



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

TESIS DOCTORAL

Composición bioquímica y condición fisiológica del santiaguíño

***Scyllarus arctus*. Implicaciones Reproductivas**

Ignacio Alborés Blanes

2016

Director:

Dr. Luis Fernández Rodríguez

Doctorado en Biología Celular y Molecular¹

¹Programa regulado por el RD 99/2011

A mi familia

Agradecimientos

La realización de esta tesis ha resultado una ardua labor a la que he dedicado muchos años de trabajo. Como en todo largo camino, esta tesis no ha estado exenta de pequeños escollos que han ido mermando parte de la energía e ilusión con la que la emprendí, y que en ocasiones, me han dificultado ver su final. Es por esta razón que después de haber terminado de redactar esta tesis, estar escribiendo estas últimas líneas me genera una gran satisfacción personal. Con estas últimas líneas quiero echar la mirada atrás y agradecer a todas las personas que han colaborado y me han dado su apoyo, una ayuda sin la que no podría haber llegado hasta aquí.

En primer lugar a mi director de tesis Luís Fernández por aceptarme como doctorando, por la confianza depositada, por todo el tiempo que me ha dedicado y la paciencia que ha tenido para enseñarme a investigar, a hacerme preguntas y a cómo razonar.

Este trabajo quiero compartirlo con un compañero, Carlos García, con el que me embarqué a estudiar el santiaguíño, y que sin su colaboración e implicación no hubiera podido realizarse.

A los patronos del barco “Venanciño” y “Novo Adrián” de Malpica por su inestimable ayuda y colaboración en la difícil tarea de obtención de ejemplares de santiaguíño.

A todo el personal del Aquarium Finisterrae: monitores (Mónica, Mari Carmen, etc.), acuaristas (Lillo, María Baulde, Guille, Caste, Luís, Vicente, Santi, Toño, Pablo, Ricardo, etc.), mantenimiento (Leo, Rogelio, Fran, Fabián, Alberto, Noelia) y técnicos (Alfredo, Manel, Paco Franco), por todo su apoyo y colaboración para llevar a cabo con éxito este trabajo de investigación.

A todos los becarios del Aquarium Finisterrae y la UDC (Silvia, Alba, Antía,

Jose) que han colaborado en algún momento durante el estudio del santiaguino.

A los compañeros de laboratorio, con los que he crecido como investigador, por su ayuda y ánimo constante para continuar y finalizar esta tesis. Somos muchos los que hemos pasado por el Grupo de Recursos Marinos y Pesquerías, pero en especial quiero mencionar a Diana Fernández, Ana Tubío, Patricia Verísimo, Gema Casal, Pablo Pita, Inma Alvarez, María José Juan Jorda, María Pan, María Boán, Inés Naya y Rosana Ouréns.

A mi madre, por todo lo que me ha ayudado y apoyado para poder llegar hasta aquí. También a mi hermana Sabela por animarme siempre a continuar.

A mi mujer Judith (y pronto la madre de nuestro hijo), por todo el apoyo y comprensión que ha mostrado durante todos estos años. Se que en muchos momentos no ha sido fácil, pero gracias por estar siempre ahí.

Y no me puedo olvidar de agradecer al resto de mi gran familia, por todo su apoyo y cariño. En especial quiero recordar a mi abuelo Lucas, que siempre me preguntaba con interés por todo lo que aprendía con el santiaguino, y que sin saberlo me animaba a continuar.

Esta tesis se realizó en el marco del proyecto “Estudio de la Biología reproductiva y desarrollo larvario del Santiaguíño *Scyllarus arctus*: Conocimientos básicos para una Gestión Pesquera Sostenible” (07MMA009103PR) cofinanciado por la Xunta de Galicia y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Asimismo, para la realización de este trabajo se ha contado con la colaboración del Aquarium Finisterrae de A Coruña, centro perteneciente a los Museos Científicos Coruñeses del Excmo. Ayuntamiento de A Coruña.

Resumen/Resumo/Abstract

Resumen

En las últimas décadas, se ha observado un notable descenso de las poblaciones del santiaguíño *Scyllarus arctus* a lo largo de su distribución geográfica. Sin embargo, su alto valor comercial y la gestión de su pesquería, contrastan con el escaso conocimiento de aspectos relevantes de su biología para comprender la capacidad de recuperación de sus poblaciones.

Esta tesis tratará de ampliar el conocimiento actual sobre la biología reproductiva de *S. arctus*, con el fin de aportar información sobre aspectos reproductivos poco estudiados. Conocer la talla de madurez sexual, el ciclo reproductivo y el potencial reproductivo de la especie, así como los factores que determinan su variabilidad, es relevante desde un punto de vista ecológico y tiene potencial interés para gestionar este recurso marino de forma sostenible y evaluar el estado de sus poblaciones.

Con este objetivo, se aborda el estudio de una población de *S. arctus* en la costa gallega (NE Atlántico) durante los años 2008 y 2009. Un aspecto novedoso es el estudio de la reproducción desde la perspectiva de la caracterización bioquímica de las puestas, y de la condición fisiológica individual, aspectos que están directamente relacionados con la disponibilidad y utilización de recursos energéticos y estructurales para su reproducción.

Resumo

Nas últimas décadas, observouse un notable descenso das poboacións do santiaguíño *Scyllarus arctus* ao longo da súa distribución xeográfica. Sen embargo, o

seu alto valor comercial e a xestión da súa pesqueira, contrastan co escaso coñecemento de aspectos relevantes da súa bioloxía para comprender a capacidade de recuperación das súas poboacións naturais.

Esta tese trata de ampliar o coñecemento actual sobre a bioloxía reprodutiva de *S. arctus*. Coñecer a talla de madurez sexual, o ciclo reprodutivo e o potencial reprodutivo da especie, así como os factores que poden determinar a súa variabilidade, é relevante desde o punto de vista ecolóxico e ademais, ten un potencial interese para poder xestionar este recurso mariño dunha forma sustentable e avaliar o estado das súas poboacións.

Con este obxectivo, abórdase o estudo dunha poboación de *S. arctus* na costa galega (NE Atlántico) durante os anos 2008 e 2009. Un aspecto novo deste traballo é o estudo da reprodución dende a perspectiva da caracterización bioquímica das postas e da condición fisiolóxica individual, aspectos de suma importancia, posto que están directamente relacionados coa dispoñibilidade e utilización de recursos enerxéticos e estruturais para a súa reprodución.

Abstract

Over the last decades it has been noted an important decline in the populations of the slipper lobster *Scyllarus arctus* throughout its distributional range. Despite its high commercial value and the management measures that are being implemented, the knowledge on basic biology of this species is scarce.

The main aim of this thesis is to increase the actual knowledge on the reproductive biology of *S. arctus* in order to provide new information on those aspects that have not been studied before. Knowledge on the reproductive cycle, size at maturity and reproductive potential of the species, and those factors that can determine their variability, is extremely important from an ecological point of view but also in order to implement sustainable management measures and to evaluate the state of its populations.

In order to do that, a population of *S. arctus* on the Galician coast (NE Atlantic) has been studied during 2008 and 2009. The novelty of this work relies on the study of the reproductive biology by the biochemical characterisation of the broods and the individual physiological condition, being both aspects critical since they are related to the availability and use of energy and structural resources for reproduction.

Índice general

Resumen/Resumo/Abstract	III
1 Introducción general	1
1.1 Características generales de la especie	1
1.1.1 Sistemática	1
1.1.2 Descripción de la especie	2
1.1.3 Distribución geográfica, hábitat y ecología	4
1.1.4 Reproducción	7
1.1.5 Desarrollo larvario	9
1.1.6 Crecimiento	10
1.2 Importancia socioeconómica de los esciláridos	12
1.3 Situación de <i>S. arctus</i>	14
1.4 Motivación, hipótesis y objetivos para la realización de esta tesis . .	17
1.4.1 Motivación	17
1.4.2 Hipótesis y objetivos	17
2 Metodología general	21
2.1 Área de estudio	21
2.2 Estrategia y protocolo del muestreo	23
2.2.1 Diseño de muestreo en el medio natural	23
2.2.2 Diseño experimental para el estudio de la reproducción y del desarrollo embrionario en cautividad	27
2.3 Análisis bioquímicos y contenido energético	28
2.3.1 Contenido en agua	28
2.3.2 Contenido en cenizas	28
2.3.3 Análisis elemental	29
2.3.4 Proteínas	29
2.3.5 Lípidos	30

2.3.6	Ácidos grasos	30
2.3.7	Carbohidratos	32
2.3.8	Ácidos nucleicos	33
2.3.9	Contenido energético	33
2.4	Procedimiento estadístico	34
3	Caracterización del stock de <i>Scyllarus arctus</i> en el área de estudio	35
3.1	Introducción	35
3.2	Metodología	37
3.2.1	Muestreo	37
3.2.2	Estructura de tallas y proporción sexual	37
3.2.3	Relaciones morfométricas	37
3.3	Resultados	38
3.3.1	Estructura de tallas y proporción sexual	38
3.3.2	Relaciones morfométricas	40
3.4	Discusión	43
3.4.1	Estructura de tallas y proporción sexual	43
3.4.2	Relaciones morfométricas	46
4	Ciclo reproductivo y talla de madurez en <i>Scyllarus arctus</i>	49
4.1	Introducción	49
4.2	Metodología	51
4.2.1	Muestreo	51
4.2.2	Ciclo gonadal	52
4.2.3	Ciclo de cría	53
4.2.4	Duración del periodo de incubación	54
4.2.5	Número de puestas anual	55
4.2.6	Talla de madurez sexual	55
4.2.6.1	<i>Machos</i>	56
4.2.6.2	<i>Hembras</i>	56
4.3	Resultados	58
4.3.1	Ciclo gonadal	58
4.3.2	Ciclo de cría	62
4.3.3	Duración del periodo de incubación	68
4.3.4	Número de puestas anual	68
4.3.5	Talla de Madurez sexual	70

4.4	Discusión	73
4.4.1	Ciclo gonadal	73
4.4.2	Ciclo de cría	75
4.4.3	Duración del periodo de incubación	76
4.4.4	Número de puestas anual	77
4.4.5	Talla de madurez sexual	78
5	Desarrollo embrionario de <i>Scyllarus arctus</i>	83
5.1	Introducción	83
5.2	Metodología	85
5.2.1	Diseño experimental y toma de muestras	85
5.2.2	Análisis bioquímicos	86
5.2.3	Examen y medición de los huevos	87
5.2.4	Análisis de datos	87
5.3	Resultados	90
5.3.1	Caracterización biométrica	90
5.3.2	Caracterización morfológica	92
5.3.3	Composición bioquímica	102
5.4	Discusión	110
5.4.1	Caracterización biométrica y morfológica	110
5.4.2	Composición bioquímica	112
6	Caracterización biométrica y bioquímica de las puestas de <i>Scyllarus arctus</i>	117
6.1	Introducción	117
6.2	Metodología	119
6.2.1	Muestreo y selección de muestras	119
6.2.2	Determinación de las características biométricas de las puestas	120
6.2.3	Determinación de la composición bioquímica	121
6.2.4	Estudio de las variables implicadas en la inversión por huevo	122
6.2.5	Análisis de datos	124
6.2.5.1	Estudio del tamaño óptimo de muestra para la estima del peso del huevo y la fecundidad	124
6.2.5.2	Análisis de las características biométricas de las puestas	124

6.2.5.3	Modelo de fecundidad que incorpora la variabilidad temporal	125
6.2.5.4	Estudio del potencial reproductivo	126
6.2.5.5	Análisis de la composición bioquímica	127
6.2.5.6	Análisis de los perfiles de ácidos grasos	127
6.2.5.7	Estudio de los factores que determinan la inversión por huevo	128
6.2.5.8	Normalidad y homogeneidad	129
6.3	Resultados	129
6.3.1	Características biométricas	129
6.3.1.1	Tamaño óptimo de muestra	129
6.3.1.2	Esfuerzo reproductivo	130
6.3.1.3	Influencia del tamaño materno	131
6.3.1.4	Variación temporal	133
6.3.1.5	Modelo de fecundidad que incorpora la variabilidad temporal	137
6.3.1.6	Potencial reproductivo	138
6.3.2	Composición bioquímica	139
6.3.2.1	Influencia de la talla	140
6.3.2.2	Variación temporal	141
6.3.2.3	Composición de ácidos grasos	142
6.3.3	Factores que influyen en la inversión por huevo	146
6.4	Discusión	150
6.4.1	Características biométricas	150
6.4.2	Composición bioquímica	156
6.4.3	Factores que influyen en la inversión por huevo	161
7	Conclusiones	165
	Bibliografía	167

Introducción general

1.1. Características generales de la especie

1.1.1. Sistemática

Scyllarus arctus (Linnaeus, 1758) es un crustáceo decápodo que pertenece a la familia Scyllaridae, la cual se encuentra incluida en el infraorden Achelata y comprende un total de 20 géneros y 89 especies de langostas distribuidas en cuatro subfamilias: Arctidinae, Ibacinae, Scyllarinae y Theninae (Tabla 1.1; De Grave *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012).

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de *S. arctus* dentro del Orden Decapoda.

Orden Decapoda Latreille, 1802
Suborden Pleocyemata Burkenroad, 1963
Infraorden Achelata Scholtz & Richter, 1995
Familia Scyllaridae Latreille, 1825
Subfamilia Arctidinae Holthuis, 1985
Subfamilia Ibacinae Holthuis, 1985
Subfamilia Theninae Holthuis, 1985
Subfamilia Scyllarinae Latreille, 1825
<i>Scyllarus</i> Fabricius, 1775
<i>Scyllarus arctus</i> (Linnaeus, 1758)

Esta langosta escilárida posee varias denominaciones a lo largo de la costa española (bujía, castañuela, cigarra, llagosta luisa, obispo, parapeto, etc.), aunque comúnmente es conocida como “santiaguíño”, un nombre de origen gallego, que hace referencia a la similitud que existe entre la forma que adoptan las pro-



Fig. 1.1. Ejemplar de *S. arctus* (Linnaeus, 1758) o “santiaguíño” (reproducida con permiso del autor Victor Nuñez, www.checkthesea.com).

tuberancias de la parte dorsal del cefalotórax y la Cruz de Santiago (Fig. 1.1).

1.1.2. Descripción de la especie

Las langostas esciláridas pueden diferenciarse bien de las langostas queladas (familia Nephropidae) por la ausencia de quelas, y de las langostas espinosas (familia Palinuridae) por la presencia de una fuerte modificación del flagelo antenal hacia una forma aplanada o placas, que utilizan para modificar la dirección durante una respuesta de escape (Spanier *et al.*, 1991). Estas langostas forman un grupo muy diverso en cuanto a tamaños, pudiéndose encontrar especies con tamaños inferiores a los 5 cm o superiores a los 50 cm de longitud total (Holthuis, 1991).

El ejemplar adulto de *S. arctus* puede identificarse fácilmente por su morfología externa (Zariquiey, 1968). Esta langosta se caracteriza por presentar un cefalotórax rectangular con un borde dentado y, dorsalmente, tres filas de dientes afilados en la dirección del eje longitudinal. Su caparazón puede adquirir varias coloraciones, que pueden ir desde el marrón claro al rojizo, según el hábitat en

el que se encuentren. Destaca la coloración de los segmentos del abdomen, por mostrar una franja azul seguida de otra de color anaranjado en la zona articular (Fig. 1.1). Los pereiópodos son de color amarillento con franjas anulares de color azul oscuro intercaladas. Los tamaños que se suelen encontrar de esta langosta oscilan entre los 50 a 100 mm de longitud total (Relini *et al.*, 1999).

Puede confundirse con otro escilárido del mismo género, *Scyllarus pygmaeus* (Bate, 1888), en regiones comunes de su distribución geográfica como el Mar Mediterráneo y los archipiélagos de Madeira, Azores y Canarias en el Océano Atlántico (Pessani y Mura, 2007). Las principales características que permiten distinguir ambas especies según Forest y Holthuis (1960) son:

- Los ejemplares de *S. pygmaeus* no superan los 65 mm de longitud total.
- En el último esternito torácico, *S. arctus* presenta un tubérculo con forma roma y aplanado hacia la parte posterior, mientras que en *S. pygmaeus* este tubérculo tiene forma cónica (Fig. 1.2a).
- Los terguitos de la parte anterior de los segmentos abdominales en *S. pygmaeus* tienen una estría recubierta con pelos, mientras que en *S. arctus* esta zona es completamente lisa (Fig. 1.2b).

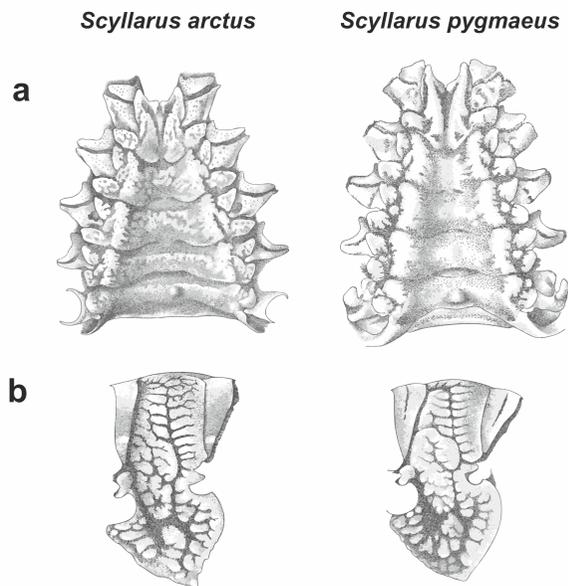


Fig. 1.2. Morfología externa de *S. arctus* y *S. pygmaeus*; (a) esternón torácico y (b) 2º segmento abdominal (Forest y Holthuis, 1960).

- El pleuron del segundo segmento abdominal termina en una punta curvada hacia la parte posterior, mientras que en *S. pygmaeus* su terminación es roma y dirigida ventralmente (Fig. 1.2b).
- La región esculpida situada en la parte posterior del terguito del primer segmento abdominal presenta una anchura uniforme en *S. arctus*, mientras que en *S. pygmaeus* es más ancha en el centro que en los bordes (Fig. 1.2b).
- En los laterales del terguito del primer segmento abdominal en *S. pygmaeus* se distingue una coloración bandeada con vetas blancas, áreas negras, y rojizas. En *S. arctus*, este terguito presenta una banda color rojo-anaranjado y un área negra con dos hendiduras en su parte central recubiertas por pelos.

1.1.3. Distribución geográfica, hábitat y ecología

Los esciláridos están ampliamente distribuidos por todo el mundo en mares templados y tropicales, ocupando desde aguas someras hasta grandes profundidades (>800m), en montañas submarinas y fosas profundas (Coutures, 2000).

La pequeña langosta escilárida *S. arctus* se encuentra presente en el Océano Atlántico Este desde los 11°N hasta los 52°N, así como por todo el Mar Mediterráneo (Holthuis, 1991; Quigley *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012)(Fig. 1.3). La variación de las características oceanográficas que tiene lugar en esta área biogeográfica indica que *S. arctus* posee la capacidad de adaptarse a los cambios ambientales. Un ejemplo, es la elevada tolerancia que presenta esta langosta a un amplio rango de salinidades (29.5-65‰ a 20°C; Vilotte, 1982).

Normalmente, los adultos de *S. arctus* pueden encontrarse en un rango de profundidades que abarca desde los 4 a 50 m, ocupando diferentes tipos de hábitat, como el interior de grietas y cuevas en fondos rocosos, fondos sedimentarios y praderas de fanerógamas (Vilotte, 1982; Holthuis, 1991; Micael *et al.*, 2006). En estos hábitats suele verse a *S. arctus* formando grupos de dos o más ejemplares (Fig. 1.4). Existen varios ejemplos de comportamiento gregario en otras langostas esciláridas como en *Scyllarides latus* y *Scyllarides squammosus*, aunque todavía no se conocen con certeza cuales pueden ser los beneficios de estas asociaciones (Lavalli *et al.*, 2007).

En cuanto a los juveniles, al igual que en otros esciláridos, se desconoce cuales son sus hábitats preferentes. Se ha sugerido que durante esta fase del ciclo de

vida se encuentran en zonas más profundas y que a continuación, migran hacia zonas costeras para reclutarse en las áreas de los adultos (Lavalli *et al.*, 2007). Sin embargo, su baja capturabilidad y naturaleza críptica han impedido comprobar esta hipótesis. En el caso de *S. arctus*, Vilotte (1982) sugiere que los juveniles se encuentran presentes en los mismos hábitats que los adultos, pero que no suelen ser capturados con las artes de pesca debido a su pequeño tamaño.

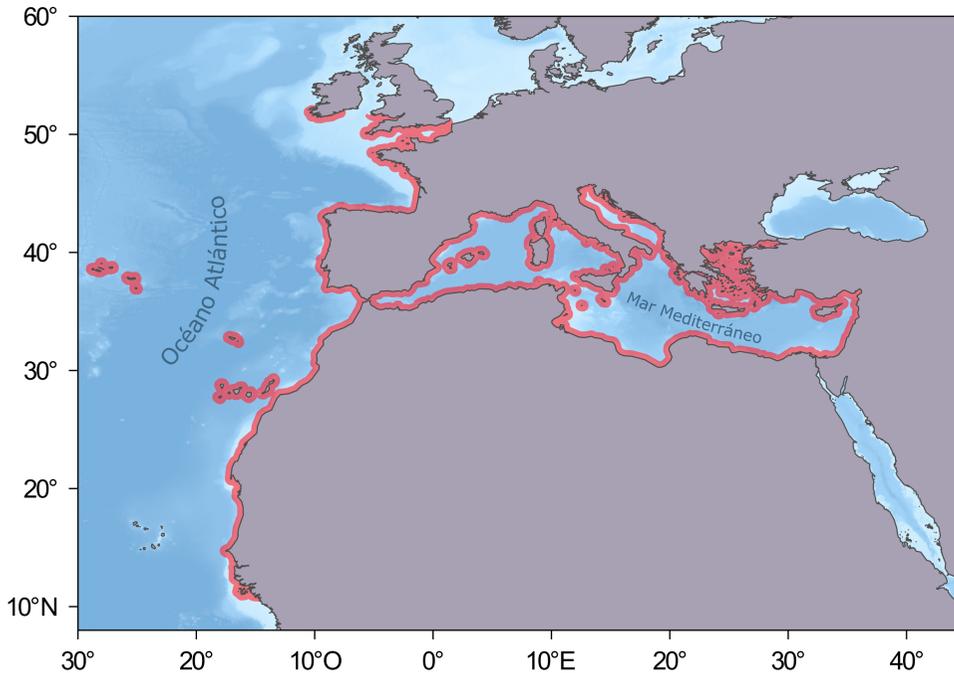


Fig. 1.3. Distribución geográfica de *S. arctus*. Modificación de la distribución definida por Holthuis (1991) en base a nuevas referencias de la especie, que amplían su rango de distribución latitudinal a 11°N-52°N (Quigley *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012). Su presencia en los márgenes costeros se indica con una sombra de color rojo.

Los esciláridos suelen mostrar cierta actividad durante el día, aunque generalmente se encuentran más activos durante la noche (Goldstein *et al.*, 2015), estando restringida esta actividad prácticamente a la búsqueda de alimento o para la reproducción (Lavalli *et al.*, 2007). En caso de que detecten algún peligro, estas langostas muestran un brusco movimiento de huida hacia atrás, que consiguen replegando y estirando vigorosamente el abdomen (Lavalli *et al.*, 2007). Este movimiento es posible por la importante musculatura que poseen en el abdomen.

También se caracterizan por poseer unos fuertes pereiópodos, que les permiten tanto abrir fácilmente las valvas de los moluscos como aferrarse a paredes de roca muy inclinadas en grietas y cuevas (Fig. 1.4).

