestras de tejido de entre 30 y 100 mg. Las mismas fueron hervidas durante una hora con KOH 30 % en una proporción 4:1 volumen: peso. Luego de enfriarse, el glucógeno fue precipitado por medio de la adición de 75  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 1875  $\mu$ l de etanol absoluto. Se centrifugó a 2000 rpm por 10 min y luego se disolvió el precipitado en 1 mL de agua destilada. El contenido de glucógeno fue medido por el método de antrona con una solución de antrona 0,2 % en ácido sulfúrico 95 %, como se describe en Seifter *et al.* (1950). Se utilizó glucógeno de hígado de conejo (Fluka®; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) como patrón (concentración: 1 mg/mL), y la absorbancia fue medida a 620 nm.

#### 3.3.4 Análisis estadístico

La exploración de datos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Zuur *et al.* (2010). Se construyeron modelos de regresión lineal mediante el método de eliminación paso a paso (hacia atrás) para analizar la asociación entre las *variables explicatorias* peso materno y peso paterno y las siguientes *variables respuesta*: fecundidad actual, peso promedio de los JI, composición bioquímica (contenido de proteínas, lípidos y glucógeno) en crías de 60 días de edad e incremento en peso en crías para el período 0-60 días. En la exploración de datos de la variable fecundidad actual, se detectaron observaciones atípicas, por lo tanto se realizó una regresión lineal robusta con una constante de calibración de 3,44, para una eficiencia del 85 % (Maronna *et al.*, 2006). Para la duración del período de incubación, se construyó un modelo lineal generalizado con distribución de Poisson (función link log). Dado que se observaron datos sub

dispersos, se utilizó una estructura de error cuasi-binomial. La asociación entre el peso materno y paterno y la variable proporción de sexos en la progenie fue analizada mediante un modelo lineal generalizado con distribución binomial y función logit. El peso materno y paterno, al igual que sus interacciones, fueron incluidos como factores fijos en todos los modelos. La variable sexo de la progenie fue incluida como variable explicatoria categórica en el análisis de las variables composición bioquímica en crías de 60 días de edad e incremento en peso en crías para el período 0-60 días. Se utilizó un criterio basado en la teoría de la información para la selección del conjunto óptimo de variables explicatorias para cada modelo (Burnham & Anderson, 2002). Los supuestos de cada modelo se estudiaron gráficamente siguiendo a Zuur *et al.* (2007). Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando los paquetes lme4 y robustbase (Bates *et al.*, 2015; Maechler *et al.*, 2016) para el programa R (R Core Team, 2016). El nivel de significación empleado fue 0,05. Se utilizó el método de Bonferroni (Dunn, 1961) para el ajuste del valor p por contrastes múltiples para el análisis de los contenidos de proteínas, lípidos y glucógeno, y se consideraron estadísticamente significativas aquellas pruebas con  $p < 0,05/3 = 0,0167$ . Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el desvío estándar.

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 Desempeño reproductivo de las hembras

El 85% de las 40 parejas de reproductores desovaron durante el periodo experimental. En promedio, el desove ocurrió luego de  $17,82 \pm 24,36$  días desde el inicio del experimento. En los casos en que el desove fue más tardío se observó en las hembras la reabsorción del ovario seguido de una remaduración del mismo. Esta reabsorción se registró incluso más de una vez para algunas hembras. Se encontró que la fecundidad actual, con una media de  $29,15 \pm 15,47$  (rango: 1 - 71) juveniles eclosionados por puesta por hembra, estaba relacionada con el peso materno pero no así con peso paterno ( $t = 2,162$ ,  $p = 0,038$ ) (Tabla 3.1, Fig. 3.3). La duración del periodo de incubación, por otro lado, no estuvo asociada al peso materno o al peso paterno, y

promedió  $14,97 \pm 1,24$  días (Tabla 3.1, Fig. 3.3).

Tabla 3.1: Comparación de los modelos para las variables fecundidad actual y duración del período de incubación en hembras de *Neocaridina davidi* (\*  $p < 0,05$ )

Variable respuesta	Variabes explicatorias	$R^2 / D^2$
Fecundidad actual	peso materno *	0,153
Duración del periodo de incubación	peso materno x peso paterno	0,085
	peso materno + peso paterno	0,057
	peso paterno	0,032
	peso materno	0,011

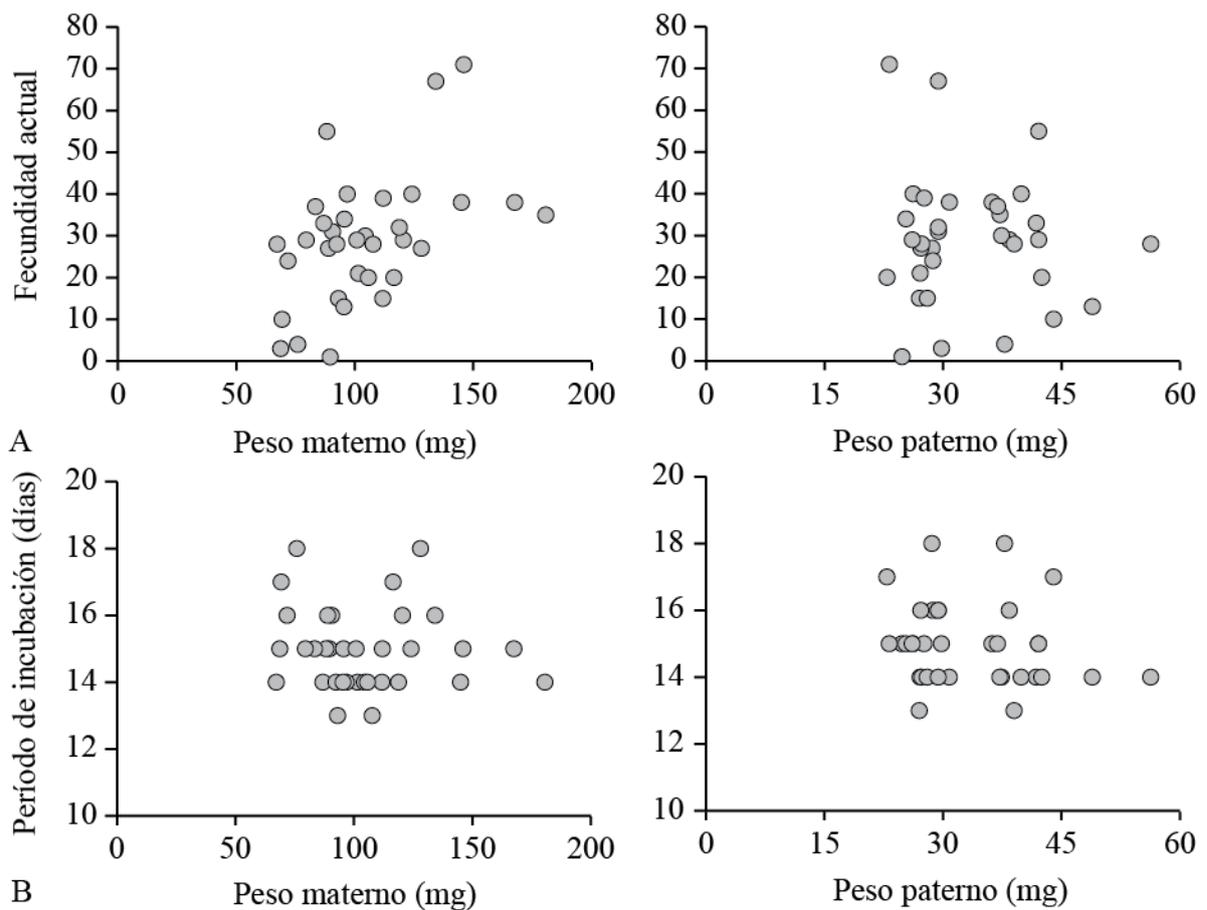


Figura 3.3: Desempeño reproductivo en hembras de *Neocaridina davidi*. Se estudió la asociación entre el peso materno y paterno, y las variables fecundidad actual (número de juveniles eclosionados por puesta por hembra) (A) y la duración del período de incubación (B) ( $n = 34$ ).

### 3.4.2 Calidad de progenie

La supervivencia de las crías luego de un período de crecimiento de 60 días, que fue en promedio  $95,15 \pm 6,17$  %, no estuvo asociada al peso materno o al peso paterno, al igual que ocurrió con la variable proporción de crías hembras, la cual tuvo un valor promedio de  $50,83 \pm 13,57$  % (Tabla 3.2, Fig. 3.4). Tampoco se encontró asociación entre el peso promedio de los JI y el peso materno o paterno. El valor medio de dicha variable fue  $63,00 \pm 24,27$   $\mu\text{g}$  (Tabla 3.2, Fig. 3.5 A). Durante el período de 60 días posterior a la eclosión la mayoría de los camarones alcanzaron la madurez sexual, con una masa final promedio de  $53,82 \pm 8,11$  mg para las crías hembra y  $35,25 \pm 3,54$  mg para las crías macho. No se observó canibalismo en ningún acuario, mientras que sí se observaron hembras ovígeras en todos ellos. El peso materno y el peso paterno no estuvieron asociadas con el incremento en peso en crías para el período 0-60 días, pero fue  $55,74$  % mayor en crías hembras que en crías machos ( $t = -2,548$ ;  $p = 0,017$ ) (Tabla 3.2, Fig. 3.5 B, C). El contenido de proteínas, lípidos y glucógeno en crías hembras y machos de 60 días no estuvo asociado al peso materno o paterno (Tabla 3.3; Fig. 3.6, 3.7 A, 3.8). Sin embargo, el contenido lipídico fue  $34,89$  % mayor en crías hembras que en crías machos ( $t = -3,172$ ,  $p = 0,003$ ) (Fig. 3.7 B).

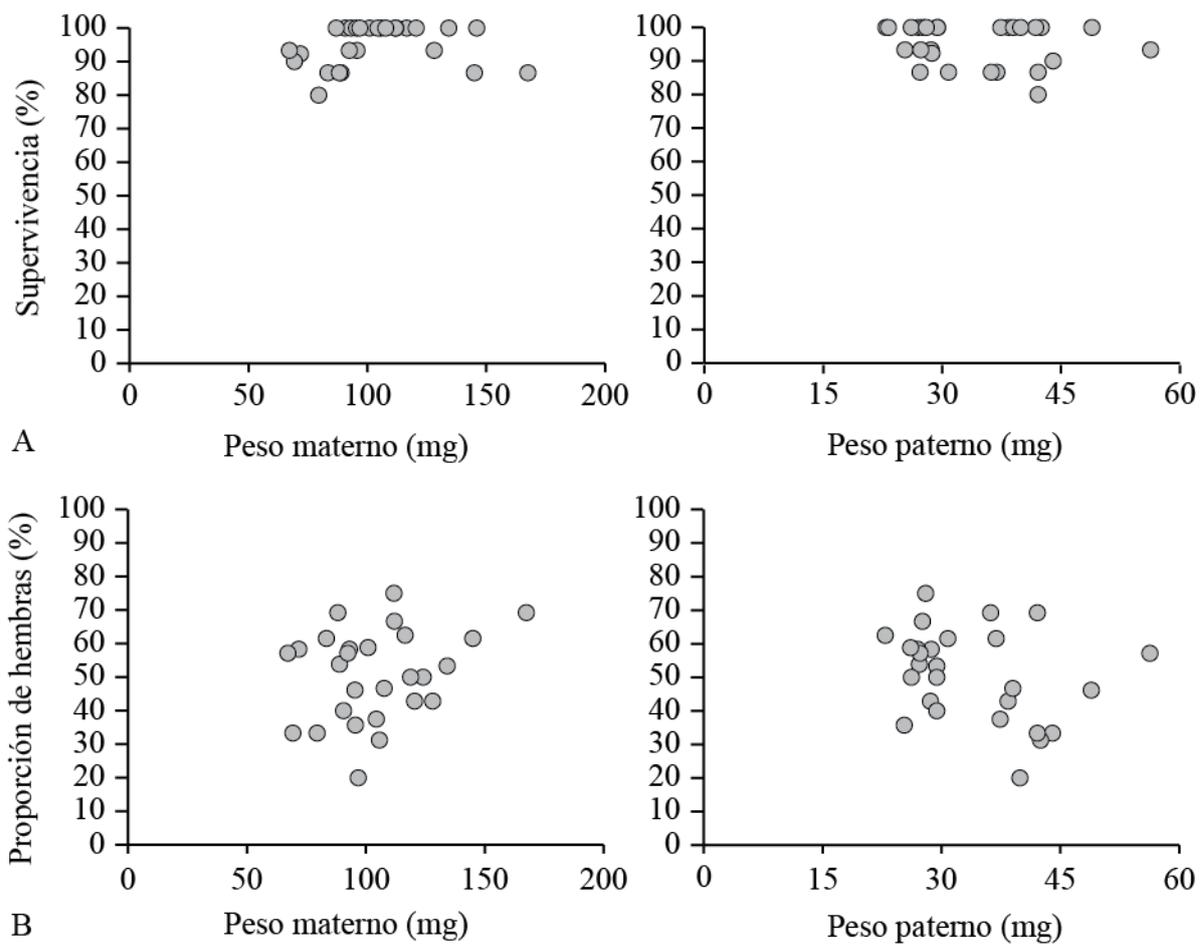


Figura 3.4: Calidad de progenie en *Neocaridina davidi*. Se estudió la asociación entre el peso materno y paterno y las variables: supervivencia de las crías luego de un período de crecimiento de 60 días (A) proporción de crías hembras (B) ( $n = 27$ ).

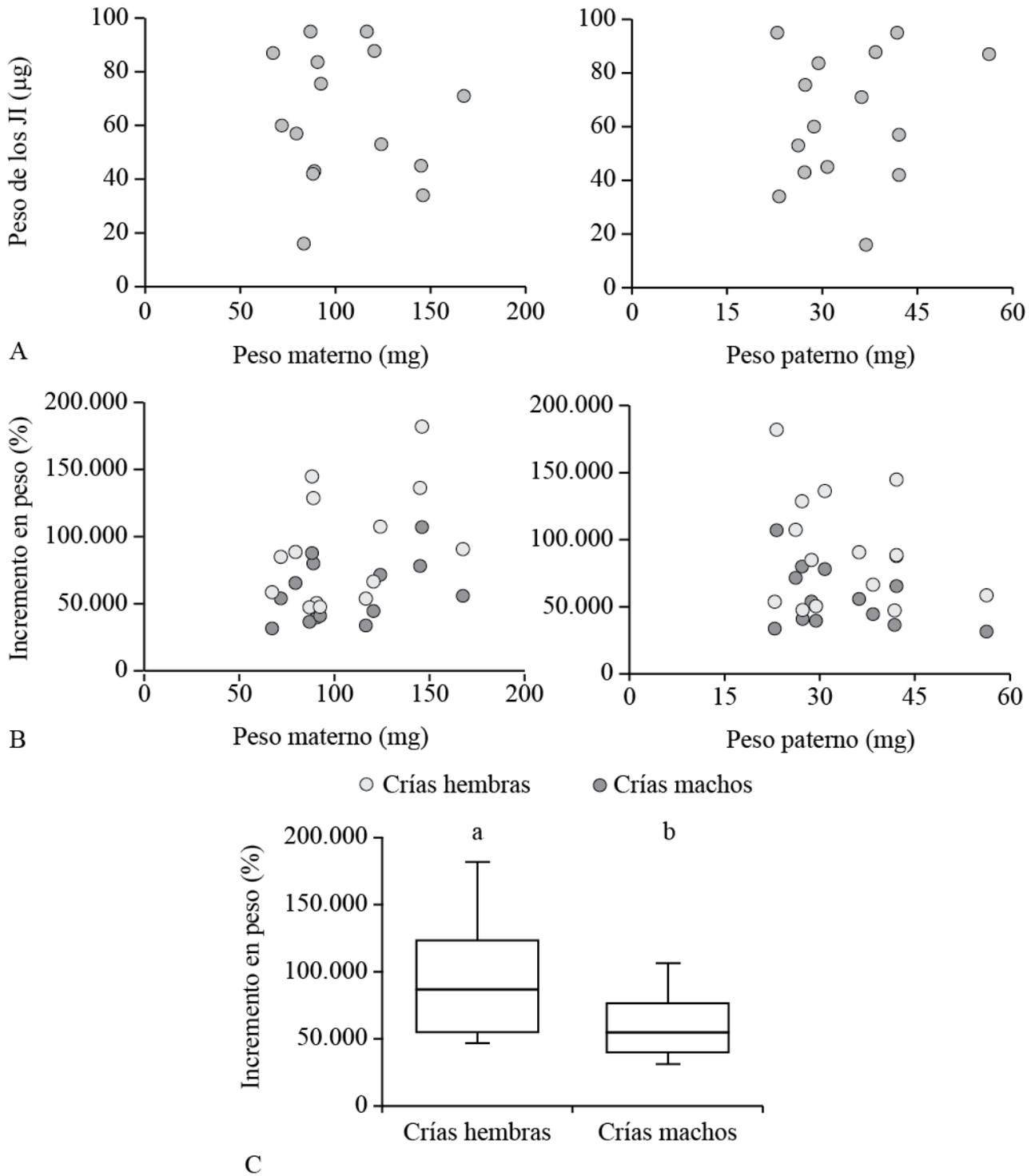


Figura 3.5: Calidad de progenie en *Neocaridina davidi*. Se estudió la asociación entre el peso materno y paterno y las variables: peso promedio de los JI (A) e incremento en peso en crías para el período 0-60 días (B) ( $n = 15$  y  $28$ , respectivamente). Para esta última, se incluyó en el análisis la variable explicatoria categórica: sexo de la progenie. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sexos (C).

Tabla 3.2: Comparación de los modelos óptimos para las variables supervivencia de las crías, proporción de crías hembras, peso promedio de los JI e incremento en peso en crías para el período 0-60 días de *Neocaridina davidi* (\*  $p < 0,05$ ).

Variable respuesta	VARIABLES explicatorias	$R^2 / D^2$	AIC
Supervivencia	peso materno x peso paterno	2,825	65,020
	peso materno + peso paterno	2,685	66,861
	peso paterno	2,232	65,020
	peso materno	1,550	65,259
Proporción de hembras	peso materno x peso paterno	23,963	128,208
	peso materno + peso paterno	10,577	132,716
	peso paterno	6,797	132,387
	peso materno	7,640	131,985
Peso de los JI	peso materno x peso paterno	0,047	-60,749
	peso materno + peso paterno	0,040	-62,638
	peso paterno	0,040	-64,638
	peso materno	0,007	-64,126
Incremento en peso	sexo de la progenie *	0,200	667,997

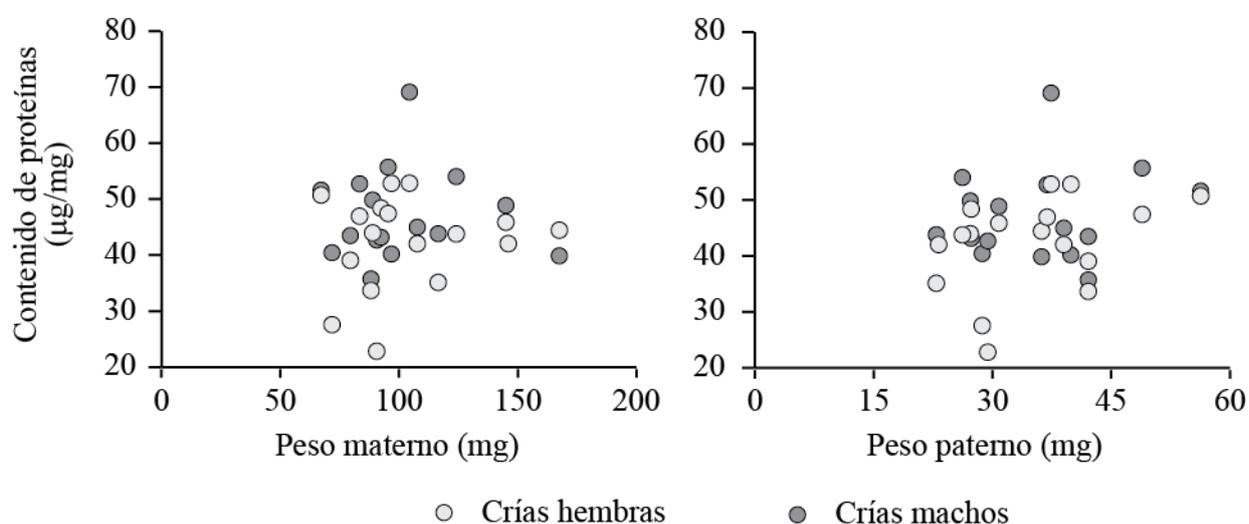


Figura 3.6: Contenido de proteínas de hembras y machos de *Neocaridina davidi* luego de un periodo de crecimiento de 60 días posterior a la eclosión ( $n = 33$ ). Su asociación con el peso materno y paterno fue analizado para las crías hembras y machos por separado.

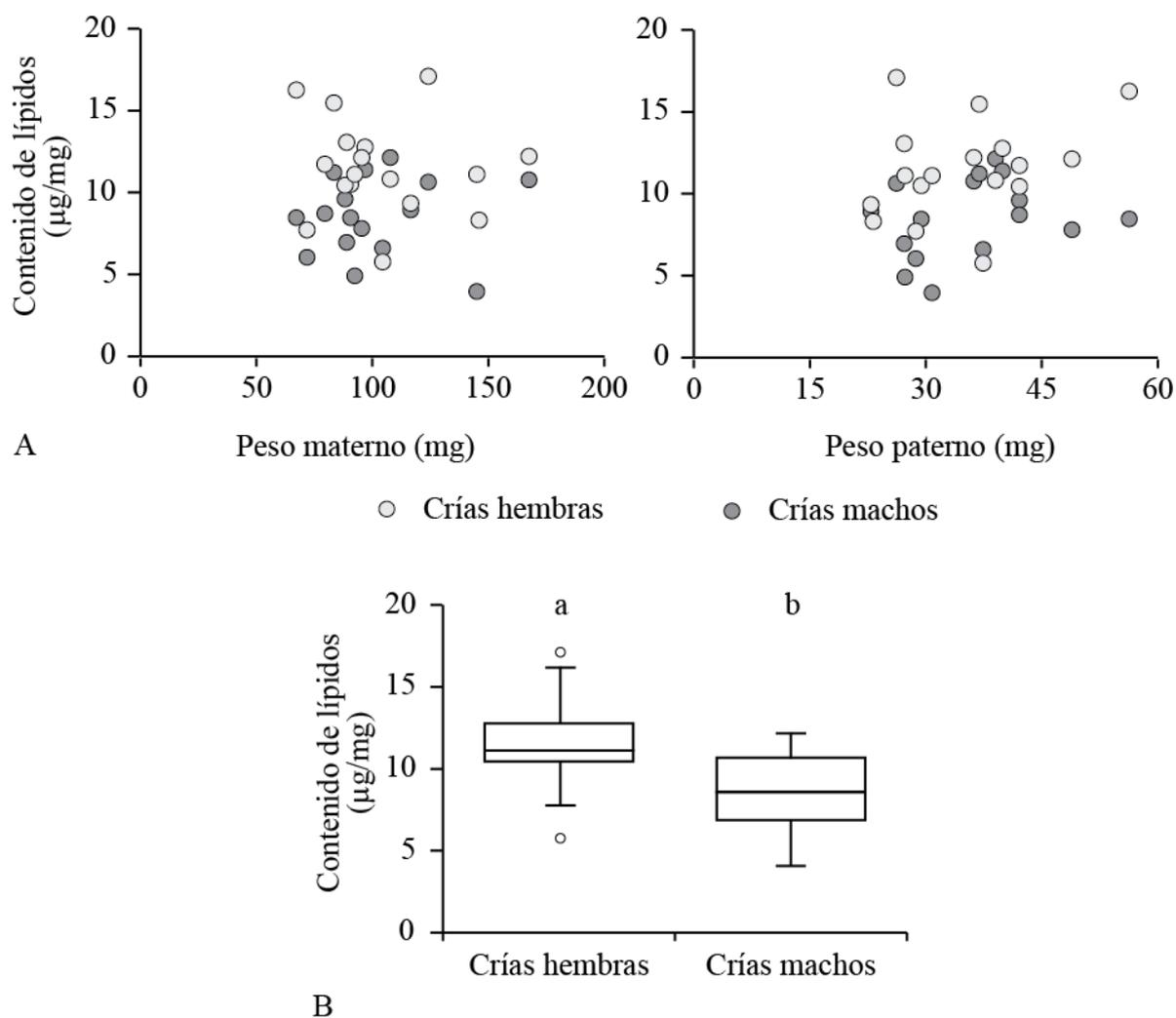


Figura 3.7: Asociación entre el contenido de lípidos de hembras y machos de *Neocaridina davidi* luego de un periodo de crecimiento de 60 días posterior a la eclosión. ( $n = 33$ ) y el peso materno y paterno (A). El análisis se realizó para las crías hembras y machos por separado. Se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,0167$ ) en el contenido lipídico entre sexos (B).

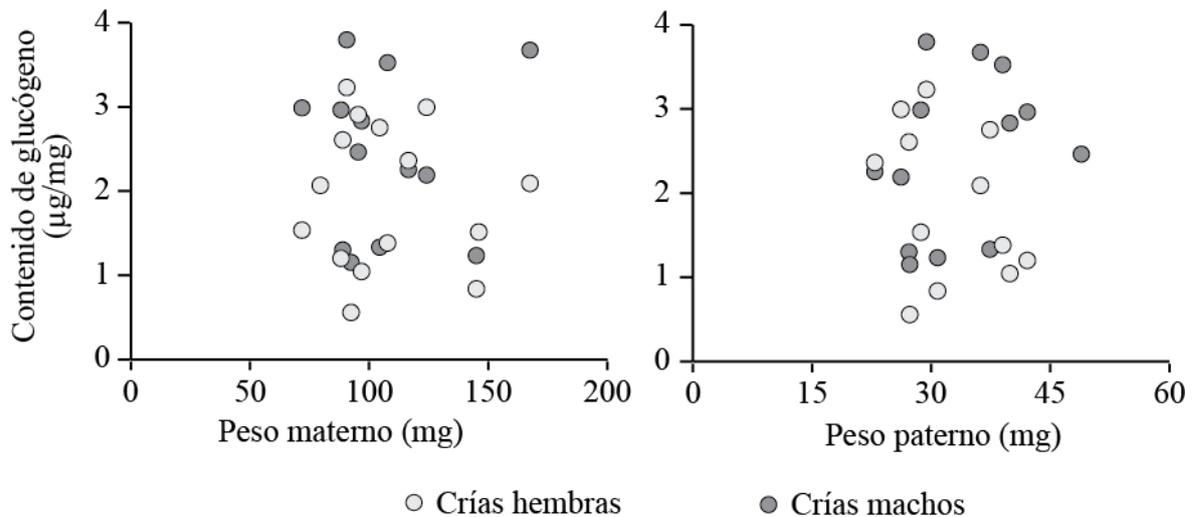


Figura 3.8: Contenido de glucógeno de hembras y machos de *Neocaridina davidi* medido luego de un periodo de crecimiento de 60 días posterior a la eclosión ( $n = 28$ ). Se estudió su asociación con el peso materno y paterno. El análisis se realizó por separado para las crías hembras y machos.

Tabla 3.3: Comparación de los modelos óptimos para las variables respuesta: contenido de proteínas, lípidos y glucógeno en crías hembras y machos de *Neocaridina davidi* de 60 días (\*  $p < 0,0167$ ).

