**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

# "Esfuerzo reproductivo en el límite de la distribución geográfica: el cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis* como modelo"

Tesis presentada para optar al Título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Agustina Marciano**

Directora de tesis: Dra. Karine Delevati Colpo

Co Directora de tesis: Dra. Laura Susana López Greco

Consejera de Estudios: Dra. Fabiana Lo Nostro

Lugar de trabajo: Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Laboratorio de Biología de la Reproducción, Crecimiento y Nutrición de Crustáceos Decápodos.

Buenos Aires, 7 de noviembre de 2022

*Para Fabio*

# Índice

Resumen ..... iv

Abstract ..... vii

Agradecimientos ..... ix

1. Introducción general ..... 1

1.1. Costo de la reproducción e inversión energética ..... 2

1..2 Reproducción en crustáceos decápodos ..... 4

1.3 Moduladores de la reproducción en crustáceos decápodos ..... 9

1.4 Cangrejo violinista ..... 13

1.5 *Leptuca uruguayensis* ..... 15

1.6 Objetivo general y objetivos específicos ..... 19

1.7 Organización de la tesis ..... 20

2. Estudio del patrón reproductivo de las hembras de *Leptuca uruguayensis* ..... 22

2.1 Introducción ..... 23

2.2 Objetivo e hipótesis ..... 26

2.3 Materiales y métodos ..... 27

2.3.1 Área de estudio ..... 27

2.3.2 Tiempo de incubación ..... 27

2.3.3 Patrón de puestas ..... 29

2.3.4 Número de puestas por hembra ..... 30

2.3.5 Condición del ovario y hepatopáncreas ..... 33

2.3.6 Análisis estadístico ..... 35

2.4 Resultados ..... 36

2.4.1 Tiempo de incubación ..... 36

2.4.2 Patrón de puestas ..... 37

2.4.3 Número de puestas por hembra ..... 39

2.4.4 Condición del ovario y el hepatopáncreas ..... 42

2.5 Discusión ..... 47

2.6 Conclusión ..... 53

3. Evaluación de los factores que modulan el desempeño reproductivo de las hembras de *Leptuca uruguayensis* ..... 56

3.1 Introducción ..... 57

3.2 Objetivo e hipótesis ..... 60

3.3 Materiales y métodos ..... 61

3.3.1 Muestreo y procesamiento en laboratorio ..... 61

3.3.2 Fecundidad ..... 63

3.3.3 Rendimiento reproductivo ..... 63

3.3.4 Volumen del huevo ..... 64

3.3.5 Composición bioquímica de los huevos ..... 64

3.3.6 Análisis estadísticos ..... 65

3.4 Resultados ..... 66

3.4.1 Fecundidad ..... 68

3.4.2 Rendimiento reproductivo ..... 70

3.4.3 Volumen del huevo ..... 70

3.4.4 Composición bioquímica de los huevos ..... 70

3.5 Discusión ..... 73

3.6 Conclusión ..... 78

4. Evaluación de la dinámica energética y el desempeño reproductivo de las hembras grandes de *Leptuca uruguayensis* ..... 80

4.1 Introducción ..... 81

4.2 Objetivo ..... 84

4.3 Materiales y métodos ..... 86

4.3.1 Área de estudio, muestreo de cangrejos y procedimientos de laboratorio ..... 86

4.3.2 Identificación de los momentos de puesta ..... 87

4.3.3 Contenido energético del hepatopáncreas, ovario y huevos ..... 87

4.3.4 Ingesta de energía ..... 89

4.3.5 Desempeño reproductivo ..... 93

4.3.6 Análisis estadístico ..... 93

4.4 Resultados ..... 94

4.4.1 Identificación de los momentos de puesta ..... 94

4.4.2 Contenido energético del hepatopáncreas, ovario y huevos ..... 98

4.4.3 Ingesta de energía ..... 102

4.4.4 Desempeño reproductivo ..... 104

4.5 Discusión ..... 107

4.6 Conclusión ..... 116

5. Discusión general ..... 118

6. Bibliografía ..... 129

# Resumen

**Esfuerzo reproductivo en el límite de la distribución geográfica: el cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis* como modelo**

El cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis* tiene como límite sur de su distribución geográfica la provincia de Buenos Aires, Argentina, donde la temporada reproductiva es corta. El objetivo de esta tesis fue estimar el esfuerzo reproductivo y comprender la estrategia de inversión energética que poseen las hembras de esta población en un estuario templado. En primer lugar, se estudió el patrón reproductivo de *L. uruguayensis* con una aproximación experimental en campo y laboratorio. Se registraron el tamaño de las hembras, el tiempo de incubación, el número de puestas que tienen y el tiempo entre las mismas. Luego, se evaluó la variación del estadio de desarrollo del ovario y el volumen del ovario y del hepatopáncreas a lo largo de la temporada reproductiva. Además, se analizaron las reservas en estos órganos mediante análisis bioquímicos. Esto permitió reconocer en la temporada reproductiva tres momentos, en cada uno de los cuales se registró un evento de puesta en la población. Debido a que las hembras de esta especie atraviesan dos temporadas reproductivas como adultas, se determinó que en el primer ciclo reproductivo, las hembras medianas y chicas pueden tener como máximo una puesta, mientras que, en el segundo ciclo reproductivo de sus vidas, las hembras grandes pueden tener hasta dos puestas. Además, se evidenció que las hembras emplean una estrategia reproductiva mixta en el manejo de la energía para la reproducción. Para conocer si el desempeño reproductivo de las hembras se modifica a lo largo de su vida, se evaluaron variables reproductivas teniendo en cuenta el ciclo

reproductivo que atraviesan las hembras y el momento de la temporada reproductiva. Si bien las hembras de primer ciclo reproductivo mostraron menor fecundidad, el rendimiento reproductivo fue similar para todas las hembras, en todos los momentos de la temporada reproductiva. El volumen del huevo y los carotenoides se vieron afectados por los momentos de la temporada reproductiva y, la calidad nutricional de los huevos, por el ciclo reproductivo de la hembra. Debido a que se observó que sólo las hembras grandes son capaces de tener dos puestas en la misma temporada reproductiva, se evaluó la dinámica energética y el desempeño reproductivo de éstas. Se comprobó que las hembras grandes tienen la primera puesta de la temporada reproductiva utilizando mayoritariamente la estrategia de capitalización. Dos meses más tarde, tienen la segunda puesta utilizando en mayor medida la estrategia reproductiva de uso inmediato, mediante el incremento de la ingesta de energía evidenciado por el aumento en la tasa de alimentación. Las puestas de huevos producidas por las hembras en la primera puesta mostraron mayor fecundidad y peso que aquellas puestas que fueron producidas en la segunda puesta. Sin embargo, la energía asignada por las hembras grandes de *L. uruguayensis* a cada embrión fue similar en ambas puestas. Los resultados de este trabajo evidencian cómo las hembras de *L. uruguayensis* utilizan la energía disponible cuando la ventana de condiciones óptimas para reproducirse es estrecha, aplicando una estrategia reproductiva mixta que maximiza el uso de recursos asegurando un proceso reproductivo exitoso.

Palabras clave: cangrejo violinista, carotenoides, ciclo reproductivo, ingesta de energía, estrategia reproductiva de capitalización, estrategia reproductiva de uso

inmediato, fecundidad, *Leptuca uruguayensis*, número de puestas por hembra, patrón de puesta, rendimiento reproductivo, reservas en ovario y hepatopáncreas, tamaño de la hembra, volumen del huevo.

# Abstract

**Reproductive effort at the limit of geographical distribution: the fiddler crab *Leptuca uruguayensis* as a model**

The southern limit of the geographical distribution of the fiddler crab *Leptuca uruguayensis* is in the province of Buenos Aires, Argentina, where the reproductive season is short. The aim of this thesis was to estimate the reproductive effort and to understand the energy investment strategy displayed by the females of this population in a temperate estuary. First, the reproductive pattern of *L. uruguayensis* was studied with an experimental approach in the field and in the laboratory. The size of the females, brooding time, number of spawns, and time between spawns, were recorded. Also, the variation of the developmental stage of the ovary and the volume of the ovary and hepatopancreas throughout the reproductive season were evaluated. In addition, the reserves in these organs were studied by biochemical analyses. Three periods in the reproductive season were recognized, with a population spawning event recorded in each one. Since the females of this species go through two reproductive seasons as adults, it was determined that in the first reproductive cycle, the medium and small females can have a maximum of one spawn, while during the second reproductive cycle of their lives, the larger females can have up to two spawns. In addition, it was evidenced that females use a mixed reproductive strategy in managing energy for reproduction. To determine whether the reproductive performance of females is modified throughout their lives, reproductive traits were evaluated considering the reproductive cycle of females

and the period of the reproductive season. Although females in the first reproductive cycle showed lower fecundity, reproductive performance was similar for all females, at all periods of the reproductive season. Egg volume and carotenoids were affected by the periods of the reproductive season, whereas egg nutritional quality, by the female reproductive cycle. Since only large females can have two clutches in the same reproductive season, their energetic dynamics and reproductive performance were evaluated. Large females have the first spawn of the reproductive season using mostly the capital breeding strategy. Two months later, they have the second spawn increasing the using of the income breeding strategy, through increased energy intake, evidenced by increased feeding rate. Egg clutches produced by females in the first spawn showed higher fecundity and weight than clutches produced in the second spawn. However, the energy allocated by large females of *L. uruguayensis* to each embryo was similar for both strategies. The results of this thesis evidence how the females of *L. uruguayensis* use the available energy when the optimal reproduction window is narrow, applying a mixed reproductive strategy that maximizes the use of resources, ensuring a successful reproductive process.

Keywords: capital breeding strategy, carapace size of the female, egg volume, energy intake, fecundity, fiddler crab, income breeding strategy, *Leptuca uruguayensis*, number of spawns per female, ovary and hepatopancreas reserves, reproductive cycle, reproductive performance, spawning pattern.

# Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, especialmente al Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, cuyos docentes y no docentes facilitaron la realización de la presente tesis doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca que posibilitó llevar a cabo 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 PIP 2015-2017 n° 11220150100544, PICT 2014-1366 (resolución 270/15), PICT 2016-0759 (resolución 285/17) y UBACYT 2018-2021 (20020170100021BA – Cs. Agropecuarias y salud animal).

A mis Directoras, por guiarme en cada paso y brindarme sus conocimientos a lo largo de estos años.

A mi Consejera de Estudios, por sus consejos y sugerencias en cada etapa de este recorrido.

A la Comisión de Seguimiento de tesis, por enriquecer este trabajo con sus sugerencias y comentarios.

A la comunidad de General Lavalle por permitirme acceder a las áreas de muestreo y colaborar en las tareas de campo.

A los becarios, investigadores y CPA's del DBBE (FCEN-UBA) y del IBBEA (CONICET-UBA) que me bridaron apoyo tanto en el trabajo de campo como en el de laboratorio y en la corrección del idioma inglés.

A los colegas del Instituto de Limnología “Dr. Raúl Ringuelet” y de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) por su trabajo y buena predisposición en las tareas de muestreo.

A Gabriel Rosa (DBBE, FCEN-UBA) y Carlos Marciano por su ayuda en la construcción de los mesocosmos.

A la Dra. Liane Stumpf (IBBEA, CONICET-UBA) por su colaboración en la realización de los análisis bioquímicos.

A la Dra. Claudia Boy (CAIDC, CONICET) por su trabajo realizado en la determinación calorimétrica de energía en el sedimento.

A mis compañeros del laboratorio 50, los que están y los que ya se fueron, por su compañerismo y amistad. De todos me llevo algo.

A los integrantes del laboratorio 1 y 101, por estar siempre dispuestos a dar una mano.

A mis padres, ya que por su amor y su dedicación pude lograr este proyecto.

A mi hermana, por apoyarme incondicionalmente.

A mi novio, gracias por compartir esto conmigo. Te amo para siempre.

A mis abuelas y mis tíos, por estar siempre pendientes y alegrarse con mis logros.

A la familia de mi novio, por su apoyo y aliento en cada etapa.

A mis amigos y amigas, por acompañarme siempre.

A mis amigos Simón y Manuel, que crecieron con este proyecto.

A mis mascotas, por la ternura y la alegría.

# Capítulo 1

## Introducción general

## 1.1. Costo de la reproducción e inversión energética

La reproducción es un proceso costoso que puede generar conflictos con otros aspectos de la vida de los animales, como el crecimiento y la supervivencia (Bell, 1980; Stearns, 1989; Reznick *et al*., 2000). Los recursos destinados a cada aspecto dependerán del equilibrio entre la disponibilidad y la demanda de éstos, que puede variar según la etapa de la vida de los individuos, la estrategia reproductiva y las condiciones ambientales (Reznick, 1985; Barnes y Partridge, 2003). El paradigma de la selección natural promueve los fenotipos que maximizan el *fitness*, por lo tanto, el modo en que los animales obtengan y administren los recursos definirá la estrategia utilizada para la reproducción (Calow y Townsend, 1981; Stearns, 1992; Roff *et al*., 2002).

Los costos fisiológicos de la reproducción se pueden medir como la energía asignada a las actividades reproductivas (Callow, 1979), de modo que un aspecto interesante es relacionar la derivación de energía considerando la dinámica del período reproductivo (Houston *et al*., 2007). En función de cómo se administra la energía derivada a la reproducción, se plantearon dos hipótesis principales denominadas *capital breeding strategy* e *income breeding strategy* (Drent y Daan, 1980; Jönsson, 1997).

En la *capital breeding strategy* la adquisición de alimento y la reproducción ocurren en momentos diferentes ya que, en los meses previos a la temporada reproductiva, los organismos obtienen el alimento que se almacena en forma de metabolitos conformando una fuente de energía que será utilizada luego, durante la temporada reproductiva (Stearn, 1992; Ejsmond *et al*., 2015). La principal *ventaja* de esta estrategia es que desacoplan las actividades de forrajeo y

reproducción, lo cual aumenta la eficiencia de ambos procesos (Jönsson, 1997; Stephen *et al*., 2009). Además, el hecho de tener reservas energéticas asegura que la reproducción pueda ocurrir temprano en la temporada reproductiva, independientemente de situaciones impredecibles (Stephen *et al*., 2009; Varpe *et al*., 2009). La principal *desventaja* es, desde una perspectiva energética, que el almacenamiento de metabolitos implica costos de mantenimiento (Jönsson, 1997; Williams *et al*., 2017).

En el caso de la *income breeding strategy* los individuos utilizan de manera inmediata el alimento adquirido durante la temporada reproductiva para madurar la gónada, lo cual resulta eficiente en términos energéticos (Stearn, 1992). Esta estrategia permite que los individuos sostengan temporadas reproductivas largas con la posibilidad de producir más progenie si las condiciones ambientales son favorables, pero resulta riesgosa si algún evento adverso impide que puedan alimentarse o se reduce la disponibilidad de alimento, ya que esto podría implicar la pérdida total de la oportunidad de reproducirse ese año (Jönsson, 1997; Stephen *et al*., 2009). La estrategia implementada dependerá de las condiciones fisiológicas de los organismos y ambientales del entorno (Drent y Daan, 1980; Stephen *et al*., 2009).

Estas estrategias son consideradas como los extremos de un gradiente donde un individuo que empieza la temporada reproductiva utilizando la energía almacenada para reproducirse, puede continuar el proceso mediante la energía captada directamente de la fuente de alimento presente en el ambiente (Houston *et al*., 2007; Zeng *et al*., 2014). También se ha observado que la edad o el tamaño puede determinar la estrategia utilizada ya que, para los organismos jóvenes y

pequeños, es difícil alcanzar la temporada reproductiva con reservas, porque aún continúan creciendo (Thomas, 1988).

Si bien los principales trabajos sobre estas estrategias se refieren a aves y mamíferos, en los últimos años se han realizado diferentes estudios en crustáceos decápodos, especialmente en cangrejos braquiuros como *Carcinus maenas (*Griffen *et al*., 2011)*, Callinectes danae* (Zara *et al*., 2011) y *Eriocheir sinensis* (Yu *et al*., 2007). Los primeros resultados indicaron que los braquiuros utilizan principalmente la *capital breeding strategy,* ya que pueden almacenar suficiente energía dentro de sus cuerpos para sustentar completamente el proceso reproductivo (Bonnet *et al*., 2001; Griffen *et al*., 2011, 2012). Sin embargo, posteriores estudios han revelado que no sólo existen especies en donde predomina el uso de la *income breeding strategy*, como fue demostrado para el cangrejo invasor *Hemigrapsus sanguineus* (Griffen *et al*., 2012), sino que también pueden presentar estrategias mixtas, como el cangrejo semiterrestre *Aratus pisonii* (Carver *et al*., 2021).

## 1.2 Reproducción en crustáceos decápodos

El estudio de la reproducción en los crustáceos decápodos puede ser abordado desde diversos enfoques (Hines, 1991; Correa *et al*., 2003; Hayes *et al*., 2013; Pamuru, 2019; Jayasankar *et al*., 2020). En particular, los trabajos realizados en hembras suelen orientarse al estudio de la dinámica energética entre el hepatopáncreas y el ovario, a la evaluación de la calidad y la cantidad de los oocitos, los huevos y las larvas, así como también al cuidado parental (Kyomo, 1988; Hines, 1992; Rodríguez Jaramillo *et al*., 2021). En este estudio

nos centraremos en los ciclos de maduración ovárica, que incluyen desde el aporte energético del hepatopáncreas, hasta la puesta de huevos.

Los crustáceos decápodos presentan un ovario sacular donde se encuentran los oocitos que aumentan de tamaño y cambian de coloración durante el ciclo reproductivo a medida que aumenta la composición y la proporción de vitelo (Tsukimura, 2001; Peixoto *et al*., 2005; López Greco, 2013). Cuando comienza el proceso de maduración ovárica, los oocitos producen los primeros componentes del vitelo, principalmente proteínas, en un proceso conocido como vitelogénesis I (Cai y Liu, 2017).

El hepatopáncreas constituye el órgano más grande del sistema digestivo y es el principal órgano de reserva de los crustáceos decápodos, donde acumulan metabolitos como lípidos, proteínas y glucógeno, que producen energía para sustentar el crecimiento somático, la muda y el proceso reproductivo (Vogt, 2019). Durante la vitelogénesis II, el hepatopáncreas vehiculiza mediante la hemolinfa algunos componentes, como precursores de vitelina, que son captados por los oocitos para luego ser modificados y formar el vitelo, que es una lipoglicocarotenoproteína (Sasaki *et al*., 1986; Lee y Chang, 1997; Tsukimura, 2001; Subramoniam, 2011; Guzmán *et al*., 2020; Jayasankar *et al*., 2020).

La tendencia general sobre la composición bioquímica de los huevos de los crustáceos decápodos con desarrollo indirecto señala que el componente principal son las proteínas, en segundo lugar los lípidos y, finalmente, los carbohidratos (Arcos *et al*., 2003; García Guerrero, 2009). Las proteínas tienen un papel fundamental como componentes estructurales del embrión y, bajo

ciertas condiciones, también se utilizan como fuente de energía (Clarke *et al*., 1991; Gardner, 2001; García Guerrero *et al*., 2003). Los lípidos son la fuente de energía metabólica más importante para el embrión en desarrollo y también son componentes estructurales esenciales de las membranas celulares y de las hormonas (Nates y McKenney Jr., 2000; Roustaian *et al*., 2001). Los carbohidratos son importantes en el ciclo de Krebs, en el almacenamiento de glucógeno, en la síntesis de quitina y en la formación de esteroides y ácidos grasos, aunque su rol en la reproducción es menor respecto de los lípidos, probablemente debido a su menor rendimiento calórico (New, 1976; Rosa y Nunes, 2002). Además, el vitelo está compuesto por carotenoides provenientes de la dieta, ya que los crustáceos no pueden sintetizarlo. Estos aportan protección antioxidante a las células y favorecen el desarrollo embrionario ya que aumentan la tolerancia al estrés, promoviendo el crecimiento y la sobrevida (Yamada *et al*., 1990; Lorenz, 1998; Darachai *et al*., 1999; Liñán Cabello *et al*., 2002).

Para determinar el costo de la reproducción debe evaluarse el desempeño reproductivo, que se considera tanto como la cantidad y calidad la progenie producida como también la inversión energética de los parentales, con lo cual la evaluación del esfuerzo reproductivo resulta compleja (Reznick, 1985; Clarke, 1987). Sin embargo, existen algunas aproximaciones que son útiles para hacer comparaciones tanto entre poblaciones como entre individuos (Hines, 1992; Hartnoll, 2006).

- Índices gonadosomático y hepatosomático

El estadio de desarrollo ovárico puede determinarse de manera macroscópica (color, peso y forma del ovario) o microscópica (cortes histológicos) y evaluarse de forma cualitativa o cuantitativa (López Greco, 1997; Brewer *et al*., 2008). Uno de los métodos cuantitativos más utilizados para la estimación del estadio de desarrollo ovárico es el índice gonadosomático que, usualmente, es calculado como la relación porcentual entre el peso del ovario y el peso de la hembra (Grant y Tyler, 1983). Además, debido a que las reservas del hepatopáncreas son movilizadas para madurar la gónada, una buena estimación para evaluar la dinámica energética es relacionar el índice gonadosomático con el índice hepatosomático, que es la relación porcentual entre el peso del hepatopáncreas y el peso de la hembra (Janz *et al*., 2001; Hasek y Felder, 2005; Shafi, 2012; Parker *et al*., 2018).

Si bien esta metodología es simple de aplicar y, en conjunto, ambos índices son una aproximación útil del esfuerzo reproductivo (Grant y Tyler, 1983), cabe aclarar que tienen algunas limitaciones. Por ejemplo, es importante considerar si los índices son determinados con el peso húmedo o seco de los órganos y los animales, la fase del ciclo de la muda en la que se encuentra el animal, el grado de sincronismo en la vitelogénesis respecto del tamaño de la hembra, entre otros (Castille y Lawrence, 1989; Sudha y Anilkumar, 1996; Courtney *et al*., 1995; Brewer *et al*., 2008; Flores *et al*., 2019).

- Fecundidad

Otra variable reproductiva de importancia que permite caracterizar y comparar el desempeño materno es la fecundidad, que puede medirse de tres formas. La fecundidad *potencial* implica contar el número de oocitos maduros que se encuentran dentro del ovario mediante técnicas histológicas y de

microscopía o recuento directo en el ovario cuando los oocitos son muy grandes (Steachey y Somers, 1995). Sin embargo, existen otras aproximaciones como determinar la *fecundidad realizada*, donde se cuenta el número de huevos presentes en los pleópodos (sea el total o una estimación a partir de submuestras), o la fecundidad *actual*, que consiste en contar el número de larvas o juveniles eclosionados (Steachey y Somers, 1995; López Greco *et al*., 2000; López Greco y Rodríguez, 2004; Ramirez Llodra, 2002; Militelli *et al*., 2019).

- Rendimiento reproductivo

La relación entre el tamaño total de la puesta de huevos producidos respecto del tamaño de la hembra se conoce como rendimiento reproductivo (*reproductive output*, *sensu* Hines 1991, 1992). Es un estimador de la proporción de la energía del cuerpo de la hembra que es destinada a la reproducción y constituye otra aproximación para evaluar el esfuerzo reproductivo (López Greco *et al*., 2000; Tsujimoto *et al*., 2016). Hines (1982) estimó para una variedad de especies de crustáceos decápodos que el peso de la masa de los huevos suele ser de alrededor del 10% del peso de la hembra, ya que el espacio dentro del cefalotórax para la acumulación de vitelo en el ovario es limitado.

- Volumen del huevo

El volumen del huevo es una variable útil para evaluar el esfuerzo reproductivo de las hembras ya que la menor cantidad de vitelo acumulada en los oocitos podría devenir en un menor tamaño del embrión, lo cual posiblemente afecte el desempeño de las larvas y, por ende, a la próxima generación de individuos (Kuris, 1990; Moran y McAlister, 2009). Usualmente suelen medirse los huevos bajo lupa o microscopio para determinar los diámetros y aproximar al

volumen de una esfera o una elipse, dependiendo la forma del huevo (Steele y Steele, 1975; Wenner *et al*., 2017). Para realizar comparaciones es importante considerar que los huevos sean medidos en similares momentos del desarrollo embrionario ya que el tamaño del huevo aumenta a medida que éste avanza, tanto por el propio crecimiento embrionario como por la acumulación de agua (Stevens, 2006; González Pisani *et al*., 2013).

## 1.3 Moduladores de la reproducción en crustáceos decápodos

Los crustáceos decápodos son un grupo altamente diverso morfológica y fisiológicamente, que incluye alrededor de 15000 especies distribuidas en ambientes marinos, de agua dulce y terrestres alrededor del mundo (Martin y Davis, 2001; De Grave *et al*., 2009), cuya reproducción tiene numerosos moduladores.

Los más estudiados son la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de alimento, el fotoperiodo y la fluctuación del ciclo de mareas y del ciclo lunar (Kleppel y Burkart, 1995; Gelin *et al*., 2001; Ferrero *et al*., 2002; Matsuda *et al*., 2002; Anger, 2003; Nagaraju, 2011; Baliña *et al*., 2018; Johnston y Yeoh, 2021). En aquellas especies que tienen una amplia distribución latitudinal, la combinación de factores modulan fuertemente la extensión de la temporada reproductiva (Oliphant *et al*., 2013; Thatje y Hall, 2016). Por lo tanto, a latitudes más altas, se ha observado que algunas especies presentan cambios de reproducción anual a estacional (Bauer, 1992, Defeo y Cardoso 2002; Lester *et al*., 2007) o mayor edad/ tamaño en la madurez sexual (Defeo y Cardoso, 2002;

Brante *et al*., 2003), como consecuencia del estrés fisiológico que representa alejarse del centro de la distribución geográfica (Lester *et al*., 2007).

Las especies que habitan climas tropicales, donde el fotoperíodo y la temperatura son constantes en los meses del año, suelen presentar reproducción anual con varios eventos reproductivos durante el año, mientras que, hacia los polos, se observa una tendencia hacia la reproducción estacional, donde las temporadas reproductivas quedan acotadas a los meses de altas temperaturas y mayor fotoperíodo (Sastry *et al*., 1983; Clarke, 1987; Pinheiro y Fransozo, 2002; Bertini *et al*., 2004; Boa y García, 2015; Grassi *et al*., 2018).

Para una misma especie, se ha observado que el tamaño de los individuos aumenta con la latitud, es decir, que en el clima templado se registran animales de mayor tamaño (Bauer, 1992; Castilho *et al*., 2007). En crustáceos decápodos, esto repercute directamente en variables como la fecundidad, debido a la estrecha relación entre el ancho del caparazón de las hembras con la capacidad de portar huevos (Hines, 1982, 1988; Fox y Czesak, 2000). De esta manera, las poblaciones que habitan en latitudes más altas invierten energía en crecer y acumular reservas durante los meses previos a la temporada reproductiva y así, tener menos puestas, pero con mayor número de huevos cada una (Castilho *et al*., 2007; Wehrtmann *et al*., 2012).

En los crustáceos decápodos, que son ectotérmicos, la temperatura tiene un efecto importante en su crecimiento (Azra *et al*., 2020). El tamaño de las hembras es considerado uno de los factores que más modulan la calidad de la progenie (García Guerrero y Hendrickx, 2004; Birkeland y Dayton, 2005; Marshall y Keough, 2007; Bert *et al*. 2016; De Grande *et al*., 2021a). El concepto

de calidad de progenie se refiere a la “calidad del huevo” y la “calidad de la larva”. El primero se define como la capacidad de un huevo para ser fecundado y desarrollarse, mientras que el segundo se refiere a la condición fisiológica y el desempeño de las larvas (Holcomb *et al*., 2004).

A partir del estudio del tamaño en los crustáceos decápodos es posible establecer diferentes parámetros. La talla de madurez sexual y los patrones de crecimiento permiten determinar la estructura de las poblaciones y la esperanza de vida. Entonces, es posible relacionar el tamaño de la hembra y el ciclo reproductivo que están atravesando con la cantidad de reservas acumuladas, la madurez de la gónada y el momento del desove (Vaninni y Gherardi,1988; López Greco, 1997; Sampedro et al., 1999; Corgos y Freire, 2006).

Estas medidas también son útiles para la evaluación de la edad de la hembra, que impacta principalmente en las reservas energéticas de las hembras y, como consecuencia, en la calidad de las sucesivas puestas (Wouters *et al*., 1999; Wu *et al*., 2010; Jones *et al*., 2014). En particular, se puede observar cómo los huevos de las primeras puestas se presentan en mayor cantidad, volumen y calidad nutricional, lo cual favorece la supervivencia de las larvas (Tropea y López Greco, 2015; Teixeira *et al*., 2017). Sin embargo, existen algunos trabajos que contradicen esta tendencia ya que demuestran que las reservas pueden no agotarse (Palacios *et al*., 2000) y la calidad de los huevos y las larvas pueden aumentar a medida que las hembras tienen puestas sucesivas (Arcos *et al*., 2005; Marciano *et al*., 2018).

El alimento presente en el ambiente es la fuente de nutrientes y, por ende, de energía para los individuos de una población. Por lo tanto, la alimentación de

los parentales puede modelar las características de la descendencia (Sorensen *et al*., 2009; Nagaraju, 2011; Emerenciano *et al*., 2013). Los crustáceos decápodos, en general, presentan diversos hábitos alimenticios que involucran diferentes comunidades de animales, plantas, algas y bacterias, cuya presencia en el ambiente se encuentra sujeta a variados factores ambientales que fluctúan a lo largo del año (Fabiano y Danovaro, 1994; Cannicci *et al*., 2007; Josileen, 2011; Mao *et al*., 2016). Esta dinámica impacta en la calidad y en la cantidad de reservas que los decápodos pueden acumular (Yamaguchi, 2001; Sánchez Paz *et al*., 2006; Sarapio *et al*., 2017) y, por lo tanto, es un factor que tendrá influencia en la duración de la temporada reproductiva, el tiempo de interpuestas y el número de puestas, entre otras variables (Griffen y Norelli, 2015; Quintana *et al*., 2015; Long *et al*., 2017).

Debido a que las proteínas y los lípidos conforman el sustento energético para los embriones, la calidad y cantidad de estos nutrientes repercutirá en su desarrollo (Rani y Subramoniam, 1997; Mak *et al*., 2005; Rodríguez González *et al*., 2006). Se ha observado que en las hembras que presentan sus hepatopáncreas empobrecidos energéticamente, los ovarios son de menor tamaño ya que disminuye la cantidad de vitelo en los oocitos (Vazquez Boucard *et al*., 2004). Generalmente, esto se observa al final de la temporada reproductiva, como consecuencia de agotamiento materno y/o como consecuencia de un déficit en la alimentación (Palacios *et al*., 2000; Arcos *et al*., 2003; Vazquez Boucard *et al*., 2004; Tropea y López Greco, 2015; Teixeira *et al*., 2017).

## 1.4 Cangrejo violinista

La familia Ocypodidae es un taxón de cangrejos braquiuros, entre los cuales se encuentran los cangrejos violinistas, que presentan más de 100 especies descritas y que habitan en zonas intermareales de estuarios tropicales, subtropicales y templados de todo el mundo (Hodgson, 1987; Mouton y Felder, 1995; Naderloo *et al*., 2010; Rosenberg, 2013; Crane, 2015; Shih *et al*., 2016).

Los cangrejos violinistas llevan este nombre coloquial debido a su dimorfismo sexual, ya que los machos no solo presentan mayor ancho de caparazón que las hembras, sino que también poseen un quelípedo hipertrofiado (Figura 1.1 A), que utilizan en combate o para cortejar a las hembras mediante un movimiento ondulatorio del quelípedo hipertrofiado conocido como *waving* (Hartnoll, 1969; Christy y Salmon, 1984). Por otro lado, las hembras son más pequeñas y presentan dos quelípedos de similar tamaño que utilizan principalmente para alimentarse (Figura 1.1 B) (Christy y Salmon, 1984).

Figura 1.1: Cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis.* (A) Ejemplar macho dónde puede apreciarse el quelípedo de mayor tamaño y (B) Ejemplar hembra con ambos quelípedos de similar tamaño. Autor de las fotografías: Álvaro Pérez Tort para ecoregistros.org.

Los cangrejos violinistas construyen cuevas de diferentes formas y tamaños, que utilizan como refugio de depredadores, para ocultarse durante la marea alta y también durante el apareamiento (Ribeiro *et al*., 2005; 2016; Zhu *et al*., 2012). En algunas especies, los machos y hembras se aparean en las cuevas y las hembras ovígeras pueden, o no, permanecer en éstas durante el tiempo de incubación (Christy y Salmon, 1984; Ribeiro *et al*., 2010; Crane, 2015). Luego de la eclosión, las larvas atraviesan un periodo en el mar y retornan como megalopas que se asientan en el sustrato, donde comienzan a alimentarse y crecer (Hartnoll, 1969; Rieger, 1996).

En general, los cangrejos violinistas tienen hábito detritívoro, llevan porciones de sedimento a la boca donde setas especializadas separan los detritos, bacterias, algas y otros organismos infaunales de las partículas de sedimento. El alimento es ingerido y las partículas de sedimento no deseadas son devueltas al ambiente en forma de pellets alimenticios (Robertson y Newell, 1982a, b; Colpo y Negreiros Fransozo, 2013; Di Virgilio y Ribeiro, 2013). La mayor actividad de forrajeo ocurre durante la marea baja diurna que es cuando los cangrejos se encuentran más activos (De La Iglesia *et al*., 1994; Ribeiro e Iribarne, 2011). Debido al movimiento que producen en el substrato donde habitan, ya sea por la confección de cuevas o por la generación de pellets alimenticios y fecales, los cangrejos violinistas son considerados “ingenieros de los ecosistemas” y, por lo tanto, son fundamentales para el funcionamiento del ecosistema (Botto e Iribarne, 2000; George *et al*., 2001; Giblock y Crain, 2013). Además, se los considera indicadores de cambio climático ya que se ha observado el desplazamiento de algunas especies a mayores latitudes como consecuencia del aumento de la temperatura (Johnson, 2014; De Grande *et al*.,

2021b; Jimenez *et* al., 2022) y la transformación del hábitat (Sanford *et al*., 2006; Crane, 2015; Vermeiren y Sheaves, 2015).

## 1.5 *Leptuca uruguayensis*

*Leptuca uruguayensis* (Nobili, 1901) es un cangrejo violinista cuya distribución tiene como límite norte el estado de Río de Janeiro (22 ° S) en Brasil y, como límite sur, la costa atlántica de Buenos Aires (36 ° S) en Argentina (Figura 1.2), lo cual la define como la especie de cangrejo violinista con la distribución más austral registrada (Crane, 2015).

La costa atlántica bonaerense es una región caracterizada por una mezcla de aguas frías de la corriente de Malvinas y aguas más cálidas de la corriente de Brasil, que tiende a incluir especies más tolerantes a la variación de temperatura (Boschi, 2000). En particular, la Bahía Samborombón representa uno de los humedales más importantes de la Provincia de Buenos Aires y fue declarada Sitio Ramsar en 1997 (rsis.ramsar.org). La Bahía Samborombón se extiende desde Punta Piedras (35°30′ S, 56°45′ O) hasta Cabo San Antonio (36°22′ S, 57°23′ O) y está formada por sedimentos provenientes de los ríos Uruguay y Paraná, generando extensas llanuras costeras y marismas (Violante *et al*., 2001), que son bañadas por las aguas salobres del estuario del Río de la Plata (Boschi, 1988).

Si bien la población de *L. uruguayensis* establecida en la Bahía de Samborombón se considera la última población estable y principal suministro genético de las demás poblaciones que se encuentran hacia el sur de la provincia de Buenos Aires (Bogazzi *et al*., 2001; Laurenzano *et al*., 2012), es posible

encontrar poblaciones de *L. uruguayensis* en Mar Chiquita (Spivak *et al*., 1991), Quequén (Boschi *et al*., 1992) y Bahía Blanca (Truchet *et al*., 2019).

Figura 1.2: Distribución geográfica de *Leptuca uruguayensis*. El límite norte de la distribución geográfica de *L. uruguayensis* es el estado de Río de Janeiro, Brasil, donde las hembras se reproducen durante todo el año (Costa *et al*., 2006), mientras que el límite sur es la provincia de Buenos Aires, Argentina, donde la mayoría de las hembras se reproducen durante los meses más cálidos (noviembre a febrero). El área de estudio fue la localidad de General Lavalle, en la Bahía de Samborombón.

Se ha observado que en Brasil, al norte de la distribución geográfica, las hembras tienen puestas en todos los meses del año (Costa *et al*., 2006), mientras que en el sur, Colpo y López Greco (2017, 2018) determinaron que la temporada reproductiva de *L. uruguayensis* comienza en el mes de noviembre y se extiende hasta febrero, distinguible por una alta proporción de hembras ovígeras en la población. Estos meses corresponden a la primavera y el verano en el hemisferio sur y se caracterizan por temperaturas máximas promedio de 25,7 °C, temperaturas mínimas promedio de 14,6 °C, precipitaciones medias de 49 mm y fotoperíodo promedio de 13,5 h de luz (weather-atlas.com). Debido a que las

hembras de *L. uruguayensis* permanecen en las cuevas mientras están ovigeras (Christy y Salmon, 1984), se considera que la capacidad de alimentarse se reduce durante el periodo de incubación de los huevos. A continuación, en febrero se observan hembras con ovarios menos desarrollados y en marzo y abril, las hembras se encuentran con ovarios no desarrollados y no es posible detectar ninguna hembra ovígera, por lo que se considera una etapa post reproductiva.

En los meses siguientes, correspondientes al otoño y al invierno, los cangrejos atraviesan un periodo de baja actividad hasta el mes de agosto donde comienzan a realizar actividades de forrajeo. En estos meses la temperatura máxima promedio es de 18,6 °C, la temperatura mínima de 10,2 °C, las precipitaciones medias de 39,2 mm y el fotoperíodo promedio de 10,8 h de luz (weather-atlas.com). A partir de este momento, es posible identificar un aumento de las reservas de lípidos y proteínas en el hepatopáncreas (Colpo y López Greco, 2017, 2018). En octubre, se comienzan a distinguir hembras con ovarios maduros, con lo cual se considera que se encuentran en una etapa pre-reproductiva de preparación para la siguiente temporada reproductiva (Colpo y López Greco, 2017, 2018).

Spivak *et al*. (1991) caracterizaron la estructura poblacional de *L. uruguayensis* en Mar Chiquita y Armendáriz y César (2006) en la Bahía de Samborombón. Estos trabajos determinaron que *L. uruguayensis* presenta una distribución bimodal de frecuencias de tallas durante la mayor parte del año que establece la presencia simultánea de dos o tres cohortes distinguibles a partir de su rango de tamaño. El rango de tamaños de las hembras grandes se caracteriza por hembras adultas que miden más de 12 mm de ancho máximo de caparazón

al comienzo de la temporada reproductiva y que ya no se encuentran en la población al final de la misma (Spivak *et al*., 1991). Luego, se distingue el rango de tamaños de hembras medianas que, en marzo, miden aproximadamente 9 mm, crecen lentamente durante el invierno y es posible encontrarlas ovígeras a partir de diciembre con un ancho de caparazón entre 10 y 12 mm (Spivak *et al*., 1991). El tercer rango de tamaños es el de las hembras chicas que comienzan la temporada reproductiva en diciembre midiendo menos del tamaño considerado para ser adultas (6,75 mm de ancho de caparazón; Hirose *et al*., 2013), pero continúan creciendo durante la misma temporada y es posible encontrarlas ovígeras en febrero, midiendo entre 7 y 10 mm de ancho de caparazón (Spivak *et al*., 1991). Las hembras adultas son sexualmente activas durante dos temporadas reproductivas y, por lo tanto, la esperanza de vida, incluida la etapa larvaria, es de 2 años (Spivak *et al*., 1991).

Si bien existen diversos trabajos donde se estudian variables reproductivas de las hembras de *L. uruguayensis* (Costa *et al*., 2006; Hirose *et al*., 2013), son pocos los que ahondan en cuestiones fisiológicas y ecológicas relacionadas con el desempeño reproductivo de esta especie. En consecuencia, la información disponible sobre este tema es escasa en toda su distribución latitudinal. Por otro lado, trabajos recientes han relacionado el aumento de la temperatura con el tamaño de la madurez sexual (De Grande *et al*., 2021a) y con la disminución en las reservas del hepatopáncreas (Vianna *et al*., 2020) de *L. uruguayensis*. También se ha reportado el desplazamiento de la especie hacia mayores latitudes (Truchet *et al*., 2019).