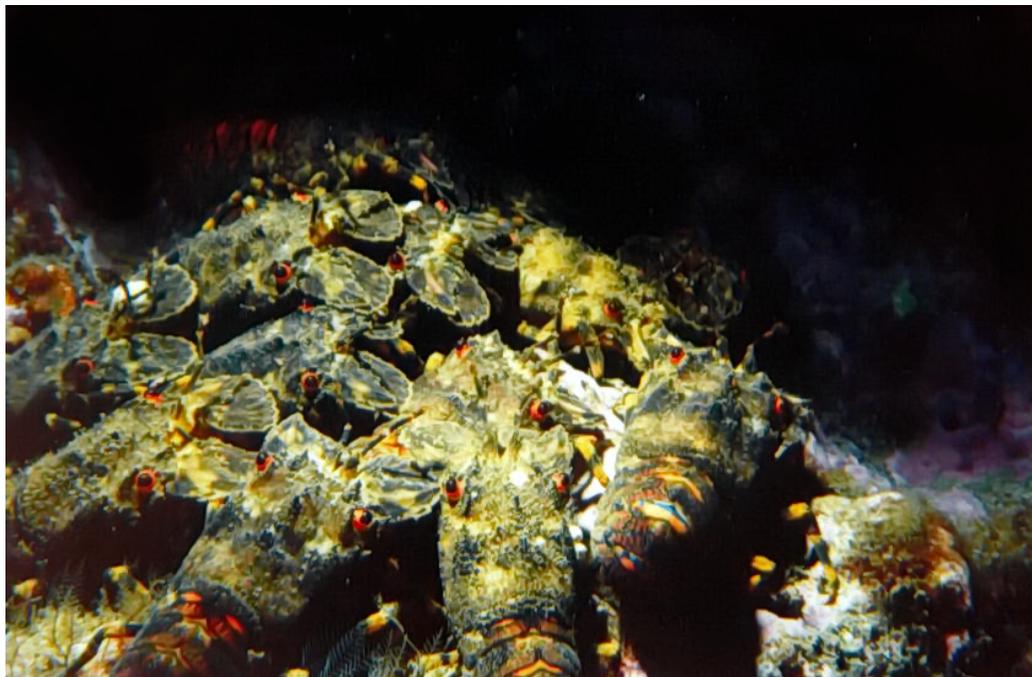


Fig. 1.4. Ejemplares de *S. arctus* formando un agregado en el techo de una grieta en una pared rocosa

No hay mucha información disponible sobre la dieta en el medio natural de los esciláridos, aunque generalmente son descritos como carnívoros y carroñeros, que presentan una preferencia por pequeños invertebrados (Johnston, 2007). Kabli (1989) determinó que la alimentación de *Thenus* spp. está compuesta por una dieta muy variada, que se caracteriza por una elevada preferencia por moluscos (36.5%), seguida de peces (30.2%), crustáceos (14.1%), poliquetos (5.5%), y otras presas en menor proporción, como esponjas, sipuncúlidos y foraminíferos, junto a restos de sedimentos (13.7%). La dieta de esciláridos del género *Scyllarides*, aunque está compuesta por una gran variedad de tipos de presas, como bivalvos, gasterópodos, opistobranquios, peces, cirrípedos, malacostráceos, poríferos, equinoideos, ascidáceos y algas, los moluscos siguen representando una importante fuente de alimento (Lavalli *et al.*, 2007). El análisis del estomacal de ejemplares de *Parribacus antarcticus* también reveló una importante proporción en la dieta de moluscos (quitones y gasterópodos), cnidarios (actinias), poliquetos (sa-

bélicos), y en menor medida, de nemertinos, sipuncúlidos, equinoideos (holoturias y estrellas de mar), pequeños crustáceos (ostrácodos, copépodos, anfípodos, anomuros, carídeos, braquiuros) y algas rojas (Lau, 1988). Las observaciones realizadas en ejemplares de *S. arctus* mantenidos en cautividad por Vilotte (1982), también indicaron una preferencia en la dieta por moluscos bivalvos. Además, la revisión del contenido estomacal de algunos ejemplares capturados en el medio natural permitió identificar, a partir de estructuras duras y fragmentos no digeridos, presas como quitones, calamares e isópodos, así como algas rojas y zoostera.

Una de las principales causas de mortalidad natural en *S. arctus* es la depredación. Entre sus principales depredadores podemos encontrar a cefalópodos como el pulpo, un importante depredador en zonas costeras de crustáceos (Boyle y Rodhouse, 2005). Pero también, *S. arctus* es una presa común para una gran variedad de peces, entre los que encontramos a meros, túnidos, escorpénidos, pintarrojas, rayas, peces planos, congrios y salmonetes (Dragovich, 1969; Barreiros y Santos, 1998; Labropoulou y Machias, 1998; Serrano *et al.*, 2003).

1.1.4. Reproducción

Se trata de una especie dioica, pudiéndose determinar el sexo de un ejemplar con facilidad por la morfología externa (Vilotte, 1982). Aunque la denominación del orden "Achelata", al que pertenece la familia Scyllaridae, se refiere a la ausencia de quelas, es característico que éstas se encuentren presentes en el quinto pereiópodo en las hembras, formadas por el propodio y el dácilo, mientras que en los machos este par de pereiópodos termina en una pequeña garra (Fig. 1.5a). Estas quelas son funcionales y son utilizadas para la manipulación y limpieza de los huevos, al igual que sucede en otras langostas (Aiken y Waddy, 1980). Vilotte (1982) observó en juveniles de *S. arctus* de tallas comprendidas entre 8 y 18 mm de longitud del cefalotórax, que en las hembras este dácilo todavía no está desarrollado completamente y se encuentra reducido a una protuberancia. Así, el desarrollo de esta quela en las hembras resulta un interesante carácter sexual secundario para determinar la talla o edad a la que alcanzan la madurez sexual. También encontramos diferencias morfológicas en la estructura de los pleópodos, los pares del 3^{er}, 4^o y 5^o segmento abdominal están formados por dos ramas, un exopodito foliáceo y un endopodito, que se corresponde con una delgada prolongación en las hembras y un diente reducido en los machos (Fig. 1.5b). Otra diferencia morfológica externa se encuentra en la localización de los orificios ge-

nitales, mientras que en las hembras están situados a nivel de protopodito del tercer pereiópodo, en los machos se localizan en el quinto pereiópodo.

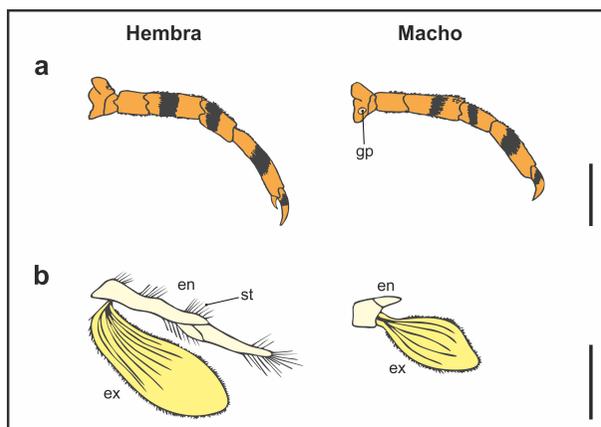


Fig. 1.5. Diferenciación morfológica entre sexos en *S. arctus*. **a** Quinto Pereiópodo. Barra de escala: 10 mm. **b** Pleópodos (3°, 4° o 5°). Barra de escala: 5 mm. Abreviaturas: ex, exopodito; en, endopodito; gp, gonoporo; st, sedas ovíferas. Adaptación de Vilotte (1982)

El proceso de cópula no ha sido descrito en detalle en *S. arctus*, pero según las observaciones realizadas en otros esciláridos, presenta similitudes al que tiene lugar en especies de los géneros *Thenus* e *Ibacus* (Haddy *et al.*, 2007; Lavalli *et al.*, 2007). La cópula comienza, sin ningún tipo de comportamiento de cortejo previo, con una secuencia de movimientos que finalizan en un abrazo entre el macho y la hembra, en el que se unen las zonas ventrales. Durante este proceso, los machos depositan dos masas de esperma de color blanco en forma de cordones en zonas próximas a las aperturas genitales de las hembras. Aunque no se ha podido confirmar donde tiene lugar la fecundación, Vilotte (1982) señala que la fecundación de los huevos en *S. arctus* es externa, argumentando que esta langosta no presenta apéndices especializados para la cópula ni receptáculos seminales a nivel de los oviductos, que las hembras presentan masas espermáticas durante el estado de intermuda, la naturaleza efímera de las masas espermáticas en el agua de mar y que tras la cópula tiene lugar la fecundación de los ovocitos.

En el Mediterráneo, las hembras de *S. arctus* son capaces de producir puestas con tamaños superiores a 70 mm de longitud total (Mura *et al.*, 1984). Se pueden encontrar hembras con puestas durante todo el año, pero las mayores proporciones de hembras ovíferas se observan en los meses comprendidos entre Febrero y Agosto. Un amplio periodo de cría, en el que se han identificado dos principales eventos de desove, durante el mes de Marzo y de Julio a Agosto, tanto por la

elevada presencia de hembras ovadas como por altas proporciones de ovocitos maduros en los ovarios (Mura *et al.*, 1984; Cau *et al.*, 1988). El examen histológico de los testículos de los machos también confirmó la presencia de dos claros eventos reproductivos, mostrando dos picos de intensa espermatogénesis durante los meses de Diciembre y Marzo (Cau *et al.*, 1988).

Vilotte (1982) estimó que el número de huevos que pueden producir las hembras de *S. arctus* durante un desove oscila entre los 30,000 y 70,000 huevos. Una fecundidad del mismo orden de magnitud que las determinadas en otras langostas de los géneros *Thenus* e *Ibacus* y de un orden menor que las registradas en el género *Scyllarides* (Sekiguchi *et al.*, 2007).

1.1.5. Desarrollo larvario

La langosta *S. arctus* posee una forma larvaria denominada filosoma que es compartida por las familias Scyllaridae y Palinuridae. La larva filosoma es un tipo de larva zoea altamente modificada, con la cabeza y tórax extremadamente aplanados y con el abdomen reducido (Williamson, 1983)(Fig. 1.6).



Fig. 1.6. Filosoma de *S. arctus* en estado III de desarrollo obtenida mediante cultivo en laboratorio. Barra de escala: 2 mm.

La filosoma, tras una larga vida planctónica, sufre una metamorfosis a una postlarva de vida más efímera, denominada "nisto" en la familia Scyllaridae y "puerulus" en Palinuridae. Esta fase supone una transición hacia una vida bentónica, similar a la de los juveniles y adultos (Fig. 1.7). En cultivo, las filosomas de *S. arctus* alcanzan la fase nisto transcurridos 192 días (Pessani y Mura, 2007). Esta gran duración de la fase larvaria favorece la dispersión de las larvas por las corrientes marinas y puede ser uno de los motivos de la elevada conectividad genética existente entre poblaciones de *S. arctus* en el Atlántico NE (Faria, 2012). En cambio, el nisto constituye una breve etapa de transición hacia la fase de juvenil, con una duración estimada en otras especies de entre 5 a 24 días (Sekiguchi *et al.*, 2007), de ahí que sean pocos los ejemplares de *S. arctus* recuperados en esta fase del ciclo de vida en el medio natural. Los ejemplares capturados de *S. arctus* en fase de nisto hasta la fecha fueron obtenidos principalmente mediante muestreos de arrastre sobre fondos blandos, a profundidades que oscilan desde los 25 a 450 m en el Mediterráneo (Palero *et al.*, 2009b; Pagliarino y Massi, 2013; Mallol *et al.*, 2014).

1.1.6. Crecimiento

S. arctus, al igual que sucede en otras langostas, muestra un crecimiento indeterminado, esto quiere decir que comienza a reproducirse antes de alcanzar su máximo tamaño (Wahle y Fogarty, 2006). Vilotte (1982) estudió el proceso de muda y el crecimiento en ejemplares de *S. arctus* mantenidos en cautividad en condiciones de temperatura (rango: 10-20°C) y fotoperiodo similares al medio natural (noroeste Mediterráneo). En relación a la muda, se observaron dos períodos de muda, un periodo principal durante el otoño (Agosto-Octubre) y otro secundario en primavera, de menor intensidad, que en los machos se extendió de Febrero a Marzo y en las hembras de Febrero a Mayo. En las hembras, los periodos de muda tuvieron lugar aproximadamente un mes después de la eclosión las puestas procedentes de los desoves de primavera y verano. Respecto al crecimiento, para ambos sexos se estimó un incremento medio de 10 mm·año⁻¹ a 20 °C (+23 % en peso) para una talla media de 100 mm de longitud total. A temperaturas más bajas el crecimiento se ralentiza a 5 mm·año⁻¹ (+14 % en peso; 15 °C) y llega a bloquearse a una temperatura de 10°C.

En el Mediterráneo se ha observado que esta langosta puede alcanzar una longitud de 160 mm, y que generalmente se encuentra con tamaños comprendidos



Fig. 1.7. Fase nisto (arriba) y juvenil (abajo) de *S. arctus* obtenidas mediante cultivo en laboratorio. Barra de escala: 5 mm.

entre los 50 y 100 mm (Relini *et al.*, 1999). En el Atlántico NE, la máxima longitud citada de esta langosta fue de 180 mm, desde la parte anterior de las antenas hasta el final del telson en una hembra (Bañón *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio de crecimiento, ni se tiene conocimiento de la estructura de tallas de las poblaciones naturales de esta especie en esta región.

1.2. Importancia socioeconómica de los esciláridos

Dentro de los invertebrados, los crustáceos decápodos forman uno de los grupos con mayor interés comercial y ecológica. Sobre ellos se desarrollan pesquerías en gran parte del mundo, tanto artesanales como industriales, muy relevantes desde el punto de vista socioeconómico (FAO, 2015). Dentro de este grupo destacan las langostas del infraorden Achelata (Scholtz y Richter, 1995), que engloba a las familias Palinuridae y Scyllaridae. Familias que, debido a su gran diversidad específica y a su elevada abundancia en ecosistemas costeros, en los que ocupan y comparten una amplia variedad de hábitats y profundidades, constituyen un grupo de especial relevancia ecológica.

A nivel mundial, las capturas anuales de crustáceos marinos (10,066,027 t) constituyen el 8.1 % de las descargas de especies marinas (promedio anual durante 2009-2013: 123,281,501 t; FAO, 2015). Las capturas de palinúridos y esciláridos representan el 0.84 % (84,510 t) de las capturas anuales de crustáceos marinos (Tabla 1.2). Por familias, la producción de esciláridos (6.6 %) es muy inferior a la de palinúridos (93.4 %). En la familia Scyllaridae, los géneros *Ibacus* y *Thenus* son los más explotados, acumulando el 6.3 % de las capturas. Sin embargo, estas estadísticas no reflejan la producción real de esciláridos, ya que la información sobre la mayor parte de las pesquerías de esciláridos es limitada o nula. Esta falta de información tiene lugar porque las langostas esciláridas tradicionalmente han sido consideradas como objetivos secundarios en las pesquerías (Spanier y Lavalli, 2007).

En las últimas décadas, los esciláridos han alcanzado un mayor interés comercial como recurso pesquero debido a una disminución en las abundancias de las especies objetivo. De esta manera, algunas especies han pasado a convertirse en objetivos de pesquerías en diferentes zonas geográficas (Australia, Hawaii, India, Islas Galápagos y Mar Mediterráneo), y como consecuencia, han sufrido una rápida disminución de la abundancia de sus poblaciones a nivel local (Lavalli y

Tabla 1.2. Promedio de las capturas (t) de langostas del infraorden Achelata durante el periodo 2009-2013. Datos adaptados de la FAO (2015).

Familia	Género	Capturas (t)	%
Palinuridae		78,925	93.4
	<i>Jasus</i>	9201	10.9
	<i>Palinurus</i>	1593	1.9
	<i>Panulirus</i>	67,680	80.1
	<i>Projasus</i>	1	0.0
	<i>Otros</i>	450	0.5
Scyllaridae		5,585	6.6
	<i>Ibacus</i>	4,186	5.0
	<i>Scyllarides</i>	69	0.1
	<i>Thenus</i>	1093	1.3
	<i>Otros</i>	237	0.3
Total		84,510	100.0

Spanier, 2007). No obstante, la razón principal de que no se conozca el estado de muchas de las poblaciones de esciláridos y, por lo tanto, que muchas de ellas se consideren sobreexplotadas, es la falta de información sobre aspectos biológicos, poblacionales y de su explotación, que son esenciales para evaluar con precisión el tamaño de las poblaciones y su resistencia a la presión pesquera o a los cambios ambientales (O'Malley, 2011).

Como respuesta a este descenso en el tamaño de las poblaciones, han comenzado a implantarse un amplio abanico de medidas para la gestión de las pesquerías de esciláridos, como el establecimiento de cuotas, periodos temporales de cierre de la pesquería, la prohibición de la captura de hembras ovadas, tallas mínimas de captura, zonas de protección, e incluso el cierre temporal de la pesquería. Sin embargo, todavía la mayor parte de las pesquerías comerciales de esciláridos no se encuentran reguladas, o la normativa existente es inadecuada o insuficiente (Spanier y Lavalli, 2007).

La importancia ecológica y el grado de explotación pesquera al que se ven sometidas las poblaciones de esta familia hacen que sea necesario profundizar en el conocimiento de su biología con el fin de buscar estrategias efectivas de conservación.

1.3. Situación de *S. arctus*

La pesca de *S. arctus* es accesoria y se encuentra asociada a la pesca costera artesanal de otras especies, generalmente con artes de pesca como nasas y trasmallos. Aunque esta langosta no posee la misma importancia a lo largo de su distribución geográfica, en algunas regiones como en Galicia, se trata de un marisco muy apreciado y que posee un gran interés comercial, dado el alto precio que alcanza en el mercado (55 € kg⁻¹, precio medio durante 2004-2014 en lonja; Xunta de Galicia, 2015). En la costa gallega, su pesca se encuentra asociada principalmente a la pesquería del pulpo (*Octopus vulgaris*), en la que su captura puede suponer un promedio del 3 % en número de ejemplares o del 0.3 % del peso de la captura total (Bañón *et al.*, 2007). Los bajos valores de abundancia relativa del santiaguíño en las capturas no permiten el desarrollo de una pesquería mono-específica sobre esta especie, aunque si permiten que se considere un interesante recurso secundario, que complementa los ingresos de los pescadores en épocas de baja captura de otras especies.

En las últimas décadas, tanto pescadores como la administración han percibido una reducción del tamaño de las poblaciones de *S. arctus*, por la disminución o cese su captura, en varias regiones del Atlántico NE como Galicia (Xunta de Galicia, 1998; Guerra *et al.*, 2008) y Azores (Hawkins *et al.*, 2000), y del Mar Mediterráneo (Lloret y Riera, 2008). Este hecho ha provocado un aumento de la preocupación por el estado de las poblaciones de *S. arctus*, lo que ha supuesto la inclusión de esta especie en normativas y listados de especies para su protección y conservación, así como el desarrollo de medidas para regular su explotación.

En el Mediterráneo, *S. arctus* es considerada una especie vulnerable, por lo que está incluida en el Anexo III del Convenio sobre la Conservación de la Vida Silvestre y del Medio Natural (Convenio de Berna, 1979) y en el Anexo III del Protocolo sobre las zonas especialmente protegidas y la diversidad biológica en el Mediterráneo (Convenio de Barcelona, 1995), que establece la adopción de medidas para la regulación de su explotación en zonas protegidas. Además, esta especie ha sido incluida recientemente en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN y categorizada como "preocupación menor", aunque no existen datos sobre la evolución de sus poblaciones (Butler *et al.*, 2013).

En el Atlántico NE, la reducción del tamaño de sus poblaciones naturales ha provocado la aplicación de diferentes regulaciones para la gestión de su pesca a nivel regional, como una talla mínima legal de captura y un periodo autorizado

para su pesca, pero sin seguir ningún criterio biológico (Tabla 1.3). Incluso en las regiones con las normativas más restrictivas como Galicia, parece que estas medidas no han tenido el efecto esperado, dado que las poblaciones de *S. arctus* no han mostrado ningún signo de recuperación.

Tabla 1.3. Regulación pesquera en *S. arctus* a nivel regional en España. Tallas mínimas y periodos de vedas en vigor para el año 2015

Región	Talla mínima de captura		Periodo de veda	Fuente
	Valor	Referencia		
Galicia	90 mm	Desde la punta del rostro hasta el extremo posterior del telson	6 Enero a 30 Septiembre	Orden 15/11/1992 Orden 22/12/2014 (DOGA)
Asturias	90 mm	Desde la punta del rostro hasta el extremo posterior del telson	-	Resolución 20/06/1992 (BOPA)
País Vasco	120 mm	Desde la punta del rostro hasta el extremo posterior del telson	1 Agosto a 31 Marzo	Decreto 102/1997 (BOPV)
Cantabria	50 mm	Longitud del cefalotórax	1 Agosto a 31 Marzo	Orden GAN/33/2015 (BOC)

Por otro lado, estas señales son difíciles de ver, ya que las estadísticas pesqueras disponibles reflejan, más que la abundancia de este recurso, los cambios que se han producido en la regulación pesquera de esta especie desde 1995, principalmente en la amplitud y ubicación del periodo autorizado de pesca (Fig. 1.8). En base a los datos pesqueros, desde 2005 hasta el 2014, se estarían capturando en Galicia entre 1 y 2 t anuales de santiaguíño, valores que contrastan con las aproximadamente 7 t registradas en 1991. Además, estos datos pesqueros tampoco representan las capturas reales, ya que aunque la pesca de santiaguíño no está permitida durante gran parte del año, sí está autorizada la captura de la especie objetivo (periodo de veda de *O. vulgaris*: del 16 Mayo a 1 Julio; Resolución 4/05/2015, DOGA), provocando que los ejemplares de *S. arctus* sean pescados prácticamente todo el año y puedan ser comercializados fuera de un marco legal.

En este sentido, Bañón *et al.* (2007) constataron, mediante la realización embarques durante un seguimiento de la pesquería del pulpo en Galicia (1999-2004), un bajo nivel de cumplimiento del periodo de veda de *S. arctus*, dado que sólo en el

23 % de los casos (N=1,878), los santiaguíños capturados no fueron devueltos al mar, hecho que contrasta con el mayor cumplimiento de otras medidas de regulación, como la talla mínima de captura y la protección de hembras ovadas, medidas que fueron respetadas en el 70 % (N=783) y el 65 % de los casos (N=1,450), respectivamente. Estos resultados ponen de relieve no solo la adecuación de las medidas de regulación pesquera existentes sobre esta langosta, sino la efectividad de su implantación y el posible efecto que pueden tener sobre sus poblaciones.

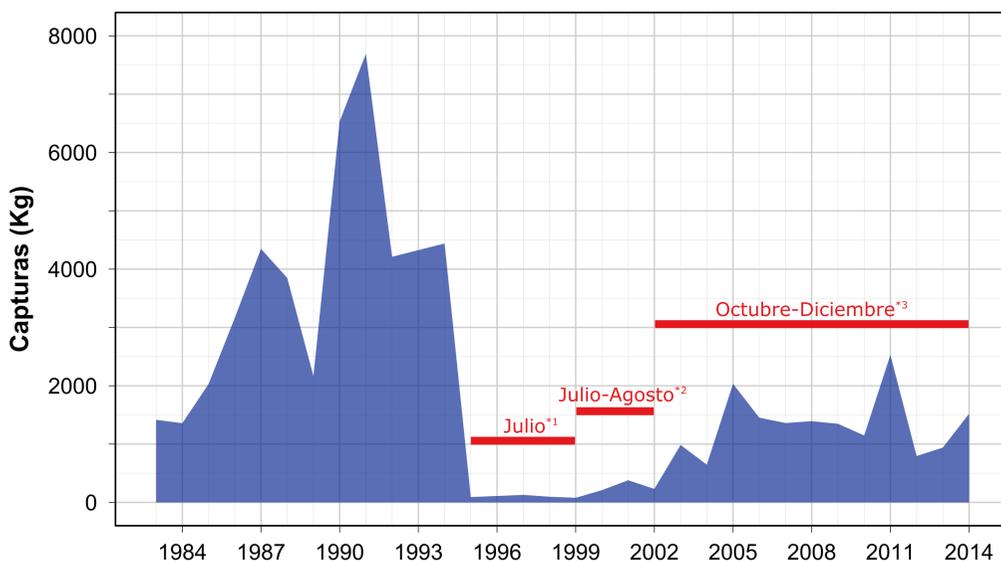


Fig. 1.8. Capturas de *S. arctus* en la costa gallega desde 1983 a 2014. Los intervalos con líneas rojas indican los periodos del año autorizados para su captura por los Planes de Explotación General Marisquera aprobados en el DOGA. *¹ Orden de 23 de diciembre de 1994. *² Orden de 23 de diciembre de 1998. *³ Orden de 28 de diciembre de 2001. Fuentes: Periodo 1983-1996 Elaboración por el Grupo RMyP de la UDC. Periodo 1997-2014 (Xunta de Galicia, 2015)

1.4. Motivación, hipótesis y objetivos para la realización de esta tesis

1.4.1. Motivación

Aunque se desconoce el estado actual de las poblaciones de *S. arctus*, hay indicios claros de que el tamaño de sus poblaciones está disminuyendo a lo largo de su distribución geográfica, a pesar de contar con diferentes regulaciones para su gestión y conservación. Esto unido a que el conocimiento biológico sobre esta langosta es escaso, especialmente sobre su reproducción, y a que la información disponible procede de estudios realizados en el Mediterráneo, se plantea la necesidad de profundizar en el estudio de su biología reproductiva en otra importante zona de su distribución geográfica, como es el Atlántico NE.