Variables respuesta	Variables explicatorias	R <sup>2</sup>	AIC
Contenido de proteínas	peso materno x peso paterno x sexo de la progenie	0,226	243,817
	peso materno + peso paterno + sexo de la progenie	0,181	237,688
	peso paterno + sexo de la progenie	0,150	236,896
	sexo de la progenie	0,086	237,304
Contenido de lípidos	sexo de la progenie *	0,245	163,117
Contenido de glucógeno	peso materno x peso paterno x sexo de la progenie	0,164	86,816
	peso materno + peso paterno + sexo de la progenie	0,096	81,005
	peso paterno + sexo de la progenie	0,096	79,008
	sexo de la progenie	0,076	77,627

### 3.5 Discusión

La fecundidad es uno de los criterios más ampliamente utilizados para evaluar la producción de juveniles en crustáceos (Racotta *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos indicarían que en *N. davidi* existe una correlación entre la fecundidad actual y el peso materno. Esto difiere de lo obtenido por Tropea y López Greco (2015) en la misma especie, quienes reportaron una relación estadísticamente significativa entre la fecundidad realizada (es decir, el número de huevos por puesta por hembra) y el peso materno, pero no así entre la fecundidad actual y la masa materna. Las autoras plantean como hipótesis que a pesar de que las hembras de mayor tamaño pusieron más huevos, podría haber existido una pérdida de huevos más acentuada en éstas que en las hembras pequeñas. Esto podría entonces llevar a una producción de juveniles similar, independientemente del tamaño de la hembra. Si bien en el presente estudio no fue posible medir la pérdida de huevos, sería esperable que de haber existido hubiera afectado a las hembras de todos los tamaños del mismo modo. Por lo tanto a valores crecientes de fecundidad realizada, mayor será el número de juveniles I eclosionados. Guay *et al.* (2011) en su estudio sobre los efectos maternos en el camarón carídeo *Sclerocrangon boreas* (Phipps, 1774), sugirió que el número de huevos por puesta y el tamaño de la progenie están condicionados por restricciones anatómicas no adaptativas, ya que tanto los huevos como la progenie, posteriormente en el desarrollo, deben caber en las estructuras reproductivas de la hembra. Estas restricciones anatómicas serían de particular importancia en especies con desarrollo directo (Marshall & Keough, 2007), como en *N. davidi*. También se observó un incremento en la fecundidad actual con el peso materno en otras especies con desarrollo directo como la langosta australiana *Cherax destructor* Clark, 1936 (Austin, 1998; Truong *et al.*, 2002), la langosta de pinzas rojas *C. quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Tropea *et al.*, 2012) y la langosta americana *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) (Kozák *et al.*, 2006).

Existen numerosos ejemplos de crustáceos decápodos marinos donde el peso paterno tiene efecto sobre la fecundidad actual. En el cangrejo de los cocoteros *Birgus latro* (Linnaeus, 1767) y en el

cangrejo azul *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896, tanto el volumen del espermátforo como el número de espermatozoides por espermátforo y el tamaño del eyaculado transferido, se incrementan con el tamaño del macho (Jivoff, 2003; Sato *et al.*, 2008). Asimismo, las hembras del cangrejo real *Paralithodes brevipes* (Milne-Edwards & Lucas, 1841) presentaron un decrecimiento en su tasa de fecundación al aparearse con machos pequeños, ya que éstos no son capaces de incrementar el volumen del eyaculado al fecundar hembras de mayor tamaño. Por lo tanto, en ese caso la fecundidad de la hembra se ve limitada por la cantidad de esperma recibido (Sato *et al.*, 2006). Similarmente, el peso de la puesta se asoció al peso paterno y al tamaño del espermátforo en *P. argus* (Butler *et al.*, 2015) y en *J. edwardsii* (MacDiarmid & Butler, 1999). A diferencia de estas especies, en la langosta japonesa *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) se encontró una relación entre el tamaño de la puesta y el tamaño materno pero no así con el tamaño paterno, y se observaron tasas de fecundación similares para todos los tamaños de parentales. Esto indicaría que los machos son capaces de transferir una cantidad adecuada de esperma, independientemente del tamaño de la hembra o de la puesta (Jinbo *et al.*, 2017). Tropea *et al.* (2018) observaron que el porcentaje de huevos fecundados en *N. davidi* fue similar y cercano al 100 % para todos los tamaños paternos. Esto es acorde con los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, donde la fecundidad actual solo se vio afectada por el peso materno. En conjunto, estos resultados sugieren que la cantidad de esperma transferido por los machos pequeños es suficiente para la fecundación de la totalidad de los oocitos desovados por las hembras, tanto pequeñas como grandes. Esto podría ser un resultado del bajo número de huevos por puesta que se observa en los crustáceos decápodos de agua dulce, como es el caso de *N. davidi*, en comparación a las especies marinas. Por otro lado, los machos podrían ajustar la cantidad de esperma que transfieren a las hembras en relación al tamaño de las mismas, como ocurre en la langosta de agua dulce *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914). De este modo al asignar menos esperma cuando se aparean con hembras pequeñas, los machos reducirían el costo energético asociado a la reproducción (Rubolini *et al.*, 2006) y al menos en teoría podrían

aparearse con más hembras. Sobre la base de estos resultados, la hipótesis 3 que dice que el desempeño reproductivo de las hembras, en términos de su fecundidad actual, se incrementa con el tamaño parental, es parcialmente rechazada.

En cuanto a la calidad de progenie, la supervivencia de las crías fue similar y superior al 80% para todos los tamaños de parentales. Además, no se encontró asociación entre el peso promedio de los Juveniles I y el peso materno. Del mismo modo en *C. quadricarinatus*, otra especie de decápodo dulceacuícola con desarrollo directo, se encontró que el tamaño de los juveniles es independiente del peso materno (Tropea *et al.*, 2012). Por otro lado, se encontró que el tamaño de los juveniles aumentaba cuando las hembras se apareaban con machos grandes en una especie de crustáceo decápodo (*Procambarus clarkii* (Girard, 1852)) con un sistema de apareamiento promiscuo, similar al de *N. davidi*. Las hembras de *P. clarkii* ajustarían la cantidad de vitelo almacenado en los oocitos previo al desove, derivando así más recursos a las puestas que serán fecundadas por machos de mayor tamaño, las cuales darían una progenie de alto *fitness* (Aquiloni & Gherardi, 2008). En el cangrejo anomuro *B. latro* se observó que el tamaño de las larvas aumentaba con el tamaño materno y que las larvas provenientes de madres de mayor tamaño tenían una mayor supervivencia (Sato & Suzuki, 2010). Esto sugeriría que las hembras de distinto tamaño estarían derivando reservas energéticas a los huevos con una composición bioquímica diferente, afectando la supervivencia larval.

Es importante destacar que la existencia de una relación débil, o incluso la ausencia de relación, entre el tamaño parental y el tamaño de la progenie que se observa en algunos estudios, incluyendo el presente, podría ser el resultado de las condiciones de laboratorio constantes y controladas bajo las cuales son realizados. En muchos casos la influencia materna se percibe solo cuando las condiciones ambientales no son ideales, por ejemplo cuando las larvas o juveniles eclosionan en ambientes con escasez de alimento. Por lo tanto, se requieren estudios de campo para corroborar si las características estudiadas (por ejemplo el tamaño parental) tienen una influencia en la calidad de progenie en su ambiente natural, tal vez menos favorable que el

evaluado en el presente trabajo de tesis. En muchas especies, las hembras ajustarían el tamaño de su progenie en relación al ambiente en que la misma se encuentra. En ambientes benignos usualmente la selección favorece la producción de crías pequeñas, mientras que en ambientes desfavorables se ven favorecidas las crías de mayor tamaño. Es decir, el tamaño y la cantidad de progenie que maximiza el fitness materno, se ve afectado por el ambiente. Dado que las madres grandes en general disponen de mayores recursos para derivar a la reproducción, típicamente esperaríamos que tengan una mayor fecundidad. Pero si las crías no se dispersan rápidamente, esa mayor fecundidad podría resultar en una mayor competencia intraespecífica, y así las hembras grandes producirían huevos de mayor tamaño para compensar por dicha competencia (Marshall *et al.*, 2010; Swiney *et al.*, 2013). Por ejemplo, Moland *et al.* (2010) sugieren que la correlación positiva que encontraron entre el tamaño de los huevos y el tamaño materno en una población silvestre de la langosta europea *Homarus gammarus* (Linnaeus, 1758), podría deberse a este tipo de competencia entre larvas planctotróficas hermanas, durante las primeras etapas de su dispersión.

Finalmente, se analizó la asociación entre el peso parental y la calidad de progenie en *N. davidi*, por medio de la evaluación del desempeño de los juveniles durante un período de crecimiento de 60 días. El peso parental, tanto materno como paterno, no estuvo relacionado con el incremento en peso de los juveniles o sobre su composición bioquímica al final de dicho período. Estos resultados, junto con la falta de asociación entre el peso de los juveniles I y el peso paterno, sugieren que la inversión reproductiva primaria en hembras de similar tamaño, no se vería afectada por el tamaño paterno. Podría existir algún tipo de elección de pareja cuando las hembras tienen la opción de aparearse con machos de distintos tamaños. Por otra parte, la concentración de lípidos fue mayor en crías hembras que en crías machos. Durante el proceso de maduración ovárica, la hembra incorpora lípidos en sus ovarios y los almacena en los oocitos (Rosa & Nunes, 2003a, 2003b). El incremento en el contenido lipídico en los ovarios de hembras maduras podría explicar las diferencias observadas entre las crías de distinto sexo al final del

período de crecimiento de 60 días. En función de estos resultados, la hipótesis 4 que dice que la calidad de la progenie difiere para distintos tamaños de reproductores, es rechazada.

El cultivo de camarones a escala comercial requiere de la selección de reproductores de alta calidad. De existir una relación isométrica entre el tamaño corporal y el tamaño de la puesta, debería priorizarse la elección de individuos de mayor tamaño siempre que no se vea afectada la calidad de la progenie resultante (Arcos *et al.*, 2003; Calado, 2008). En el caso de *N. davidi*, solo se encontró una relación entre la fecundidad y el tamaño materno, sin observarse una disminución en la calidad de los juveniles obtenidos. Por lo tanto, y en relación al objetivo propuesto en el presente capítulo, el rango de tamaño óptimo de hembras reproductoras se encuentra entre los 80 y 110 mg de peso corporal.

# CAPÍTULO 4

Evaluación de la asociación entre la coloración materna y la calidad de progenie en el camarón ornamental *Neocaridina davidi*.

Los resultados del presente capítulo han sido parcialmente publicados como:

Sganga, D.E., & López Greco, L.S.

Assessment of potential trade-off between maternal colouration and offspring quality in the ornamental “red cherry” shrimp (*Neocaridina davidi* (Bouvier))

Aquaculture research. 2019. doi: 10.1111/are.14032



## 4.1 Introducción

La coloración en crustáceos se debe a la presencia de sustancias orgánicas llamadas pigmentos, principalmente carotenoides. Los carotenoides son compuestos formados por 8 unidades de isopreno, cuya estructura se deriva formalmente del licopeno  $C_{40}H_{56}$  acíclico. Los dos grupos de carotenoides más importantes son: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, que son carotenoides oxigenados (Goodwin, 1980). Los animales no pueden sintetizar estos pigmentos *de novo*, debiendo incorporarlos de la dieta, aunque muchos pueden alterar las moléculas por oxidación transformando un carotenoide en otro. El carotenoide principal en crustáceos es la astaxantina, que pertenece al grupo de las xantofilas (Goodwin, 1984). Este carotenoide produce un color rojo intenso pero también se lo encuentra formando complejos carotenoide-proteína que exhiben colores que van desde el verde hasta el violeta. Un ejemplo son las langostas del género *Homarus*, cuyo exoesqueleto de color azul se vuelve rojo después de su cocción, ya que el calor desnaturaliza la carotenoproteína y se observa entonces el color producido por la astaxantina libre (Svensson & Wong, 2011). Los pigmentos se encuentran en la cutícula o en células llamadas cromatóforos que se ubican debajo de ella. En los camarones carídeos, los cromatóforos suelen encontrarse agrupados en cromatosomas. Tanto el tipo de pigmento presente en los ellos, como su densidad relativa, y la cantidad y el grado de dispersión de los pigmentos influyen en el color que producirá dicho cromatosoma, generando distintos patrones de coloración (Latscha, 1989; Bauer, 2004). Estos patrones intervienen en comportamientos reproductivos, en la comunicación inter e intraespecífica y en la evasión de predadores a través de una coloración críptica (Bernal Rodríguez *et al.*, 2017). A la vez, la coloración puede sufrir cambios a corto y a largo plazo. Los primeros son de tipo fisiológico y se deben a la contracción o dispersión de los pigmentos dentro de los cromatóforos. Ocurren rápidamente, en cuestión de minutos o segundos y en general están involucrados en interacciones sociales, termorregulación y en el ajuste del color corporal para igualar el color del sustrato. En los cambios a largo plazo, o morfológicos, se modifica el tipo, el número o el arreglo de los cromatosomas. Estos cambios

son graduales y pueden darse en respuesta a cambios estacionales en el ambiente o pueden ocurrir a lo largo de la ontogenia. En este caso, los cambios en la coloración suelen darse en respuesta a las diferentes necesidades de camuflaje frente a posibles predadores a lo largo de la vida del camarón, asociados a cambios en el hábitat o en su comportamiento (Bauer, 2004; Bernal Rodríguez *et al.*, 2017; Detto *et al.*, 2008).

Además de su rol en la pigmentación, los carotenoides cumplen varias funciones fisiológicas. Esta versatilidad está relacionada a su estructura. Todos los carotenoides poseen un sistema de enlaces simples y dobles en la parte central de la molécula. Esta estructura conjugada hace que los carotenoides absorban la luz en longitudes de onda de 400-500 nm, dando la coloración amarilla, roja o anaranjada característica. A la vez, permite la deslocalización y la estabilización de la energía contenida en moléculas de alta energía potencialmente dañinas, como los radicales libres y otros metabolitos oxidativos. Esto le da a los carotenoides la capacidad de proteger a otros sistemas contra el daño oxidativo, y constituye la base de su acción antioxidante (Britton, 2008). Debido a las rápidas tasas de crecimiento embrionario, se generan niveles altos de estrés oxidativo en el embrión. Por lo tanto, la cantidad de carotenoides que la hembra derive al vitelo puede afectar la calidad de su progenie. A la vez, esta cantidad se puede ver reducida cuando las hembras asignan carotenoides a su coloración. En numerosas especies de aves y de peces se ha encontrado una correlación entre la coloración materna y la calidad de su progenie (para una revisión ver Nordeide *et al.*, 2013). Aunque esta relación está escasamente explorada en crustáceos decápodos.

En particular, la coloración rojiza de *Neocaridina davidi* es la característica más buscada entre los acuaristas, y es lo que define su valor de mercado (Ruangdej & Laohavisuti, 2014). La cría selectiva de las variantes intensamente coloreadas es una de las principales ventajas del cultivo comercial de ésta y otras especies ornamentales, por sobre la colección de ejemplares de la naturaleza (Calado, 2008; Walker *et al.*, 2000). Sin embargo, poco se conoce sobre la relación entre la coloración de las hembras y su desempeño reproductivo o la calidad de su progenie. En

consecuencia, en este capítulo se explorará si la intensidad de coloración de las hembras está asociada a la producción de crías de mejor calidad evaluadas en términos de su crecimiento hasta alcanzar tamaño de reproductores, composición bioquímica y coloración en las crías hembra.

## 4.2 Objetivo

Evaluar la asociación entre la coloración materna de *N. davidi*, el rendimiento reproductivo y la calidad de progenie.

En el marco de dicho objetivo se plantearon las siguientes hipótesis:

**Hipótesis 5:** El desempeño reproductivo de las hembras, en términos de su fecundidad actual relativa, disminuye a mayor coloración materna.

**Hipótesis 6:** La calidad de la progenie para madres poco coloreadas es mayor que la de madres intensamente coloreadas.

## 4.3 Materiales y métodos

### 4.3.1 Obtención de ejemplares

Juveniles de *N. davidi* recientemente eclosionados fueron colocados en acuarios plásticos conteniendo agua de clorada, y mantenidos en las condiciones descritas en el capítulo 2. El nivel de iluminación fue similar para todos los acuarios (aproximadamente 30 lx, provistos por una lámpara fluorescente de 36 W), debido a que la luz puede influir en la coloración de los camarones (Calvo *et al.*, 2016). Los individuos fueron sexados aproximadamente a los 30 días de edad, y hembras y machos fueron separados para asegurar su virginidad al comienzo del experimento. Al alcanzar los 90 días de edad, todos los individuos sexualmente maduros fueron pesados (peso materno y paterno) y las hembras fueron fotografiadas para cuantificar su

coloración inicial (coloración materna). Los reproductores fueron seleccionados en base a su peso de acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo 3 (hembras: 80-120 mg, machos: 30-60 mg) y según la coloración materna cubriendo todo el rango de coloración observada, desde hembras escasamente coloreadas hasta intensamente coloreadas (Fig 4.1 A, B).

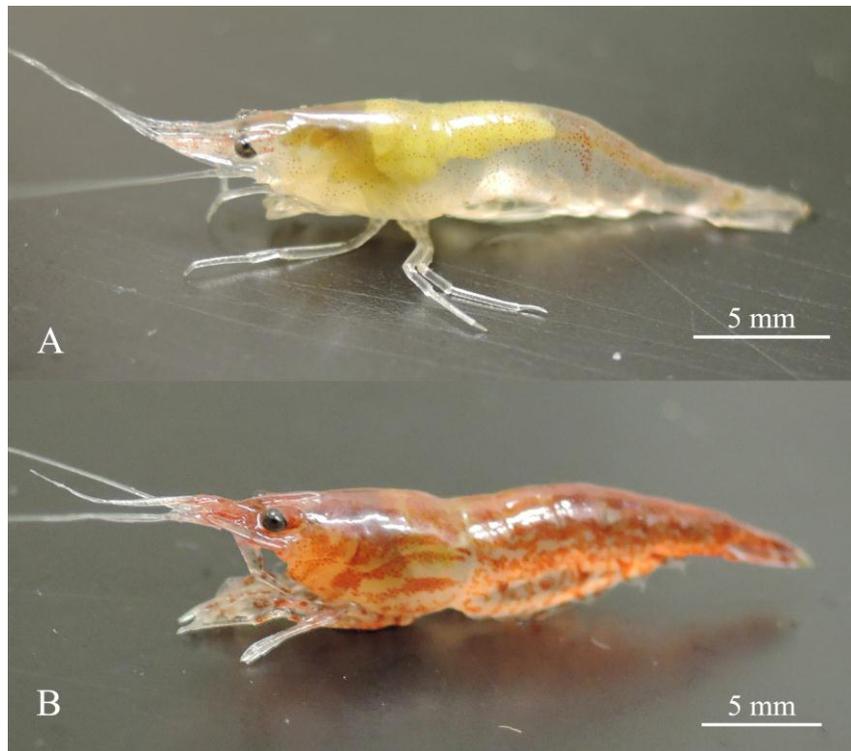


Figura 4.1: Hembras adultas de *Neocaridina davidi* escasamente (A) e intensamente coloreadas (B).

#### 4.3.2 Diseño experimental

Una hembra y un macho vírgenes fueron colocados en un acuario plástico (18 x 12,5 x 12 cm) conteniendo 2 L de agua dechlorada, y mantenidos en las mismas condiciones de calidad de agua, temperatura, fotoperiodo y alimentación anteriormente descriptas. Diariamente las parejas de reproductores (n = 51) fueron inspeccionadas para la detección de hembras ovígeras e inmediatamente luego de la eclosión de los juveniles, las hembras fueron pesadas (peso materno; precisión: 0,1 mg). Los juveniles I fueron contados y la FECUNDIDAD ACTUAL RELATIVA fue calculada dividiendo la fecundidad actual (número de juveniles eclosionados) por el peso

materno. Una muestra al azar de 10 JI de cada puesta fue pesada (precisión: 0,1 mg). El PESO PROMEDIO DE LOS JI fue calculado dividiendo el peso total de la muestra por el número de JI (peso 0 días). Se tomó una segunda muestra al azar de 15 JI por puesta para evaluar su crecimiento durante un período de 30 días, en las mismas condiciones de cría que las parejas de reproductores. Las crías de 30 días de edad fueron sexadas, pesadas (precisión: 0,1 mg; peso 30 días), anestesiadas por inmersión en agua a 0 °C y almacenadas a -20 °C para las determinaciones bioquímicas. Una tercera muestra de 15 JI por puesta fue seleccionada para evaluar su crecimiento luego de un período de 60 días y la coloración de las crías hembras a los 90 días de la eclosión. Las crías fueron sexadas y pesadas el día 60 posterior a la eclosión (precisión: 0,1 mg; peso 60 días) y luego las crías hembras fueron fotografiadas el día 90 posterior a la eclosión para medir su coloración (COLORACIÓN DE LAS CRÍAS HEMBRA). El crecimiento de las crías fue evaluado en términos del INCREMENTO EN PESO, el cual fue calculado como:

$IP = 100 \times [(P_f - P_i) / P_i]$ , donde  $P_f$  es el peso final de las crías y  $P_i$  es el peso inicial de las crías para los períodos 0-30 y 30-60 días. La SUPERVIVENCIA de las crías fue expresada como el porcentaje que sobrevivió al final del período de crecimiento de 90 días.

#### 4.3.3 Captura de imágenes

Se obtuvo una fotografía del lado izquierdo del caparazón de las hembras bajo microscopio estereoscópico con un aumento de 20 x (Carl Zeiss Stemi 2000-C), utilizando una cámara Nikon Coolpix P340 (Nikon Imaging Japan Inc., Tokio, Japón). La cámara fue ajustada al modo Macro, con una apertura del diafragma de f/3,7 y sin flash. Los animales fueron preparados para la fotografía removiendo el exceso de agua del caparazón y el ángulo de la cámara fue ajustado de modo que se minimice la superficie reflectiva. Para evitar distorsiones de paralaje, todas las fotografías fueron tomadas ubicando los ejemplares en el centro de la imagen de manera que la

mayoría de los márgenes no estuviesen ocupados por partes del caparazón. Las condiciones de iluminación fueron las mismas para todas las fotografías.

#### 4.3.4 Medición de la coloración

Las imágenes tomadas fueron almacenadas en formato jpg con una resolución de 600 ppp. Luego fueron recortadas para evitar las partes del cefalotórax donde el ovario o el órgano perigástrico pueden observarse a través de la cutícula translúcida, interfiriendo en la medición del color del cefalotórax. Así se obtuvo una porción rectangular de la región anteroventral del lado izquierdo del cefalotórax (Fig. 4.2 A).

Para la cuantificación de la coloración se utilizó la metodología previamente ensayada por Detto *et al.* (2008) en el cangrejo violinista *Uca capricornis* Crane, 1975, y por Siegenthaler *et al.* (2017) en el camarón carideo *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758). Consiste en medir la cobertura de los cromatosomas en áreas definidas del cuerpo y permite así evaluar las variaciones en color de manera cuantitativa. El área coloreada de rojo fue seleccionada utilizando el programa Adobe Photoshop C5S (versión 1.5.3.9120) y cuantificada en píxeles cuadrados. Luego fue relativizada al área total de la porción rectangular del cefalotórax seleccionada (Fig. 4.2 B, C). La coloración de las hembras se definió, entonces, como la proporción de la superficie del caparazón coloreada de rojo y por lo tanto esta variable tiene un valor que oscila entre 0 y 1.

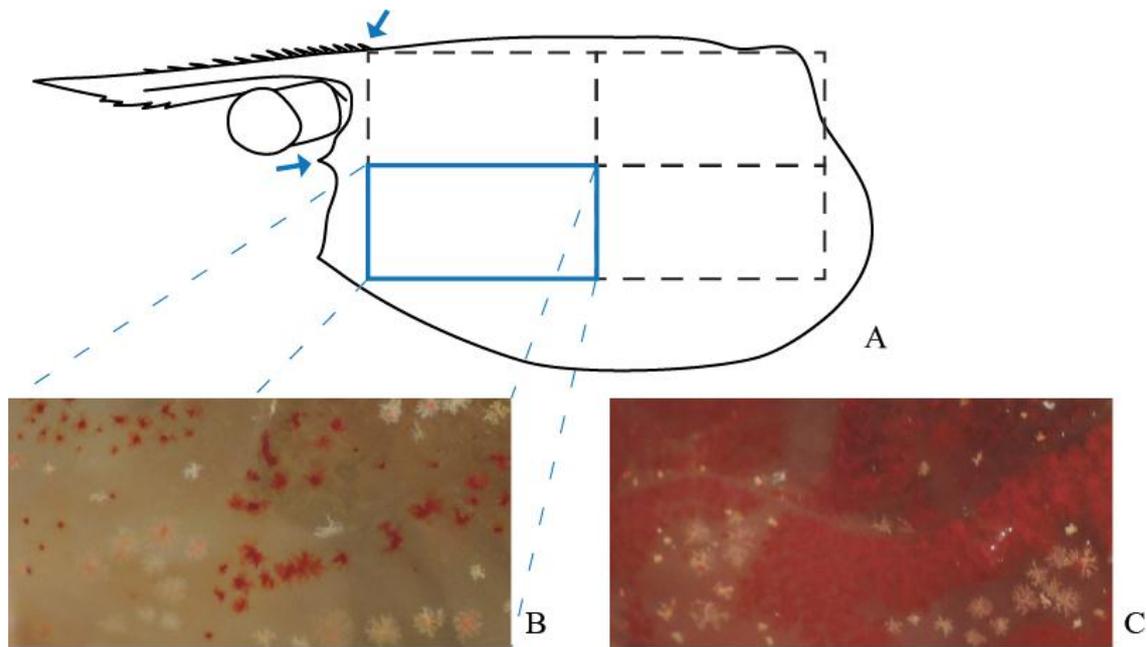


Figura 4.2: Esquema del cefalotórax de *Neocaridina davidi*. La línea punteada representa la cuadrícula de 2 x 2 porciones rectangulares de igual tamaño, y proporcionales al tamaño de la imagen, la cual fue alineada con la espina antenal y con la primer espina rostral postorbital (indicadas en la figura con flechas). El área de interés, es decir, la porción rectangular de la parte anteroventral del lado izquierdo del cefalotórax, está resaltado (A), y se muestra como ejemplo una hembra poco (B) y una intensamente coloreada (C).

La coloración de las hembras fue medida:

∴ en las hembras del lote parental al comienzo del experimento (coloración materna; 90 días de edad) y a los 3 meses de comenzado el mismo (coloración materna; 180 días de edad). Dichos valores fueron ajustados a la edad de cada hembra correspondiente a la primera y segunda puesta mediante la siguiente corrección:

$C_1 = C_{90} + \Delta_{\text{edad}} \times (C_{180} - C_{90})/90$  y  $C_2 = C_{180} + \Delta_{\text{edad}} \times (C_{180} - C_{90})/90$ , donde  $C_{1/2}$  es la coloración de la hembra en el momento de la primera o segunda puesta,  $C_{90/180}$  es la coloración de la hembra a los 90 o 180 días,  $\Delta_{\text{edad}}$  es la diferencia de edad entre la primera o segunda puesta y los 90 o 180 días, respectivamente;

∴ en las crías hembras a los 90 días de edad. De todas ellas, 3 de cada puesta fueron seleccionadas al azar para su posterior análisis.

#### 4.3.5 Determinaciones bioquímicas

El contenido de proteínas, lípidos y glucógeno en los camarones a los 30 días de edad fue determinado siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3.