Por lo tanto, *L. uruguayensis* se torna un modelo ideal para evaluar el esfuerzo reproductivo y la estrategia de inversión energética en el sur de la

distribución geográfica. Estos resultados ampliarán los conocimientos acerca del esfuerzo reproductivo, de las estrategias reproductivas y de la estabilidad poblacional. La información generada por este estudio proporcionará una herramienta más para la predicción de las consecuencias del calentamiento global sobre los cangrejos violinistas.

## 1.6 Objetivo general y objetivos específicos

El objetivo general de este trabajo de tesis es estudiar las estrategias de inversión energética en reproducción que poseen las hembras de *L. uruguayensis* en poblaciones con reproducción estacional que se encuentran hacia el sur de su rango de distribución, donde presenta reproducción estacional. En este marco se plantean 3 objetivos específicos:

- Reconocer el **patrón reproductivo** de las hembras de *L. uruguayensis* en la población estudiada con el fin de comprender las estrategias de inversión energética.
- Evaluar si el **desempeño reproductivo** de las hembras de *L. uruguayensis* en una población de clima templado está modulado por el ciclo reproductivo que atraviesan las hembras o por los momentos de la temporada reproductiva.
- Evaluar la **dinámica energética y el desempeño reproductivo de hembras grandes** de *L. uruguayensis* para conocer cómo combinan las diferentes estrategias reproductivas para tener su primera y segunda puesta.

## 1.7 Organización de la tesis

La tesis está organizada en 5 capítulos. En el capítulo 1 se resumen brevemente los factores que modulan la reproducción en crustáceos decápodos, haciendo hincapié en los patrones de reproducción y las estrategias de inversión energética para reproducción. Asimismo, se describen las particularidades de la especie estudiada y se establecen las características que la convierten en un buen modelo para este estudio.

En el capítulo 2 se establece el patrón reproductivo que tienen las hembras de esta población. Se realizó una aproximación en campo y laboratorio con el fin de determinar el tiempo de incubación, el número de puestas por temporada reproductiva, el tiempo de interpuestas y estudiar los principales componentes bioquímicos en el hepatopáncreas y el ovario durante la temporada reproductiva.

En el capítulo 3 se evalúan dos factores que afectan el desempeño reproductivo de las hembras: el ciclo reproductivo que están atravesando (primera o segunda temporada reproductiva de sus vidas) y el momento de la temporada reproductiva (inicio, mediados o final). Para esto se tuvieron en cuenta rasgos reproductivos como la fecundidad, el rendimiento reproductivo y el volumen y composición bioquímica de los huevos.

En el capítulo 4 se estudian las hembras grandes de *L. uruguayensis* con el fin de relacionar el desempeño reproductivo con las dos estrategias de energía para la reproducción que estas hembras utilizan en una misma temporada reproductiva.

Por último, en el capítulo 5 se integran los resultados obtenidos en los capítulos anteriores en una discusión general. Finalmente se incluyen todas las referencias bibliográficas en el capítulo 6.

# Capítulo 2

## Estudio del patrón reproductivo de las hembras de *Leptuca uruguayensis*

Los resultados de este capítulo han sido parcialmente publicados como:

Marciano, A., López Greco, L.S., and Colpo, K.D., 2021. Reproductive patterns and energy management strategies of females of the fiddler crab *Leptuca uruguayensis* with short reproductive seasons. Canadian Journal of Zooloy. 99, 149–159.

## 2.1 Introducción

La reproducción es un proceso esencial en la vida de los organismos y, por lo tanto, debe llevarse a cabo con éxito para asegurar la continuidad de la especie (Bell, 1980; Salmon *et al*., 2001; Møller *et al*., 2010). Aunque las especies pueden tener diferentes estrategias reproductivas, identificar la temporada reproductiva y cuáles son los individuos de la población que se están reproduciendo contribuye a predecir la cantidad y calidad de la descendencia producida (Reid, 1987; Koivula *et al*., 2003; Harshman y Zera, 2007; Møller *et al*., 2010; Lv *et al*., 2020).

El momento y la duración de la temporada reproductiva se ven afectados principalmente por el fotoperiodo y la temperatura. En crustáceos, por ejemplo, a medida que aumenta la latitud, la temporada reproductiva suele restringirse a los meses de mayor temperatura, mientras que, en latitudes bajas, estos animales pueden reproducirse durante todo el año y tienden a tener más puestas por año (Clarke, 1987; Castilho *et al*., 2007; Lester *et al*., 2007; Wehrtmann *et al*., 2012; Faria *et al*., 2017; Johnston y Yeoh, 2021, entre otros).

En las hembras de los crustáceos decápodos, los gastos de la reproducción están relacionados principalmente con la vitelogénesis y el cuidado de los embriones (Fernández *et al*., 2000; Taylor y Leelapiyanart, 2001; Silva *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2011; Simpson *et al*., 2015; Bert *et al*., 2016), dos procesos en los que el hepatopáncreas juega un papel importante, ya que contiene las principales reservas de lípidos y glucógeno que abastecen las demandas energéticas y aportan al ovario los nutrientes esenciales que serán trasferidos a los embriones para su desarrollo (Subramoniam, 2011; Jimenez y Kinsey, 2015;

Wang *et al*., 2015; Colpo y López Greco, 2018; Vogt, 2019). Las proteínas, lípidos, carbohidratos y carotenoides son los componentes necesarios para la maduración del ovario ya que determinan la calidad de los huevos, lo que condiciona el éxito de las larvas (Holcomb *et al*., 2004). Son los componentes estructurales y sustrato para el metabolismo energético de los oocitos y los embriones (Gardner, 2001; García Guerrero *et al*., 2003; Rosa *et al*., 2005).

Otro punto importante en la inversión energética para la reproducción es *cómo* se gestiona esta energía. Se han propuesto, para diferentes artrópodos, aves, reptiles y mamíferos, dos estrategias principales denominadas *capital breeding strategy* e *income breeding strategy* (Drent y Daan, 1980; Jönsson, 1997; Warner *et al*., 2008; Wessels *et al*., 2010; Bert *et al*., 2016; Williams *et al*., 2017). Entre los diversos grupos de artrópodos en los que se ha estudiado este tema, como en el copépodo *Calanoides acutus* (Varpe *et al*., 2007) y en la mosca *Sarcophaga crassipalpis* (Wessels *et al*., 2010), los cangrejos braquiuros han sido considerados como animales que utilizan principalmente la *capital breeding strategy*, ya que cubren los “costos” de la reproducción mediante las reservas acumuladas en el hepatopáncreas (Ng *et al*., 2008; Zeng *et al*., 2014; Bert *et al*., 2016; Griffen, 2018). Sin embargo, algunas especies de braquiuros pueden presentar una estrategia mixta como *Scylla serrata* (Alava *et al*., 2007; Brockerhoff y McLay, 2011; Zeng *et al*., 2014) y *Aratus pisonii* (Carver *et al*., 2021). En este caso tienen puestas tempranas usando la *capital breeding strategy* y puestas tardías usando directamente los recursos del medio ambiente (sin previa acumulación), es decir, la *income breeding strategy*. Esto dependerá principalmente del estado fisiológico de las hembras y de las condiciones ambientales, ya que aquellas hembras capaces de combinar las estrategias y

aprovechar las ventajas de ambas podrían incrementar el rendimiento reproductivo de la población maximizando el uso de reservas acumuladas y la disponibilidad de alimento en el ambiente (Griffen *et al*., 2012; Zeng *et al*., 2014; Carver *et al*., 2021). Dado que para estas estrategias definidas originalmente en inglés no existe una traducción directa al idioma castellano, utilizaremos los nombres de “estrategia de capitalización” para la *capital breeding strategy,* ya que implica “acumular” previamente al período reproductivo la energía en el hepatopáncreas, *y* “estrategia de uso inmediato” para la *income breeding strategy,* ya que implica la utilización directa del alimento para el proceso reproductivo, sin acumulación previa en el hepatopáncreas.

El cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis* habita en los estuarios templados de Argentina, donde su temporada reproductiva se restringe a los cuatro meses más cálidos (Armendáriz y César, 2006; Ribeiro *et al*., 2016; Colpo y López Greco, 2017). En Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina), la esperanza de vida de *L. uruguayensis* se estimó en dos años (Spivak *et al*., 1991), por lo que los individuos probablemente experimentan dos temporadas reproductivas durante su vida. Si bien estos rasgos reproductivos son conocidos, existen otros aspectos que quedan sin estudiar o son inciertos, y esto dificulta la comprensión de las estrategias que utiliza la población para maximizar el uso de los recursos y asegurar una descendencia exitosa.

## 2.2 Objetivo e hipótesis

El objetivo de este capítulo fue reconocer el patrón reproductivo de las hembras de *L. uruguayensis* en una población de la Bahía de Samborombón con el fin de comprender las estrategias de inversión energética en especies con una ventana estrecha para la reproducción. Para este objetivo, se desarrolló un enfoque integrado a lo largo de la corta temporada reproductiva de este cangrejo violinista para analizar el tiempo de incubación, el patrón de puestas modulado por el tamaño de la hembra, el número de puestas por hembra y el contenido de reservas en el ovario y en el hepatopáncreas.

Considerando que esta población de *L. uruguayensis* tiene dos temporadas reproductivas cortas durante su vida, se plantearon las siguientes hipótesis:

- *Hipótesis 1:* La estrategia que utilizan las hembras para administrar la energía les permite tener más de dos puestas por temporada reproductiva.
- *Hipótesis 2:* Las puestas múltiples son posibles sólo si *L. uruguayensis* utiliza las estrategias reproductivas de capitalización y de uso inmediato.

## 2.3 Materiales y métodos

### 2.3.1 Área de estudio

El trabajo de campo se llevó a cabo en un área de arena fangosa de aproximadamente 3500 $m^2$ en la zona intermareal del canal Saladero (36° 25' 0,3" S - 56° 57'11" O), en la localidad de General Lavalle, Buenos Aires, Argentina. El área de estudio tiene unos 25 m de zona intermareal con una pendiente suave de 3 a 5°. En este estuario, las mareas son semilunares y semidiurnas, con una amplitud de aproximadamente 1 m en mareas sicigia (Acha *et al*., 2008). *Leptuca uruguayensis* habita la zona alta del intermareal, que se extiende de 8 a 10 m y que se descubre con cada marea baja, tanto de sicigia como de cuadratura. El trabajo de campo se realizó durante las mareas bajas en los días de marea de cuadratura.

### 2.3.2 Tiempo de incubación

El tiempo de incubación de *L. uruguayensis* se evaluó durante la temporada reproductiva 2017 - 2018. Para esto se colectaron en el área de muestreo 60 hembras adultas no ovígeras (ancho máximo de caparazón > 6,75 mm; Hirose *et al*., 2013) entre el 10 de noviembre de 2017 y el 1 de febrero de 2018. Se trasladaron al laboratorio en un recipiente adecuado y se dispusieron individualmente en recipientes de plástico (31 x 24 x 19 cm) con 10 cm de sedimento del ambiente para permitir que las hembras excaven (Figura 2.1 A). El sedimento se mantuvo húmedo con agua salina artificial mantenida a una salinidad entre 12 y 20‰. Los recipientes permanecieron a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y fotoperíodo de verano (14 h L: 10 h O) en el bioterio de Ciudad Universitaria, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Las hembras fueron controladas diariamente para registrar el día de la puesta (Figura 2.1 B), que se consideró como el primer día donde era posible identificar la masa de huevos color violáceo intenso en el abdomen de la hembra (Figura 2.1 C). Luego, las hembras eran revisadas diariamente y las puestas examinadas para evidenciar el avance del desarrollo embrionario (Figura 2.1 D) y detectar la eclosión de las larvas. El intervalo entre el día del desove y el día de eclosión de las larvas se consideró como el tiempo de incubación.

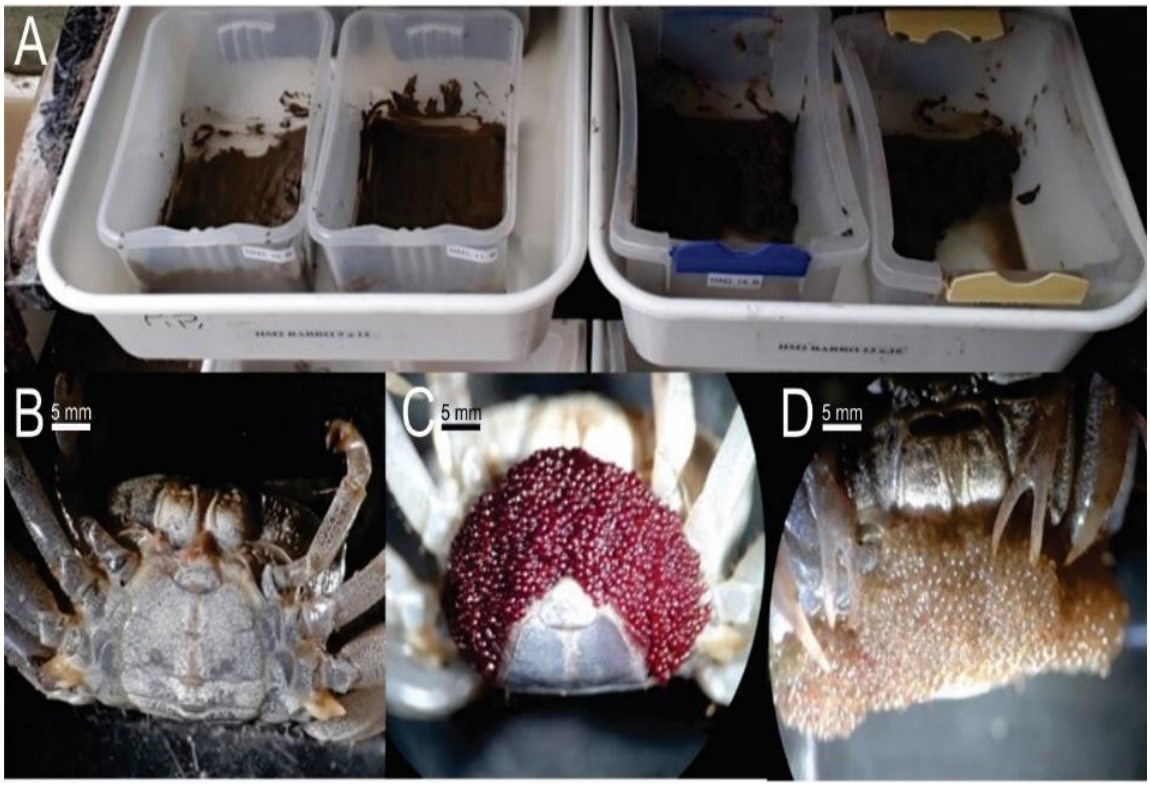


Figura 2.1: Determinación del tiempo de incubación para *Leptuca uruguayensis*. (A) Distribución de los recipientes con hembras y sedimento en el bioterio de Ciudad Universitaria. (B) Abdomen de una hembra sin huevos. (C) Abdomen de una hembra con puesta de huevos con embriones en estadio inicial del desarrollo. (D) Abdomen de una hembra con puesta de huevos con embriones en estadio avanzado del desarrollo.

### 2.3.3 Patrón de puestas

Los resultados del tiempo de incubación se utilizaron para definir el esquema de muestreo en el campo para reconocer el patrón de puestas de *L. uruguayensis*. Esto permitió establecer un intervalo de tiempo adecuado para realizar los muestreos en el campo y observar todos los posibles eventos de puestas de las hembras. El muestreo se realizó cada 14,7 ± 2,1 días desde el 18 de octubre de 2018 hasta el 27 de febrero de 2019, es decir, un total de nueve fechas de muestreo (Tabla 2.1). Sólo el muestreo del 17 de diciembre no se pudo realizar debido a las condiciones climáticas. En cada fecha de muestreo, dos personas entrenadas recolectaron hembras adultas ovígeras y no ovígeras al azar en el área de estudio durante 1 h.

Dado que las hembras de *L. uruguayensis* permanecen en las cuevas durante el período de incubación de los huevos (Ribeiro *et al*., 2016; Colpo y López Greco, 2017), se excavó a 40 cm de profundidad en el sedimento para muestrearlas. En el campo, el ancho máximo del caparazón (AC) de las hembras muestreadas se midió con un calibre (precisión 0,01 mm) y la proporción de hembras ovígeras se estimó a partir de la cantidad total de hembras adultas en la población. Además, a partir de su tamaño, se categorizó a las hembras adultas en: hembras chicas (< 10 mm AC), hembras medianas (10 - 12 mm AC) o hembras grandes (> 12 mm AC). En cada fecha de muestreo, se llevaron al laboratorio hembras adultas no ovígeras y se estimó la proporción de hembras ovígeras de cada rango de tamaño.

Tabla 2.1: Esquema de muestreo del cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis* para la temporada reproductiva 2018/2019 en la Bahía de Samborombón, estuario del Río de la Plata, Argentina.

| Muestreos | Fecha |
|---|---|
| 1er muestreo | 18 de octubre de 2018 |
| 2do muestreo | 2 de noviembre de 2018 |
| 3er muestreo | 16 de noviembre de 2018 |
| 4to muestreo | 30 de noviembre de 2018 |
| Muestreo no realizado | 17 de diciembre de 2018 |
| 5to muestreo | 28 de diciembre de 2018 |
| 6to muestreo | 14 de enero de 2019 |
| 7mo muestreo | 27 de enero de 2019 |
| 8vo muestreo | 13 de febrero de 2019 |
| 9no muestreo | 27 de febrero de 2019 |

### 2.3.4 Número de puestas por hembra

Para estimar el número de puestas por hembra, las hembras adultas de *L. uruguayensis* fueron confinadas en mesocosmos *in situ* y monitoreadas durante la temporada reproductiva.

Los mesocosmos fueron cestas plásticas de 54 x 29 x 35 cm con perforaciones de 5 mm en todos los lados para permitir el flujo de agua producido por los ciclos de mareas. En la primera fecha de muestreo (18 de octubre de 2018) se distribuyeron aleatoriamente ocho mesocosmos en la zona alta del intermareal, donde predomina *L. uruguayensis*. Los mesocosmos se rellenaron hasta 30 cm de profundidad con sedimento del ambiente y se enterraron en el sustrato (Figura 2.2 A).

En la segunda fecha de muestreo (2 de noviembre de 2018), se recolectaron, midieron e identificaron individualmente 55 hembras adultas sin huevos utilizando marcas plásticas de diferentes colores que fueron adheridas al caparazón (Figura 2.2 B). En esta fecha, sólo se encontraron hembras medianas y grandes en el campo, por lo tanto, el número de puestas se registró sólo para estos tamaños de hembras. En cada mesocosmos se agregaron siete u ocho hembras, así como también cinco machos maduros (ancho máximo de caparazón > 12 mm) para asegurar el apareamiento.

La densidad de cangrejos en los mesocosmos fue similar a la registrada en el campo, es decir, 70 cangrejos.$m^2$ (datos no publicados de K.D. Colpo). Cada mesocosmos se cubrió con un bastidor de madera recubierto por una malla plástica (2 $mm^2$) conformando una tapa para evitar que los cangrejos escaparan, pero permitiendo que el agua fluyera (Figura 2.2 C). En cada fecha de muestreo, se levantaron las tapas de los mesocosmos, se excavó el sedimento del interior y se revisó cuidadosamente en busca de las hembras. Se registró la identidad de las hembras recuperadas a partir de las marcas de colores, y su estado de ovígera o no ovígera. Con eso se pudo identificar cuántas puestas tuvo cada hembra a lo largo de la temporada reproductiva. Los cangrejos se mantuvieron en los mesocosmos durante todo el período de muestreos.

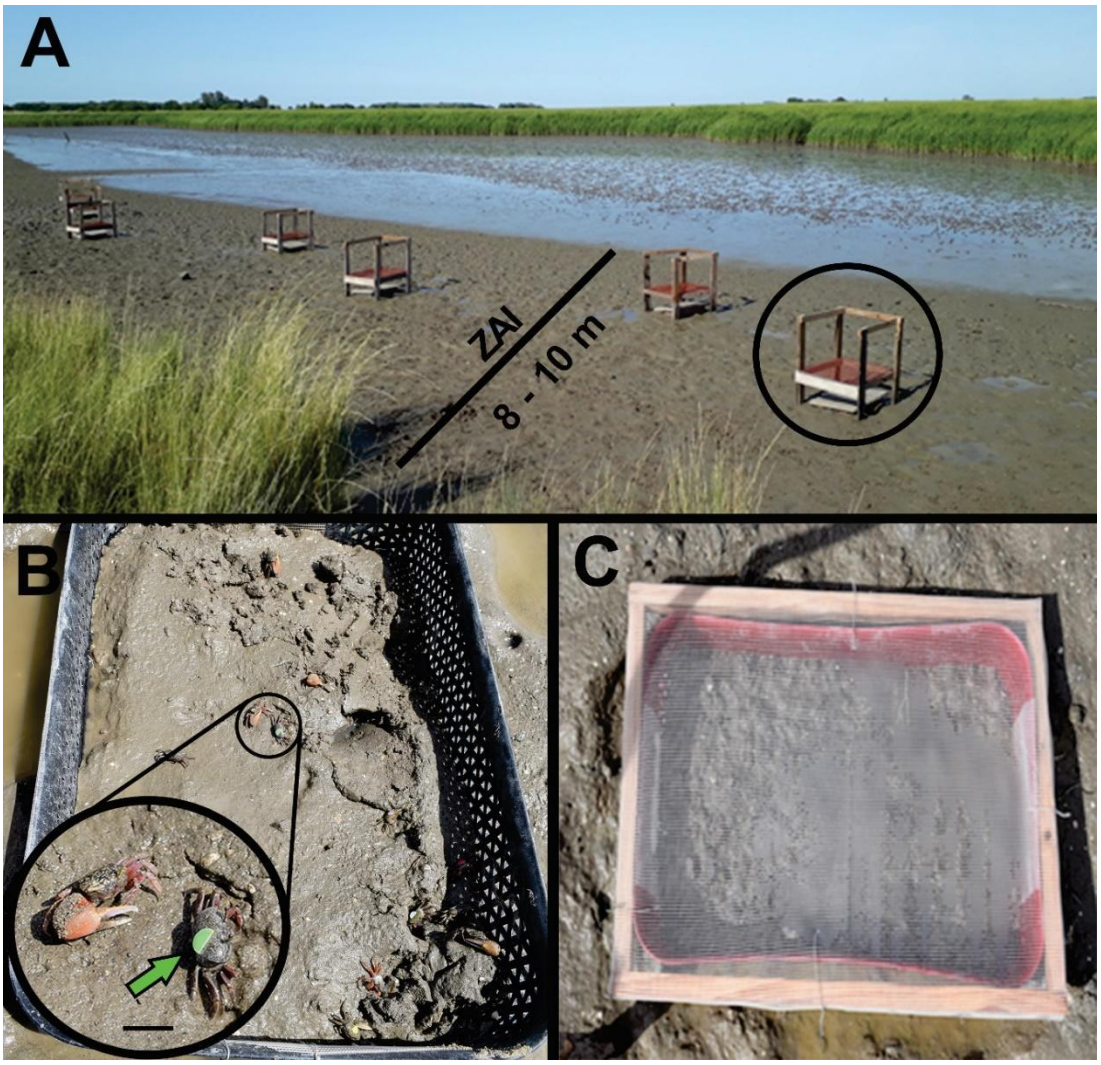


Figura 2.2: Área de estudio y mesocosmos utilizados para evaluar al cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis* en el canal Saladero, estuario del Río de la Plata, Argentina. (A) Vista general que muestra la extensión de la zona alta del intermareal (ZAI) habitada por *L. uruguayensis* y la disposición de algunos mesocosmos en el área experimental junto con un dispositivo de protección, señalado en la figura con un círculo. (B) Vista de un mesocosmo enterrado y lleno de sedimento del ambiente con los cangrejos violinistas identificados. En el detalle un macho y una hembra con marca plástica sobre el caparazón señalada con una flecha. Barra de escala = 10 mm. (C) Vista de un mesocosmo cubierto por una malla plástica (2 $mm^2$) sostenido por un marco de madera, después de la incorporación de los cangrejos.

### 2.3.5 Condición del ovario y hepatopáncreas

Las hembras adultas no ovígeras colectadas durante 1 h en cada fecha de muestreo fueron llevadas al laboratorio, sacrificadas después de ser anestesiadas en frío durante 15 min, y luego disecadas para determinar el índice gonadosomático en base húmeda (IGS = peso de la gónada húmeda / peso de la hembra húmeda) y el índice hepatosomático en base húmeda (IHS = peso del hepatopáncreas húmedo / peso de la hembra húmeda). La precisión de la balanza fue de 0,1 mg.

El desarrollo ovárico se categorizó según los valores de IGS, de la siguiente manera: los ovarios incipientes tenían un IGS menor a 4 con un color rosado; los ovarios en desarrollo tenían un IGS entre 8 y 4 con una coloración violácea tenue y los ovarios desarrollados tenían un IGS mayor a 8 y presentaban un color violáceo intenso (Figura 2.3).

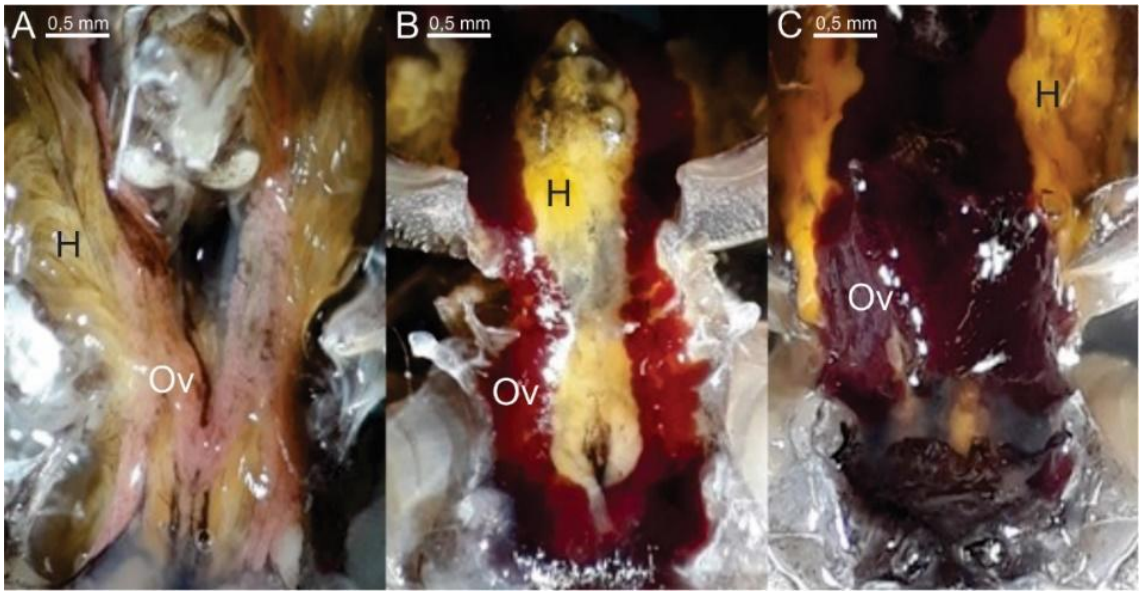


Figura 2.3: Vista dorsal de ovarios de *Leptuca uruguayensis* en diferentes estadios de desarrollo. (A) Ovario incipiente (IGS < 4). (B) Ovario en desarrollo (4 < IGS < 8). (C) Ovario desarrollado (IGS >8). H: hepatopáncreas, Ov: ovario.

Por otro lado, el contenido de nutrientes en el ovario y el hepatopáncreas (proteínas totales, lípidos totales y glucógeno) se determinó bioquímicamente desde la segunda hasta la novena fecha de muestreo. Las proteínas y los lípidos totales se determinaron en ovario y hepatopáncreas, mientras que la concentración de glucógeno se midió solo en el hepatopáncreas.

Para obtener la masa de tejido mínima para realizar los análisis bioquímicos, se combinaron los ovarios y el hepatopáncreas de cinco hembras con el mismo estadio de desarrollo ovárico. Cada uno de estos grupos se consideró una réplica (entre 8 y 15 réplicas por fecha de muestreo, dependiendo del número de hembras muestreadas en cada fecha). El ovario y el hepatopáncreas de las hembras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de realizar los análisis bioquímicos.

Para determinar la concentración de proteínas totales, las muestras de ovario y hepatopáncreas se homogeneizaron en 4: 1 volumen (µL): peso (mg) con buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), y luego se centrifugaron a 10.000 g durante 30 min en una centrífuga refrigerada (4 °C). Los sobrenadantes se diluyeron con agua destilada, como se indica a continuación: 1: 20 para el ovario y 1: 3 para el hepatopáncreas (volumen: volumen). Las proteínas totales se determinaron mediante el método de azul de Coomassie, en un espectrofotómetro Shimadzu UV1800 a 595 nm (Bradford, 1976). Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar (Sigma-Aldrich®). Los valores se expresaron como mg de proteínas totales/g de tejido. Para la determinación de lípidos totales, las muestras de ovario y hepatopáncreas se homogeneizaron en 20: 1 volumen (µL): peso (mg) de una mezcla de cloroformo y metanol (2: 1 volumen: volumen), luego se mezclaron y centrifugaron con NaCl al 0,9% para separar la fracción lipídica. Los

lípidos totales se determinaron mediante el método de sulfofosfovanillina de acuerdo con Folch *et al*. (1957) modificado por Frings *et al*. (1972) y medido con un espectrofotómetro a 530 nm. Se utilizó aceite de oliva extra-virgen (Nucete®) diluido con etanol absoluto para construir la curva estándar. Los valores se expresaron como mg de lípidos totales/g de tejido. Para la determinación de glucógeno, se digirieron muestras de hepatopáncreas hirviéndolas con solución alcalina (KOH 30%). Se utilizaron $SO_4Na_2$ saturado, alcohol absoluto y centrifugación para lograr la precipitación de glucógeno. El sedimento resultante se disolvió con agua destilada. El glucógeno se determinó siguiendo el método descrito por van Handel (1965) y se midió con un espectrofotómetro a 620 nm. Se usó hígado de conejo (Fluka®) para construir la curva estándar. Los valores se expresaron como mg de glucógeno/g de tejido.

### 2.3.6 Análisis estadísticos

Los tamaños de las hembras que tuvieron 0, 1 o 2 puestas en los mesocosmos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La proporción de hembras ovígeras entre el campo y los mesocosmos se comparó mediante un modelo lineal generalizado (GLM). Debido a que en los mesocosmos se encontraron sólo hembras medianas y grandes, tales comparaciones se realizaron con hembras de campo de los mismos rangos de tamaño. Se utilizaron dos factores fijos: ubicación (campo y mesocosmos) y muestreo (cada fecha de muestreo con datos para ambas ubicaciones). Se implementó la distribución binomial y "*logit*" como función de enlace (Zuur *et al*., 2010).

Las variables del ovario y del hepatopáncreas (IGS, IHS, proteínas totales, lípidos totales y contenido de glucógeno) se utilizaron en un escalamiento

multidimensional no métrico (nmMDS) para comparar las ocho fechas de muestreo (de la segunda a la novena fecha de muestreo) y detectar variaciones a lo largo de la temporada reproductiva. Además, se realizó un análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) para identificar las variables más importantes que generan los patrones de disimilitud observados entre los diferentes momentos de muestreo dentro de la temporada reproductiva. Para los análisis nmMDS y SIMPER, se utilizó el coeficiente de Bray-Curtis como medida de similitud (Clarke y Warwick, 1994; Gotelli y Ellison, 2004). Se realizó un ANOVA de una vía para comparar las variables de ovario y hepatopáncreas a lo largo de la temporada reproductiva. Los valores se expresaron como media ± desvío estándar (DE). Para el ANOVA, los datos fueron probados para normalidad y homocedasticidad con las pruebas de Shapiro-Willks y Levene, respectivamente. Se aplicó la prueba de Tukey cuando se encontraron diferencias significativas. Todas las pruebas se llevaron a cabo al 95% de nivel de significancia con el software R 4.0.3 (RStudio Team, 2015).

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Tiempo de incubación

De las 60 hembras evaluadas en el laboratorio, 15 quedaron ovígeras. De éstas, seis perdieron sus huevos en los primeros 10 días, mientras que, en las nueve hembras restantes, la puesta completó el desarrollo y las larvas eclosionaron. El tiempo promedio de incubación se estimó en 21 ± 1,8 días.

También se observó que la puesta de huevos y la eclosión de las larvas se encontraban sincronizadas con la fase lunar, como ya ha sido reportado para otros cangrejos (Christy y Stancyk, 1982; Zimmerman y Felder, 1991; Gove y

Paula, 2000). En este caso, observamos que el 73% de las hembras que quedaron ovígeras lo hicieron en luna cuarto menguante y el 83% de las eclosiones se produjeron en luna llena.

### 2.4.2 Patrón de puestas

Se recolectaron un total de 684 hembras de *L. uruguayensis* durante los nueve muestreos realizados. De ellos, 552 estaban no ovígeras y 132 estaban ovígeras. El tamaño medio y el desvío estándar para las hembras chicas fue de 8,3 ± 0,7 mm de AC, para las hembras medianas fue de 10,8 ± 0,5 mm de AC y para las hembras grandes fue de 12,7 ± 0,8 mm de AC.

En la primera fecha de muestreo (18 de octubre de 2018), no se encontraron hembras ovígeras en la población. Las primeras hembras ovígeras, que eran grandes y medianas, se encontraron en la segunda fecha de muestreo, a principios de noviembre (Figura 2.4). Esto confirma que se registró el inicio de la temporada reproductiva. En las primeras cuatro fechas de muestreo (del 18 de octubre de 2018 al 30 de noviembre de 2018), el porcentaje de hembras chicas no superó el 5%. En la quinta fecha de muestreo (28 de diciembre de 2018) se observaron hembras chicas en mayor proporción y, en este momento, representaron el 35% de las hembras adultas. En la sexta (14 de enero de 2019) y octava (13 de febrero de 2019) fechas de muestreo, se encontraron hembras chicas ovígeras (Figura 2.4). En la quinta (28 de diciembre de 2018), séptima (27 de enero de 2019) y novena (27 de febrero de 2019) fechas de muestreo, no se encontraron hembras ovígeras en la población (Figura 2.4).

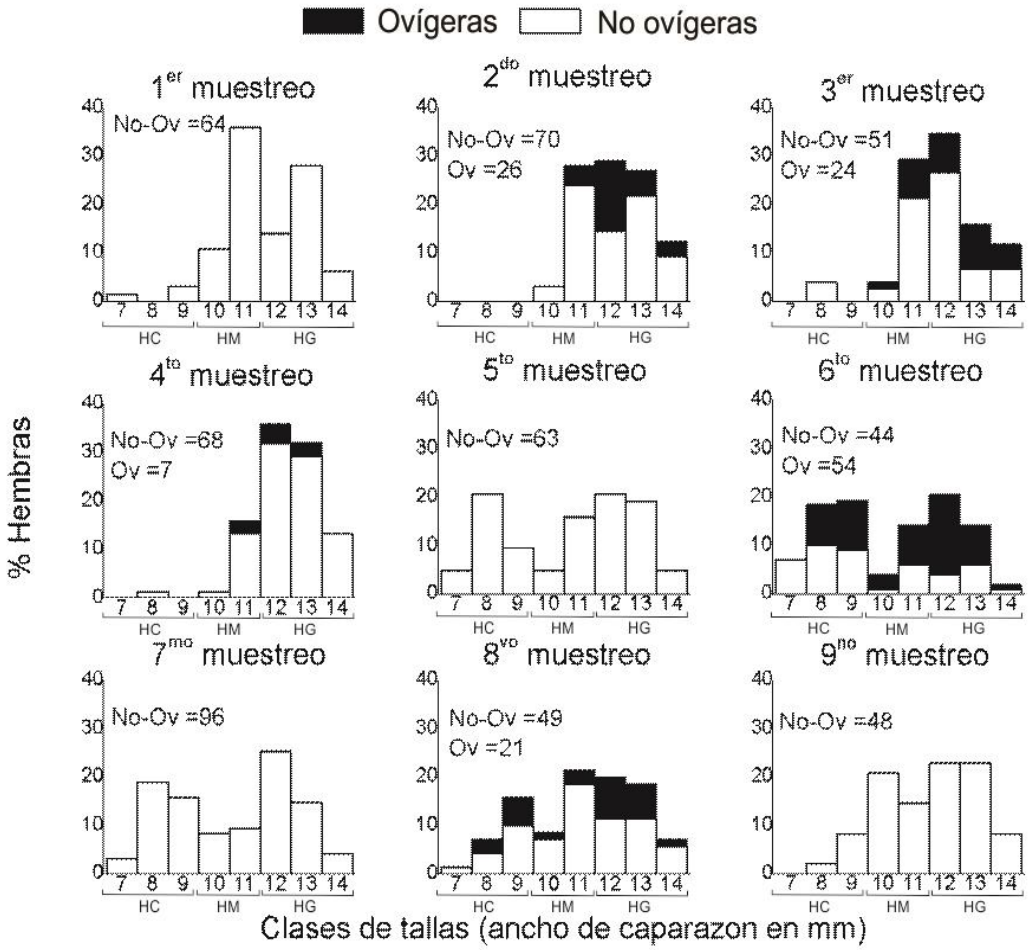


Figura 2.4: Patrón de puestas de *Leptuca uruguayensis*. Porcentaje de hembras ovígeras y no ovígeras de cada clase de talla (ancho del caparazón en mm), representadas para cada fecha de muestreo. No-Ov., número de hembras no ovígeras y Ov., número de hembras ovígeras para cada fecha de muestreo. Además, se indica el rango de tamaño que corresponde a las hembras chicas (HC), hembras medianas (HM) y hembras grandes (HG).

Se registraron tres eventos de puesta en esta temporada reproductiva (Figura 2.5). El primer evento ocurrió entre la segunda y cuarta fechas de muestreo (2 y 30 de noviembre), cuando el 29,2% de las hembras adultas estaban ovígeras, divididas en 6,4% hembras medianas y 22,8% hembras grandes. El segundo evento de puesta se observó en la sexta fecha de muestreo (14 de enero de 2019), cuando el 55,4% de las hembras muestreadas estaban ovígeras, divididas en 18,7% hembras chicas, 11,2% hembras medianas y 25,5% hembras grandes. Finalmente, el tercer evento de puesta se observó en

la octava fecha de muestreo (13 de febrero de 2019), cuando el 30% de la población de hembras estaba ovígera, dividida en 8,6% de hembras chicas, 4,3% de hembras medianas y 17,1% de hembras grandes (Figura 2.5).

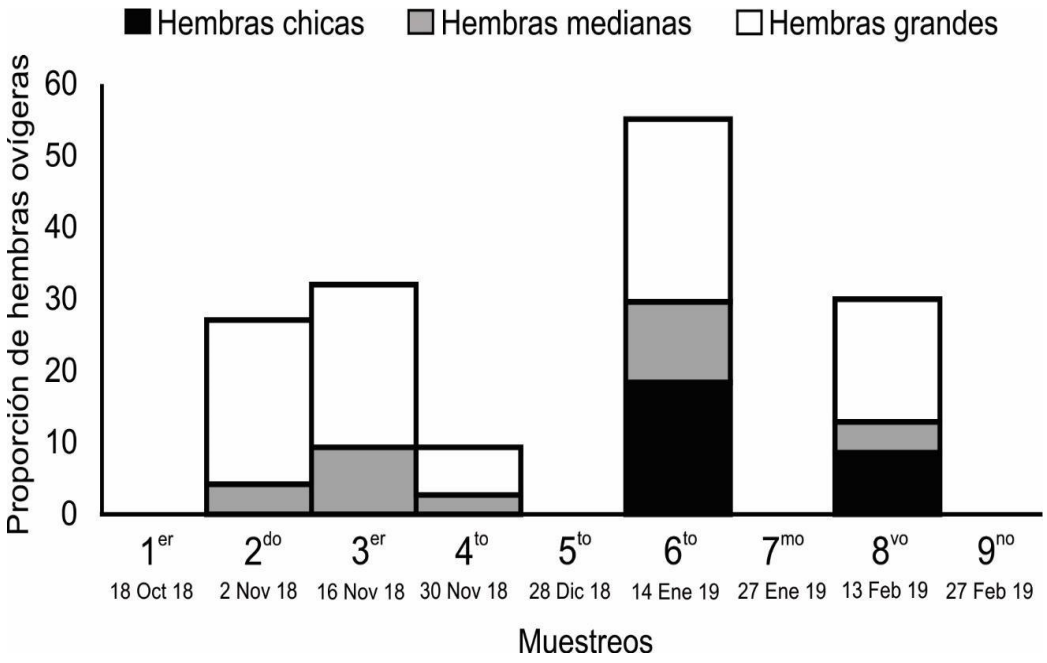


Figura 2.5: Proporción de hembras ovígeras de cada rango de tamaño de *Leptuca uruguayensis*, encontradas en el campo durante toda la temporada reproductiva. Hembras chicas (negro; < 10 mm AC), hembras medianas (gris; 10 - 12 mm AC) y hembras grandes (blanco; > 12 mm AC).