1.4.2. Hipótesis y objetivos

El objetivo fundamental de esta tesis es ampliar el conocimiento actual sobre la biología reproductiva de *S. arctus*, con el fin de aportar información sobre aspectos poco estudiados en esta especie. La tesis hace especial hincapié en el estudio de la talla de madurez sexual, el ciclo reproductivo, los recursos que invierten las hembras en la reproducción, y el estudio del desarrollo embrionario, que inciden directamente en el potencial reproductivo de *S. arctus*.

Se pretende testar la hipótesis de que al igual que sucede en otros crustáceos presentes en zonas templadas, el potencial reproductivo de *S. arctus* varía en función de las condiciones ambientales del hábitat. Dado que los factores ambientales (temperatura, disponibilidad de alimento, etc.) pueden incidir en el estado fisiológico de los individuos y, a su vez, en la coordinación de procesos vitales como el crecimiento y la reproducción, se pretende evaluar la influencia de las condiciones ambientales sobre el ciclo reproductivo y en las características de sus puestas.

Para abordar el objetivo principal y testar la hipótesis planteada, en esta tesis plantean los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización del stock de *S. arctus* en el área de estudio (Capítulo 3)

Para este objetivo se va a estudiar la estructura de tallas, la proporción sexual y el crecimiento relativo de los ejemplares de *S. arctus*. El estudio del

crecimiento relativo va a permitir determinar la presencia de diferentes fases de crecimiento a partir de características biométricas, que podrían ser utilizadas para determinar la madurez sexual morfométrica de los individuos. Además, va a permitir la obtención de relaciones morfométricas que facilitarán la comparación de los resultados con otros estudios.

- Determinación de la talla de madurez sexual y el ciclo reproductivo (Capítulo 4)

El conocimiento de la duración del ciclo reproductivo representa el principal objetivo para comprender la estrategia reproductiva de *S. arctus*. Para ello, es necesario una adecuada descripción del ciclo de maduración gonadal, del ciclo de cría y la estimación de la talla a la que alcanza la madurez sexual, que indica el comienzo de la etapa adulta y de la fase reproductiva.

- Descripción del desarrollo embrionario (Capítulo 5)

El objetivo de este estudio es describir el desarrollo embrionario de *S. arctus* desde el desove hasta la eclosión de los huevos desde un punto de vista biométrico, morfológico y bioquímico. Se busca relacionar los cambios bioquímicos que se producen en los huevos de *S. arctus* con los procesos morfo-genéticos y los cambios biométricos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario. Los datos obtenidos aportarán una valiosa información para mejorar la comprensión de la importancia de la composición bioquímica durante el desarrollo embrionario y en su primer estadio larvario.

- Caracterización biométrica y bioquímica de las puestas (Capítulo 6)

Uno de los objetivos iniciales de este estudio es medir la variación estacional e interanual en el potencial reproductivo de *S. arctus*, en términos de fecundidad y tamaño de los huevos de las puestas, así como respecto a la calidad de los huevos, en base a su composición bioquímica, y explorar la influencia de los posibles factores ambientales y maternos que la condicionan.

El conocimiento de estos aspectos de la biología reproductiva de *S. arctus*, conjuntamente con la información obtenida en los objetivos previos, va a permitir estimar el potencial reproductivo tanto a nivel individual como a nivel del stock.

La información obtenida permitirá mejorar el conocimiento biológico de la especie, y resulta de potencial interés para el desarrollo de la acuicultura y la gestión

pesquera de esta especie.

Metodología general

2.1. Área de estudio

Este estudio se realizó en la costa gallega (NO de la Península Ibérica), en la denominada Costa da Morte, desde Punta Nariga ($43^{\circ} 19' 22''\text{N } 8^{\circ} 54' 40''\text{W}$) a Punta dos Muiños ($43^{\circ} 18' 40''\text{N } 8^{\circ} 47' 11''\text{W}$), incluyendo las Islas Sisargas (Fig. 2.1).

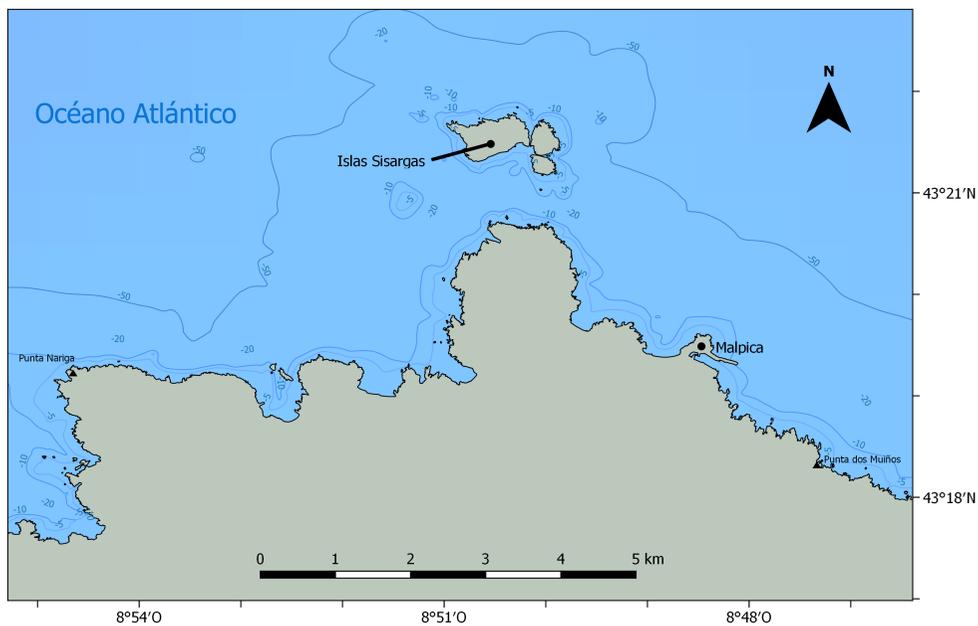


Fig. 2.1. Área de estudio de *S. arctus* en la Costa da Morte (Galicia, NO España). Datum WGS84.

El elevado hidrodinamismo en esta área costera y la disposición de las Islas Sigargas tienen una importante influencia en la existencia de gran variedad de hábitats y en la distribución de las especies, y como consecuencia, que esta zona albergue una elevada biodiversidad (Otero Schmitt y Trigo Trigo, 1986). Esta franja costera se caracteriza por la presencia de fondos marinos rocosos, con paredes verticales y numerosas cuevas y grietas; con fondos blandos de arena intercalados, sobre todo de grano medio (Otero Schmitt y Trigo Trigo, 1986). Durante los meses de primavera y verano, la zona rocosa está cubierta por bosques de quelpos (*Laminaria ochroleuca*, *L. hyperborea* y *Saccorhiza polyschides*), principalmente en aguas someras, siendo especialmente densos en las zonas más expuestas (Veiga *et al.*, 1998). Así, la geomorfología y la flora de estos fondos dotan al complejo costero Malpica-Sigargas de unas características óptimas de protección y de obtención de alimento para *Scyllarus arctus*.

La costa de Galicia está situada en el límite norte del Sistema de Afloramiento del Atlántico Norte (Wooster *et al.*, 1976). En esta región, los procesos de afloramiento son el resultado de la intervención de varias masas de agua y unas condiciones favorables que generan vientos de componente Norte, generalmente con un carácter estacional (Blanton *et al.*, 1984; McClain *et al.*, 1986). En primavera y verano, la proximidad de la masa de Agua Central del Atlántico Noreste (ENACW) va a provocar que sean frecuentes los eventos de afloramiento de una masa de agua profunda más fría y rica en nutrientes (Fraga, 1981; McClain *et al.*, 1986; Rios *et al.*, 1992; Álvarez *et al.*, 2008). En cambio, a finales de otoño y en invierno, la plataforma gallega se encuentra bajo la influencia de la corriente ibérica que va hacia el Polo (IPC), una masa de agua más salina y pobre en nutrientes, que se aproxima a costa con una menor frecuencia (Prego *et al.*, 2007; Varela *et al.*, 2008). Así, los eventos de afloramiento que tienen lugar desde la primavera al verano, generados por el ascenso de la ENACW a capas superficiales, provocan un importante aumento de la producción primaria, base de la cadena trófica y que soporta la gran biodiversidad de la región (Tenore *et al.*, 1995). Por otro lado, durante el otoño-invierno también se pueden producir afloramientos de la IPC, que también pueden generar un incremento de la producción primaria y experimentar sucesiones planctónicas típicas de los afloramientos de primavera-verano, aunque con una menor intensidad (Varela *et al.*, 2010).

Esta variación de las condiciones ambientales se va a trasladar desde la base a todos los niveles de la cadena trófica, influyendo directamente en la biología de las especies animales que alberga, especialmente en lo que se refiere a invertebra-

dos, como el santiaguíño *S. arctus*.

2.2. Estrategia y protocolo del muestreo

2.2.1. Diseño de muestreo en el medio natural

Los estudios sobre distintos aspectos del ciclo vital en crustáceos, como el ciclo gonadal, el ciclo de cría, la fecundidad o el ciclo de muda, requieren un número elevado de muestras, que habitualmente han de ser recolectadas durante un periodo de tiempo mínimo, que varía entre especies, pero que suele requerir un esfuerzo elevado a lo largo de uno o varios ciclos anuales.

En este estudio, la realización de un diseño de muestreo dirigido (pesca experimental o buceos) no fue posible debido a la aleatoriedad en las capturas de ejemplares de *S. arctus*, probablemente relacionada con el estado de sus poblaciones y a su comportamiento críptico. Por este motivo, la obtención de ejemplares se realizó a partir de las capturas de barcos de pesca artesanal en Malpica, una de las principales áreas de explotación de este crustáceo en Galicia. El periodo de estudio extendió desde Febrero de 2008 hasta Junio de 2009 (Tabla 2.1). No obstante, la existencia del periodo de veda del pulpo impidió la captura de ejemplares de santiaguíño durante junio de 2008 y sólo permitió una jornada de pesca en junio de 2009.

El arte empleada para los muestreos de *S. arctus* fue la nasa utilizada para la captura comercial de pulpo (*Octopus vulgaris*). La “nasa de pulpo” utilizada, está formada por un armazón de hierro galvanizado semicilíndrico de 45 cm de longitud, 33.5 cm de ancho y 28 centímetros de alto; recubierto por una malla de 2 cm de luz; y provista de una abertura o boca en su parte superior (Fig. 2.2). Para atraer a la presa, en el interior de cada nasa se sitúa una pequeña bolsa de malla donde se introduce el cebo, comúnmente y en este estudio: *Sardina pilchardus*. El esfuerzo de muestreo fue dirigido exclusivamente a las capturas realizadas durante cada jornada por dos barcos de pesca artesanal (eslora 6.8 m, potencia 30CV y arqueo GT 2.02) con 250-300 nasas de pulpo distribuidas en 5-6 caceas o riseiros. Las nasas fueron lanzadas principalmente en fondos rocosos a profundidades inferiores a 30 metros.

Los santiaguíños capturados fueron mantenidos en tanques isotérmicos con agua fría para disminuir el estrés y evitar la pérdida de huevos durante su transporte al laboratorio tras cada jornada de pesca. Una vez en el laboratorio se re-

Tabla 2.1. Resumen del esfuerzo mensual de muestreo de *S. arctus* y rango de tallas (LC, longitud del cefalotórax) de los ejemplares utilizados en este estudio.

Año	Mes	Captura (kg)	Ejemplares (N)	Rango LC (mm)
2008	Feb	4.02	148	22.28 - 39.28
	Mar	3.16	110	14.98 - 45.10
	Abr	8.20	258	23.63 - 47.90
	May	5.45	204	19.07 - 46.25
	Jun	-	-	-
	Jul	7.36	269	22.73 - 47.03
	Ago	4.96	144	19.37 - 46.48
	Sep	3.61	111	20.98 - 45.12
	Oct	5.10	161	20.56 - 47.45
	Nov	2.47	62	22.70 - 45.19
	Dic	2.23	67	9.49 - 45.27
	2009	Ene	5.91	166
Feb		3.22	106	22.18 - 44.00
Mar		7.99	235	21.63 - 47.00
Abr		13.97	476	22.01 - 42.80
May		1.92	64	24.35 - 39.93
Jun		0.31	11	28.95 - 37.67
TOTAL		79.88	2592	9.49 - 47.90

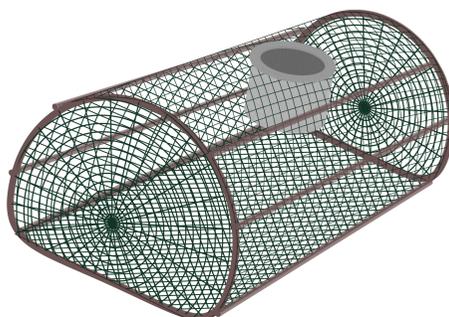


Fig. 2.2. Nasa de pulpo utilizada para la captura de *S. arctus*.

cogió la siguiente información de cada ejemplar: el sexo; mediciones corporales como la longitud máxima (LM, precisión: ± 0.01 mm), desde la parte anterior de las antenas hasta el extremo posterior del telson; la longitud total (LT, precisión: ± 0.01 mm), desde la punta del rostro hasta el extremo posterior del telson; la longitud del cefalotórax (LC, ± 0.01 mm), como la distancia entre el seno rostral y el borde posterior; la anchura del cefalotórax (AC, ± 0.01 mm); la anchura del tercer segmento abdominal (AA, ± 0.01 mm) (Fig. 2.3); el peso húmedo (PH, ± 1 mg); y la presencia de quelas en el 5º par de pereiópodos y de sedas ovígeras en los pleópodos de las hembras.

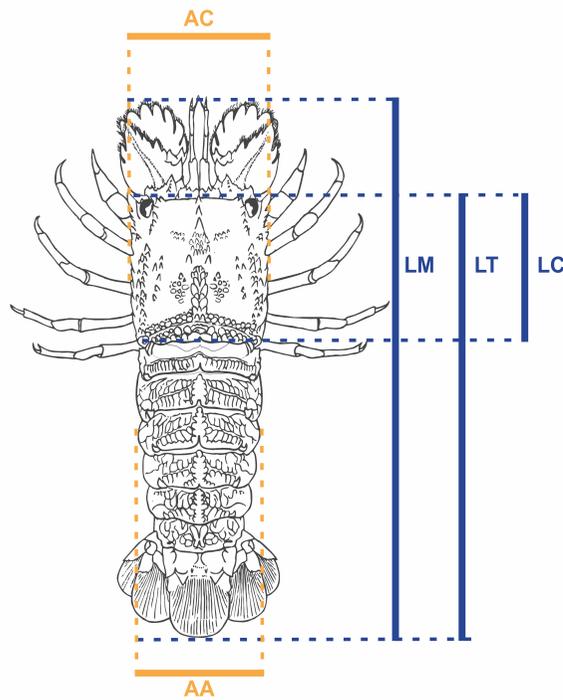


Fig. 2.3. Mediciones morfométricas realizadas en *S. arctus*. Abreviaturas: LM, longitud máxima; LT, longitud total; LC, longitud del cefalotórax; AC, anchura del cefalotórax; AA, anchura del 3^{er} segmento abdominal. Ilustración de Holthuis (1991).

Las masas de huevos de las hembras ovígeras fueron cuidadosamente retiradas de los pleópodos y sumergidas durante 3 minutos en una solución de amonio formiato ($31.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) para eliminar los restos de sales, siendo posteriormente drenadas y pesadas para la obtención del peso húmedo de la puesta (± 1 mg). Una vez que el color de cada puesta fue registrado, una muestra de 30-40 huevos fue recogida y conservada en formol neutralizado al 4% para determinar posterior-

mente el estado de desarrollo embrionario y medir el tamaño de los huevos.

A continuación, los ejemplares fueron diseccionados para su examen interno (Fig. 2.4). En las hembras, se registró el volumen de ocupación de los ovarios en la cavidad cefalotorácica y su coloración con la escala de color RAL®. Una vez que el ovario fue caracterizado y pesado (± 1 mg), una pequeña muestra de la zona media del lóbulo superior derecho de cada ovario fue conservada en formol neutralizado al 4 % para medir el tamaño de los ovocitos. En los machos, los testículos extraídos fueron pesados y conservados en formol neutralizado al 4 % para determinar posteriormente la presencia de espermátóforos. Finalmente, se registró la coloración del hepatopáncreas, antes de ser retirado y pesado (± 1 mg).

Las masas de huevos, el ovario y el hepatopáncreas retirados fueron conservados a -32°C hasta su liofilización.

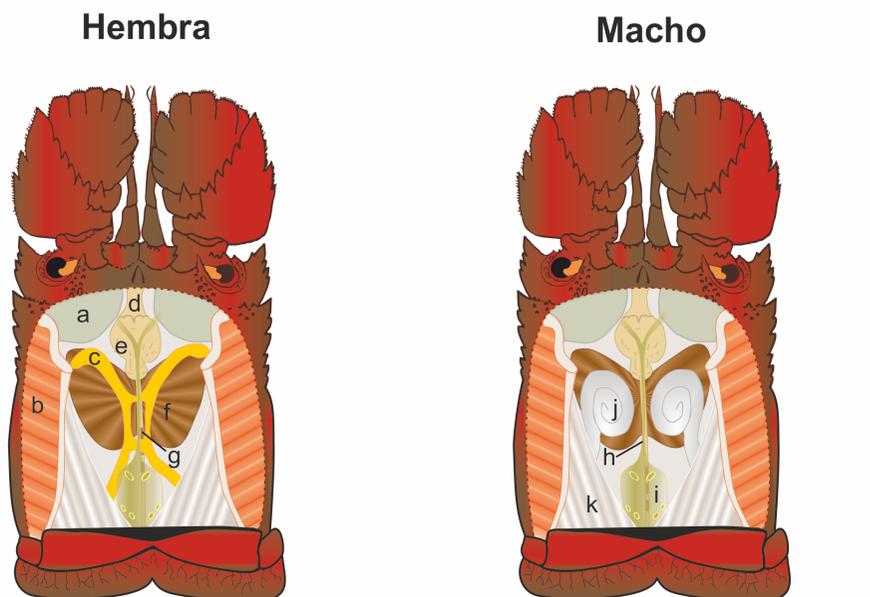


Fig. 2.4. Estructura interna de una hembra y un macho de *S. arctus*. Abreviaturas: a, glándula antenal; b, cavidad branquial; c, ovario; d, exófago; e, estómago; f, hepatopáncreas; g, intestino; h, aorta anterior; i, corazón; j, testículo; k, músculo. Barra de escala: 10 mm.

2.2.2. Diseño experimental para el estudio de la reproducción y del desarrollo embrionario en cautividad

Con el fin de describir el ciclo reproductivo en cautividad y realizar un seguimiento del desarrollo embrionario a nivel morfológico y bioquímico de las puestas de huevos, se utilizaron un total de 50 hembras y 50 machos de *S. arctus* capturados desde Julio a Agosto de 2010 en la misma área de estudio. Los ejemplares capturados fueron aclimatados y mantenidos en cautividad en las instalaciones del Aquarium Finisterrae de A Coruña hasta la finalización de la experiencia en Septiembre de 2011. Para el experimento, los ejemplares capturados fueron medidos y marcados con una pequeña etiqueta plástica adherida con cianocrilato sobre el cefalotórax. El rango de tallas de las hembras y de los machos utilizados fue 30.5-40.6 mm LC y 31.2-39.5 mm LC, respectivamente. Una vez marcados, los santiaguíños fueron estabulados en 5 tanques de 60 L a una proporción 1:1 de machos y hembras.

Durante todo el experimento se mantuvieron en los tanques de cultivo unas condiciones ambientales similares a las de las del medio natural, tanto de temperatura del agua como de fotoperíodo. El agua de mar utilizada en el cultivo se obtuvo de una captación exterior situada a 250 m de la costa y 16 m de profundidad, tras un proceso de filtrado mediante filtros de cartucho hasta 1 μm . En todos los tanques de cultivo se mantuvo un caudal de renovación de 4 L \cdot min⁻¹. Durante el cultivo los tanques fueron protegidos con una cubierta translúcida para evitar el estrés de los individuos. La alimentación fue administrada *ad libitum*, fundamentalmente en base a mejillones frescos (*Mytilus spp.*). En general, todos los ejemplares capturados se adaptaron bien a las condiciones de cultivo y sobrevivieron sin problemas a la amplia duración de la experiencia.

Los individuos de *S. arctus* fueron examinados con una periodicidad diaria para determinar eventos de muda y los desoves. Tras el desove, las hembras ovas fueron aisladas en tanques individuales (10 L) para el seguimiento del desarrollo embrionario y la recogida de muestras de huevos. Inmediatamente, tras la eclosión de las puestas de huevos, las hembras fueron reubicadas de nuevo con los machos.

Para el estudio de la composición bioquímica de los huevos durante el desarrollo embrionario se utilizaron un total de 35 puestas de huevos diferentes. Cada puesta fue muestreada desde el desove hasta la eclosión de los huevos con una periodicidad de 6 días. En cada muestreo se recogieron dos muestras, una

primera muestra de aproximadamente 0.5 g de peso húmedo destinada al análisis bioquímico y una muestra de 50-100 huevos para la toma de imágenes para la realización de análisis morfométricos y la clasificación de los embriones. Las muestras para análisis bioquímicos fueron congeladas a -32°C .

2.3. Análisis bioquímicos y contenido energético

Las técnicas analíticas que se describen a continuación fueron realizadas en el laboratorio del Grupo de Recursos Marinos y Pesquerías de la Universidade da Coruña, a excepción del análisis elemental (CHN) y la identificación y cuantificación de los ácidos grasos, que fueron realizados por la Unidad de Técnicas Instrumentales de Análisis y la unidad de Técnicas Cromatográficas, de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña.

Las muestras de tejidos congeladas fueron liofilizadas a peso constante durante 48 h con un liofilizador Telstar Cryodos 50. Los tejidos una vez liofilizados, fueron pesados (± 1 mg) y homogeneizados, antes de ser almacenados de nuevo a -32°C hasta el momento del análisis de su composición bioquímica. Todas las analíticas realizadas, a excepción de los ácidos grasos y la composición elemental, se hicieron por triplicado y las muestras cuyo coeficiente de variación fue superior al 15 % fueron repetidas. El contenido de agua y cenizas también fue estimado. Los análisis realizados se describen a continuación.

2.3.1. Contenido en agua

Una vez que las muestras fueron liofilizadas, se mantuvieron en un desecador con gel de sílice para su correcta conservación hasta el momento de la determinación de su peso en una balanza de precisión Metler MP460 (± 0.1 mg). El contenido de agua de los tejidos se estimó a partir de las diferencias entre el peso húmedo y el peso seco de las muestras, obtenido tras la extracción del agua mediante el proceso de liofilización.

2.3.2. Contenido en cenizas

El contenido en cenizas se estimó a partir de un tamaño de muestra de 25 mg de tejido. Las muestras fueron sometidas a incineración en pocillos de porcelana de 6 ml (previamente tarados) en un horno Mufla HK-11 Hobersal a 450°C durante 4 horas. Cuando la temperatura del horno hubo descendido hasta 100°C ,

se retiraron los pocillos y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador, procediéndose a continuación, a pesarlos en una balanza de precisión Mettler MP460 (± 0.1 mg).