#### 4.3.6 Análisis estadístico

Se llevó adelante la exploración de datos siguiendo a Zuur *et al.* (2010). Para analizar la asociación entre la coloración materna, el número de puesta (primera y segunda) y las variables respuesta: fecundidad actual relativa, composición bioquímica (contenido de proteínas, lípidos y glucógeno) en crías de 30 días de edad e incremento en peso en crías para el período 0-30 días y para el período 30-60 días, se construyeron modelos de regresión lineal mixtos mediante el método de eliminación paso a paso (hacia atrás). Para las variables supervivencia de las crías y coloración de las crías hembra se asumió una distribución Binomial (utilizando una función logística link). Al analizar la variable coloración de las crías hembra, se observaron datos sobre dispersos para el modelo Binomial. Por lo tanto se ajustó una distribución beta-binomial. Para la variable supervivencia de las crías el análisis inicial indicó sub-dispersión, por lo cual se utilizó una estructura de error cuasi-binomial. Fueron incluidos como factores fijos en todos los modelos, la variable continua coloración materna y la variable categórica número de puesta. Cada pareja de reproductores fue considerada un efecto aleatorio (Zuur *et al.*, 2009). Para el análisis de las variables incremento en peso en crías para el período 0-30 y 30-60 días se incluyó la variable sexo de la progenie como variable explicatoria categórica. La selección de modelos se llevó a cabo utilizando un criterio basado en la teoría de la información. Los supuestos de cada modelo se estudiaron gráficamente según Zuur *et al.* (2007). Todos los análisis fueron realizados con los paquetes MASS, nlme y lme4 (Venables & Ripley, 2002; Bates *et al.*, 2015; Pinheiro *et al.*, 2017) para el programa R (R Core Team, 2016). El nivel de significación empleado fue 0,05. Se ajustó el valor p por contrastes múltiples mediante el método de Bonferroni (Dunn, 1961) para el análisis de los contenidos de proteínas, lípidos y glucógeno, considerándose

estadísticamente significativas aquellas pruebas con  $p < 0,0167$ . Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el desvío estándar.

#### 4.4 Resultados

##### 4.4.1 Desempeño reproductivo de las hembras

El 33,33% de las 51 parejas de reproductores desovaron dos veces durante el periodo experimental. La fecundidad actual relativa, que tuvo un valor promedio de  $0,40 \pm 0,12$  juveniles eclosionados por puesta por mg (rango: 0,13 - 0,67), estuvo relacionada negativamente a la coloración materna ( $F = 13,698$ ,  $p = 0,0019$ ). Sin embargo, fue similar entre puestas (Tabla 4.1, Fig. 4.3).

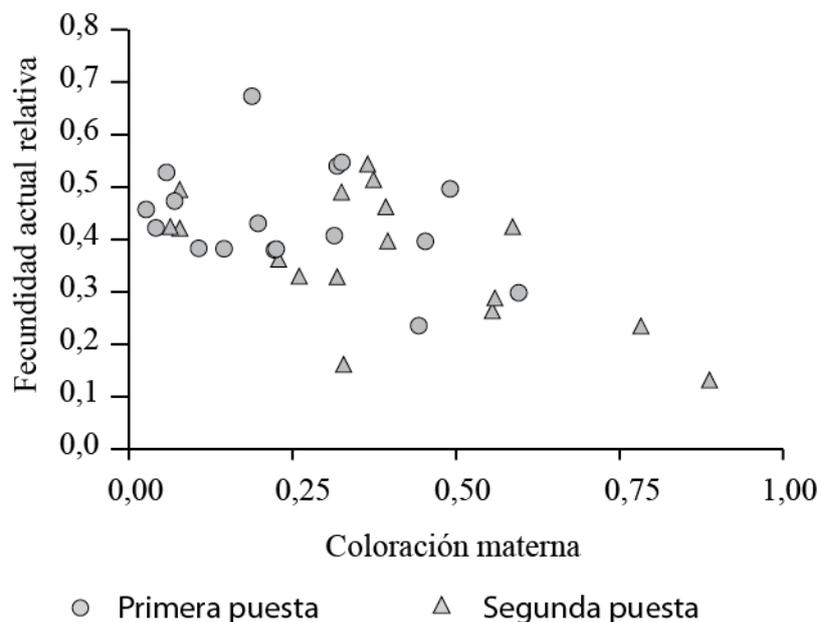
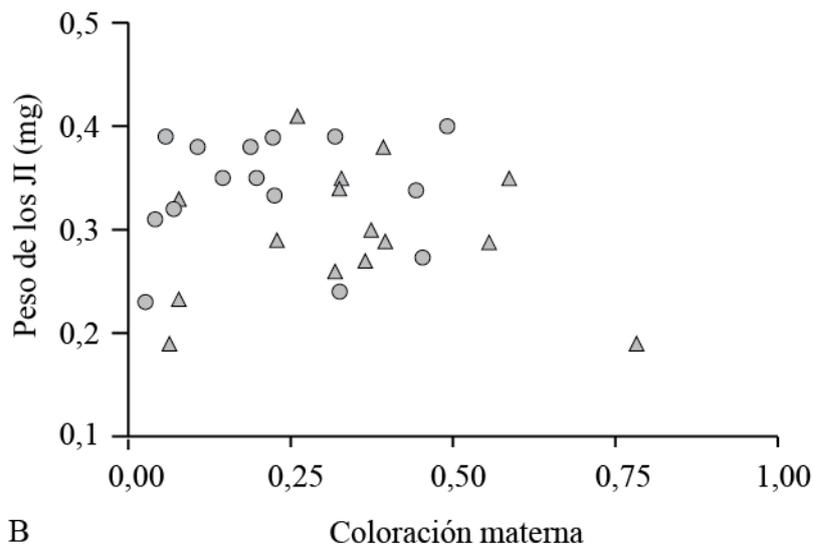
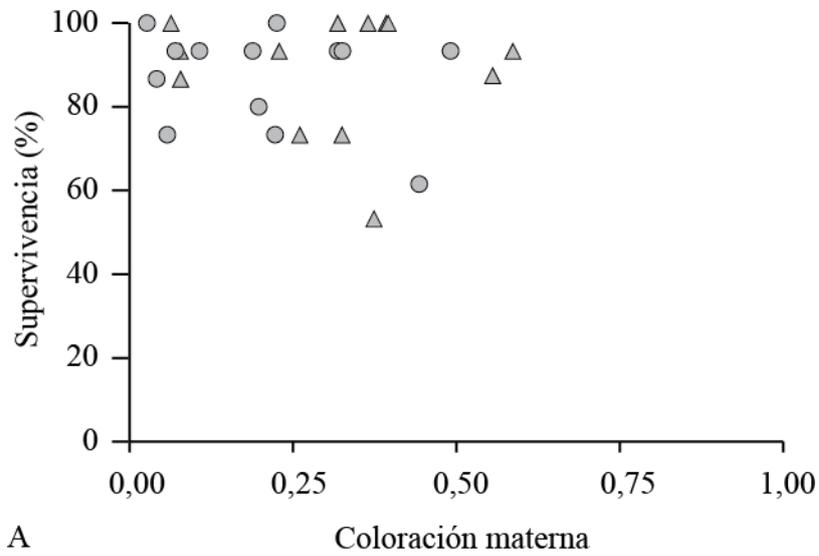


Figura 4.3: Desempeño reproductivo y calidad de progenie en *Neocaridina davidi*. Se estudió la asociación entre la coloración materna y la fecundidad actual relativa (número de juveniles eclosionados por puesta por mg de hembra).

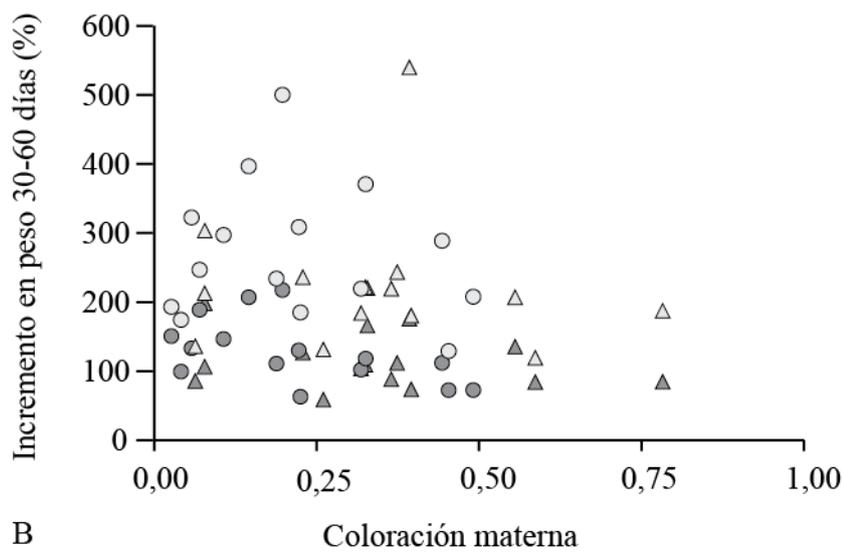
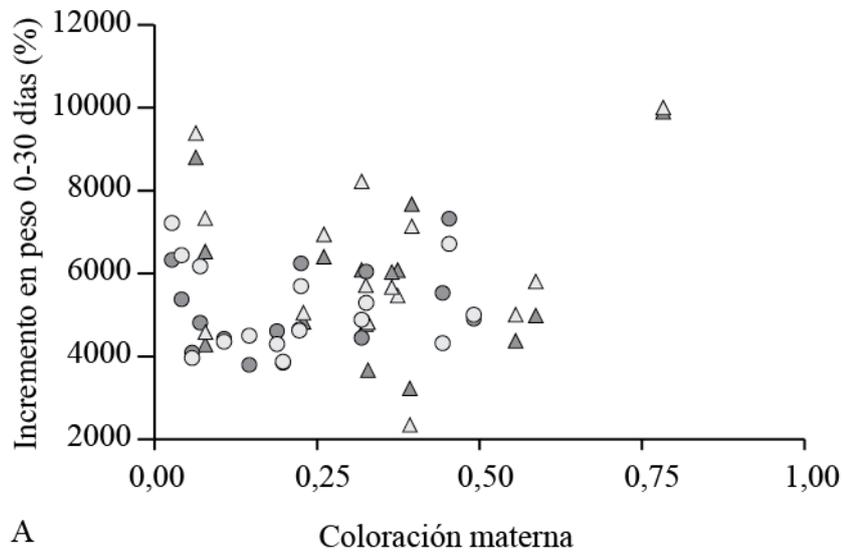
#### 4.4.2 Calidad de progenie

En cuanto a la calidad de la progenie, la supervivencia de las crías luego de un período de crecimiento de 90 días fue en promedio  $88,04 \pm 12,79$  % y no estuvo asociada a la coloración materna o al número de puesta (Tabla 4.1, Fig. 4.4 A). El peso de los JI no estuvo asociado a la coloración materna, pero sí a la puesta ( $F = 10,656$ ,  $p = 0,006$ ) (Tabla 4.1, Fig. 4.4 B). Sin embargo fue solo 13,33 % mayor para la primera puesta en relación a la segunda, promediando  $0,34 \pm 0,05$  y  $0,30 \pm 0,06$  mg, respectivamente. No se encontró asociación entre el incremento en peso y la coloración materna en ninguno de los períodos analizados. El incremento en peso promedió  $5586,78 \pm 1581,32$  % para el periodo 0-30 días y si bien fue similar para ambos sexos fue 17,98 % mayor en crías de la segunda puesta comparados con los de la primera ( $F = 13,546$ ,  $p = 0,0006$ ) (Tabla 4.1, Fig. 4.5 A). Para el período 30-60 días el incremento en peso fue en promedio  $172,21 \pm 81,07$  % y fue 22,87 % mayor en crías de la primera puesta comparadas con aquellas provenientes de las segundas puestas ( $F = 7,576$ ,  $p = 0,009$ ). Similarmente, fue un 95,92 % mayor en crías hembra que en crías macho ( $F = 75,618$ ,  $p < 0,0001$ ) (Tabla 4.1, Fig. 4.5 B). El contenido de proteínas, lípidos y glucógeno de las crías de 30 días de edad no estuvo asociado a la coloración materna o al número de puesta, y promedió  $32,12 \pm 11,42$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ,  $5,02 \pm 1,81$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , y  $1,80 \pm 0,73$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente (Tabla 4.1, Fig. 4.6 A, B; 4.6 A). La coloración de las crías hembra al final de un período de crecimiento de 90 días no estuvo asociada significativamente a las variables coloración materna y número de puesta (Tabla 4.1, Fig. 4.7 B).



○ Primera puesta      △ Segunda puesta

Figura 4.4: Calidad de progenie en *Neocaridina davidi*. Se evaluó la asociación entre la coloración materna y las variables: peso de los juveniles I (A) y supervivencia de las crías luego de un período de 90 días (B) para las dos primeras puestas.



- Crías hembra, primera puesta      ● Crías macho, primera puesta
- △ Crías hembra, segunda puesta    ▲ Crías macho, segunda puesta

Figura 4.5: Calidad de progenie de *Neocaridina davidi*. Se estudió la asociación entre la coloración materna y las variables: incremento en peso en el período 0-30 días (A), incremento en peso en el período 30-60 días (B), para crías hembras y machos de las dos primeras puestas.

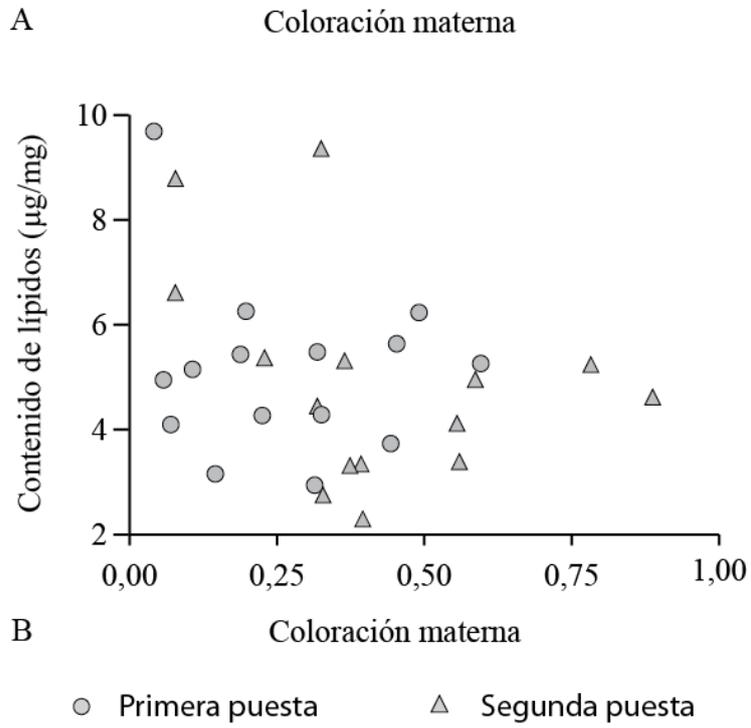
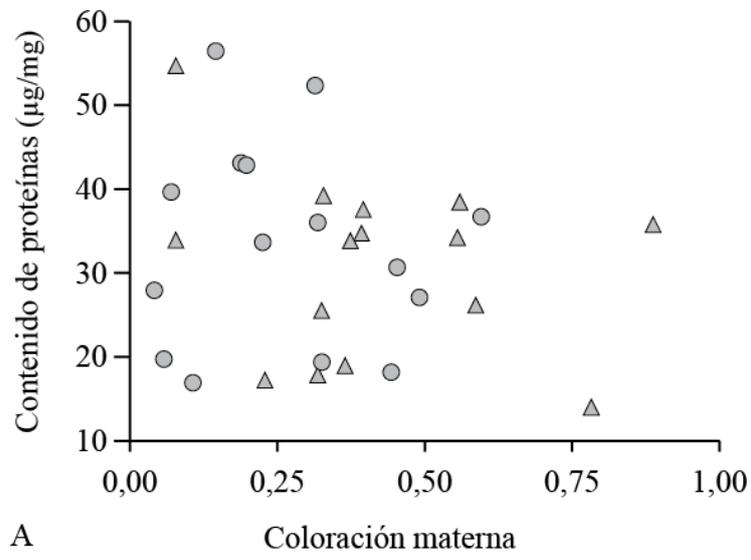
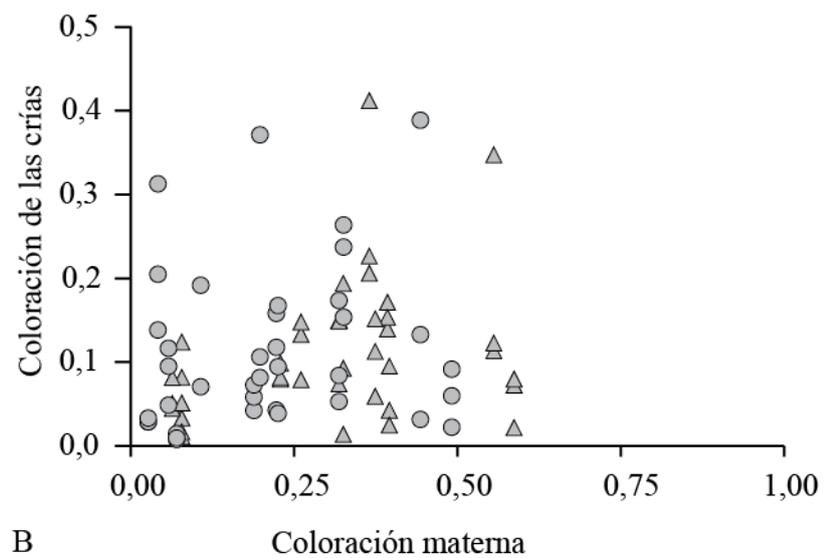
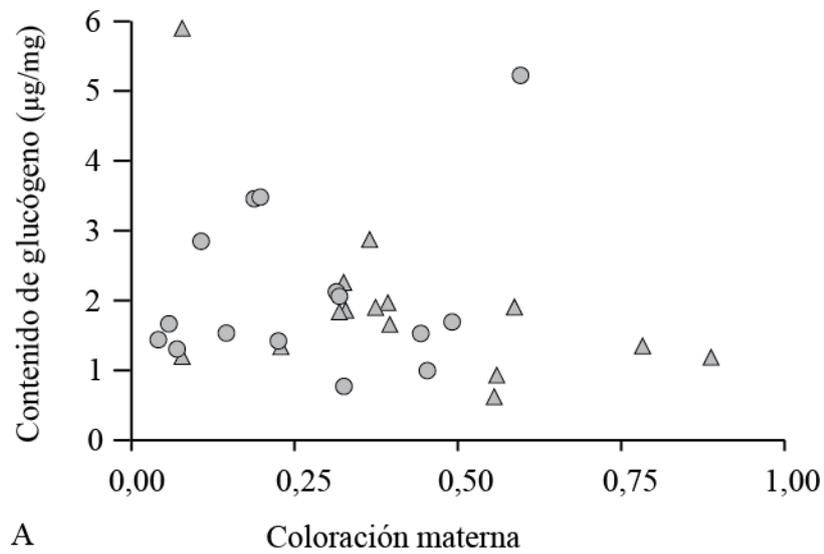


Figura 4.6: Calidad de progenie de *Neocaridina davidi*. Se evaluó la asociación entre la coloración materna y el contenido de proteínas (A) y de lípidos (B) de crías de 30 días de edad, para las dos primeras puestas.



○ Primera puesta      △ Segunda puesta

Figura 4.7: Calidad de progenie de *Neocaridina davidi*. Se evaluó la asociación entre la coloración materna y las variables: contenido de glucógeno en crías de 30 días de edad (A) y coloración de las crías hembra de 90 días de edad (B) para las dos primeras puestas.

Tabla 4.1: Comparación de los modelos óptimos para las variables fecundidad actual relativa, supervivencia de las crías, incremento en peso en crías para el período 0-30 días, incremento en peso en crías para el período 30-60 y contenido de proteínas, lípidos y glucógeno en crías de *Neocaridina davidi* (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,0167$ )

Variable respuesta	Variabes explicatorias	$R^2_{GLMM(c)}$	AIC
Fecundidad actual relativa	coloración materna	0,696	-50,707
Supervivencia	coloración materna x puesta	0,728	-
	coloración materna + puesta	0,637	-
	coloración materna	0,602	-
	puesta	0,605	-
Peso de los JI	puesta*	0,714	-73,675
Incremento en peso en el período 0-30 días	puesta*	0,637	1004,513
Incremento en peso en el período 30-60 días	puesta * + sexo de la progenie *	0,681	547,221
Contenido de proteínas	coloración materna x puesta	0,264	217,634
	coloración materna + puesta	0,270	223,700
	coloración materna	0,285	226,445
	puesta	0,263	228,940
Contenido de lípidos	coloración materna x puesta	0,408	119,568
	coloración materna + puesta	0,446	121,642
	coloración materna	0,440	120,654
	puesta	0,349	125,212
Contenido de glucógeno	coloración materna x puesta	0,148	97,347
	coloración materna + puesta	0,035	102,533
	coloración materna	0,036	100,865
	puesta	0,006	103,502
Coloración de las crías hembra	coloración materna x puesta	-	1879,766
	coloración materna + puesta	-	1878,422
	coloración materna	-	1876,518
	puesta	-	1877,984

#### 4.5 Discusión

En relación al rendimiento reproductivo de *N. davidi*, se encontró que la fecundidad actual relativa estuvo negativamente asociada a la coloración materna, y fue similar para ambas puestas. Esto podría deberse a una disminución en la fecundidad realizada para las hembras intensamente coloreadas o a una menor supervivencia de sus embriones. En cuanto a la explicación referida a la disminución de la fecundidad, Janhunen *et al.* (2011 b) encontraron en

la trucha alpina *Salvelinus alpinus* (Linnaeus, 1758) que la fecundidad fue menor para hembras más coloreadas. La segunda explicación, en cambio, ha sido propuesta para explicar el comportamiento de varias especies de peces, donde al igual que en los crustáceos, la coloración se debe a la presencia de carotenoides en sus tejidos (Bjerkeng, 2008; Goodwin, 1984; Latscha, 1989; Wade *et al.*, 2015). Janhunen *et al.* (2011 a, b) encontraron en la trucha alpina una relación negativa entre la coloración de las hembras y la supervivencia de sus crías. A su vez, Nordeide *et al.* (2008) encontraron en la misma especie una asociación negativa entre la coloración materna y el contenido de carotenoides en los huevos, si bien dicha relación no fue estadísticamente significativa. Similarmente, Nordeide *et al.* (2006) realizaron un estudio en el pez espinoso *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758, donde la coloración de las espinas pélvicas de las hembras también está basada en carotenoides, y encontraron que la coloración de dichas espinas está negativamente asociada al contenido de carotenoides en los huevos. La astaxantina, en particular, tiene potencial para reaccionar con las especies de oxígeno reactivo que son producidas normalmente en los procesos oxidativos de las células causando estrés oxidativo. En los embriones, el estrés oxidativo se encuentra acentuado por su alta tasa de crecimiento. Por lo tanto, la astaxantina podría prevenir el daño al DNA y a los lípidos y proteínas de las biomembranas, los cuales resultarían en una disminución de la calidad de los huevos (Blount *et al.*, 2000; Britton, 2008; Wade *et al.*, 2015; Weiss *et al.*, 2011; Wouters *et al.*, 2001). En particular, la astaxantina es el carotenoide que se encuentra predominantemente en crustáceos y es transportada durante la vitelogénesis desde el órgano perigástrico hacia el ovario. Su movilización hacia los huevos sugiere que esta sustancia cumple un rol importante en el desarrollo embrionario (Dall *et al.*, 1995; Harrison, 1990; Sawanboonchun *et al.*, 2008). Del mismo modo, ha sido previamente relacionada a la maduración ovárica y el desove en el camarón tigre (*Penaeus monodon*) (Pangantihon-Kühlmann *et al.*, 1998), así como a la supervivencia de sus postlarvas (Pan *et al.*, 2001). A la vez, se observó que la astaxantina aceleró el desarrollo post larval y mejoró el crecimiento en el camarón kuruma (*Penaeus japonicus*

Spence Bate, 1888) (Petit *et al.*, 1997). Pero, si bien la presencia de astaxantina supondría una mayor supervivencia y calidad de los embriones y larvas, cuando las madres derivan carotenoides a otras funciones, como la ornamentación o el camuflaje, la cantidad disponible para la progenie puede reducirse. Entonces, las hembras deben balancear la cantidad de carotenoides que derivan a su coloración y a la progenie. Así, se establece un compromiso entre la coloración corporal materna y la calidad de su progenie (Blount *et al.*, 2000; Garner *et al.*, 2010; Nordeide *et al.*, 2013; Weiss *et al.*, 2011). Por lo tanto, en el caso particular de *N. davidi*, la menor fecundidad actual observada en hembras más coloreadas, podría explicarse por una menor supervivencia de sus embriones, debido a que estas hembras derivarían una menor cantidad de astaxantina a sus huevos. En base a estos resultados, la hipótesis 5 que dice que el desempeño reproductivo de las hembras, en términos de su fecundidad actual relativa, disminuye a mayor coloración materna, no es rechazada.

En cuanto a la calidad de progenie, la supervivencia de las crías de *N. davidi* luego de un período de 90 días, al igual que su incremento en peso en los períodos 0-30 y 30-60 días y su composición bioquímica a los 30 días de edad, no estuvo asociada a la coloración materna. Por lo tanto, no obstante la diferencia inicial en la supervivencia de los embriones, el desempeño de las crías luego de la eclosión sería similar independientemente de la coloración materna. En consecuencia, la hipótesis 6 que dice que la calidad de la progenie para madres poco coloreadas es mayor que la de madres intensamente coloreadas, es rechazada. El contenido de proteínas, lípidos y glucógeno en las crías de 30 días de edad, por su parte, se encontró entre los valores reportados para la especie (Baliña *et al.*, 2018; Tropea & López Greco, 2015). Además, el incremento en peso de las crías en el período 30-60 días fue significativamente mayor en hembras que en machos, pero no así en el período 0-30 días. Del mismo modo, en el capítulo 3, se observó que el incremento en peso medido al final de un período de crecimiento de 60 días fue mayor para las crías hembras. Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos

en el capítulo 2 y por Vazquez *et al.* (2017), donde se observó un crecimiento diferencial en machos y hembras aproximadamente a partir de los 30 días de edad.

En cuanto a la coloración de las crías, se observó que luego de un período de crecimiento de 90 días no estuvo asociada a la coloración materna ni al número de puesta. Sin embargo, se encontró que la coloración de las madres se modificó con la edad: a los 180 días de edad fue casi 70 % mayor que a los 90 días de edad lo que indicaría un incremento de la coloración en el tiempo incluso luego de alcanzada la madurez sexual. Esta diferencia podría estar relacionada con la acumulación de carotenoides incorporados a través de la dieta. De manera similar, Bauer (1981) observó en los camarones carideos, *Heptacarpus pictus* (Stimpson, 1871) y *H. paludicola* Holmes, 1900, que las hembras de mayor edad presentaban una coloración más intensa respecto a las más jóvenes. Dado que los machos adultos de esas especies, al igual que los de *N. davidi*, son más pequeños y menos coloreados que las hembras de la misma edad, el autor consideró que la acumulación de pigmentos por ingestión era poco probable. La coloración de los machos no se midió en el presente trabajo de tesis, pero se observó un ligero aumento en su coloración a través del tiempo, aunque siempre fue menor en comparación con las hembras de la misma edad. A pesar de las diferencias fisiológicas en la utilización de carotenoides entre machos y hembras, todos los camarones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta con alto contenido de carotenoides durante todo el experimento (382 mg/kg). Por lo tanto, el desarrollo del color puede depender del período en el que fueron alimentados, como se observó en la langosta americana *Homarus americanus* (Tlustý & Hyland, 2005).