### 2.4.3 Número de puestas por hembra

Las 55 hembras presentes en los mesocosmos de tamaño mediano y grande nos permitieron estimar el número de puestas que una hembra puede tener durante la temporada reproductiva. Se encontró que el 20% de las hembras (n= 11) nunca tuvieron puestas, el 31% (n= 17) tuvo solo una puesta y el 22% (n= 12) tuvo dos puestas durante la temporada reproductiva (Tabla 2.2). Además, 15 hembras (27%) murieron o se perdieron antes de tener una puesta.

Las hembras que tuvieron dos puestas fueron más grandes que las que tuvieron una o ninguna puesta (resultado ANOVA de una vía, $F_{2;37} = 10,6$; $p < 0,001$) (Tabla 2.2). Para las hembras que tuvieron dos puestas, el tiempo promedio entre puestas consecutivas fue de 58 ± 11 días. En la mitad de la temporada reproductiva, se registraron ocho hembras que tuvieron una puesta y mudaron en los mesocosmos (es decir, se encontraron exuvias etiquetadas de hembras que estaban ovígeras en fechas de muestreo anteriores). Estas hembras no volvieron a tener una puesta durante la temporada reproductiva y la mayoría eran hembras medianas (AC medio 11,1 ± 1,06 mm). Este evento de muda fue corroborado también por la observación de algunas hembras con caparazones blandos en el campo fuera de los mesocosmos.

Tabla 2.2: Número y tamaño promedio de hembras de *Leptuca uruguayensis* en los mesocosmos que tuvieron 0, 1 o 2 puestas y muestreo en que ocurrieron durante la temporada reproductiva. Los valores (promedio ± DE) con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

| | | Muestreo* | 3er | 4to | 5to | 6to | 7mo | 8vo | 9no |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Número de puestas por hembra | AC (mm) promedio ± DE | N hembras | | | | | | | |
| 0 | 11,4 ± 1,09[a] | 11 | | | | | | | |
| 1 | 11,6 ± 1,03[a] | 6 | x | | | | | | |
| | | 4 | | | x | | | | |
| | | 7 | | | | x | | | |
| 2 | 13 ± 0,74[b] | 8 | x | | | x | | | |
| | | 2 | | x | | x | | | |
| | | 1 | | | x | | | x | |
| | | 1 | x | | | | | x | |

*El número total de hembras en los mesocosmos en cada fecha de muestreo fueron: 3ra= 55; 4ta= 55; 5ta= 41; 6ta= 40; 7ma= 23; 8va= 10; 9na= 7.

Los eventos de puesta registrados para hembras grandes y medianas en el campo y los mesocosmos fueron sincrónicos (Figura 2.6). El análisis de GLM no mostró diferencias entre la proporción de hembras ovígeras registradas en campo y las registradas en los mesocosmos (resultado LR Chiq $_{(1)}$ = 1,9; p = 0,168), lo que indica que el confinamiento de las hembras en los mesocosmos no afectó su desempeño reproductivo (Figura 2.6). El análisis de GLM mostró diferencias en la proporción de hembras ovígeras entre las fechas de muestreo (resultado LR Chiq $_{(6)}$ = 116,5; p < 0,001), corroborando la presencia de tres eventos de puestas durante la temporada reproductiva (Figura 2.6).

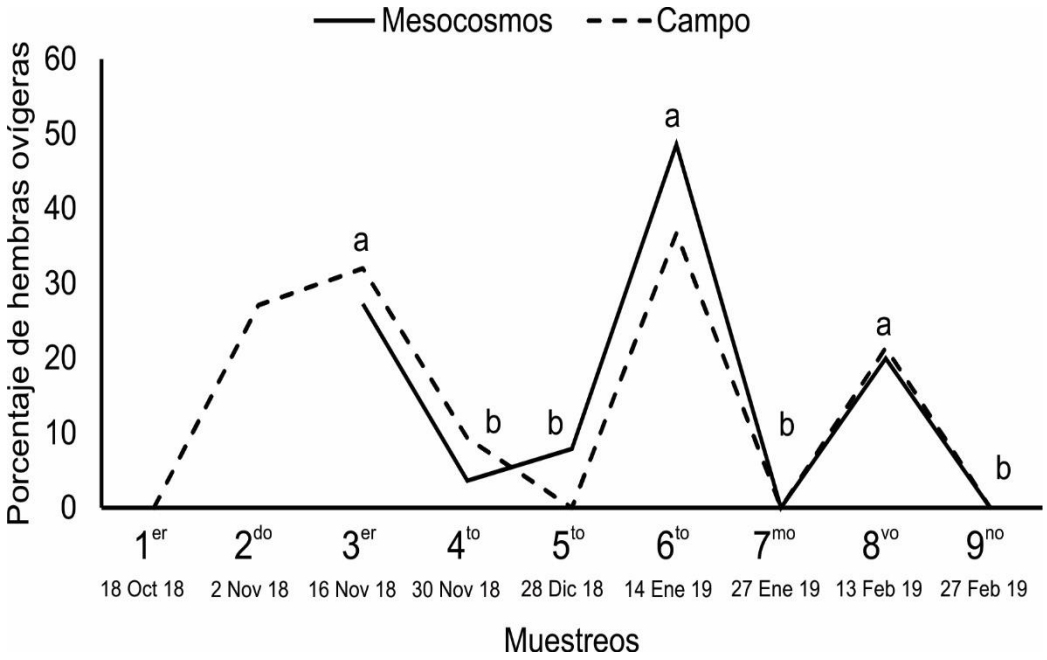


Figura 2.6: Porcentaje de hembras ovígeras grandes y medianas de *Leptuca uruguayensis* encontradas en el campo (línea de puntos) y en los mesocosmos (línea completa) para cada fecha de muestreo. No se encontraron diferencias en la proporción de hembras ovígeras entre campo y mesocosmos (p > 0,05). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los días de muestreo (p < 0,05).

### 2.4.4 Condición del ovario y del hepatopáncreas

Los análisis de nmMDS de la condición del ovario y del hepatopáncreas agruparon las fechas de muestreo en tres grupos con una similitud del 95% (Figura 2.7). El primer grupo incluyó la segunda, tercera y cuarta fechas de muestreo, que correspondieron al inicio de la temporada reproductiva (2 de noviembre, 16 de noviembre y 30 de noviembre de 2018). El segundo grupo incluyó la quinta y sexta fechas de muestreo, que correspondieron a mediados de la temporada reproductiva (28 de diciembre de 2018 y 14 de enero de 2019). Finalmente, el tercer grupo incluyó las fechas de muestreo séptima, octava y novena, que correspondieron al final de la temporada reproductiva (27 de enero, 13 de febrero y 27 de febrero de 2019) (Figura 2.7). El análisis SIMPER mostró que las principales variables que explicaron la disimilitud entre los tres momentos dentro de la temporada reproductiva fueron los lípidos totales, el contenido de glucógeno del hepatopáncreas y el IGS. El contenido de lípidos totales y glucógeno en el hepatopáncreas contribuyeron con el 62% de la disimilitud entre inicio y el mediados de la temporada reproductiva, mientras que el IGS y el contenido de lípidos totales en el hepatopáncreas contribuyeron con el 54% de la disimilitud entre el inicio y el final de la temporada reproductiva. El IGS y el contenido de glucógeno en el hepatopáncreas contribuyeron con el 52% de la disimilitud entre mediados y final de la temporada reproductiva (Tabla 2.3).

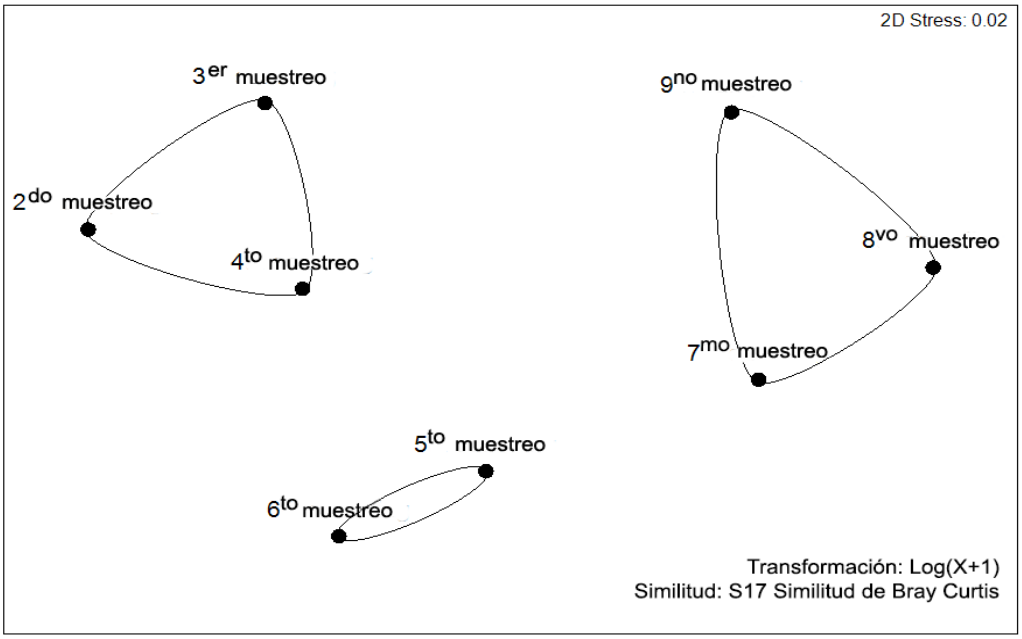


Figura 2.7: Escalamiento multidimensional no métrico (nMMDS) basado en variables del ovario y del hepatopáncreas de *Leptuca uruguayensis*. Se determinaron tres grupos con un 95% de similitud (coeficiente de Bray-Curtis). El primer grupo agrupó las tres primeras fechas de muestreo (inicio de la temporada reproductiva). El segundo grupo vinculó la quinta y sexta fecha de muestreo (mediados de la temporada reproductiva). El tercer grupo incluyó las últimas fechas de muestreo (final de la temporada reproductiva).

Tabla 2.3: Resultados del análisis SIMPER que indican la contribución de las variables del ovario y el hepatopáncreas que explican más del 50% de disimilitud entre los tres momentos de la corta temporada reproductiva de *Leptuca uruguayensis*.

| Momentos de la temporada reproductiva | Variables | Contribución de las variables (%) |
|---|---|---|
| Inicio y mediados | Glucógeno en el hepatopáncreas | 36,2 |
| | Lípidos totales en el hepatopáncreas | 26,2 |
| | | % acumulado = 62,4 |
| Inicio y final | IGS | 34,0 |
| | Lípidos totales en el hepatopáncreas | 19,9 |
| | | % acumulado = 53,9 |
| Mediados y final | IGS | 35,0 |
| | Glucógeno en el hepatopáncreas | 17,0 |
| | | % acumulado = 52,0 |

Entendiendo que las etapas inicio, mediados y fin de la temporada reproductiva se caracterizan por diferentes condiciones ambientales, se integraron también datos ambientales. A partir de los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) con su sistema de información y gestión agrometeorológica (siga.inta.gob.ar) y de los proporcionados por *Weather Atlas* (www.weather-atlas.com), se pudo caracterizar el momento previo y posterior a la temporada reproductiva 2018 - 2019, así como también el inicio, mediados y final a partir de diferentes variables climáticas registradas en zonas aledañas al área de muestreo (Tabla 2.4). Es posible observar cómo aumentan las temperaturas máximas y mínimas a medida que avanza la temporada reproductiva, así como también se observa que hay menores precipitaciones hacia mediados de la temporada y que las horas de luz variaron entre 14,5 y 12,3 h.

El IGS disminuyó 37,1% desde el inicio hasta mediados de la temporada reproductiva y 79,8% hacia el final de la misma (Tabla 2.5). Al inicio de la temporada reproductiva, la mayoría de las hembras presentaban ovarios desarrollados (63,2%), mientras que a mediados, las proporciones de hembras con ovarios desarrollados, en desarrollo e incipientes fueron similares. Finalmente, al final de la temporada reproductiva, la mayoría de las hembras (85,3%) tenían ovarios incipientes (Tabla 2.5).

El contenido de proteínas totales en los ovarios fue 37,8% más alto al inicio que en el final de la temporada reproductiva, mientras que el contenido lípidos totales de los ovarios no varió durante la temporada reproductiva (Tabla 2.5). El IHS disminuyó un 13,2% entre inicio y mediados de la temporada reproductiva y luego aumentó un 42,4% en el final de ésta. El contenido de

proteínas totales del hepatopáncreas no mostró diferencias a lo largo de la temporada reproductiva, mientras que los lípidos totales disminuyeron en un 34,6% desde el inicio hasta el final de la temporada reproductiva. El contenido de glucógeno del hepatopáncreas disminuyó 59,4% a mediados de la temporada reproductiva, y aumentó al final de la misma (Tabla 2.5).

Tabla 2.4: Valores promedios de algunas variables climáticas mensuales reportadas para la región sur de la Bahía de Samborombón y zonas aledañas en 2018 - 2019 que permiten caracterizar la temporada reproductiva de *Leptuca uruguayensis* y los momentos previos y posterior. TR: temporada reproductiva.

| Variables climáticas mensuales | Pre TR | Inicio TR | Mediados TR | | Final TR | Post TR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Octubre | Noviembre | Diciembre | Enero | Febrero | Marzo |
| Temperatura Máxima (°C) | 21,4 | 24,7 | 28 | 29 | 29,7 | 26 |
| Temperatura Mínima (°C) | 9,7 | 12,9 | 12 | 16,3 | 14,7 | 11,3 |
| Precipitaciones (mm) | 69 | 67 | 51 | 30 | 43 | 39 |
| Horas de luz (h) | 13 | 14 | 14,5 | 14,2 | 13,3 | 12,3 |

Tabla 2.5: Comparación de las variables del ovario y del hepatopáncreas de *Leptuca uruguayensis* entre el inicio, mediados y final de la temporada reproductiva. IGS = índice gonadosomático. Ovario desarrollado (IGS ≥ 8), ovario en desarrollo (8 > IGS ≥ 4) y ovario con desarrollo incipiente (IGS < 4). IHS = índice hepatosomático. Se muestran los resultados para el ANOVA de una vía. El N indicado para proteínas totales, lípidos totales y glucógeno corresponden a muestrasde cinco hembras. Los valores (media ± DE) con letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

| | Variables | Inicio | Mediados | Final | ANOVA | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | gl | F | p | N |
| Ovario | IGS | 8,9±4,2[a] | 5,6±4,6[b] | 1,8±2,8[c] | 2 | 66,3 | <0,001 | 459 |
| | %Desarrollado | 63,2 | 27,1 | 7,9 | - | - | - | - |
| | %En desarrollo | 16,8 | 33,6 | 6,8 | - | - | - | - |
| | %Desarrollo incipiente | 20 | 39,3 | 85,3 | - | - | - | - |
| | Proteínas totales (mg/g Tejido) | 108,3±49[a] | 98,2±30,6[ab] | 67,4±27,9[b] | 2 | 4,7 | 0,014 | 49 |
| | Lípidos totales (mg/g Teijdo) | 43,3±17,1[a] | 39,9±10,2[a] | 42±11,6[a] | 2 | 0,1 | 0,868 | 33 |
| Hepatopáncreas | IHS | 3,8±1,3[b] | 3,3±1,5[c] | 4,7±1,9[a] | 2 | 26,9 | <0,001 | 428 |
| | Proteínas totales (mg/g Tejido) | 19,5±7,8[a] | 20,4±5,6[a] | 16,83±6,1[a] | 2 | 0,9 | 0,401 | 45 |
| | Lípidos totales (mg/g Tejido) | 55,5±15,5[a] | 36,4±17,8[ab] | 36,3±17,4[b] | 2 | 5 | 0,016 | 25 |
| | Glucógeno (mg/g Tejido) | 3,2±1,9[a] | 1,3±0,6[b] | 2,3±1,4[ab] | 2 | 8,4 | <0,001 | 50 |

## 2.5 Discusión

El patrón reproductivo identificado para *L. uruguayensis* nos permite proponer que las estrategias de manejo de energía para la reproducción de esta población difieren para hembras de distintos tamaños.

Durante la corta temporada reproductiva de esta especie en la pobación más grande y estable al sur de su distribución geográfica, se registraron tres eventos de puesta a nivel poblacional, en los que las hembras grandes contribuyeron de manera porcentualmente más importante. Sin embargo, contrariamente a nuestra predicción, las hembras no tuvieron múltiples puestas durante la temporada reproductiva. La mayoría de las hembras tuvieron una puesta, y sólo algunas de las hembras grandes tuvieron dos puestas en un intervalo de aproximadamente dos meses. Estos resultados sugieren que las dos puestas en la corta temporada reproductiva de esta especie fueron posibles debido a la combinación de las estrategias reproductivas de capitalización y de uso inmediato.

A partir de la observación del apareamiento dentro de las cuevas en otro sitio de la bahía de Samborombón, Ribeiro *et al*. (2016) sugirieron que *L. uruguayensis* podría tener cinco o seis puestas por temporada reproductiva. Considerando que la temporada reproductiva se estimó en aproximadamente 120 días y el período de incubación en 21 días, sería posible alcanzar seis puestas por hembra si las hembras tuvieran una nueva puesta inmediatamente después de la eclosión de las larvas. Sin embargo, todas las hembras ovígeras disecadas, con huevos en diferentes etapas de desarrollo embrionario, tenían un ovario en desarrollo incipiente (observaciones de K.D. Colpo y A. Marciano), lo

que sugiere que el ovario no está maduro y listo para una puesta inminente después de la eclosión de las larvas.

Dado que *L. uruguayensis*, en estuarios de zonas templadas, experimenta dos temporadas reproductivas a lo largo de su vida (Spivak *et al*., 1991), los resultados sugieren que las hembras no tienen más de tres puestas durante su vida: una puesta en su primera temporada reproductiva y un máximo de dos puestas en la segunda. Este hallazgo evidencia los altos costos de reproducción que tienen las hembras en una corta temporada reproductiva.

En este capítulo pudimos evidenciar que la mayoría de las larvas eclosionaron durante el periodo de luna llena. Esto se relaciona con el hecho de que durante esta fase lunar se registró en la Bahía de Samborombón un máximo de marea alta correspondiente a los 1,84 m según el Servicio de Hidrografía Naval, lo cual favorecería la exportación de las larvas al mar, que es donde completan su desarrollo planctónico (Zimmerman y Felder, 1991; Morgan y Christy, 1995; Morgan, 2020). Este fenómeno sugiere que, en primera instancia, las cópulas estarían sincronizadas con la fase lunar de tal modo que luego, la eclosión de las larvas pueda coincidir con el máximo nivel de la marea que las exporta hacia el océano (Hyatt, 1948; Naylor, 2001). A su vez, implica un tiempo de incubación de tres semanas aproximadamente, como se ha evidenciado en este estudio. Similares resultados han sido registrados para el cangrejo *Neohelice granulata* (López Greco, 1997), que cohabita el intermareal de la Bahía de Samborombón con *L. uruguayensis*, así como también para *Plagusia dentipes* (Tsuchida y Watanabe, 1997) y *Hemigrapsus sanguineus* (McDermott, 1998) de otras poblaciones.

El IGS, que suele utilizarse como indicador del estado reproductivo de las poblaciones (Sastry *et al*., 1983; Tsuchida y Watanabe, 1997; Janz *et al*., 2001; Hasek y Felder, 2005; Shafi, 2012; Parker *et al*., 2018, entre otros), mostró valores máximos para *L. uruguayensis* al inicio de la temporada reproductiva, lo que se relacionó con una gran cantidad de reservas en el ovario y con una gran proporción de ovarios desarrollados. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos en varias otras especies con temporadas reproductivas cortas en ambientes templados, que alcanzan el valor máximo de IGS y la mayor cantidad de reservas en el ovario justo antes del inicio de la temporada reproductiva (Kyomo, 1988; López Greco, 1997, López Greco y Rodríguez, 1999; Yamaguchi, 2001; Aristizabal, 2007; Pérez *et al*., 2010; Naderi *et al*., 2018 entre otros)

Estudios previos sobre esta población de *L. uruguayensis* mostraron que, a fines del invierno (antes del inicio de la vitelogénesis), el hepatopáncreas de las hembras adultas alcanza valores máximos de IHS (8,3 ± 1,4) y contenido de glucógeno (14,8 ± 4,4 mg/g de tejido), lo que indica un alto nivel de energía almacenada (Colpo y López Greco, 2017, 2018). Durante la primavera, cuando comienza la vitelogénesis, estos parámetros disminuyen y alcanzan valores similares a los que aquí se encuentran al inicio de la temporada reproductiva (IHS = 3,8 ± 1,3 y contenido de glucógeno = 3,2 ± 1,9 mg/g de tejido). Estos resultados indicarían que los requerimientos energéticos y nutrientes demandados para la maduración ovárica al inicio de la temporada reproductiva se derivan principalmente de las reservas del hepatopáncreas, sustentando el primer evento de puesta realizado por las hembras medianas y grandes. Por lo tanto, se propone que, al inicio de la temporada reproductiva, las hembras

medianas y grandes de *L. uruguayensis* utilizarían la estrategia reproductiva de capitalización (Figura 2.8).

A mediados de la temporada reproductiva, las variables indicativas de madurez ovárica disminuyeron y alcanzaron valores intermedios como resultado del primer evento de puesta (Antunes *et al*., 2010; Fortes *et al*., 2011). Además, en este momento, el IHS, el glucógeno y los lípidos totales del hepatopáncreas alcanzaron los valores más bajos, hecho que sugiere un “agotamiento” o reducción significativa de las reservas energéticas de las hembras. En este momento de la temporada reproductiva, ocurrió el segundo evento de puesta, siendo el mayor de la temporada reproductiva (evaluado como proporción de hembras ovígeras), ya que estuvieron involucradas hembras de todos los tamaños.

Las hembras medianas y grandes que tuvieron su primera puesta durante este período probablemente utilizaron la estrategia reproductiva de capitalización, como había ocurrido al comienzo de la temporada reproductiva. En contraste, las hembras grandes que tuvieron su segunda puesta posiblemente cambiaron su estrategia reproductiva a la de uso inmediato. Probablemente estas hembras usaron las reservas para tener una puesta temprana en la temporada reproductiva (estrategia de capitalización), y luego se alimentaron y obtuvieron energía del ambiente hasta que el ovario maduró nuevamente para tener una segunda puesta en la temporada reproductiva (estrategia de uso inmediato). Se propone el uso de la estrategia reproductiva de uso inmediato porque, durante la temporada reproductiva, las reservas de energía en el hepatopáncreas (IHS y contenido de glucógeno) nunca alcanzaron

los niveles registrados en Colpo y López Greco (2017, 2018) en períodos pre-reproductivos (Figura 2.8).

Debido a su tamaño, las hembras chicas no pueden almacenar mucha energía (Stephens *et al*., 2009) lo que representa una limitación para el tamaño de la puesta (Hines, 1992; Ramirez Llodra, 2002; Henmi, 2003; Swiney *et al*., 2012). Durante la primavera y el comienzo de la temporada reproductiva, las hembras chicas estarían creciendo y llegarían a mediados de la temporada con mayor tamaño alcanzando a tener su primera puesta. Sin embargo, el proceso de crecimiento es costoso (Cox *et al*., 2010) y los índices de reserva energética (IHS = 3,4 ± 1,7) y de desarrollo gonadal (IGS = 3,8 ± 3,3) de las hembras chicas fueron bajos en la primera fecha de muestreo en la que fueron registradas (28 de diciembre de 2018) (Figura 2.8). Estos valores bajos indican que las hembras chicas no tendrían suficiente energía almacenada para solventar la vitelogénesis, lo que sugiere que usaron la estrategia reproductiva de uso inmediato para tener una puesta tardía, aprovechando los recursos disponibles del medio ambiente (Williams *et al*., 2017; Griffen, 2018).

No se esperaban mudas durante la corta temporada reproductiva de *L. uruguayensis*, porque se supuso que las hembras dedicarían toda la energía a la reproducción (Kobayashi y Archdale, 2017), considerando la estrecha ventana para la reproducción y, porque, en algunos cangrejos braquiuros, la reproducción y la muda son procesos que no se solapan, y las mudas suelen ocurrir luego del periodo reproductivo (Hyatt, 1948; Adiyodi, 1968; López Greco, 1997; Hartnoll, 2001; Raviv *et al*., 2008). La mayoría de las hembras que mudaron en los mesocosmos eran de tamaño mediano y pertenecían al mismo rango de tamaño de las hembras que solo tenía una puesta durante la temporada reproductiva.

Por lo tanto, las hembras medianas tuvieron una puesta en el inicio en la temporada reproductiva, probablemente utilizando la estrategia reproductiva de capitalización. Después de eso, mudaron y continuaron creciendo (Figura 2.8) hasta alcanzar un mayor tamaño lo que les permitiría aumentar su fecundidad en la próxima temporada reproductiva (Hines, 1992; Ramirez Llodra, 2002; Swiney *et al*., 2012).

El evento de puesta al final de la temporada reproductiva fue producido principalmente por hembras chicas que tuvieron su primera puesta y por hembras grandes que tuvieron su segunda puesta (información de los mesocosmos). Probablemente, como se sugirió antes, estas hembras utilizaron una estrategia reproductiva de uso inmediato para sus puestas.

Al final de la temporada reproductiva, la mayoría de las hembras de la población no mostraron signos de remaduración ovárica. Por lo general, las reservas de lípidos y proteínas totales en el ovario disminuyen hacia el final del proceso reproductivo (Antunes *et al*., 2010; Fatima *et al*., 2013; Sacristán *et al*., 2017). En el presente estudio, se encontró que, al inicio de la temporada reproductiva, cuando la estrategia reproductiva de capitalización sería predominante, el contenido de proteínas en las gónadas era mayor que en el final de la temporada reproductiva, cuando prevalecería la estrategia reproductiva de uso inmediato, y que el contenido de lípidos totales se mantuvo estable a lo largo del tiempo. Este patrón podría indicar que la cantidad de proteínas que las hembras transfieren a los huevos variaría según la estrategia reproductiva utilizada. Esto podría resultar en una disminución de la calidad de los huevos en el final de la temporada reproductiva, como ya se registró en otras especies de crustáceos que tienen puestas sucesivas utilizando la energía

obtenida en la temporada reproductiva (Varpe *et al*., 2007; Bert *et al*., 2016; Griffen, 2018).

Dado que la mayoría de las hembras de *L. uruguayensis* habían terminado el proceso reproductivo después de la mitad de la temporada reproductiva, la demanda energética disminuyó y los valores de IHS y contenido de glucógeno en el hepatopáncreas aumentaron al final de la temporada reproductiva. Sin embargo, las reservas totales de lípidos no aumentaron en este momento, probablemente porque son más costosas de generar y tardan más en acumularse (Sánchez Paz *et al*., 2006). Este aumento en las reservas podría relacionarse con la acumulación de energía necesaria para las mudas post-reproductivas, como fue observado en el cangrejo *N. granulata* que habita en la Bahía de Samborombón, donde el aumento del IHS al final de la temporada reproductiva se relacionó con el acopio de nutrientes necesarios para invertir en crecimiento somático luego de un periodo de gasto energético intenso, como lo es el proceso reproductivo (López Greco, 1997).

## 2.6 Conclusión

A partir de lo discutido anteriormente, se propone que *L. uruguayensis* presenta una estrategia reproductiva mixta, de capitalización y de uso inmediato (Williams *et al*., 2017) para el uso de reservas relacionadas con el tamaño de la hembra y el momento de la temporada reproductiva. Al inicio de su vida reproductiva, cuando aún asignan energía para el crecimiento somático, las hembras chicas y medianas tienen sólo una puesta durante su primera temporada reproductiva (Figura 2.8). En la segunda temporada reproductiva de sus vidas, las hembras grandes utilizan menos energía para el crecimiento

somático y pueden tener su primera puesta al comienzo de la temporada reproductiva, posiblemente utilizando la estrategia reproductiva de capitalización. Después de la eclosión de las zoeas, estas hembras grandes abandonan la cueva, comienzan a comer para obtener energía y tardan aproximadamente 60 días en tener una segunda puesta, posiblemente utilizando la estrategia reproductiva de uso inmediato (Figura 2.8). **La ventaja de utilizar una estrategia reproductiva mixta sería que permite minimizar los costos de las características específicas de cada estrategia, y mejorar el desempeño reproductivo de la población, optimizando todos los recursos energéticos disponibles** (Varpe *et al*., 2009; Wessels *et al*., 2010; Williams *et al*., 2017).

En base a los resultados obtenidos se rechaza la *hipótesis 1* ya que la mayoría de las hembras tiene una puesta por temporada reproductiva y sólo algunas hembras grandes pueden tener dos. Por otro lado, la *hipótesis 2* no es rechazada ya que las hembras de *L. uruguayensis* demostraron tener una estrategia reproductiva mixta.

.

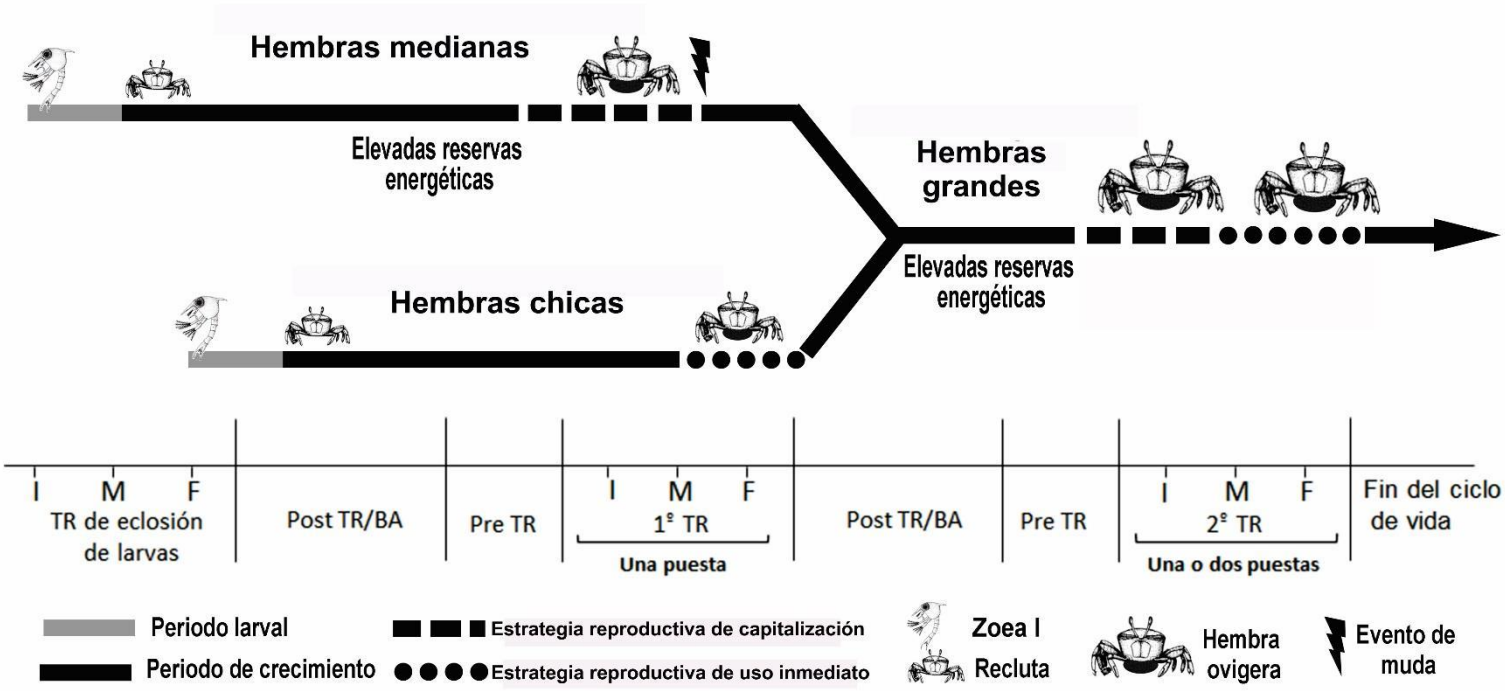


Figura 2.8: Resumen esquemático de la vida de las hembras del cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis*, su manejo de la energía y estrategias de reproducción. El esquema se divide en los períodos del ciclo reproductivo anual de *L. uruguayensis* en la población templada (Colpo y López Greco, 2017, 2018). Post TR / BA indica la temporada post-reproductiva y los periodos de baja actividad que ocurren principalmente en otoño e invierno, Pre TR indica la temporada pre-reproductiva cuando comienza la vitelogénesis y TR indica la temporada reproductiva. Hay tres TRs, y cada una presenta tres momentos (el inicio (I), mediados (M) y final (F)): la TR de eclosión, en la cual *L. uruguayensis* eclosiona, la primer TR, en el que la etapa adulta comienza, y la segunda TR, en el que termina la vida reproductiva. Cada patrón de línea indica los diferentes períodos de vida y el proceso que probablemente demanda la mayor asignación de energía: período larvario de aproximadamente 34 días (Rieger, 1996), período de crecimiento y estrategias reproductivas de capitalización y uso inmediato. Se registraron altos niveles de energía almacenada en el hepatopáncreas de hembras medianas y grandes en los períodos previos al inicio de la vitelogénesis (Colpo y López Greco, 2017, 2018). En la primera TR, *L. uruguayensis* puede producir una sola puesta. Las hembras que eclosionaron primero alcanzaron la primer TR como hembras de tamaño mediano, mientras que las hembras que eclosionaron más tarde alcanzaron la primer TR como hembras chicas. Ambos rangos de tamaño alcanzan la segunda TR como hembras grandes y pueden producir una o dos puestas.

# Capítulo 3

## Evaluación de los factores que modulan el desempeño reproductivo de las hembras de *Leptuca uruguayensis*

Los resultados de este capítulo han sido parcialmente publicados como:

Marciano, A., López Greco, L.S., and Colpo, K.D., 2022. Factors modulating the female reproductive performance of the fiddler crab *Leptuca uruguayensis* with short reproductive season. Biological Bulletin. 242, 16–26.

## 3.1 Introducción

Los factores bióticos y abióticos que modulan la reproducción tienen implicaciones ecológicas y evolutivas para las especies. El conocimiento de los efectos de estos factores sobre la reproducción puede permitir predecir las condiciones “ideales” para producir descendencia exitosa (Giménez y Anger, 2001; Marshall y Keough, 2004; Birkeland y Dayton, 2005).

Los factores bióticos que influyen en el desempeño reproductivo de las hembras incluyen, entre otros, la condición fisiológica (Wu *et al*., 2010; Tropea y López Greco, 2015) y el estado nutricional de las hembras (Ruffino *et al*., 2014; Stahlschmidt y Adamo, 2015; Domitília *et al*., 2016), mientras que algunos ejemplos de factores abióticos de impacto directo sobre la reproducción son la temperatura, salinidad y fotoperíodo (Steele y Steele, 1991; Menassol *et al*., 2012; Thatje *et al*., 2019, entre otros).

La condición fisiológica y, en particular, el estado nutricional de las hembras, determinan su capacidad para la producción de gametas, el apareamiento y el cuidado maternal, lo que influye en la calidad y el éxito de la progenie (Prasad *et al*., 2011; Horváthová *et al*., 2012; Hayes *et al*., 2013). Por lo tanto, las hembras en buenas condiciones fisiológicas y nutricionales pueden lograr mayor calidad de huevos (tamaño y composición bioquímica, por ejemplo, como sus estimadores), mayor número de huevos (fecundidad), mayor número de puestas y mayor supervivencia de las crías (Hernández Herrera *et al*., 2001; Wootton y Fletcher, 2009; Ruffino *et al*., 2014; Stahlschmidt y Adamo, 2015; Guzmán *et al*., 2020, entre otros). También se ha demostrado que, debido a la relación con la edad de las hembras, el ciclo reproductivo en el cual se encuentran (primera, segunda, tercera o posteriores puestas), afecta a la

descendencia de diferentes formas (Lemaître y Gaillard, 2017). Por ejemplo, se ha observado que cuando las hembras de la lagartija *Lacerta vivipara* (Massot *et al*., 2011) y del cangrejo *Eriocheir sinensis* (Chang *et al*., 2017) tienen sus primeras puestas, presentan menor fecundidad y descendencia de menor calidad que las hembras maduras que han atravesado más ciclos reproductivos.

Algunos estudios han sugerido que la mejora de las variables reproductivas en los ciclos reproductivos sucesivos podría estar relacionada con el aumento del tamaño corporal, lo que permite producir más descendencia (DelGiudice *et al*., 2007; Jones *et al*., 2014; Tsujimoto *et al*., 2016; Cohen *et al*., 2020). En crustáceos decápodos, algunos estudios sugieren que las hembras senescentes tienen crías de mayor calidad, como se ha observado para *Maja brachydactyla* (Verísimo *et al*., 2011) y *Neocaridina davidi* (Marciano *et al*., 2018), mientras que otros autores han encontrado que esto no afecta la fecundidad ni el tamaño de los huevos, como en el caso de *Litopenaeus vannamei* (Arcos *et al*., 2003) y *Callinectes sapidus* (Graham *et al*., 2012).

Uno de los factores abióticos más importantes que afectan las variables reproductivas de las poblaciones es la temperatura (Clarke *et al*., 1991; Yampolsky y Scheiner, 1996; Cardoso y Defeo, 2003; Bywater *et al*., 2010; Chou *et al*., 2019, entre otros). En climas tropicales, la pequeña amplitud térmica permite la reproducción anual y las sucesivas puestas tienden a ser homogéneas a lo largo del año (Bauer, 1989). En cambio, en climas templados, las temporadas reproductivas suelen estar restringidas a los meses más cálidos (Boa y García, 2015; Grassi *et al*., 2018).

En los decápodos que habitan en climas templados, la calidad y cantidad de la progenie puede variar entre el inicio y el final de la misma temporada

reproductiva (Guzmán *et al*., 2016; Naderi *et al*., 2018, entre otros), incluso en temporadas reproductivas cortas que se extienden por tres o cuatro meses (Yamaguchi, 2001; Vázquez *et al*., 2013; Guzmán *et al*., 2020; Johnston y Yeoh, 2021).

La combinación entre el estado fisiológico de las hembras y las condiciones ambientales genera diferentes escenarios que demandan estrategias apropiadas para que las hembras maximicen el éxito reproductivo (Resnick, 1985; Barnes y Partridge, 2003). Como se mencionó anteriormente, las hembras adultas de *L. uruguayensis* experimentan dos temporadas reproductivas durante su vida (Spivak *et al*., 1991). En su primera temporada reproductiva, las hembras adultas atraviesan su primer ciclo reproductivo, miden menos de 12 mm de ancho de caparazón y tienen solo una puesta en toda la temporada, mientras que en su segunda temporada reproductiva, las hembras atraviesan su segundo ciclo reproductivo, miden más de 12 mm de ancho de caparazón y pueden producir un máximo de dos puestas en la temporada (Capítulo 2, Marciano *et al*., 2021). El patrón reproductivo determinado en el capítulo 2 para *L. uruguayensis* sugirió que al comienzo de la temporada reproductiva, la mayoría de las hembras de la población tendrían la estrategia reproductiva de capitalización, a mediados de la temporada, algunas hembras usarían la estrategia reproductiva de capitalización, y otras usarían la estrategia reproductiva de uso inmediato y, al final de la temporada reproductiva, la estrategia predominante sería la de uso inmediato.

## 3.2 Objetivo e hipótesis

El objetivo de este capítulo fue evaluar si el desempeño reproductivo de las hembras de *L. uruguayensis* en una población de clima templado está modulado por el ciclo reproductivo que atraviesan las hembras (primero o segundo) y/o por los momentos de la temporada reproductiva (inicio, mediados y final), entendiendo que representan distintas condiciones de temperatura y fotoperíodo entre otros factores. El desempeño reproductivo de las hembras se evaluó mediante la estimación de la fecundidad, el rendimiento reproductivo, el volumen de los huevos y la composición bioquímica de los huevos (contenido de carotenoides, proteínas y lípidos totales).