2.3.3. Análisis elemental

La composición elemental (carbono, hidrógeno y nitrógeno; CHN) de cada tejido se determinó a partir de muestras de 2-3 mg de tejido liofilizado pesadas en una balanza de precisión Mettler Toledo UMX2 (± 0.01 mg). El método analítico para esta determinación se basa en la oxidación completa de la muestra mediante combustión instantánea. Para ello, se utilizó un analizador elemental Carlo Erba CHNS-O EA 1108 con un catalizador de oxidación de óxido de cromo a 1020°C, un reductor de cobre de 650°C y una columna de gases Porapak de 2m de longitud y a 60°C. Durante el proceso los gases resultantes de la combustión son transportados mediante un gas portador (helio) a un flujo de 100 ml min⁻¹ a través de un horno de reducción y de la columna de gases, donde son separados y eluidos como nitrógeno, dióxido de carbono, agua y dióxido de azufre. La detección de estos elementos se realiza mediante un detector de conductividad térmica acoplado al analizador elemental, que emite una señal proporcional a la concentración de los componentes individuales de la muestra. Este instrumento se calibra con acetanilida, estándar aconsejado para muestras con elevado contenido orgánico. Para la adquisición y procesado de los resultados se empleó la aplicación EAGER 200 (Carlo Erba Instruments).

2.3.4. Proteínas

La determinación del contenido proteico de los tejidos se calculó a partir del contenido de nitrógeno de 1 mg de tejido liofilizado obtenido con el análisis elemental (CHN), utilizándose un factor de conversión de 5.78, que se considera es el más adecuado para los organismos marinos (Gnaiger y Bitterlich, 1984). Esta determinación a partir de la composición elemental ha sido utilizada anteriormente en otros crustáceos decápodos para la comparación de la composición proteica entre estados de desarrollo, entre diferentes especies, etc. (Anger y Harms, 1990; Anger, 1998, 2001).

2.3.5. Lípidos

Los lípidos se extrajeron mediante el método de Bligh y Dyer (1959), según la adaptación realizada por Holland y Gabbott (1971) para su posterior cuantificación. Muestras con 30 mg de tejido liofilizado fueron resuspendidas en tubos de vidrio roscados de 10 ml (16 x 100 mm) con 5 ml de metanol (CH₃OH):cloroformo (CH₂Cl₂) a una proporción 2:1 V/V y homogenizadas con un disrruptor para facilitar la extracción. El metanol actúa disolviendo los lípidos polares, y el cloroformo los apolares. A continuación se centrifugaron los extractos durante a 800 g durante 5 minutos en una centrifuga refrigerada MPW-350R a -4°C. El sobrenadante fue transferido a otros tubos de 10 ml. El precipitado residual se sometió a una segunda extracción, resuspendiéndolo con 2 ml de metanol:cloroformo 2:1 V/V y centrifugándolo de nuevo (800 g, 5 min a -4°C). El sobrenadante se añadió al obtenido en la primera extracción, mientras que el precipitado fue desechado. Seguidamente, al extracto resultante se le añadieron cloroformo y agua destilada Milli-Q para obtener una relación final de solventes metanol:cloroformo: agua de 2:2:1 V/V. Se agitó con un agitador vortex hasta la total homogenización de la muestra y se centrifugó nuevamente, formándose dos fases: una fase acuosa superior y una fase orgánica inferior. La fase acuosa se extrajo con una pipeta Pasteur y se desechó. Los extractos lipídicos obtenidos se secaron en un evaporador centrífugo Jouan RC1010 con trampa de frío RCT90 a 40°C hasta la total evaporación de los solventes. En el caso de que los extractos no fueran analizados inmediatamente, se almacenaron a -30 °C en 300 µl de cloroformo con BHT (Butilhidroxitolueno) como antioxidante. La cuantificación del contenido lipídico se llevo a cabo siguiendo el método de estimación gravimétrica no destructiva. Para ello, se resuspendieron los extractos de lípidos con 300 µl de cloroformo y a continuación se trasvasaron a viales de vidrio de 3 ml previamente tarados. Los viales se secaron en el evaporador centrífugo a 40°C hasta la evaporación total del solvente. A continuación, se dejaron enfriar en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente hasta su pesaje con una precisión de 0.1 mg. El peso resultante corresponde a la cantidad de lípidos totales presentes en la muestra inicial.

2.3.6. Ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (CG-EM). Se empleó la técnica de Lepage y

Roy (1984) para la preparación de los derivados metil-éster de los ácidos grasos (AGMEs). Esta técnica incluye cuatro fases fundamentales: saponificación de la muestra, metilación de los ácidos grasos, extracción a partir de la fase acuosa y lavado final. La saponificación de los lípidos consiste en hidrolizar los ácidos grasos de los ésteres del colesterol, triglicéridos y fosfolípidos, convirtiéndolos en jabones solubles en agua. Para ello, se tomaron muestras de 25 mg de tejido liofilizado en tubos de vidrio roscados de 10 ml, previamente tarados y se les adicionaron 2 ml de una solución de NaOH 1.2 N en metanol acuoso al 50 % y 20 μ l del estándar interno C19:0 (72332 SIGMA), calentando a 90-100 °C durante 30 minutos. Tras enfriar el saponificado a temperatura ambiente, se acidificó con 1 ml de HCL 6N a pH inferior a 2. Posteriormente, se procedió a la derivatización de las fracciones lipídicas añadiéndose a la solución 1 ml de BF₃ al 14 % en metanol para catalizar la metilación. Esta solución se calentó en un termobloque P-Selecta 85°C durante 5 minutos. Seguidamente, se adicionó 1 ml de hexano:dietiléter (1:1) V/V para la extracción de los ésteres metílicos y se procedió a la agitación suave de las muestras durante 3 minutos. Tras la agitación se forman dos fases: una fase orgánica superior y una fase acuosa inferior, la cual se desechó mediante su extracción con una pipeta Pasteur. El extracto orgánico se lavó con 3 ml de NaOH 0.3 N y se sometió nuevamente a una agitación suave durante un minuto. Esto permitió una nueva separación en dos fases: una fase inferior acuosa y una fase superior orgánica. Esta última fase fue recogida mediante una pipeta Pasteur y transvasada a un vial de forma cónica (1 ml).

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo de gases Thermo Finnigan Trace GC acoplado a un espectrofotómetro de masas con trampa iónica Thermo Finnigan Polaris Q. Como gas portador se utilizó helio a flujo constante (1 mL/min). La inyección de las muestras (1 μ l de volumen inyectado) con un inyector automático modelo CTC PAL GC se realizó con la válvula del "split" abierta a una proporción 1:50 y con una temperatura del inyector de 260°C. Se empleó una columna capilar de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, rellena con un fase estacionaria SP-2330. Las muestras se sometieron a un gradiente térmico de 1.5°C/min comenzando por una temperatura inicial de 120°C hasta alcanzar los 162°C, luego una isoterma a 162°C durante 13 minutos y otro gradiente térmico de 1.5°C/min desde 162°C hasta 200°C. La detección se realizó mediante un espectrofotómetro de masas con trampa ió-

nica (multiplicador electrónico 1500V, rango de masas 45-400 uma¹, ionización electrónica positiva 70EV).

Se creó un patrón cuantitativo a partir del estándar SIGMA 18919, que contiene una mezcla de metil-ésteres de 37 ácidos grasos diferentes, metil-C19:0 (74208 SIGMA) y metil-C18:1 *cis*-11 (CRM46904 SIGMA). A partir de este patrón, se obtuvieron los factores de respuesta del detector para cada compuesto, empleándolos posteriormente junto con los datos del estándar interno para el cálculo normalizado del porcentaje y cantidad absoluta de cada compuesto. Se comprobó la linealidad de la respuesta del cromatógrafo de gases y se hizo una recta de calibrado con el patrón externo. El procesamiento de los resultados cromatográficos se efectuó con el software Xcalibur 1.4.

2.3.7. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos se estimó mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956) partiendo de 10 mg de tejido liofilizado. Este método deriva del test de Molisch e implica el calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y un desarrollante del color que normalmente es un fenol o una amina aromática (en este estudio se empleó el fenol, Herbert *et al.*, 1971). Al líofilo, depositado en un vial eppendorf, se le adicionó 1 ml de agua Milli-Q y se homogenizó s de 30 a 50 segundos. Seguidamente, se realizó una dilución 1/2 y se extrajo una alícuota de 100 μ l para un nuevo eppendorf. Asimismo, se prepararon las diferentes concentraciones de la curva de calibración utilizando glucosa (2 mg/ml), y se extrajo una alícuota de 100 μ l de cada concentración de la curva para nuevos eppendorf. A las alícuotas se le adicionaron 200 μ l de fenol al 5.4 % y se agitaron con un vortex durante 30 segundos. Luego se añadió 1 ml de ácido sulfúrico 96 %, volviéndose a agitar el vial 30 segundos en el vórtex y dejándose enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Para la cuantificación se cargaron en una microplaca de 96 pocillos alícuotas de 250 μ L de cada muestra por cuadruplicado, y de cada concentración del patrón por triplicado. A continuación la microplaca cargada fue leída a una absorbancia de 490 nm en un lector de microplacas (ELX800 Bio-Tec Instruments Inc.) para cuantificar el contenido en carbohidratos de las muestras.

¹uma: unidad de masa atómica

2.3.8. Ácidos nucleicos

Para la determinación del contenido de ARN y ADN se utilizó el protocolo modificado de McGinty *et al.* (2008) basado en el uso de los kits Qubit® para la cuantificación de ADN (dsDNA BR Assay Kit) y ARN (Qubit® RNA BR Assay Kit). Se pesaron 1-2 mg de tejido liofilizado y se rehidrataron con 100 µL de Tris-EDTA buffer pH 8.0 (TE buffer; Invitrogen) en un microtubo. A continuación, a cada vial se añadieron bolas de sílice de dos tamaños y se procedió a la homogeneización de la muestra con un molino de bolas (bead beater) durante 30 s. Al homogenizado resultante se le añadió 50 µl de TE buffer N-lauroylsarcosina²1.5 % (STEB) para provocar la lisis de las células. Se diluyó con TE buffer (1.35 mL) y se centrifugó a 3800 rpm en una centrifuga refrigerada a 4°C durante 8 minutos. A partir del sobrenadante, se pipeteó una alícuota en microtubos de 0.5 ml (Qubit®) con las soluciones de medición Quant-IT (5µL para ARN y 10 µl para el tubo de ADN). Dos estándares para cada ensayo (para la calibración de las rectas de ADN y ARN) también fueron añadidos a la solución de medición. A la solución de medición de los estándares se añadió 1µl de STEB 1.5 % para corregir el efecto del detergente en la fluorescencia del tinte empleado en el ensayo Qubit®. Se dejaron incubar las muestras, 2 min para el ensayo de ADN y 15 min para el ensayo de ARN, y se procedió a la cuantificación. Para la cuantificación del contenido de ácidos nucleicos se empleó un fluorímetro Qubit®. En cada proceso de análisis se incluyeron 3 blancos sin muestra y 3 muestras con un estándar externo según el ácido nucleico a determinar: ARN total *E. coli* (AM7940 AMBION®) y ADN total de la glándula de timo (15633019 AMBION®).

2.3.9. Contenido energético

Se utilizaron dos criterios para estimar el contenido energético (E):

1. La conversión propuesta por Winberg (1971), en base al contenido de los principales componentes bioquímicos (lípidos, proteínas y carbohidratos), los cuales fueron obtenidos mediante los procesos anteriormente descritos:

$$E [B] (J) = E_{Prot} + E_{Lip} + E_{Carb}$$

²N-lauroylsarcosina: detergente iónico

$$E_{Prot} (J) = 23.64 (J/mg) \cdot Prot (mg)$$

$$E_{Lip} (J) = 39.54 (J/mg) \cdot Lip (mg)$$

$$E_{Carb} (J) = 17.15 (J/mg) \cdot Carb (mg)$$

2. A partir del contenido en carbono (C), determinado mediante el análisis de la composición elemental (Salonen *et al.*, 1976):

$$E [C] (J) = 46 (J/mg) \cdot C (mg)$$

2.4. Procedimiento estadístico

Todos los análisis estadísticos y el ajuste de modelos descritos en esta tesis fueron realizados con el paquete de software R (R Core Team, 2015). Todos los conjuntos de datos utilizados en las diferentes secciones de esta tesis fueron sometidos a una exploración previa siguiendo el protocolo propuesto por Zuur *et al.* (2010). El objetivo de esta exploración previa de los datos es probar las asunciones de los modelos propuestos para evitar su violación, y bien detectar, corregir o eliminar la presencia de valores atípicos.

Caracterización del stock de *Scyllarus arctus* en el área de estudio

3.1. Introducción

Tras décadas de explotación, algunos de los stocks de *Scyllarus arctus* han comenzado a mostrar signos de sobrepesca (Xunta de Galicia, 1998; Hawkins *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2008; Lloret y Riera, 2008), lo que pone de manifiesto la necesidad de caracterizar los stocks explotados y, en relación con ello, realizar estudios sobre su potencial reproductivo.

El estado de sobreexplotación en el que se encuentran sus poblaciones plantea la necesidad de determinar inicialmente el impacto que puede haber generado la actividad pesquera sobre la estructura de sus poblaciones, y la repercusión que puede tener en su potencial reproductivo. Como es sabido, la pesca es una fuente de mortalidad selectiva en las poblaciones naturales (Fenberg y Roy, 2008). Una selectividad que se hace más evidente, cuando las medidas que regulan la explotación tienen como objetivo proteger unos tamaños y un sexo específico, llegando a provocar cambios en la estructura de las poblaciones explotadas. Este es el caso de la mayoría de las pesquerías de crustáceos, en las que generalmente se produce una selección de los machos y de los ejemplares más grandes (Orensanz *et al.*, 1998).

La presión pesquera selectiva ha dado lugar a cambios en la proporción sexual y en la distribución de tamaños en varias poblaciones de crustáceos decápodos (Kennelly, 1992; MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006; ASMFC, 2015). Alteraciones que pueden tener importantes implicaciones sobre el potencial reproductivo de

los stocks, ya que podrían reducir el éxito de los apareamientos o provocar la aparición de una limitación de la capacidad de los machos para fecundar totalmente las puestas de las hembras, causando una reducción del número de desoves o de su viabilidad (MacDiarmid y Butler, 1999; MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006; Sato y Goshima, 2006; Pugh *et al.*, 2013). Por otra parte, la retirada de los ejemplares de mayor tamaño, en el caso de las hembras, también puede provocar el desplazamiento de la talla de madurez hacia tallas más pequeñas (Pugh *et al.*, 2013); una reducción de la producción de huevos, dado que la fecundidad está directamente relacionada con la talla (MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006); y también influir en la calidad de las puestas y, como consecuencia, sobre el reclutamiento, ya que las hembras más grandes tienden a producir descendientes que tienen una mayor tasa de supervivencia y un mayor tamaño (Smith y Ritar, 2007; Moland *et al.*, 2010).

El dimorfismo sexual que presentan muchas especies de crustáceos puede favorecer el desarrollo de pesca sesgada hacia un sexo o de un solo sexo (Orensanz *et al.*, 1998). El dimorfismo sexual se produce por la aparición de cambios graduales o abruptos en la forma o en el tamaño relativo de partes corporales durante el ciclo de vida. Estos cambios morfológicos se encuentran regulados mediante un control endocrino, y están relacionados con la maduración sexual, de forma que permiten distinguir la fase juvenil de la adulta (Hartnoll, 1982). En las hembras, pueden observarse cambios en el tamaño de los pleópodos o de los segmentos abdominales, que permiten aumentar la capacidad para fijar y portar un mayor número de huevos (Farmer, 1974; DeMartini *et al.*, 2005). En los machos, también pueden identificarse cambios en el crecimiento de estructuras de defensa como quelas y antenas (Anderson *et al.*, 2013), o con fines reproductivos, como el apéndice masculino en los pleópodos (McQuaid *et al.*, 2006). Tanto en las langostas como en otros decápodos, estas alometrías ontogenéticas están asociadas con cambios fisiológicos y bioquímicos, que se producen en el individuo como parte del proceso de maduración gonadal (MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006).

El objetivo principal de este capítulo es describir la estructura de tallas y la proporción sexual de *S. arctus* en una zona de explotación en la Costa da Morte (NO España). Además, se determinarán las relaciones morfométricas entre sus partes corporales, y se estudiará su crecimiento relativo en relación con sus implicaciones reproductivas.

3.2. Metodología

3.2.1. Muestreo

Para la elaboración de este capítulo se han utilizado diferentes medidas biométricas de los ejemplares de *S. arctus* muestreados durante el periodo de estudio de Febrero 2008 a Junio de 2009 (ver Metodología general 2.2.1). Los datos utilizados de cada ejemplar son: el sexo; la longitud máxima (LM; mm), medida desde la parte anterior de las antenas hasta el extremo posterior del telson; la longitud total (LT; mm), desde el seno rostral hasta el extremo posterior del telson; la longitud del cefalotórax (LC; mm), como la distancia entre el seno rostral y el borde posterior del cefalotórax; la anchura del cefalotórax (AC; mm); la anchura del tercer segmento abdominal (AA; mm) y el peso húmedo (PH; g).

3.2.2. Estructura de tallas y proporción sexual

Las diferencias en la talla media entre sexos fue analizada mediante la prueba U-Mann Whitney, mientras que la prueba Chi-Cuadrado (χ^2) fue utilizada para comparar la proporción sexual en las muestras con un tamaño muestral >10 ejemplares. La proporción sexual fue estimada como el cociente entre el número de machos y el número de total de ejemplares capturados. La normalidad fue evaluada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (prueba KS).

3.2.3. Relaciones morfométricas

El crecimiento relativo para cada sexo fue evaluado mediante una análisis de regresión linealizando la relación potencial $y = ax^b$. Las relaciones morfométricas analizadas fueron LM x LC, LT x LC, AC x LC, AA x LC y PH x LC. Para linealizar las relaciones se aplicó la transformación logarítmica. El ajuste de las regresiones fue realizado mediante mínimos cuadrados. Para determinar diferencias morfométricas en el crecimiento relativo en cada sexo se realizó una regresión lineal segmentada con el paquete estadístico *segmented* (Muggeo, 2008) en R.

Para determinar diferencias en el crecimiento relativo entre los sexos, las relaciones morfométricas estudiadas fueron comparadas mediante el análisis de covarianza (ANCOVA). Dado que los rangos de talla entre los sexos fueron diferentes, los análisis fueron limitados a un intervalo de tamaños en el que los rangos de tallas se solaparon (rango: 19.37-47.90 mm LC). La presencia de alome-

trías en las relaciones biométricas fue analizada mediante la comparación de las pendientes obtenidas con el valor de 1 (crecimiento isométrico), o con el valor de 3 (únicamente para la relación de PH x LC), mediante una prueba t.

3.3. Resultados

3.3.1. Estructura de tallas y proporción sexual

Se analizaron un total de 2592 santiaguíños, de los cuales 1419 (54.7%) fueron hembras y 1173 (45.3%) machos. El rango de tallas de los ejemplares muestreados fue de 9.49-40.51 mm LC para machos y 19.37-47.90 mm LC para las hembras (Tabla 3.1). Las hembras, con una talla media de 35.12 ± 4.44 mm LC (\pm DT), fueron significativamente más grandes que los machos, cuya talla media fue de 31.28 ± 3.66 mm LC (U-Mann Whitney, $U=1,207,940$, $N_1=1396$, $N_2=1153$, $P<0.001$; Fig. 3.1).

Las tallas en las hembras y en los machos no estuvieron normalmente distribuidas (prueba KS, $P<0.001$). Los histogramas de tallas mostraron en ambos sexos una distribución unimodal. La clase modal de los machos fue 30-32 mm LC, mientras que en las hembras se situó en la clase de talla de 34-36 mm LC (Fig. 3.1).

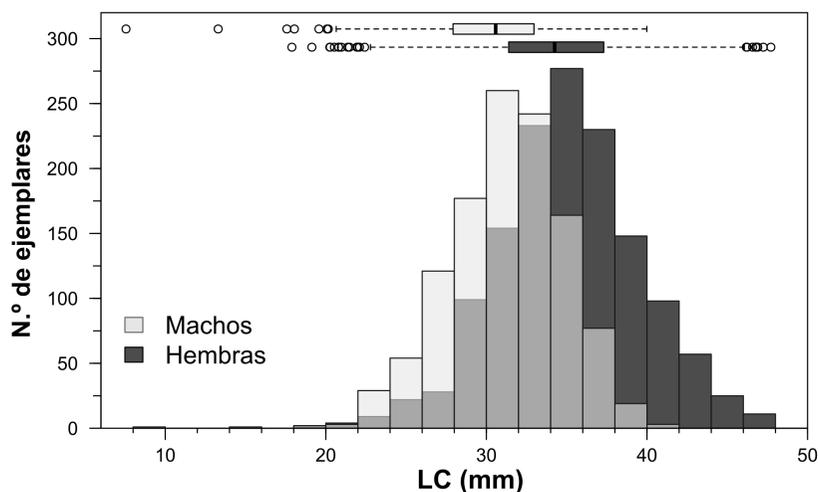


Fig. 3.1. Distribución de tallas por sexos. En la parte superior, un diagrama de caja muestra la mediana (mm), el rango intercuartilico, el rango y los valores extremos

Tabla 3.1. Resumen por sexos de las principales características morfométricas

		Hembras	Machos
LM	media (DT)	126.64 (16.72)	110.59 (13.20)
	rango	66.07-175.47	35.46-142.77
LT	media (DT)	108.14 (14.59)	93.19 (11.06)
	rango	57.40-149.20	28.75-120.77
LC	media (DT)	35.12 (4.44)	31.28 (3.66)
	rango	19.37-47.90	9.49-40.51

El análisis de la proporción sexual por clases de talla mostró que la proporción de machos fue significativamente mayor en las clases de talla inferiores a 32 mm LC (χ^2 , $P < 0.001$; Fig. 3.2), mientras que la proporción de hembras fue claramente superior a partir de los 34 mm LC (χ^2 , $P < 0.001$). Los ejemplares con una talla menor a 22 mm LC estuvieron escasamente representados en ambos sexos.

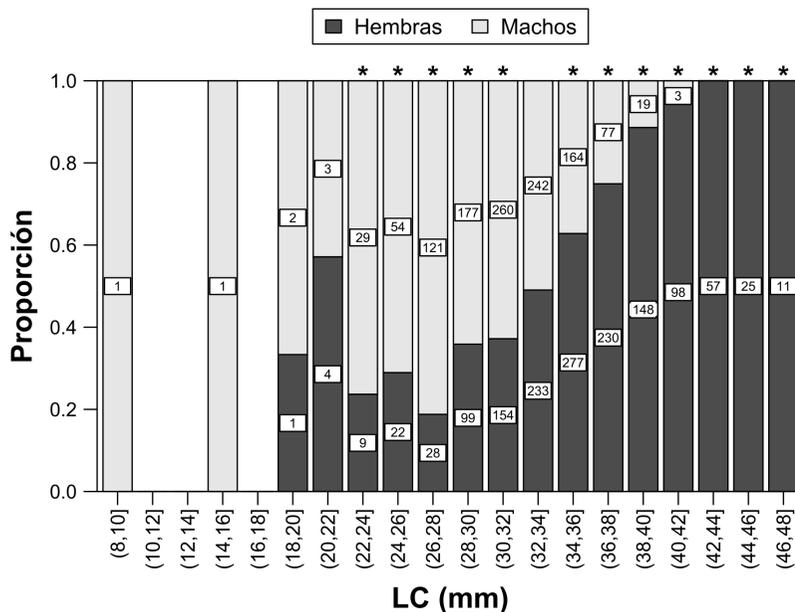


Fig. 3.2. Proporción sexual por clase de talla (cada 2 mm) de los ejemplares *s* muestreados (N=2592). Los asteriscos indican cuando la proporción sexual se desvía significativamente de una proporción 1:1 esperada (χ^2 , $P < 0.05$).