Por otro lado, estos resultados muestran que el alimento suministrado (TetraColor®) proporciona una cantidad suficiente de pigmentos carotenoides para obtener una coloración intensa en las hembras. Ruangdej y Laohavisuti (2014) informaron un aumento en la coloración corporal en *N. davidi* con la inclusión de cantidades crecientes de carotenoides en la dieta de los camarones. La mayor pigmentación probada fue de 200 mg/kg, mientras que el contenido de carotenoides del alimento comercial utilizado en el presente trabajo fue de 382 mg/kg. También

se logró un realce del color mediante la suplementación con carotenoides en otras especies de camarones. Tanto el contenido de carotenoides como el color del cuerpo aumentaron en *Penaeus monodon* alimentado con dietas conteniendo 100 mg/kg de astaxantina (Niu *et al.* 2014). De manera similar, se logró una pigmentación óptima en *Litopenaeus vannamei* con dietas que contenían 75 a 100 mg/kg de astaxantina (Ju *et al.*, 2011). Mientras que en *P. japonicus*, el contenido total de carotenoides aumentó con niveles de astaxantina en la dieta de hasta 200 mg/kg, pero no se encontraron mayores diferencias con una dieta suplementada con 400 mg/kg (Yamada *et al.*, 1990).

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren una asociación negativa entre la coloración materna y la fecundidad actual relativa en *N. davidi*. Entonces, si bien para el cultivo de esta especie es preferible la selección de las hembras de mayor tamaño para el lote de reproductores, la coloración de las mismas es un factor que debe tenerse en consideración para la producción masiva de juveniles. La elección de hembras poco coloreadas para el lote reproductor aumentaría el número de juveniles producidos por hembra por puesta. Por otro lado, el valor de mercado de los camarones cultivados para la industria ornamental podría aumentarse criándolos más allá de su madurez sexual, dado que la coloración de las hembras aumenta con la edad.



# CAPÍTULO 5

Evaluación de la calidad del alimento sobre la calidad de progenie en el camarón ornamental *Neocaridina davidi*.



## 5.1 Introducción

Las dietas comerciales son utilizadas comúnmente en el cultivo de camarones en reemplazo de alimentos frescos o congelados. A diferencia de ellos, las dietas comerciales están disponibles en todas las estaciones y se mantienen estables durante su almacenamiento. Asimismo reducen la suciedad de los tanques y el riesgo de introducción de enfermedades siendo su mayor ventaja que estos alimentos permiten controlar la composición de la dieta y su valor nutricional en cada etapa del cultivo (Bray & Lawrence, 1992; Calado, 2008; Harrison, 1990). A pesar de sus numerosas ventajas, las dietas comerciales suelen ser más costosas que las frescas (Calado, 2008). Dado que el alimento es el insumo que supone el mayor gasto en la acuicultura de camarones, es crucial reducir el costo de las dietas mientras se asegure que no se verá comprometida la calidad de los reproductores (De Silva, 2006; New, 1976). En este sentido, es importante seleccionar dietas de calidad para los reproductores que satisfagan sus requerimientos energéticos para el crecimiento, la muda y la reproducción. Una mala nutrición podría repercutir sobre su desempeño reproductivo y afectar negativamente la calidad de su progenie (Calado, 2008; Harrison, 1990; Wouters *et al.*, 2001). Esto se debe a que el desarrollo de los embriones y las larvas lecitotróficas depende exclusivamente de los nutrientes presentes en el vitelo. A la vez, la cantidad y calidad de dichos nutrientes depende de las reservas energéticas de las madres y de su nutrición durante la maduración gonadal (Wouters *et al.* 2001; Harrison, 1990).

El contenido y la composición lipídica de las dietas, en particular, tienen un papel importante en la reproducción. La adición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) a la dieta mejoró el desempeño reproductivo y la calidad de progenie, medida en términos de la eclosión de los huevos (Wen *et al.*, 2002) y de la supervivencia a pruebas de estrés (Wu *et al.*, 2007), en el cangrejo *Eriocheir sinensis*. También, altos niveles de PUFA de la serie n-6 y n-3 en la dieta de los reproductores, mejoró la fecundidad, la tasa de eclosión de los huevos y la calidad de la progenie en el camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Cavalli *et al.*, 1999). Sin embargo, Ribeiro *et al.* (2012) encontraron que para *M. amazonicum*

(Héller, 1862) la proporción de n-3: n-6 PUFA tuvo una influencia mayor sobre la reproducción, que los valores absolutos de cada una de esas series de ácidos grasos. La suplementación de las dietas con ácido araquidónico (C20:4 n-6) ha dado como resultado un aumento en la fecundidad, en el tamaño de los huevos y en la tasa de eclosión, y mejoró la resistencia de las larvas frente a pruebas de estrés en el camarón *Penaeus monodon*, Fabricius, 1798 y en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Coman *et al.*, 2011; Kangpanich *et al.*, 2016, 2017; Xu *et al.*, 2017). Además, los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la dieta pueden afectar la calidad de los espermatozoides/ espermátóforos. Por ejemplo, en *P. monodon* y en la langosta de agua dulce *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823, el conteo de espermatozoides aumentó al alimentar a los machos con un alimento rico en PUFA (Harlioğlu *et al.*, 2013; Meunpol *et al.*, 2005).

Varios de los criterios usualmente utilizados para la evaluación del desempeño reproductivo y la calidad de progenie, pueden ser utilizados para poner a prueba la eficacia de las dietas suministradas a los reproductores; por ejemplo: la fecundidad, el tamaño, peso y composición bioquímica de los huevos, larvas o juveniles, y su supervivencia a pruebas de estrés. Los niveles iniciales de reservas presentes en los huevos y larvas o juveniles lecitotróficos pueden determinar su futuro desempeño. Por este motivo, su composición bioquímica es utilizada como indicador de la calidad de progenie en relación a la nutrición de los reproductores (Harrison, 1990; Racotta *et al.*, 2003, 2004). En particular, se utiliza el contenido de astaxantina en los huevos como criterio predictivo de su calidad, ya que ha sido relacionado con la supervivencia de las larvas en *P. monodon* y en *L. vannamei* (Pan *et al.*, 2001; Wade *et al.*, 2015). Estos carotenoides no pueden ser sintetizados *de novo* por los crustáceos y deben ser incorporados exclusivamente a través de la dieta (Dall *et al.*, 1995). La suplementación con astaxantina de diversas fuentes en la alimentación ha sido empleada exitosamente para mejorar la fecundidad y la calidad de las larvas en los camarones *Penaeus japonicus* Spence Bate, 1888, *P. monodon* y *L. vannamei* (Pangantihon-Kuhlmann *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 1997; Wyban *et al.*, 1997)

La supervivencia a pruebas de estrés también ha sido utilizada para evaluar la calidad de larvas y juveniles en respuesta a distintas dietas (Rodríguez-González *et al.*, 2014). Estas pruebas consisten evaluar el desempeño de los individuos frente a la exposición a condiciones ambientales adversas (Racotta *et al.*, 2003). Por ejemplo, condiciones de salinidad desfavorables (Mutti *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018), temperaturas altas (Duan *et al.*, 2017 a), concentraciones crecientes de amoníaco o formaldehído (Duan *et al.*, 2017 b, Wang *et al.*, 2018) e hipoxia (Pakravan *et al.*, 2018), entre otras. En dichas condiciones, la condición fisiológica de las larvas o juveniles determinará su capacidad para sobrevivir (Cavalli *et al.*, 2000). Específicamente, las pruebas de restricción nutricional nos permiten evaluar el desempeño de las dietas de los reproductores, debido a que la resistencia de los juveniles a la inanición temporaria está directamente relacionada a las reservas maternas transferidas (Harrison, 1990; Marciano *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha utilizado la cuantificación de las gotas lipídicas en el órgano perigástrico como una estimación de las reservas energéticas larvales, para evaluar el potencial endotrófico larval y su vulnerabilidad nutricional en la langostilla *Pleuroncodes monodon* (H. Milne Edwards, 1837) (Espinoza *et al.*, 2016).

A pesar de su importancia, pocos estudios han abordado la formulación de dietas específicas para camarones ornamentales o han puesto a prueba los alimentos comerciales disponibles en el mercado (Tziouveli *et al.*, 2011). En particular, los requerimientos nutricionales específicos de *Neocaridina davidi* se desconocen, y solo se ha probado formalmente una dieta comercial en esta especie (Tetracolor®). Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se evaluaron tres dietas comerciales y su efecto sobre el desempeño reproductivo y la calidad de progenie en el camarón *N. davidi* a partir de un protocolo de evaluación que podría utilizarse a futuro para evaluar otros alimentos comerciales, o formulados específicos. El primero es un alimento comercial formulado para peces tropicales ornamentales que se considera apropiado para *N. davidi* y que hemos utilizado extensamente con buenos resultados en el laboratorio sobre la reproducción y el crecimiento (Baliña *et al.*, 2018; Marciano *et al.*, 2018; Pantaleão *et al.*, 2015;

Tropea *et al.*, 2015; Tropea & López Greco, 2015; Vazquez *et al.*, 2017), el segundo es un alimento específico para crustáceos con un valor de mercado similar al anterior y el tercero es un alimento comercial para peces ornamentales que tiene un costo menor a los otros.

## 5.2 Objetivo

Evaluar el impacto directo de la calidad del alimento sobre la producción de crías en *N. davidi*, de tres alimentos comerciales para acuicultura de especies ornamentales.

En el marco de dicho objetivo se plantearon las siguientes hipótesis:

**Hipótesis 7:** El desempeño reproductivo de las hembras y la calidad de la progenie en estadios tempranos del desarrollo (embriones y juveniles I) se verán afectados por el contenido de carotenoides y de ácidos grasos poliinsaturados de la dieta.

**Hipótesis 8:** El desempeño de las crías frente a pruebas de estrés dependerá del contenido y proporción de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 y n-6 de la dieta.

## 5.3 Materiales y métodos

### 5.3.1 Condiciones de cría

Juveniles de *N. davidi* recientemente eclosionados fueron colocados en acuarios plásticos conteniendo agua de clorada y en las mismas condiciones descritas en el capítulo 2. El agua fue reemplazada una vez a la semana de manera parcial y una segunda vez completamente. La calidad de agua (pH, kH, gH, Cl<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>2-</sup>) se monitoreó por medio de tiras reactivas Sera Quick Test®. Los individuos fueron asignados aleatoriamente a una de las siguientes dietas (tratamientos) y fueron alimentados diariamente en cantidades iguales (aproximadamente el 7 % del peso corporal) con:

- ∴ **T**: alimento comercial para peces tropicales (Tetracolor®, Tetra GmbH, Melle, Germany),
- ∴ **C**: alimento comercial para crustáceos (Crusta Sticks®, Tropical, Chorzów, Poland),
- ∴ **O**: alimento comercial para peces ornamentales (Basic®, Labcon, Camboriú, Brazil).

Todos los alimentos fueron previamente molidos y tamizados con una malla fina para ofrecer a los juveniles similar tamaño de partícula. Los ingredientes de cada alimento, según lo indican sus fabricantes, se detallan en la tabla 5.1.

Se colocó en cada acuario una planta artificial de material plástico para ser utilizado como sustrato y/o refugio, en reemplazo del musgo de Java que se utiliza habitualmente en el cultivo de la especie dado que éste último podría ser utilizado también como alimento e interferir en los resultados. Estas plantas artificiales fueron fabricadas con tiras de 1,5 cm de ancho x 10 cm de largo de tejido de monofilamento de polietileno color verde, unidas por la base.

Las hembras fueron separadas de los machos al observarse por primera vez el desarrollo de los caracteres sexuales, garantizando así la virginidad de las hembras al comienzo del experimento. Los individuos fueron criados hasta que alcanzaron un peso mínimo de 60 mg para las hembras y de 35 mg para los machos (aproximadamente a los 3 meses de edad). Se seleccionaron los individuos sexualmente maduros.

Tabla 5.1: Ingredientes de los tres alimentos comerciales evaluados.

T	C	O
Harina de soja	...	Harina de soja
Harina de pescado	Harina de pescado	Harina de pescado
Harina de trigo	Harina de trigo	Harina de trigo
Harina de germen de trigo	Harina de germen de trigo	...
Gluten de trigo	...	...
Harina de avena	...	...
Harina de maíz	Harina de maíz	Harina de maíz
...	Harina de arroz	...
...	Arvejas	...
...	Alfalfa	...
...	...	Harina de mandioca
Harina de algas	Harina de algas	Harina de algas
...	...	Harina de lombriz
Harina de camarón	Crustáceos	Camarón deshidratado
...	Moluscos	Calamar
Levadura	Levadura	Levadura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
...	Aceite de pescado	Aceite de pescado
Aceite de soja	...	Aceite de soja
...	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Spirulina</i> sp.
Palmitato de vitamina A, vit. C, vit. D3, vit. B12, monohidrocloruro de L-lisina, lecitina, ácido ascórbico, inositol, lacina, biotina, ácido fólico, sulfato de zinc, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, acetato de cobalto, cloruro de colina	Vit. A, vit. D, vit. E, vit. C, hierro, cobre, zinc, manganeso, selenio, yodo, molibdeno	Vit. A, vit. C, vit. D3, vit. E, vit. K3, vit. B1, vit. B2, vit. B6, vit. B12, niacina, pantotenato de calcio, ácido fólico, colina, hierro, cobre, zinc, manganeso, selenio, yodo metionina, aditivo prebiótico (MOS), aditivo enzimático (pectinasa, proteasa, fitasa, beta glucanasa, xilasa, celulasa y amilasa)
Ácido cítrico, etoxiquina	Antioxidantes	Ácido cítrico, etoxiquina, BHA, BHT
Beta-caroteno, extracto de annatto, Rojo 3 de tinte		Cúrcuma, espinacas, cochinilla, zanahoria

### 5.3.2 Diseño experimental

Se llevaron a cabo dos experimentos, el primero para evaluar el rendimiento reproductivo (Experimento 1) y el segundo para evaluar la calidad de progenie en la primera puesta de reproductores alimentados con los tres alimentos comerciales (Experimento 2).

#### 5.3.2.1 Experimento 1

Los tratamientos (T, C y O) fueron asignados a las unidades experimentales al azar (diseño completamente aleatorizado). Cada unidad experimental (10 réplicas x 3 tratamientos) estuvo compuesta por una hembra virgen y dos machos, colocados en un acuario plástico de 18 x 12,5 x 12 cm de tamaño, conteniendo 2 L de agua dechlorada y una planta artificial y mantenidos en las mismas condiciones de calidad de agua, temperatura y fotoperiodo descritas anteriormente. Todos los acuarios fueron inspeccionados visualmente una vez al día para determinar la presencia de hembras ovígeras. Inmediatamente luego del desove, los huevos fueron removidos (Fig. 5.1 A, B) y contados para la evaluación de la fecundidad realizada, y las hembras fueron pesadas (peso materno; precisión: 0,1 mg). La FECUNDIDAD REALIZADA RELATIVA se calculó dividiendo la fecundidad realizada por el peso materno. Los huevos fueron pesados (peso total de los huevos; precisión: 0,1 mg), y el PESO PROMEDIO DE LOS HUEVOS fue calculado dividiendo el peso total de los huevos por el número total de huevos. Una muestra al azar, correspondiente aproximadamente al 25 % de cada puesta, fue medida a lo largo del eje mayor y menor bajo microscopio estereoscópico (Carl Zeiss Stemi 2000-C). El VOLUMEN DE CADA HUEVO se calculó por medio de la fórmula para el volumen de un elipsoide:  $\frac{4}{3} \times \pi \times a \times b^2$ , donde a y b son los radios del eje mayor y menor, respectivamente (Clarke, 1993). Los huevos fueron conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación del CONTENIDO TOTAL DE CAROTENOIDES.



Figura 5.1: Hembra de *Neocaridina davidi* cuyos huevos fueron parcialmente removidos luego del desove (A); detalle de los huevos donde se observan los primeros surcos de segmentación (B).

#### 5.3.2.2 Experimento 2

Al igual que en el experimento 1, los tratamientos fueron asignados completamente al azar a las unidades experimentales. Cada una de las 10 réplicas contenía una hembra virgen y dos machos, que fueron inspeccionadas diariamente para la detección de hembras ovígeras. Inmediatamente luego de la eclosión el número de juveniles I fue contado para evaluar la fecundidad actual. Las hembras fueron pesadas (peso materno; precisión 0,1 mg) y la FECUNDIDAD ACTUAL RELATIVA se calculó dividiendo la fecundidad actual por el peso materno. Una muestra al azar de 5 a 10 JI de cada puesta fue fotografiada para medir el ÁREA DEL ÓRGANO PERIGÁSTRICO OCUPADA POR GOTAS LIPÍDICAS, según Espinoza *et al.* (2016). Luego fue pesada (precisión: 0,1 mg) y el peso promedio de los JI fue calculado dividiendo el peso total de la muestra por el número de JI. Se tomó otra muestra de 10 juveniles al azar de cada puesta para evaluar su COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA luego de un período de crecimiento de 30 días, empleando la metodología que se describe en el capítulo 3. Finalmente una muestra al azar de 12 juveniles por puesta fueron sometidas a una prueba de restricción nutricional, de acuerdo con Pantaleão *et al.* (2015) y Marciano *et al.* (2018). Para esta prueba, la cual duró 32 días, cada JI fue colocado en un contenedor plástico de 250 cm<sup>3</sup> y mantenido en las mismas condiciones de calidad de agua,

temperatura y fotoperiodo que los reproductores. Una pequeña pieza de malla plástica (2 x 1 cm), y una pequeña piedra (0,5 x 0,2 x 0,5 cm) fueron colocados en cada contenedor para ser utilizados por los juveniles como sustrato y refugio (Fig. 5.2). El agua de los contenedores fue reemplazada completamente una vez a la semana. Cada JI fue asignado al mismo tratamiento que sus padres (alimento) y a uno de los siguientes tratamientos de restricción en un diseño factorial de 3 x 2:

- ∴ **AC**: alimentación diaria durante el período de 32 días,
- ∴ **I8**: inanición por los primeros 8 días luego de la eclosión y luego alimentación diaria hasta el día 32.

Diariamente se registró la mortalidad y al final de la prueba los camarones de 32 días de edad fueron pesados (PESO DE LOS CAMARONES DE 32 DÍAS DE EDAD; precisión 0,1 mg). La SUPERVIVENCIA de la progenie fue definida como la proporción de camarones de cada puesta que sobrevivió a la prueba de restricción nutricional.

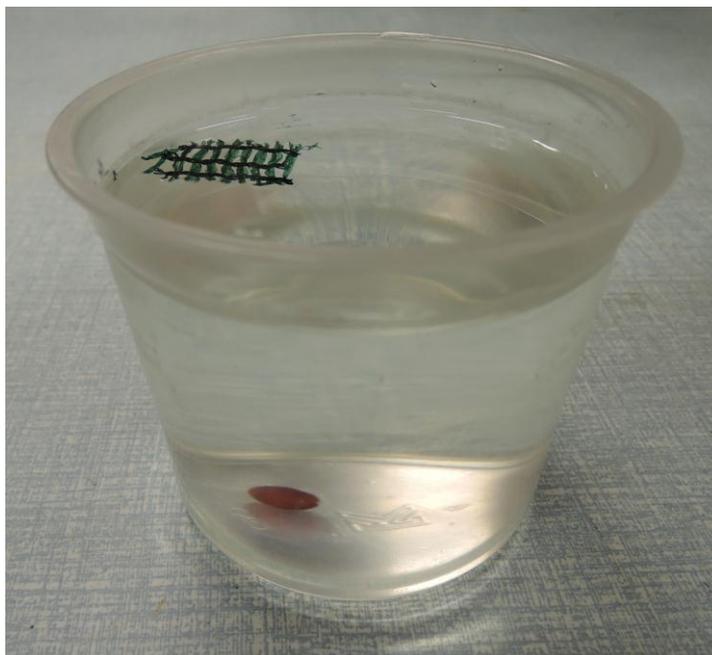


Figura 5.2: Envase plástico de 250 cm<sup>3</sup> conteniendo una pieza de malla plástica y una piedra, utilizado en la prueba de restricción nutricional.

### 5.3.3 Composición proximal de los alimentos y determinación de ácidos grasos

El contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos totales fue determinado por los siguientes métodos: Kjeldahl (factor de conversión: 6,25; AOAC, 1984), Bligh y Dyer (Bligh & Dyer, 1959), y Cleeg-Anthrone (Cleeg, 1956), respectivamente. La humedad, el contenido de cenizas y el contenido de fibras fueron determinados utilizando los métodos estándar desarrollados por AOAC international (1990, 1997). Finalmente, se llevó a cabo la separación y cuantificación de los ácidos grasos presentes en los alimentos por medio de cromatografía gaseosa con detector de ionización a la llama. La identificación de los diferentes ácidos grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención de ácidos grasos contenido en el estándar FAME Mix Supelco® 37 component y PUFA N° 1 de origen Marino Supelco®. Los resultados se expresan en porcentaje relativo, calculado como la razón entre el área bajo el pico correspondiente al ácido graso y la suma de las áreas bajo todos los picos (% Área).

### 5.3.4 Determinación del contenido de carotenoides

El contenido total de carotenoides fue determinado espectrofotométricamente por un método modificado de Renstrøm *et al.* (1981) y Torrissen y Naevdal (1984). Las muestras de entre 5 y 20 mg fueron homogeneizadas en acetona 100 %, y almacenadas durante 3 días a 4 °C en oscuridad. Se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 475 nm. El contenido de carotenoides de cada muestra se calculó por medio de la fórmula de Kelley y Harmond (1972):  $\mu\text{g de carotenoides/mg de huevos} = A \times V \times 106 / (100 \times G \times \epsilon^{1\%}_{1\text{cm}})$ , donde A es la absorbancia a 475 nm, V es el volumen del extracto (mL), G es el peso de la muestra (mg), y  $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}} = 1900$  es el coeficiente de extinción para la astaxantina en acetona al 100 % (Foss *et al.*, 1984). Se utilizó el coeficiente de extinción para la astaxantina ya que este es el carotenoide más abundante (90 %) en crustáceos.

### 5.3.5 Adquisición de imágenes y medición del área del órgano perigástrico ocupada por gotas lipídicas.

Los JI fueron anestesiados por inmersión en agua fría y fotografiados en vista dorsal por medio de una cámara fotográfica Nikon Coolpix P340 (Nikon Imaging Japan Inc., Tokyo, Japan) bajo microscopio estereoscópico con un aumento de 50 x (Carl Zeiss Stemi 2000-C). Todas las fotografías fueron tomadas ubicando al ejemplar en el centro de la imagen para evitar el error de paralaje. Para establecer la escala de las imágenes, se utilizó papel milimetrado. Las imágenes fueron almacenadas en formato jpg con una resolución de 600 dpi ppp. El área del órgano perigástrico ocupada por gotas lipídicas fue medida en mm<sup>2</sup> (Fig. 5.3), utilizando el programa Adobe Photoshop C5S (version 1.5.3.9120).

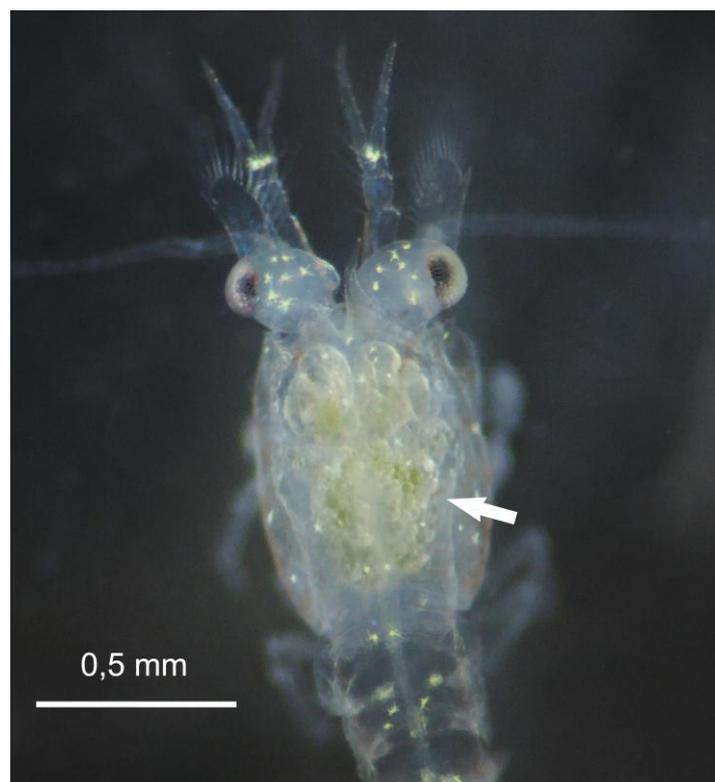


Figura 5.3: *Neocaridina davidi*. Gotas lipídicas en el órgano perigástrico de los Juveniles I.

### 5.3.6 Análisis estadísticos

La exploración de datos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Zuur *et al.* (2010). El efecto de la dieta sobre la fecundidad realizada relativa, el peso promedio de los huevos, el contenido de carotenoides en los huevos, la fecundidad actual relativa, el peso promedio de los JI y el área del órgano perigástrico ocupada por gotas lipídicas fue analizado ajustando un modelo lineal por cuadrados mínimos generalizados.

El efecto de la dieta sobre el volumen de los huevos fue analizado ajustando un modelo mixto con la dieta como factor fijo y el número de réplica como factor aleatorio. Las comparaciones múltiples fueron realizadas por medio de una prueba de Tukey.

Para analizar el efecto de la dieta sobre la supervivencia de la progenie, se utilizó un modelo generalizado con una distribución Binomial y una función link logística, incluyendo a la dieta, el tratamiento de restricción y sus interacciones como factores fijos. Para la variable peso de los camarones de 32 días de edad, se ajustó un modelo lineal mixto con las variables explicatorias: dieta, tratamiento de restricción y su interacción como factores fijos, y el número de réplica como factor aleatorio. Dado que la interacción entre los factores dieta y tratamiento de restricción fue estadísticamente significativa, se definió una nueva variable como la combinación de los niveles de todos los factores, y todas las comparaciones posibles fueron realizadas mediante una prueba de Tukey. Los supuestos de cada modelo fueron evaluados gráficamente según Zuur *et al.* (2007). Los análisis estadísticos fueron realizados con los paquetes nlme y multcomp (Hothorn *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2017) para el software R (R Core Team, 2016). El nivel de significación empleado fue 0,05. Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el desvío estándar.

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Alimentos

La composición proximal y el contenido de carotenoides en los alimentos se resumen en la tabla 5.2. El alimento O tuvo el mayor contenido de lípidos, pero tuvo menor cantidad de carbohidratos que los otros alimentos y C fue el que tuvo el menor contenido de carotenoides. Todas las dietas tuvieron porcentajes de proteínas superiores al 35%. La composición de ácidos grasos de los alimentos se resume en la tabla 5.3. Los resultados se expresan en porcentaje relativo, calculado como la razón entre el área bajo el pico correspondiente al ácido graso y la suma de las áreas bajo todos los picos.

Tabla 5.2: Composición proximal (g /100 g peso fresco) y contenido de carotenoides (mg/kg peso fresco) de los tres alimentos comerciales evaluados (media  $\pm$  DE).