A partir de esto, se plantearon dos hipótesis:

- *Hipótesis 1:* El ciclo reproductivo de las hembras modula la fecundidad y el rendimiento reproductivo debido a la relación de estas variables con el tamaño de la hembra.
- *Hipótesis 2:* Los momentos de la temporada reproductiva afectan el volumen y la composición bioquímica de los huevos debido a las diferentes estrategias reproductivas y a la disponibilidad de nutrientes en el ambiente.

## 3.3 Materiales y métodos

### 3.3.1 Muestreo y procesamiento en laboratorio

Se muestrearon hembras de *Leptuca uruguayensis* al inicio (noviembre), mediados (diciembre y enero) y final (febrero) de las temporadas reproductivas 2018 - 2019 y 2019 - 2020 en la misma ubicación detallada en el capítulo 2. Se tomaron muestras de cangrejos 2 o 3 veces en cada momento de las temporadas reproductivas para asegurar un número apropiado de réplicas para los análisis previstos.

En cada día de muestreo, las hembras ovígeras de *L. uruguayensis* fueron muestreadas como se indica en el capítulo 2. Fueron transportadas al laboratorio donde fueron lavadas con agua y examinadas bajo lupa para determinar la etapa del desarrollo embrionario. Sólo se utilizaron hembras con huevos en una etapa inicial de desarrollo. La etapa inicial se caracterizó por huevos en estadio temprano de blástula, identificados por la distribución uniforme del vitelo, el tamaño del embrión pequeño y la ausencia de pigmentos visibles en los ojos (Figura 3.1) (Litulo, 2005; González Pisani *et al*., 2013; Guzmán *et al*., 2016; González Pisani y López Greco, 2021). Las hembras se sacrificaron mediante anestesia con hielo durante 15 minutos. El ancho máximo de caparazón de las hembras se midió con calibre.

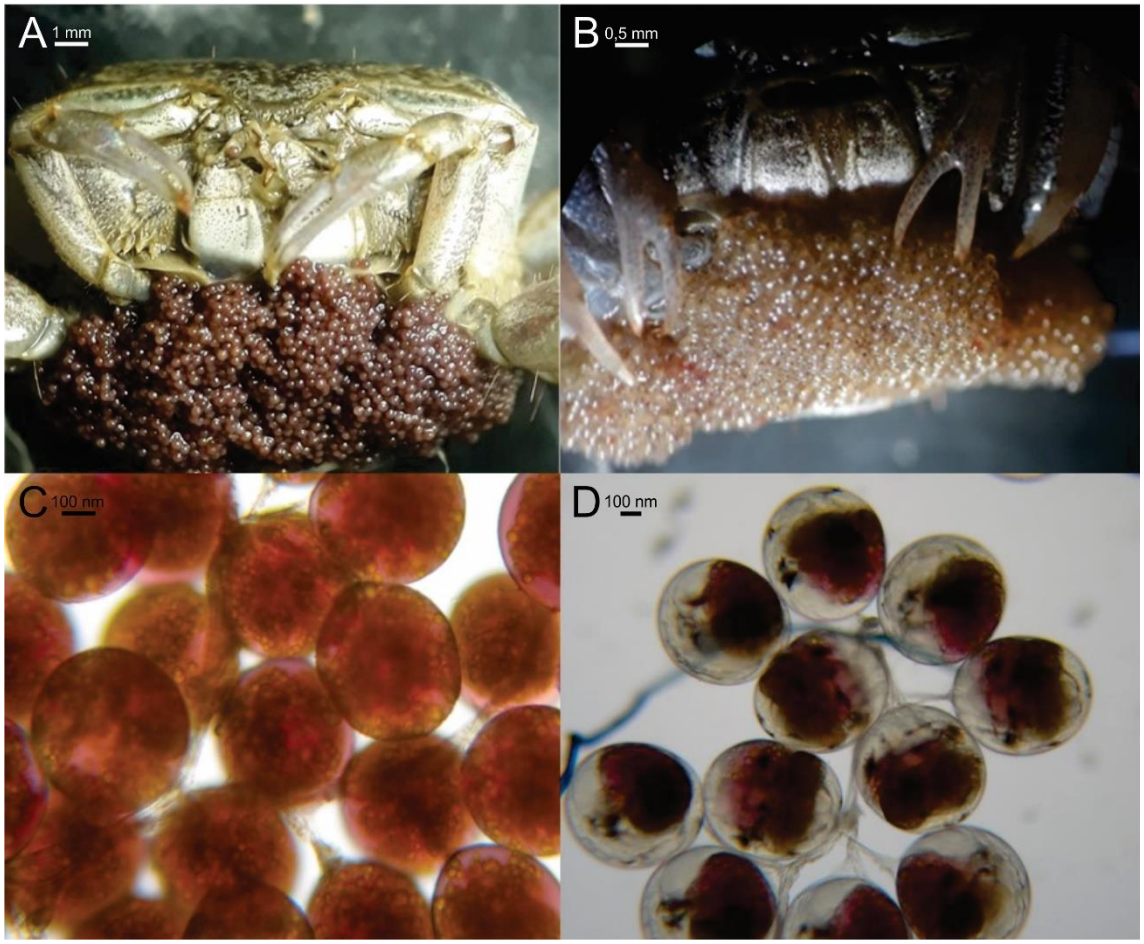


Figura 3.1: Puestas completas y detalle de huevos de *Leptuca uruguayensis*. (A) Vista ventral de una hembra con puesta de huevos que se encuentran en estadio inicial del desarrollo embrionario, caracterizado por el color violáceo. (B) Vista ventral de una hembra con puesta de huevos que se encuentran en estadio avanzado del desarrollo embrionario, caracterizado por el color gris/marrón. (C) Huevos en estadio inicial del desarrollo embrionario visto bajo el microscopio óptico. Se observan granulación en tonos violeta y amarillo correspondiente a la gran cantidad de vitelo. (D) Huevos en estadio avanzado del desarrollo embrionario visto bajo el microscopio óptico. Además de la evidente disminución del vitelo, es posible identificar pigmentos oculares y cromatóforos.

Las hembras ovígeras se distribuyeron aleatoriamente para evaluar las variables reproductivas y se consideró que las hembras con un tamaño de entre 7 y 12 mm de ancho de caparazón (AC) son hembras adultas chicas y medianas que están atravesando su primer ciclo reproductivo y aquellas mayores que 12 mm de AC son hembras grandes que se encuentran en su segundo ciclo reproductivo (Spivak *et al*., 1991; Marciano *et al*., 2021, capítulo 2). La puesta de huevos se retiró de los pleópodos con pinzas finas, se secó con un papel absorbente para quitar el exceso de agua y se pesó (peso húmedo de la puesta de huevos). Las hembras se secaron con un papel absorbente y se pesaron (peso húmedo de la hembra).

### 3.3.2 Fecundidad

La fecundidad en los crustáceos decápodos generalmente se estima contando el número de huevos transportados por hembras ovígeras en los pleópodos, y se denomina fecundidad *realizada* (Steachey y Somers, 1995; Ramirez Llodra, 2002; Militelli *et al*., 2019, entre otros). En este estudio, la fecundidad realizada de cada hembra se estimó contando los huevos de cinco submuestras de puestas de aproximadamente 3 mg (~ 200 huevos) y extrapolando el número promedio de huevos al peso húmedo de la puesta total.

### 3.3.3 Rendimiento reproductivo

El rendimiento reproductivo (*output* reproductivo) es un estimador del esfuerzo reproductivo ampliamente utilizado en crustáceos decápodos porque relaciona el tamaño de la hembra con el tamaño de la puesta de huevos, lo que indica la biomasa relativa que la hembra asigna a la puesta (Bell, 1980; Hines, 1991; López Greco *et al*., 2000; López Greco y Rodríguez, 2004; Tsujimoto *et*

*al*., 2016). En este estudio, las puestas y las hembras se secaron a 45 °C durante tres días hasta que alcanzaron un peso constante (peso seco de la puesta y peso seco de la hembra). Esta información se utilizó para determinar el rendimiento reproductivo de *L. uruguayensis* (% rendimiento reproductivo = (peso seco de la puesta de huevos / peso seco de la hembra) x 100) (Clarke *et al*., 1991).

### 3.3.4 Volumen del huevo

El volumen del huevo se usa generalmente como un indicador de la calidad de la puesta, porque los huevos pequeños podrían indicar no solo una menor cantidad de vitelo, sino también un tamaño más pequeño del embrión (Kuris, 1990; Moran y McAlister, 2009). Para estimar el volumen de los huevos de *L. uruguayensis*, se seleccionaron al azar diez huevos por puesta para fotografiarlos bajo un microscopio Axioplan equipado con una cámara Zeiss Axiocam ERc 5. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Zeiss Zen 2.3 Lite. El volumen de huevo ($mm^3$) se calculó de acuerdo con la fórmula: $1 / 6\pi D^3$ (Jones y Simons, 1983; Peiró *et al*., 2014), donde "D" representa el promedio del diámetro máximo y mínimo del huevo.

### 3.3.5 Composición bioquímica de los huevos

En los crustáceos decápodos, la composición bioquímica de los huevos depende de los nutrientes que las hembras transfieren durante la vitelogénesis a los oocitos para el posterior desarrollo del embrión (Koopman *et al*., 2015). En consecuencia, esta es una medida estimativa del estado nutricional y fisiológico de la hembra (Vargas Ceballos *et al*., 2018). En este estudio, se determinó el contenido de carotenoides, proteínas y lípidos totales de los huevos. Para ello, las puestas de huevos se extrajeron de los pleópodos, se secaron con papel

absorbente, se pesaron y mantuvieron en un congelador a -20 °C hasta la realización del análisis bioquímico.

Para la determinación del contenido de carotenoides, se homogeneizaron muestras de puestas de huevos de alrededor de 15 mg con 1,5 ml de acetona y luego se dejaron 72 horas en la heladera a 4 °C. El contenido de carotenoides se determinó espectrofotométricamente a 475 nm, según los métodos descritos por Renstrøm *et al*. (1981) y Torrissen y Naevdal (1984) con modificaciones de Tropea *et al*., (2019). Los valores se expresan como µg de carotenoides/mg de huevos.

Para la determinación de proteínas y lípidos totales, se realizó la misma metodología indicada en el capítulo 2. No se realizó determinación de glucógeno en los huevos ya que se priorizó la masa de las puestas obtenidas para el análisis de las proteínas y lípidos totales que son los elementos constitutivos más importantes en huevos de decápodos (Rosa y Nunes, 2003).

### 3.3.6 Análisis estadístico

Para evaluar cómo los factores estudiados modulan el desempeño reproductivo de las hembras de *L. uruguayensis*, se realizó un análisis estadístico donde el ciclo reproductivo de las hembras fue un factor fijo con dos niveles (primero y segundo), y los momentos de la temporada reproductiva fueron considerados un factor fijo con tres niveles (inicio, mediados y final). La fecundidad se analizó mediante regresiones lineales múltiples que relacionaron el AC con el número de huevos de hembras en el primer y segundo ciclo reproductivo, en cada momento de la temporada reproductiva. Posteriormente, las ecuaciones de fecundidad se compararon mediante el análisis de la

covarianza (ANCOVA) de dos vías, utilizando AC como covariable. Las variables AC, rendimiento reproductivo, volumen de los huevos y composición bioquímica de los huevos (contenido de carotenoides, proteínas y lípidos totales) se analizaron mediante ANOVA de dos vías. Los valores se expresaron como media ± desvío estándar (DE). El número de hembras ovígeras utilizado para estimar cada variable reproductiva fue diferente, debido a la técnica utilizada para la determinación de cada una de ellas.

Se utilizaron las pruebas de Levene y Shapiro Wilks para verificar los supuestos de homocedasticidad y normalidad, respectivamente. Cuando fue necesario, se modeló la estructura de la varianza (Zuur *et al*., 2010). Todas las pruebas se llevaron a cabo al 95% de nivel de significancia. Se utilizó la prueba de Tukey para realizar comparaciones múltiples. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R 4.0.3 (RStudio Team, 2015).

## 3.4 Resultados

Se muestrearon un total de 252 hembras ovígeras: 134 al inicio de las temporadas reproductivas, 92 a mediados y 26 sobre el final. La hembra ovígera más pequeña registrada presentó un AC de 7,5 mm, mientras que la más grande tenía un AC de 14,5 mm.

La comparación del AC mostró una interacción significativa entre el ciclo reproductivo de las hembras y los momentos de la temporada reproductiva (Tabla 3.1). Las hembras de primer ciclo reproductivo fueron un 11,1% más grandes, en promedio, al inicio de la temporada reproductiva que a mediados y en el final. Sin embargo, las hembras de segundo ciclo reproductivo, que fueron en promedio un 20% más grandes que las hembras de primer ciclo reproductivo,

y mostraron tamaños similares en todos los momentos de la temporada reproductiva (Tabla 3.1; Figura 3.2).

Tabla 3.1: Resultados del ANOVA de dos vías que muestran los efectos del ciclo reproductivo de las hembras (primero y segundo) y los momentos de la temporada reproductiva (inicio, mediados y final) sobre el tamaño y las variables reproductivas de las hembras (rendimiento reproductivo, volumen de huevo y contenido de carotenoides, proteínas y lípidos totales en las puestas de huevos) del cangrejo violinista *Leptuca uruguayensis*.

| Variables reproductivas | Factores | gl | SC | F | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Tamaño de la hembra (ancho de caparazón, mm) | Ciclo | 1 | 300 | 405 | <0,001 |
| | Momentos | 2 | 5,8 | 7,9 | <0,001 |
| | Ciclo x momentos | 2 | 7,7 | 10,4 | <0,001 |
| | Error | 246 | 0,7 | | |
| Rendimiento reproductivo (%) | Ciclo | 1 | 0,004 | 1,1 | 0,31 |
| | Momentos | 2 | 0,0001 | 0,04 | 0,96 |
| | Ciclo x momentos | 2 | 0,002 | 0,5 | 0,59 |
| | Error | 152 | 0,003 | | |
| Volumen de huevo ($mm^3$) | Ciclo | 1 | $6,7 \times 10^{-6}$ | 2 | 0,15 |
| | Momentos | 2 | $5,9 \times 10^{-5}$ | 18,3 | <0,001 |
| | Ciclo x momentos | 2 | $1,1 \times 10^{-6}$ | 0,3 | 0,71 |
| | Error | 130 | $3,2 \times 10^{-6}$ | | |
| Contenido de carotenoides (µg/mg de huevos) | Ciclo | 1 | 0,0005 | 0,2 | 0,67 |
| | Momentos | 2 | 0,01 | 3,2 | 0,04 |
| | Ciclo x momentos | 2 | 0,0006 | 0,2 | 0,81 |
| | Error | 55 | 0,003 | | |
| Contenido de proteínas totales (mg/g de huevos) | Ciclo | 1 | 113 | 0,3 | 0,59 |
| | Momentos | 2 | 417 | 1,1 | 0,35 |
| | Ciclo x momentos | 2 | 1691 | 4,4 | 0,01 |
| | Error | 60 | 387 | | |
| Contenido de lípidos totales (mg/g de huevos) | Ciclo | 1 | 45,8 | 0,4 | 0,55 |
| | Momentos | 2 | 1159 | 9,4 | < 0,001 |
| | Ciclo x momentos | 1 | 0,32 | 0,003 | 0,96 |
| | Error | 38 | 123 | | |

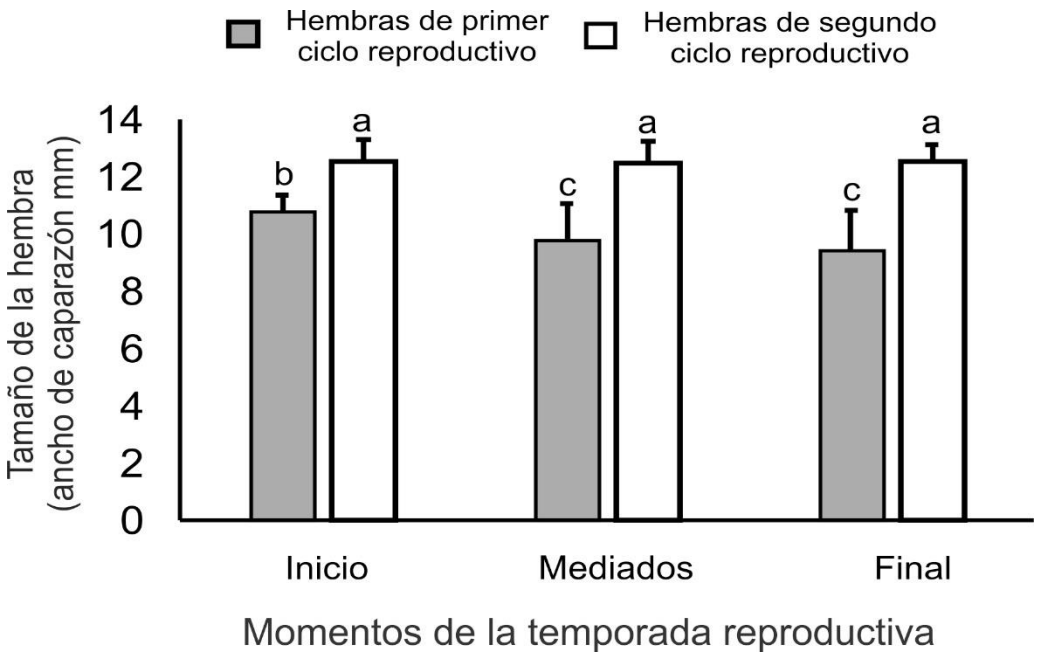


Figura 3.2: Ancho del caparazón (AC) de *Leptuca uruguayensis* comparando hembras de primer (gris) y segundo (blanco) ciclo reproductivo en los momentos de la temporada reproductiva (media ± DE). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

### 3.4.1 Fecundidad

La fecundidad, que se estimó para 109 hembras, osciló entre 1447 y 13172 huevos. Las ecuaciones de fecundidad para las hembras de primer y segundo ciclo reproductivo en cada momento de la temporada reproductiva mostraron una relación positiva entre el tamaño de la hembra (AC) y el número de huevos (resultado regresiones lineales múltiples, $p < 0,05$). El ANCOVA que comparó estas ecuaciones indicó que la fecundidad fue afectada por la covariable (AC) (resultado ANCOVA $F_{1;102} = 174,3$; $p < 0,001$). Además, el ANCOVA mostró interacción entre el ciclo reproductivo de las hembras y los momentos de la temporada reproductiva (resultado ANCOVA: $F_{1;102} = 2,5$; $p = 0,044$). En consecuencia, se realizó la prueba de Tukey para comparar las ecuaciones de fecundidad para todos los niveles de los factores ciclo y momentos (Tabla 3.2).

La fecundidad de las hembras del primer ciclo reproductivo fue significativamente mayor al inicio que a mediados y final de la temporada reproductiva, mientras que la fecundidad de las hembras de segundo ciclo reproductivo no varió a lo largo del tiempo (Tabla 3.2) y mostraron, en promedio, un 38% más de huevos (entre 5078 y 13172 huevos) que las hembras de primer ciclo (entre 1447 y 9893 huevos).

Tabla 3.2: Ecuaciones de la fecundidad que relacionan el ancho del caparazón (AC) con el número de huevos (F) de hembras de *Leptuca uruguayensis* que están atravesando el primer y segundo ciclo reproductivo, en cada momento de la temporada reproductiva (inicio, mediados y final). Letras diferentes indican diferencias significativas en las ecuaciones de fecundidad comparadas con la prueba de Tukey, después del resultado de la interacción en el ANCOVA ($p < 0,05$).

| Ciclo | Momentos | *n* | Ecuación fecundidad | $R^2$ | Resultado Tukey |
|---|---|---|---|---|---|
| Primero | Inicio | 16 | F = 1303,3 AC – 7787,9 | 0,5 | b |
| | Mediados | 22 | F = 1048,9 AC – 5671,9 | 0,8 | c |
| | Final | 5 | F = 1558 AC – 10499 | 0,9 | c |
| Segundo | Inicio | 38 | F = 1303,5 AC – 7863,3 | 0,6 | a |
| | Mediados | 22 | F = 1115,4 AC – 5973,4 | 0,5 | a |
| | Final | 6 | F = 1838 AC – 14936 | 0,7 | a |

### 3.4.2 Rendimiento reproductivo

El rendimiento reproductivo se estimó para 158 hembras ovígeras. La puesta de huevos representó 22 ± 6% del peso corporal de la hembra, valor que no difirió significativamente entre ciclo reproductivo o entre los momentos de la temporada reproductiva (Tabla 3.1).

### 3.4.3 Volumen del huevo

Se determinó el volumen del huevo en 136 hembras ovígeras. Este varió entre 0,008 y 0,017 $mm^3$, y no difirió significativamente entre hembras de primer y segundo ciclo reproductivo, pero se vio afectado por los momentos de la temporada reproductiva (Tabla 3.1). En el final de la temporada reproductiva, los huevos eran en promedio, 24% más pequeños, que los del inicio y mediados de la temporada reproductiva (Tabla 3.1; Figura 3.3 A).

### 3.4.4 Composición bioquímica de los huevos

Se determinó el contenido de carotenoides para 61 puestas de huevos. El contenido de carotenoides en las puestas de huevos no difirió significativamente entre hembras de primer y segundo ciclo reproductivo, pero varió significativamente entre los momentos de la temporada reproductiva (Tabla 3.1), ya que los huevos producidos al final de la temporada reproductiva contenían, en promedio, un 19% más de carotenoides que los huevos producidos al inicio (Figura 3.3 B).

El contenido de proteínas totales se determinó para 66 puestas de huevos. El ANOVA de dos vías mostró una interacción significativa entre el ciclo y el momento (Tabla 3.1). Las puestas de huevos de las hembras de primer ciclo reproductivo mostraron un contenido de proteína similar (71,2 ± 17,5 mg de

proteínas totales/g de huevos) durante la temporada reproductiva. Por el contrario, los huevos producidos por hembras de segundo ciclo reproductivo al final de la temporada reproductiva contenían, en promedio, un 28% menos de contenido de proteínas totales que los huevos producidos en los otros momentos (Figura 3.3 C).

Se determinó el contenido total de lípidos para 43 puestas de huevos. El contenido medio de lípidos en las puestas no difirió significativamente entre hembras de primer y segundo ciclo reproductivo durante el inicio y mediados de la temporada reproductiva (54,1 ± 11,9 mg de lípidos totales /g de huevos) (Tabla 3.1, Figura 3.2 D). Hacia el final de la temporada reproductiva, los huevos producidos por hembras de segundo ciclo reproductivo presentaron, en promedio, un 32% menos de contenido de lípidos totales que los huevos producidos en el inicio y mediados de la temporada reproductiva (Figura 3.3 D). En este momento, las hembras de primer ciclo reproductivo registradas fueron pocas y tenían puestas pequeñas; por lo tanto, la masa de huevos requerida para la determinación de lípidos fue insuficiente y no se pudo determinar el contenido total de lípidos en las puestas de huevos de las hembras de primer ciclo reproductivo al final de la temporada reproductiva.

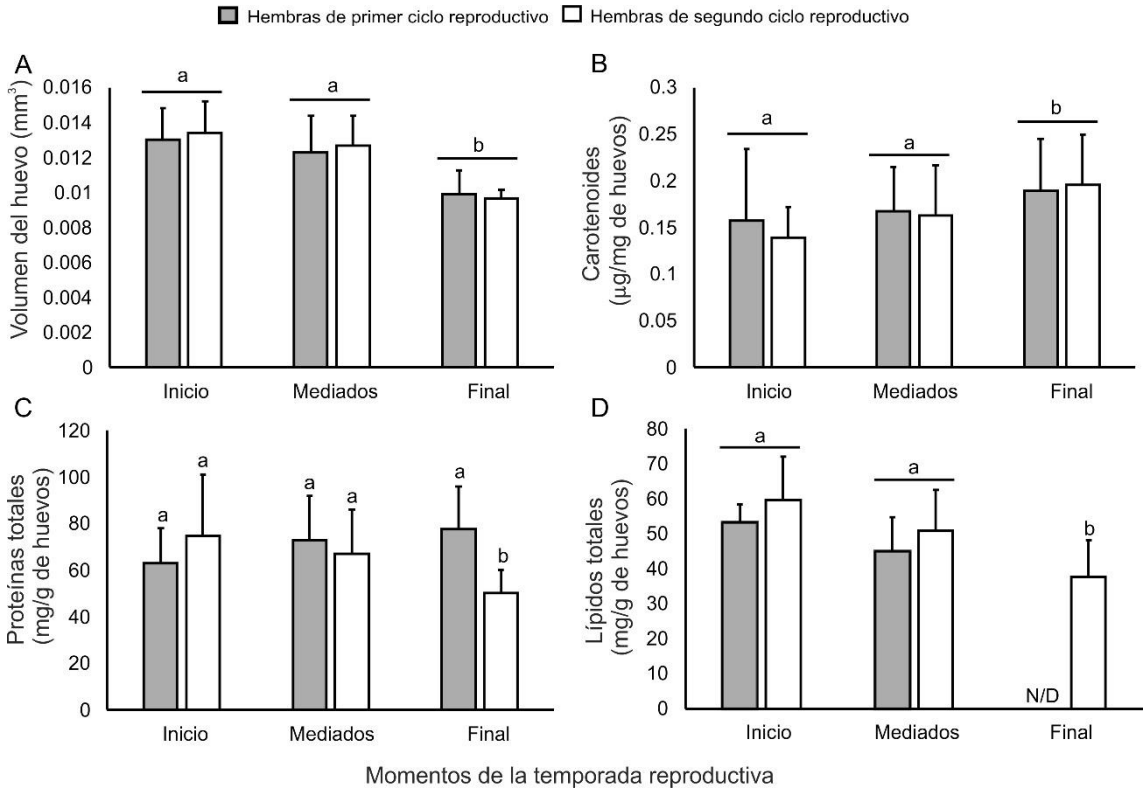


Figura 3.3: Variables reproductivas para las hembras de *Leptuca uruguayensis*. (A) Volumen del huevo, (B) Contenido de carotenoides, (C) Contenido de proteínas totales y (D) Contenido de lípidos totales en huevos de hembras de primer (gris) y segundo (blancas) ciclo reproductivo en los diferentes momentos de la temporada reproductiva (media ± DE). N/D significa que la información no está disponible. Letras diferentes

## 3.5 Discusión

El desempeño reproductivo de *L. uruguayensis* estuvo afectado por el ciclo reproductivo de la hembra y por los momentos de la temporada reproductiva. El ciclo reproductivo de las hembras afectó principalmente a la fecundidad dado que las hembras de primer ciclo mostraron una fecundidad menor que las hembras de segundo ciclo reproductivo. El rendimiento reproductivo no se vio afectado ni por el ciclo reproductivo de la hembra ni por el momento de la temporada reproductiva. Sin embargo, el volumen del huevo y el contenido de carotenoides fueron modulados principalmente por el momento de la temporada reproductiva y el contenido nutricional de los huevos (proteínas y lípidos totales) fue influenciado por ambos factores.

La relación positiva entre el tamaño de la hembra y la fecundidad ha sido bien documentada en muchas especies de decápodos (Fox y Czesak, 2000; López Greco *et al*., 2000; Yosho, 2000; Muiño, 2002; García Guerrero y Hendrickx, 2004; Birkeland y Dayton, 2005; Marshall y Keough, 2007; González Pisani y López Greco, 2014; Bert *et al*., 2016; Tropea *et al*., 2019; entre otros). Conforme aumenta el tamaño de las hembras, éstas tienen más espacio para desarrollar la gónada en el cefalotórax y una mayor capacidad para transportar los huevos en el abdomen (Hines, 1982, 1988). Por lo tanto, se esperaba que la fecundidad varíe entre las hembras de *L. uruguayensis* de diferentes tamaños y, por lo tanto, de diferentes ciclos reproductivos.

La mayor fecundidad de las hembras de primer ciclo al inicio de la temporada reproductiva se relacionó con el mayor tamaño que éstas presentan (10 - 12 mm de AC). En el capítulo 2 se observó que las hembras chicas de

primer ciclo sólo ponen huevos a partir de mediados de la temporada reproductiva. Por lo tanto, la inclusión de estas hembras más pequeñas a la población reproductora disminuye la estimación de la fecundidad promedio por hembra de *L. uruguayensis* a mediados y final de la temporada, como consecuencia de sus tamaños. Previamente se ha encontrado una tendencia similar para el camarón *Palaemon macrodactylus* (Vázquez *et al*., 2013) y el cangrejo *Pyrhila pisum* (Kobayashi y Archdale, 2017), donde predominan las hembras grandes al comienzo de la temporada reproductiva y las hembras más pequeñas se incorporan hacia el final, resultando en menores valores de fecundidad promedio.

Calcular el costo de la reproducción es una cuestión interesante, pero compleja ya que es un aspecto de la vida de los organismos que implica componentes fisiológicos, ecológicos y etológicos que muchas veces son difíciles de analizar adecuadamente (Callow, 1979; Bell, 1980; Resnick, 1985). Por lo tanto, una alternativa es determinar el rendimiento reproductivo (Clarke, 1987) ya que, en los cangrejos braquiuros, casi el contenido total del ovario se extruye en el desove, lo que hace que la relación peso de la puesta de huevos / peso corporal de la hembra sea una aproximación válida del esfuerzo reproductivo (Hartnoll, 2006). El rendimiento reproductivo de los cangrejos braquiuros varía entre el 10 y el 22% en promedio (Hines, 1982, 1991) y puede llegar hasta superar el 60% en cangrejos pinotéridos (Hines, 1992). Así, el valor aquí registrado para *L. uruguayensis* (22%) indica que las hembras de este cangrejo violinista realizan una alta inversión en reproducción dentro de los valores hallados para cangrejos. Dado que esta variable no ha sido analizada en poblaciones con mayor amplitud de la temporada reproductiva, como por

ejemplo poblaciones de *L. uruguayensis* en Brasil, no podemos evaluar si es una variable de magnitud similar modelada por la extensión del período reproductivo.

Si bien la fecundidad de *L. uruguayensis* fue modulada por el tamaño, el rendimiento reproductivo fue similar para las hembras de ambos ciclos reproductivos, lo que indica que el esfuerzo realizado en la reproducción fue proporcional al ciclo reproductivo/tamaño de la hembra, independientemente del número de huevos en la puesta. Además, el rendimiento reproductivo no varió entre los momentos de la temporada. Estos resultados sugieren que los recursos asignados por las hembras de *L. uruguayensis* a la reproducción serían similares en cada puesta de sus vidas. Sin embargo, el rendimiento reproductivo no es una medida que incluya toda la complejidad de la inversión energética en la reproducción, ya que no considera variables como el volumen y la composición nutricional de los huevos (Callow, 1979; Hartnoll, 2006; Tsujimoto *et al*., 2016).

En los crustáceos decápodos, el tamaño de los huevos podría verse influenciado por varios factores, como por ejemplo si la hembra es multípara o primípara (Graham *et al*., 2012), si los huevos son de verano o de invierno (Jacobs *et al*., 2003; Guzmán *et al*., 2016, 2020), si el desarrollo es planctotrófico o lecitotrófico (Jalihal *et al*., 1993), y si hay un aumento o disminución de temperatura o latitud (Anger y Moreira, 1998; Ituarte *et al*., 2006; Bas *et al*., 2007, 2009). Esta variabilidad también podría deberse a cambios en el contenido de agua de los huevos (Peiró *et al*., 2014), cambios en la salinidad del ambiente (Giménez y Anger, 2001), cambios en la disponibilidad del alimento (Urzúa *et al*., 2012) y también factores relativos a la hembra como su tamaño (Mauchline, 1988), el agotamiento de las reservas maternas (Tropea y López Greco, 2015), y el cuidado parental (Palaoro *et al*., 2020). En este trabajo, el volumen de los

huevos en las hembras de ambos ciclos reproductivos disminuyó en el final de la temporada reproductiva, probablemente debido a más de un factor. Estos resultados sugieren que los factores que modulan el volumen de los huevos de *L. uruguayensis* varían a lo largo de la temporada reproductiva, pero no están relacionados con el ciclo reproductivo de las hembras, ya que esta variable fue similar entre hembras de diferentes ciclos.

En cuanto a la composición bioquímica de los huevos, los carotenoides aportan pigmentación a los embriones (Dall, 1995; Long *et al*., 2017), fotoprotección (Britton *et al*., 2008) y defensas antioxidantes (Wouters *et al*., 2001; Wade *et al*., 2017). El contenido de carotenoides en los huevos está directamente influenciado por la cantidad de estos pigmentos en la dieta de las hembras (Jeckel *et al*., 1989; Schneider *et al*., 2016). Dado que los cangrejos violinistas se alimentan del sedimento (Miller, 1961; Sayão Aguiar *et al*., 2012), las variaciones a corto plazo que suelen ocurrir en las comunidades intersticiales (Morrisey *et al*., 1992; Bathmann *et al*., 1991; Madariaga, 2002; Rodil *et al*., 2008) podrían afectar los recursos alimenticios disponibles para *L. uruguayensis*, promoviendo diferencias en el contenido de carotenoides de los huevos durante la temporada reproductiva.

Dado que al final de la temporada reproductiva *L. uruguayensis* tendría una puesta utilizando recursos adquiridos mediante la alimentación (estrategia reproductiva de uso inmediato) (capítulo 2, Marciano *et al*., 2021), sugerimos que el aumento en el contenido de carotenoides en las puestas de huevos para hembras de ambos ciclos reproductivos podría explicarse tanto por variaciones en el tipo de alimento disponible en el sedimento como por la diferencia en la estrategia de manejo de energía utilizada para la producción de huevos.

La composición nutricional de los huevos es un indicador útil de la inversión energética materna (Hernández Herrera *et al*., 2001; Palacios *et al*., 2001). Entonces, una reducción en estos componentes del vitelo podría sugerir una menor calidad de la progenie (Sasaki *et al*., 1986; Nates y McKenney Jr., 2000; García Guerrero *et al*., 2003). Aunque las hembras de primer ciclo de *L. uruguayensis* aquí estudiadas estaban invirtiendo energía tanto en la reproducción como en el crecimiento, mantuvieron el suministro de proteínas y lípidos a las puestas de huevos, independientemente de la estrategia reproductiva utilizada.

La calidad de los huevos de los crustáceos tiene implicaciones directas sobre la supervivencia y el éxito de la descendencia (Anger, 2001, 2006; Paschke *et al*., 2004; Urzúa y Anger, 2013). Entonces, el contenido nutricional más bajo de huevos observado para las hembras de segundo ciclo reproductivo de *L. uruguayensis* al final de la temporada reproductiva podría producir larvas de menor calidad. En los decápodos, esto puede deberse a que las puestas sucesivas pueden reducir las reservas de nutrientes de las hembras y, como consecuencia, la composición bioquímica de los huevos puede cambiar y afectar la condición de las larvas (Vazquez Boucard *et al*., 2004; Yu *et al*., 2007; Tropea y López Greco, 2015; Marciano *et al*., 2018).

Las hembras ovígeras de segundo ciclo reproductivo de *L. uruguayensis* muestreadas al final de la temporada reproductiva estaban teniendo su segunda puesta en la temporada (capítulo 2, Marciano *et al*., 2021), y sus puestas mostraron, en promedio, un 30% menos de contenido de proteínas y lípidos totales. En el capítulo 2 se observó que, después de la primera puesta de la temporada reproductiva, disminuyó el contenido de proteínas totales en el ovario,

así como el contenido de glucógeno y lípidos en el hepatopáncreas. Esto sugiere una condición de agotamiento de las hembras de segundo ciclo, por lo que se asignarían menos nutrientes a los huevos, un hecho que a su vez podría resultar en una menor calidad de su segunda puesta en la temporada. Sin embargo, no podemos afirmar si esta disminución del contenido nutricional en huevos de hembras de segundo ciclo reproductivo fue consecuencia de la senescencia o del cambio en la estrategia de manejo de energía para la reproducción, ni como efectivamente afecta las larvas ya que ello implicaría realizar análisis de distintas variables de las larvas de ambos ciclos.

## 3.6 Conclusión

Tanto el ciclo reproductivo que atraviesan las hembras como los momentos de la corta temporada reproductiva afectaron el desempeño reproductivo de *L. uruguayensis* en una población de clima templado. Es importante resaltar que las diferencias más importantes en los parámetros reproductivos se registraron entre el inicio y el final de la temporada reproductiva, probablemente debido a que, en estos momentos, las hembras estaban utilizando exclusivamente la estrategia reproductiva de capitalización o de uso inmediato, respectivamente.

En base a estos resultados, rechazamos parcialmente la *hipótesis 1* ya que si bien el ciclo reproductivo de las hembras moduló la fecundidad debido a su estrecha relación con el tamaño, el rendimiento reproductivo fue similar para todas las hembras durante toda la temporada reproductiva. La *hipótesis 2* también es parcialmente rechazada ya que las proteínas y los lípidos totales

fueron igualmente afectados por el factor momentos de la temporada reproductiva y ciclo reproductivo.

# Capítulo 4

## Evaluación de la dinámica energética y el desempeño reproductivo de las hembras grandes de *Leptuca uruguayensis*

Los resultados de este capítulo han sido parcialmente publicados como:

Marciano, A., Colpo, K.D., Boy, C.C., and López Greco, L.S., 2022. Female energy dynamics in the southernmost fiddler crab: mixed breeding strategy in *Leptuca uruguayensis*. Zoology. *In press*, 126041.

## 4.1 Introducción

El esfuerzo reproductivo es un concepto central en la teoría de la evolución de las estrategias de vida, ya que refiere a la proporción de energía que los organismos derivan del presupuesto energético total al proceso reproductivo (Hirshfield y Tinkle, 1975). Por lo tanto, éstos deberán compensar los costos de la reproducción con los que también implican el mantenimiento somático y la supervivencia (Stearns, 1989). Así, el *fitness* no dependerá sólo de la reproducción, sino también de cómo esta se distribuya en su historia de vida (Bell, 1980).

Los esfuerzos para aumentar el *fitness* llevaron a los animales a desarrollar diferentes estrategias reproductivas para adquirir, almacenar y utilizar la energía para la reproducción (Stearns, 1992; McEwen y Wingfield, 2003; Ejsmond *et al*., 2015). Las “ventajas” y “desventajas” de cada estrategia dependen del tipo de organismo y del hábitat (Drent y Daan, 1980; Stephens *et al*., 2009). Como se menciona en los capítulos 2 y 3, se han definido dos estrategias alternativas de reproducción para describir cómo los organismos manejan o asignan la energía para reproducirse (Drent y Daan, 1980), y que hemos denominado en esta tesis como estrategia reproductiva de capitalización y de uso inmediato.

Las estrategias reproductivas de capitalización y uso inmediato se consideran los extremos de un gradiente, en el cual los individuos ajustan y combinan diferentes estrategias de acuerdo con sus necesidades (Houston *et al*., 2007; Griffen, 2018). Por ejemplo, en ambientes estables, una misma hembra puede tener una puesta utilizando mayoritariamente la estrategia reproductiva

de capitalización y luego alimentarse para tener una segunda puesta utilizando principalmente la de uso inmediato. Esto fue observado para la mosca *Sarcophaga crassipalpis* (Wessels *et al*., 2010), donde los autores utilizaron isótopos estables para cuantificar la asignación de recursos a las dos estrategias reproductivas y encontraron que, en la primera puesta, las proteínas provenían de las reservas acumuladas mientras que, para la segunda puesta, la energía provenía de los componentes captados en la dieta. Por otro lado, Varpe *et al*., (2007, 2009) modelaron para el copépodo *Calanoides acutus*, que vive en latitudes altas, diferentes escenarios considerando variables ambientales como la disponibilidad de alimento, la presencia de predadores y la temperatura, entre otros. Además, evaluaron variables como el tamaño y el estado fisiológico de las hembras y la producción de huevos. Los modelos matemáticos obtenidos se basaron en la historia de vida de estos animales y determinaron que los individuos que comienzan la temporada utilizando la estrategia reproductiva de capitalización continúan reproduciéndose utilizando la estrategia reproductiva de uso inmediato.