La proporción de machos fluctuó mensualmente dentro de un rango de 0.23-0.64 sin mostrar ningún patrón mensual sistemático (Fig 3.3). En la mayor parte de los meses (63%), la proporción sexual varió significativamente de una ratio 1:1. La ratio sexual estuvo sesgada hacia las hembras en el 44% de los meses y hacia los machos el 19%. Durante los meses de Septiembre de 2008, Noviembre

de 2008 y Marzo de 2010 se alcanzaron importantes sesgos hacia las hembras con valores en un rango de 0.23 y 0.29 (proporción de machos). En general, la proporción sexual de los ejemplares muestreados fue de 0.83:1 (machos:hembras), una desviación significativa de la proporción 1:1 esperada ($\chi^2=23.35$, $gl=1$, $P<0.001$), que muestra un claro sesgo hacia las hembras.

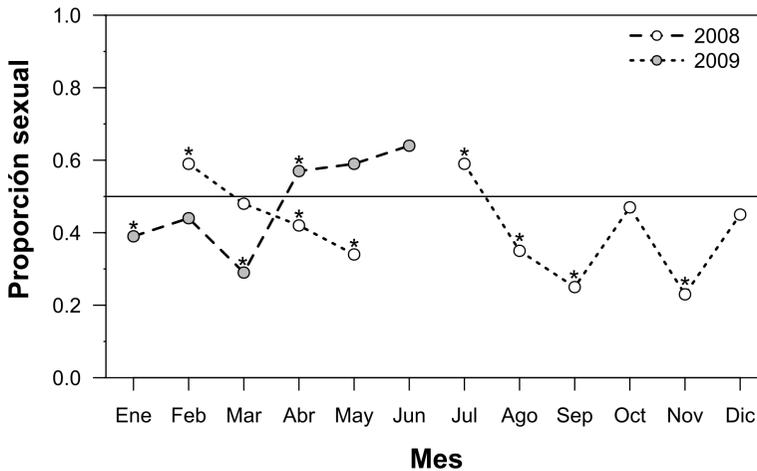


Fig. 3.3. Proporción mensual de machos durante 2008 y 2009. Los asteriscos indican cuando la proporción sexual se desvía significativamente de una proporción 1:1 esperada (χ^2 , $P<0.05$).

3.3.2. Relaciones morfométricas

No se observó ningún punto de ruptura en el análisis de segmentación de las líneas de regresión (Fig. 3.4), indicando que para los rangos de tallas utilizados, no existen diferencias morfométricas entre juveniles y adultos en ambos sexos en *S. arctus* (Tabla 3.2). Por ello, se ajustaron independiente las relaciones morfométricas para cada sexo.

Todas las relaciones analizadas mostraron un buen ajuste de los datos, con valores de R^2 entre 0.971-0.987 (Tabla 3.2). La relación PH x LC mostró una alometría negativa ($b<3$) de la variable dependiente respecto a la medida de referencia corporal (LC) en ambos sexos. Las relaciones LT x LC y AA x LC en las hembras, como también las relaciones LM x LC y AC x LC en ambos sexos, indicaron un elevado crecimiento relativo ($b>1$) de la variable dependiente respecto a la longitud cefalotorácica. Para los otros casos, el crecimiento fue isométrico.

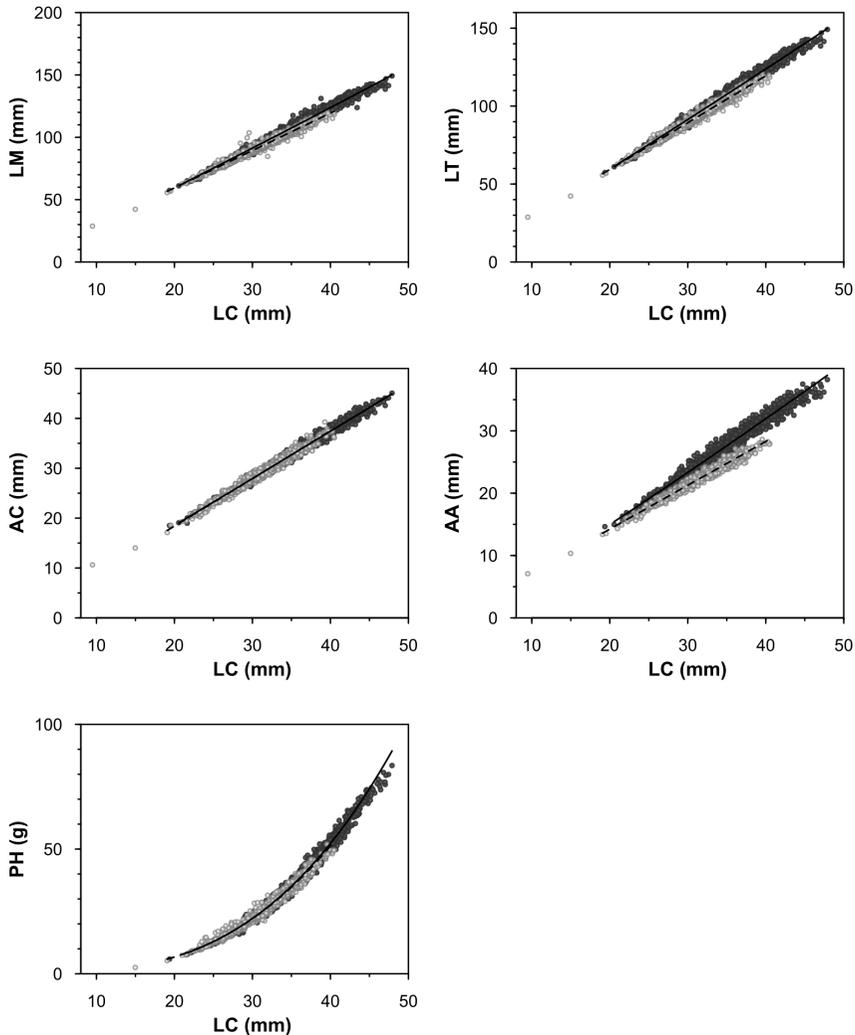


Fig. 3.4. Relaciones entre los caracteres morfométricos y el peso húmedo con la LC en las hembras (puntos gris oscuro) y los machos (puntos gris claro). Se representan las ecuaciones regresión ajustadas de la Tabla 3.2 para las hembras (línea continua) y los machos (línea discontinua).

El análisis de covarianza realizado para evaluar la relación AC x LC no mostró ninguna diferencia entre sexos ($P > 0.08$; Tabla 3.2), permitiendo así, ajustar esta relación con los datos de ambos sexos conjuntamente ($\text{Log AC} = 0.146$ ($\text{ET} = 0.011$) + 1.022 ($\text{ET} = 0.003$) $\cdot \text{Log LC}$, $R^2 = 0.979$). Para las relaciones LM x LC, LT x LC, AA x LC y PH x LC, los análisis revelaron diferencias significativas entre sexos tanto en la ordenada en el origen como entre las pendientes (ANCOVA, $P < 0.001$). Así, las hembras alcanzan una mayor longitud corporal (LM y LT), una mayor capacidad del abdomen y un mayor peso a la misma LC que los machos (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Relaciones entre los caracteres morfométricos (LM, longitud máxima; LT, la longitud total; LC, la longitud del cefalotórax; AC, la anchura del cefalotórax; AA, anchura del 3er segmento abdominal) y el peso húmedo (PH) con la longitud del cefalotórax (LC) para cada sexo, su comparación mediante ANCOVA y el crecimiento relativo.

Relación	Sexo	Coeficientes		R ²	n	Intersección		Pendiente		Crecimiento		
		log a (ET)	b (ET)			F	P	F	P	t	P	Tipo
LM x LC	Macho	1.221 (0.017)	1.009 (0.005)	0.975	1106	297.35	<0.001	45.32	<0.001	2.46	0.01	+
	Hembra	1.117 (0.015)	1.046 (0.004)	0.979	1349			10.96	<0.001	10.96	<0.001	+
LT x LC	Macho	1.063 (0.014)	1.008 (0.004)	0.982	1102	1149.27	<0.001	82.95	<0.001	1.90	0.06	0
	Hembra	0.925 (0.013)	1.055 (0.004)	0.969	1343			14.64	<0.001	14.64	<0.001	+
AC x LC	Macho	-0.114 (0.016)	1.013 (0.005)	0.975	1144	0.01	0.94	2.95	0.08	5.91	<0.001	+
	Hembra	-0.118 (0.013)	1.014 (0.004)	0.983	1382			4.05	<0.001	4.05	<0.001	+
AA x LC	Macho	-0.308 (0.017)	0.989 (0.005)	0.974	1092	10286.57	<0.001	235.83	<0.001	1.72	0.09	0
	Hembra	-0.567 (0.018)	1.093 (0.005)	0.971	1372			18.04	<0.001	18.04	<0.001	+
PH x LC	Macho	-6.888 (0.042)	2.935 (0.012)	0.981	1136	18.93	<0.001	33.20	<0.001	5.72	<0.001	-
	Hembra	-7.051 (0.033)	2.984 (0.009)	0.987	1334			2.46	0.01	2.46	0.01	-

Se incluyen los coeficientes y el error estándar entre paréntesis de las relaciones ajustadas; el coeficiente de determinación (R²), el número de ejemplares (n), los valores la prueba F y la significación (P) del ANCOVA, el valor de la prueba t, su significación (P) y el tipo de crecimiento: 0, isométrico; +, alométrico positivo; -, alométrico negativo. El rango de LC utilizado en las ecuaciones de regresión fue 20-48 mm en las hembras y 18-42 mm en los machos.

3.4. Discusión

3.4.1. Estructura de tallas y proporción sexual

Aunque el estudio poblacional no es un objetivo específico de esta tesis, en este capítulo se presenta información de interés sobre la estructura del stock estudiado, un aspecto de especial relevancia para el estudio de la biología reproductiva en *S. arctus* y, como consecuencia, para la consideración de nuevas medidas de gestión de su pesca.

Los datos presentados en este trabajo son los primeros resultados sobre las tallas y la proporción sexual de un stock de *S. arctus* en la zona atlántica de su distribución. El análisis de la estructura de tallas refleja la dificultad de capturar juveniles, los cuales pueden estar ocupando hábitats diferentes al de los adultos, como zonas más profundas o con otros tipos de fondo (arena, cascajo, etc.). En estudios previos realizados en el Mediterráneo se utilizaron otros métodos de captura como redes de arrastre, pero tampoco se consiguieron capturar un gran número de juveniles (Vilotte, 1982; Mura *et al.*, 1984). Pero no se trata de un hecho específico, ya que la presencia de juveniles de esciláridos en otros trabajos también es escasa (Spanier y Lavalli, 2006; Lavalli *et al.*, 2007).

La talla media, así como la talla máxima alcanzada por las hembras fue superior a la de los machos, lo que indica la existencia de un dimorfismo sexual. Esta característica es compartida con otras especies dentro de la familia Scyllariidae, pero no con las langostas de las familias Palinuridae y Nephropidae, en las que sucede el fenómeno contrario (Wahle y Fogarty, 2006; Spanier y Lavalli, 2006; Duarte *et al.*, 2014). En los esciláridos, el mayor tamaño que alcanzan las hembras respecto a los machos se relaciona con una maximización de la eficiencia reproductiva para aumentar la capacidad de realizar y portar puestas con un mayor número de huevos (Jones, 2007). Sin embargo, el mayor tamaño que alcanzan las hembras no puede ser explicado fácilmente desde un punto de vista energético. En una especie como *S. arctus*, con crecimiento indeterminado, que las hembras destinen una mayor cantidad de recursos energéticos a la reproducción en comparación a los machos, supondría una menor inversión en crecimiento somático (Hartnoll, 1985). Esto sugiere, que las hembras de *S. arctus* para mantener su actividad reproductiva y un elevado crecimiento, requieren una importante cantidad de energía, por lo que el mantenimiento de un estado nutricional óptimo puede ser un factor clave durante su ciclo de vida para que ninguno de ambos procesos

se vea afectado.

En comparación a otras regiones, la talla media de *S. arctus* en el Atlántico (machos: 93.19 mm LT, hembras: 108.14 mm LT) fue superior que la estimada en el Mediterráneo (machos: 78.41 mm LT, hembras: 90.28 mm LT; Mura *et al.*, 1984). Estas diferencias pueden ser debidas a la presencia de diferentes tasas de crecimiento en ambas regiones, de forma que los ejemplares de *S. arctus* en el Atlántico podrían poseer tasas de crecimiento mayores que en el Mediterráneo. Los ejemplares de otra langosta presente en ambas regiones, como es *Palinurus elephas*, también alcanzan un mayor tamaño en las poblaciones del Atlántico, debido probablemente a la mayor tasa de crecimiento que presentan (Mercer, 1973; Marin, 1987). Las diferencias espaciales en el crecimiento de langostas son atribuidas generalmente a la variabilidad encontrada en las condiciones ambientales (Chittleborough, 1975; Pollock *et al.*, 1997), la disponibilidad de alimento (Newman y Pollock, 1974; Edgar, 1990) y la densidad poblacional (Polovina, 1989; Pollock, 1991; McGarvey *et al.*, 1999). En este caso, la existencia de diferencias espaciales en las tasas de crecimiento pueden ser debidas probablemente a la mayor disponibilidad de alimento presente en aguas del Atlántico que en el Mediterráneo (Massutí *et al.*, 2004). Por otra parte, estas estimas deben ser tomadas con precaución, porque la talla media en un stock explotado también puede depender del nivel y el patrón de explotación, así como del método de muestreo, la época y el hábitat (Goñi y Latrouite, 2005).

En general, la proporción sexual en *S. arctus* estuvo sesgada hacia las hembras durante el periodo de estudio (0.83:1, machos:hembras). Este resultado contrasta con los resultados obtenidos por Mura *et al.* (1984) en el Mediterráneo, así como en otros esciláridos del genero *Thenus* (Jones, 1993), *Ibacus* (Haddy *et al.*, 2005) y *Scyllarides* (Hardwick Jr. y Cline, 1990; Hearn, 2006; Bianchini y Ragonese, 2007; Sharp y Teehan, 2007; O'Malley, 2011), donde la proporción sexual fue próxima a la unidad o presentó un pequeño sesgo hacia los machos. Una proporción sexual sesgada puede estar originada por diferencias temporales en la capturabilidad entre sexos. Hay que tener en cuenta que la capturabilidad en las langostas depende en gran medida de las pautas de alimentación, que pueden variar estacionalmente debido a procesos fisiológicos y ecológicos claves como son la muda y la reproducción (Ziegler *et al.*, 2004).

La presencia de diferentes épocas de muda en los machos y las hembras podría ser una de las causas de la proporción sesgada hacia las hembras. Sin embargo, los dos periodos de muda que describe Vilotte (1982) en *S. arctus* (obser-

vaciones realizadas en cautividad), uno principal durante los meses de Agosto a Octubre y otro secundario, de menor intensidad, que en los machos se extiende de Febrero a Marzo y en las hembras de Febrero a Mayo, señalan un elevado grado de solapamiento de las épocas de muda entre los dos sexos.

En cuanto a la reproducción, tampoco parece que tenga una clara influencia en el sesgo de capturas hacia las hembras. Las hembras de las langostas espinosas generalmente tienden a recluirse y a ocupar las zonas más profundas del hábitat mientras están ovadas (Kanciruk y Herrnkind, 1976; Aguzzi *et al.*, 2007). Sin embargo, en *S. arctus* ambos sexos deberían permanecer agrupados en las mismas áreas durante el periodo reproductivo, que ocupa gran parte del año (Diciembre-Junio), dado que al no tener las hembras estructuras para almacenar el esperma necesitan de una cópula previa para que se produzca el desove (Capítulo 5).

Como la muda y la reproducción no permiten explicar la proporción sexual observada, se plantea la hipótesis de que pueda ser el resultado de una mayor presión pesquera sobre los machos, generada por la prohibición de capturar hembras ovígeras y la presencia de una elevada proporción de hembras ovadas durante una gran parte del año (Capítulo 4). Esta hipótesis es acorde con los resultados obtenidos por Bañón *et al.* (2007) sobre el grado de cumplimiento de la normativa pesquera en *S. arctus*, que indican un bajo nivel de cumplimiento (23 % de los casos, N=1,878) del periodo de veda (Enero-Septiembre), y un mayor cumplimiento de otras medidas de regulación, como la talla mínima de captura y la protección de hembras ovadas, medidas que fueron respetadas en el 70 % (N=783) y el 65 % de los casos (N=1,450), respectivamente. Esta hipótesis debería ser investigada por las posibles consecuencias que puede tener en el éxito reproductivo de los stocks pesqueros. La alteración de la proporción sexual puede disminuir la probabilidad de encuentros entre machos y hembras, dificultando u obligando a retrasar el apareamiento (MacDiarmid y Butler, 1999). Además, una reducción del número y tamaño de los machos, podría llegar a provocar una limitación de esperma, fenómeno que varía entre especies, y que puede agruparse en tres tipos (Pugh *et al.*, 2013): (i) un agotamiento de las reservas de esperma en los machos por un aumento de la tasa de apareamientos, (ii) una reducción del tiempo disponible para recuperar las reservas de esperma entre apareamientos o (iii) una restricción del número y tamaño de los espermatozoides para poder repartir los recursos disponibles entre múltiples hembras. Los principales efectos que estas alteraciones tienen sobre la reproducción son fallos en el desove, la producción de puestas sin fecundar y la disminución de las tasas de fecundación en las puestas

tas según avanza el periodo reproductivo (McMullen, 1969; Sato y Goshima, 2006; Yamanoi *et al.*, 2006).

3.4.2. Relaciones morfométricas

Los elevados valores del coeficiente de determinación (R^2) mostrados en todas las relaciones ajustadas indican una muy buena correlación lineal de las variables biométricas en los ejemplares de santiaguíño. En este estudio no se observaron cambios alométricos en las variables biométricas analizadas entre juveniles y adultos, probablemente por la baja cantidad de ejemplares capturados de tallas pequeñas (<19.4 mm LC). No obstante, si se observaron divergencias en el crecimiento relativo de las partes corporales entre los sexos.

Las hembras mostraron una mayor anchura relativa de los segmentos abdominales que los machos. Esta alometría positiva es considerada una adaptación para aumentar la capacidad del abdomen y así facilitar el acomodo de los huevos (DeMartini y Williams, 2001). La finalidad reproductiva y el dimorfismo sexual que genera este carácter, indican que la relación AA x LC podría ser utilizada para estimar la talla a la que las hembras alcanzan la madurez sexual. Según Aiken y Waddy (1980), el aumento del tamaño del abdomen en las langostas comienza a producirse antes del primer desove. En esciláridos del género *Thenus* (Jones, 2007) y *Scyllarides* (Duarte *et al.*, 2014), también se ha observado que las hembras realizan una mayor inversión en crecimiento que los machos en incrementar el tamaño de los segmentos del abdomen. Por otro lado, las hembras de *S. arctus* mostraron un mayor aumento del tamaño corporal (LM y LT) respecto a los machos para una misma longitud cefalotorácica, que puede estar relacionado con el incremento de la longitud de los segmentos abdominales para el mismo fin reproductivo. Estas diferencias en la dimensión del abdomen permiten además, explicar el mayor peso relativo de las hembras frente a los machos.

La ausencia de cambios alométricos claros en la morfología corporal en los machos es un rasgo común en esciláridos y excepcional respecto a otras especies de langostas (Jones, 2007; Radhakrishnan *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2014). En otras langostas, el mayor crecimiento relativo en los machos de los pereiópodos en la familia Palinuridae, y de las quelas en la familia Nephropidae, está asociado con el alcance de la madurez sexual morfológica, comportamientos de cortejo y el proceso de cópula (Wahle y Fogarty, 2006). En cambio, la ausencia de una morfología equivalente en *S. arctus* y otros esciláridos, podría indicar la presencia de

un proceso de cortejo y cópula más sencillo (Jones, 2007).

Tanto los machos como las hembras de *S. arctus* mostraron un crecimiento alométrico positivo de la anchura del cefalotórax. Que ambos sexos compartan un mismo tipo de crecimiento sugiere la existencia de una igual demanda de espacio disponible en la cavidad cefalotorácica para el desarrollo de los conductos deferentes y de los ovarios. Esta característica también está presente en otras langostas como *Panulirus echinatus* (do Vale Barreto *et al.*, 2009), *Panulirus homarus* (Heydorn, 1969) y *Scyllarides deceptor* (Duarte *et al.*, 2014).

Entre las medidas realizadas en este estudio, la longitud total, medida desde la punta del rostro hasta el extremo posterior del telson, es utilizada desde hace tiempo como medición de referencia para establecer la talla mínima de captura en *S. arctus*, porque tradicionalmente es considerada una medida fácil de llevar a cabo y de sencilla interpretación por parte de los pescadores. Sin embargo, su medición en las langostas posee cierto grado de error asociado por la dificultad que conlleva, ya que para su realización es necesario que el ejemplar este relajado y conseguir que se estire completamente sobre una superficie plana (Hepper, 1966; Latrouite y Noel, 1997). Por el contrario, la longitud del cefalotórax es una medida de más rápida realización y que aporta una mayor precisión, por lo que está siendo adoptada como medida de referencia en varias langostas (Tidu *et al.*, 2004). Por este motivo, consideramos que la longitud del cefalotórax debería ser utilizada también como medida de referencia para la monitorización y el seguimiento de las capturas de *S. arctus*, así como en futuros estudios, para facilitar la realización de comparaciones. Además, las ecuaciones morfométricas obtenidas en este estudio, por los altos valores de R^2 mostrados, permiten la realización de conversiones entre las diferentes variables biométricas, en particular, en base a longitud del cefalotórax.

Ciclo reproductivo y talla de madurez en *Scyllarus arctus*

4.1. Introducción

La reproducción es un proceso básico del ciclo de vida de cualquier organismo y que supone un elevado gasto energético (Hartnoll, 2006). Por esta razón, la cantidad de recursos energéticos que un organismo asigna a la reproducción afecta directamente a su eficacia biológica (Kozłowski, 1992). En la naturaleza, los organismos muestran diferentes patrones reproductivos, los cuales son considerados estrategias para optimizar su eficacia biológica durante su ciclo de vida (Yoshino *et al.*, 2002). Los crustáceos son un claro ejemplo de la gran diversidad de estrategias reproductivas que puede adoptar una especie (Pandian, 1994). Estrategias que no sólo varían entre especies, sino que una misma especie puede presentar diferentes estrategias como respuesta adaptativa a las diferentes condiciones ambientales de los hábitats (Goñi *et al.*, 2003; de Lestang *et al.*, 2003; Fischer y Thatje, 2008). Para caracterizar la estrategia reproductiva de una especie es necesario conocer algunos aspectos reproductivos relevantes como cuando alcanzan la madurez sexual los individuos, el ciclo reproductivo y el número de puestas que puede realizar.

La talla o edad en la que alcanzan los individuos la madurez sexual es un parámetro que permite determinar cuando comienzan a destinar energía para su reproducción. Para establecer la talla a la cual se alcanza la madurez sexual en los decápodos se han utilizado diferentes criterios. MacDiarmid y Sainte-Marie (2006) agrupan los criterios utilizados en tres indicadores de madurez: (i) la ma-

durez morfológica, caracterizada por la aparición de alometrías en el crecimiento de partes corporales o de caracteres sexuales secundarios; (ii) la madurez fisiológica, representada por el grado de desarrollo de las gónadas; y (iii) la madurez funcional, obtenida a partir de características internas y externas que muestran al comportamiento reproductivo pasado. Además, la determinación de la talla de madurez es de interés para la gestión pesquera de la especie, ya que generalmente se utiliza para el establecimiento de medidas de regulación como la talla mínima de captura. Por otro lado, las alteraciones que se pueden producir en la talla de madurez entre regiones o en el tiempo, pueden ser indicativas del impacto de los cambios en el ambiente o del grado de explotación a la que se han visto sometidas las poblaciones (Linnanea *et al.*, 2009).

En los crustáceos decápodos, el ciclo reproductivo generalmente está correlacionado con los cambios que se producen en el ambiente, de forma que la descendencia producida encuentre los momentos más favorables para su supervivencia (Raviv *et al.*, 2008). La frecuencia y la amplitud de estos cambios son los que controlan principalmente los patrones de reproducción (ver Green *et al.*, 2014). La temperatura y el fotoperiodo son dos de las variables ambientales más relevantes que intervienen en la regulación de la reproducción (Nagaraju, 2011). En algunas especies, la reproducción puede llegar a estar sincronizada incluso con las variaciones de la marea (ritmos circamareales) y las fases lunares (ritmos circalunares). En general, para caracterizar el ciclo reproductivo en decápodos marinos se analizan los cambios temporales en el estado de desarrollo de las gónadas, la proporción de hembras ovadas y el grado de desarrollo embrionario de las puestas (Oh y Hartnoll, 2004; Chang *et al.*, 2007). La determinación época y la amplitud del ciclo reproductivo también es relevante para la gestión de los recursos pesqueros, ya que estos parámetros son utilizados generalmente para establecer periodos de veda con el objetivo de proteger la reproducción de las diferentes especies.