	T	C	O
Humedad	4,87 $\pm$ 0,35	8,18 $\pm$ 0,09	4,52 $\pm$ 0,19
Cenizas	8,68 $\pm$ 0,32	9,82 $\pm$ 0,14	11,92 $\pm$ 0,19
Proteínas	45,59 $\pm$ 0,09	37,45 $\pm$ 0,16	43,43 $\pm$ 0,08
Lípidos	8,57 $\pm$ 0,00	5,64 $\pm$ 0,25	15,62 $\pm$ 0,00
Carbohidratos	20,93 $\pm$ 0,37	33,82 $\pm$ 0,11	15,00 $\pm$ 0,25
Fibra	8,53 $\pm$ 2,03	5,09	7,33 $\pm$ 1,60
Carotenoides	381,95 $\pm$ 1,81	20,30 $\pm$ 0,56	318,88 $\pm$ 11,92

Tabla 5.3: Composición de ácidos grasos de los tres alimentos comerciales evaluados (% Área promedio  $\pm$  DE). La línea de puntos indica que el ácido graso no fue detectado.

Ácido graso	T	C	O
C12:0	0,061 $\pm$ 0,000	...	...
C14:0	1,882 $\pm$ 0,018	3,480 $\pm$ 0,060	0,787 $\pm$ 0,008
C15:0	0,137 $\pm$ 0,002	0,240 $\pm$ 0,000	0,129 $\pm$ 0,000
C16:0	15,182 $\pm$ 0,004	25,830 $\pm$ 0,120	13,760 $\pm$ 0,045
C16:1	2,704 $\pm$ 0,037	3,020 $\pm$ 0,090	0,896 $\pm$ 0,005
C17:0	0,127 $\pm$ 0,000	0,180 $\pm$ 0,040	0,164 $\pm$ 0,001
C17:1	0,330 $\pm$ 0,002	...	...
C18:0	2,473 $\pm$ 0,005	3,380 $\pm$ 0,080	3,819 $\pm$ 0,020
C18:1n9 <sup>φ</sup>	23,379 $\pm$ 0,002	23,020 $\pm$ 0,180	23,075 $\pm$ 0,023
C18:1n7	1,623 $\pm$ 0,006	...	1,311 $\pm$ 0,006
C18:2n6 <sup>φ</sup>	35,185 $\pm$ 0,020	24,830 $\pm$ 0,160	47,208 $\pm$ 0,006
C18:3n6	3,247 $\pm$ 0,005	2,900 $\pm$ 0,080	4,361 $\pm$ 0,001
C18:3n3	0,578 $\pm$ 0,007	2,930 $\pm$ 0,010	0,281 $\pm$ 0,016
C18:4n3	0,800 $\pm$ 0,002	...	0,131 $\pm$ 0,002
C20:0	0,063 $\pm$ 0,004	0,120 $\pm$ 0,000	0,132 $\pm$ 0,001
C20:1	0,182 $\pm$ 0,004	3,300 $\pm$ 0,040	0,273 $\pm$ 0,002
C20:2	...	0,360 $\pm$ 0,010	...
C21:0	0,108 $\pm$ 0,002	...	...
C22:0	0,396 $\pm$ 0,008	...	0,177 $\pm$ 0,001
C24:0	0,154 $\pm$ 0,000	...	...
C20:3n6	0,186 $\pm$ 0,005	...	...
C20:4n6 (ARA)	0,177 $\pm$ 0,010	...	0,294 $\pm$ 0,004
C20:5n3	4,600 $\pm$ 0,027	2,350 $\pm$ 0,010	0,906 $\pm$ 0,004
C22:1n9	...	0,350 $\pm$ 0,050	...
C22:1n11	0,266 $\pm$ 0,001	...	...
C22:5n3	0,692 $\pm$ 0,005	...	0,241 $\pm$ 0,007
C22:6n3	4,528 $\pm$ 0,020	3,640 $\pm$ 0,040	1,743 $\pm$ 0,012
Σ Saturados	20,586 $\pm$ 0,027	33,230 $\pm$ 0,212	18,966 $\pm$ 0,037
Σ Monoinsaturados	28,484 $\pm$ 0,027	29,690 $\pm$ 0,255	25,555 $\pm$ 0,025
Σ Poliinsaturados (PUFA) <sup>γ</sup>	49,995 $\pm$ 0,082	37,010 $\pm$ 0,310	55,163 $\pm$ 0,011
Σ n-3 PUFA	11,199 $\pm$ 0,017	8,920 $\pm$ 0,060	3,302 $\pm$ 0,001
Σ n-6 PUFA	38,796 $\pm$ 0,041	27,730 $\pm$ 0,240	51,863 $\pm$ 0,013
n3/n6	0,289 $\pm$ 0,000	0,322 $\pm$ 0,250	0,064 $\pm$ 0,000

<sup>φ</sup> configuraciones cis y trans

<sup>γ</sup>  $\geq 18:2n$

#### 5.4.2 Experimento 1

El peso de las hembras fue en promedio  $73,81 \pm 1,96$  mg. La fecundidad realizada relativa no difirió estadísticamente entre tratamientos (GL = 2; F = 1,2354; p = 0,3079). Promedió  $0,51 \pm 0,08$  huevos por mg para T (rango: 0,14 - 0,79),  $0,62 \pm 0,03$  para C (rango: 0,43 - 0,76) y  $0,49 \pm 0,04$  para O (rango: 0,28 - 0,63) (Fig. 5.4). El peso promedio y el volumen de los huevos fue en promedio  $0,27 \pm 0,01$  mg y  $2,16 \pm 0,02$  mm<sup>3</sup>, respectivamente, y fueron similares entre tratamientos (GL = 2; F = 0,8174; p = 0,4531; y GL = 2; F = 3,1067; p = 0,0624, respectivamente) (Fig. 5.5 A, B). El contenido de carotenoides en los huevos difirió estadísticamente entre tratamientos (GL = 2; F = 11,1939; p = 0,0004) (Fig. 5.6). Fue 67 % mayor en huevos provenientes de parejas alimentadas con T que en aquellas alimentadas con C (GL = 2; Z = 3,4170; p = 0,0018) y 150 % mayor que en las parejas alimentadas con O (GL = 2; Z = 4,4510; p = 0,0001).

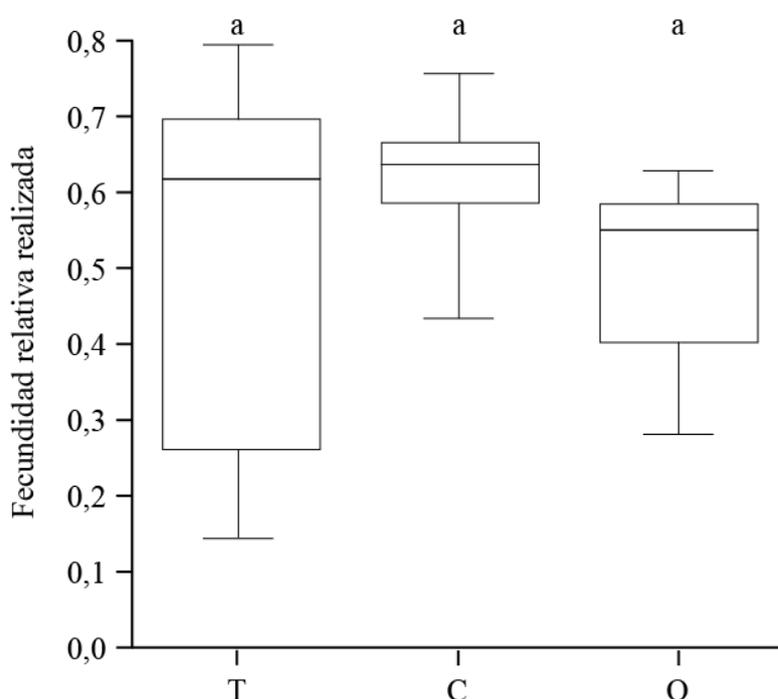


Figura 5.4: Desempeño reproductivo de *Neocaridina davidi*. Se estudió el efecto de los tres alimentos comerciales (T, C, O) sobre la fecundidad relativa realizada (número de huevos/mg de hembra). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

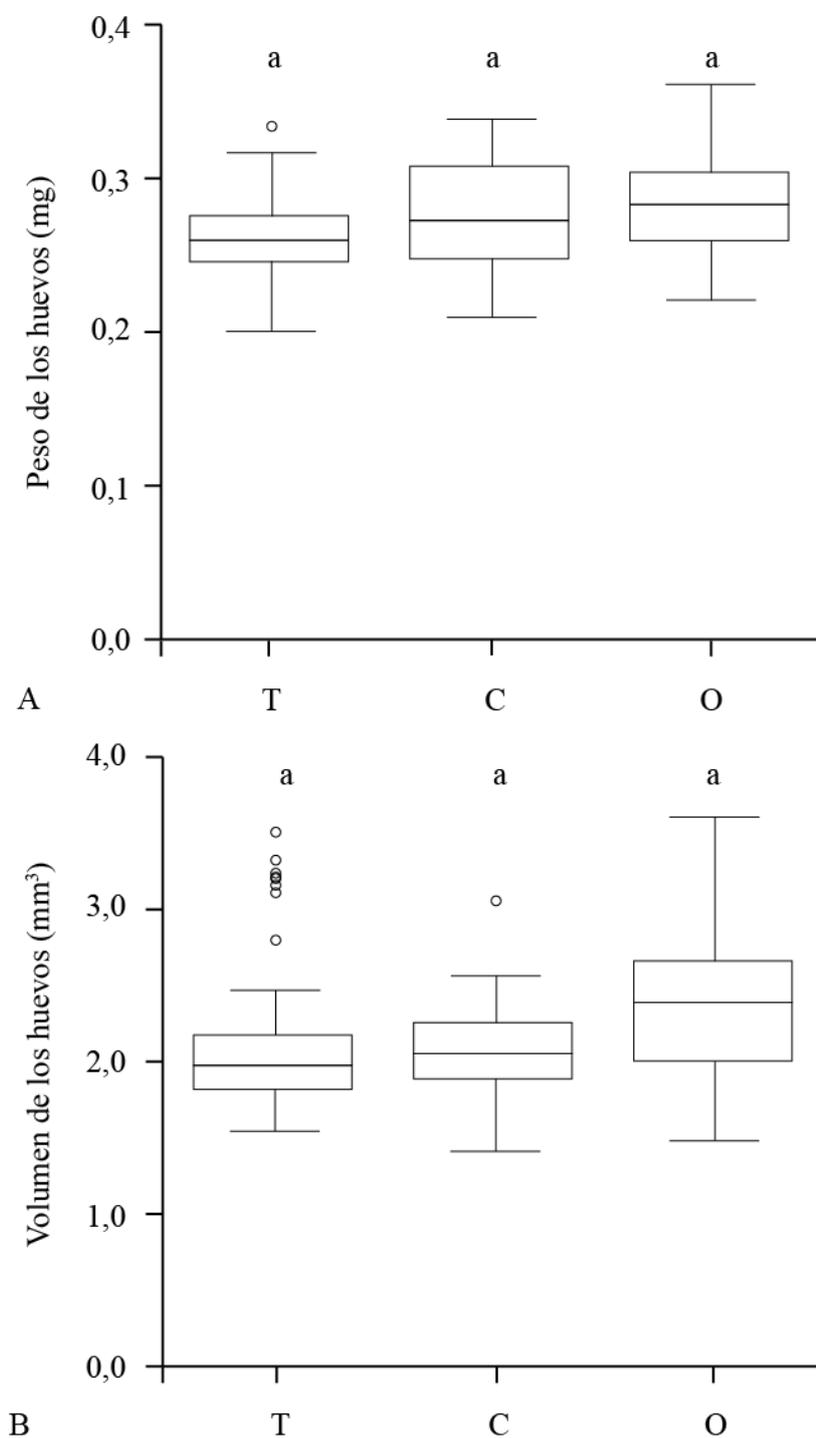


Figura 5.5: Calidad de progenie en *Neocaridina davidi*. Se evaluó el efecto de los tres alimentos comerciales (T, C, O) sobre el peso promedio de los huevos (A) y sobre el volumen de los huevos (B). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

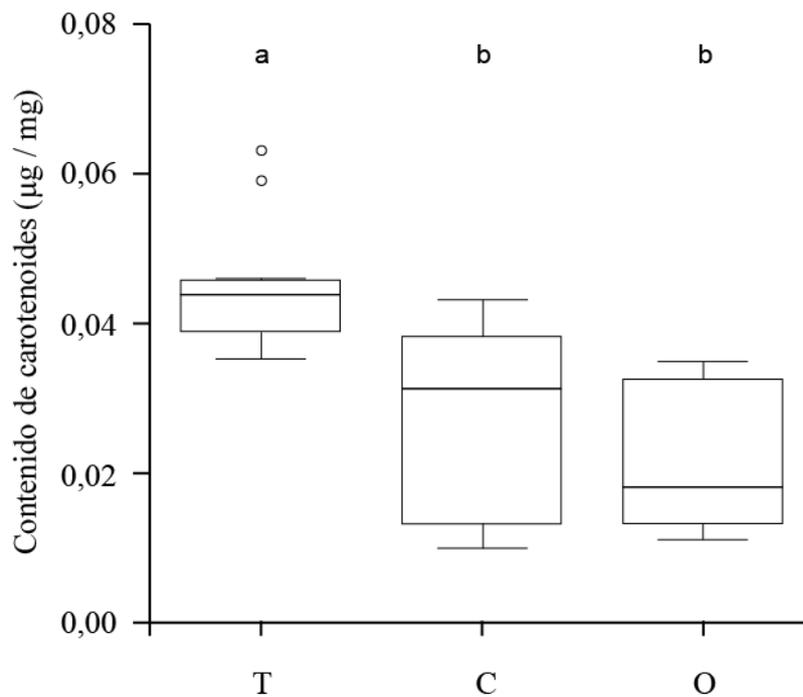


Figura 5.6: Calidad de progenie en *Neocaridina davidi*. Se estudió el efecto de los tres alimentos comerciales (T, C, O) sobre el contenido de carotenoides. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.3 Experimento 2

El peso de las hembras fue en promedio  $85,27 \pm 2,26$  mg. El 89% de las puestas provenientes de hembras alimentadas con T eclosionaron completamente, pero solo el 67 % y el 71 % de las puestas de hembras alimentadas con C o con O no perdieron completamente sus huevos, respectivamente. La fecundidad actual relativa, que promedió  $0,34 \pm 0,05$  juveniles eclosionados por mg para T (rango: 0,26 - 0,54),  $0,14 \pm 0,05$  para C (rango: 0,09 - 0,31), y  $0,18 \pm 0,06$  para O (rango: 0,13 - 0,56), no difirió estadísticamente entre tratamientos ( $df = 2$ ;  $F = 3.391$ ;  $p = 0.059$ ). Sin embargo, fue 58,82 % menor para reproductores alimentados con C que para aquellos alimentados con T, y 47,06 % menor para parejas alimentadas con O que para aquellas alimentadas con T (Fig. 5.7 A, B). El peso promedio de los JI fue similar para todos los tratamientos ( $GL = 2$ ;  $F = 1,0148$ ;  $p = 0,3847$ ), y promedió  $0,37 \pm 0,01$  mg (Fig. 5.8 A). Por otro lado, el área del órgano perigástrico ocupada por gotas lipídicas en los JI difirió estadísticamente entre tratamientos ( $GL = 2$ ;  $F = 6,5081$ ;  $p = 0,0025$ ) (Fig. 5.8 B). Los JI provenientes de parejas

de reproductores alimentadas con C tuvieron un área 17,39 % menor del órgano perigástrico ocupada por gotas lipídicas que aquellos provenientes de reproductores alimentados con T (Prueba de Tukey: GL = 2; Z = 3,1850; p = 0,0041) y 20,83 % menor que los provenientes de reproductores alimentados con O (Prueba de Tukey: GL = 2; Z = 3,2160; p = 0,0037). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los JI de reproductores alimentados con T y JI de reproductores alimentados con O (Prueba de Tukey: GL = 2; Z = -0,2880; p = 0,9552). La cantidad de juveniles eclosionados por hembra no fue suficiente en todas las réplicas para tomar una muestra para determinaciones bioquímicas y por lo tanto no se alcanzó la masa mínima requerida para realizar la determinación del contenido de proteínas, lípidos y glucógeno en los camarones a los 30 días de edad.

En cuanto al test de restricción alimentaria, la supervivencia de las crías fue similar para las diferentes dietas (GL = 2; devianza = 60,6610; p = 0,7957), pero fue 54,90 % mayor para AC que para I8 (GL = 1; devianza = 45,1290; p = 8,1130e<sup>-05</sup>), promediando 79,00 ± 19,00 % para AC y 51,00 ± 26,00 % para I8 (Fig. 5.9 A). El peso de los camarones de 32 días de edad fue similar para los alimentados diariamente con T y los alimentados diariamente con C (Prueba de Tukey: GL = 5; Z = -1,7490; p = 0,4770), pero fue 26,61 % menor en camarones alimentados diariamente con O en relación a los alimentados diariamente con T (Prueba de Tukey: GL = 5; Z = 2,8250; p = 0,0487), y 68,13 % mayor en camarones alimentados diariamente con C comparados con los alimentados diariamente con O (Prueba de Tukey: GL = 5; Z = -3,9430; p = 0,0010) (Fig. 5.9 B).

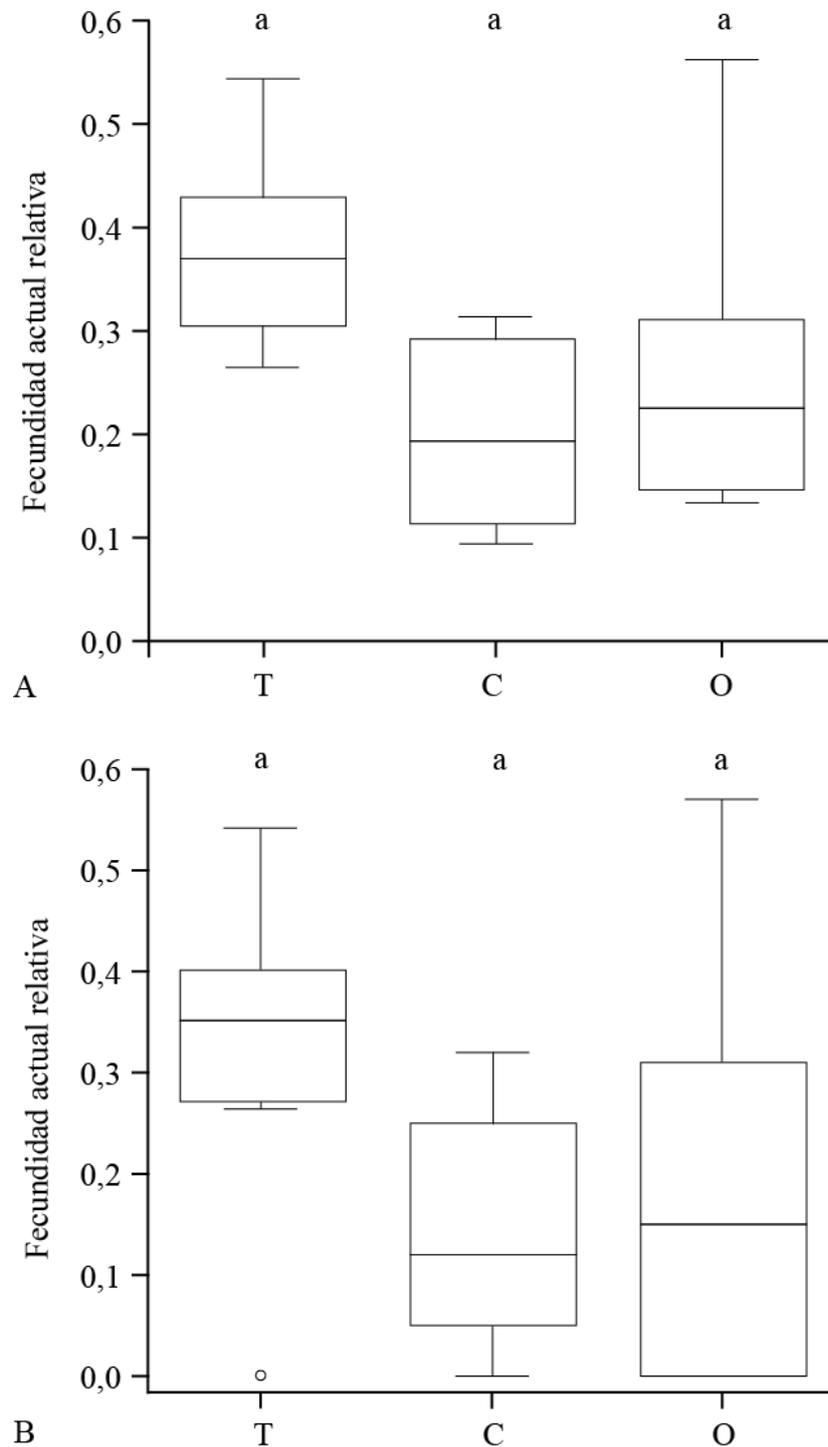


Figura 5.7: Desempeño reproductivo de *Neocaridina davidi*. Se evaluó el efecto de los tres alimentos comerciales (T, C, O) sobre la fecundidad actual relativa (número de juveniles eclosionados por mg de hembra); se muestran los resultados excluyendo (A) e incluyendo (B) a las hembras que sufrieron una pérdida total de huevos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

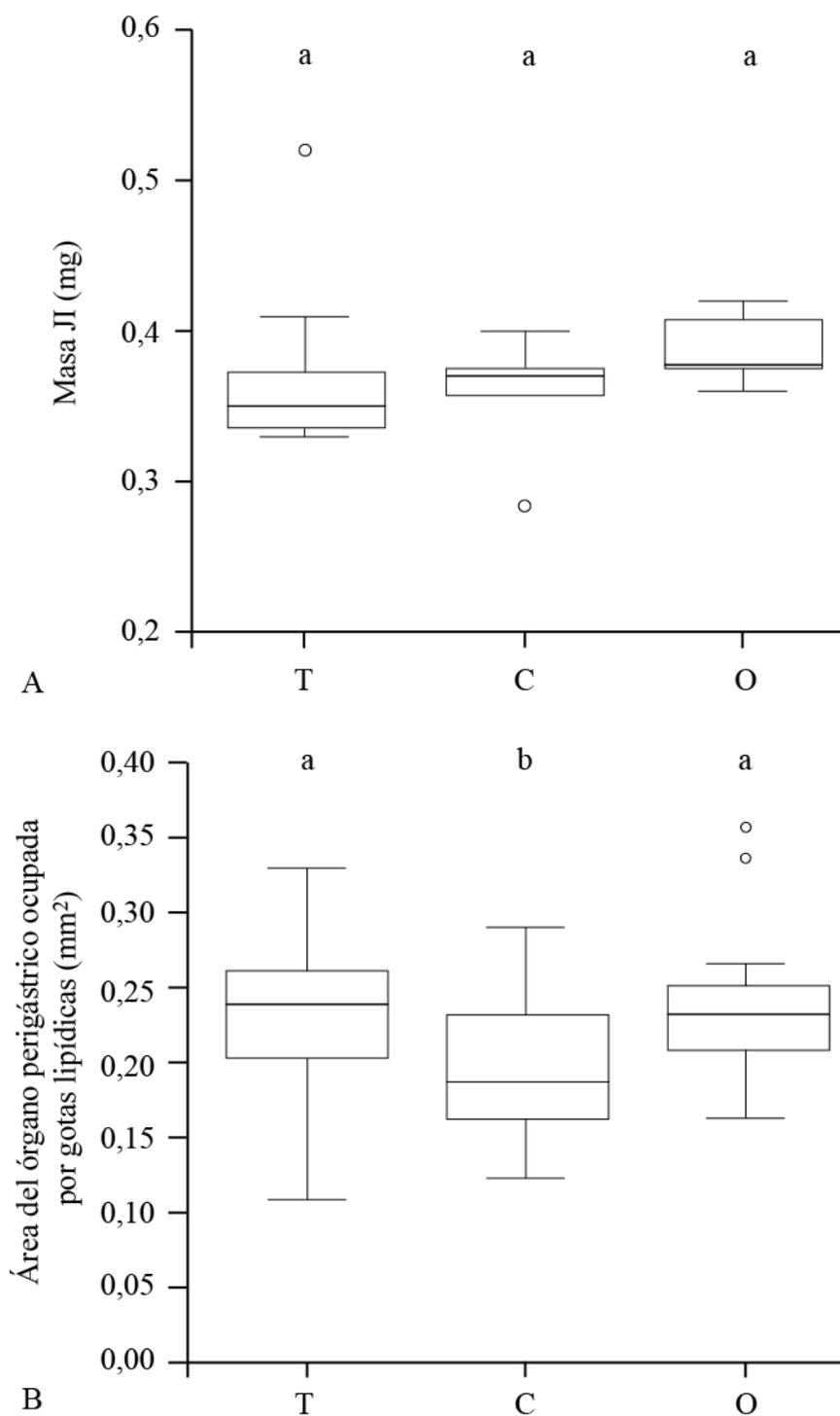


Figura 5.8: Calidad de progenie en *Neocaridina davidi*. Se evaluó el efecto de los tres alimentos comerciales (T, C, O) sobre el peso promedio de los juveniles I (A) y el área del órgano perigástrico de los Juveniles I ocupado por gotas lipídicas (B). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

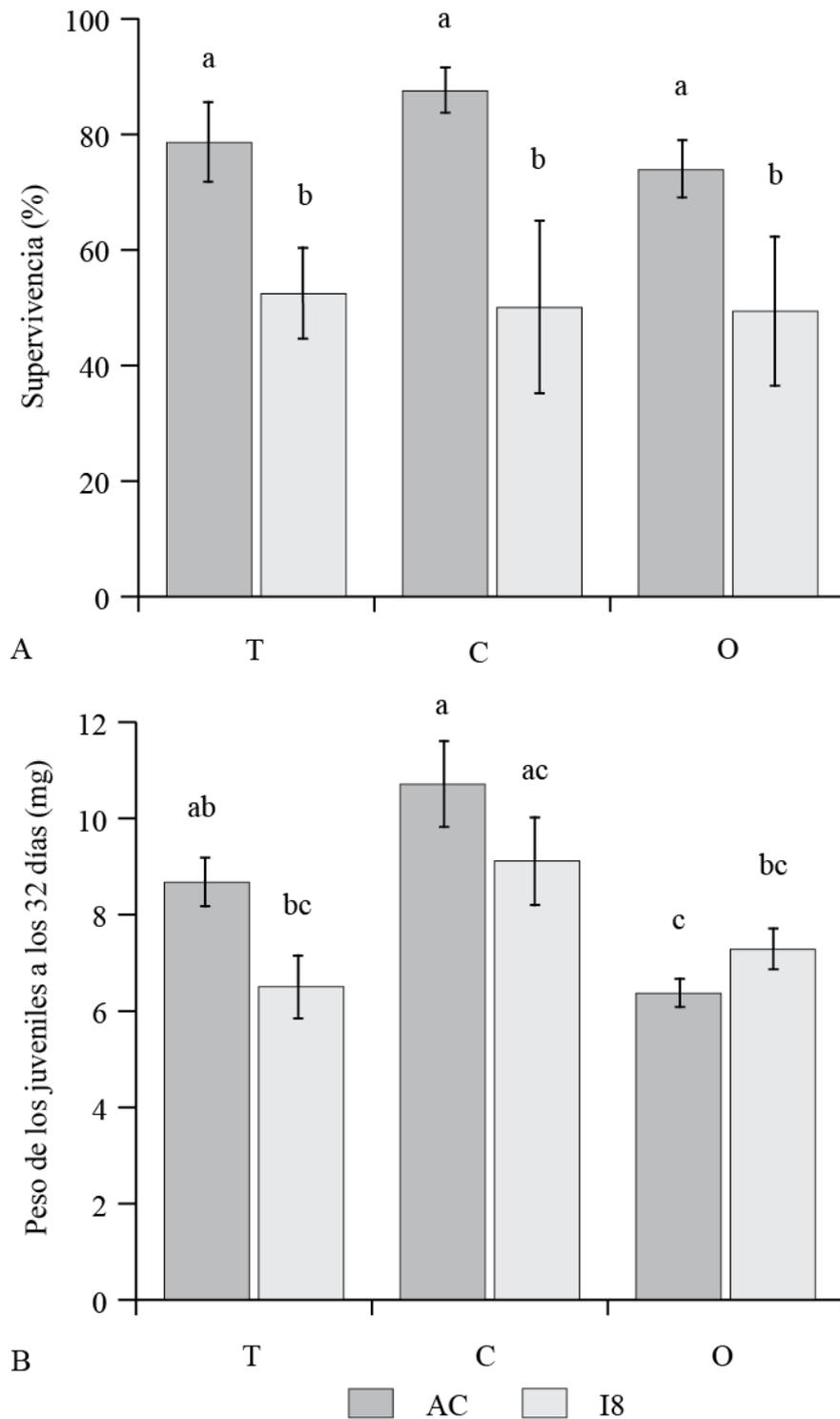


Figura 5.9: La calidad de progenie en *Neocaridina davidi* de parejas de reproductores alimentadas con tres alimentos comerciales (T, C, O) fue evaluada mediante una prueba de restricción nutricional. El efecto de la dieta sobre la supervivencia (A), y el peso de las crías de 32 días de edad (B) fue analizado para los dos regímenes de alimentación: AC e I8. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