El desempeño reproductivo de las hembras no sólo es modulado por las estrategias reproductivas sino también por otros factores (Houston *et al*., 2007), como las puestas sucesivas y la edad de las hembras (Wouters *et al*., 1999; Wu *et al*., 2010; Jones *et al*., 2014). Estos factores producen, principalmente, el agotamiento de las reservas de las hembras en gónadas y órganos de almacenamiento (Palacios *et al*., 2000; Vazquez Boucard *et al*., 2004), lo que puede afectar el peso corporal de las hembras, la fecundidad y la calidad de los huevos (Arcos *et al*., 2003; Teixeira *et al*., 2017 entre otros).

Durante la maduración ovárica en los crustáceos decápodos el hepatopáncreas juega un papel fundamental ya que moviliza diferentes compuestos, como proteínas, lípidos y glucógeno, para sustentar el proceso reproductivo (Rani y Subramoniam, 1997; Mak *et al*., 2005; Rodríguez González *et al*., 2006; Vogt, 2019). Por eso, las dos herramientas más utilizadas para evaluar la contribución de la energía del hepatopáncreas a la maduración ovárica es la evidencia de una relación negativa significativa entre el peso del hepatopáncreas y el ovario en los días previos al desove, relativizado al peso corporal de la hembra (Griffen et al., 2011, 2012) y el seguimiento de compuestos desde el hepatopáncreas hasta el ovario maduro. Estos parámetros son indicadores de la estrategia reproductiva de capitalización (Pateraki y Stratakis, 2000; Griffen, 2018). La ausencia de relación entre el peso de estos órganos y los compuestos del hepatopáncreas en el ovario maduro es indicativa de que la maduración ovárica se sustenta en recursos no almacenados (Griffen, 2018).

Algunos indicadores de la estrategia reproductiva de uso inmediato pueden ser los cambios en la cantidad y la calidad del alimento ingerido, que fueron documentados para los cangrejos *Carcinus maenas* (Griffen, 2014) y *Aratus pisonii* (Carver *et al*., 2021) mediante el análisis de isótopos estables en el alimento que se utilizó para confirmar que estos nutrientes son transferidos a los ovarios en el proceso reproductivo. También se puede estimar la tasa de alimentación que en trabajos previos realizados en cangrejos violinistas como *Gelasimus vocans* y *Tubuca polita*, se ha demostrado que puede ser un factor importante en la ingesta de energía (Dye y Lasiak, 1986; Weis y Weis, 2004), pero está muy poco estudiado con relación al desempeño reproductivo.

En el capítulo 2 pudimos evidenciar que sólo algunas hembras grandes mayores de 12 mm de ancho del caparazón (AC) pueden tener dos puestas en la misma temporada reproductiva y sugerimos que estas hembras utilizan una estrategia mixta, primero de capitalización y luego de uso inmediato, para administrar la energía para la reproducción. Propusimos que la primera puesta fue subsidiada principalmente por las reservas acumuladas en el hepatopáncreas (estrategia de reproductiva de capitalización), ya que luego del primer evento de puesta, las mismas disminuyeron indicando que fueron utilizadas. Por otro lado, para la segunda puesta, propusimos que la remaduración ovárica estaría financiada mayormente por la energía proveniente del alimento ingerido durante la temporada reproductiva (estrategia reproductiva de uso inmediato), ya que las reservas en el hepatopáncreas no aumentaron significativamente hasta el final de la misma (capitulo 2) y, en trabajos previos, se comprobó que estos cangrejos se alimentan activamente durante la temporada reproductiva (Colpo y López Greco, 2018).

## 4.2 Objetivo

El objetivo de este capítulo fue evaluar la dinámica energética y el desempeño reproductivo de las hembras grandes de *L. uruguayensis* para conocer cómo combinan las diferentes estrategias reproductivas para tener su primera y segunda puesta.

En primer lugar, identificamos los momentos de la temporada reproductiva en que las hembras grandes tienen la primera y la segunda puesta, mediante el uso de mesocosmos. La dinámica energética se evaluó mediante la medición del contenido energético en el hepatopáncreas, ovario y huevos. La relación

entre los índices hepatosomático y gonadosomático se utilizó para evaluar la contribución del hepatopáncreas a la maduración del ovario como indicativo de la estrategia reproductiva de capitalización. Se estimó la tasa de alimentación, la energía disponible en el recurso alimenticio (sedimento) y la cantidad consumida del mismo para evaluar la importancia de la ingesta de energía en la maduración del ovario, como indicativo de la estrategia reproductiva de uso inmediato. Además, se midieron algunas variables reproductivas como la fecundidad, peso seco de la puesta de huevos y peso seco del cuerpo de la hembra, para evaluar los efectos de cada estrategia en el desempeño reproductivo de las hembras en cada puesta.

En el marco de este objetivo, se plantean tres hipótesis:

- *Hipótesis 1:* Para la primera puesta, el ovario madurará y su energía aumentará principalmente debido a la contribución energética del hepatopáncreas que disminuirá, lo que indica el uso principal de la estrategia reproductiva de capitalización.
- *Hipótesis 2:* La remaduración ovárica, que resultará en la segunda puesta, se deberá principalmente al aumento de la ingesta de energía respecto de los días previos a la primera puesta. Dicho aumento indica el uso mayoritario de la estrategia reproductiva de uso inmediato.
- *Hipótesis 3*: La segunda puesta de huevos será más pequeña y las hembras ovígeras perderán masa corporal respecto de la primera puesta debido a la reducción en las reservas energéticas de las hembras grandes hacia el final de la temporada reproductiva.

## 4.3 Materiales y métodos

### 4.3.1 Área de estudio, muestreo de cangrejos y procedimientos de laboratorio

Se realizaron ocho muestreos cada 18 ± 7 días, durante la temporada reproductiva de *L. uruguayensis*, del 5 de noviembre de 2019 al 5 de marzo de 2020, en la misma ubicación detallada en los capítulos 2 y 3. En cada fecha de muestreo, las hembras grandes ovígeras y no ovígeras de *L. uruguayensis* fueron muestreadas, como se indica en el capítulo 2, por dos personas entrenadas durante 1 h. Las hembras fueron trasladadas al laboratorio, donde fueron lavadas con agua, sacrificadas utilizando anestesia por frío durante 15 minutos, secadas con papel absorbente, medidas con calibre, y pesadas para obtener el peso húmedo de la hembra.

Las hembras no ovígeras fueron disecadas para obtener el hepatopáncreas y el ovario, los cuales fueron pesados. El peso húmedo de las hembras, el hepatopáncreas y los ovarios se utilizaron para determinar el índice hepatosomático (IHS = peso húmedo del hepatopáncreas / peso húmedo del cuerpo de la hembra) y el índice gonadosomático (IGS = peso húmedo de la gónada / peso húmedo del cuerpo de la hembra), como fue descripto en el capítulo 2. Para los análisis que involucraron hepatopáncreas y ovario, usamos sólo hembras que presentaron un IGS superior a 4, ya que implica que estas hembras presentan ovarios desarrollados y en desarrollo (capítulo 2) que estarían preparándose para desovar en el siguiente evento de puesta. Las hembras ovígeras fueron examinadas bajo lupa para determinar la etapa de desarrollo embrionario. Sólo se utilizaron hembras con huevos en estadio inicial

del desarrollo embrionario. Los huevos se extrajeron de los pleópodos de las hembras con pinzas finas y se pesaron.

### 4.3.2 Identificación de los momentos de puesta

Para identificar cuándo las hembras tienen la primera y la segunda puesta en la temporada reproductiva, 40 hembras grandes no ovígeras fueron etiquetadas y confinadas en mesocosmos establecidos en el campo durante la temporada reproductiva 2019-2020. Estas hembras fueron seguidas a lo largo de la temporada reproductiva y su estado de ovígera o no ovígera fue monitoreado en cada fecha de muestreo. El procedimiento del mesocosmos se encuentra detallado en el capítulo 2.

### 4.3.3 Contenido energético del hepatopáncreas, ovario y huevos

El contenido energético en el hepatopáncreas y en el ovario de las hembras no ovígeras, y en los huevos de las hembras ovígeras muestreados en los momentos de puesta, se estimó sumando la energía aportada por las proteínas totales, los lípidos totales y el glucógeno existente en cada uno (Rosa y Nunes, 2003; Tropea y López Greco, 2015). Para obtener la masa crítica suficiente para realizar las determinaciones bioquímicas de estos compuestos, se pesaron y agruparon el hepatopáncreas y los ovarios de cinco hembras (con IGS mayor a 4) conformando un total de seis grupos por fecha de muestreo de cada tejido. Cada grupo se consideró una réplica de hepatopáncreas y ovarios, mientras que cada puesta de huevos se analizó individualmente (cinco puestas de huevos por cada momento de puesta). Estos grupos de hepatopáncreas y ovarios y las puestas huevos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones bioquímicas.

La determinación del contenido de proteínas y lípidos totales y glucógeno se realizó mediante la misma metodología descripta en el capítulo 2. Para estimar el contenido energético por gramo de hepatopáncreas, ovario y huevos, se sumó la energía aportada por cada compuesto bioquímico, según los siguientes factores de conversión: 23,42 J/mg para proteínas, 39,31 J/mg para lípidos y 17,14 J/mg para carbohidratos (Winberg, 1971). La fracción de carbohidratos se estimó únicamente por el contenido de glucógeno. Los valores se expresaron como contenido energético (kJ/g) del hepatopáncreas, ovario y huevos.

Es necesario destacar que las metodologías aplicadas permiten realizar una aproximación energética de los recursos disponibles para ser utilizados por cada órgano y los huevos. Hay que considerar que al analizar lípidos y proteínas totales (los métodos cuantifican en la fracción soluble) se están evaluando también compuestos estructurales que en general no se encuentran biodisponibles para que los animales los transformen en energía. En general para crustáceos, los principales componentes lipídicos que se utilizan para soportar el proceso reproductivo son los triglicéridos y los ácidos grasos, pero hay otros, como los fosfolípidos, que son estructurales (Rosa y Nunes, 2003). Lo mismo ocurre con las proteínas, como las vitelinas (Subramoniam, 2011), pero también están las que forman parte de las membranas o mismo conforman los embriones (Clarke *et al*., 1991) y que no están disponibles como “combustible”.

### 4.3.4 Ingesta de energía

Para determinar la ingesta de energía que tiene *L. uruguayensis* se evaluaron: la tasa de alimentación de las hembras, la energía disponible en el recurso alimentario (sedimento) y la cantidad consumida del mismo.

*Leptuca uruguayensis* presenta un hábito detritívoro. Las hembras utilizan los dos quelípedos simétricos, cuyos própodo y dáctilo en forma de cuchara raspan el sedimento de la superficie para llevarlo a la boca (Barnes, 1989). Luego, setas especializadas presentes en los maxilipedios separan las partículas orgánicas de las inorgánicas (Colpo, 2005; Colpo y Negreiros Fransozo, 2011, 2013). Para evaluar la tasa de alimentación en cada fecha de muestreo, se filmó el comportamiento de 38 hembras entre 1 h antes y 1 h después de la marea baja diurna, ya que es cuando las hembras de *L. uruguayensis* están más activas durante la temporada reproductiva (Ribeiro *et al*., 2016). Si bien la metodología para el estudio del comportamiento en cangrejos violinistas es muy variada (Dye y Lasiak, 1986; Weis y Weis, 2004; Tina *et al*., 2015; Vianna *et al*., 2020), en este trabajo aplicamos la realizada por Colpo y López Greco (2018) para esta misma especie en la Bahía de Samborombón, donde cada cangrejo fue filmado durante 2 minutos, y los registros se realizaron a una distancia mínima de 6 m para evitar la interferencia del observador en las actividades de los cangrejos. Durante el análisis de los videos se contó el número de veces que una hembra llevó cada quelípedo a la boca por minuto y esto se consideró la *tasa de alimentación* (número de veces que la hembra lleva el quelípedo a la boca/min) (Weis y Weis, 2004).

Para determinar la *energía disponible en el recurso alimentario*, en cada fecha de muestreo se tomaron seis muestras de sedimento alrededor de las

cuevas de *L. uruguayensis*, en zonas sin rastros de alimentación de cangrejos (pellets de alimentación y huellas) (Saher y Qureshi, 2014). Cada muestra de sedimento estuvo compuesta por dos submuestras que se obtuvieron con un sacabocados de 10 mm de diámetro (jeringa) y 3-4 mm de profundidad, las cuales se almacenaron en un tubo Eppendorf® (Ribeiro e Iribarne, 2011). Las muestras de sedimento se transportaron al laboratorio en hielo.

Una vez en el laboratorio se registró el peso húmedo de las muestras de sedimento y, después de tres días en estufa a 45 °C, se registró el peso seco. Las muestras secas fueron tamizadas, molidas con mortero y peletizadas con una prensa Parr 2812. El contenido calórico de cada muestra se obtuvo quemando los pellets (80 - 150 mg) en una semi micro bomba calorimétrica Parr 1425 (Lucas, 1996; Boy *et al*., 2009). Los valores obtenidos se corrigieron por el contenido de cenizas y ácidos y se expresaron como densidad energética: kJ/g peso seco libre de cenizas (PSLC). Las calibraciones de ácido benzoico se llevaron a cabo periódicamente. Estas determinaciones fueron realizadas por la Dra. Claudia C. Boy en el Laboratorio de Ecología, Fisiología y Evolución de Organismos Acuáticos (CADIC) siguiendo los protocolos previamente aplicados en *Galaxias maculatus* (Boy *et al*., 2009), *Cosmasterias lurida* (Cossi *et al*., 2017) y *Diplopteraster verrucosus* (Fraysse *et al*., 2020).

Con el fin conocer *la ingesta de energía* que tienen las hembras de *L. uruguayensis*, fue necesario evaluar la cantidad de sedimento que procesan y relacionarlo con la energía presente en el mismo. Para esto se estimó, a partir de una estrategia de extrapolación, el peso de la porción de sedimento tomado por las hembras cada vez que se llevan el quelípedo a la boca y se lo multiplicó

por la tasa de alimentación calculada y por la energía presente en cada gramo de sedimento, en cada muestreo de la temporada reproductiva.

El própodo y el dáctilo presentan en su cara interna una concavidad rodeada de setas que funciona como una cuchara, permitiendo a los cangrejos levantar el sedimento y llevarlo a la boca (Miller, 1961; Costa y Negreiros Fransozo, 2001). Cuando las hembras se alimentan, raspan la parte distal del quelípedo abierto en el sedimento y cuando lo cierran obtienen una porción del mismo (Colpo y Negreiros Fransozo, 2013). Con base en observaciones realizadas en el campo, se consideró que la forma aproximada que adquiere la porción de sedimento manipulada por los quelípedos es de una esfera. Por lo tanto, para estimar el tamaño de la porción de sedimento que una hembra de *L. uruguayensis* lleva a la boca, fue necesario conocer el volumen de esta esfera. Para esto, se midieron en mm el ancho, el largo y el alto de la parte del quelípedo que manipula el sedimento.

Se midieron los quelípedos de 20 hembras grandes, utilizando una lupa Zeiss® con lente graduada. El ancho y el largo de la concavidad del própodo y del dáctilo del quelípedo, con las cuales manipulan el sedimento, fueron medidos como se indica en la Figura 4.1 A. Estas medidas se promediaron para obtener el ancho promedio y el largo promedio de la concavidad del quelípedo, respectivamente. Debido a que la apertura del quelípedo es variable y puede afectar el tamaño de la esfera, se estimaron tres alturas diferentes considerando las medidas tomadas para cada apertura. Se consideró la apertura *mínima* cuando el própodo y el dáctilo están juntos, la apertura *relajada* cuando están abiertos, pero el dáctilo está por debajo de la línea del própodo, y la apertura *máxima* cuando el dáctilo está abierto justo a la altura del própodo (Figura 4.1).

Estas tres medidas de aperturas fueron promediadas y representaron el alto promedio de la esfera de sedimento que las hembras pueden llevar a la boca. El ancho, largo y alto promedio del quelípedo fueron a su vez promediados y ese valor representó el diámetro de la esfera (*d*) en la ecuación: $d^3 \frac{1}{6} \pi$, que estima volumen, en $mm^3$.

Una vez conocido el volumen promedio de las porciones tomadas por las hembras, el próximo paso fue estimar el peso de las mismas. Para eso, se prepararon 20 pequeñas esferas con el sedimento del ambiente, cuidando de no compactarlo demasiado. Cada esfera fue pesada en balanza de precisión (mg) y medida con calibre (ancho, largo y alto en mm). Con estas medidas, se calculó un diámetro promedio (*d*) que fue utilizado en la ecuación de la esfera, como fue descrito anteriormente ($d^3 \frac{1}{6} \pi$). Se relacionó el peso y el volumen de las 20 esferas preparadas y se aplicó una ecuación lineal $y = ax + b$, en donde $y$ corresponde al peso en mg de la esfera y $x$, al volumen en $mm^3$. A partir de esta ecuación lineal y del volumen promedio estimado para las porciones de sedimento que las hembras pueden manipular con sus quelípedos, se pudo estimar el peso promedio aproximado (mg) de cada porción de sedimento que las hembras de *L. uruguayensis* pueden llevar a la boca.

Finalmente, para calcular la *ingesta de energía* en cada muestreo de la temporada reproductiva, el peso de la porción de sedimento promedio que manipulan las hembras con sus quelípedos se multiplicó por el número de veces que cada hembra lleva los quelípedos a la boca por minuto. De esta manera se estimó en gramos la cantidad de sedimento que las hembras consumen por minuto (g de sedimento/min). Este valor fue multiplicado por el contenido de

energía en cada gramo del sedimento en cada fecha de muestreo (kJ/g PSLC) para conocer la *ingesta de energía* (kJ/min).

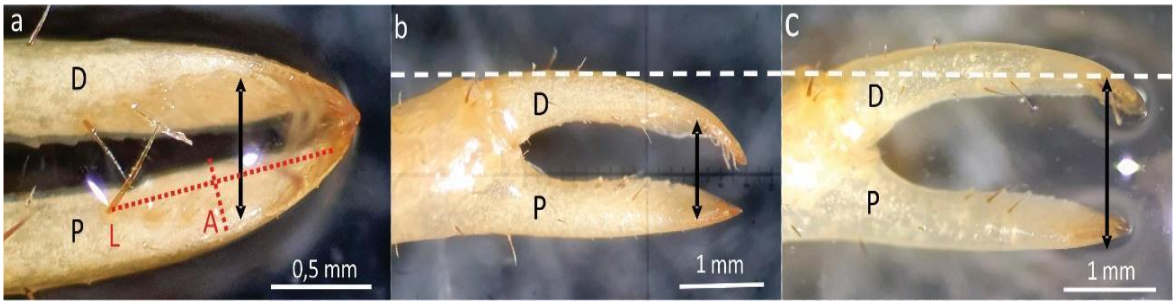


Figura 4.1: Quelípedos de las hembras grandes de *Leptuca uruguayensis*. (a) Líneas punteadas rojas representan el ancho (A) y largo (L) de la concavidad del própodo (P) y dáctilo (D) y muestra la apertura mínima indicada con la flecha negra. (b) La flecha negra muestra la apertura relajada, donde se puede ver que la apertura del dáctilo no supera el límite del própodo, indicado con la línea punteada blanca. (c) La flecha negra muestra la apertura máxima, donde se puede ver que la apertura del dáctilo está justo en el límite del própodo, indicado con la línea punteada blanca.

### 4.3.5 Desempeño reproductivo

El desempeño reproductivo se estimó a través de la fecundidad, el peso seco de las puestas de huevos y el peso seco corporal de las hembras. La fecundidad se estimó siguiendo la metodología detallada en el capítulo 3. El peso seco de las puestas de huevos y el peso seco de las hembras se estimó después de secarlos a 45 °C, durante tres días hasta que alcanzaron un peso seco constante.

### 4.3.6 Análisis estadísticos

Se utilizó un modelo de regresión lineal para evaluar la relación entre el IHS y IGS en los días previos a cada momento de puesta, el IHS como variable predictora y el IGS como variable respuesta. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar el IHS, IGS, los contenidos de proteínas totales, lípidos totales, glucógeno y el contenido de energía del hepatopáncreas,

ovario y huevos entre las fechas de muestreo, así como la tasa de alimentación, el contenido de energía del sedimento y el AC de las hembras. Se utilizaron regresiones lineales para estimar la relación del AC (variable predictora) con la fecundidad, el peso seco de las puestas de huevos y el peso seco de las hembras (variables dependientes), en cada momento de puesta. Posteriormente, se utilizó el análisis de covarianza (ANCOVA) para comparar las pendientes y ordenadas de estas regresiones entre la primera y la segunda puesta (variable de agrupamiento), con el AC como covariable. Los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homocedasticidad con las pruebas de Shapiro-Willks y Levene, respectivamente. Cuando fue necesario, se modeló la estructura de la varianza (Zuur *et al*., 2010). Se aplicó la prueba de Tukey cuando se encontraron diferencias significativas. Todas las pruebas se realizaron al 95% de nivel de significancia utilizando el software R 4.0.3 (RStudio Team, 2015).

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Identificación de los momentos de puesta

El seguimiento de las hembras en los mesocosmos a lo largo de la temporada reproductiva permitió reconocer dos momentos principales de puesta, es decir, cuando más del 65% de las hembras grandes de la población estaban ovígeras. El primer momento de puesta fue la 3$^{ra}$ fecha de muestreo (5 de diciembre de 2019) y, el segundo, la 6$^{ta}$ fecha de muestreo (3 de febrero de 2020) (Tabla 4.1). En la 3$^{ra}$ fecha de muestreo, el 100% de las hembras ovígeras estaban teniendo su primera puesta y, en la 6$^{ta}$ fecha de muestreo, el 81,8% estaban teniendo su segunda puesta de la temporada reproductiva. (Tabla 4.1). Dado que la primera puesta ocurrió en la 3$^{ra}$ fecha de muestreo, la 1$^{ra}$ y 2$^{da}$ fechas

de muestreo (5 y 20 de noviembre de 2019) se consideraron alrededor de 30 y 15 días, respectivamente, antes de la primera puesta. Asimismo, como la segunda puesta ocurrió en la 6$^{ta}$ fecha de muestreo, la 4$^{ta}$ y 5$^{ta}$ fechas de muestreo (4 y 17 de enero de 2020) se consideraron alrededor de 30 y 15 días, respectivamente, antes de la segunda puesta (Tabla 4.1). La ausencia de hembras ovígeras en las 7$^{ma}$ y 8$^{va}$ fechas de muestreo (3 y 18 de febrero de 2020) indica que la temporada reproductiva había terminado para las hembras grandes (Tabla 4.1).

Se registró una relación negativa significativa entre IHS y IGS de hembras no ovígeras colectadas antes del primer momento de puesta (1$^{ra}$ y 2$^{da}$ fechas de muestreo) (resultado modelo lineal: $F_{1;61}$= 24,7; $p < 0,001$) (Figura 4.2 A), mientras que no se registró una relación significativa entre IHS y IGS de hembras no ovígeras colectadas antes del segundo momento de puesta (4$^{ta}$ y 5$^{ta}$ fechas de muestreo) (resultado modelo lineal: $F_{1;\,22}$ = 2,5; $p = 0,125$) (Figura 4.2 B).

Tabla 4.1: Porcentaje total de hembras ovígeras de *Leptuca uruguayensis* registradas en los mesocosmos, en cada fecha de muestreo. También se muestra el porcentaje de hembras que están teniendo una puesta de huevos por primera y por segunda vez en la temporada reproductiva (TR), para cada fecha de muestreo.

| Fecha | Fecha de muestreo | N hembras | Definición de la fecha de muestreo | Ovígeras en los mesocosmos (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Total | Primera puesta de la TR | Segunda puesta de la TR |
| 5 nov 2019 | 1er muestreo | 40 | 30 días antes de la primera puesta | 0 | 0 | 0 |
| 20 nov 2019 | 2do muestreo | 39 | 15 días antes de la primera puesta | 10,3 | 100 | 0 |
| 5 dic 2019 | 3er muestreo | 29 | Primera puesta | 69 | 100 | 0 |
| 4 enero 2019 | 4to muestreo | 26 | 30 días antes de la segunda puesta | 11,5 | 100 | 0 |
| 17 enero 2019 | 5tp muestreo | 21 | 15 días antes de la segunda puesta | 0 | 0 | 0 |
| 3 febrero 2020 | 6to muestreo | 16 | Segunda puesta | 68,8 | 18,2 | 81,8 |
| 18 febrero 2020 | 7mo muestreo | 15 | Final de la TR | 0 | 0 | 0 |
| 5 marzo 2020 | 8vo muestreo | 14 | Final de la TR | 0 | 0 | 0 |

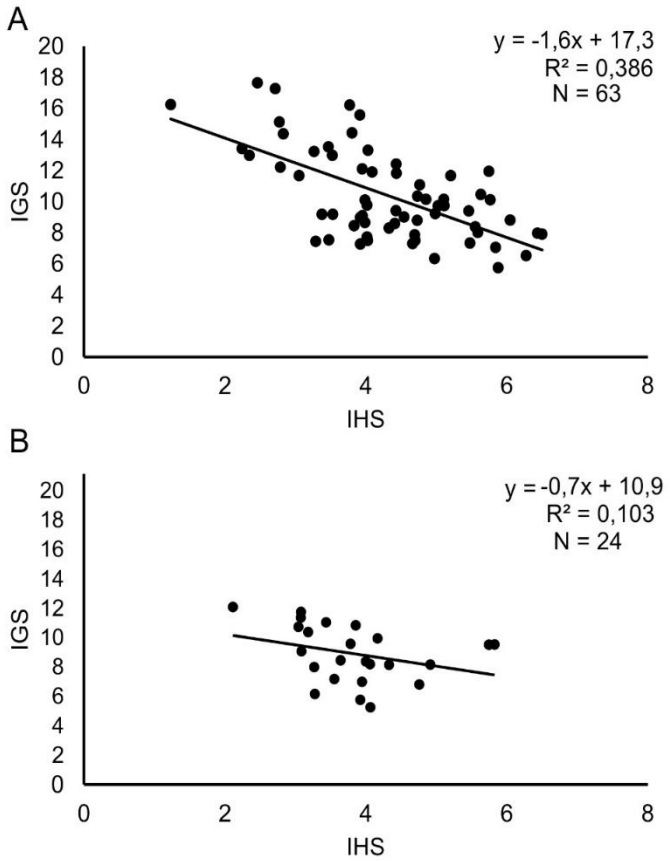


Figura 4.2: Relación entre el índice hepatosomático (IHS) y el índice gonadosomático (IGS) de las hembras en (A) los días previos a la primera puesta (1ra y 2da fechas de muestreo) y (B) los días previos a la segunda puesta (4ta y 5ta fechas de muestreo).

El IHS mostró el mayor valor en los 30 días antes de la primera puesta, luego disminuyó 20,9% en los 15 días siguientes. Un mes después de la primera puesta, el IHS aumentó un 18,1% en los 30 días antes de la segunda puesta, para finalmente disminuir un 27,5% en los 15 días antes de la segunda puesta (resultado ANOVA de una vía: $F_{3;83}$= 17; $p < 0,001$) (Figura 4.3 A). El IGS aumentó un 26,5% desde los 30 días hasta los 15 días antes de la primera puesta, y volvió a aumentar un 23,6% desde los 30 días hasta los 15 días antes de la segunda puesta (resultado ANOVA de una vía: $F_{3;\ 83}$ = 15,1; $p < 0,001$) (Figura 4.3 B). Sin embargo, el IGS registrado 15 días antes de la primera puesta fue un 24,1% mayor que el IGS de 15 días antes de la segunda puesta.

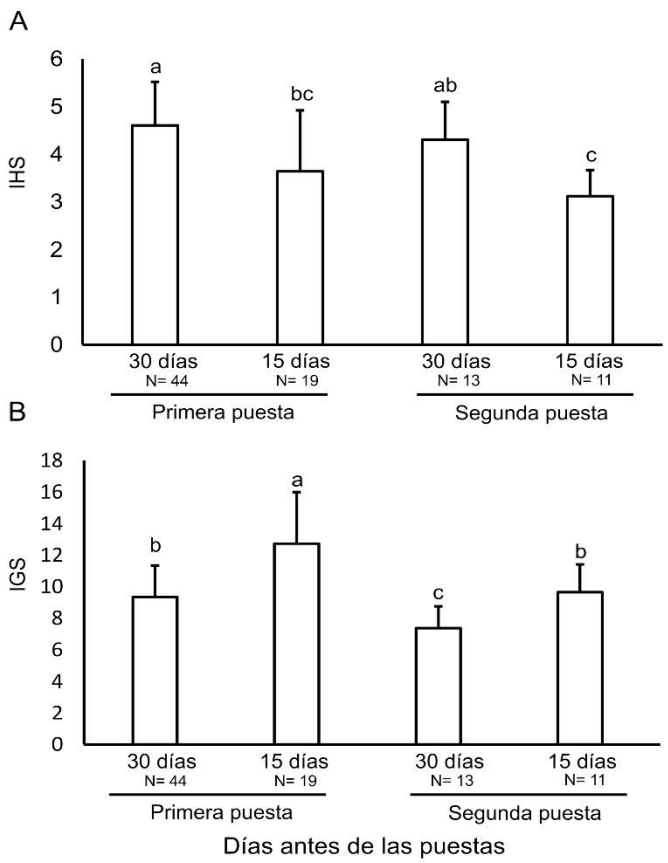


Figura 4.3: Índice hepatosomático (IHS) e índice gonadosomático (IGS) de hembras grandes de *Leptuca uruguayensis*. (A) IHS y (B) IGS en 30 y 15 días antes de las primera y segunda puesta. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios ± DE.

### 4.4.2 Contenido energético del hepatopáncreas, ovario y huevos

La mayor parte de la energía en el hepatopáncreas fue proporcionada por los lípidos (93% en promedio). El contenido de energía del hepatopáncreas difirió sólo entre los 30 días antes de la primera puesta y los 30 días antes de la segunda puesta, cuando fue un 33% más bajo (Figura 4.4 A) (resultado ANOVA de una vía: $F_{3;18} = 3,9$; $p = 0,024$). Este resultado se debió al contenido de lípidos totales, que también disminuyó un 50% entre los 30 días antes de la primera puesta y los 30 días antes de la segunda puesta (Tabla 4.2).

La mayor parte de la energía en el ovario fue proporcionada por los lípidos y las proteínas totales (en promedio 61% y 37%, respectivamente), y tales proporciones se mantuvieron similares a lo largo de la temporada reproductiva

(Tabla 4.2). El contenido de energía del ovario no difirió entre los días previos a las puestas (Figura 4.4 B) (resultado ANOVA de una vía: $F_{3;18} = 1,7$; $p = 0,202$).

En el caso de los huevos, la mayor parte de la energía en los huevos también fue proporcionada por los lípidos y las proteínas totales (en promedio, 57% y 41% respectivamente), y tales proporciones fueron similares entre los huevos producidos por las hembras en ambas puestas (Tabla 4.3). El contenido de energía de los huevos también fue similar entre la primera y segunda puesta producidas por las hembras (Figura 4.4 C) (resultado ANOVA de una vía: $F_{1;8}= 0,8$; $p= 0,406$).

El glucógeno fue el compuesto que menos energía aportó al hepatopáncreas, ovario y huevos (en promedio 2%), y solo mostró diferencias significativas en el ovario entre los 15 días antes de la primera puesta y los 30 días antes de la segunda puesta (Tabla 4.2).

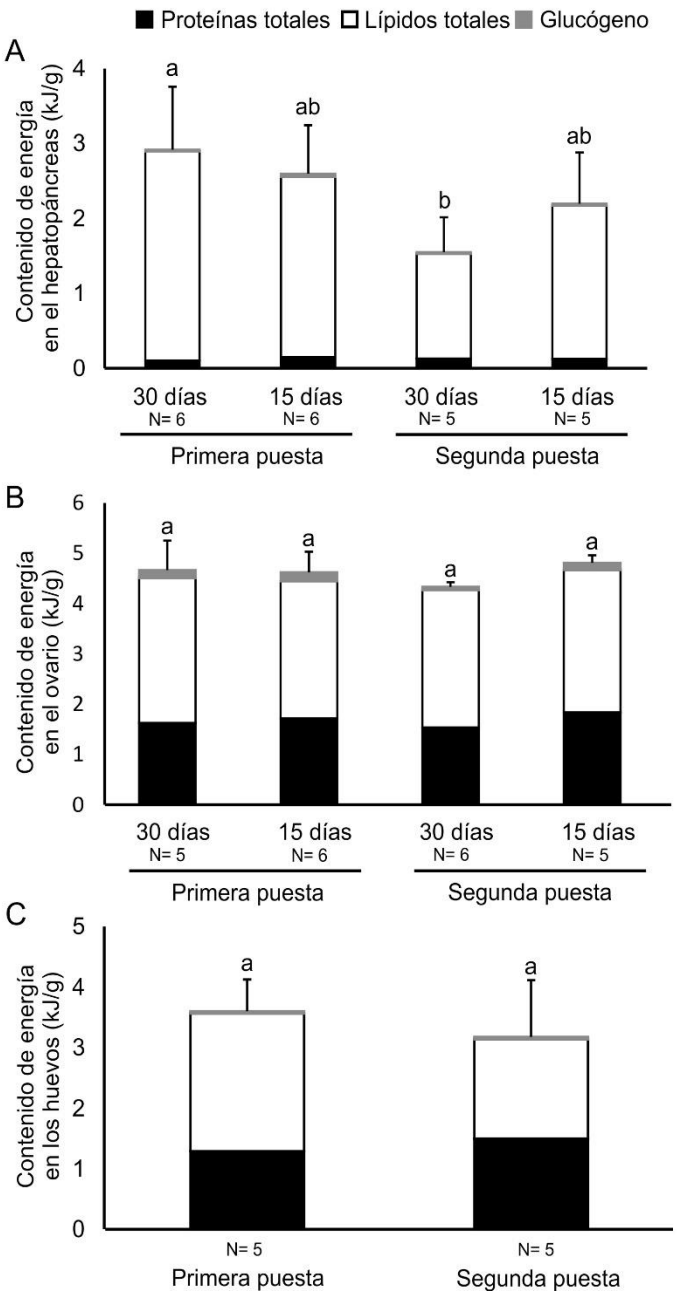


Figura 4.4: Contenido energético del hepatopáncreas, ovario y huevos de hembras grandes de *Leptuca uruguayensis*. Contenido de energía en (A) hepatopáncreas y (B) ovario en los 30 y 15 días antes de la primera y segunda puesta y (C) contenido de energía de los huevos producidos por hembras grandes en la primera y segunda puesta. El N indicado para el contenido de energía en hepatopáncreas y ovario corresponden a muestras de cinco hembras. El N indicado para huevos corresponde a cada puesta de huevos evaluada. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios ± DE del contenido energético del hepatopáncreas, ovario y huevos.

Además, se muestra la energía proporcionada por las proteínas totales (negro), los lípidos totales (blanco) y el glucógeno (gris).

Las diferencias estadísticas entre la energía proporcionada por las proteínas, los lípidos y el glucógeno se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Comparación de la energía aportada por los compuestos bioquímicos (proteínas totales, lípidos totales y glucógeno) al hepatopáncreas, ovario y huevos de hembras grandes de *Leptuca uruguayensis*. Para el hepatopáncreas y el ovario, las comparaciones se realizaron entre los días previos a las puestas correspondientes a la estrategia reproductiva de capitalización y uso inmediato. Para los huevos, las comparaciones se realizaron entre los huevos producidos utilizando cada estrategia reproductiva. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

| | Compuestos bioquímicos | ANOVA | | | | Tukey test | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Factores | gl | F | p | Niveles | Resultados |
| Hepatopáncreas | Lípidos totales | Días antes de las puestas | 3 | 4,14 | 0,02 | 30 días antes de la primera puesta | a |
| | | Error | 18 | | | 15 días antes de la primera puesta | ab |
| | | | | | | 30 días antes de la segunda puesta | b |
| | | | | | | 15 días antes de la segunda puesta | ab |
| | Proteínas totales | Días antes de las puestas | 3 | 1,07 | 0,39 | 30 días antes de la primera puesta | a |
| | | Error | 18 | | | 15 días antes de la primera puesta | a |
| | | | | | | 30 días antes de la segunda puesta | a |
| | | | | | | 15 días antes de la segunda puesta | a |
| | Glucógeno | Días antes de las puestas | 3 | 1,34 | 0,29 | 30 días antes de la primera puesta | a |
| | | Error | 19 | | | 15 días antes de la primera puesta | a |
| | | | | | | 30 días antes de la segunda puesta | a |
| | | | | | | 15 días antes de la segunda puesta | a |
| Ovario | Lípidos totales | Días antes de las puestas | 3 | 0,76 | 0,53 | 30 días antes de la primera puesta | a |
| | | Error | 18 | | | 15 días antes de la primera puesta | a |
| | | | | | | 30 días antes de la segunda puesta | a |
| | | | | | | 15 días antes de la segunda puesta | a |
| | Proteínas totales | Días antes de las puestas | 3 | 0,59 | 0,63 | 30 días antes de la primera puesta | a |
| | | Error | 18 | | | 15 días antes de la primera puesta | a |
| | | | | | | 30 días antes de la segunda puesta | a |
| | | | | | | 15 días antes de la segunda puesta | a |
| | Glucógeno | Días antes de las puestas | 3 | 3,68 | 0,03 | 30 días antes de la primera puesta | ab |
| | | Error | 18 | | | 15 días antes de la primera puesta | a |
| | | | | | | 30 días antes de la segunda puesta | b |
| | | | | | | 15 días antes de la segunda puesta | ab |
| Huevos | Lípidos totales | Puesta | 1 | 4,89 | 0,06 | Primera puesta | a |
| | | Error | 8 | | | Segunda puesta | a |
| | Proteínas totales | Puesta | 1 | 0,36 | 0,56 | Primera puesta | a |
| | | Error | 8 | | | Segunda puesta | a |
| | Glucógeno | Puesta | 1 | 0,04 | 0,85 | Primera puesta | a |
| | | Error | 8 | | | Segunda puesta | a |

### 4.4.3 Ingesta de energía

Con relación a la tasa de alimentación, en promedio, las hembras grandes de *L. uruguayensis* se llevan sus quelípedos a la boca 63,5 ± 22,3 veces por minuto. Entre los 30 y 15 días antes de la primera puesta, la tasa de alimentación aumentó un 28,3% (Figura 4.5 A). A pesar de que la tasa de alimentación no se pudo medir en los 30 días antes de la segunda puesta debido a las condiciones climáticas, se observó un aumento del 33% en la tasa de alimentación 15 días antes de la segunda puesta, en comparación con los valores registrados para los 15 días antes de la primera puesta (Figura 4.5 A) (resultado ANOVA de una vía: $F_{2;35} = 14,5$; $p < 0,001$).

Las muestras de sedimento presentaron un alto nivel de material inorgánico, entre un 61,9 y 98,2%. La densidad de energía evaluada en estas muestras mostró que el contenido de energía del sedimento no difirió significativamente entre los días previos a las puestas siendo el valor promedio de 3 ± 0,5 kJ/g PSLC (Figura 4.5 B) (resultado ANOVA de una vía: $F_{3;20} = 1,6$; $p = 0,219$).

A partir de las medidas tomadas en los quelípedos de las hembras, el ancho promedio de la concavidad del quelípedo fue estimado en 0,4 ± 0,02 mm y el largo promedio fue 1,1 ± 0,2 mm. La altura calculada para la apertura mínima fue de 0,6 ± 0,1 mm, para la relajada fue de 0,9 ± 0,1 mm y para la máxima de 1,3 ± 0,2 mm, dando como resultado una altura promedio de 0,9 ± 0,3 mm. Con estos datos se calculó el diámetro promedio ($d$ = 0,8), que fue utilizado en la ecuación de la esfera para obtener el volumen promedio de la porción de sedimento manipulado por las hembras, que fue de 0,3 ± 0,1 $mm^3$.

El volumen de las porciones de sedimento preparadas varió entre 2 y 9,2 $mm^3$ y, su peso, entre 6 y 19 mg. La relación entre estas variables permitió obtener la ecuación $y = 1,6\,x + 4,7$, ($R^2 = 0,63$) donde se introdujo el volumen promedio calculado a partir de las medidas de los quelípedos. Esto permitió estimar el peso promedio de cada porción de sedimento que la hembra lleva a la boca en 5,2 ± 0,2 mg.