Otro parámetro representativo de la estrategia reproductiva de una especie es el número de puestas que produce una hembra durante un ciclo reproductivo anual (Gonzalez-Gurriarán *et al.*, 1998; Fischer y Thatje, 2008; Thiel *et al.*, 2012). En crustáceos decápodos, la producción de desoves así como el periodo de incubación de las puestas de huevos pueden ser inferidos indirectamente a partir de muestreos en el medio natural, a partir del análisis temporal de la proporción de hembras ovígeras, el grado de desarrollo de los huevos o la maduración de los ovarios (Morizur, 1981; Mori *et al.*, 1998; Oh y Hartnoll, 2004; Gelpi *et al.*, 2009). Sin embargo, en ocasiones dada la amplitud de los periodos de incubación y el sola-

pamiento de desoves sucesivos, no es posible realizar estimaciones fiables de los periodos de incubación y del número desoves durante el periodo reproductivo. En este caso, recurrir a estudios en laboratorio con parámetros controlados permite comprobar las hipótesis realizadas sobre los datos obtenidos en los muestreos de campo. Con este objetivo, varias especies de decápodos marinos han sido sometidas a experimentos en laboratorio (Chittleborough, 1976; Shields *et al.*, 1991; Valdés *et al.*, 1991b; González-Gurriarán *et al.*, 1993; Matsuda *et al.*, 2002; Thiel *et al.*, 2012). De estos estudios, se ha podido obtener una información importante sobre el número de puestas y la duración de los desarrollos embrionarios. Además, han permitido comprobar el efecto de variables ambientales como la temperatura y el fotoperiodo en la duración de los ciclos reproductivos (Matsuda *et al.*, 2002; Fischer y Thatje, 2008). Por otro lado, aunque el mantenimiento los ejemplares durante largos periodos en cautividad puede llegar a afectar a la periodicidad de los desoves y a la frecuencia de muda (Wen *et al.*, 2006; Hoa y Wouters, 2009), estos estudios son necesarios para comprender lo que sucede en la naturaleza.

La langosta *Scyllarus arctus* se encuentra distribuida por todo el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico NE, dos regiones con características oceanográficas muy diferentes. Para alcanzar tan amplia distribución, es probable que esta langosta haya necesitado adaptarse o poseer cierta plasticidad fisiológica en algunos aspectos de su ciclo vital, como en la reproducción. Por esta razón, la biología reproductiva de las poblaciones de *S. arctus* del Mediterráneo (Mura *et al.*, 1984; Cau *et al.*, 1988) puede mostrar variaciones con la de las poblaciones del Atlántico.

En este capítulo se estudia la reproducción de *S. arctus* en el Atlántico NE en base al análisis de ejemplares procedentes del medio natural y mantenidos en cautividad, con los objetivos de determinar la talla de madurez sexual y el ciclo reproductivo, en base al estudio del ciclo gonadal, del ciclo de cría, de la duración del periodo de incubación y del número de puestas anual.

4.2. Metodología

4.2.1. Muestreo

Los datos del medio natural provienen del análisis de los 2592 ejemplares de *S. arctus* muestreados mensualmente durante el periodo de estudio de Febrero 2008 a Junio de 2009 en la costa gallega (NO de la Península Ibérica).

En el estudio en laboratorio se utilizaron un total de 50 hembras y 50 machos,

que fueron capturados en la zona de estudio durante los meses comprendidos entre Julio a Agosto de 2010. Los ejemplares capturados fueron aclimatados y mantenidos en cautividad en las instalaciones del Aquarium Finisterrae de A Coruña hasta la finalización de la experiencia en Septiembre de 2011. Para el experimento, los ejemplares capturados fueron marcados y estabulados en 5 tanques de 60 L a una proporción 1:1 de machos y hembras. El rango de tallas de las hembras utilizadas fue 30.5-40.6 mm LC, mientras que el rango de los machos fue 31.2-39.5 mm LC. Los individuos de *S. arctus* fueron examinados con una periodicidad diaria para determinar eventos de muda y desoves. Tras el desove, las hembras ovadas fueron aisladas en tanques individuales (10 L) para el seguimiento de la duración del periodo de incubación. Inmediatamente, tras la eclosión de las puestas de huevos, las hembras fueron reubicadas de nuevo con los machos.

4.2.2. Ciclo gonadal

Con el fin de determinar el periodo reproducción se evaluaron mensualmente los cambios en el estado reproductivo de las hembras maduras, y del índice gonadosomático en machos y hembras muestreadas en el medio natural. La asignación del estado reproductivo en las hembras se basó en el examen macroscópico de los ovarios. Los ovarios fueron clasificados en función de características macroscópicas como la coloración, la morfología y el volumen de ocupación de los ovarios en la cavidad cefalotorácica. Estos estados de desarrollo fueron caracterizados microscópicamente en base al examen y determinación del diámetro de 30 ovocitos presentes en las muestras de ovarios conservadas en formol neutralizado al 4%. Las mediciones fueron realizadas con un análisis de imagen (NIS Elements de Nikon) a partir de imágenes capturadas con una cámara digital Nikon DXM 1200 acoplada al microscopio estereoscópico Nikon SMZ 1500. La determinación del valor modal y del intervalo de confianza fue obtenido mediante la prueba de rango con signo de Wilcoxon.

El índice gonadosomático (IGS) fue calculado separadamente para los machos y las hembras a partir de la siguiente expresión:

$$IGS_i = \frac{PG_i}{PH_i} \cdot 100$$

donde PG_i representa el peso húmedo de las gónadas y PH_i el peso húmedo de cada individuo i . Para evitar la influencia gónadas inmaduras en las estimas del

IGS medio mensual, los ejemplares considerados inmaduros fueron excluidos.

Mediante el análisis de correlación cruzada (coeficiente de Pearson), el IGS fue correlacionado en el tiempo entre machos y hembras, y el IGS de las hembras con la temperatura media del agua usando medias mensuales. En estos análisis, los valores de una variable son correlacionados con los valores de la otra variable a diferentes retardos (meses).

Para la obtención de la temperatura superficial del agua (SST) se utilizó el producto Atlantic-Iberian Biscay Irish-Ocean Physics Reanalysis (2002-2011) proporcionado por el Servicio de Monitorización Marina Copernicus (marine.copernicus.eu), un reanálisis de datos SST in situ de imágenes satélite (AVHRR¹ y alta resolución Multi-satélite) con una resolución espacial de 1/12°. La temperatura media mensual se calculó a partir del promedio de los valores de temperatura de 8 puntos distribuidos homogéneamente sobre el área de estudio.

4.2.3. Ciclo de cría

En el medio natural se evaluaron mensualmente los cambios en la proporción de hembras ovígeras y del estado de desarrollo embrionario de las puestas de huevos en los ejemplares capturados en el medio natural. Las puestas de huevos fueron clasificadas según el estado de desarrollo embrionario de acuerdo a criterios macroscópicos (coloración) y microscópicos (desarrollo del embrión y ocupación del vitelo). Para caracterizar los estados de desarrollo embrionario, las muestras de huevos fueron examinadas y fotografiadas con una cámara digital Nikon DXM 1200 acoplada al microscopio estereoscópico Nikon SMZ 1500, y con un análisis de imagen (NIS Elements de Nikon) se determinó el diámetro medio (D), mayor y menor de 30 huevos. El volumen del huevo (V) se obtuvo con la fórmula del volumen del elipsoide oblató, $V = \pi \cdot d_1^2 \cdot d_2 / 6$, donde d_1 es el diámetro medio menor y d_2 es el mayor (Turner y Lawrence, 1979). Las diferencias entre las características biométricas de los huevos entre estados de desarrollo fueron analizadas mediante un análisis de la varianza (ANOVA).

Para estudiar el ciclo de cría en cautividad, se analizaron mensualmente los cambios en la proporción de hembras ovígeras, el número de desoves por hembra y el número de puestas eclosionadas. Además se evaluó el efecto de la talla en el comienzo del ciclo cría y en el número de puestas de cada hembra con el coeficiente de correlación de Pearson.

¹Advanced Very High Resolution Radiometer

4.2.4. Duración del periodo de incubación

Los modelos aplicados en el estudio de la duración del periodo de incubación en crustáceos son muy diversos e incluyen modelos hiperbólicos, potenciales y exponenciales, donde el número de parámetros puede variar entre 2 y 3 (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Modelos de duración de la fase embrionaria ajustados a los datos de duración (D) y temperatura (T) de los periodos de incubación de *S. arctus* obtenidos en cultivo. *a*, *b* y α son parámetros de los modelos

Modelo	Ecuación	Fuente
<i>Réaumur</i>	$D = a / (T - \alpha)$	Ito <i>et al.</i> (1980)
<i>Bělehrádek</i>	$D = a(T - \alpha)^b$	Mclaren <i>et al.</i> (1969)
<i>Heip</i>	$D = aT^b$	Heip (1974)
<i>Tauti</i>	$D = ae^{bT}$	Tauti y Higurashi (1925)
<i>Arrhenius</i>	$D = ae^{-b(1/T)}$	Guerrero <i>et al.</i> (1994)

Donde *a*, *b* y α son constantes ajustadas; D es el tiempo de desarrollo (días) y T es la temperatura media (°C). La constante α , se denomina ‘cero biológico’ y representa el valor umbral de temperatura para el desarrollo embrionario de la especie (Mclaren *et al.*, 1969). Para cada desarrollo, T fue obtenida a partir de la temperatura efectiva acumulada, calculada como la suma de las temperaturas medias diarias registradas. Las funciones mostradas en la tabla 4.1 se ajustaron al conjunto de los datos de 47 periodos de incubación. Los ajustes de los modelos de duración de la fase embrionaria fueron realizados mediante mínimos cuadrados no lineales generalizados mediante la función *gnls* del paquete estadístico *nlme* de R.

El proceso de selección de modelos de duración del periodo de incubación fue evaluado siguiendo el criterio de Akaike (*AIC*; Akaike, 1974) y el criterio Bayesiano (*BIC*; Schwarz, 1978). Los valores absolutos de IC_i para cada modelo *i* por sí solos carecen de importancia porque son difíciles de interpretar. Son las diferencias relativas entre los IC_i (Δ_i) de los diferentes modelos, las que permiten clasificar los diferentes modelos y favorecer una mejor interpretación de la plausibilidad de los modelos. La realización de una ponderación de estas diferencias relativas es útil, ya que como los valores obtenidos oscilan entre 0 y 1, pueden considerarse como un porcentaje de acierto al seleccionar el modelo que posee el mejor IC_i de entre los posibles candidatos (Burnham, K.P. y Anderson, 2002, 2004):

$$IC_{p_i} = \exp(-0.5\Delta_i) / (\sum_i^R \exp(-0.5\Delta_i))$$

Según el criterio que se esté utilizando, el mínimo IC_i utilizado es el AIC (o BIC) más bajo de los R modelos que se están examinando. El IC_p es el valor ponderado estimado.

4.2.5. Número de puestas anual

Finalmente se propone un escenario para comprobar la capacidad reproductiva (número de puestas posibles) de una hembra de *S.arctus* y el rango de duración del periodo de incubación en el medio natural. Con este propósito, se utiliza el modelo de duración del periodo de incubación seleccionado para determinar que fracción del periodo de incubación tiene lugar cada día a una temperatura dada. Posteriormente, mediante un proceso iterativo de suma acumulada hacia adelante se calcula el número de días necesarios para completar un desarrollo embrionario para una puesta recién desovada tipo para cada día. Los datos de temperatura diaria utilizada se corresponden con una zona próxima al área objeto de estudio de esta tesis durante los años 2008 y 2009 (coordenadas 43° 23.11' N 8° 24.63' O, datum WGS84; fuente: Aquarium Finisterrae). Como inicio del ciclo de cría para cada año se utilizó la fecha promedio del primer desove de las hembras en laboratorio. Además se muestran los posibles acoplamientos entre la eclosión de las puestas de huevos con la disponibilidad de alimento mediante la representación de la producción secundaria (mesozooplancton >200 μm , fuente: IEO; Coordenadas 43° 25.3 N, 8° 26.2 O).

Por otro lado, se estimó el número de puestas anual en base al porcentaje mensual de hembras ovígeras (N_m) desde Febrero de 2008 hasta Enero de 2009, la duración mensual estimada del periodo de incubación a partir de la temperatura media mensual del agua (D_m), y un número medio de días para cada mes m según Fischer y Thatje (2008):

$$N_{puestas\ anual} = \sum_{m=1}^{12} \frac{N_m \cdot 30.4}{D_m}$$

4.2.6. Talla de madurez sexual

Para la estimación de talla de madurez se ha utilizado como referencia la LC y se han utilizado las relaciones de conversión determinadas en el Capítulo 3 para realizar comparaciones con las estimas obtenidas con otros trabajos.

4.2.6.1. Machos

En las langostas espinosas y esciláridas macho no es posible la determinación de la madurez sexual por la presencia de caracteres sexuales secundarios o por el aspecto macroscópico de los testículos (Aiken y Waddy, 1980; Chubb, 2000).

Para determinar la talla a la cual los machos alcanzan la madurez sexual se utilizó la regresión lineal segmentada en la relación $\log LC \times \log PG$. La regresión lineal segmentada tiene como objetivo cuantificar un cambio abrupto en la relación lineal entre la variable respuesta y las variables predictoras. En este caso, un punto ruptura en la relación alométrica entre el incremento de $\log LC$ y el aumento de $\log PG$. Este punto de ruptura es considerado como indicativo de la talla de madurez sexual fisiológica (Goñi *et al.*, 2003).

Para la determinación de la regresión lineal segmentada se utilizó el paquete *segmented* (Muggeo, 2008). Este paquete estadístico permite la estimación del punto de ruptura mediante un algoritmo que realiza un ajuste iterativo de las regresiones lineales a partir de un valor o valores iniciales. Este proceso de ajuste iterativo se basa en la minimización de un parámetro "brecha", que mide la distancia entre las líneas de regresión a ambos lados de un punto de ruptura. El algoritmo converge cuando el parámetro "brecha" se aproxima a cero, minimizando el error estándar de la estimación del punto de ruptura (Muggeo, 2003). Para establecer el valor inicial se utilizó un ajuste iterativo de relaciones lineales parciales para cada posible punto de ruptura dentro del intervalo de datos (Crawley, 2007). Para determinar el mejor modelo ajustado, que se corresponde con el punto de ruptura (valor inicial), se utilizó el criterio de selección de Akaike (1974).

Para evaluar la existencia de un punto de ruptura se utilizó la prueba de Davies, que prueba la hipótesis de igualdad entre las pendientes de las líneas de regresión a ambos lados de un punto de ruptura (Davies, 2002). Los puntos de ruptura con un valor de $|t|$ asociado al parámetro "brecha" < 2 se consideraron estimaciones fiables de la talla de madurez fisiológica (Muggeo, 2008).

La presencia de espermátóforos fue estudiada en los machos más pequeños (< 24 mm LC) mediante el examen del conducto deferente bajo el microscopio.

4.2.6.2. Hembras

Para determinar cuando tiene lugar la madurez sexual morfológica se estimó la talla a la que aparecen cambios alométricos en la capacidad del abdomen (AA) respecto a LC entre sexos (Capítulo 3), mediante la determinación del punto de

corte entre las relaciones ajustadas por mínimos cuadrados (George y Morgan, 1979). Además, se evaluó la presencia de quelas en el 5° par de pereiópodos, considerado en algunos esciláridos como un carácter sexual secundario en las hembras.

Para estimar la talla de madurez sexual fisiológica en hembras se aplicaron dos criterios. El primer criterio utilizado es el aspecto macroscópico de los ovario. Para esto, se ajustó un modelo lineal generalizado (GLM), asumiendo una distribución de error binomial (función vínculo logit) y estableciendo como variable respuesta binaria la presencia de hembras maduras/inmaduras (1/0) respecto a LC durante el periodo reproductivo. Las hembras fueron consideradas inmaduras cuando presentaron ovarios en estado P1 y maduras cuando éstas presentaron ovarios en estado P3 o superior, o portaban puestas de huevos. El modelo final obtenido para evaluar la proporción de hembras maduras fue el siguiente:

$$M_i = \frac{e^{\pi_i}}{1 + e^{\pi_i}} \quad \text{logit}(M_i) = \pi_i = e^{a_0 + a_1 \cdot CL}$$

Donde M_i es la probabilidad de una hembra estar madura; y a_0 , a_1 son parámetros del modelo. A partir de este modelo se estimó la talla a la que el 50% y 95% de las hembras alcanzan la madurez sexual (LC50 y LC95).

El segundo criterio que se utiliza como estima de la talla de madurez sexual fisiológica es el punto de ruptura en la relación Log PG x Log LC, obtenido mediante el ajuste de una regresión lineal segmentada, método que ha sido descrito previamente.

Para determinar la talla de madurez funcional se ajustó un GLM con distribución binomial (función vínculo logit) y estableciendo como variable respuesta binaria la presencia de hembras maduras/inmaduras (1/0) respecto a LC durante los meses de mayores proporciones de hembras ovígeras. Las hembras fueron consideradas maduras si estaban ovadas o presentaban restos de huevos de una puesta anterior o esperma en el abdomen, e inmaduras si no estaban ovadas. Además, se evaluó la presencia de sedas ovígeras en los pleópodos como indicador externo de madurez sexual funcional.

4.3. Resultados

4.3.1. Ciclo gonadal

En base a las características macroscópicas del ovario se definieron cinco estados de desarrollo ovárico. Para cada estado se determinó el tamaño de los ovocitos y el IGS. Estos estados de desarrollo fueron agrupados en función del estado de madurez (inmaduro, maduro) y el grado de desarrollo de los ovarios maduros.

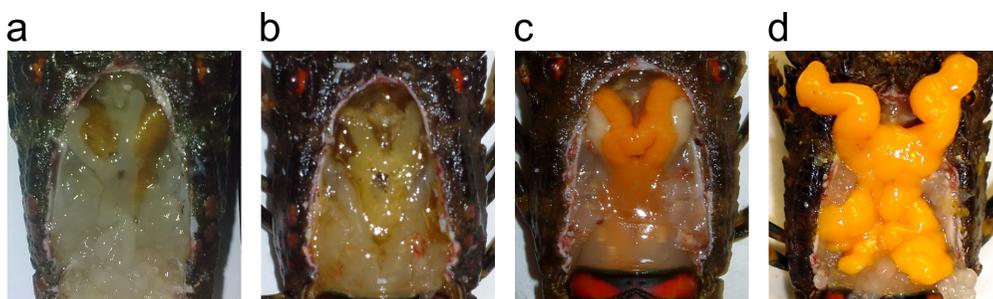


Fig. 4.1. Aspecto macroscópico del ovario según el estado de desarrollo en las hembras de *S. arctus*: (a) ovario inmaduro, (b) ovario maduro desovado/reposo, (c) ovario en maduración intermedia, y (d) ovario preparado para el desove

Estado P1: Ovario inmaduro

EL ovario es delgado, translúcido y sin pigmentación (Fig. 4.1a). Los lóbulos tienen forma de barras y se encuentran extendidos ocupando una pequeña parte de la cavidad cefalotorácica. El examen microscópico mostró que los ovarios inmaduros analizados contienen pequeños ovocitos con un citoplasma claro y un núcleo visible. Los diámetros de los ovocitos oscilaron entre 66 y 101 μm , pero el tamaño modal fue de 82 μm (IC 95 %: 76-98 μm). Los ovarios inmaduros mostraron un IGS medio del $0.34 \pm 0.14\%$ (\pm DT) (Tabla 4.2).

Estado P2: Ovario desovado o en estado de reposo

El ovario tras el desove tiene externamente una coloración crema (RAL® 1002), un aspecto flácido y una morfología arrugada, e internamente, un aspecto acuososo (Fig. 4.1b). Durante el descanso reproductivo los lóbulos del ovario recuperan una mayor firmeza y adquieren una coloración blanquecina (RAL® 1013). En algunos ovarios pueden encontrarse unos pocos ovocitos desarrollados de forma residual. Los ovocitos en este estado tuvieron un tamaño de entre 78 y 189 μm , y

un tamaño modal de 109 μm (IC 95 %: 105-113 μm). Una vez realizado el desove el IGS osciló entre el 0.39 % y el 1.71 % (Tabla 4.2).

Estado P3: Ovario en estado de maduración inicial

El ovario comienza a incrementar su tamaño y adquirir una coloración crema/amarillo (RAL® 1002/RAL® 1018). El ovario en este estado contiene ovocitos inmaduros y en desarrollo. Los ovocitos en desarrollo son translúcidos, lo que permite que todavía se distinga el núcleo. Las medidas de los ovocitos oscilaron entre 86 y 214 μm , con un tamaño modal de 123 μm (IC 95 %: 114-134 μm). El valor medio del IGS al inicio de la maduración del ovario fue del 0.73 ± 0.17 % (\pm DT)(Tabla 4.2).

Estado P4: Ovario en estado maduración intermedia

El ovario está hinchado en toda su longitud, pero no amontonado (Fig. 4.1c). El color del ovario es amarillo/naranja (RAL® 1018/RAL® 1028). En esta etapa se encuentra ocupando el 50 % de la cavidad cefalotorácica. La opacidad de los ovocitos en este estado no permite que se diferencie el núcleo. Las medidas de los ovocitos oscilaron entre 104 y 379 μm , pero el tamaño modal fue de 237 μm (IC 95 %: 218-257 μm). Durante este estado de maduración el IGS osciló entre el 0.68 % y el 6.30 % (Tabla 4.2).

Estado P5: Ovario en estado de maduración final o desove

El ovario se encuentra hinchado y formando pliegues, ocupando todo el espacio disponible en la cavidad cefalotorácica (Fig. 4.1d). La coloración del ovario es naranja brillante (RAL® 1028), aunque en ocasiones puede presentar una coloración naranja oscuro (RAL® 2000). Los ovocitos maduros, claramente visibles individualmente, son opacos y están completamente rellenos de vitelo. El tamaño de los ovocitos medidos osciló entre las 227 y 407 μm , y mostró un valor modal de 341 μm (IC 95 %: 329-355 μm). En este estado el IGS medio fue de 5.40 ± 1.45 % (\pm DT), aunque ante un inminente desove se alcanzó un IGS máximo del 8.23 % (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Clasificación de los estados de desarrollo del ovario en base al índice gonadosomático (IGS, %).

Desarrollo del ovario	IGS				
		M (DT)	Rango	N	
Inmaduro	P1	0.34 (0.14)	0.14-0.60	12	
Maduro	<i>Desovado/Reposo</i>	P2	0.73 (0.17)	0.39-1.71	142
	<i>Inicio</i>	P3	1.18 (0.45)	0.48-2.97	308
	<i>Intermedio</i>	P4	2.37 (1.05)	0.68-6.30	358
	<i>Final o desove</i>	P5	5.40 (1.45)	1.61-8.23	491

Desde Febrero hasta Mayo de 2008 las hembras mostraron una elevada proporción (>50 %) de ovarios preparados para el desove (Fig. 4.2) y un IGS superior al 3.6 % (Fig. 4.3). Durante los meses siguientes, se produjo un notable aumento de la proporción de ovarios en estado P2 entre los meses de Julio y Noviembre (>13.1 %) y un descenso del IGS a valores inferiores al 2 %, que indican la presencia de un descanso gonadal al final del ciclo reproductivo de 2008.

Durante este periodo de descanso gonadal, la mayor proporción de hembras con ovarios en P2 tuvo lugar en Septiembre (58.1 %), coincidiendo con la menor proporción de hembras (6.2 %) con ovarios en estado avanzado de maduración (Fig. 4.2). A continuación de este periodo, comenzó a aumentar el número de hembras con ovarios preparados para el desove (estado P5), hasta alcanzar entre los meses de Diciembre de 2008 y Mayo de 2009 proporciones >36.2 % y valores de IGS >3.8 %. En ambos años, durante los meses con altas proporciones de hembras con ovarios en proceso de maduración (estados P3 a P5), el IGS mostró tres descensos en los meses de Febrero, Abril y en Junio-Julio, que pueden corresponder con los principales eventos de desove (Fig. 4.3).