## 5.5 Discusión

Las tres dietas fueron aceptadas de igual manera por los reproductores y juveniles de *N. davidi*. Los reproductores y sus crías fueron examinados diariamente y se observó alimento en sus tractos digestivos en todos los tratamientos. El rendimiento reproductivo fue similar entre dietas: no se observaron diferencias significativas entre los alimentos en la fecundidad realizada relativa y para la fecundidad actual relativa. Sin embargo, la fecundidad actual relativa en reproductores alimentados con T fue cerca de un 50 % mayor que aquellos alimentados con C o con O. Esta diferencia podría estar dada por una pérdida de huevos que habría sido menor en el caso de los reproductores alimentados con T. Es importante destacar que solo un 10 % de las hembras alimentadas con T perdieron sus huevos completamente (es decir, con una fecundidad actual igual a 0). En contraposición, alrededor de un 30 % de las hembras alimentadas con C y con O sufrieron una pérdida total de sus huevos. La mayor supervivencia de los embriones observada en las hembras alimentadas con T podría deberse a que tuvieron el mayor contenido de carotenoides. En particular, la astaxantina es el carotenoide más abundante en crustáceos (Yanar *et al.*, 2004). El contenido de astaxantina puede afectar la calidad de la progenie, ya que este carotenoide reacciona con los radicales libres de oxígeno que son producidos normalmente por los procesos oxidativos que se llevan a cabo en las células y causan estrés oxidativo (Blount *et al.*, 2000; Wade *et al.*, 2015). Las especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el singulete de oxígeno (radical de oxígeno), pueden inducir la inactivación enzimática, el clivaje de la hebra de ADN y la peroxidación de los lípidos de membrana (Hirayama *et al.*, 1994). La astaxantina puede atrapar estas especies reactivas y por lo tanto previene el daño al ADN del embrión y de los lípidos y proteínas de sus membranas, siendo su eficacia 11 veces mayor que el beta-caroteno y 550 veces más grande que el alfa-tocoferol (Britton, 2008; López Roldán *et al.* 2012; Weiss *et al.*, 2011; Wouters *et al.*, 2001). Además, se ha visto que la calidad de los huevos mejora cuando los reproductores son alimentados con dietas ricas en astaxantina (Watanabe & Vassallo-Agius, 2003). La

suplementación de las dietas con astaxantina incrementó la calidad de los huevos y el número normal de larvas en el medregal del Japón, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel, 1845 (Verakunpiriya *et al.*, 1997); mientras que en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), mejoró la calidad de huevos y su tasa de supervivencia durante el desarrollo embrionario (Ahmadi *et al.*, 2006). Por otra parte, la calidad de las larvas nauplii de *Litopenaeus vannamei* mejoró luego de la adición de pimentón a la dieta de los reproductores. Esta especie es fuente de varios carotenoides que luego pueden ser convertidos a astaxantina en crustáceos (Wyban *et al.*, 1997). A pesar de que el contenido de carotenoides en el alimento O fue similar al del alimento T, los huevos de hembras alimentadas con O tuvieron un contenido de carotenoides menor que aquellos provenientes de hembras alimentadas con T. Esto podría deberse a la formulación de la dieta, ya que dependiendo de la fuente, la astaxantina se puede encontrar en diferentes formas: libre con diferente composición de estereoisómeros, esterificado en uno o ambos grupos hidroxilo con ácido palmítico, oleico, esteárico o linoleico, o combinado con proteínas o lipoproteínas. Esto podría resultar en diferentes niveles de absorción (Bjerkeng *et al.*, 1997; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006). Además, la biodisponibilidad de la astaxantina podría depender también de la interacción con otros nutrientes presentes en la dieta y de la velocidad a la que se libera la astaxantina de la matriz alimentaria (Bjerkeng, 2000; Ju *et al.*, 2011; Maltby *et al.*, 2003).

Es importante señalar que los valores de fecundidad actual relativa para los reproductores alimentados con T, fueron menores que en el ensayo descrito en el capítulo 4. Esto puede deberse al reemplazo del uso de musgo de Java por plantas artificiales, pudiendo generar un impacto negativo en la calidad del agua. La presencia del musgo de Java contribuye a la disminución de compuestos nitrogenados (amonio, nitritos y nitratos) (Rogers & Thorp, 2015). En su ausencia se adicionó un segundo recambio de agua semanal y se monitoreo la concentración de nitritos y nitratos por medio de tiras reactivas. Sin embargo, estas medidas

probablemente no hayan sido suficientes para mantener la calidad del agua. Una de las consecuencias de esto puede ser una reducción en la fecundidad (Calado, 2008).

En las hembras inmaduras, el órgano perigástrico es la principal reserva de lípidos. Durante la vitelogénesis, los lípidos acumulados en el órgano perigástrico, y también los obtenidos de la dieta, se transportan y acumulan en los oocitos en desarrollo (Galois, 1984; Harrison, 1990). Por lo tanto, en las hembras con ovario en desarrollo, la concentración de lípidos en los mismos aumenta, mientras que se observa habitualmente una disminución en el nivel de lípidos totales en el órgano perigástrico (Wouters *et al.*, 2001). El vitelo proporciona todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de embriones y larvas lecitotróficas. Los lípidos, en particular, son la principal fuente de energía en estas etapas de desarrollo (Harrison, 1990), especialmente en especies con desarrollo abreviado, donde se observa un desarrollo embrionario relativamente más largo, que requiere una mayor cantidad de reservas de lípidos en los huevos (Cavalli *et al.*, 2000; Herring, 1974). Acorde a esto, Tropea y López Greco (2015) encontraron que los lípidos son la reserva más abundante en los huevos de *N. davidi*. En camarones carideos, el contenido de nutrientes del huevo se correlaciona con su volumen, y las diferencias en el volumen de los huevos son representativas de la inversión materna (Clarke, 1993; Wehrtmann & Graeve, 1998). En nuestro estudio, el volumen y el peso de los huevos de *N. davidi* fueron similares para todas las dietas. Esto indicaría que el contenido total de lípidos también podría ser similar entre los tratamientos, aunque no se midió directamente.

El peso de los juveniles I no se vio afectado por la dieta ofrecida a los reproductores. En contraste, la cantidad de gotas lipídicas encontradas en la región del órgano perigástrico en los juveniles I de reproductores alimentados con C fue aproximadamente un 20 % menor que en aquellos provenientes de reproductores alimentados con T u O. Esto podría corresponderse con una diferencia en el contenido de lípidos del embrión que no afectó el volumen del huevo, y podría estar relacionado con el contenido de lípidos en la dieta, que fue menor para C. Para esta

especie, entonces, el volumen de los huevos parecería no estar correlacionado con su contenido de lípidos.

Como se encontró en varios estudios, la composición de los ácidos grasos del embrión se puede alterar significativamente con la dieta de los reproductores (Cahu *et al.*, 1994, 1995; Cavalli *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2002). Por lo tanto, la calidad de los huevos y las larvas podría verse influenciada por la composición de los ácidos grasos de la dieta. En particular, se ha demostrado que la inclusión de niveles crecientes de PUFA n-3 en la dieta de los reproductores en camarones peneidos, mejora la calidad de la progenie. La tasa de eclosión de los huevos se relacionó con el contenido de PUFA n-3 en varias especies, por ejemplo, en el langostino *Penaeus indicus* H. Milne Edwards, 1837 (Cahu *et al.*, 1995), en el langostino chino *P. chinensis* (Xu *et al.*, 1994) y en el camarón *M. rosenbergii* (Cavalli *et al.*, 1999). De las tres dietas que se compararon en el presente estudio, T tuvo el contenido más alto de PUFA n-3, mientras que O tuvo el valor más bajo. Esta diferencia en el contenido de n-3 puede haber afectado la supervivencia de los embriones. Pero, si bien el alimento C y el T tuvieron valores similares de PUFA n-3 (solo un 20 % menor en C que en T), los reproductores alimentados con C tuvieron una eclosión considerablemente menor que los alimentados con T. En este caso, el contenido de astaxantina podría haber contribuido en mayor medida que el contenido de PUFA n-3 a la supervivencia de los embriones. Por lo tanto, la hipótesis 7 que dice que el desempeño reproductivo de las hembras y la calidad de la progenie en estadios tempranos del desarrollo (embriones y juveniles I) se verán afectados por el contenido de carotenoides y de ácidos grasos poliinsaturados de la dieta, es rechazada parcialmente.

Niveles altos de ácido linoleico (LIN; C18: 2 n-6) en la dieta de los reproductores provocaron un aumento en la fecundidad en *M. rosenbergii* (Cavalli *et al.*, 1999). En esta especie, así como en *N. davidi*, los niveles de PUFA n-6 en tejidos fueron más abundantes que los PUFA n-3 (C20: 5 n-3, EPA, y C22: 6 n-3, DHA) (Baliña *et al.*, 2018). Se ha propuesto que las hembras de *N. davidi* derivan LIN a los oocitos durante la vitelogénesis para ser usados como

un precursor del ácido docosaheptaenoico (C22:6 n-3) por los embriones (Baliña *et al.*, 2018). Este ácido graso podría almacenarse en el órgano perigástrico en adultos como fuente de energía metabólica. El contenido de LIN fue abundante en todas las dietas analizadas en el presente trabajo de tesis, pero más alto en O. Además, este alimento tuvo el mayor contenido de PUFA n-6 y la menor la proporción de PUFA n-3 y n-6. A pesar de que la supervivencia de la progenie a la prueba de restricción nutricional fue similar para todas las dietas, su peso fue menor cuando los reproductores fueron alimentados con O. Los PUFA de la serie n-3 parecerían más eficientes para promover el crecimiento en *N. davidi* que LIN, ya que las crías de los reproductores alimentados con el alimento O, con un alto contenido en LIN pero bajo en PUFA n-3, alcanzaron el peso más bajo. De forma similar, la inclusión de LIN en la dieta fue menos efectiva que el ácido alfa-linolénico (C18:3 n-3) para aumentar la ganancia en peso en *P. indicus* (Read, 1981) y *P. japonicus* (Kanazawa *et al.*, 1979). En consecuencia, la composición de ácidos grasos en la dieta podría ser más importante para el crecimiento de *N. davidi* que el contenido total de lípidos, ya que su valor nutritivo podría estar relacionado con los tipos de ácidos grasos y su contenido en la dieta (Kanazawa, 1985). Sobre la base de estos resultados, la hipótesis 8 que dice que el desempeño de las crías frente a pruebas de estrés dependerá del contenido y proporción de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 y n-6 de la dieta, es parcialmente rechazada.

En cuanto al contenido proteico de las dietas, es importante destacar que en todos los casos fue mayor al 35 %. Si bien se desconocen los requerimientos específicos para los camarones atyidos, éstos fueron ampliamente estudiados en camarones peneidos. Para éstos, se encontró que la concentración de proteínas recomendada en el alimento varía para las diferentes especies entre 30 % y 45 % (Alava & Lim, 1983; Córdova-Murueta & García-Carreño, 2002). Las dietas utilizadas para la cría de reproductores en peneidos poseen un contenido proteico incluso mayor, de entre 45 y 60 % (Bray & Lawrence, 1992). Otro factor a tener en cuenta es la calidad de las proteínas en la dieta. Dado que los ingredientes ricos en proteínas suelen ser costosos, las dietas comerciales suelen poseer una mezcla de fuentes proteicas (Córdova-Murueta & García-Carreño,

2002). Primeramente esto podría ser considerado ventajoso ya que los camarones utilizan mejor aquellas dietas que contienen una mezcla de dos o más fuentes de proteínas que las que contienen solo una (Alava & Lim, 1983). Pero por otro lado, la inclusión de fuentes de proteína vegetal en reemplazo de las fuentes de origen animal podría resultar en una deficiencia nutricional. La harina de soja, por ejemplo, es comúnmente utilizada en las dietas comerciales, dada su disponibilidad, su precio conveniente y su alta digestibilidad. Pero en comparación con la harina de pescado, la harina de soja es deficiente en ciertos aminoácidos esenciales, como la metionina, la lisina y el triptófano, y tiene una menor palatabilidad (Floreto *et al.*, 2000). Todos los alimentos ensayados en este trabajo de tesis, incluyen harinas de origen vegetal, como harina de soja, de trigo y de maíz. Pero a su vez incluyen fuentes proteicas de origen animal, como la harina de pescado, la harina de camarón y calamares, aunque se desconoce en qué proporción. Por lo tanto, aunque se espera que la cantidad de proteínas presentes en las dietas sea apropiada para el crecimiento de *N. davidi*, la composición de las mismas podría ser otro factor influyente en el menor peso obtenido para los camarones alimentados con O.

Este trabajo es el primero en explorar el uso de dietas comerciales en el cultivo de *N. davidi* y su efecto en la reproducción y la calidad de la progenie. Se utilizaron diversos criterios para evaluar la calidad de la progenie en relación a la dieta de los reproductores, como el tamaño del huevo, su contenido de carotenoides, la cantidad de gotas lipídicas en el órgano perigástrico y la supervivencia a una prueba de restricción nutricional. En base a los resultados obtenidos se concluye que el uso del alimento comercial T en la acuicultura de *N. davidi* proporcionaría una nutrición adecuada para su reproducción, ya que los reproductores alimentados con este alimento tuvieron el mejor desempeño reproductivo, probablemente debido a su alto contenido de astaxantina. En contraste, con el alimento C que está formulado específicamente para crustáceos, se obtuvo una menor producción de juveniles. Sin embargo, este alimento sería el más adecuado para la etapa de crecimiento debido a su alto contenido de PUFA n-3. A futuro, podría explorarse la posibilidad de combinar el

uso del alimento C con la suplementación de algún ingrediente rico en astaxantina para mejorar la producción de juveniles. Para concluir, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis proporcionan información valiosa para el posterior desarrollo y evaluación de dietas adecuadamente balanceadas para los reproductores de *N. davidi*.

# CAPÍTULO 6

Consideraciones finales



El cultivo de camarones ornamentales de agua dulce puede desarrollarse en tanques pequeños que se pueden mantener en un laboratorio, en una casa o en un garaje sin necesidad de acceder a instalaciones de gran tamaño (Rhyne, 2010). Por ello, la acuicultura de especies ornamentales es un emprendimiento que puede ser llevado adelante por pequeños, medianos o grandes productores, e incluso junto con otras producciones obteniendo una buena rentabilidad. Sin embargo, para que estos emprendimientos acuícolas tengan éxito en Argentina, es menester que se avance en la investigación sobre las especies de interés comercial (Luchini & Panné Huidobro, 2008).

En este sentido, *Neocaridina davidi* es una de las especies con potencial para la producción acuícola que ya ha sido introducida en nuestro país por medio de la importación, y que actualmente es comercializada como ornamental. Para avanzar sobre su cultivo es preciso ampliar el conocimiento sobre su biología reproductiva. En particular debe hacerse hincapié en el estudio de los factores que regulan la producción de crías, ya que el cultivo de camarones con fines comerciales depende de una producción continua de juveniles. Para maximizar la cantidad y calidad de crías producidas, deben seleccionarse reproductores de alta calidad y deben implementarse condiciones de cultivo que permitan su óptima maduración (Browdy, 1998; Calado, 2008; Crocos & Coman, 1997).

El tamaño de los reproductores es uno de los principales factores a tener en cuenta en un cultivo (Browdy, 1998). En *N. davidi* en particular, se encontró que la fecundidad actual, es decir, el número de juveniles eclosionados por hembra por puesta, depende del peso materno pero no del peso paterno. Para hembras de entre 40 y 110 mg el promedio fue de  $29,15 \pm 15,47$  juveniles eclosionados por puesta por hembra. Por lo tanto para un cultivo comercial se sugiere utilizar hembras reproductoras de aproximadamente 80 a 100 mg de peso corporal, para obtener así un máximo rendimiento reproductivo. Este rango de peso fue el utilizado para evaluar otro factor que puede relacionarse con la fecundidad en un cultivo: la coloración materna (Nordeide *et al.*, 2008, 2013). Se obtuvo en promedio una fecundidad de  $0,40 \pm 0,12$  juveniles eclosionados

por puesta por mg de hembra, y se encontró que esta variable está relacionada negativamente a la coloración materna. Esta disminución de la fecundidad con el aumento de la coloración en las madres se debe probablemente a una menor supervivencia de sus embriones. Esto se relacionaría a un menor contenido de carotenoides en los huevos producidos por las hembras más coloreadas. Los carotenoides son únicamente incorporados a través de la dieta y al utilizarse en gran parte para la coloración corporal en las hembras intensamente coloreadas, se derivaría una menor cantidad a sus huevos. En cambio, en las hembras poco coloreadas, un mayor contenido de carotenoides en los huevos supondría una mayor supervivencia y calidad de los embriones que produce (Nordeide *et al.*, 2008, 2013). Para corroborar esta explicación, en estudios futuros sería necesario evaluar el efecto de la coloración materna sobre la fecundidad realizada, es decir, el número de huevos producidos por puesta por hembra, y sobre la supervivencia de los embriones. A su vez, la medición del contenido de carotenoides tanto en los huevos como en las hembras inmediatamente luego del desove, contribuiría a estudiar el posible compromiso entre la asignación de carotenoides a la coloración corporal y a la progenie.

En base a lo expuesto anteriormente, *la selección de hembras reproductoras poco coloreadas y de gran tamaño incrementaría la producción de juveniles por puesta*. Por otro lado, se encontró un aumento de la coloración de las hembras con la edad, incluso luego de alcanzada la madurez sexual. Este resultado tiene importancia en cuanto al cultivo ornamental, debido a que el precio de venta de los camarones depende de su coloración (Ruangdej & Laohavisuti, 2014). *En el caso de N. davidi, la cría de los ejemplares por lo menos hasta los 180 días de edad resultaría en la obtención de camarones intensamente coloreados aumentando así su valor comercial*. Adicionalmente no se encontró una asociación entre la coloración materna y la coloración de las crías una vez alcanzada la madurez sexual.

La nutrición de los reproductores es otro factor que está estrechamente relacionado con el éxito en la reproducción (Bray & Lawrence, 1992). En los ensayos descritos en los capítulos 3 y 4 los camarones fueron alimentados diariamente con un alimento comercial para peces

tropicales (TetraColor®). Luego, se comparó su desempeño con otros dos alimentos disponibles en el mercado: un alimento comercial para crustáceos (Crusta Sticks®) y uno para peces ornamentales (Basic®). Los tres alimentos proporcionaron una nutrición adecuada para la reproducción en *N. davidi*, obteniéndose una fecundidad realizada relativa similar entre alimentos. Su promedio fue de  $0,51 \pm 0,08$  huevos por mg para el alimento TetraColor®,  $0,62 \pm 0,03$  para el alimento Crusta Sticks® y  $0,49 \pm 0,04$  para el alimento Basic®. En cambio, se alcanzó una mejor fecundidad actual relativa con TetraColor® que con los otros alimentos, promediando  $0,34 \pm 0,05$  juveniles eclosionados por mg. La fecundidad actual relativa obtenida al alimentar a los reproductores con el alimento Crusta Sticks® fue de  $0,14 \pm 0,05$ , mientras que con Basic® se obtuvo un valor de  $0,18 \pm 0,06$  juveniles eclosionados por mg. Es decir, el número de juveniles eclosionados por hembra fue aproximadamente un 50 % mayor para el alimento TetraColor® comparado con los otros probablemente debido a su alto contenido de carotenoides. Con referencia a lo anterior se halló que el contenido de carotenoides de los huevos desovados por hembras alimentadas con dicho alimento, fue considerablemente mayor que en los otros casos.

Luego de la eclosión, el siguiente paso en el cultivo de *N. davidi* es la fase de crecimiento de los juveniles. La obtención de huevos y juveniles de óptima calidad es fundamental para obtener el máximo rendimiento de la producción (Racotta *et al.*, 2004). Entre los diversos criterios utilizados con frecuencia para evaluar la calidad de la progenie se encuentra el monitoreo de la supervivencia en etapas tempranas (Bray & Lawrence, 1992). Tanto para el peso parental como para los otros dos factores analizados (coloración materna y dieta de los reproductores), la supervivencia de la progenie se mantuvo siempre por encima del 80 %.

Otro criterio que se ha propuesto es el tamaño de los huevos o embriones, ya que podría reflejar la cantidad de reservas contenidas en el vitelo y tiene la ventaja de ser una variable más fácil y rápida de evaluar (Clarke, 1993). Tanto el volumen como el peso de los huevos fecundados fueron similares para las tres dietas evaluadas. De igual modo, el peso de los

Juveniles I no se vio afectado por el peso materno, el peso paterno, la coloración materna o la dieta de los reproductores. Sin embargo, la cantidad de gotas lipídicas encontradas en la región del órgano perigástrico en los juveniles I fue menor para los reproductores alimentados con el alimento Crusta Sticks®. Ambos resultados en conjunto sugerirían que el tamaño de los huevos no sería un buen indicador de las reservas energéticas que contiene. En relación a esto, es importante señalar que no fue posible medir la composición bioquímica de los Juveniles I por ser su masa insuficiente. Pero la medición de las gotas lipídicas en la región del órgano perigástrico podría ser una aproximación sencilla cuando no sea posible aplicar otras metodologías más precisas.

La composición bioquímica de larvas y juveniles también se utiliza como criterio predictivo de su calidad (Calado, 2008; Racotta *et al.*, 2003). En particular, para evaluar la calidad de progenie en relación al tamaño parental y a la coloración materna, se midió su contenido de lípidos, proteínas y glucógeno luego de un período de crecimiento de 60 y 30 días, respectivamente. La composición bioquímica fue similar para las crías independientemente del tamaño o color de los reproductores.

La tasa de crecimiento es también utilizada para identificar tempranamente en un cultivo a los animales fuertes y sanos (Bray & Lawrence, 1992). *El peso de los reproductores y la coloración materna no afectaron el incremento en peso de las crías evaluado en los 60 días posteriores a la eclosión.* Sin embargo, se observó que fue mayor para las crías hembras que para las crías machos en el período comprendido entre los 30 y 60 días luego de la eclosión. Estos resultados son consistentes con los hallados en el capítulo 2, donde se observó que el peso de las hembras y los machos es similar hasta los 45 días de edad. En ese punto se empezó a observar un aumento del peso más acelerado en las hembras y finalmente a los 54 días se encontró un dimorfismo sexual significativo respecto al tamaño.

Por otro lado, *el crecimiento de los juveniles se vio afectado por la calidad del alimento de los reproductores.* En la prueba de restricción nutricional utilizada para comparar el desempeño

de las dietas, se encontró que con el alimento Basic® las crías alcanzaron un peso menor. Si bien no hubo diferencias significativas entre el alimento TetraColor® y el alimento Crusta Sticks®, el crecimiento de los juveniles fue un 23 % mayor para el último. Esto probablemente se deba a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados n-3. Por lo tanto, teniendo en cuenta ésta y las otras variables anteriormente mencionadas, el alimento Crusta Sticks® sería el más adecuado de los ensayados para la etapa de crecimiento en el cultivo de *N. davidi*. *Estos primeros ensayos sobre dietas comerciales para el cultivo de Neocaridina davidi pueden constituir la base de ensayos para otras formulaciones comerciales y/o el diseño de dietas específicas para la especie.*

Dadas las consideraciones que anteceden se puede concluir que, a diferencia de la dieta, el tamaño de los reproductores y la coloración materna no afectaron la calidad de las crías resultantes. De este modo se puede proceder a la selección de reproductores con alto rendimiento reproductivo sin comprometer la calidad de progenie obtenida.

Por último, es importante destacar que el cultivo de camarones requiere del desarrollo de pruebas estandarizadas simples, precisas y replicables para determinar la viabilidad de las crías producidas. Pero son pocos los parámetros que se han correlacionado con los resultados a largo plazo, es decir, en la fase de crecimiento del cultivo (Bray & Lawrence, 1992). *En la presente tesis se ensayaron una variedad de criterios para evaluar la calidad de progenie, aplicados tanto en huevos y juveniles recién eclosionados, como etapas avanzadas del crecimiento. Su uso se puede extender a futuras investigaciones que evalúen diversas condiciones de cultivo de los reproductores, y a la industria ornamental para monitorear el progreso del cultivo.* Además de estas contribuciones respecto a la acuicultura de *N. davidi*, se obtuvieron resultados de importancia teórica que contribuyen a la comprensión de los factores que afectan la inversión materna y consecuentemente la calidad de progenie en *N. davidi* en particular, y en los camarones carideos en general. Del mismo modo se amplió el conocimiento sobre su dimorfismo sexual, evidenciándose diferencias en la forma general del caparazón entre hembras y machos

adultos. Estas diferencias corresponden a cambios alométricos, y pueden interpretarse como un efecto directo del crecimiento.