Este valor fue considerado en gramos para multiplicarlo por la tasa de alimentación registrada para cada hembra en los días previos a cada puesta, lo que permitió estimar que las hembras llevan a la boca una cantidad de sedimento que varía entre 0,04 y 0,6 g de sedimento/min. Luego, para calcular la ingesta de energía, se multiplicaron estos valores por el valor promedio de contenido de energía en el sedimento informado para cada muestreo. Se observa que en los días anteriores a la primera puesta la ingesta de energía fue similar y que aumentó significativamente un 43% en los 15 días previos a la segunda puesta (Figura 4.5 C) (resultado ANOVA: $F_{2;35} = 21,9$; $p < 0,001$). No se pudo estimar la ingesta de energía en los 30 días antes de la segunda puesta ya que para ese día no se conoce la tasa de alimentación, que es necesaria para el cálculo.

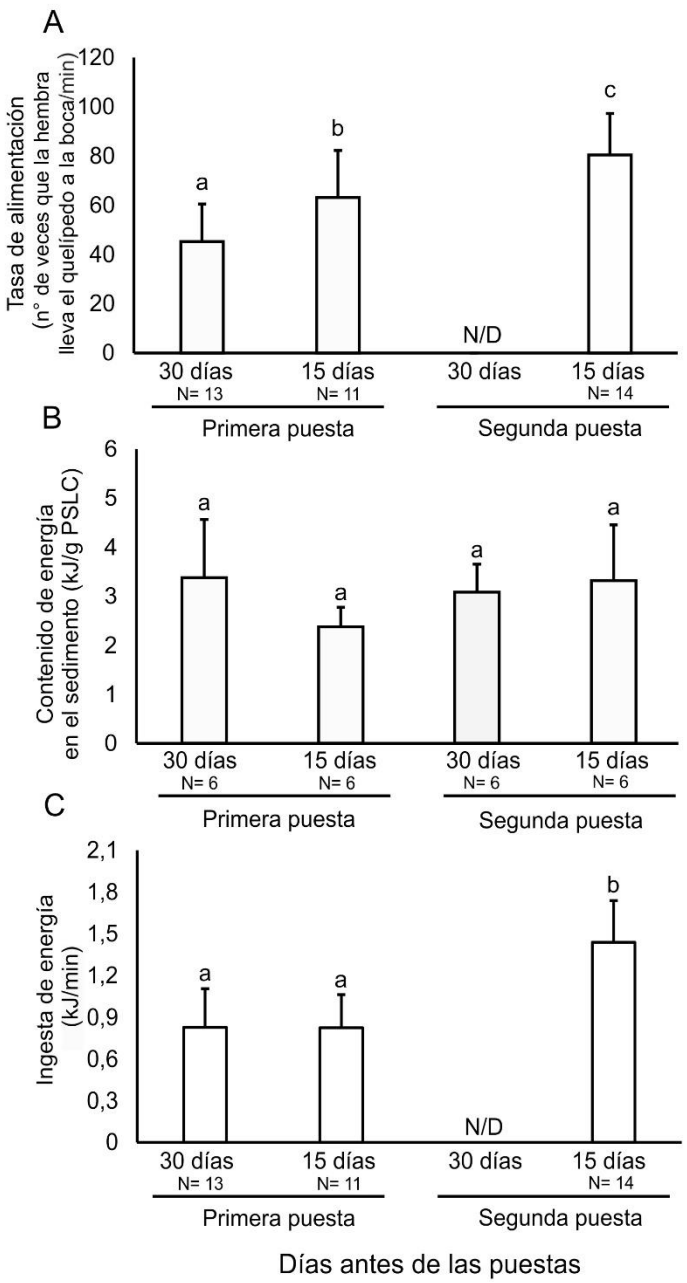


Figura 4.5: Ingesta de energía en hembras grandes de *Leptuca uruguayensis*. (A) Tasa de alimentación, (B) Contenido de energía en el sedimento y (C) Ingesta de energía en los 30 y 15 días antes de la primera y segunda puesta. PSLC: peso seco libre de cenizas. N/D significa que la información no está disponible. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores medios ± DE ($p < 0,05$).

### 4.4.4 Desempeño reproductivo

Las regresiones lineales mostraron una relación positiva entre el tamaño de las hembras (AC) y la fecundidad, el peso seco de las puestas de huevos y el peso seco del cuerpo de las hembras ($p < 0,05$). Las puestas de huevos producidas por las hembras grandes de *L. uruguayensis* en la primera puesta tuvieron, en promedio, un 12% más fecundidad y un 11 % más peso seco (Figura 4.6 A; 4.6 B; resultados de ANCOVA en la Tabla 3) y dichas hembras ovígeras

fueron, en promedio, un 12,3% más pesadas (Figura 4.6 C; resultados de ANCOVA en la Tabla 4.3) que las de la segunda puesta.

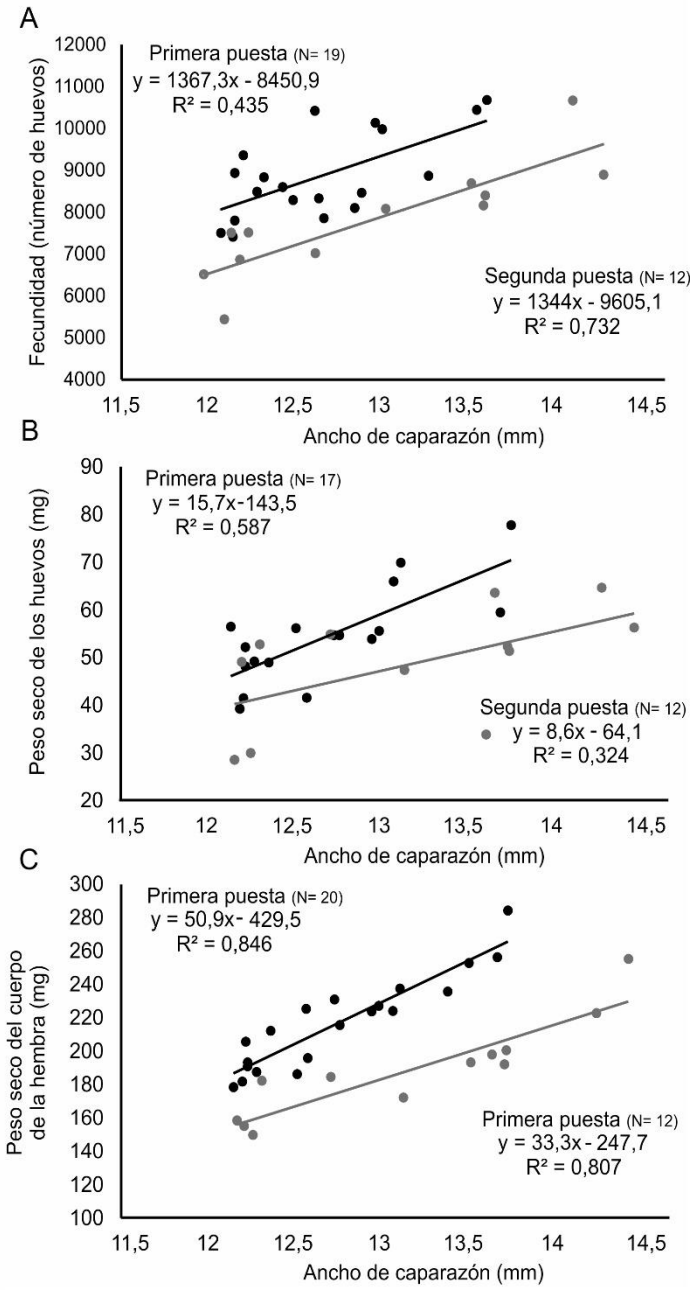


Figura 4.6: Desempeño reproductivo de hembras grandes de *Leptuca uruguayensis*. (A) Fecundidad, (B) Peso seco de las puestas de huevos y (C) Peso seco del cuerpo de la hembra en la primera (negro) y segunda puesta (gris). Se muestra la ecuación lineal y el $R^2$ para las variables en cada estrategia reproductiva.

Tabla 4.3: Comparación del desempeño reproductivo de hembras ovígeras de *Leptuca uruguayensis* entre la primera y segunda puesta. Los resultados de ANCOVA indicaron diferencias significativas ($p < 0.05$) de las pendientes y de las ordenadas en las regresiones lineales que relacionaron el ancho del caparazón con la fecundidad, el peso seco de las puestas de huevos y el peso seco del cuerpo de la hembra (ecuaciones en la Figura 4.5).

| Variables reproductivas | Puestas | N | Resultados del ANCOVA | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Comparación de pendientes | | Comparación de ordenadas | |
| | | | F | p | F | p |
| Fecundidad | Primera | 19 | 0.003 | 0.95 | 26.67 | <0.001 |
| | Segunda | 12 | | | | |
| Peso seco de las puestas de huevos | Primera | 17 | 1.77 | 0.19 | 10.26 | <0.001 |
| | Segunda | 12 | | | | |
| Peso seco del cuerpo de la hembra | Primera | 20 | 5.99 | 0.02 | 77.96 | <0.001 |
| | Segunda | 12 | | | | |

## 4.5 Discusión

La evaluación de la dinámica energética en las hembras grandes de *L. uruguayensis* durante la temporada reproductiva evidenció que utilizan una estrategia mixta de capitalización y uso inmediato para tener dos puestas. Identificamos que la primera maduración del ovario (primera puesta) fue “financiada” principalmente por la energía acumulada en el hepatopáncreas, mientras que el aumento de la tasa de alimentación aseguró la mayor parte de la energía necesaria para la remaduración del ovario (segunda puesta). Sin embargo, la magnitud de los valores de IGS en los días previos a la segunda puesta no alcanzaron los valores encontrados antes de la primera puesta, lo que resultó en una fecundidad y peso de la puesta de huevos más bajos.

Durante los períodos pre reproductivos (mayo - septiembre), las hembras de *L. uruguayensis* acumulan altos niveles de reservas de energía en el hepatopáncreas, indicados por valores altos de IHS (alrededor de 9) y de contenido de glucógeno (Colpo y López Greco, 2017, 2018). Estos parámetros disminuyen cuando comienza el proceso de vitelogénesis y aumenta la energía demandada por las hembras (Adiyodi, 1988) (Figura 4.7).

Los resultados de este capítulo mostraron que, antes de la primera puesta de la temporada reproductiva, la relación entre el IHS y el IGS de las hembras de *L. uruguayensis* fue significativamente negativa. Esto sugiere una importante contribución de las reservas acumuladas en el hepatopáncreas a la maduración del ovario. Sin embargo, consideramos que tal contribución podría estar subestimada, ya que los muestreos para esta tesis comenzaron al inicio de la temporada reproductiva (noviembre), cuando los ovarios estaban en desarrollo

y los valores de IHS registrados fueron inferiores a los observados durante los períodos pre reproductivos (Colpo y López Greco, 2017). Esto sugiere que la energía almacenada en el hepatopáncreas estaba siendo derivada a la vitelogénesis desde octubre (Figura 4.7).

Un mes después de la primera puesta (principios de enero), el IHS aumentó ligeramente y alcanzó valores de alrededor de 4. Este aumento puede ser una respuesta al aumento de la tasa de alimentación. Sin embargo, este valor de IHS representa aproximadamente la mitad del IHS de los periodos pre reproductivos (Colpo y López Greco, 2017), denotando la reducción de las reservas del hepatopáncreas (Figura 4.7). A pesar de los valores bajos de IHS, antes de la segunda puesta, la relación entre IHS e IGS mostró una tendencia negativa, pero no significativa, mientras que la tasa de alimentación aumentó aún más.

Estos resultados sugieren que las hembras de *L. uruguayensis* utilizan una estrategia mixta de reproducción para producir las dos puestas de la temporada reproductiva. Sin embargo, usaron cada estrategia en diferentes proporciones. Para la primera puesta, las hembras de *L. uruguayensis* utilizaron mayoritariamente la estrategia reproductiva de capitalización, indicado por una contribución más importante de la energía almacenada en el hepatopáncreas que de la ingesta de energía para la maduración ovárica, mientras que para la segunda puesta, utilizaron principalmente la estrategia reproductiva de uso inmediato , indicado por una mayor contribución de la ingesta de energía que de la energía almacenada en el hepatopáncreas para la re maduración ovárica. Estos resultados son la primera aproximación para cuantificar la estrategia mixta

utilizada por *L. uruguayensis* para tener dos puestas en la corta temporada reproductiva.

Después de la primera puesta, el contenido de energía en el hepatopáncreas fue el más bajo, debido a la reducción significativa en los lípidos totales, como también se registró para *Pleuroncodes monodon* (Bascur *et al*., 2017), *Oratosquilla oratoria* (Yan *et al*., 2017) y *Carcinus maenas* (Campos *et al*., 2021). Este nutriente no sólo representa una forma de almacenamiento de energía, sino que también es un componente importante de la vitelina que el hepatopáncreas deriva al ovario durante la vitelogénesis (Vogt, 2019). Por lo tanto, estos resultados sugieren que las hembras de *L. uruguayensis* no pueden volver a acumular cantidades considerables de reservas en el hepatopáncreas después de la primera puesta de la temporada reproductiva. Esto se ha informado para otras especies de cangrejo violinista en poblaciones con distribución templada y temporadas reproductivas cortas, como *Austruca lactea* en la Isla Nagaura (Japón) (Yamaguchi, 2003) y *Minuca pugnax* en su límite norte de distribución en Estados Unidos (Brodie *et al*., 2017).

A pesar de esto, dos meses después de la primera puesta, el ovario volvió a madurar, apoyado principalmente por un aumento en la tasa de alimentación de las hembras antes de la segunda puesta, ya que la energía proporcionada por el alimento en el sedimento fue constante durante toda la temporada reproductiva. En otros cangrejos como *Carcinus maenas* y *Callinectes sapidus*, la masa ovárica también se ha relacionado con el consumo de alimentos durante el periodo de desarrollo ovárico, lo que confirma que estos cangrejos utilizan la estrategia reproductiva de uso inmediato (Griffen, 2018).

La utilización de la estrategia reproductiva de uso inmediato depende de la abundancia de alimento disponible para las hembras y su constancia durante la temporada reproductiva (Varpe *et al*., 2009). Los cangrejos violinistas consumen compuestos orgánicos que abundan en el espacio intersticial o se adhieren a las partículas del sedimento de los estuarios (Dye y Lasiak, 1986; Fabiano y Danovaro, 1994; Méziane *et al*., 2006; Colpo y Negreiros Fransozo, 2011). Dependiendo de las características del sedimento y de la morfología y el conjunto de cerdas de los maxilipedios, los cangrejos violinistas podrán ser más o menos eficientes en la separación de la materia orgánica del sedimento del estuario (Miller, 1961; Maitland, 1990; Colpo, 2005; Colpo y Negreiros Fransozo, 2011; Sayão Aguiar *et al*., 2012).

La actividad alimentaria de *L. uruguayensis* ha sido estudiada en los manglares subtropicales de la Isla Saponin, en São Pablo (Brasil), donde se determinó que extraen hasta el 80% de la materia orgánica presente en el sedimento, lo cual resultó más eficiente que la otra especie estudiada en el mismo trabajo, *Minuca rapax* y que *Gelasimus vocans* (43%) y *Tabuca polita* (22 %) en el trabajo de Dye y Lasiak (1986), realizado en un manglar tropical de Australia. A pesar de la intensa actividad alimentaria que, en principio, hace pensar que la materia orgánica disponible podría disminuir para los cangrejos, la dinámica de las mareas promovería la reposición constante de estos recursos alimentarios asegurando una disponibilidad de alimento predecible en el tiempo (Ribeiro e Iribarne, 2011). Por lo tanto, las hembras grandes de *L. uruguayensis* probablemente encuentren condiciones estables y adecuadas para tener una segunda puesta, utilizando la estrategia reproductiva de uso inmediato.

Este patrón reproductivo mixto también se registró en el cangrejo de manglar *A. pisonii* en poblaciones con temporada reproductiva estacional en el canal intra costero del Atlántico de la costa de Florida (Carver *et al*., 2021). Dos diferencias metodológicas importantes de este trabajo respecto del presentado en esta tesis son, por un lado, que los autores decidieron combinar la masa de los ovarios maduros junto con la del hepatopáncreas para estimar la energía destinada a la primera puesta y, por el otro, determinaron la calidad y la cantidad del alimento adquirido mediante la disección y posterior análisis del intestino de los cangrejos. Si bien estas diferencias metodológicas son evidentes, el estudio de las estrategias de manejo de energía para la reproducción en crustáceos decápodos son bastantes recientes (Griffen, 2018) y es necesario ensayar más aproximaciones hasta identificar las más adecuadas o precisas que permitan evaluarlas.

En esta tesis, el IGS alcanzó valores mayores antes de la primera puesta que antes de la segunda, sugiriendo que la energía adquirida durante la temporada reproductiva no fue suficiente para asegurar la misma masa ovárica que la promovida por las reservas almacenadas en el hepatopáncreas meses antes de la primera puesta de la temporada reproductiva (Harrison, 1990; Griffen, 2018). Este patrón es el más informado en la literatura y se ha descripto en una gran variedad de decápodos, como en la langosta *Panulirus japonicus* (Minagawa y Sano, 1997), en los camarones *Solenocera melantho* (Ohtomi *et al*., 1998) y *Parapenaeus fissuroides* (Farhana y Ohtomi, 2016*)* y en los cangrejos *Nehoelice granulata* (López Greco, 1997), *Cranuca inversa* (Litulo, 2005) y *Scylla olivacea* (Paul *et al*., 2021), entre otros. Esto podría deberse al bajo contenido de materia orgánica en el sedimento (Colpo y López Greco, 2017)

que tiene por tanto un bajo aporte energético (presente capítulo) y la menor cantidad de precursores de vitelo entregados por el hepatopáncreas “empobrecido” en nutrientes (Griffen, 2018).

A pesar de las diferencias observadas en el IGS, el contenido de energía en cada gramo de ovario no varió a lo largo de la temporada reproductiva, probablemente porque tampoco cambió la energía proporcionada por los lípidos y las proteínas totales. A diferencia del hepatopáncreas, las proteínas totales aportan una cantidad importante de energía al ovario y también son el componente principal del vitelo en *L. uruguayensis* (Colpo y López Greco, 2018; Marciano *et al*., 2021). Las diferencias en la energía aportada por el glucógeno al ovario probablemente no fueron relevantes, ya que el glucógeno muestra un bajo aporte energético a este órgano (Roustaian *et al*., 2001; García Guerrero, 2009). En este estudio hemos demostrado que el contenido de energía en cada gramo de ovario es independiente de la estrategia de reproducción utilizada principalmente por las hembras.

La ingesta de energía estimada para *L. uruguayensis* fue similar entre los muestreos antes de la primera puesta, y aumentó en los 15 días antes de la segunda. Seguramente, el aumento de la tasa de alimentación en este último muestreo sea la variable explicativa del incremento de la ingesta de energía, debido a que no se registraron diferencias significativas en la energía por gramo de sedimento. Ribeiro e Iribarne (2011) discuten que en estudios experimentales realizados en otras especies de cangrejos violinistas se ha demostrado que la tasa de alimentación se correlaciona positivamente con la concentración de alimento (López y Levinton, 1987; Robertson y Newell, 1982a, b; Weissburg, 1992, 1993). Sin embargo, un aumento excesivo en la tasa de alimentación

podría comprometer el proceso de extracción de nutrientes, ya que una gran cantidad de sedimento en la cavidad bucal podría saturar el mecanismo (Robertson y Newell, 1982a; Weissburg, 1992). Weis y Weis (2004) observaron la tasa de alimentación para cuatro especies de cangrejos violinista y detectaron que la misma varía entre 50 y 140 veces que la hembra lleva el quelípedo a la boca/min. En esta tesis, la máxima tasa de alimentación registrada fue de 111,8 veces/min, lo cual sugiere que el aumento de la actividad alimentaria observado antes de la segunda puesta es el esperable para hembras de cangrejo violinista y no compromete la capacidad de extracción alimentaria de las mismas. Por lo tanto, *L. uruguayensis* en los días antes de la segunda puesta estaría consumiendo más energía que antes de la primera puesta por un aumento en la actividad alimentaria.

Sin embargo, la ingesta de energía es una variable difícil de estimar. En principio, la proporción de agua en el sedimento y la composición granulométrica del mismo puede cambiar y, consecuentemente, influenciar el tamaño de la porción de sedimento tomada por los quelípedos de las hembras y la capacidad del sedimento de retener materia orgánica (Carol *et al*., 2008; Crane, 2015). Además, es importante conocer y considerar cuánto tiempo dedican las hembras a alimentarse. Si bien se ha registrado que las hembras de *L. uruguayensis* se encuentran más activas en los meses de altas temperaturas durante las horas de la marea baja diurna, también se ha registrado que realizan otras actividades como desplazarse o permanecer en las cuevas (Di Virgilio y Ribeiro, 2013). Por ejemplo, Dye y Lesiak (1986) informaron que, de las 4 h de marea baja diurna en manglares tropicales de Australia, las hembras de *Gelasimus vocans* utilizan sólo de 2,5 a 3 h para alimentarse.

Algo que resulta evidente es que a mayor apertura del quelípedo, las hembras podrán tomar porciones de sedimento mayores. Esto quedó evidenciado con la relación positiva entre el volumen y el peso de las porciones estimadas, con lo cual es posible pensar que este factor tendría incidencia en el resultado de la ingesta de energía. Lamentablemente, el diseño del experimento no permite apreciar con claridad en las grabaciones la apertura de quelípedo que las hembras realizan en cada caso, que podría variar entre manipular una mínima porción de sedimento hasta tomar una porción que supere ampliamente la capacidad del quelípedo. Sin embargo, el planteo realizado permitió estimar un valor promedio del peso de las porciones como aproximación inicial del estudio de la dinámica de alimentación que tiene esta especie durante la temporada reproductiva.

Finalmente podríamos preguntarnos ¿es posible que en la segunda mitad de la temporada reproductiva las hembras estén tomando mayores porciones de alimento y, por lo tanto, ingiriendo más energía que la estimada? Las respuestas a esta pregunta permitirían profundizar en la comprensión de la estrategia de manejo de energía para la reproducción, que involucra el uso inmediato del alimento.

Dado que las hembras de los cangrejos braquiuros extruden completamente los oocitos maduros durante la oviposición (Hartnoll, 2006), esperábamos que las puestas de huevos de *L. uruguayensis* mostraran características similares a las del ovario. Efectivamente, los ovarios más pequeños registrados antes de la segunda puesta impactaron en el tamaño de las puestas de huevos que mostraron menor fecundidad y peso en comparación

con la primera puesta. Además, al igual que en el ovario, el contenido energético de los huevos producidos por ambas puestas fue similar.

Algunos estudios en crustáceos, como los cangrejos *Octolasmis mülleri* (Bert *et al*., 2016) y *Hemigrapsus sanguineus* (Griffen, 2018), sugirieron que los huevos de la primera puesta presentan mejor calidad y, por lo tanto, larvas más exitosas que los huevos de la segunda puesta. Sin embargo, Varpe *et al*. (2007) realizaron un modelado en el copépodo *Calanoides acutus*, el cual indica que a pesar de la estrategia utilizada, el éxito de las larvas estará determinado por las condiciones ambientales al momento de la eclosión. En particular, lo autores indican que la primera puesta llevada a cabo con la energía acumulada previamente permite poner huevos antes del pico de alimento disponible en el ambiente, en este caso fitoplancton. De esta manera, las larvas eclosionan justo en el momento de mayor disponibilidad de alimento pero también de menor riesgo de ser predadas, lo cual aumenta su supervivencia y posibilidad de llegar como adultos a la siguiente temporada reproductiva (Varpe *et al*. 2007). En esta tesis demostramos que las hembras de *L. uruguayensis* pueden aportar el mismo contenido energético al embrión, independientemente del momento de la temporada.

Hacia el final de la temporada reproductiva, las hembras grandes de *L. uruguayensis* mostraron menor peso corporal que cuando tuvieron la primera puesta. Estos resultados sugieren que durante la corta temporada reproductiva en la población estudiada, *L. uruguayensis* asigna significativamente más energía a la reproducción que al crecimiento/mantenimiento, evidenciando la compensación en el *presupuesto energético* que generalmente se registra en los crustáceos decápodos (Clarke, 1993; Hartnoll, 2006; Stahlschmidt y Adamo,

2015). Varios estudios realizados en cangrejos y camarones han registrado deterioro de las reservas de las hembras y bajo peso después de las puestas (Harrison, 1990), como es el caso del camarón carideo *Neocaridina davidi* (Tropea y López Greco, 2015) y del cangrejo violinista *Austruca lactea* y (Yamaguchi, 2003). De hecho, el patrón reproductivo de *L. uruguayensis* al sur de su distribución es similar al reportado para las hembras de *A. lactea* (Yamaguchi, 2003), las cuales pueden producir dos puestas en una temporada reproductiva corta, mostrando signos de agotamiento materno al final de la temporada. Yamaguchi (2003) evidenció el agotamiento materno mediante la observación de hepatopáncreas deteriorados, evaluados mediante el peso seco relativo al cuerpo de la hembra y también midiendo la energía con un calorímetro (Yamaguchi, 2003).

## 4.6 Conclusión

En conclusión, la pérdida de peso corporal junto con la disminución de IHS, lípidos totales y contenido de glucógeno en el hepatopáncreas serían indicadores de cierto agotamiento materno de *L. uruguayensis* después de la primera puesta. Sin embargo, las hembras grandes intensificaron su actividad alimentaria para obtener energía y así tener una segunda puesta en la temporada, principalmente utilizando la estrategia reproductiva de uso inmediato. Finalmente, los resultados mostraron que aunque la segunda puesta fue más pequeña, el suministro de energía asignado a cada embrión fue equivalente en ambas puestas.

En base a los resultados obtenidos, las *hipótesis 1 y 2* no son rechazadas, mientras que la *hipótesis 3* es parcialmente rechazada ya que si bien se observó

menor fecundidad y menor peso seco de los huevos en la segunda puesta, los huevos tuvieron la misma energía disponible para el desarrollo del embrión y por eso no podemos decir que los huevos de la segunda puesta fueron de menor calidad.

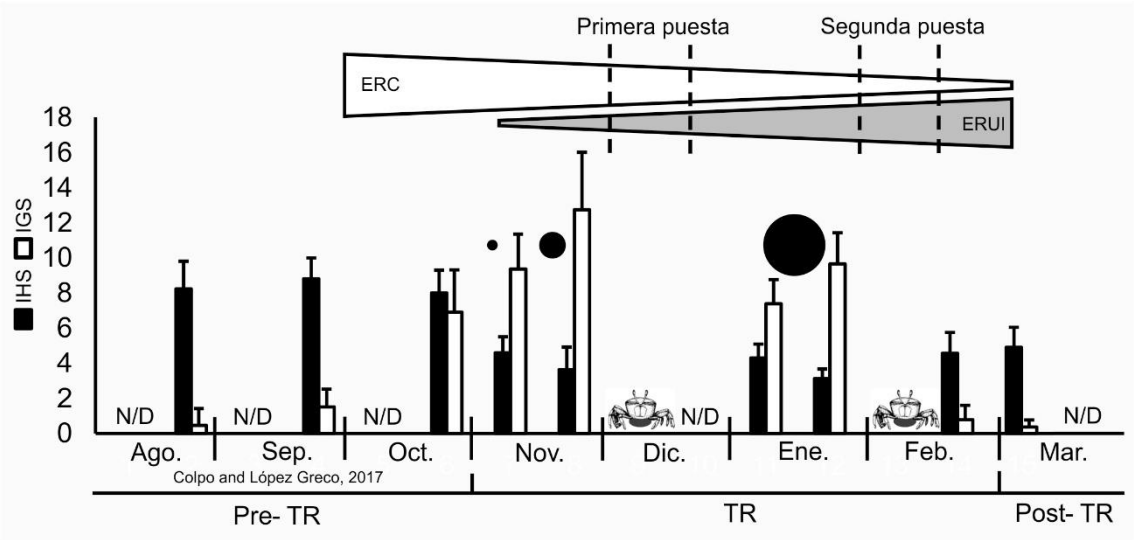


Figura 4.7: Dibujo esquemático de la estrategia reproductiva mixta de las hembras grandes de *Leptuca uruguayensis* en el sur de su distribución geográfica. Durante la temporada pre-reproductiva (Pre-TR), presentaron los valores más altos del índice hepatosomático (IHS). Luego, cuando comenzó la vitelogénesis, el índice gonadosomático (IGS) aumentó y el IHS disminuyó, evidenciando la participación del hepatopáncreas en la maduración del ovario (Colpo y López Greco, 2017). Al comienzo de la temporada reproductiva (TR), el IHS disminuyó y el IGS alcanzó su máximo justo antes del primer desove, cuando la tasa de alimentación aumentó un 28%. Antes del segundo desove, las hembras aumentaron aún más su tasa de alimentación, pero el HSI no aumentó a los niveles de la temporada pre-reproductiva, lo que indica una baja contribución de la energía almacenada en el hepatopáncreas para producir el segundo desove. Estos datos sugieren que las hembras usaron principalmente la estrategia reproductiva de capitalización (ERC) para tener su primera puesta y que usaron principalmente la estrategia reproductiva de uso inmediato (ERUI) para tener su segundo desove. El IGS aumentó antes del segundo desove, pero no alcanzó los mismos valores que antes del primer desove. Después del segundo desove, el IGS disminuyó y el IHS aumentó, lo que indica el comienzo de la temporada post-reproductiva (Post-TR). El tamaño de los círculos negros indica la magnitud de la tasa de alimentación registrada en cada momento de la época reproductiva. N/D significa que la información no está disponible.

# Capítulo 5

## Discusión general

El esfuerzo reproductivo de una especie se encuentra limitado por una variedad de factores entre los que se encuentran, la temperatura, el fotoperiodo y la disponibilidad de alimento (Wehrtmann *et al*., 2012; Faria *et al*., 2017). Las características de cada hábitat determinarán cuáles son las mejores condiciones que permiten maximizar el *fitness* de las especies (Giménez y Anger, 2001; Marshall y Keough, 2004; Birkeland y Dayton, 2005).

En los límites de la distribución geográfica, donde la calidad del hábitat disminuye, los animales desarrollan estrategias de optimización de energía que permiten generar descendencia capaz de mantener la población (Stearns, 1992; Gaston, 2003; McEwen y Wingfield, 2003; Wehrtmann *et al*., 2012; Hargreaves *et al*., 2014).

*Leptuca uruguayensis* resulta un modelo interesante para este tipo de investigación ya que habita en la distribución más austral registrada para los cangrejos violinistas (Crane, 2015) y, además, la población más estable se encuentra en el estuario del Río de la Plata, que se ha visto afectado en los últimos años por el cambio climático (Perillo, 1997; Canziani *et al*., 2013; Leal Filho *et al*., 2022). En este contexto, este trabajo de tesis aporta información relevante sobre el desempeño reproductivo y la estrategia de inversión energética de esta población, lo que puede ser una herramienta más para predecir el comportamiento de *L. uruguayensis* frente a cambios en el ambiente donde se encuentra.

Uno de los aportes más importantes de este trabajo es haber establecido el patrón reproductivo de las hembras de *L. uruguayensis* hacia el sur de la distribución geográfica. Anteriormente se estableció la duración de la temporada reproductiva (Colpo y López Greco, 2017), el momento en que las hembras de

diferentes tamaños son encontradas ovígeras en el campo (Spivak *et al*., 1991) y se propuso la cantidad de ciclos reproductivos en base a la actividad de los machos (Ribeiro *et al*., 2016). Sin embargo, esta es la primera vez que se establece de manera empírica cual es el patrón reproductivo que siguen las hembras de diferentes tamaños en la temporada reproductiva.

En primer lugar, determinamos que en la temporada reproductiva se pueden reconocer tres momentos: inicio, mediados y final, caracterizados por una puesta a nivel poblacional en cada uno de ellos. Se observó que las hembras medianas y grandes se reproducen entre el inicio y mediados de la temporada reproductiva. Luego, se incorporan las hembras pequeñas entre mediados y el final, dónde también es posible reconocer hembras grandes teniendo su segunda puesta. Finalmente, se estableció que la mayoría de las hembras podían tener una puesta por temporada reproductiva, y sólo las hembras grandes, dos puestas. Considerando que las hembras de *L. uruguayensis* en el sur de su distribución geográfica pueden atravesar hasta dos temporadas reproductivas en su vida adulta, determinamos que son capaces de tener como máximo 3 puestas: una en la primera temporada reproductiva, y dos en la segunda.

En diferentes poblaciones de animales que atraviesan temporadas reproductivas acotadas se ha observado que en la primera parte de la temporada es donde se encuentra la mayor cantidad de ovarios desarrollados, la mayor calidad y cantidad de huevos y es cuando los factores ecológicos ofrecen la mejor perspectiva para que la progenie pueda alimentarse y sobrevivir (Crick *et al*., 1993; Varpe *et al*., 2007; Vázquez *et al*., 2013; Grassi *et al*., 2018, entre otros). En este contexto, la población de *L. uruguayensis* estudiada no fue la

excepción. Se identificó que el periodo más intenso de la temporada reproductiva para la población es el que ocurre entre noviembre y enero, donde se registraron los IGS más elevados y la mayor cantidad de hembras ovígeras. Además, coincide con los resultados encontrados por Ribeiro *et al*. (2016), donde informan que en este periodo (inicio y mediados de la temporada reproductiva) es cuando se registra la mayor cantidad de tiempo que los machos dedican al comportamiento reproductivo, como hacer cuevas y *waving.* Como las hembras medianas y grandes son las que participan mayoritariamente en este periodo, la fecundidad fue elevada debido a la estrecha relación que tienen el número de huevos con el tamaño materno (Fox y Czesak, 2000; Muiño, 2002; Marshall y Keough, 2007; Bert *et al*., 2016). Para la mayoría de estas hembras, esta será la única puesta de la temporada reproductiva y es a la que le asignaron los recursos energéticos almacenados durante la etapa pre-reproductiva. En consecuencia, se observa el agotamiento de las reservas del hepatopáncreas, en particular los lípidos totales y el glucógeno, que sólo comenzaron a restablecerse al final de la temporada reproductiva. Este es un indicio del alto esfuerzo reproductivo que implica reproducirse para las hembras de esta población.

Los estudios realizados en poblaciones de *L. uruguayensis* de Brasil, en la distribución norte de la especie, se han enfocado en variables ecológicas y comportamentales, pero muy pocos han determinado variables reproductivas. Las variables medidas que permiten hacer comparaciones entre las poblaciones de Argentina y Brasil están relacionadas con el comportamiento de *waving* en los machos (Ribeiro *et al*., 2016; Backwell, 2019), la utilización del sustrato para hacer las cuevas y alimentarse (Ribeiro *et al*., 2005; Sayão Aguiar *et al*., 2012; Machado *et al*., 2013; Natálio *et al*., 2017), el riesgo de predación por parte de

aves marinas (Iribarne y Martinez, 1999; Ferreira *et al*., 2005; Ribeiro *et al*., 2019), el flujo génico entre poblaciones (Laurenzano *et al*., 2012) y el tamaño corporal y la talla de madurez sexual (Martins y Masunari, 2013; Hirose *et al*., 2013; Hampton *et al*., 2014; De Grande *et al*., 2021a).

El principal trabajo realizado en Brasil donde se miden variables reproductivas en hembras comparables con las de este estudio es el de Costa *et al.* (2006). Las autoras evaluaron la fecundidad y la frecuencia de hembras ovígeras de *L. uruguayensis* durante el año, evidenciando que tienen reproducción anual, menor tamaño y, consecuentemente, menor fecundidad que la población estudiada en esta tesis. Un patrón similar pudo evidenciarse recientemente para el cangrejo *Carcinus maenas* en la extensión de la costa oeste de Estados Unidos (Kelley *et al*., 2015) y en la costa de Portugal (Monteiro *et al*., 2022).

Sin embargo, no hay trabajos para *L. uruguayensis* en toda su distribución que provean información sobre el estado fisiológico de las hembras respecto de los ovarios y el hepatopáncreas ni de otros aspectos relativos a la calidad de los huevos. Los primeros trabajos en ese aspecto fueron los realizados por Colpo y López Greco (2017, 2018), que luego fueron profundizados en esta tesis. Si bien hay mucha información sobre *L. uruguayensis* en el norte de su distribución geográfica, hay numerosos aspectos reproductivos que restan ser estudiados y, por lo tanto, la comparación entre las dos poblaciones queda incompleta. Estudiar las estrategias reproductivas y su impacto en la dinámica energética del ovario y el hepatopáncreas, así como también en el rendimiento reproductivo y la calidad de los huevos en poblaciones con más puestas al año implicaría

comprender de manera más abarcativa las estrategias poblacionales de esta especie en el rango de su distribución.

Por otro lado, en la Bahía de Samborombón, *L. uruguayensis* se encuentra en simpatría con el cangrejo *Neohelice granulata* (Daleo *et al*., 2003), en el cual se han realizado diversos estudios con relación al patrón reproductivo que presenta en la región. A partir de la información disponible, es posible determinar que la temporada reproductiva es equivalente para ambas especies, que se extiende desde mediados de la primavera hasta fines del verano en el hemisferio sur. Además, ambas especies presentan el máximo IGS al inicio de la temporada reproductiva, al mismo tiempo que se observa una disminución en el IHS, como consecuencia del agotamiento de las reservas (López Greco, 1997; López Greco y Rodríguez, 1999). También se observó que ambas especies presentan tiempos de incubación que rondan las tres semanas y que la eclosión de las larvas coincide con el máximo de marea alta que permite exportarlas al mar (López Greco, 1997). Entonces, que el patrón reproductivo de *L. uruguayensis* en la Bahía de Samborombón sea más similar al de *N. granulata* en el mismo sitio que al de *L. uruguayensis* en poblaciones del norte, sugiere que el patrón reproductivo de la especie es fuertemente modelado por las variables ambientales propias de la latitud.

Otro punto relevante descripto en este trabajo es la estrategia mixta de energía para la reproducción que presentan las hembras de *L. uruguayensis*. Dicha estrategia se observó en dos niveles. En primer lugar, entre los tamaños de hembras pudimos evidenciar que aquellas que eclosionaron temprano en la temporada reproductiva anterior, se asentaron y tuvieron tiempo para alimentarse y crecer antes del invierno, llegaron a la siguiente temporada como

hembras medianas y utilizaron mayoritariamente la estrategia reproductiva de capitalización. Esto mismo se observa para las hembras grandes al inicio de la segunda temporada reproductiva de sus vidas. Por otro lado, las hembras pequeñas que eclosionaron al final de la temporada reproductiva anterior se asentaron más tarde y no tuvieron tiempo suficiente para alimentarse y crecer antes del invierno. Por lo tanto, llegaron a su primera temporada reproductiva sin reservas adecuadas para generar una puesta. Estas hembras utilizaron los recursos alimentarios disponibles en el ambiente para tener su primera puesta mediante la estrategia reproductiva de uso inmediato hacia mediados y fines de la temporada reproductiva

En segundo lugar, entre las hembras grandes, también se distingue una estrategia mixta ya que, aquellas que lograron tener una segunda puesta en la misma temporada, lo hicieron utilizando en mayor medida la estrategia reproductiva de uso inmediato. Este cambio de estrategia permitió que algunas hembras grandes pudieran tener dos puestas en la temporada reproductiva. Hay que considerar que *L. uruguayensis* pertenece a un grupo de cangrejos que sólo maduran el ovario luego de la eclosión de las larvas (Christy y Salmon, 1984). Esto sumado a la corta temporada reproductiva y al periodo de interpuesta de dos meses, son factores que impiden alcanzar más puestas en una misma temporada reproductiva. El hecho de que sólo las hembras grandes puedan hacerlo sugiere que esto representa un gran esfuerzo reproductivo, pero también es la “última” oportunidad que tienen de dejar descendencia ya que estos animales sólo viven dos años aproximadamente (Spivak *et al*., 1991).

La posibilidad de utilizar la estrategia reproductiva de uso inmediato está dada por la disponibilidad continua de alimento en el sedimento donde los

animales se alimentan. Este factor facilitaría la segunda puesta de algunas hembras grandes, pero también es clave para el desarrollo de las hembras pequeñas. En este trabajo pudimos establecer que si bien la composición de las comunidades de organismos intersticiales podría variar entre los meses de la temporada reproductiva (Schneider *et al*., 2016), el recurso energético es constante en el tiempo. En este sentido, las hembras que aumentan su tasa de alimentación pueden disponer de los recursos nutricionales necesarios y madurar el ovario nuevamente, aunque con menor magnitud que cuando se utilizan los metabolitos almacenados. Si bien la actividad alimentaria de los cangrejos violinistas está ampliamente estudiada (Mokhlesi *et al*., 2011; Tina *et al*., 2015; Vianna *et al*., 2020, entre otros), este es el primer estudio que relaciona el aumento de la tasa de alimentación con la estrategia reproductiva de uso inmediato.