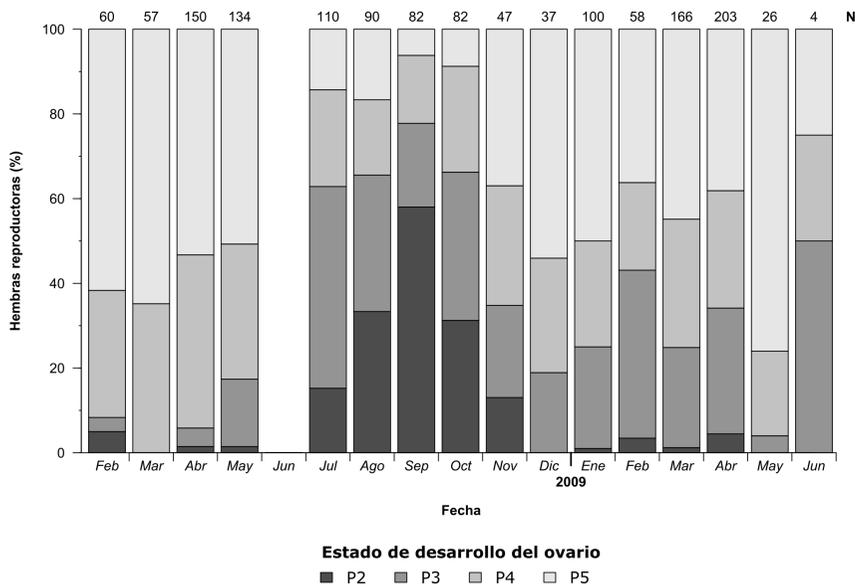


Fig. 4.2. Proporción mensual de hembras con ovarios en diferentes estados de maduración desde Enero 2008 a Junio 2009. Encima de cada barra se muestra el número de hembras (N)

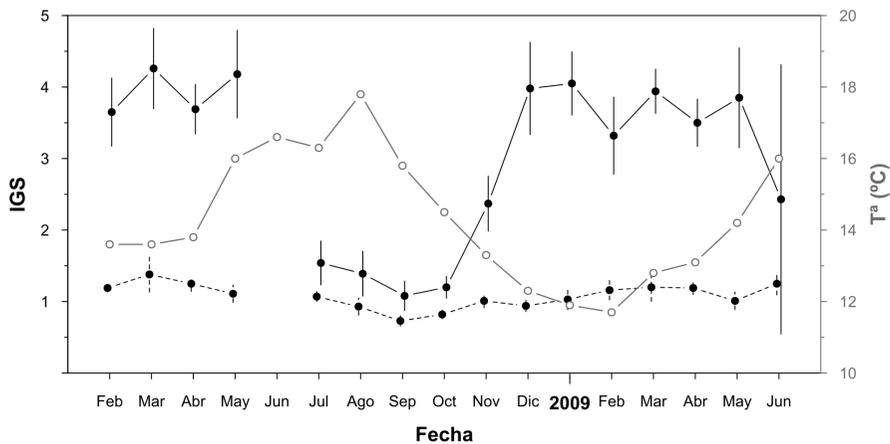


Fig. 4.3. Índice gonadosomático medio (IGS) y temperatura superficial del agua (SST) desde Febrero 2008 a Junio 2009. Los puntos con relleno negro unidos con una línea continua representan el IGS de hembras y con una línea discontinua el de los machos (eje izquierdo). Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%. Los puntos grises sin relleno representan la SST media (eje derecho).

La relación entre el IGS en hembras y SST mostró un patrón inverso entre ambas variables (Fig. 4.3). El análisis de la correlación cruzada indica que el descenso del IGS en hembras se inicia un mes después que ha tenido lugar un aumento de la temperatura del agua ($r_{xy(-1)} = -0.81$, $P < 0.05$). Mientras que con un desfase de 5 meses entre este aumento de temperatura ($r_{xy(5)} = 0.741$, $P < 0.05$), se produce un aumento del IGS en las hembras. El análisis de la relación entre el IGS hembras y IGS machos fue positiva y significativa, mostrando un retardo de un mes ($r_{xy(-1)} = 0.75$, $P < 0.05$).

4.3.2. Ciclo de cría

Se determinaron tres estados de desarrollo en las puestas de huevos: estado A, constituido por huevos de color amarillo anaranjado (RAL® 1028), con el vitelo ocupando la mayor parte del volumen (>80 %); estado B, de color naranja (RAL® 2000) con manchas oculares visibles y apéndices bien definidos, el vitelo ocupa sobre el 50 %; y estado C, caracterizado por huevos de color marrón (RAL® 8001) con larvas bien desarrolladas, donde el vitelo ocupa menos de 10 % o está ausente (Fig. 4.4).

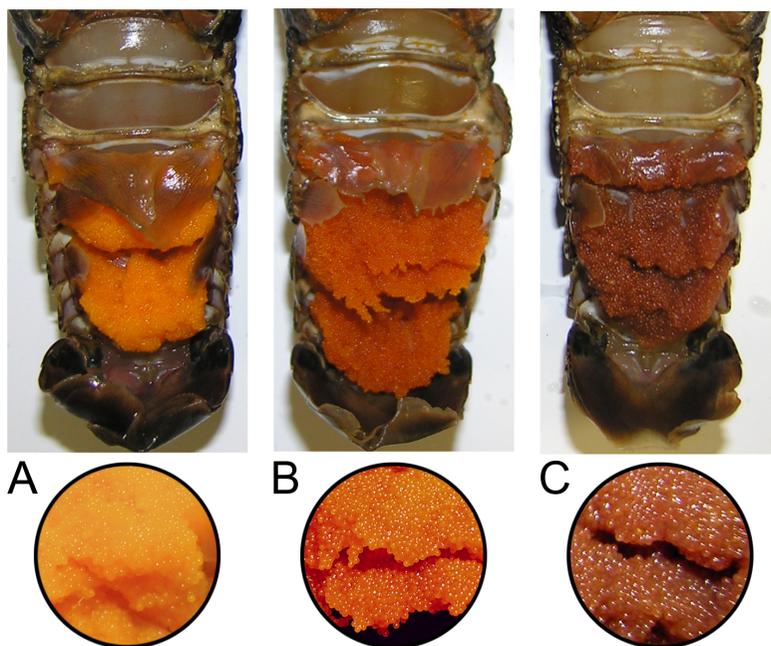


Fig. 4.4. Aspecto macroscópico de las puestas de huevos según el estado de desarrollo: De izquierda a derecha, una hembra con puesta de huevos en estado A, en estado B y en estado C.

El tamaño de los huevos se incrementó significativamente entre cada estados de desarrollo ($P < 0.001$; Tabla 4.3). El volumen de los huevos aumentó desde $542.8 \pm 59.2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$ ($M \pm DT$) en estado A hasta los $674.9 \pm 83.4 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$ en un estado C. Las puestas en estado B y C presentaron las mayores variaciones en el volumen de los huevos, dentro de un rango de $468.9-833.2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$ y de $532.2-879.7 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$, respectivamente. El diámetro medio aumentó desde los $461.0 \pm 17.8 \mu\text{m}$ en un estado A hasta los $493.3 \pm 21.4 \mu\text{m}$ en un estado C.

Tabla 4.3. Características de las puestas. Se indica el volumen estimado (V) y el diámetro medio (D) de los huevos en cada estado de desarrollo, el valor de la prueba F y la significación (F)

Tamaño	Desarrollo de los huevos			F	P
	Estado A	Estado B	Estado C		
<i>V</i> ($\cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$)					
$M \pm DT$	542.8 ± 59.2^a	604.6 ± 82.7^b	674.9 ± 83.4^c	116.1	<0.001
Rango	402.1-693.7	468.9-833.2	532.2-879.7		
<i>D</i> (μm)					
$M \pm DT$	461.0 ± 17.8^a	475.9 ± 21.5^b	493.3 ± 21.4^c	89.72	<0.001
Rango	414.9-502.5	436.1-533.5	445.7-541.6		
N	247	87	82		

Las letras diferentes indican diferencias significativas.

El análisis de un total de 1406 hembras maduras en el medio natural, de las cuales 894 correspondieron a hembras ovígeras (63.6 %) permitió definir la estacionalidad del ciclo de cría. El mayor número de hembras capturadas fue en Abril-Mayo en 2008 (142 ± 11 , $M \pm DT$) y Marzo-Abril en 2009 (185 ± 26). Se capturaron hembras ovadas prácticamente en todo el periodo estudiado, salvo en el mes de Octubre (Fig. 4.5). Teniendo en cuenta los dos años de estudio, el periodo principal de cría se situó entre los meses de Febrero a Agosto, periodo en el que el porcentaje mensual de hembras ovadas fue superior al 50 %. En cada ciclo de cría anual, las mayores proporciones de hembras ovadas se produjeron en el mes de Abril en 2008 (93.3 %), mientras que en 2009 tuvieron lugar desde Marzo a Junio (>87 %).

La presencia de una alta proporción de puestas de huevos en estado A de desarrollo embrionario (>40 %) permite identificar un prolongado periodo de desove entre los meses de Febrero y Julio (Fig. 4.6). El principal periodo de liberación de larvas al medio tuvo lugar entre los meses de Marzo y Septiembre, meses en los

que se encontró una elevado número y proporción de hembras ovadas con puestas próximas a eclosionar. Durante este periodo, la mayor proporción de puestas con huevos a punto de eclosionar en 2008, se alcanzó durante los meses de Mayo y Agosto (31.4% y 30.4%, respectivamente), mientras que en 2009, tuvo lugar en Mayo (26.1%). El 83.1% de las hembras con puestas de huevos a punto de eclosionar (Estado C) presentaron ovarios preparados para el desove (P5), indicando que la maduración del ovario en *S. arctus* está sincronizada con el periodo de incubación.

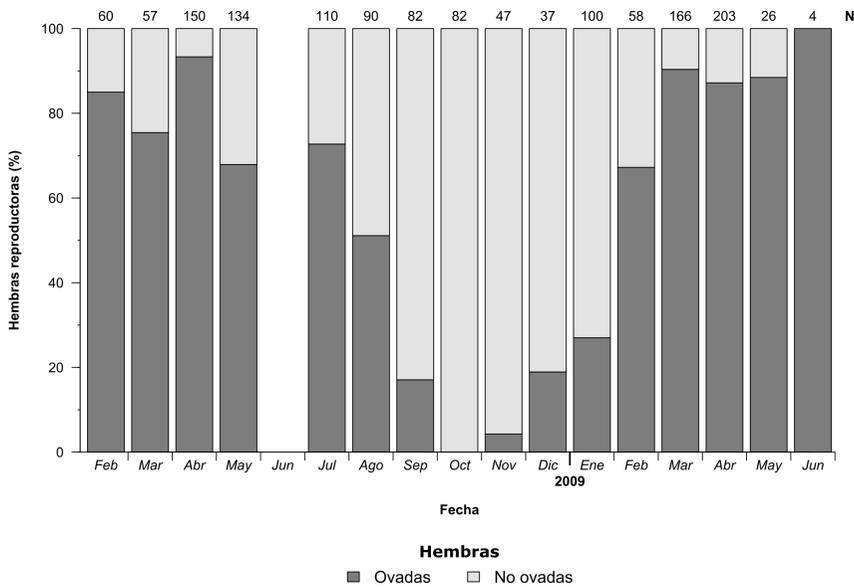


Fig. 4.5. Variación mensual de la proporción de hembras ovadas de *S. arctus* desde Febrero 2008 a Junio 2009. Encima de cada barra se muestra el número total de hembras reproductoras (N)

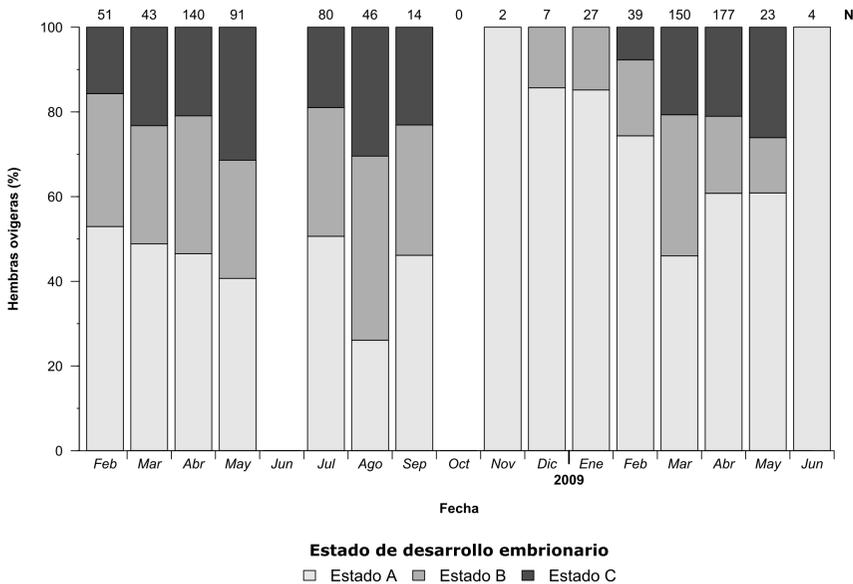


Fig. 4.6. Variación mensual de la proporción de puestas de huevos en diferentes estados de desarrollo embrionario desde Febrero 2008 a Junio 2009. Encima de cada barra se muestra el número total de hembras ovígeras (N)

De las 50 hembras de *S. arctus*, un 72 % realizaron una muda en laboratorio entre los meses de Agosto a Noviembre (fecha promedio: 29-09-2010, DT=27 días). La duración media desde la muda hasta la primera puesta del nuevo ciclo reproductivo fue de 170 ± 77 días ($M \pm DT$, N=36). La duración de este periodo no estuvo correlacionado a la talla de los individuos (Coeficiente de correlación de Pearson=0.18, P=0.41).

Durante este estudio, 48 hembras realizaron un total de 64 desoves durante el periodo reproductivo anual. Las hembras realizaron los desoves principalmente por la noche. Algunas de las hembras, tras los desoves, mostraron restos de espermatozoides en avanzado estado de degradación junto a la base del 5º par de pereópodos durante el examen diario de los ejemplares. La mayor parte de estas hembras (72 %) realizaron una primer desove, el 23 % un 2º desove y sólo el 5 % realizaron un 3º desove. Dos hembras que no llegaron a realizar ningún desove, presentaron una reabsorción de la gónada, que se caracterizó externamente por una coloración amarillenta del músculo del abdomen. El número de puestas no dependió del tamaño de los individuos (Coeficiente de correlación de Pearson=0.24, P=0.16).

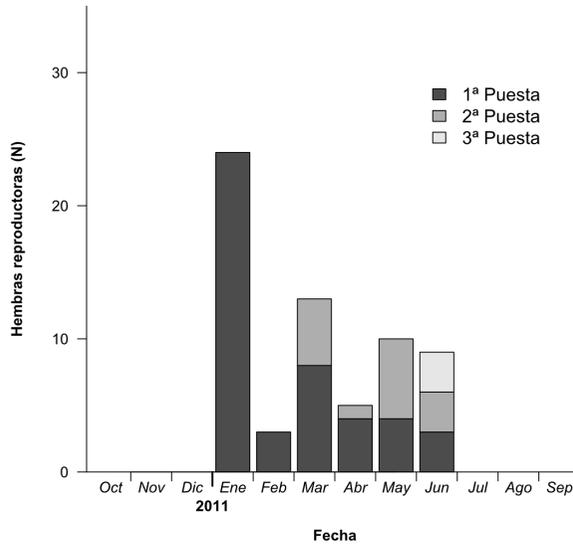


Fig. 4.7. Número de hembras que desovaron en cautividad. Cada barra indica el número de hembras que desovaron en cada mes del año, agrupadas en el caso de puestas sucesivas, según el orden de la secuencia (1ª, 2ª y 3ª puesta).

Durante el periodo reproductivo se pudieron identificar 3 periodos de puesta con una mayor proporción de desoves. Un 1^{er} periodo de puesta en enero, donde el 38 % de las hembras reproductoras realizaron un 1^{er} desove; el 2^o periodo en Marzo, mes en el que se produjo el solapamiento de 1^{os} y 2^{os} desoves (20 % de las hembras); y un 3^{er} máximo en los meses de mayo-junio en el que se solaparon 1^{as}, 2^{as} y 3^{as} puestas (25 % de las hembras, Fig. 4.7). La producción continua de desoves sucesivos dio lugar a que la proporción de hembras ovadas fuera superior al 50 % durante la mayor parte de los meses (Enero-Junio) del ciclo reproductivo anual observado (Fig. 4.8).

Los eventos de eclosión de las puestas de huevos tuvieron lugar durante la noche y fueron de corta duración (horas). La distribución mensual de las hembras con puestas de huevos eclosionando permitió identificar tres periodos importantes de liberación de larvas al medio durante el ciclo reproductivo (Fig. 4.9). Un 1^{er} periodo tuvo lugar en Marzo, en el que eclosionaron un 40 % de las puestas de huevos y otros dos posteriores, en Mayo (27 %) y Julio (25 %). El número de días entre la eclosión de una puesta y una nueva ovoposición para una misma hembra osciló entre 1 y 13 días, con una media de 2.8 ± 2.6 días.

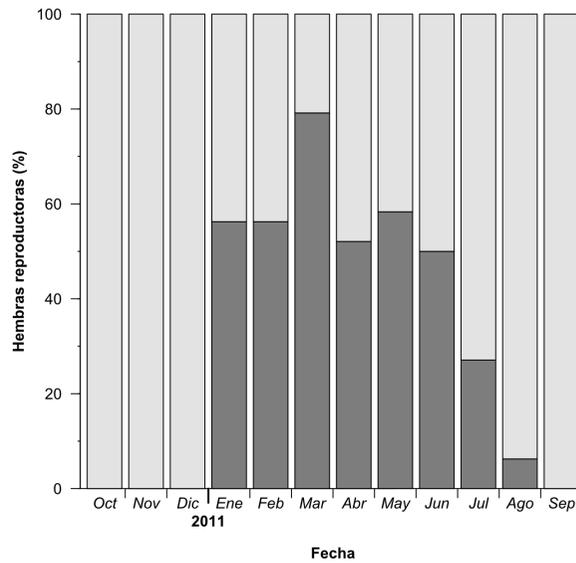


Fig. 4.8. Variación mensual del porcentaje de hembras ovadas en cultivo. Las barras de color gris oscuro indica el porcentaje de hembras ovígeras y en gris claro el porcentaje de hembras sin huevos

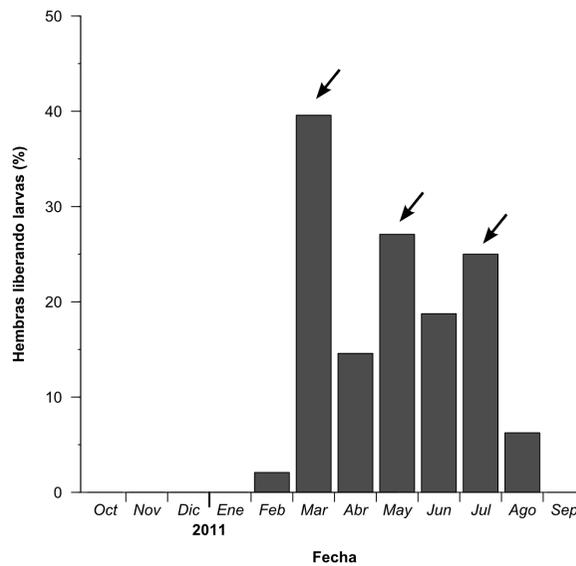


Fig. 4.9. Porcentaje mensual de hembras con puestas de huevos que completaron la fase embrionaria y eclosionaron, liberando las larvas al medio durante el ciclo reproductivo en cautividad. Las flechas indican los principales eventos de producción de larvas

4.3.3. Duración del periodo de incubación

Tanto los valores de *AIC* como *BIC* indican el modelo de Réaumur como la función que mejor se ajusta al conjunto de datos (Tabla 4.4). Además, las diferencias con los otros modelos examinados son considerables, como muestran las altas proporciones de *AIC* y *BIC* ponderados (72 % y 88 % de probabilidad de ser el mejor modelo evaluado, respectivamente). El modelo de Arrhenius y el de Bělehrádek fueron los siguientes modelos con un mejor ajuste. Sin embargo, este último recibió una mayor penalización debido a la estimación del parámetro adicional *b*. En comparación al modelo de Bělehrádek, la función de Réaumur se trata de una ecuación simplificada, en la que el parámetro *b* toma como valor 1. Finalmente, los modelos con peor ajuste fueron el de Heip y el de Tauti.

Tabla 4.4. Parámetros estimados de los modelos ajustados la duración del desarrollo embrionario (valor ± ET). Se muestran el valor de *AIC*, *BIC* y sus valores ponderados

Modelo	Parámetros			R ²	AIC	AICp	BIC	BICp
	a	b	α					
<i>Réaumur</i>	327.44 ± 6.05		8.91 ± 0.10	0.985	158.6	7.2·10 ⁻¹	164.5	8.8·10 ⁻¹
<i>Arrhenius</i>	4.51 ± 0.2	-37.20 ± 0.66		0.985	159.5	3.9·10 ⁻¹	165.4	3.9·10 ⁻¹
<i>Bělehrádek</i>	265.23 ± 18.87	-0.92 ± 0.26	9.36 ± 1.55	0.985	160.5	2.8·10 ⁻¹	168.4	1.2·10 ⁻¹
<i>Heip</i>	46153.90 ± 5.73·10 ³	-2.49 ± 4.6·10 ⁻²		0.984	163.5	0.8·10 ⁻¹	169.4	0.8·10 ⁻¹
<i>Tauti</i>	659.82 ± 32.24	-0.16 ± 0.17		0.981	170.6	2.5·10 ⁻³	176.5	2.5·10 ⁻³

La duración del periodo de incubación disminuyó exponencialmente al aumentar la temperatura, situándose en un rango de 80-33 días, para unas temperaturas de 13°C y 18°C, respectivamente (Fig. 4.10). El significado biológico de la ecuación de Réaumur se encuentra en el parámetro *α*, que supone un valor umbral de temperatura para el desarrollo embrionario. El valor obtenido de *α* para *S. arctus* fue 8.91 °C (IC 95 % = 8.81-9.01 °C).

4.3.4. Número de puestas anual

El escenario utilizado para la estimación de la duración de los periodos de incubación para la costa atlántica permitió, a partir del modelo de Réaumur, comprobar e identificar, al igual que en el estudio en cautividad, la capacidad de realizar hasta tres desoves durante un ciclo reproductivo anual (Fig. 4.11). Esta estimación coincide con el número de puestas anual estimado que puede llegar a realizar *S. arctus* en el Atlántico NE de 3.3 puestas por hembra.