# BIBLIOGRAFÍA



- Accioly, I. V., Lima-Filho, P. A., Santos, T. L., Barbosa, A. C. A., Santos Campos, L. B., Souza, J. V., Araújo, W. C., y Molina, W. F. (2013). Sexual dimorphism in *Litopenaeus vannamei* (Decapoda) identified by geometric morphometrics. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 8, 276–281.
- Adams, D. C., Collyer, M. L., y Kaliontzopoulou, A. (2018). Geomorph: Software for geometric morphometric analyses (version 3.0.6) [biblioteca de R]. Recuperado de: <https://cran.r-project.org/package=geomorph>
- Adams, D. C., Rohlf, F. J., y Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the ‘revolution’. *Italian Journal of Zoology*, 71, 5–16. doi: 10.1080/11250000409356545
- Adams, D. C., Rohlf, F. J., y Slice, D. E. (2013). A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. 24, 7–14. doi: 10.4404/hystrix-24.1-6283
- Ahmadi, M. R., Bazayar, A. A., Safi, S., Ytrestøyl, T., y Bjerkgeng, B. (2006). Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 388–394. doi: 10.1111/j.1439-0426.2006.00770.x
- Alava, V. R., y Lim, C. (1983). The quantitative dietary protein requirements of *Penaeus monodon* juveniles in a controlled environment. *Aquaculture*, 30, 53–61. doi: 10.1016/0044-8486(83)90151-5
- Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton, Estados Unidos de América: Princeton University Press.
- Andriantahina, F., Liu, X., Huang, H., Xiang, J., y Yang, C. (2012). Comparison of reproductive performance and offspring quality of domesticated Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 324, 194–200. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.10.026

- Anger, K., y Hayd, L. (2010). Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. *Aquatic Biology*, 9, 251–261. doi: 10.3354/ab00259
- Anger, K., y Moreira, G. S. (1998). Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. *Journal of Crustacean Biology*, 18, 823–838. doi: 10.2307/1549156
- AOAC International (1984). *Official methods of analysis of AOAC International*. Arlington, Virginia: AOAC International.
- AOAC International (1990). *Official methods of analysis of AOAC International*. Arlington, Virginia: AOAC International.
- AOAC International (1997). *Official methods of analysis of AOAC International*. Arlington, Virginia: AOAC International.
- Aquiloni, L., y Gherardi, F. (2008). Evidence of female cryptic choice in crayfish. *Biology Letters*, 4, 163–165. doi:10.1098/rsbl.2007.0590
- Attard, J., y Hudon, C. (1987). Embryonic development and energetic investment in egg production in relation to size of female lobster (*Homarus americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44, 1157–1164. doi: 10.1139/f87-138
- Austin, C. M. (1998). Intraspecific variation in clutch and brood size and rate of development in the yabby, *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture*, 167, 147–159. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00306-8
- Aya, F. A., Cuvin-Aralar, M. L., y Coloso, R. M. (2015). Potential of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) meal as an alternative protein source in diets for giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man 1879). En M. R. R. Romana-Eguia, F. D. Parado-Esteba, N. D. Salayo, y M. J. H. Lebata-Ramos (Eds.), *Resource enhancement and sustainable aquaculture practices in southeast Asia: challenges in responsible production of aquatic species: proceedings of the international workshop on resource enhancement and sustainable aquaculture practices in southeast Asia 2014 (RESA)* (pp. 231–237).

Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.

- Baeza, J. A., Furlan, M., Almeida, A. C., de Paiva Barros-Alves, S., Alves, D. F., y Fransozo, V. (2013). Population dynamics and reproductive traits of the ornamental crab *Porcellana sayana*: implications for fishery management and aquaculture. *Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms, 1*, 1–12. doi: 10.3354/sedao00002
- Baliña, S., Temperoni, B., López Greco, L. S., y Tropea, C. (2018). Losing reproduction: effect of high temperature on female biochemical composition and egg quality in a freshwater crustacean with direct development, the red cherry shrimp, *Neocaridina davidi* (Decapoda, Atyidae). *The Biological Bulletin, 234*, 139–151. doi: 10.1086/698266
- Barbier, C. (2010). *Crevettes d'eau douce en aquariophilie: exemple de maintenance de la Neocaridina heteropoda pour les débutants* (tesis de grado). Université Toulouse 3, Toulouse. Recuperado de: [http://oatao.univ-toulouse.fr/4229/1/hartmann\\_4229.pdf](http://oatao.univ-toulouse.fr/4229/1/hartmann_4229.pdf)
- Barría, E. M., Sepúlveda, R. D., y Jara, C. G. (2011). Morphologic variation in *Aegla* Leach (Decapoda: Reptantia: Aeglidae) from Central-Southern Chile: interspecific differences, sexual dimorphism, and spatial segregation. *Journal of Crustacean Biology, 31*, 231–239. doi: 10.1651/10-3324.1
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., y Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software, 67*, 1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01
- Bauer, R. T. (1981). Color patterns of the shrimps *Heptacarpus pictus* and *H. paludicola* (Caridea: Hippolytidae). *Marine Biology, 64*, 141–152. doi: 10.1007/BF00397103
- Bauer, R. T. (2004). *Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans*. Norman, Estados Unidos de América: University of Oklahoma Press.
- Bauer, R. T., Okuno, J., y Thiel, M. (2014). Inferences on mating and sexual systems of two Pacific *Cinetorhynchus* shrimps (Decapoda, Rhynchocinetidae) based on sexual

- dimorphism in body size and cheliped weaponry. *ZooKeys*, 457, 187–209. doi: 10.3897/zookeys.457.6512
- Bernal Rodríguez, C. E., García, A. C., Ponce-Palafox, J. T., Spanopoulos-Hernández, M., y Puga-López, D. (2017). The color of marine shrimps and its role in the aquaculture. *International Journal of Aquaculture and Fishery Sciences*, 3, 62–65. doi: 10.17352/2455-8400.000030
- Bernardo, J. (1996). Maternal effects in animal ecology. *American Zoologist*, 36, 83–105. doi: 10.1093/icb/36.2.83
- Bertin, A., David, B., Cézilly, F., y Alibert, P. (2002). Quantification of sexual dimorphism in *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) using outline approaches. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77, 523–533. doi: 10.1046/j.1095-8312.2002.00125.x
- Bissaro, F. G., Gomes-Jr, J. L., y Madeira Di Benedetto, A. P. (2013). Morphometric variation in the shape of the cephalothorax of shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* on the east coast of Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93, 683–691. doi: 10.1017/S0025315412000409
- Bjerkeng, B. (2000). Carotenoid pigmentation of salmonid fishes - recent progress. En: L. E. Cruz –Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.), *Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (pp. 71–89). Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Bjerkeng, B. (2008). Carotenoids in aquaculture: fish and crustaceans. En: G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (Eds.), *Carotenoids, Vol. 4: Natural Functions* (pp. 237–254). Basilea, Suiza: Birkhäuser Verlag. doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0\_12
- Bjerkeng, B., Følling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J. J., y Alsted, N. (1997). Bioavailability of all-E-astaxanthin and Z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 157, 63–82. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00146-4

- Bligh, E. G., y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917. doi: 10.1139/o59-099
- Blount, J. D., Houston, D. C., y Møller, A. P. (2000). Why egg yolk is yellow. *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 47–49. doi: 10.1016/S0169-5347(99)01774-7
- Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–253.
- Bray, W. A., y Lawrence, A. L. (1992). Reproduction of *Penaeus* species in captivity. En A. W. Fast y L. J. Lester (Eds.), *Marine Shrimp Culture* (pp. 93–170). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Science B.V.
- Brillon, S., Lambert, Y., y Dodson, J. (2005). Egg survival, embryonic development, and larval characteristics of northern shrimp (*Pandalus borealis*) females subject to different temperature and feeding conditions. *Marine Biology*, 147, 895–911. doi: 10.1007/s00227-005-1633-6
- Britton, G. (2008). Functions of Intact Carotenoids. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (Eds.), *Carotenoids, Vol. 4: Natural Functions* (pp. 189–212). Basel, Suiza: Birkhäuser Verlag. doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0\_10
- Browdy, C. L. (1998). Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. *Aquaculture*, 164, 3–21. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00174-4
- Burnham, K. P., y Anderson, D. R. (2002). *Model selection and multimodel inference: a practical information theoretic approach*. Nueva York, Estados Unidos de América: Springer.

- Butler, M. J. IV, MacDiarmid, A., y Gnanalingam, G. (2015). The effect of parental size on spermatophore production, egg quality, fertilization success, and larval characteristics in the Caribbean Spiny lobster, *Panulirus argus*. *ICES Journal of Marine Science*, 72, i115–i123. doi: 10.1093/icesjms/fsv015
- Cahu, C. L., Cuzon, G., y Quazuguel, P. (1995). Effect of highly unsaturated fatty acids,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112, 417–424. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01868.x
- Cahu, C. L., Guillaume, J. C., Stephan, G., y Chim, L. (1994). Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. *Aquaculture*, 126, 159–170. doi: 10.1016/0044-8486(94)90257-7
- Calado, R. (2008). *Marine ornamental shrimp: biology, aquaculture and conservation*. Oxford, Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- Calado, R., Figueiredo, J., Rosa, R., Nunes, M. L., y Narciso, L. (2005a). Effects of temperature, density, and diet on development, survival, settlement synchronism, and fatty acid profile of the ornamental shrimp *Lysmata seticaudata*. *Aquaculture*, 245, 221–237. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.11.034
- Calado, R., Lin, J., Rhyne, A. L., Araújo, R., y Narciso, L. (2003). Marine ornamental decapods—popular, pricey, and poorly studied. *Journal of Crustacean Biology*, 23, 963–973. doi: 10.1651/C-2409
- Calado, R., Olivotto, I., Planas, M., y Holt, G. J. (2017). *Marine ornamental species aquaculture*. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Calado, R., Rosa, R., Morais, S., Nunes, M. L., y Narciso, L. (2005b). Growth, survival, lipid and fatty acid profile of juvenile monaco shrimp *Lysmata seticaudata* fed on different diets. *Aquaculture Research*, 36, 493–504. doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01235.x

- Calado, R., Vitorino, A., Reis, A., Lopes da Silva, T., y Dinis, M. T. (2009). Effect of different diets on larval production, quality and fatty acid profile of the marine ornamental shrimp *Lysmata amboinensis* (de Man, 1888), using wild larvae as a standard. *Aquaculture Nutrition*, 15, 484–491. doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00614.x
- Calvo, N. S., Roldán-Luna, M., Argáez-Sosa, J. A., Martínez-Moreno, G. L., Mascaró, M. y Simões, N. (2016). Reflected-light influences the coloration of the peppermint shrimp, *Lysmata boggessi* (Decapoda: Caridea). *Journal of the World Aquaculture Society*, 47, 701–711. doi: 10.1111/jwas.12314
- Cavalli, R. O., Lavens, P., y Sorgeloos, P. (1999). Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture*, 179, 387–402. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00173-8
- Cavalli, R. O., Menschaert, G., Lavens, P., y Sorgeloos, P. (2000). Maturation performance, offspring quality and lipid composition of *Macrobrachium rosenbergii* females fed increasing levels of dietary phospholipids. *Aquaculture International*, 8, 41–58. doi: 10.1023/A:1009220932268
- Chang, G., Wu, X., Cheng, Y., Zeng, C., y Yu, Z. (2017). Reproductive performance, offspring quality, proximate and fatty acid composition of normal and precocious Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture*, 469, 137–143. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.11.025
- Cheng, R. C., y Kuntner, M. (2015). Disentangling the size and shape components of sexual dimorphism. *Evolutionary Biology*, 42, 223–234. doi: 10.1007/s11692-015-9313-z
- Chucholl, C. (2013). Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biological Invasions*, 15, 125–141. doi: 10.1007/s10530-012-0273-2
- Clarke, A. (1993). Reproductive trade-offs in caridean shrimps. *Functional Ecology*, 7, 411–419. doi: 10.2307/2390028

- Clegg, K. M. (1956). The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7, 40–44. doi: 10.1002/jsfa.2740070108
- Coman, G. J., Arnold, S. J., Barclay, M., y Smith, D. M. (2011). Effect of arachidonic acid supplementation on reproductive performance of tank-domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture nutrition*, 17, 141–151. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00716.x
- Córdova-Murueta, J. H., y García-Carreño, F. L. (2002). Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*, 210, 371–384. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00011-X
- Correa, C., y Thiel, M. (2003). Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76, 187–203. doi: 10.4067/S0716-078X2003000200006
- Crococ, P. J., y Coman, G. J. (1997). Seasonal and age variability in the reproductive performance of *Penaeus semisulcatus* broodstock: optimising broodstock selection. *Aquaculture*, 155, 55–67. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00109-9
- Dall, W., Smith, D. M., y Moore, L. E. (1995). Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation. *Marine Biology*, 123, 435–441. doi: 10.1007/BF00349222
- Darnell, M. Z., Rittschof, D., Darnell, K. M., y McDowell, R. E. (2009). Lifetime reproductive potential of female blue crabs *Callinectes sapidus* in North Carolina, USA. *Marine Ecology Progress Series*, 394, 153–163. doi: 10.3354/meps08295
- De Grave, S., Cai, Y., y Anker, A. (2008). Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 287–293. doi: 10.1007/s10750-007-9024-2
- De Grave, S., Smith, K. G., Adeler, N. A., Allen, D. J., Alvarez, F., Anker, A., Cai, Y., Carrizo, S. F., Klotz, W., Mantelatto, F. L., Page, T. J., Shy, J. Y., Villalobos, J. L., y Wowor, D. (2015). Dead shrimp blues: a global assessment of extinction risk in freshwater shrimps

- (Crustacea: Decapoda: Caridea). *PLoS ONE*, *10*, e0120198. doi:  
10.1371/journal.pone.0120198
- De Silva, S. S. (2006). Reducing feed costs in aquaculture: Is the use of mixed feeding schedules the answer for semi-intensive practices?. *Aquaculture Asia*, *11*, 7–12
- Detto, T., Hemmi, J. M., y Backwell, P. R. (2008). Colouration and colour changes of the fiddler crab, *Uca capricornis*: a descriptive study. *PLoS One*, *3*, e1629. doi:  
10.1371/journal.pone.0001629
- Ding, Z. L., Kong, Y. Q., Li, J. F., Cao, F., Zhang, Y. X., Du, Z. Y., y Ye, J. Y. (2017). Growth and metabolic responses of juvenile *Macrobrachium nipponense* to different dietary carbohydrate levels. *Aquaculture Nutrition*, *23*, 1136–1144. doi: 10.1111/anu.12482
- Duan, Y., Zhang, Y., Dong, H., Wang, Y., y Zhang, J. (2017 a). Effect of the dietary probiotic *Clostridium butyricum* on growth, intestine antioxidant capacity and resistance to high temperature stress in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Thermal Biology*, *66*, 93–100. doi: 10.1016/j.jtherbio.2017.04.004
- Duan, Y., Zhang, Y., Dong, H., Wang, Y., Zheng, X., y Zhang, J. (2017 b). Effect of dietary *Clostridium butyricum* on growth, intestine health status and resistance to ammonia stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, *65*, 25–33. doi: 10.1016/j.fsi.2017.03.048
- Dunn, O. J. (1961). Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, *56*, 52–64. doi: 10.1080/01621459.1961.10482090
- Espinoza, C., Guzmán, F., Bascur, M., y Urzúa, A. (2016). Effect of starvation on the nutritional condition of early zoea larvae of the red squat lobster *Pleuroncodes monodon* (Decapoda, Munididae). *Invertebrate Reproduction & Development*, *60*, 152–160. doi:  
10.1080/07924259.2016.1174157
- FAO (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma, Italia.

- Fischer, S., Thatje, S., y Brey, T. (2009). Early egg traits in *Cancer setosus* (Decapoda, Brachyura): effects of temperature and female size. *Marine Ecology Progress Series*, 377, 193–202. doi: 10.3354/meps07845
- Floreto, E. A., Bayer, R. C., y Brown, P. B. (2000). The effects of soybean-based diets, with and without amino acid supplementation, on growth and biochemical composition of juvenile American lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture*, 189, 211–235. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00363-X
- Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A., y Lebaron, F. N. (1951). Preparation of lipid extracts from brain tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 191, 833–841.
- Folch, J., Lees, M., y Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. y Streiff, K. (1984). Carotenoids in diets for salmonids: I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture*, 41, 213–226. doi: 10.1016/0044-8486(84)90284-9
- Fox, C. W., y Czesak, M. E. (2000). Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annual Review of Entomology*, 45, 341–369. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.341.
- Galois, R. G. (1984). Variations de la composition lipidique tissulaire au cours de la vitellogenèse chez la crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 84, 155–166. doi: 10.1016/0022-0981(84)90208-9
- Gardner, C. (1997). Effect of size on reproductive output of giant crabs *Pseudocarcinus gigas* (Lamarck): Oziidae. *Marine and Freshwater Research*, 48, 581–587. doi: 10.1071/MF97023
- Garner, S. R., Neff, B. D., y Bernards, M. A. (2010). Dietary carotenoid levels affect carotenoid and retinoid allocation in female chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Fish Biology*, 76, 1474–1490. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02579.x

- Gasparini, J. L., Floeter, S. R., Ferreira, C. E. L., y Sazima, I. (2005). Marine ornamental trade in Brazil. *Biodiversity & Conservation*, 14, 2883–2899. doi: 10.1007/s10531-004-0222-1
- Giri, F., y Loy, A. (2008). Size and shape variation of two freshwater crabs in Argentinean Patagonia: the influence of sexual dimorphism, habitat, and species interactions. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 37–45. doi: 10.1651/07-2824R.1
- Goodall, C. (1991). Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 53, 285–339.
- Goodwin, T. W. (1980). *The biochemistry of the carotenoids. Vol. I: Plants*. Londres, Reino Unido: Chapman & Hall.
- Goodwin, T. W. (1984). *The biochemistry of the carotenoids. Vol. II: Animals*. Londres, Reino Unido: Chapman & Hall.
- Guay C., Sainte-Marie, B., y Brêthes, J.C. (2011). Strong maternal effects and extreme heterogeneity of progeny development in the caridean shrimp *Sclerocrangon boreas* (Crangonidae). *Marine Biology*, 158, 2835–2845. doi: 10.1007/s00227-011-1782-8
- Gunz, P., y Mitteroecker, P. (2013). Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24, 103–109. doi: 10.4404/hystrix-24.1-6292
- Gupta, A. (2005). *Formulation and evaluation of some alternative practical feeds for giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii (De Man)* (tesis doctoral). Punjab Agricultural University, Ludhiana. Recuperado de: <http://krishikosh.egranth.ac.in/bitstream/1/5810015761/1/PAU-296462%20ok.pdf>
- Gupta, A., Sehgal, H. S., y Sehgal, G. K. (2007). Growth and carcass composition of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), fed different isonitrogenous and isocaloric diets. *Aquaculture research*, 38, 1355–1363. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01787.x

- Hamasaki, K., Fukunaga, K., y Maruyama, K. (2003). Egg development and incubation period of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Decapoda: Portunidae) reared in the laboratory. *Crustacean Research*, 32, 45–54. doi: 10.18353/crustacea.32.0\_45
- Harlioğlu, M. M., Köprücü, K., Harlioğlu, A. G., Yonar, S. M., Duran, T. Ç., Çakmak, M. N., Aksu, Ö., Özcan, S., Kutluyer, F., y Gündoğdu, H. (2013). Effect of dietary n-3 series fatty acids on sperm production in the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz) (Astacidae). *Aquaculture international*, 21, 273–282. doi: 10.1007/s10499-012-9549-x
- Harrison, K. E. (1990). The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustacean: a review. *Journal of Shellfish Research*, 9, 1–28.
- Hasanuzzaman, A. F. M., Siddiqui, M. N., y Chisty, M. A. H. (2009). Optimum replacement of fishmeal with soybean meal in diet for *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) cultured in low saline water. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 17–22. doi: 10.1111/are.12916
- Hedrick, A. V., y Temeles, E. J. (1989). The evolution of sexual dimorphism in animals: hypotheses and tests. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 136–138. doi: 10.1016/0169-5347(89)90212-7
- Heerbrandt, T. C., y Lin, J. (2006). Larviculture of red front shrimp, *Caridina gracilirostris* (Atyidae, Decapoda). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37, 186–190. doi: 10.1111/j.1749-7345.2006.00025.x
- Herler, J., Kerschbaumer, M., Mitteroecker, P., Postl, L., y Sturmbauer, C. (2010). Sexual dimorphism and population divergence in the Lake Tanganyika cichlid fish genus *Tropheus*. *Frontiers in Zoology*, 7, 2. doi: 10.1186/1742-9994-7-4
- Herring, P. J. (1974). Size, density and lipid content of some decapod eggs. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 21, 91–94. doi: 10.1016/0011-7471(74)90023-0
- Hines, A. H. (1982). Allometric constraints and variables of reproductive effort in brachyuran crabs. *Marine Biology*, 69, 309–320. doi: 10.1007/BF00397496

- Hines, A. H. (1991). Fecundity and reproductive output in nine species of *Cancer* crabs (Crustacea, Brachyura, Cancridae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 267–275. doi: 10.1139/f91-037
- Hirayama, O., Nakamura, K., Hamada, S., y Kobayasi, Y. (1994). Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids*, 29, 149–150. doi: 10.1007/BF02537155
- Holcomb, M., Cloud, J. G., Woolsey, J., y Ingermann, R. L. (2004). Oxygen consumption in unfertilized salmonid eggs: an indicator of egg quality?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 138, 349–354. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.05.007
- Hossain, M. A., Siddique, M. A. L., y Miaje, M. A. H. (2000). Development of low-cost feed for culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in ponds. *Bangladesh Journal of Fisheries Research*, 4, 127–134.
- Hothorn, T., Bretz, F., y Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50, 346–363. doi: 10.1002/bimj.200810425
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., y Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 46, 185–196. doi: 10.1080/10408690590957188
- Janhunen, M., Kekäläinen, J., Kortet, R., Hyvärinen, P., y Piironen, J. (2011 a). No evidence for an indirect benefit from female mate preference in Arctic charr *Salvelinus alpinus*, but female ornamentation decreases offspring viability. *Biological journal of the Linnean Society*, 103, 602–611. doi: 10.1111/j.1095-8312.2011.01659.x
- Janhunen, M., Peuhkuri, N., Primmer, C. R., Kolari, I., y Piironen, J. (2011 b). Does breeding ornamentation signal genetic quality in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*?. *Evolutionary Biology*, 38, 68–78. doi: 10.1007/s11692-010-9100-9
- Jinbo, T., Sugiyama, A., Murakami, K., y Hamasaki, K. (2017). Effects of body size on mating behavior and spawning success of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von

- Siebold, 1824) (Decapoda: Palinuridae): implications for broodstock management techniques. *Journal of Crustacean Biology*, 37, 90–98. doi: 10.1093/jcbiol/ruw008
- Jivoff, P. (2003). A review of male mating success in the blue crab, *Callinectes sapidus*, in reference to the potential for fisheries-induced sperm limitation. *Bulletin of Marine Science*, 72, 273–286.
- Ju, Z. Y., Deng, D. F., Dominy, W. G., y Forster, I. P. (2011). Pigmentation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by dietary astaxanthin extracted from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 633–644. doi: 10.1111/j.1749-7345.2011.00511.x
- Kanazawa, A. (1985). Nutrition of penaeid prawns and shrimps. En Y. Taki, J. H. Primavera y J. A. Llobrera (Eds.), *Proceedings of the first international conference on the culture of penaeid prawns/shrimps* (pp. 123–130). Iloílo, Filipinas: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Tokiwa, S., y Ceccaldi, H. J. (1979). Effects of dietary linoleic and linolenic acids on growth of prawn. *Oceanologica Acta*, 2, 41–48.
- Kangpanich, C., Pratoomyot, J., Siranonthana, N., y Senanan, W. (2016). Effects of arachidonic acid supplementation in maturation diet on female reproductive performance and larval quality of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *PeerJ*, 4, e2735. doi: 10.7717/peerj.2735
- Kangpanich, C., Pratoomyot, J., Siranonthana, N., y Senanan, W. (2017). Effects of arachidonic acid supplementation in maternal diet on low salinity tolerance of newly hatched larvae of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man). *International Journal of Agricultural Technology*, 13, 59–72.
- Kelley, C. E., y Harmon, A. W. (1972). Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. *U.S. National Marine Fisheries Service Fishery Bulletin*, 70, 111–113.

- Kent, J. T., y Mardia, K. V. (2001). Shape, Procrustes tangent projections and bilateral symmetry. *Biometrika*, 88, 469–485. doi: 10.1093/biomet/88.2.469
- Klotz, W., Miesen, F. W., Hüllen, S., y Herder, F. (2013). Two Asian fresh water shrimp species found in a thermally polluted stream system in North Rhine-Westphalia, Germany. *Aquatic Invasions*, 8, 333–339. doi: 10.3391/ai.2013.8.3.09
- Kovalenko, E. E., D'Abramo, L. R., Ohs, C. L., y Buddington, R. K. (2002). A successful microbound diet for the larval culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 210, 385–395. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00127-8
- Kozák, P., Buřič, M., y Polícar, T. (2006). The fecundity, time of egg development and juvenile production in spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) under controlled conditions. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380–381, 1171–1182. doi: 10.1051/kmae:2006019
- Latscha, T. (1989). The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Advances in Tropical Aquaculture, Actes de Colloque*, 9, 319–325.
- Leal, M. C., Rocha, R. J. M., Rosa, R., y Calado, R. (2016). Aquaculture of marine non-food organisms: what, why and how? *Reviews in Aquaculture*, 0, 1–24. doi:10.1111/raq.12168
- Liang, X. Q. (2002). On new species of atyid shrimps (Decapoda, Caridea) from china. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 33, 167–173.
- Lin, J., y Shi, H. (2002). Effect of broodstock diet on reproductive performance of the golden banded coral shrimp *Stenopus scutellatus*. *Journal of the World Aquaculture society*, 33, 383–386. doi: 10.1111/j.1749-7345.2002.tb00515.x
- Lin, J. D., y Zhang, D. (2001). Effect of broodstock diet on reproductive performance of the peppermint shrimp, *Lysmata wurdemanni*. *Journal of Shellfish Research*, 20, 361–363.
- López Roldán, P., y Mach, N. (2012). Efecto del consumo de astaxantina en la salud. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*, 18, 162–175.