La evaluación del desempeño reproductivo presentó variaciones en algunos de los parámetros estudiados, como la fecundidad y el contenido de proteínas y lípidos totales en las puestas de huevos, entre las dos temporadas reproductivas analizadas (2018-2019 y 2019-2020). Por este motivo, se realizó para las dos temporadas una exploración de las variables ambientales, utilizando los datos colectados por el SIGA-INTA (siga.inta.gov.ar) en una estación meteorológica cercana al área de estudio.

Se detectó que las temperaturas mínimas del aire fueron, en promedio, 3 °C más bajas durante los meses de la pre temporada reproductiva 2019-2020, respecto de la 2018-2019, sugiriendo que las hembras se encontraron en diferentes condiciones durante el inicio de la vitelogénesis. Considerando que el desarrollo ovárico de *L. uruguayensis* está relacionado positivamente con la

temperatura del aire (Colpo y López Greco, 2017), las bajas temperaturas en el periodo pre reproductivo de la temporada 2019-2020, podrían explicar también el hecho de que las primeras hembras ovigeras de esa temporada fueron muestreadas unos 20 días más tarde que en la temporada 2018-2019 (observación Colpo y Marciano). Además, fue posible evidenciar que, en promedio, las temperaturas mínimas registradas durante los meses de la temporada reproductiva 2019-2020 superaron en 4 °C a la temporada 2018-2019. Quizás estas diferencias entre las temperaturas interanuales hayan generado algunas de las variaciones en los parámetros evaluados, sugiriendo que el desempeño reproductivo de *L. uruguayesis* puede ser sensible a los cambios de temperatura, como evidenciaron Vianna *et al*. (2020) para la fisiología de los machos de esta misma especie.

Estos hallazgos generan algunas preguntas: ¿Es posible que las hembras grandes tengan la flexibilidad de desarrollar estrategias diferentes frente a la variabilidad de la temperatura? ¿Cómo afecta la temperatura a la maduración ovárica de las hembras grandes en el periodo pre reproductivo y luego, a la re maduración, durante la temporada reproductiva?

Es importante destacar que este trabajo aporta información preliminar sobre las diferencias interanuales que pueden existir en el patrón reproductivo de esta población. Si bien es posible obtener resultados interesantes en dos años de trabajo, como demostraron Urzúa *et al*. (2012) para el camarón *Crangon crangon* y Guzmán *et al*. (2020) para la langosta *Pleuroncodes monodon*, para obtener resultados que permitan sacar conclusiones más precisas o contundentes serían necesarios varios años de estudio en diversos aspectos de las poblaciones y el ambiente, como los realizados para la langostas *Homarus*

*americanus* (Ouellet y Plante, 2004; Pershing *et al*., 2012; Gendron *et al*., 2019) y *Palinurus elephas* (Muñoz *et al*., 2021), entre otros. De este modo se minimizaría el impacto de las fluctuaciones interanuales de temperatura, que pueden llevar a distintas respuestas en las hembras y en la interpretación de los resultados.

Finalmente, ¿sería posible que algunas hembras tuvieran una tercera puesta en la misma temporada reproductiva? En cuanto a la estrategia de manejo de energía para reproducción, las hembras grandes e incluso algunas medianas, podrían tener otra puesta utilizando la estrategia reproductiva de uso inmediato, ya que la energía proveniente del alimento estaría disponible. Sin embargo, el limitante de esta situación hipotética es la temperatura. Un trabajo realizado en *Leptuca terpsichores* demostró que las hembras y los machos son capaces de ajustar las actividades reproductivas, como la cópula, en función de los cambios en la temperatura (Kerr *et al*., 2014). Entonces, si la temperatura aumenta significativamente, podría ampliar la ventana reproductiva, lo cual abre la posibilidad de que eventualmente ocurra otro evento de puesta.

Si bien para *L. uruguayensis* estas son suposiciones, se ha encontrado evidencia en los últimos años de que la especie está siendo afectada por los cambios de temperatura (Vianna *et al*., 2020; De Grande *et al*., 2021b). Esta información, en conjunto con el hecho de que el cambio climático afecta la distribución de las poblaciones (Kelly *et al*., 2012; Madeira *et al*., 2012; Deutsch *et al*., 2015; Szuwalski *et al*., 2021), genera un panorama donde es posible esperar cambios en la distribución geográfica de *L. uruguayensis.* En este sentido, trabajos recientes han informado la presencia de *L. uruguayensis* en Bahía Blanca, al sur de la provincia de Buenos Aires (Truchet *et al*., 2019).

Probablemente el aumento de la temperatura global (Atwoli *et al*., 2021) ha permitido que la especie empiece a desplazarse hacia mayores latitudes, como ha ocurrido con *Minuca pugnax* (Johnson, 2014), *Varuna litterata* (Mos *et al*., 2017) y *Chionoecetes opilio* (Zisserson y Cook, 2017).

Los resultados de esta tesis evidencian cómo las hembras de estos cangrejos manejan la energía disponible dependiendo de su tamaño y del momento de la temporada reproductiva. Las hembras de *L. uruguayensis* tuvieron menos puestas de lo esperado durante la temporada reproductiva debido principalmente a la estrecha ventana que tienen para reproducirse. Sin embargo, aplicaron una estrategia reproductiva que maximiza el uso de recursos para asegurar un proceso reproductivo exitoso.

# Capítulo 6

## Bibliografía

Acha, E.M., Mianzan, H., Guerrero, R., Carreto, J., Giberto, D., Montoya, N., and Carignan, M., 2008. An overview of physical and ecological processes in the Rio de la Plata Estuary. Cont. Shelf Res. 28, 1579–1588.

Adiyodi, R.G., 1968. On reproduction and molting in the crab *Paratelphusa hydrodromous*. Physiol. Zool. 41, 204–209.

Adiyodi, R.G., 1988. Reproduction and development, In: Burggren, W.W., McMahon, B.R. (Eds.), Biology of the Land Crabs. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 139–185.

Alava, V.R., Quinitio, E.T., De Pedro, J.B., Priolo, F.M.P., Orozco, Z.G.A., and Wille, M., 2007. Lipids and fatty acids in wild and pond-reared mud crab *Scylla serrata* (Forsskål) during ovarian maturation and spawning. Aquacult. Res. 38, 1468–1477.

Anger, K., 2001. The Biology of Decapod Crustacean Larvae, Lisse: A.A. Balkema Publishers, The Netherlands.

Anger, K., 2003. Salinity as a key parameter in the larval biology of decapod crustaceans. Invertebr. Reprod. Dev. 43, 29–45.

Anger, K., 2006. Contributions of larval biology to crustacean research: a review. Invertebr. Reprod. *Dev.* 49, 175–205.

Anger, K., and Moreira, G.S., 1998. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. J. Crust. Biol. 18, 823–838.

Antunes, G.F., Amaral, A.P.N., Ribarcki, F.P., Wiilland, E.F., Zancan, D.M., and Vinagre, A.P.S., 2010. Seasonal variations in the biochemical composition and reproductive cycle of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) in Southern Brazil. J. Exp. Zool. 313A, 280–291.

Arcos, F.G., Ibarra, A.M., Palacios, E., Vazquez Boucard, C., and Racotta, I.S., 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. Aquac. 228, 335–349.

Arcos, F.G., Racotta, I.S., Palacios, E., and Ibarra, A.M., 2005. Ovary development at the onset of gametogenesis is genetically determined and correlated with reproductive traits at maturity in shrimp *Litopenaeus* (Penaeus) *vannamei.* Mar. Biol. 148, 339–346.

Aristizabal, E.O., 2007. Energy investment in the annual reproduction cycle of female red porgy, *Pagrus pagrus* (L.). Mar. Biol. 152, 713–724.

Armendáriz, L.C., and César, I.I., 2006. Estimating secondary production of *Uca uruguayensis* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae) from Samborombón Bay, Argentina. Cienc. Mar. 32, 551–558.

Atwoli, L., Baqui, A.H., Benfield, T., Bosurgi, R., Godlee, F., Hancocks, S., and Vázquez, D., 2021. Call for emergency action to limit global temperature increases, restore biodiversity, and protect health: Wealthy nations must do much more, much faster. Nutr. Rev. 79, 1183–1185.

Azra, M.N., Aaqillah-Amr, M.A., Ikhwanuddin, M., Ma, H., Waiho, K., Ostrensky, A., and Abol-Munafi, A.B., 2020. Effects of climate-induced water temperature changes on the life history of brachyuran crabs. Rev. Aquac. 12, 1211–1216.

Backwell, P.R.Y., 2019. Synchronous waving in fiddler crabs: a review. Curr. Zool. 65, 83–88.

Baliña, S., Temperoni, B., López Greco, L. S., and 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 Biol. Bull. 234, 139–151.

Barnes, A.I., and Partridge, L., 2003. Costing reproduction. Anim Behav. 66, 199–204.

Barnes, R., 1989. Zoología de los invertebrados. 5ta Edic. Interamericana, Mexico D.F.

Bas, C., Luppi, T., Spivak, E., and Schejter, L., 2009. Larval dispersion of the estuarine crab *Neohelice granulata* in coastal marine waters of the Southwest Atlantic. Estuar. Coast. Shelf Sci. 83, 569–576.

Bas, C.C., Spivak, E.D., and Anger, K., 2007. Seasonal and interpopulational variability in fecundity, egg size, and elemental composition (CHN) of eggs and larvae in a grapsoid crab, *Chasmagnathus granulatus*. Helgol. Mar. Res. 61, 225–237.

Bascur, M., Guzmán, F., Mora, S., and Urzúa, Á., 2017. Seasonal changes in the biochemical composition of females and offspring of red squat lobster, *Pleuroncodes monodon* (Decapoda, Munididae), from the Southeastern Pacific. Mar. Ecol. 38, e12419.

Bathmann, U., Fischer, G., Müller, P. J., and Gerdes D., 1991. Short–term variations in particulate matter sedimentation off Kapp Norvegia, Weddell Sea, Antarctica: relation to water mass advection, ice cover, plankton biomass and feeding activity. Polar Biol. 11, 185–195.

Bauer, R.T., 1989. Decapod crustacean grooming: functional morphology, adaptive value, and phylogenetic significance. Crustac. Issues 6, 49–73.

Bauer, R.T., 1992. Testing generalizations about latitudinal variation in reproduction and recruitment patterns with sicyoniid and caridean shrimp species. Invertebr. Reprod. Dev. 22, 193–202.

Bell, G., 1980. The costs of reproduction and their consequences. Am. Nat. 116, 45–76.

Bert, T.M., Geiger, S.P., Gerhart, S.D., and McCarthy, K.J., 2016. Factors influencing reproductive attributes of stone crabs (*Menippe*) in Tampa Bay, Florida. J. Shellfish Res. 35, 241–257.

Bertini, G., Fransozo, A., and Braga, A.A., 2004. Ecological distribution and reproductive period of the hermit crab *Loxopagurus loxochelis* (Anomura, Diogenidae) on the northern coast of São Paulo State, Brazil. J. Nat. Hist. 38, 2331–2344.

Birkeland, C., and Dayton, P.K., 2005. The importance in fishery management of leaving the big ones. Trends Ecol. Evol. 20, 356–358.

Boa, J.M., and García, J.M.G., 2015. Densidad poblacional del cangrejo violinista *Uca tangeri* (Eydoux, 1835) (Brachyura: Ocypodidae) en la costa Atlántica del sur de España. Chronica naturae 5, 26–34.

Bogazzi, E., Iribarne, O., Guerrero, R., and Spivak, E., 2001. Wind pattern may explain the southern limit of distribution of a southwestern Atlantic fiddler crab. J. Shellfish Res. 20, 353–360.

Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R., and Lourdais, O., 2001. Short-term versus long-term effects of food intake on reproductive output in a viviparous snake, *Vipera aspis*. Oikos 92, 297–308.

Boschi E.E., 2000. Species of decapod crustaceans and their distribution in the american marine zoogeographic provinces. Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero, Argentina 13, 7–136.

Boschi, E.E., 1988. El ecosistema estuarial del Río de la Plata (Argentina y Uruguay). An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nac. Autón. Méx. 15, 159–182.

Boschi, E.E., Fischbach, C.E. and Iorio, M.I., 1992. Catálogo ilustrado de los crustáceos estomatópodos y decápodos marinos de Argentina. Frente Marítimo, Argentina–Uruguay 10,7–94.

Botto, F., and Iribarne, O., 2000. Contrasting effects of two burrowing crabs (*Chasmagnathus granulata* and *Uca uruguayensis*) on sediment composition and transport in estuarine environments. Estuar. Coast. Shelf Sci. 51, 141–151.

Boy, C., Pérez, A., Fernández, D., Calvo, J., and Morriconi, E., 2009. Energy allocation in relation to spawning and overwintering of a diadromous Puyen (*Galaxias maculatus*) population in the southernmost limit of the species distribution. Polar Biol. 32, 9–14.

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

Brante, A., Fernandez, M., Eckerle, L., Mark, F., Portner, H.O., and Arntz, W., 2003. Reproductive investment in the crab *Cancer setosus* along a latitudinal cline: Egg production, embryo losses and embryo ventilation. Mar. Ecol. Prog. Ser. 251, 221–232.

Brewer, S.K., Rabeni, C.F., and Papoulias, D.M., 2008. Comparing histology and gonadosomatic index for determining spawning condition of small-bodied riverine fishes. Ecol. Fresh. Fish 17, 54–58.

Britton, G., Liaaen Jensen, S., and Pfander, H., 2008. Carotenoids, vol. 4: natural functions. Springer Science and Business Media, Berlin.

Brockerhoff, A., and McLay, C., 2011. Human–mediated spread of alien crabs, In: B. Galil, P. Clark, and J. Carlton (Eds.). In the wrong place–alien marine crustaceans: distribution, biology and impacts. Springer, Dordrecht, pp. 27–106.

Brodie, R.J., Roberts, B., Espinosa, J.I., Heilman, K., Borgianini, S.A., Welch, J.M., and Reinsel, K.A., 2017. Seasonal and latitudinal variations in the energy reserves of the mud fiddler crab *Uca pugnax*: implications for the response to climate change. Aquat. Biol. 26, 113–123.

Bywater, K.A., Apollonio, M., Cappai, N., and Stephens P.A., 2010. Litter size and latitude in a large mammal: the wild boar *Sus scrofa*. Mammal Rev. 40, 212–220.

Cai, S., and Liu, H. 2017. Biological characteristics and synthesis of vitellogenin in Decapoda, crustacean. J. Fish. China 41, 150–158.

Callow, P., 1979. The cost of reproduction: a physiological approach. Biol. Rev. 54, 23–40.

Calow, P. and Townsend, C.R., 1981. Energetics, ecology and evolution. In: Townsend, C.R. and Calow, P. (Eds), Physiological ecology: an evolutionary approach to resource use. Blackwell, Oxford, pp. 3–19.

Campos, J., Ribas, F., Bio, A., Freitas, V., Souza, A. T., and van der Veer, H.W., 2021. Body condition and energy content of shore crab *Carcinus maenas*

in a temperate coastal system: temporal variability. Mar. Ecol. Pro. Ser. 667, 99–112.

Cannicci, S., Gomei, M., Dahdouh Guebas, F., Rorandelli, R., and Terlizzi, A., 2007. Influence of seasonal food abundance and quality on the feeding habits of an opportunistic feeder, the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus*. Mar. Biol. 151, 1331–1342.

Canziani, P.O., Fernandez Cirelli, A., Codignotto, J.O., Gimenez, J.C., Giraut, M. A., and Volpedo, A., 2013. Análisis de vulnerabilidad al Cambio Climático del Sitio Ramsar Bahía Samborombón y su zona de influencia.

Cardoso, R.S., and Defeo O., 2003. Geographical patterns in reproductive biology of the Pan–American sandy beach isopod *Excirolana braziliensis*. Mar. Biol. 143, 573–581.

Carol, E., Kruse, E., and Pousa, J., 2008. Environmental hydrogeology of the southern sector of the Samborombon Bay wetland, Argentina. Env. Geol. 54 95–102.

Carver, J., Meidell, M., Cannizzo, Z.J., and Griffen, B.D., 2021. Evidence for use of both capital and income breeding strategies in the mangrove tree crab, *Aratus pisonii*. Sci. Rep. 11, 1–11.

Castilho, A.L., Gavio, M.A., Costa, R.C., Boschi, E.E., Bauer, R.T., and Fransozo, A., 2007. Latitudinal variation in population structure and reproductive pattern of the endemic South American shrimp *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeoidea). J. Crustac. Biol. 27, 548–552.

Castille, F.L. and Lawrence, A.L., 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the

shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus* (L.). J. Crust. Biol. 9, 202–211.

Chang, G., Wu, X., Cheng, Y., Zeng, C., and Yu, Z., 2017. Reproductive performance, offspring quality, proximate and fatty acid composition of normal and precocious Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Aquac. 469, 137–143.

Chou, C.C., Head, M.L., and Backwell, P.R.Y., 2019. Effects of temperature on reproductive timing and hatching success in a tropical fiddler crab. Biol. J. Linn. Soc. 128, 817–827.

Christy, J.H., and Salmon, M., 1984. Ecology and evolution of mating systems of fiddler crabs (genus *Uca*). Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 59, 483–509.

Christy, J.H., and Stancyk, S.E., 1982. Timing of larval production and flux of invertebrate larvae in a well-mixed estuary. In: Kennedy, V.S (Ed.), Estuarine comparisons. Academic Press, Oregon, pp. 489–503.

Clarke, A., 1987. Temperature, latitude and reproductive effort. Mar. Ecol. Prog. Ser. 38, 89–99.

Clarke, A., 1993. Reproductive trade–offs in caridean shrimps. Funct. Ecol. 411–419.

Clarke, A., Hopkins, C.C.E., and Nilssen, E.M., 1991. Egg size and reproductive output in the deep–water prawn *Pandalus borealis* Kroyer, 1838. Funct. Ecol. 1, 724–730.

Clarke, K.R., and Warwick, R.M., 1994. An approach to statistical analysis and interpretation. In: Clarke, K.R., and Gorley, R.N. (Eds.), Change in marine communities, second edition. PRIMER-E Ltd., Plymouth, pp. 117–143.

Cohen, A. A., Coste, C. F., Li, X. Y., Bourg, S., and Pavard, S., 2020. Are trade-offs really the key drivers of ageing and life span? Funct. Ecol. 34, 153–166.

Colpo, K.D., 2005. Morfologia dos apêndices alimentares de caranguejos do gênero *Uca* Leach, 1814 (Crustacea: *Ocypodidae*) e sua implicação na extração dos alimentos a partir de substratos distintos. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Colpo, K.D., and López Greco, L.S., 2017. Temperature influences the reproduction of fiddler crabs at the southern edge of their distribution. Invertebr. Biol. 136, 171–183.

Colpo, K.D., and López Greco, L.S., 2018. Dynamics of energy reserves and the cost of reproduction in female and male fiddler crabs. Zoology 126, 11–19.

Colpo, K.D., and Negreiros Fransozo, M.L., 2011. Sediment particle selection during feeding by four species of *Uca* (Brachyura, Ocypodidae). Crustaceana 721–734.

Colpo, K.D., and Negreiros Fransozo, M.L., 2013. Morphological diversity of setae on the second maxilliped of fiddler crabs (Decapoda: Ocypodidae) from the southwestern Atlantic coast. Invert. Biol. 132, 38–45.

Corgos, A., and Freire, J., 2006. Morphometric and gonad maturity in the spider crab *Maja brachydactyla*: a comparison of methods for estimating size at maturity in species with determinate growth. ICES J. Mar. Sci. 63, 851–859.

Correa, C., Baeza, J.A., Hinojosa, I.A., and Thiel, M., 2003. Male dominance hierarchy and mating tactics in the rock shrimp *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: *Caridea*). J. Crust. Biol. 23, 33–45.

Cossi, P.F., Boy, C.C., and Pérez, A.F., 2017. Pattern of energy allocation during the gametogenesis of the asteroid *Cosmasterias lurida* (Forcipulatida: *Stichasteridae*) from the Beagle Channel, Ushuaia, Argentina. Rev. Biol. Trop. 65, 197–206.

Costa, T. M., Silva, S. M. J., and Negreiros Fransozo, M. L., 2006. Reproductive pattern comparison of *Uca thayeri* Rathbun, 1900 and *U. uruguayensis* Nobili, 1901 (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae). Braz. Arch. Biol. Technol. 49, 117–123.

Costa, T.M. and Negreiros Fransozo, M.L., 2001. Morphological adaptation of the second maxilliped in semiterrestrial crabs of the genus *Uca* Leach, 1814 (Decapoda, Ocypodidae) from a subtropical Brazilian mangrove. Nauplius 9, 123–131.

Courtney, A.J., Montgomery, S., Die, D.J., Andrew, N.L., Cosgrove, M.G. and Blount, C., 1995. Maturation in the female eastern king prawn *Penaeus plebejus* from coastal waters of eastern Australia, and considerations for quantifying egg production in penaeid prawns. Mar. Biol. 122, 547–556.

Cox, R.M., Parker, E.U., Cheney, D.M., Liebl, A.L., Martin, L.B., and Calsbeek, R., 2010. Experimental evidence for physiological costs underlying the trade-off between reproduction and survival. Funct. Ecol. 24, 1262–1269.

Crane, J., 2015. *Fiddler crabs of the world: Ocypodidae: genus Uca* (Vol. 1276). Princeton University Press.

Crick, H.Q., Gibbons, D.W., and Magrath, R.D. 1993. Seasonal changes in clutch size in British birds. J. Anim. Ecol. 263–273.

Daleo, P., Ribeiro, P., and Iribarne, O., 2003. The SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* Dana affects the distribution and survival of

the fiddler crab *Uca uruguayensis* Nobili. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 291, 255–267.

Dall, W., 1995. Carotenoids versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). Mar. Biol. 124, 209–213.

Darachai, J., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P., 1999. Effect of astaxanthin on growth and survival of *Penaeus monodon* larvae. In Proceedings of the 37th Kasetsart University Annual Conference (pp. 36–41).

De Grande, F.R., Arakaki, J.Y., Marochi, M., and Costa, T.M., 2021b. Cold water temperatures define the poleward range limits of south American fiddler crabs. Estuar. Coast. Shelf Sci. 260, 107494.

De Grande, F.R., Granado, P., and Costa, T.M. 2021a. Size-at-age or structure shift: Which hypothesis explains smaller body size of the fiddler crab *Leptuca uruguayensis* in northern populations? Estuar.Coast.Shelf Sci. 254, 107358.

De Grave, S., Pentcheff, N. D., Ahyong, S.T., Chan, T.Y., Crandall, K.A., Dworschak, P.C., and Wetzer, R., 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. Raffles Bull. Zool., 21, 1–109.

De la Iglesia, H.O., Rodríguez, E.M., Dezi, R.E., 1994. Burrow plugging in the crab *Uca uruguayensis* and its synchronization with photoperiod and tides. Physiol. Behav. 55, 913–919.

Defeo, O., and Cardoso, R.S., 2002. Macroecology of population dynamics and life history traits of the mole crab *Emerita brasiliensis* in Atlantic sandy beaches of South America. Mar. Ecol. Prog. Ser. 239, 169–179.

DelGiudice, G. D., Lenarz, M. S., and Powell, M. C., 2007. Age–specific fertility and fecundity in northern free–ranging white–tailed deer: evidence for reproductive senescence? J. Mammal. 88: 427–435.

Deutsch, C., Ferrel, A., Seibel, B., Pörtner, H.O., and Huey, R.B., 2015. Climate change tightens a metabolic constraint on marine habitats. Science 348, 1132–1135.

Di Virgilio, A., and Ribeiro, P.D. 2013. Spatial and temporal patterns in the feeding behavior of a fiddler crab. Mar. Biol. 160, 1001–1013.

Domitília, M., Joaquim, S., Matias, A.M., and Leitão A., 2016. Reproductive effort of the European clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): influence of different diets and temperatures. Invertebr. Reprod. Dev. 60, 49–58.

Drent, R.H., and Daan, S., 1980. The prudent parent: energetic adjustments in avian breeding. Ardea 68, 225–252.

Dye, A.H., and Lasiak, T.A., 1986. Microbenthos, meiobenthos and fiddler crabs: trophic interactions in a tropical mangrove sediment. Mar. Ecol. Prog. Ser. 32, 259–264.

Ejsmond, M.J., Varpe, Ø., Czarnoleski, M., and Kozłowski, J., 2015. Seasonality in offspring value and trade–offs with growth explain capital breeding. Am. Nat. 186, 111–125.

Emerenciano, M., Cuzon, G., and Arévalo, M., 2013. Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. Aquacult. Int. 21, 987–1007.

Fabiano, M., and Danovaro, R., 1994. Composition of organic matter in sediments facing a river estuary (Tyrrhenian Sea): relationships with bacteria and microphytobenthic biomass. Hydrobiologia 277, 71–84.

Farhana Z., and Ohtomi J. 2016. Ovarian maturation, size at sexual maturity, and spawning season of *Parapenaeus fissuroides* (Decapoda: Penaeidae). J. Crust. Biol. 36, 815–822.

Faria, S.C., Faleiros, R.O., Brayner, F.A., Alves, L.C., Bianchini, A., Romero, C., and McNamara, J.C., 2017. Macroevolution of thermal tolerance in intertidal crabs from Neotropical provinces: A phylogenetic comparative evaluation of critical limits. Ecol. Evol. 7, 3167–3176.

Fatima, H., Ayub, Z., Ali, S.A., and Siddiqui, G., 2013. Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguiensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda). Turk. J. Zool. 37, 334–347.

Fernández, M., Bock, C., and Pörtner, H.O., 2000. The cost of being a caring mother: the ignored factor in the reproduction of marine invertebrates. Ecol. Lett. 3, 487–494.

Ferreira, W.L.D.S., Bemvenuti, C.E., and Rosa, L.C.D., 2005. Effects of the shorebirds predation on the estuarine macrofauna of the Patos Lagoon, south Brazil. Thalassas 21, 77–82.

Ferrero, E.A., Privileggi, N., Scovacricchi, T., and Van Der Meeren, G., 2002. Does lunar cycle affect clawed lobster egg hatching and moulting frequency of hatchery–reared juveniles? Ophelia, 56, 13–22.

Flores, A., Wiff, R., Ganias, K., and Marshall, C.T., 2019. Accuracy of gonadosomatic index in maturity classification and estimation of maturity ogive. Fish. Res. 210, 50–62.

Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497–509.

Fortes, P., Salvador, G., and Consoli, F.L., 2011. Ovary development and maturation in *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: *Pentatomidae*). Neotro. Entomol. 40, 89–96.

Fox, C.W., and Czesak, M.E., 2000. Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. Annu. Rev. Entomol. 45, 341–369.

Fraysse, C.P., Boy, C.C., Becker, Y.A., Calcagno, J.A., and Pérez, A.F., 2020. Brooding in the Southern Ocean: the case of the pterasterid sea star *Diplopteraster verrucosus* (Sladen, 1882). Biol. Bull. 239, 1–12.

Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., and Queen, C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo–phospho–vanillin reaction. Clin. Chem. 18, 673–674.

García Guerrero, M., 2009. Proximate biochemical variations in eggs of the prawn *Macrobrachium americanum* (Bate, 1869) during its embryonic development. Aquac. Res. 40, 575–581.

García Guerrero, M., and Hendrickx, M.E., 2004. Embryonic development of the mangrove crabs *Goniopsis pulchra* and *Aratus pisonii* (Decapoda: Brachyura). J. Crust. Biol. 24, 666–672.

García Guerrero, M., Racotta, I.S., and Villarreal, H., 2003. Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of

the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). J. Crustac. Biol. 23, 1–6.

Gardner, C., 2001. Composition of eggs in relation to embryonic development and female size in giant crabs *Pseudicarcinus gigas* (Lamarck). Mar. Freshw. Res. 52, 333–338.

Gaston, K.J., 2003. The structure and dynamics of geographic ranges. Oxford University Press on Demand.

Gelin, A., Crivelli, A.J., Rosecchi, E., and Kerambrun, P. 2001. Can salinity changes affect reproductive success in the brown shrimp *Crangon crangon*? J. Crust. Biol. 21, 905–911.

Gendron, L., Lefaivre, D., and Sainte Marie, B. 2019. Local egg production and larval losses to advection contribute to interannual and long–term variability of American lobster (*Homarus americanus*) settlement intensity. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 76, 350–363.

George, R.Y., Bodnar, G., Gerlach, S. L., and Nelson, R.M., 2001. Buffer zones promoting oligotrophication in golf course runoffs: fiddler crabs as estuarine health indicators. Water Sci. Technol. 44, 591–598.

Giblock, S.M., and Crain, D., 2013. Fiddler crabs (*Uca pugilator*) as bioindicators of environmental health in coastal estuarine communities of Beaufort, South Carolina. P & P: Interdisciplinary J. Undergraduate Res. 2, 13.

Giménez, L., and Anger K., 2001. Relationships among salinity, egg size, embryonic development and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata,* Dana 1851. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 260, 241–257.

González Pisani, X., and López Greco, L.S., 2014. Comparative reproductive effort in the spider crabs, *Leurocyclus tuberculosus* and *Libinia spinosa* (Majoidea, Brachyura). Zool. Stud. 31, 244–250.

González Pisani, X., and López Greco, L.S., 2021. Modulating effect of temperature on spatial distribution of adult females, and embryonic development in two species of spider crabs (Majoidea). Zoology 148, 125949.

Gonzalez Pisani, X., Dellatorre, F.G., and López Greco, L.S., 2013 Embryology of the spider crabs *Leurocyclus tuberculosus* (H. Milne–Edwards and Lucas 1842) and *Libinia spinosa* (H. Milne–Edwards 1834) (Brachyura, Majoidea). Zootaxa 3718, 301–316.

Gotelli, N.J., and Ellison, A.M., 2004. Primer of ecological statistics. Sinauer Associates Publishers, Sunderland.

Gove, D., and Paula, J., 2000. Rhythmicity of larval release in three species of intertidal brachyuran crabs (Crustacea: *Brachyura*) from Inhaca Island (Mozambique). Mar. Biol. 136, 685–691.

Graham, D.J., Perry, H., Biesiot, P., and Fulford, R., 2012. Fecundity and egg diameter of primiparous and multiparous blue crab *Callinectes sapidus* (Brachyura: Portunidae) in Mississippi waters. J. Crust. Biol. 32, 49–56.

Grant, A., and Tyler, P.A., 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. Int. J. Invert. Reprod. 6, 259–269.

Grassi, A., Gottardello, A., Dalton, D. T., Tait, G., Rendon, D., Ioriatti, C., and Walton, V.M., 2018. Seasonal reproductive biology of *Drosophila suzukii*

(Diptera: Drosophilidae) in temperate climates. Environ. Entomol. 47, 166–174.

Griffen, B.D., 2014. Linking individual diet variation and fecundity in an omnivorous marine consumer. Oecologia 174, 121–130.

Griffen, B.D., 2017. Metabolic costs of capital energy storage in a small-bodied ectotherm. Ecol. Evol. 7, 2423–2431.

Griffen, B.D., 2018. The timing of energy allocation to reproduction in an important group of marine consumers. Plos one 13, e0199043.

Griffen, B.D., Altman, I., Bess, B.M., Hurley, J., and Penfield, A., 2012. The role of foraging in the success of invasive Asian shore crabs in New England. Biol. Invasions 14, 2545–2558.

Griffen, B.D., Altman, I., Hurley, J., Mosblack, H., 2011. Reduced fecundity by one invader in the presence of another: a potential mechanism leading to species replacement. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 406, 6–13.

Griffen, B.D., and Norelli, A.P., 2015. Spatially variable habitat quality contributes to within-population variation in reproductive success. Ecol. Evol. 5, 1474–1483.

Guzmán, F., Bascur, M., Olavarria, L., Mora, S., Riera, R., and Urzúa, Á., 2020. Seasonal and interannual changes in reproductive parameters and eggs biochemical composition of the fishery resource *Pleuroncodes monodon* (Decapoda: Munididae) from the Humboldt Current System. Fish. Res. 221, 105404.

Guzmán, F., Olavarría, L., and Urzúa, Á., 2016. Seasonal variation in reproductive parameters of the squat lobster *Pleuroncodes monodon* from a South Pacific population. Invert. Rep. Dev. 60, 137–144.

Hampton, K.R., Hopkins, M.J., McNamara, J.C., and Thurman, C.L., 2014. Intraspecific variation in carapace morphology among fiddler crabs (Genus *Uca*) from the Atlantic coast of Brazil. Aquat. Biol. 20, 53–67.

Hargreaves, A.L., Samis, K.E., and Eckert, C.G., 2014. Are species' range limits simply niche limits writ large? A review of transplant experiments beyond the range. Am. Nat. 183, 157–173.

Harrison, K.E., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction, and embryonic development of decapod crustacean: a review. J. Shellfish Res. 9, 1–28.

Harshman, L.G., and Zera, A.J., 2007. The cost of reproduction: the devil in the details. Trends Ecol. Evol. 22, 80–86.

Hartnoll, R.G., 1969. Mating in the Brachyura. Crustaceana 16, 162–181.

Hartnoll, R.G., 2001. Growth in Crustacea—twenty years on, In: Paula, P.M., Flores, A.V., Fransen H.J.M (Eds.), Advances in Decapod Crustaceans research. Springer, Dordrecht, pp. 111–122.

Hartnoll, R.G., 2006. Reproductive investment in Brachyura. Hydrobiologia 557, 31–40.

Hasek, B.E., and Felder, D.L., 2005. Biochemical composition of ovary, embryo, and hepatopancreas in the grapsoid crabs *Armases cinereum* and *Sesarma nr. reticulatum* (Crustacea, Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. B 140, 455–463.

Hayes, C.L., Booksmythe, I., Jennions, M.D., and Backwell, P.R., 2013. Does male reproductive effort increase with age? Courtship in fiddler crabs. Biol. lett. 9, 20121078.

Henmi, Y., 2003. Trade–off between brood size and brood interval and the evolution of underground incubation in three fiddler crabs (*Uca perplexa, U. vocans, and U. dussumieri*). J. Crustac. Biol. 23, 46–54.

Hernández Herrera, R., Perez Rostro, C.I., Arcos, F., Ramırez, J.L., Ibarra, A. M., Palacios, E., and Racotta, I.S., 2001. Predictive criteria of shrimp larval quality: an experimental approach, In: Hendry, C.I., Van Stappen, G., Wille, M., and Sorgeloos, P. (Eds.). Fish and Crustacean Larviculture Symposium, Ghent, pp. 242–245.

Hines, A.H., 1982. Allometric constraints and variables of reproductive effort in brachyuran crabs. Mar. Biol. 69, 309–320.

Hines, A.H., 1988. Fecundity and reproductive output in two species of deep–sea crabs, *Geryon fenneri* and *G. quinquedens* (Decapoda: Brachyura). J. Crust. Biol. 8, 557–562.

Hines, A.H., 1991. Fecundity and reproductive output in nine species of *Cancer* crabs (Crustacea, Brachyura, Cancridae). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 267–275.

Hines, A.H., 1992. Constraint on reproductive output in brachyuran crabs: pinnotherids test the rule. Am. Zool. 32, 503–511.

Hirose, G.L., Fransozo, V., Tropea, C., López Greco, L.S., and Negreiros–Fransozo, M.L., 2013. Comparison of body size, relative growth and size at onset sexual maturity of *Uca uruguayensis* (Crustacea: Decapoda: Ocypodidae) from different latitudes in the south–western Atlantic. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 93, 781–788.

Hirshfield, M.F., and Tinkle, D.W., 1975. Natural selection and the evolution of reproductive effort. Proc. Nati. Acad. Sci. 72, 2227–2231.

Hodgson, A.N., 1987. Distribution and abundance of the macrobenthic fauna of the Kariega estuary. S. Afr. J. Zool. 22, 153–162.

Holcomb, M., Cloud, J.G., Woosley, J., and Ingermann, R.L., 2004. Oxygen consumption in unfertilized salmonid eggs: an indicator of egg quality? Comp. Biochem. Physiol. A 138, 349–354.

Horváthová, T., Nakagawa, S., and Uller, T., 2012. Strategic female reproductive investment in response to male attractiveness in birds. Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci. 279, 163–170.

Houston, A.I., Stephens, P.A., Boyd, I.L., Harding, K.C., and McNamara, J.M., 2007. Capital or income breeding? A theoretical model of female reproductive strategies. Behav. Ecol. 18, 241–250.

Hyatt, R., 1948. The biology of the lined shore crab *Pachygrapsus crassipes* Randall. Pacif. Sci. 2, 135–213.

Iribarne, O.O., and Martinez, M.M. 1999. Predation on the southwestern Atlantic fiddler crab (*Uca uruguayensis*) by migratory shorebirds (*Pluvialis dominica*, *P. squatarola*, *Arenaria interpres*, and *Numenius phaeopus*). Estuaries, 22, 47–54.

Ituarte, R.B., Bas, C., Luppi, T.A., and Spivak, E.D., 2006. Interpopulational differences in the female reproductive cycle of the southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). Sci. Mar. 70, 709–718.

Jacobs, J.R., Biesiot, P.M., Perry, H.M., and Trigg, C., 2003. Biochemical composition of embryonic blue crabs *Callinectes sapidus* Rathbun 1896 (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of Mexico. Bull. Mar. Sci. 72, 311–324.

Jalihal, D.R., Sankolli, K.N., and Shenoy, S., 1993. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, *Palaemonidae*). Crustaceana 65, 365– 376.

Janz, D.M., McMaster, M.E., Weber, L.P., Munkittrick, K.R., and Kraak, G.V.D., 2001. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 58, 620–625.

Jayasankar, V., Tomy, S., and Wilder, M.N., 2020. Insights on molecular mechanisms of ovarian development in decapod crustacea: Focus on vitellogenesis-stimulating factors and pathways. Front. Endocrinol. 11, 674.

Jeckel, W.H., de Moreno, J.E.A., and Moreno, V.J., 1989. Biochemical composition, lipid classes and fatty acids in the ovary of the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem. 92, 271–276.

Jimenez, A.G., and Kinsey, S.T., 2015. Energetics and metabolic regulation, In: Chang, E.S., and Thiel, M. (Eds.), The Natural History of Crustacea Physiology. Oxford University Press, New York, pp 391–419.

Jimenez, P.J., Vorsatz, L.D., Costa, T.M., and Cannicci, S., 2022. Temperature extremes and sex-related physiology, not environmental variability, are key in explaining thermal sensitivity of bimodal-breathing intertidal crabs. Front. Mar. Sci 9, 858280.

Johnson, D.S., 2014. Fiddler on the Roof: A Northern Range Extension for the Marsh Fiddler Crab *Uca pugnax*. J. Crust. Biol. 34, 671–673.

Johnston, D.J., and Yeoh, D.E., 2021. Temperature drives spatial and temporal variation in the reproductive biology of the blue swimmer crab *Portunus armatus* A. Milne–Edwards, 1861 (Decapoda: Brachyura: Portunidae). J. Crust. Biol. 41, ruab032.

Jones, M.B., and Simons, M.J., 1983. Latitudinal variation in reproductive characteristics of a mud crab, *Helice crassa* (Grapsidae). Bull. Mar. Sci. 33, 656–670.

Jones, O.R., Scheuerlein, A., Salguero Gomez, R., Camarda, C.G., Schaible, R., Casper, B.B., Dahlgren, J.P., Ehrlen, J., García, M.B., Menges, E.S., Quintana Ascencio, P.F., Caswell, H., Baudisch, A., and Vaupel, J.W., 2014. Diversity of ageing across the tree of life. Nature 505, 169–173.

Jönsson, K.I., 1997. Capital and income breeding as alternative tactics of resource use in reproduction. Oikos 57–66.

Josileen, J., 2011. Food and feeding of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) (Decapoda, *Brachyura*) along the coast of Mandapam, Tamil Nadu, India. Crustaceana 84, 1169–1180.

Kelley, A.L., de Rivera, C.E., Grosholz, E.D., Ruiz, G.M., Yamada, S.B., and Gillespie, G., 2015. Thermogeographic variation in body size of *Carcinus maenas*, the European green crab. Mar. Biol. 162, 1625–1635.