- Luchini, L., y Panné Huidobro, S. (2008). Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. Recuperado de:  
[https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/\\_archivos//000000\\_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/081110\\_Panorama%20actual%20de%20comercio%20internacional%20de%20Peces%20Ornamentales.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//000000_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/081110_Panorama%20actual%20de%20comercio%20internacional%20de%20Peces%20Ornamentales.pdf)
- Luo, N., Ding, Z. L., Kong, Y. Q., Zhang, R. F., Zhang, Y. X., Wu, C. L., Jiang, Z. Q., y Ye, J. Y. (2018). An evaluation of increasing linolenic acid level in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Lipid deposition, fatty acid composition and expression of lipid metabolism-related genes. *Aquaculture Nutrition*, 24, 758–767. doi: 10.1111/anu.12604
- MacDiarmid, A. B., y Butler, M. J. IV. (1999). Sperm economy and limitation in spiny lobsters. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46, 14–24. doi: 10.1007/s002650050587
- MacDiarmid, A. B., y Sainte-Marie, B. (2006). Reproduction. En B. F. Phillips (Ed.) *Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries* (pp. 45–77). Oxford: Blackwell Publishing. doi: 10.1002/9780470995969.ch2
- Maceda-Veiga, A., Domínguez-Domínguez, O., Escribano-Alacid, J., y Lyons, J. (2014). The aquarium hobby: can sinners become saints in freshwater fish conservation?. *Fish and Fisheries*, 17, 860–874. doi: 10.1111/faf.12097
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Croux, C., Todorov, V., Ruckstuhl, A., Salibian-Barrera, M., Verbeke, T., Koller, M., Conceicao, E. L. T., y di Palma, M. A. (2016). robustbase: Basic robust statistics R package (versión 0.92-7) [biblioteca de R]. Recuperado de:  
<http://CRAN.R-project.org/package=robustbase>
- Maltby, J. B., Albright, L. J., Kennedy, C. J., y Higgs, D. A. (2003). Effect of route of administration and carrier on bioavailability and kinetics of astaxanthin in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture Research*, 34, 829–838. doi: 10.1046/j.1365-2109.2003.00888.x

- Marciano, A., Tropea, C., y López Greco, L. S. (2018). Effect of multiple spawning on female reproductive output and offspring quality in a freshwater caridean shrimp with direct development. *Invertebrate Biology*, *137*, 66–77. doi: 10.1111/ivb.12206
- Marshall, D. J., Heppell, S. S., Munch, S. B., y Warner, R. R. (2010). The relationship between maternal phenotype and offspring quality: do older mothers really produce the best offspring?. *Ecology*, *91*, 2862–2873. doi: 10.1890/09-0156.1
- Marshall, D. J., y Keough, M. J. (2007). The evolutionary ecology of offspring size in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology*, *53*, 1–60. doi: 10.1016/S0065-2881(07)53001-4
- Marochi, M. Z., Trevisan, A., Gomes, F. B., y Masunari, S. (2016). Dimorfismo sexual em *Hepatus pudibundus* (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Iheringia, Série Zoologia*, *106*, e2016003 doi: 10.1590/1678-4766e2016003
- Maronna, R. A., Martin R. D., y Yohai, V. J. (2006). *Robust statistics: theory and methods*. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Martínez-Guerrero, B., y Cid-Rodríguez, M. R. P. (2010). El comercio de los camarones de ornato: el marco legal y sus complicaciones. *Ciencia y Mar*, *14*, 69–74.
- Meunpol, O., Meejing, P., y Piyatiratitivorakul, S. (2005). Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research*, *36*, 1216–1225. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01342.x
- Mitteroecker, P., y Gunz, P. (2009). Advances in Geometric Morphometrics. *Evolutionary Biology*, *36*, 235–247. doi: 10.1007/s11692-009-9055-x
- Mitteroecker, P., Gunz, P., Windhager, S., y Schaefer, K. (2013). A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, *24*, 59–66. doi: 10.4404/hystrix-24.1-6369
- Moland, E., Olsen, E. M., y Stenseth, N. C. (2010). Maternal influences on offspring size variation and viability in wild European lobster *Homarus gammarus*. *Marine Ecology Progress Series*, *400*, 165–173. doi: 10.3354/meps08397

- Mullin, S. K., y Taylor, P. J. (2002). The effects of parallax on geometric morphometric data. *Computers in Biology and Medicine*, 32, 455–464. doi: 10.1016/S0010-4825(02)00037-9
- Muralisankar, T., Bhavan, P. S., Radhakrishnan, S., Santhanam, P., y Jayakumar, R. (2017). Growth performance, muscle biochemical constituents, amino acid and fatty acid compositions of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, fed with herb-incorporated diet. *Aquaculture Nutrition*, 23, 766–776. doi: 10.1111/anu.12443
- Mutti, D. W., Ballester, E. L., Martino, R. C., Wasielesky, W., y Cavalli, R. O. (2017). Feeding n-3 HUFA enriched *Artemia* to the larvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* increases stress tolerance and subsequent growth. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45, 18–24. doi: 10.3856/vol45-issue1-fulltext-2
- Naimei Kohal, M., Fereidouni, A. E., Firouzbakhsh, F., y Hayati, I. (2018). Effects of dietary incorporation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* meal on growth, survival, body composition, and reproductive performance of red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Atyidae) over successive spawnings. *Journal of Applied Phycology*, 30, 431–443. doi: 10.1007/s10811-017-1220-5
- New, M. B. (1976). A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture*, 9, 101–144. doi: 10.1016/0044-8486(76)90055-7
- Niu, J., Wen, H., Li, C. H., Liu, Y. J., Tian, L. X., Chen, X., Huang, Z., y Lin, H. Z. (2014). Comparison effect of dietary astaxanthin and  $\beta$ -carotene in the presence and absence of cholesterol supplementation on growth performance, antioxidant capacity and gene expression of *Penaeus monodon* under normoxia and hypoxia condition. *Aquaculture*, 422, 8–17. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.11.013
- Nordeide, J. T., Kekäläinen, J., Janhunen, M., y Kortet, R. (2013). Female ornaments revisited – are they correlated with offspring quality? *Journal of Animal Ecology*, 82, 26–38. doi: 10.1111/1365-2656.12021

- Nordeide, J. T., Mohus, Å., Nicolaisen, O., Volden, R., y Egeland, E. S. (2008). Offspring or ornaments? Is carotenoid-based ornamentation in female Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), condition-dependent and traded off against offspring? *Ecology of Freshwater Fish*, *17*, 328–339. doi:10.1111/j.1600-0633.2007.00286.x
- Nordeide, J. T., Rudolfson, G., y Egeland, E. S. (2006). Ornaments or offspring? Female sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.) trade off carotenoids between spines and eggs. *Journal of Evolutionary Biology*, *19*, 431–439. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.01018.x
- Nunes Cabrita, J. G. (2012). *Estudo do comportamento do camarão Neocaridina heteropoda* Var. *Red em relação a diferentes substratos* (tesis de maestría). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10400.5/4873>
- Oh, C. W., Ma, C. W., Hartnoll, R., y Suh, H. L. (2003). Reproduction and population dynamics of the temperate freshwater shrimp, *Neocaridina denticulata denticulata* (De Haan, 1844), in a korean stream. *Crustaceana*, *76*, 993–1015. doi: 10.1163/156854003771997864
- Pakravan, S., Akbarzadeh, A., Sajjadi, M. M., Hajimoradloo, A., y Noori, F. (2018). *Chlorella vulgaris* meal improved growth performance, digestive enzyme activities, fatty acid composition and tolerance of hypoxia and ammonia stress in juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, *24*, 594–604. doi: 10.1111/anu.12594
- Palacios, E., Racotta, I. S., Heras, H., Marty, Y., Moal, J., y Samain, J. F. (2001). Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture International*, *9*, 531–543. doi: 10.1023/A:1020589924810
- Pan, C. H., Chien, Y. H., y Cheng, J. H. (2001). Effects of light regime, algae in the water, and dietary astaxanthin on pigmentation, growth, and survival of black tiger prawn *Penaeus monodon* post-larvae. *Zoological Studies*, *40*, 371–382.

Pangantihon-Kühlmann, M. P., Millamena, O., y Chern, Y. (1998). Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquatic Living Resources*, 11, 403–409. doi: 10.1016/S0990-7440(99)80006-0

Panné Huidobro, S. (2010). Organismos acuáticos ornamentales: su importación y exportación en el 2009. Recuperado de:  
[https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/\\_archivos//000000\\_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/100628\\_Organismos%20Acu%C3%A1ticos%20Ornamentales%20\(Su%20importaci%C3%B3n\).pdf](https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//000000_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/100628_Organismos%20Acu%C3%A1ticos%20Ornamentales%20(Su%20importaci%C3%B3n).pdf)

Panné Huidobro, S. (2012). Importación y exportación de organismos acuáticos ornamentales en Argentina, años 2010-2011. Recuperado de:  
[https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/\\_archivos//000000\\_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/120717\\_Importacion%20y%20Exportaci%C3%B3n%20de%20Organismos%20Acu%C3%A1ticos%20Ornamentales%20en%20Argentina,%20a%C3%B1os%202010%20y%202011.pdf](https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//000000_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/120717_Importacion%20y%20Exportaci%C3%B3n%20de%20Organismos%20Acu%C3%A1ticos%20Ornamentales%20en%20Argentina,%20a%C3%B1os%202010%20y%202011.pdf)

Panné Huidobro, S. (2014). Comercio internacional de organismos acuáticos ornamentales: participación argentina en la importación y exportación 2012-2013. Recuperado de:  
[https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/\\_archivos//000000\\_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/141028\\_IMPORTACI%C3%93N%20Y%20EXPORTACION%20DE%20ORGANISMOS%20ACUATICOS%20ORNAMENTAL.pdf](https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//000000_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/141028_IMPORTACI%C3%93N%20Y%20EXPORTACION%20DE%20ORGANISMOS%20ACUATICOS%20ORNAMENTAL.pdf)

Panné Huidobro, S. (2015). Estadísticas de importación y exportación de organismos acuáticos ornamentales durante el año 2014. Recuperado de:  
[https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/\\_archivos//000000\\_Informaci%C3%B3n%20y%20noticias%20vinculadas%20al%20sector/160216\\_Estad%C3%ADsticas%20de%20Importaci%C3%B3n%20y%20Exportaci%C3%B3n%20de%20Organismos%20Acu%C3%A1ticos%20Ornamentales%20durante%20el%202014.pdf](https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//000000_Informaci%C3%B3n%20y%20noticias%20vinculadas%20al%20sector/160216_Estad%C3%ADsticas%20de%20Importaci%C3%B3n%20y%20Exportaci%C3%B3n%20de%20Organismos%20Acu%C3%A1ticos%20Ornamentales%20durante%20el%202014.pdf)

- Pantaleão, J. A. F., Barros-Alves, S. P., Tropea, C., Alves, D. F. R., Negreiros-Fransozo, M. L., y López Greco, L. S. (2015). Nutritional vulnerability in early stages of the freshwater ornamental “red cherry shrimp” *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Caridea: Atyidae). *Journal of Crustacean Biology*, 35, 676–681. doi: 10.1163/1937240X-00002357
- Pantaleao, J. A., Gregati, R. A., Da Costa, R. C., López-Greco, L. S., y Negreiros-Fransozo, M. L. (2017). Post-hatching development of the ornamental ‘Red Cherry Shrimp’ *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Crustacea, Caridea, Atyidae) under laboratorial conditions. *Aquaculture Research*, 48, 553–569.
- Patoka, J., Bláha, M., Devetter, M., Rylková, K., Čadková, Z., y Kalous, L. (2016). Aquarium hitchhikers: attached commensals imported with freshwater shrimps via the pet trade. *Biological Invasions*, 18, 457–461. doi: 10.1007/s10530-015-1018-9
- Patoka, J., Kalous, L., y Kopecký, O. (2015). Imports of ornamental crayfish: the first decade from the Czech Republic’s perspective. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 416, 04. doi: 10.1051/kmae/2014040
- Petit, H., Nègre-Sadargues, G., Castillo, R., y Trilles, J. P. (1997). The effects of dietary astaxanthin on growth and moulting cycle of postlarval stages of the prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117, 539–544. doi: 10.1016/S0300-9629(96)00431-8
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., y R Core Team (2017). nlme: linear and nonlinear mixed effects models (versión 3.1-131) [biblioteca de R]. Recuperado de: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Qvarnström, A., y Price, T. D. (2001). Maternal effects, paternal effects and sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 95–100. doi: 10.1016/S0169-5347(00)02063-2

- R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing (versión 3.3.1) [entorno de programación]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Recuperado de: <https://www.R-project.org/>
- Racotta, I. S., Palacios, E., Hernández-Herrera, R., Bonilla, A., Pérez-Rostro, C. I., y Ramírez, J. L. (2004). Criteria for assessing larval and postlarval quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture*, 233, 181–195. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.09.031
- Racotta, I. S., Palacios, E., e Ibarra, A. M. (2003). Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227, 107–130. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00498-8
- Ramirez Llodra, E. (2000). *Reproductive patterns of deep-sea invertebrates related to phylogeny and energy availability* (tesis doctoral), University of Southampton, Southampton. Recuperado de: <https://eprints.soton.ac.uk/42166/1/0000384.pdf>
- Ramirez Llodra, E. (2002). Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology*, 43: 87–170. doi: 10.1016/S0065-2881(02)43004-0
- Ramirez Llodra, E., Tyler, P. A., y Copley, J. T. P. (2000). Reproductive biology of three caridean shrimp, *Rimicaris exoculata*, *Chococaris chacei* and *Mirocaris fortunata* (Caridea: Decapoda), from hydrothermal vents. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80, 473–484.
- Rasch, J. A., y Bauer, R. T. (2016). The functional morphology and role of the thelycum in insemination, and its relation to the mating system in the seagrass shrimp *Ambidexter symmetricus* (Decapoda: Processidae). *Invertebrate Biology*, 135, 163–173. doi: 10.1111/ivb.12126
- Rasid, R., Brown, J. H., Pratoomyot, J., Monroig, O., y Shinn, A. P. (2017). Growth performance, nutrient utilisation and body composition of *Macrobrachium rosenbergii* fed graded levels of phytic acid. *Aquaculture*, 479, 850–856. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.029

- Read, G. H. L. (1981). The response of *Penaeus indicus* (Crustacea: Penaeidea) to purified and compounded diets of varying fatty acid composition. *Aquaculture*, 24, 245–256. doi: 10.1016/0044-8486(81)90060-0
- Renstrøm, B., Borch, G., y Liaaen-Jensen, S. (1981). Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin 4. Ex shrimps (*Pandalus borealis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 69, 621–624. doi: 10.1016/0305-0491(81)90359-X
- Responde, A. A., Torres, M. A. J., Gorospe, J., Tabugo, S. R. E., Manting, M. M. E., y Demayo, C. G. (2015). Describing variations in the carapace shape of the red-clawed crab *Perisesarma bidens*. *Advances in Environmental Biology*, 9, 137–145.
- Rhyne, A. L. (2010). The importance of open access in technology transfer for marine ornamental aquaculture: the case of hobbyist-led breeding initiative. *Aquaculture, Aquariums, Conservation & Legislation*, 3, 269–272.
- Ribeiro, K., Franceschini-Vicentini, I. B., Papa, L. P., New, M. B., y Valenti, W. C. (2012). Effect of polyunsaturated fatty acids on the fecundity of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). *Aquaculture Research*, 43, 1756–1763. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02980.x
- Rodríguez-González, H., Villarreal, H., Hernández-Llamas, A., García-Ulloa, M., Vázquez-Boucard, C., y Serrano-Pinto, V. (2011). Effect of dietary protein-to-energy ratio on reproduction in female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research*, 42, 1840–1847. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02787.x
- Rodríguez-González, H., Hernández-Llamas, A., García-Ulloa, M., Racotta, I., Montoya-Mejía, M., y Villarreal, H. (2014). Effect of protein and lipid levels in diets for female red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* on quality of offspring (juvenile), with emphasis on growth performance, biochemical composition and stress resistance to low oxygen, high ammonia and salinity. *Aquaculture Nutrition*, 20, 557–565. doi: 10.1111/anu.12109

- Rogers, D. C., y Thorp, J. H. (2015). Collecting, Preserving, and Culturing Invertebrates. En J. H. Thorp y D. C. Rogers (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates* (pp. 57–62). San Diego, Estados Unidos de América: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-385026-3.00003-6
- Rohlf, F. J. (1999). Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification*, 16, 197–223. doi: 10.1007/s003579900054
- Rohlf, F. J. (2004). tpsUtil, file utility program (versión 1.6) [programa informático]. Nueva York: State University of New York at Stony Brook. Recuperado de: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf, F. J. (2005). tpsDig, digitize landmarks and outlines (versión 2.22) [programa informático]. Nueva York: State University of New York at Stony Brook. Recuperado de: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf, F. J., y Marcus, L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 129–132. doi: 10.1016/0169-5347(93)90024-J
- Rohlf, F. J., y Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, 39, 40–59. doi: 10.2307/2992207
- Rosa, R., y Nunes, M. L. (2003a). Tissue biochemical composition in relation to the reproductive cycle of deep-sea decapod *Aristeus antennatus* in the south Portuguese coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83, 963–970. doi: 10.1017/S0025315403008154h
- Rosa, R., y Nunes, M. L. (2003b). Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies off the Portuguese south coast. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 50, 119–130. doi: 10.1016/S0967-0637(02)00147-4

- Ruangdej, U., y Laohavisuti, N. (2014). The use of synthetic and natural carotenoid in diet for color enhancement on red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda*. *Journal of Fisheries and Environment*, 38, 30–34.
- Rubolini, D., Galeotti, P., Ferrari, G., Spairani, M., Bernini, F., y Fasola, M. (2006). Sperm allocation in relation to male traits, female size, and copulation behaviour in a freshwater crayfish species. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60, 212–219. doi: 10.1007/s00265-005-0158-9
- Rufino, M., Abelló, P., y Yule, A. B. (2004). Male and female carapace shape differences in *Liocarcinus depurator* (Decapoda, Brachyura): An application of geometric morphometric analysis to crustaceans. *Italian Journal of Zoology*, 71, 79–83. doi: 10.1080/11250000409356554
- Sachlikidis, N. G., Jones, C. M., y Seymour, J. E. (2010). The effect of temperature on the incubation of eggs of the tropical rock lobster *Panulirus ornatus*. *Aquaculture*, 305, 79–83. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.04.015
- Santos e Almeida, A., Barros-Alves, S. D. P., Hirose, G. L., y Alves, D. F. R. (2018). Reproductive output of the ornamental shrimp *Lysmata vittata* (Stimpson, 1860) (Decapoda: Caridea) in wild populations and under different maturation diets. *Invertebrate Reproduction & Development*, 62, 257–267. doi: 10.1080/07924259.2018.1509903
- Sato, T., Ashidate, M., Jinbo, T., y Goshima, S. (2006). Variation of sperm allocation with male size and recovery rate of sperm numbers in spiny king crab *Paralithodes brevipes*. *Marine Ecology Progress Series*, 312, 189–199. doi: 10.3354/meps312189
- Sato, T., y Suzuki, N. (2010). Female size as a determinant of larval size, weight, and survival period in the coconut crab, *Birgus latro*. *Journal of Crustacean Biology*, 30, 624–628. doi: 10.1651/10-3279.1

- Sato, T., Yoseda, K., Abe, O., y Shibuno, T. (2008). Male maturity, number of sperm, and spermatophore size relationships in the coconut crab *Birgus latro* on Hatoma Island, southern Japan. *Journal of Crustacean Biology*, 28, 663–668. doi: 10.1651/07-2966.1
- Sawanboonchun, J., Roy, W. J., Robertson, D. A., y Bell, J. G. (2008). The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua*, L.). *Aquaculture*, 283, 97–101. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.024
- Scalici, M., y Gibertini, G. (2009). Sexual dimorphism and ontogenetic variation in the carapace of *A. pallipes* (Lereboullet, 1858). *Italian Journal of Zoology*, 76, 179–188. doi: 10.1080/11250000802334635
- Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., y Muntwyler, E. (1950). The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archives of Biochemistry*, 25, 191–200.
- Simões, F., Ribeiro, F., y Jones, D. A. (1998). The effect of diet on the reproductive performance of marine cleaner shrimps *Lysmata debelius* (Bruce 1983) and *L. amboinensis* (De Man 1888) (Caridea, Hippolytidae) in captivity. En *Book of Abstracts, Aquaculture 1998* (pp. 566). Las Vegas, USA: World Aquaculture Society.
- Siegenthaler, A., Mondal, D., y Benvenuto, C. (2017). Quantifying pigment cover to assess variation in animal colouration. *Biology Methods and Protocols*, 2, bpx003. doi: 10.1093/biomethods/bpx003
- Slice, D. E. (2001). Landmark coordinates aligned by Procrustes analysis do not lie in Kendall's shape space. *Systematic Biology*, 50, 141–149. doi: 10.1080/10635150119110
- Smith, C. C., y Fretwell, S. D. (1974). The optimal balance between size and number of offspring. *The American Naturalist*, 108, 499–506. doi: 10.1086/282929
- Smith, G. G., Ritar, A. J., Thompson, P. A., Dunstan, G. A., y Brown, M. R. (2002). The effect of embryo incubation temperature on indicators of larval viability in Stage I phyllosoma of the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 209, 157–167. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00758-X

- Svensson, P. A., y Wong, B. B. M. (2011). Carotenoid-based signals in behavioural ecology: a review. *Behaviour*, *148*, 131–189. doi: 10.1163/000579510X548673
- Swiney, K. M., Eckert, G. L., y Kruse, G. H. (2013). Does maternal size affect red king crab, *Paralithodes camtschaticus*, embryo and larval quality?. *Journal of Crustacean Biology*, *33*, 470–480. doi: 10.1163/1937240X-00002162
- Tacon, A. J. (2003). Aquaculture production trends analysis. En: *Review of the state of world aquaculture* (pp. 5–29). Roma, Italia: FAO.
- Thatje, S., Lovrich, G. A., y Anger, K. (2004). Egg production, hatching rates, and abbreviated larval development of *Campylonotus vagans* Bate, 1888 (Crustacea: Decapoda: Caridea), in subantarctic waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *301*, 15–27. doi: 10.1016/j.jembe.2003.09.010
- Thlusty, M., y Hyland, C. (2005). Astaxanthin deposition in the cuticle of juvenile American lobster (*Homarus americanus*): implications for phenotypic and genotypic coloration. *Marine Biology*, *147*, 113–119. doi: 10.1007/s00227-005-1558-0
- Tomas, A. L., García Bento, M. A., Mutti, L. D., Zara, F. J., y López Greco, L. S. (2019). New insights in the male anatomy, spermatophore formation and sperm structure in Atyidae: the red cherry shrimp *Neocaridina davidi*. *Invertebrate Biology*. doi: 10.1111/ivb.12239
- Torres, M. V., Giri, F., y Collins, P. A. (2014). Geometric morphometric analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Decapoda: Palaemonidae) at a microgeographical scale in a floodplain system. *Ecological Research*, *29*, 959–968. doi: 10.1007/s11284-014-1184-8
- Torrissen, O. J., y Naevdal, G. (1984). Pigmentation of salmonids—genetical variation in carotenoid deposition in rainbow trout. *Aquaculture*, *38*, 59–66. doi: 10.1016/0044-8486(88)90244-X

- Trevisan, A., Marochi, M. Z., Costa, M., Santos, S., y Masunari, S. (2012). Sexual dimorphism in *Aegla marginata* (Decapoda: Anomura). *Nauplius*, 20, 75–86. doi: 10.1590/S0104-64972012000100008
- Tropea, C., Lavarías, S. M. L., y Greco, L. S. L. (2018). Getting ready for mating: the importance of male touching as an accelerator of ovarian growth in a caridean shrimp. *Zoology*, 130, 57–66. doi: 10.1016/j.zool.2018.08.003
- Tropea, C., Arias, M., Calvo, N. S., y López Greco, L. S. (2012). Influence of female size on offspring quality of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae: Decapoda). *Journal of Crustacean Biology*, 32, 883–890. doi: 10.1163/1937240X-00002103
- Tropea, C., y López Greco, L. S. (2015). Female growth and offspring quality over successive spawnings in a caridean shrimp *Neocaridina davidi* (Decapoda, Atyidae) with direct development. *Biological Bulletin*, 229, 243–254. doi: 10.1086/BBLv229n3p243
- Tropea, C., Stumpf, L., y López Greco, L. S. (2015). Effect of temperature on biochemical composition, growth and reproduction of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda* (Decapoda, Caridea). *PLoS One*, 10: e0119468, doi: 10.1371/journal.pone.0119468
- Truong, K., Meewan, M., y Austin, C. M. (2002). Comparison of brood size and juvenile weight between a blue strain and normal-coloured strains of the australian freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 22, 538–542. doi: 10.1163/20021975-99990265
- Tziouveli, V., Hall, M., y Smith, G. (2011). The effect of maturation diets on the reproductive output of the white-striped cleaner shrimp, *Lysmata amboinensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 56–65. doi: 10.1111/j.1749-7345.2010.00443.x
- Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Analytical Biochemistry*, 11, 256–265.

- Vazquez, N. D., Delevati Colpo, K., Sganga, D. E., y López Greco, L. S. (2017). Density and gender segregation effects in the culture of the caridean ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* Bouvier, 1904 (Caridea: Atyidae). *Journal of Crustacean Biology*, 37, 367–373. doi: 10.1093/jcbiol/rux051
- Venables, W. N., y Ripley, B. D. (2002). *Modern applied statistics with S*. Nueva York, Estados Unidos de América: Springer.
- Verakunpiriya, V., Mushiake, K., Kawano, K., y Watanabe, T. (1997). Supplemental effect of astaxanthin in broodstock diets on the quality of yellowtail eggs. *Fisheries Science*, 63, 816–823. doi: 10.2331/fishsci.63.816
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., y Razak, T. (2003). *From Ocean to Aquarium*. Cambridge, Reino Unido: UNEP-WCMC.
- Wade, N. M., Gabaudan, J., y Glencross, B. D. (2015). A review of carotenoid utilisation and function in crustacean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 9, 141–156. doi: 10.1111/raq.12109
- Walker, M. L., Austin, C. M., y Meewan, M. (2000). Evidence for the inheritance of a blue variant of the Australian fresh-water crayfish *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae) as an autosomal recessive. *Journal of Crustacean Biology*, 20, 25–30. doi: 10.1163/20021975-99990013
- Wang, W., Ishikawa, M., Koshio, S., Yokoyama, S., Dawood, M. A., y Zhang, Y. (2018). Effects of dietary astaxanthin supplementation on survival, growth and stress resistance in larval and post-larval kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture Research*, 49, 2225–2232. doi: 10.1111/are.13679
- Watanabe, T., y Vassallo-Agius, R. (2003). Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227, 35–61. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00494-0

- Weber, S., y Traunspurger, W. (2016). Influence of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) on freshwater meiofaunal assemblages. *Limnologia*, 59, 155–161. doi: 10.1016/j.limno.2016.06.001
- Wehrtmann, I. S., y Graeve, M. (1998). Lipid composition and utilization in developing eggs of two tropical marine caridean shrimps (Decapoda: Caridea: Alpheidae, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 121, 457–463. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10141-4
- Weiss, S. L., Kennedy, E. A., Safran, R. J., y McGraw, K. J. (2011). Pterin-based ornamental coloration predicts yolk antioxidant levels in female striped plateau lizards (*Sceloporus virgatus*). *Journal of Animal Ecology*, 80, 519–527. doi:10.1111/j.1365-2656.2010.01801.x
- Wen, X. B., Chen, L. Q., Zhou, Z. L., Ai, C. X., y Deng, G. Y. (2002). Reproduction response of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) fed different sources of dietary lipid. *Comparative Biochemistry and Physiology part a: Molecular & Integrative Physiology*, 131, 675–681. doi: 10.1016/S1095-6433(01)00515-3
- Wickler, W., y Seibt, U. (1981). Monogamy in Crustacea and Man. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 57, 215–234. doi: 10.1111/j.1439-0310.1981.tb01924.x
- Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., y Sorgeloos, P. (2001). Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 202, 1–21. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00570-1
- Wu, X., Cheng, Y., Sui, L., Zeng, C., Southgate, P. C., y Yang, X. (2007). Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock. *Aquaculture*, 273, 602–613. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.09.030
- Wu, X., Cheng, Y., Zeng, C., Sui, L., Southgate, P. C., Zhou, G., y Bian, W. (2009). Reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

- (H. Milne-Edwards) females fed an optimized formulated diet and the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Aquaculture Research*, 40, 1335–1349. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02121.x
- Wyban, J., Martinez, G., y Sweeney, J. (1997). Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquaculture*, 28, 59–62.
- Wyman, M. J., Stinchcombe, J. R., y Rowe, L. (2013). A multivariate view of the evolution of sexual dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 2070–2080. doi: 10.1111/jeb.12188
- Xu, H., Zhang, Y., Luo, K., Meng, X., Luan, S., Cao, B., Chen, B., Liang, M., y Kong, J. (2017). Arachidonic acid in diets for early maturation stages enhances the final reproductive performances of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 479, 556–563. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.06.037
- Xu, X. L., Ji, W. J., Castell, J. D., y O'dor, R. K. (1994). Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture*, 119, 359–370. doi: 10.1016/0044-8486(94)90300-X
- Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M., e Ito, Y. (1990). Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids: I. Effect of dietary astaxanthin,  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, 87, 323–330. doi: 10.1016/0044-8486(90)90069-Y
- Yanar, Y., Çelik, M., y Yanar, M. (2004). Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus monoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. *Food Chemistry*, 88, 267–269. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.01.037
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., y Fink, W. L. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. San Diego, Estados Unidos de América: Academic Press.

- Zimmermann, G., Bosc, P., Valade, P., Cornette, R., Améziane, N., y Debat, V. (2012). Geometric morphometrics of carapace of *Macrobrachium australe* (Crustacea: Palaemonidae) from Reunion Island. *Acta Zoologica*, 93, 492–500. doi: 10.1111/j.1463-6395.2011.00524.x
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., y Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1, 3–14, doi: 10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x
- Zuur, A., Ieno, E. N., y Smith, G. M. (2007). *Analyzing ecological data*. Nueva York, Estados Unidos de América: Springer Science & Business Media.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A., y Smith, G. M. (2009). *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Nueva York, Estados Unidos de América: Springer Science & Business Media.