Kelly, M.W., Sanford, E., and Grosberg, R.K., 2012. Limited potential for adaptation to climate change in a broadly distributed marine crustacean. Proc. R. Soc. B: Biol. Sci. 279, 349–356.

Kerr, K.A., Christy, J.H, Joly Lopez, Z., Luque, J., Collin, R., and Guichard, F., 2014. Reproducing on time when temperature varies: Shifts in the timing of courtship by fiddler crabs. Plos One 9, e97593.

Kleppel, G.S., and Burkart, C.A., 1995. Egg production and the nutritional environment of *Acartia tonsa*: the role of food quality in copepod nutrition. ICES J. Mar. Sci. 52, 297–304.

Kobayashi, S., and Archdale, M.V., 2017. Occurrence pattern and reproductive ecology of the leucosiid crab *Pyrhila pisum* (De Haan) in tidal flats in Hakata Bay, Fukuoka, Japan. Crust. Res. 46, 103–119.

Koivula, M., Koskela, E., Mappes, T., and Oksanen, T.A., 2003. Cost of reproduction in the wild: manipulation of reproductive effort in the bank vole. Ecology 84, 398–405.

Koopman, H.N., Westgate, A.J., and Siders, Z.A., 2015. Declining fecundity and factors affecting embryo quality in the American lobster (*Homarus americanus*) from the Bay of Fundy. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 72, 352–363.

Kuris, A. 1990. Crustacean egg production. CRC Press, Florida.

Kyomo, J., 1988. Analysis of the relationship between gonads and hepatopancreas in males and females of the crab *Sesarma intermedia*, with reference to resource use and reproduction. Mar. Biol. 97, 87–93.

Kyomo, J., 2000. Intraspecific variation of reproductive strategies of the crab *Sesarma intermedia*: a consequence of habitat variations. Bull. Mar. Sci. 66,157–171.

Laurenzano, C., Farías, N.E., and Schubart, C.D., 2012. Mitochondrial genetic structure of two populations of *Uca urugayensis* fails to reveal an impact of the Rio de la Plata on gene flow. Nauplius 20, 15–25.

Leal Filho, W., Nagy, G.J., Martinho, F., Saroar, M., Erache, M.G., Primo, A.L., and Li, C., 2022. Influences of climate change and variability on estuarine

ecosystems: An impact study in selected European, South American and Asian countries. Int. J. Environ. Res. Public Health 19, 585.

Lee, F., and Chang, C., 1997. The concentrations of vitellogenin and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn *Macrobrachium rosembergii*. Comp. Biochem. Physiol. 117, 433– 439.

Lemaître, J.F., and Gaillard, J.M., 2017. Reproductive senescence: new perspectives in the wild. Biol. Rev. 92, 2182–2199.

Lester, S.E., Gaines, S.D., and Kinlan, B.P., 2007. Reproduction on the edge: Large-scale patterns of individual performance in a marine invertebrate. Ecology 88, 2229–2239.

Liñán Cabello, M.A., Paniagua Michel, J., and Hopkins, P.M., 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. Aquac. Nutr., 8, 299–309.

Litulo, C., 2005. Population structure and reproductive biology of the fiddler crab *Uca inversa* (Hoffman, 1874) (Brachyura: Ocypodidae). Acta Oecol. 27, 135–141.

Long, X., Xugan, W., Lei Zhao, J.L., and Yongxu, C., 2017. Effects of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis* cell powder on coloration, ovarian development and antioxidation capacity of adult female Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Aquac. 473, 545–553.

López Greco, L.S., 1997. Adquisición de la madurez sexual y caracterización del patrón de crecimiento y reproducción en *Chasmagnathus granulata*, Dana, 1851 (Brachyura, Grapsidae, *Sesarminae*) de Bahía

Samborombón, Buenos Aires, Argentina. Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

López Greco, L.S., and Rodríguez, E.M., 1999. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). Cah. Mar. Biol. 40, 155–164.

López Greco, L.S., and Rodríguez, E.M., 2004. Reproductive performance in *Cyrtograpsus angulatus* and *Cyrtograpsus altimanus* (Brachyura, *Varunidae*) from Jabalí Island, Argentina. J. Crust. Biol. 24, 213–216.

López Greco, L.S., Hernández, J.E., Bolaños, J., Rodriguez, E.M., and Hernández, G. 2000. Population features of *Microphrys bicornutus* Latreille, 1825 (Brachyura, *Majidae*) from Isla Margarita, Venezuela. Hydrobiologia, 439, 151–159.

López, G.R., and Levinton, F.S., 1987. Ecology of deposit–feeding animals in marine sediments. Q. Rev. Biol. 62, 235–260.

Lorenz, T. 1998. A review of the carotenoid, astaxanthin, as a pigment and vitamin source for cultured *Penaeus* prawn. Naturose. Tech. Bull. 1, 1–7.

Lucas, A., 1996. Bioenergetics of aquatic animals, English edition. Taylor and Francis, France.

Lv, L., Liu, Y., Osmond, H.L., Cockburn, A., and Kruuk, L.E., 2020. When to start and when to stop: effects of climate on breeding in a multi-brooded songbird. Glob. Change Biol. 26, 443–457.

Machado, G.B., Gusmão Junior, J.B., and Costa, T.M., 2013. Burrow morphology of *Uca uruguayensis* and *Uca leptodactylus* (Decapoda: *Ocypodidae*) from a subtropical mangrove forest in the western Atlantic. Integr. Zool. 8, 307–314.

Madariaga, I., 2002. Short–term variations in the physiological state of phytoplankton in a shallow temperate estuary. In: Orive, E., and de Jonge, V.N. (Eds.), Nutrients and Eutrophication in Estuaries and Coastal Waters. Springer, Dordrecht, pp. 345–358.

Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., and Vinagre, C., 2012. Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. J. Sea Res. 70, 32–41.

Maitland, D.P., 1990. Feeding and mouthpart morphology in the semaphore crab *Heloecius cordiformis* (Decapoda: Brachyura: Ocypodidae). Mar. Biol. 105, 287–296.

Mak, A.S.C., Choi, C.L., Tiu, S.H.K., Hui, J.H.L., He, J.G., Tobe, S.S., and Chan, S.M., 2005. Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: Hepatopancreas-specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression. Mol. Reprod. Dev. 70, 288–300.

Mao, Z., Gu, X., and Zeng, Q., 2016. Food sources and trophic relationships of three decapod crustaceans: insights from gut contents and stable isotope analyses. Aquac. Res. 47, 2888–2898.

Marciano, A., López Greco, L.S., and Colpo, K.D., 2021. Reproductive patterns and energy management strategies of females of the fiddler crab *Leptuca uruguayensis* with short reproductive seasons. Can. J. Zool. 99, 149–159.

Marciano, A., López Greco, L.S., and Colpo, K.D., 2022. Factors modulating the female reproductive performance of the fiddler crab *Leptuca uruguayensis* with short reproductive season. Biol. Bull. 242, 16–26.

Marciano, A., Tropea, C., and López Greco, L. S., 2018. Effect of multiple spawning on female reproductive output and offspring quality in a

freshwater caridean shrimp with direct development. Invert. Biol. 137, 66–77.

Marshall, D.J., and Keough, M.J., 2004. When the going gets rough: Effect of maternal size manipulation on offspring quality. Mar. Ecol. Prog. Ser. 272, 301–305.

Marshall, D.J., and Keough, M.J., 2007. The evolutionary ecology of offspring size in marine invertebrates. Adv. Mar. Biol. 53, 1–60.

Martin, J.W., and Davis, G.E., 2001. An updated classification of the recent Crustacea. Los Angeles: Natural History Museum of Los Angeles County.

Martins, S.B., and Masunari, S., 2013. Relative growth in the fiddler crab *Uca uruguayensis* Nobili, 1901 (Brachyura, *Ocypodidae*) from Garças River mangrove, Guaratuba Bay, southern Brazil. Nauplius, 21, 35–41.

Massot, M., Clobert, J., Montes Poloni, L., Haussy, C., Cubo, J., and Meylan, S., 2011. An integrative study of ageing in a wild population of common lizards. Funct. Ecol. 25, 848–858.

Matsuda, H., Takenouchi, T., and Yamakawa, T. 2002. Effects of photoperiod and temperature on ovarian development and spawning of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. Aquac. 205, 385–398.

Mauchline, J., 1988. Egg and brood sizes of oceanic pelagic crustaceans. Mar. Ecol. Prog. Ser. Oldendorf 43, 251–258.

McDermott, J.J., 1998. The western Pacific brachyuran *Hemigrapsus sanguineus* (*Grapsidae*) in its new habitat along the Atlantic coast of the United States: reproduction. J. Crust. Biol.18, 308–316.

McEwen, B.S, and Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. Horm. Behav. 43, 2–15.

Menassol, J.B., Collet, A., Chesneau, D., Malpaux, B., and Scaramuzzi R.J., 2012. The interaction between photoperiod and nutrition and its effects on seasonal rhythms of reproduction in the ewe. Biol. Reprod. 86, 52–1.

Méziane, T., d'Agata, F., and Lee, S.Y., 2006. Fate of mangrove organic matter along a subtropical estuary: small–scale exportation and contribution to the food of crab communities. Mar. Ecol. Prog. Ser. 312, 15–27.

Militelli, M.I., Firpo, C., Rodrigues, K.A., and Macchi, G.J., 2019. Egg production and validation of clutch fullness indices scale of southern king crab, *Lithodes santolla*, in the Central Patagonian Sector, Argentina (44°–48° S). Fish. Res. 211, 40–45.

Miller, D.C., 1961. The feeding mechanism of fiddler crabs, with ecological considerations of feeding adaptations. Zoologica 46, 89–101.

Minagawa, M., and Sano, M., 1997. Oogenesis and ovarian development cycle of the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae). Mar.Fresh. Res. 48, 875–888.

Mokhlesi, A., Kamrani, E., Backwell, P., and Sajjadi, M., 2011. Study on the behaviour of two fiddler crabs, *Uca sindensis* and *Uca annulipes* (Decapoda: Ocypodidae), in Bandar Abbas, Iran. J.Mar. Biolog. Assoc. 91, 245–249.

Møller, A.P., Flensted Jensen, E., Klarborg, K., Mardal, W., and Nielsen, J.T., 2010. Climate change affects the duration of the reproductive season in birds. J. Anim. Ecol. 79, 777–784.

Monteiro, J.N., Ovelheiro, A., Ventaneira, A.M., Vieira, V., Teodósio, M.A., and Leitão, F., 2022. Variability in *Carcinus maenas* fecundity along lagoons and estuaries of the Portuguese coast. Estuaries and Coasts, 1–12.

Moran, A.L., and McAlister J.S., 2009. Egg size as a life history character of marine invertebrates: is it all it's cracked up to be? Biol. Bull. 216, 226–242.

Morgan, S.G., 2020. The timing of larval release, In: McEdward, L. (Ed.), Ecology of marine invertebrate larvae. CRC Press, London, pp. 157–191

Morgan, S.G., and Christy, J.H., 1995. Adaptive significance of the timing of larval release by crabs. Am. Nat. 145, 457–479.

Morrisey, D.J., Underwood, A.J., Howitt L., and Stark J. S.,1992. Temporal variation in soft–sediment benthos. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 164, 233–245.

Mos, B., Ahyong, S.T., Burnes, C.N., Davie, P.J.F., McCormack, R.B., 2017. Range extension of a euryhaline crab, *Varuna litterata* (Fabricius, 1798) (Brachyura: Varunidae), in a climate change hot–spot, J. Crust. Biol. 37, 258–262.

Mouton, E.C. Jr., and Felder, D.L., 1995. Reproduction of the fiddler crabs *Uca longispinalis* and *Uca spinicarpa* in a Gulf of Mexico salt marsh. Estuaries 18, 469–481.

Muiño, R., 2002. Fecundity of *Liocarcinus depurator* (Brachyura: Portunidae) in the Ría de Arousa (Galicia, north–west Spain). J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 82, 109.

Muñoz, A., Goñi, R., Linares, C., Kersting, D., Stobart, B., Mallol, S., and Díaz, D., 2021. Exploration of the inter-annual variability and multi-scale environmental drivers of European spiny lobster, *Palinurus elephas* (Decapoda: Palinuridae) settlement in the NW Mediterranean. Mar. Ecol. 42, e12654.

Naderi, M., Hosseini, S.A., Pazooki, J., Hedayati, A., Zare, P., and Lastra, M., 2018. Reproductive biology of the ghost crab, *Ocypode rotundata* Miers, 1882 (Decapoda, Ocypodidae) at Qeshm Island, Persian Gulf. Crustaceana, 91, 1039–1059.

Naderloo, R., Türkay, M., and Chen, H.L., 2010. Taxonomic revision of the wide-front fiddler crabs of the *Uca lactea* group (Crustacea: Decapoda: Brachyura: *Ocypodidae*) in the Indo-West Pacific. Zootaxa 2500, 1–38.

Nagaraju, G.P.C., 2011. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. J. Exp. Biol. 214, 3–16.

Natálio, L.F., Pardo, J.C., Machado, G.B., Fortuna, M.D., Gallo, D.G., and Costa, T.M., 2017. Potential effect of fiddler crabs on organic matter distribution: a combined laboratory and field experimental approach. Est. Coast. Shelf Sci. 184, 158–165.

Nates, S.F., and McKenney Jr., C.L., 2000. Ontogenetic changes in biochemical composition during larval and early post larval development of *Lepidophthalmus louisianensis*, a ghost shrimp with abbreviated development. Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 127, 459–468.

Naylor, E., 2001. Marine Animal Behaviour in Relation to Lunar Phase, In: Barbieri, C., Rampazzi, F. (Eds), Earth-Moon Relationships. Springer, Dordrecht, pp. 291–302.

New, M.B., 1976. A review of dietary studies with shrimps and prawns. Aquac. 9, 101–144.

Ng, P.K.L., Guinot, D., and Davie, P.J.F., 2008. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. The Raffles Bull Zool.17, 1–286.

Ohtomi, J., Yamamoto, S., and Koshio, S., 1998. Ovarian maturation and spawning of the deep–water mud shrimp *Solenocera melantho* De Man, 1907 (Decapoda, Penaeoidea, Solenoceridae) in Kagoshima Bay, southern Japan. Crustaceana 672–685.

Oliphant, A., Hauton, C., and Thatje S., 2013. The implications of temperature-mediated plasticity in larval instar number for development in a marine invertebrate, the shrimp *Palaemonetes varians*. PLoS ONE 8, e75785.

Oliveira, G.T., Hack, C., Almerão, M., Bond Buckup, G., and Dutra, B.K., 2011. Tissue composition and haemolymphatic metabolites during gonadal development in *Aegla platensis* (Crustacea, Decapoda) maintained in experimental culture. R. Bras. Bioci. 9, 64–71.

Ouellet, P., and Plante, F., 2004. An investigation of the sources of variability in American lobster (*Homarus americanus*) eggs and larvae: female size and reproductive status, and interannual and interpopulation comparisons. J. Crust. Biol. 24, 481–495.

Palacios, E., Ibarra, A.M., and Racotta, I.S., 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond reared *Penaeus vannamei* broodstock. Aquac. 185, 353–371.

Palacios, E., Racotta, I.S., Heras, H., Marty, Y., Moal, J., and Samain, J.F., 2001. Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). Aquac. Int. 9, 531–543.

Palaoro, A.V., Thiel, M., Cothran, R.D., and Thiel, M. 2020. The caring crustacean: an overview of crustacean parental care. Reproduct. Biol. 6, 115–144.

Pamuru, R.R., 2019. Endocrinology of reproduction in crustaceans. Comparative Endocrinology of Animals. IntechOpen, London.

Parker, G.A., Ramm, S.A., Lehtonen, J., and Henshaw, J.M., 2018. The evolution of gonad expenditure and gonadosomatic index (GSI) in male and female broadcast–spawning invertebrates. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 93, 693–753.

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

Paul, P., Islam, M.S., Khatun, S., Bir, J., and Ghosh, A., 2021. Reproductive biology of mud crabs (*Scylla olivacea*) collected from Paikgachha, Khulna, Bangladesh. J.Adv. Vet. 8, 44.

Peiró, D.F., Wehrtmann, I.S., and Mantelatto, F.L., 2014. Reproductive strategy of the ghost shrimp *Callichirus major* (Crustacea: Axiidea: Callianassidae) from the southwestern Atlantic: sexual maturity of females, fecundity, egg features, and reproductive output. Invertebr. Reprod. Dev. 58, 294–305.

Peixoto, S., Coman, G., Arnold, S., Crocos, P., and Preston, N., 2005. Histological examination of final oocyte maturation and atresia in wild and domesticated *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. Aquac. Res. 36, 666–673.

Pérez, A.F., Boy, C., Morriconi, E., and Calvo, J., 2010. Reproductive cycle and reproductive output of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata:

Echinoidea) from Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. Polar Biol. 33, 271–280.

Perillo, G.M.E.,1997. Evaluación de la vulnerabilidad de la costa argentina al ascenso del nivel del mar. Proyecto Arg.

Pershing, A.J., Wahle, R.A., Meyers, P.C., and Lawton, P., 2012. Large scale coherence in New England lobster (*Homarus americanus*), settlement and associations with regional atmospheric conditions. Fish. Oceanograph. 21, 348–362.

Pinheiro, M.A.A., and Fransozo, A., 2002. Reproduction of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: *Portunidae*) on the Brazilian coast near 23 30′ S. J. Crust. Biol. 22, 416–428.

Prasad, A., Croydon Sugarman, M.J., Murray, R.L., and Cutter, A.D., 2011. Temperature-dependent fecundity associates with latitude in *Caenorhabditis briggsae*. Evolution 65, 52–63.

Quintana, D., Márquez, L., Arévalo, J.R., Lorenzo, A., and Almansa, E., 2015. Relationships between spawn quality and biochemical composition of eggs and hatchlings of *Octopus vulgaris* under different parental diets. Aquac. 446, 206–216.

Ramirez Llodra, E., 2002. Fecundity and life–history strategies in marine invertebrates. Adv. Mar. Biol. 43, 88–172.

Ramsar. Mayo de 2022. Argentina Names Bahía de Samborombón to the Ramsar List. https://ramsar.org/news/argentina-names-bahia-de-samborombon-to-the-ramsar-list.

Rani, K., and Subramoniam, T., 1997. Vitellogenesis in the mud crab *Scylla serrata*– an *in vivo* isotope study. J. Crust. Biol. 17, 659–665.

Raviv, S., Parnes, S., and Sagi, A., 2008. Coordination of reproduction and molt in decapods, In: E. Mente (Ed.), Reproductive Biology of crustaceans: case studies of decapod crustaceans. Science Publishers, New Hampshire. pp. 365–390.

Reid, W.V., 1987. The cost of reproduction in the glaucous–winged gull. Oecologia 74, 458–467.

Renstrøm, B., Borch, G., and Liaaen Jensen, S., 1981. Natural occurrence of enantiomeric and meso–astaxanthin 4. Ex shrimps (*Pandalus borealis*). Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem. 69, 621–624.

Reznick, D., 1985. Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. Oikos 44, 257–267.

Reznick, D., Nunney, L., and Tessier, A., 2000. Big houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction. Trends Ecol. Evol. 15, 421–425.

Ribeiro, P.D., and Iribarne, O.O., 2011. Coupling between microphytobenthic biomass and fiddler crab feeding. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 407, 147–154.

Ribeiro, P.D., Christy J.H., Nuñez J.D, and Iribarne O.O., 2016. Hood–building dynamics and mating mode in the temperate fiddler crab *Uca uruguayensis*. J. Crust. Biol. 36, 507–514.

Ribeiro, P.D., Daleo, P., and Iribarne, O.O., 2010. Density affects mating mode and large male mating advantage in a fiddler crab. Oecologia 164, 931–941.

Ribeiro, P.D., Iribarne, O.O., and Daleo, P., 2005. The relative importance of substratum characteristics and recruitment in determining the spatial distribution of the fiddler crab *Uca uruguayensis* Nobili. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 314, 99–111.

Ribeiro, P.D., Navarro, D.D., Jaureguy, L.M., Daleo, P., and Iribarne, O.O., 2019. Evaluating the potential impact of bird predation on the SW Atlantic fiddler crab *Leptuca uruguayensis*. Helgol. Mar. Res. 73, 1–12.

Rieger, P.J., 1996. Desenvolvimento larval de *Uca* (Celuca) *uruguayensis* Nobili, 1901 (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae), em laboratório. Nauplius 4, 73–103.

Robertson, J.R., and Newell, S.Y., 1982a. Experimental studies of particle ingestion by the sand fiddler crab *Uca pugilator* (Bosc). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 59, 1–21.

Robertson, J.R., and Newell, S.Y., 1982b. A study of particle ingestion by three fiddler crab species foraging on sandy sediments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 65, 11–17.

Rodil, I.F., Cividanes, S., Lastra, M., and López, J., 2008. Seasonal variability in the vertical distribution of benthic macrofauna and sedimentary organic matter in an estuarine beach (NW Spain). Estuar. Coasts 31, 382–395.

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

Rodríguez Jaramillo, C., López Martínez, J., Herrera Valdivia, E., and Rábago-Quiroz, C.H., 2021. Reproduction in the spider crab *Maiopsis panamensis* (Decapoda: Majoidea) in the Gulf of California. Invert. Biol. 140, e12342.

Roff, D.A., Mostowy, S., and Fairbairn, D.J., 2002. The evolution of trade-offs: testing predictions on response to selection and environmental variation. Evolution 56, 84–95.

Rosa, R., and Nunes, M., 2002. Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of Portugal. Mar. Biol. 141, 1001–1009.

Rosa, R., and Nunes, M.L., 2003. Tissue biochemical composition in relation to the reproductive cycle of deep–sea decapod *Aristeus antennatus* in the south Portuguese coast. J. Mar. Biol. Assoc. UK 83, 963–970.

Rosa, R., Calado, R., Andrade, A.M., Narciso, L., and Nunes, M.L., 2005. Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of European lobster, *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. B 140, 241–249.

Rosenberg, M.S., 2013. The nomenclatural status of the two 'spiny-wristed' fiddler crabs: *Uca spinicarpa* Rathbun, 1900, and *U. hesperiae* Crane, 1975 (Crustacea: Brachyura: *Ocypodidae*). Zootaxa 3716, 494–500.

Roustaian, P., Kamarudin, M.S., Omar, H.B., Saad, C.R., and Ahmad, M.H., 2001. Biochemical changes in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* during larval development. J. World Aquac. Soc. 32, 53–59.

RStudio Team, 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA.

Ruffino, L., Salo, P., Koivisto, E., Banks, P. B., and Korpimäki, E., 2014. Reproductive responses of birds to experimental food supplementation: a meta–analysis. Front. Zool. 11, 80.

Sacristán, H.J., Rodríguez, Y.E., De los Angeles Pereira, N., López Greco, L.S., Lovrich, G.A., and Gimenez, A.V.F., 2017. Energy reserves mobilization: strategies of three decapod species. PloS one 12, e0184060.

Saher, N.U., and Qureshi, N.A., 2014. Food and feeding ecology of fiddler crabs species found along the coast of Pakistan. Rom. J. Biol. 1, 19.

Salmon, A.B., Marx, D.B., and Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: stress susceptibility. Evolution 55, 1600–1608.

Sampedro, M., González Gurriarán, E., Freire, J., and Muiño, R., 1999. Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in Galicia, Spain. J. Crust. Biol. 19, 578–592.

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

Sanford, E., Holzman, S.B., Haney, R.A., and Bertness, M.D., 2006. Larval tolerance, gene flow, and the northern geographic range limit of fiddler crabs. Ecology 87, 2882–2894.

Sarapio, E., Santos, J.T., Model, J.F.A., De Fraga, L.S., Vinagre, A.S., Martins, T.L., and Trapp, M., 2017. Glyceroneogenesis in the hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata*: diet, starvation and season effects. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 211, 1–7.

Sasaki, G. C., Capuzzo, J.M., and Biesiot, P., 1986. Nutritional and bioenergetic considerations in the development of the American lobster *Homarus americanus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43, 2311–2319.

Sastry, A.N., Vernberg, F.J., and Vernberg, W.B., 1983. Ecological aspects of reproduction. Biol. Crust. 8, 179–270.

Sayão Aguiar, B., Pinheiro, M.A.A., and Colpo, K.D., 2012. Sediment bioturbation potential of *Uca rapax* and *Uca uruguayensis* as a result of their feeding activity. J. Crust. Biol. 32, 223–229.

Schneider, T., Grosbois, G., Vincent, W. F., and Rautio, M., 2016. Carotenoid accumulation in copepods is related to lipid metabolism and reproduction rather than to UV-protection. Limnol. Oceanogr. 61, 1201–1213.

Shafi, S., 2012. Study on fecundity and GSI of *Carassius carassius* (Linneaus, 1758–introduced) from Dal Lake Kashmir. J. Biol. Agric. Healthc. 2, 68–75.

Shih, H.T., Ng, P.K., Davie, P.J., Schubart, C.D., Türkay, M., Naderloo, R., and Liu, M.Y., 2016. Systematics of the family *Ocypodidae rafinesque*, 1815 (Crustacea: Brachyura), based on phylogenetic relationships, with a reorganization of subfamily rankings and a review of the taxonomic status of *Uca leach*, 1814, sensu lato and its subgenera. Raffles Bull. Zool. 64.

Silva, P.V., Luppi, T.A., and Spivak, E.D., 2007. Epibiosis on eggs and brooding care in the burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae): comparison between mudflats and salt marshes. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 87, 893–901.

Simpson, L., Ambrosio, L.J., Guéron, R., Mora, N., and Owen, D., 2015. Reproductive investment in a phyletic giant, the Caribbean king crab *Damithrax spinosissimus*: exploring egg production costs in large brooding marine invertebrates. J. Shellfish Res. 34, 1049–1056.

Sistema de Información y Gestión Meteorológica. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Mayo 2022. https://siga.inta.gov.ar/#/data

Sorensen, M.C., Hipfner, J.M., Kyser, T.K., and Norris, D.R., 2009. Carry-over effects in a Pacific seabird: stable isotope evidence that pre-breeding diet quality influences reproductive success. J. An. Ecol. 78, 460–467.

Spivak, E.D., Gavio, M.A., and Navarro, C.E., 1991. Life history and structure of the world's southernmost Uca population: *Uca uruguayensis* (Crustacea, Brachyura) in Mar Chiquita Lagoon (Argentina). Bull. Mar. Sci. 48, 679–688.

Stahlschmidt, Z.R., and Adamo, S.A., 2015. Food-limited mothers favor offspring quality over offspring number: a principal components approach. Funct. Ecol. 29, 88–95.

Steachey, D.P.M., and Somers, K.M., 1995. Potential, realized and actual fecundity in the crayfish *Orconectes immunis* form southwestern Ontario. Can. J. Zool. 73, 672–677.

Stearns, S.C., 1989. Trade-offs in life-history evolution. Funct. Ecol. 3, 259–268.

Stearns, S.C., 1992. The evolution of life histories, Oxford University Press, Oxford.

Steele, D.H., and Steele, V.J., 1975. Egg size and duration of embryonic development in Crustacea. Int. Rev. der Ges. Hydrobiol. Hydrogr. 60, 711–715.

Steele, D.H., and Steele, V.J., 1991. Effects of salinity on the survival, growth rate, and reproductive output of *Gammarus lawrencianus* (Crustacea, Amphipoda). Mar. Ecol. Prog. Ser. 78, 49–56.

Stephens, P.A., Boyd I.L., McNamara J.M., and Houston A.I., 2009. Capital breeding and income breeding: their meaning, measurement, and worth. Ecology, 90, 2057–22067.

Stevens, B. 2006. Embryo development and morphometry in the blue king crab *Paralithodes platypus* studied by using image and cluster analysis. J. Shell. Res. 25, 569–576

Subramoniam, T., 2011. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. Fish. Sci. 77, 1–21.

Sudha, K., and Anilkumar, G., 1996. Seasonal growth and reproduction in a highly fecund brachyuran crab, *Metopograpsus messor* (Forskal)(*Grapsidae*). Hydrobiologia 319, 15–21.

Swiney, K.M., Long, W.C., Eckert, G.L., and Kruse, G.H., 2012. Red king crab, *Paralithodes camtschaticus*, size–fecundity relationship, and interannual and seasonal variability in fecundity. J. Shellfish Res. 31, 925–933.

Szuwalski, C., Cheng, W., Foy, R., Hermann, A.J., Hollowed, A., Holsman, K., and Zheng, J., 2021. Climate change and the future productivity and distribution of crab in the Bering Sea. ICES J. Mar. Sci. 78, 502–515.

Taylor, H.H., and Leelapiyanart, N., 2001. Oxygen uptake by embryos and ovigerous females of two intertidal crabs, *Heterozius rotundifrons* (Belliidae) and *Cyclograpsus lavauxi* (Grapsidae): scaling and the metabolic costs of reproduction. J. Exp. Biol. 204, 1083–1097.

Teixeira, G.M., Fransozo, V., Góes, J.M., Fernandes Góes, L.C., Hirose, G.L., Almeida, A.C., and Fransozo, A., 2017. Reproductive investment and multiple spawning evidence in the redfinger rubble crab *Eriphia gonagra* (Brachyura, Eriphioidea). Nauplius 25, e2017006.buscar las páginas

Thatje, S., and Hall, S., 2016. The effect of temperature on the evolution of per offspring investment in a globally distributed family of marine invertebrates (Crustacea: Decapoda: Lithodidae). Mar. Biol. 163, 1-9.

Thatje, S., Dunbar, C.G., and Smith, K.E., 2019. Temperature–driven inter–annual variability in reproductive investment in the common whelk *Buccinum undatum*. J. Sea Res. 148, 17–22.

Thomas, V.G., 1988. Body condition, ovarian hierarchies, and their relation to egg formation in Anseriform and *Galliform* species, In: Quellet H. (Ed.), Acta XIX Congressus Internationalis Ornithologici. National Museum of Natural Science, Ottawa, pp. 353–363.

Tina, F.W., Jaroensutasinee, M., and Jaroensutasinee, K., 2015. Effects of sexual dimorphism and body size on feeding behaviour of the fiddler crab, *Uca bengali* Crane, 1975. Crustaceana 88, 231–242.

Torrissen, O.J., and Naevdal G., 1984. Pigmentation of salmonids–genetical variation in carotenoid deposition in rainbow trout. Aquac. 38, 59–66.

Tropea, C., and López Greco, L.S., 2015. Female growth and offspring quality over successive spawnings in a caridean shrimp *Neocaridina davidi* (Decapoda, Atyidae) with direct development. Biol. Bull. 229, 243–254.

Tropea, C., Sganga, D.E., and López Greco, L.S., 2019. Egg production in relation to paternal weight in a freshwater caridean shrimp (Decapoda). J. Zool. 309, 50–59.

Truchet, D.M., Buzzi, N. S., Carcedo, M.C., and Marcovecchio, J.E., 2019. First record of the fiddler crab *Leptuca (= Uca) uruguayensis* in the Bahia Blanca Estuary (Buenos Aires, Argentina) with comments on its biology in South America. Reg. Stud. Mar. Sci. 27, 100539.

Tsuchida, S., and Watanabe, S., 1997. Growth and reproduction of the grapsid crab *Plagusia dentipes* (Decapoda: Brachyura). J. Crust. Biol. 17, 90–97.

Tsujimoto, M., Komori, O., and Imura S., 2016. Effect of lifespan and age on reproductive performance of the tardigrade *Acutuncus antarcticus*: minimal reproductive senescence. Hydrobiologia 772, 93–102.

Tsukimura, B., 2001. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. Am. Zool. 41, 465–476.

Urzúa, Á., and Anger K., 2013. Seasonal variations in larval biomass and biochemical composition of brown shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea), at hatching. Helgol. Mar. Res. 67, 267–277.

Urzúa, Á., Paschke, K., Gebauer, P., and Anger, K., 2012. Seasonal and interannual variations in size, biomass and chemical composition of the eggs of North Sea shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda: Caridea). Mar. Biol. 159, 583–599.

van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount of tissue. Anal. Biochem. 11, 256–265.

Vaninni M. and Gherardi F., 1988. Studies on the pebble crab, *Eriphia smithi* MacLeay, 1838 (Xanthoidea, *Menippidae*): patterns of relative growth and population structure. Trop. Zool. 1, 203–216.

Vargas Ceballos, M. A., López Uriarte, E., García Guerrero, M. U., Wehrtmann, I. S., Ríos Jara, E., and Vega Villasante, F., 2018. Fecundity, egg volume and reproductive output of *Macrobrachium tenellum* (Crustacea: Palaemonidae) from the northern coast of Jalisco, Mexico. Lat. Am. J. Aquat. Res. 46, 502–511.

Varpe, Ø., Jørgensen, C., Tarling, G. A., and Fiksen, Ø., 2009. The adaptive value of energy storage and capital breeding in seasonal environments. Oikos 118, 363–370.

Varpe, Ø., Jørgensen, C., Tarling, G.A., and Fiksen, Ø., 2007. Early is better: seasonal egg fitness and timing of reproduction in a zooplankton life–history model. Oikos 116, 1331–1342.

Vazquez Boucard, C.G.V., Patrois, J., and Ceccaldi, H.J., 2004. Exhaustion of lipid reserves in the hepatopancreas of *Fenneropenaeus indicus* broodstock in relation to successive spawnings. Aquac. 236, 523–537.

Vázquez, M.G., Bas, C.C., and Spivak, E.D., 2013. Seasonal variation in reproductive traits of the oriental shrimp *Palaemon macrodactylus* (Crustacea: Caridea: Palaemonidae) in a non–native population. Helgol. Mar. Res. 67, 749–756.

Verísimo, P., Bernárdez, C., González Gurriarán, E., Freire, J., Muiño, R., and Fernández, L., 2011. Changes between consecutive broods in the fecundity of the spider crab, *Maja brachydactyla*. ICES J. Mar. Sci. 68, 472–478.

Vermeiren, P., and Sheaves, M., 2015. Predictable habitat associations of four crab species across the low intertidal landscape of a tropical estuary over time. Estuar. Coast. 38, 285–295.

Vianna, B.S, Miyai, C.A., Augusto, A., and Costa, T.M., 2020. Effects of temperature increase on the physiology and behavior of fiddler crabs. Physiol. Behav. 215, 112765.

Violante, R.A., Parker, G., and Cavallotto, J.L., 2001. Evolución de las llanuras costeras del este bonaerense entre la bahía Samborombón y la laguna Mar Chiquita durante el Holoceno. Rev. Asoc. Geol. Arg. 56, 51–66.

Vogt, G., 2019. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. J. Morphol. 280, 1405–1444.

Wade, N.M., Gabaudan, J., and Glencross, B.D., 2017. A review of carotenoid utilization and function in crustacean aquaculture. Rev. Aquac. 9, 141–156.

Wang, L.H., Lin, C., Huang, C.Y., and Tsai, S., 2015. Studies on lipid content and composition in banded coral shrimp (*Stenopus hispidus*) embryos. J. Crustac. Biol. 35, 622–626.

Warner, D.A., Bonnet, X., Hobson, K.A., and Shine, R., 2008. Lizards combine stored energy and recently acquired nutrients flexibly to fuel reproduction. J. Anim. Ecol. 77, 1242–1249.

Weather Atlas. Mayo 2022. Bahía de Samborombón. https://www.weather-atlas.com/es/argentina/samborombon-clima.

Wehrtmann, I.S., Miranda, I., Lizana Moreno, C.A., Hernáez, P., Barrantes Echandi, V., and Mantelatto, F.L., 2012. Reproductive plasticity in *Petrolisthes armatus* (Anomura, Porcellanidae): a comparison between a Pacific and an Atlantic population. Helgol. Mar. Res. 66, 87–96.

Weis, J.S., and Weis, P., 2004. Behavior of four species of fiddler crabs, genus *Uca*, in southeast Sulawesi, Indonesia. Hydrobiologia 523, 47–58.

Weissburg, M. 1992. Functional analysis of fiddler crab foraging: sex-specific mechanics and constraints in *Uca pugnax* (Smith). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 156, 105–124.

Weissburg, M., 1993. Sex and the single forager: Gender–specific energy maximization strategies in fiddler crabs. Ecology 74, 279–291.

Wenner, A.M., Page, H.M., and Siegel, P.R., 2017. Variation in size at onset of egg production. In: Wenner, A.M. (Ed.), Factors in adult growth. Routledge, London, pp. 149–164.

Wessels, F.J., Jordan, D.C., and Hahn, D.A., 2010. Allocation from capital and income sources to reproduction shift from first to second clutch in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. J. Insect Physiol. 56, 1269–1274.

Williams, C.T., Klaassen, M., Barnes, B.M., Buck, C.L., Arnold, W., Giroud, S., Vetter, S.G., and Ruf, T., 2017. Seasonal reproductive tactics: annual timing and the capital–to–income breeder continuum. Phil. Trans. R. Soc. B 372, 20160250.

Winberg, G.G., 1971. Methods for the Estimation of Production of Aquatic Animals. Academic Press, London.

Wootton, R. J., and Fletcher, D.A., 2009. Effect of spawning number and ration on reproductive performance of the batch–spawning three–spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. J. Fish. Biol. 75, 618–629.

Wouters, R., Gomez, L., Lavens, P., and Calderon, J., 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. J. Shellfish Res. 18, 651–656.

Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., and Sorgeloos, P., 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. Aquac. 202, 1–21.

Wu, X.G., Cheng, Y.X., Zeng, C.S., Wang, C.L., and Cui, Z.X., 2010. Reproductive performance and offspring quality of the first and the second

brood of female swimming crab, *Portunus trituberculatus*. Aquac. 303, 94–100.

Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M., and Ito, Y., 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids: I. Effect of dietary astaxanthin, β–carotene and canthaxanthin on pigmentation. Aquac. 87, 323–330.

Yamaguchi, T., 2001. Incubation of eggs and embryonic development of the fiddler crab, *Uca lactea* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). Crustaceana, 74, 449–458.

Yamaguchi, T., 2003. Seasonal changes in the energy content of females of the fiddler crab, *Uca lactea*, especially during the reproductive period. Crustaceana, 1371–1397.

Yampolsky, L. Y., and Scheiner, S. M., 1996. Why larger offspring at lower temperatures? A demographic approach. Am. Nat. 147, 86–100.

Yan, H., Xue, M., Liu, H., Wang, L., Liu, Q., and Jiang, L., 2017. Energy reserves and gonad steroid levels during the reproductive cycle of the Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* De Haan, 1844 (Stomatopoda: *Squillidae*) in Pikou Bay, Dalian, China. J. Crust. Biol. 37, 99–108.

Yosho, I., 2000. Reproductive cycle and fecundity of *Chionoecetes japonicus* (Brachyura: Majidae) off the coast of Central Honshu, Sea of Japan. Fish. Sci. 66, 940–946.

Yu, Z. Y., Wu, X. G., Chang, G. L., Cheng, Y. X., Liu, Z. J., and Yang, X. Z., 2007. Changes in the main biochemical composition in ovaries and hepatopancreas of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne–

Edwards) during the second ovarian development. Acta Hydrobiol. Sin. 31, 45–52.

Zara, F.J., Gaeta, H.H., Costa, T.M., Toyama, M.H., and Caetano, F.H., 2011. The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). Acta Zool.,94, 134–146.

Zeng, X., Wan, H., Zhong, J., Feng, Y., Zhang, Z., and Wang, Y., 2021. Large lipid transfer proteins in hepatopancreas of the mud crab *Scylla paramamosain*. Comp. Biochem. Physiol. Genom. Proteom. 38, 100801.

Zeng, Y., McLay, C., and Yeo, D.C., 2014. Capital or income breeding crabs: who are the better invaders? Crustaceana, 87, 1648–1656.

Zhu, Z., Kim, T.W., and Choe, J.C., 2012. Is female preference for large sexual ornaments due to a bias to escape predation risk? BMC Evol. Biol. 12, 33.

Zimmerman, T.L., and Felder, D.L., 1991. Reproductive ecology of an intertidal brachyuran crab, *Sesarma sp.* (nr. reticulatum), from the Gulf of Mexico. Biol. Bull. 181, 387–401.

Zisserson, B., and Cook, A., 2017. Impact of bottom water temperature change on the southernmost snow crab fishery in the Atlantic Ocean. Fish. Res.195, 12–18.

Zuur, A.F., Ieno, E.N., and Elphick, C.S., 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. Methods Ecol. Evol. 1, 3–14.