La variación de la temperatura del agua entre periodos generó importantes variaciones en la distribución temporal del ciclo de cría por su efecto en las dura-

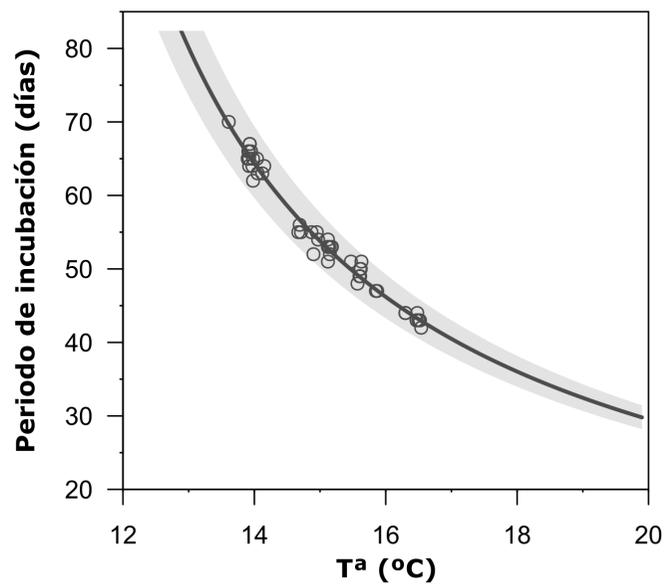


Fig. 4.10. Curva estimada a partir de la función de Réaumur para la duración del desarrollo embrionario en *S. arctus* en función de la temperatura. El área sombreada indica el intervalo de confianza al 95% obtenido mediante remuestreo aleatorio. Los puntos son las duraciones obtenidas en el laboratorio

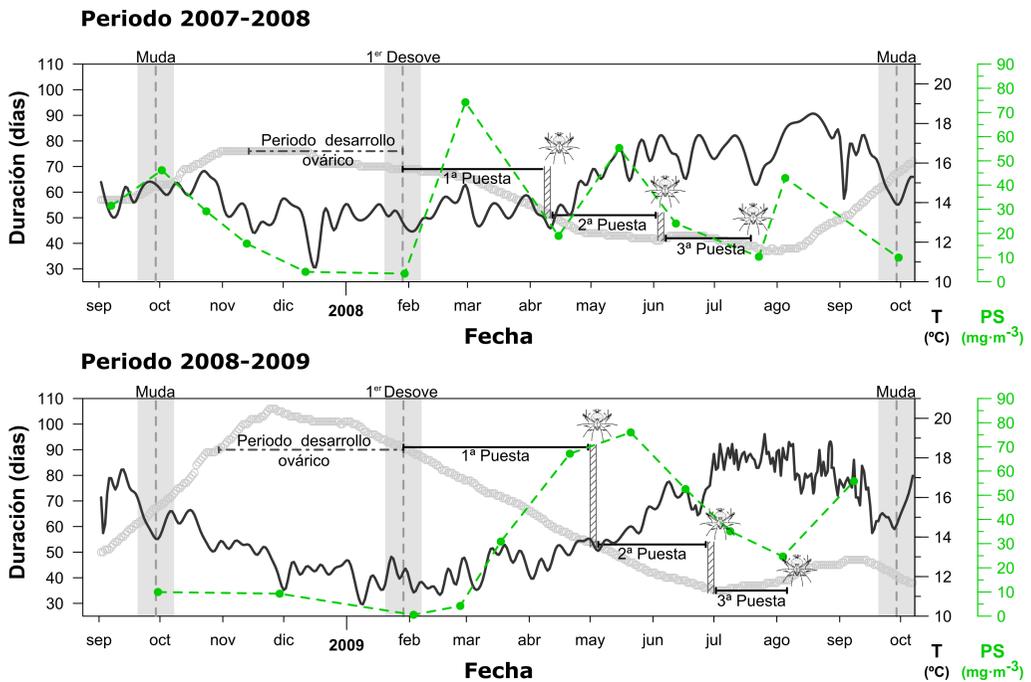


Fig. 4.11. Escenarios propuestos para determinar la capacidad de una hembra de *S. arctus* de realizar varios desoves durante los ciclos reproductivos de 2008 y 2009. Los puntos grises representan el número de días de incubación predichos a partir de la ecuación de Réaumur para cada desove. Se indican las fecha media de muda y del primer desove (líneas verticales discontinuas grises) y su intervalo de confianza al 95 % (barras grises) en cultivo. Como inicio del ciclo de cría se estableció como referencia la fecha media del primer desove. Los periodos de incubación estimados se indican mediante segmentos horizontales y los intervalos entre puestas (2.8 días) mediante barras con líneas diagonales. También se muestra la estima de la extensión del desarrollo ovárico de la primera puesta. La biomasa de producción secundaria (mesozooplankton, $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$; puntos verdes) y la temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$; línea continua negra) se indican en el eje de ordenadas derecho

ciones de los periodos de incubación. Así, la duración del periodo de incubación de las puestas de huevos en 2008 osciló entre los 42-76 días (verano- invierno), mientras que en 2009 estuvieron entre 35-91 días. Por otra parte, las variaciones en la temperatura del agua y la biomasa de mesozooplankton entre los dos años de estudio, provocan que en el escenario propuesto se observen desacoples entre los periodos de eclosión de los huevos y la presencia de alimento para las larvas recién eclosionadas (Fig. 4.11).

4.3.5. Talla de Madurez sexual

La hembra ovígera más pequeña muestreada midió 24.35 mm LC y sus ovarios estaban preparados para un nuevo desove (estado P5), mientras que la hem-

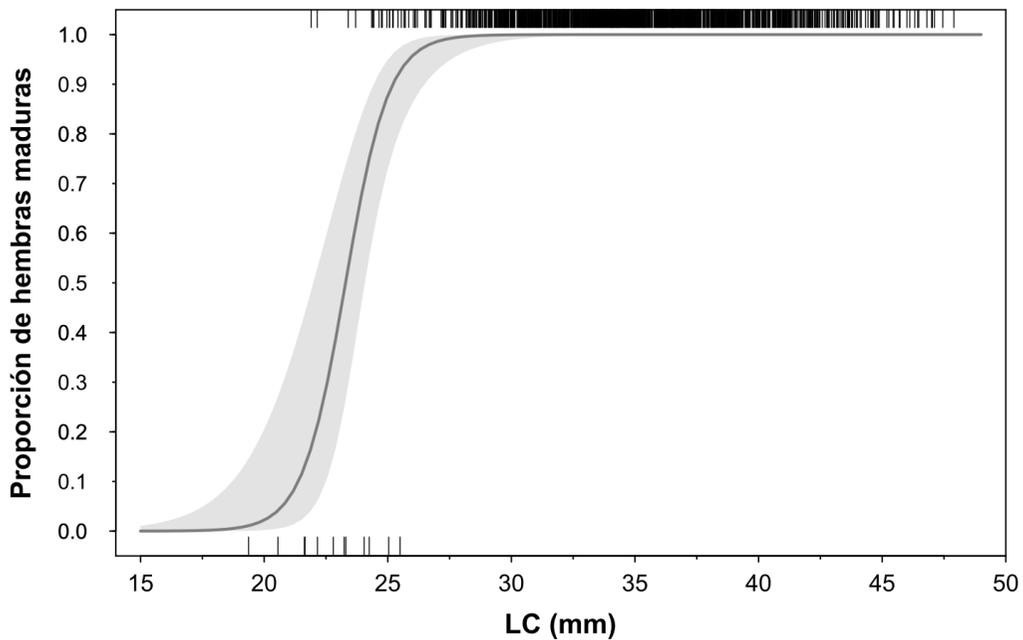


Fig. 4.12. Proporción de hembras con ovarios maduros respecto a la longitud del cefalotórax (LC). La línea gris representa el ajuste del GLM binomial y el sombreado el intervalo de confianza al 95% de confianza. Las líneas negras verticales en la parte superior e inferior indican el número de langostas maduras o inmaduras para cada talla

bra más pequeña con ovarios maduros midió 21.9 mm LC.

Todas las hembras capturadas presentaron pinzas desarrolladas en el dactilo del 5° par de pereiópodos, indicando que este carácter aparece a tallas menores de 19.37 mm LC (talla mínima de las hembras capturadas). La talla de madurez morfológica estimada, en base a la aparición de cambios alométricos en la amplitud del abdomen de las hembras, fue de 16.55 mm LC (IC95 %=16.26-16.84 mm LC).

En base a los caracteres macroscópicos del ovario, la madurez fisiológica estimada como LC50 se alcanzó a los 23.29 mm (IC95 %=22.66-24.37 mm) y la LC95 a los 25.85 mm (IC95 %=25.03-27.09 mm) durante el periodo reproductivo (Diciembre-Agosto)(Fig. 4.12). Los parámetros del modelo resultante fueron: $a_0 = -26.79 \pm 6.58$ (\pm ET), $a_1 = -1.15 \pm 0.27$.

El análisis de la relación Log PG con Log LC en 1319 hembras (rango de tallas: 19.37-47.90 mm) permitió identificar dos grupos con diferente tasa de crecimiento de los ovarios (prueba de Davies, $P < 0.001$; Fig. 4.13). El punto de ruptura estimado entre ambas rectas se consideró como la talla de madurez sexual fisiológica, y

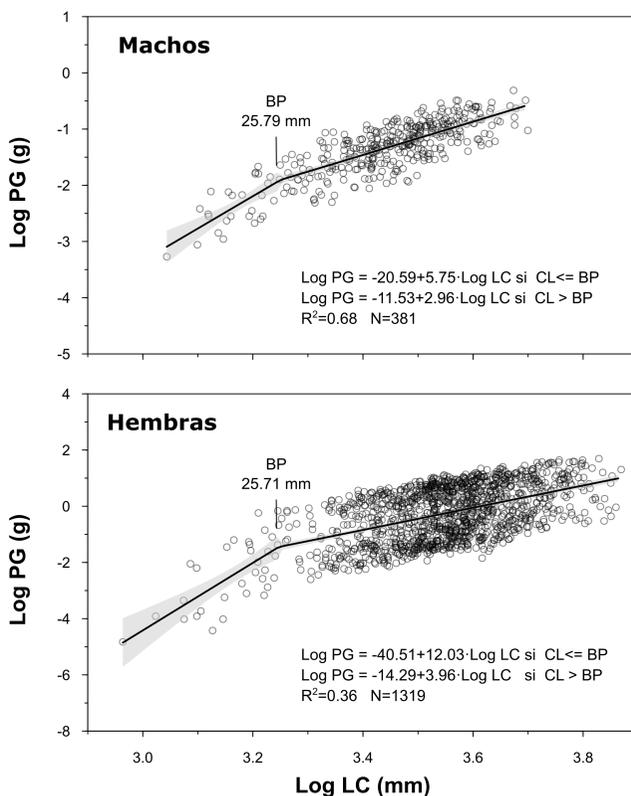


Fig. 4.13. Relación Log PG con Log LC para machos (arriba) y hembras (abajo) de *S. arctus*. La línea sólida muestra las regresiones segmentadas ajustadas entorno al punto de ruptura estimado en machos y hembras (BP). Las áreas sombreadas indican el intervalo de confianza al 95 %.

fue 25.71 mm LC (IC95 %: 24.34-27.17 mm LC).

En los machos, el análisis de la relación Log PG con Log LC en 381 ejemplares (rango de tallas: 20.98-40.43 mm) también permitió identificar dos grupos con diferente tasa de crecimiento de los testículos (prueba de Davies, $P < 0.001$; Fig. 4.13). La talla de madurez sexual fisiológica estimada fue 25.79 mm LC (IC95 %: 24.09-27.63 mm LC). Sin embargo, todos los machos < 24 mm LC presentaron espermátóforos en los conductos deferentes.

La madurez funcional no pudo ser determinada ya que el modelo no convergió. Los motivos fundamentales fueron posiblemente la escasa captura de ejemplares de pequeño tamaño durante las épocas de mayor proporción de hembras ovígeras (Marzo-Mayo) y la presencia de hembras probablemente maduras, que no pudieron ser clasificadas como maduras porque no mostraron ningún signo externo diferencial como la presencia de restos de huevos y espermátóforos. Ade-

más, la presencia de sedas ovígeras en los pleópodos no pudo ser utilizado como criterio de madurez, ya que estuvo presente en todas las hembras muestreadas.

4.4. Discusión

4.4.1. Ciclo gonadal

Los cinco estados de desarrollo del ovario determinados en *S. arctus* fueron equivalentes y presentaron características macroscópicas similares (coloración, aspecto, ocupación) a los descritos en otros esciláridos (Haddy *et al.*, 2007; Jones, 2007; Radhakrishnan *et al.*, 2007) y palinúridos (Aiken y Waddy, 1980; Chang *et al.*, 2007).

La comparación de los estados descritos con un estudio histológico previo de los ovarios realizado por Vilotte (1982) permitió ver una correspondencia con las fases de maduración de los ovocitos en el interior de los ovarios, en función de su tamaño y aspecto. El proceso de maduración del ovario tiene lugar en dos fases, una primera fase de proliferación y crecimiento de ovocitos (estados P1-P2), y continuación, una segunda fase de vitelogénesis. La vitelogénesis, a su vez, se divide en dos periodos, un primer periodo de vitelogénesis 1ª (estado P3), en el que tiene lugar la síntesis de vitelo de forma endógena; y un segundo periodo, vitelogénesis 2ª (estados P4-P5), en el que los ovocitos incorporan compuestos exógenos, principalmente lipoproteínas (Cau *et al.*, 1988). La correlación entre ambas clasificaciones señala que el aspecto macroscópico de los ovarios puede ser utilizado como un indicador del desarrollo de los ovocitos dentro del ovario, información que junto con la determinación del IGS pueden permitir la realización de evaluaciones más rápidas y precisas del estado de desarrollo.

El estudio del ciclo de maduración gonadal permitió identificar un periodo reproductivo continuo desde Diciembre a Junio en la costa atlántica. Este resultado contrasta con el periodo reproductivo descrito en el NO Mediterráneo, donde *S. arctus* muestra dos eventos reproductivos diferenciados que tienen lugar en Marzo y Julio-Agosto (Cau *et al.*, 1988). La temperatura es uno de los principales factores abióticos que controlan la actividad reproductiva en los invertebrados marinos y que podrían originar estas diferencias entre ambas regiones (Kinne, 1970). Esta constatado que la variación de la temperatura del mar influye en la duración del ciclos gonadales en decápodos marinos, acelerándolos a temperaturas templadas o ralentizándolos a temperaturas frías (Velázquez, 2003; Hamasaki

et al., 2004). En los cangrejos braquiuros se ha observado como a lo largo de un gradiente latitudinal, en el que se produce una importante variación de temperatura, ven modificadas la amplitud y la época de su periodo reproductivo (Fischer y Thatje, 2008; Verísimo, 2015). Si bien es cierto que la temperatura influye en la maduración de los ovarios, este único efecto no permite explicar las diferencias geográficas en el patrón reproductivo de *S. arctus*. La temperatura también tiene un importante efecto sobre la muda, un proceso que compite, desde el punto de vista energético, con la reproducción en los crustáceos decápodos (Raviv *et al.*, 2008). La respuesta ante un incremento de temperatura en las langostas palinúridas y homáridas es aumentar la frecuencia de muda (Aiken, 1980). Así, un aumento de la frecuencia de muda en el Mediterráneo debido a un mayor temperatura en comparación al Atlántico, podría provocar la concentración de la reproducción en los dos periodos anteriormente mencionados. Esta hipótesis se ve reforzada con las observaciones realizadas por Vilotte (1982) en hembras mantenidas en cautividad bajo condiciones de temperatura similares a las del medio natural en el Mediterráneo NO (rango: 10-20°C), en las que identifica dos periodos de muda anual, un primero de Febrero a Mayo, y un segundo de Agosto a Octubre. En cambio, las observaciones realizadas en la experiencia de cultivo en este estudio indican la presencia de un único periodo de muda entre los meses de Agosto a Noviembre. Este periodo de muda también explicaría el descanso gonadal durante los meses de Septiembre y Noviembre en la naturaleza.

El tiempo medio necesario para realizar el primer desove desde la muda (170 días) mostró una elevada variación temporal (>40 %). En algunas langostas palinúridas se ha observado que las hembras más grandes pueden comenzar el ciclo de cría antes que las hembras más pequeñas (Junio, 1987; Plaut, 1993; Chang *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio no se detectó la influencia de la talla en el inicio del ciclo de cría en cautividad, aunque hay que tener en cuenta que en esta experiencia se utilizó un estrecho rango de tallas, dada la dificultad de obtener ejemplares en el medio natural.

El análisis de la proporción de hembras ovígeras, el estado de maduración del ovario y el IGS permitió determinar que las hembras pueden desovar varias veces durante un periodo reproductivo anual. La evolución del IGS medio durante el periodo de estudio señala además, la existencia de hasta tres principales periodos de desove. Estos periodos de desove tendrían lugar en Febrero, en Abril y en Junio. Por otra parte, los datos obtenidos respecto al estado de desarrollo de las puestas y los ovarios de hembras ovadas muestran que la eclosión de los

huevos y la realización de un nuevo desove está sincronizado. Es decir, que tras la eclosión de la puesta puede producirse de forma inmediata un nuevo desove. Esta sincronización entre la maduración de los ovarios y el desarrollo embrionario también está presente en otros decápodos que habitan ambientes costeros (Norman y Jones, 1993; González-Gurriarán *et al.*, 1996; Siegel *et al.*, 2008).

4.4.2. Ciclo de cría

El ciclo de cría en cultivo comenzó con los primeros desoves en Enero y alcanzó una amplitud de 8 meses, mostrando un patrón temporal en la proporción de hembras ovígeras similar al observado en los muestreos de campo. Durante este periodo las hembras llegaron a producir hasta tres puestas sucesivas, con un breve intervalo medio de tiempo entre puestas (2.8 días), confirmando las observaciones realizadas en el medio natural. Así, poco tiempo después de la eclosión de las puestas se produciría una nueva cópula durante la noche, e inmediatamente la extrusión de los huevos para su fecundación. En otro escilárido, *Thenus orientalis*, la cópula también tiene lugar durante la noche, y el desove durante las 6-8 horas siguientes (Radhakrishnan *et al.*, 2007). La similitud entre ambas especies también se ve apoyada por la rápida degradación que muestran las masas de espermátóforos gelatinosas en las hembras de *S. arctus*, con una persistencia más similar a la determinada en *Thenus* spp. (<12 horas) (Jones, 2007), que a los 6-10 días observados en *Scyllarides latus* (Spanier y Lavalli, 2006). La presencia de estas masas de esperma externas y su rápida degradación también sugiere que la fecundación en *S. arctus* ocurre externamente, al igual que sucede en otras langostas (Paterson, 1969; MacDiarmid, 1988; MacDiarmid y Kittaka, 2000; Aiken *et al.*, 2004).

En los crustáceos, el momento de la liberación de las larvas está sometido a un control endógeno y generalmente se encuentra sincronizado con ciclos naturales como el ciclo lunar, las mareas y el ciclo de luz (Forward, 1987). Las hembras de *S. arctus* eclosionaron sus puestas durante la noche coincidiendo con condiciones de oscuridad. Este patrón coincide con las observaciones realizadas en langostas palinúridas, que también liberan sus larvas durante la noche o en los momentos previos al amanecer (MacDiarmid, 1985; Ziegler, 2007). No obstante, *S. arctus* eclosiona toda la puesta en una noche, en lugar de seguir la estrategia que muestran otras langostas, de repetir este proceso durante varios días hasta la eclosión total de la puesta (Ennis, 1973; Moller y Branford, 1979).

Los resultados obtenidos reflejan la existencia de una estrategia reproductiva en *S. arctus*, que se basa en la realización de varias puestas a lo largo del año, y que favorece la eclosión de las larvas en diferentes épocas, principalmente durante la invierno-primavera (Febrero-Marzo) y verano (Julio). Aunque no están claras las causas que llevan a *S. arctus* a adoptar esta estrategia reproductora, la alta variabilidad de las condiciones ambientales, tanto abióticas (corrientes, temperatura, fotoperiodo) como bióticas (disponibilidad de alimento), que dominan en la zona de estudio, pueden haber forzado la selección de este tipo de estrategia. Esta estrategia también es compartida con otros crustáceos decápodos presentes en la misma región como son *Maja brachydactyla* (González-Gurriarán, 1985), *Pisidia longicornis* (Sampedro *et al.*, 1997) y *Necora puber* (Gonzalez-Gurriarán *et al.*, 1998).

4.4.3. Duración del periodo de incubación

La temperatura es el principal factor que determina la duración y el éxito del desarrollo de los huevos en los decápodos marinos (Wear, 1974). La temperatura tuvo un efecto claro en la duración del periodo de incubación de los huevos en *S. arctus*, disminuyendo con el aumento de la temperatura. A diferencia de otros trabajos, en los que utilizan varias temperaturas fijas para evaluar el efecto de este parámetro sobre el periodo de incubación (Hamasaki, 2003; Sachlikidis *et al.*, 2010; Van den Brink *et al.*, 2011), este estudio permitió comprobar que con este objetivo, pueden utilizarse datos de duraciones de puestas sometidas a una variación natural de temperatura y obtener buenos ajustes.

Los resultados del ajuste de los cinco modelos propuestos mostraron pocas diferencias en los valores de AIC y BIC calculados, aunque la función de Réaumur resultó ser la que mejor ajustó los datos. Hamasaki (2003) obtuvo resultados similares cuando analizó que función era la más adecuada para estimar el momento de la eclosión de las larvas en *Scylla serrata*. El valor umbral de temperatura (α) estimado a partir de la función de Réaumur es de gran interés porque podría ayudar a definir la distribución geográfica potencial de esta especie, de acuerdo a un criterio de mínima temperatura necesaria para la viabilidad del desarrollo embrionario (Hamasaki, 2003), así como la realización de predicciones sobre los cambios que se puedan producir en sus distribución a consecuencia del cambio climático.

4.4.4. Número de puestas anual

En la zona de estudio, el rango de temperatura del agua a lo largo del año y la presencia de una suficiente cantidad de alimento en el ecosistema bentónico generada por los eventos de afloramiento (Tenore *et al.*, 1995) favorecen una reproducción continua en *S. arctus*. Estas características ambientales apoyan el resultado de la estima obtenida de 3.3 puestas anuales que puede llegar producir una hembra en el Atlántico NE. La realización de múltiples puestas también se ha observado en otros esciláridos como *T. orientalis* (Kagwade y Kabli, 1996), *Petrarctus rugosus* (Kumar *et al.*, 2009), *Ibacus chacei* e *Ibacus peronii* (Haddy *et al.*, 2005). Además, la capacidad de producir más de una puesta durante la época reproductiva anual es compartida con otros decápodos también presentes en el mismo hábitat como son *M. brachydactyla* (González-Gurriarán *et al.*, 1993) y *N. puber* (González-Gurriarán, 1985).

La simulación realizada para estimar la duración del periodo de incubación en el medio natural reveló que puede oscilar desde los 91 días en invierno hasta los 35 días en verano. Por otra parte, esta simulación muestra que el rango de duración del periodo de incubación puede variar considerablemente entre años debido a fluctuaciones en la oscilación anual de la temperatura del agua. Así, una disminución en la temperatura media anual podría dilatar los periodos de incubación y reducir el número de puestas anual que puede realizar una hembra, y lo contrario con un aumento de la temperatura. Además, estas variaciones pueden favorecer los acoplamientos o provocar desacoplamientos entre los eventos de eclosión de las puestas y la disponibilidad de alimento en la columna de agua, e influir en la tasa de supervivencia de las larvas (Calado y Leal, 2015). De esta forma, la temperatura no sólo resulta un factor determinante en la duración del periodo de incubación de las puestas, si no que puede ser un parámetro clave en la producción de puestas, y tener consecuencias directas en el éxito reproductivo anual en *S. arctus*.

La producción de puestas en *S. arctus* también puede presentar variaciones a lo largo de su distribución geográfica. Son varios los crustáceos decápodos que presentan variaciones en el número de puestas que producen, desde una a tres puestas anuales, a lo largo de su distribución latitudinal según un gradiente de temperatura (Fischer y Thatje, 2008; Verísimo, 2015). *S. arctus* no sólo presenta una gran variabilidad latitudinal en su distribución (11°N a 52°N), sino que se encuentra distribuido en dos regiones como el Atlántico y el Mediterráneo (Holt-

hais, 1991; Quigley *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012), con características muy diferentes, tanto de temperatura como de disponibilidad de alimento (Massutí *et al.*, 2004). Ambos factores también tienen un importante efecto sobre el crecimiento, y en consecuencia, sobre la inversión destinada a la reproducción (Kanciruk, 1980; Chittleborough, 1975, 1976). Por tanto, *S. arctus* podría presentar diferencias en el número y épocas de muda, como se ha comentado previamente, y generar diferencias espaciales en su estrategia reproductiva. De hecho, la presencia de dos eventos de puesta diferenciados en el Mediterráneo podría ser indicativa de la realización de dos puestas anuales y a la existencia de un importante periodo de muda entre ambos eventos.

Los resultados obtenidos sobre la capacidad reproductiva y la duración del periodo de incubación en *S. arctus* son importantes aspectos del ciclo vital que deben ser considerados para el desarrollo de estrategias adecuadas para la gestión de este recurso. Además de la importancia ecológica y pesquera, poder predecir la eclosión de los huevos a partir de la relación de la duración del periodo de incubación con la temperatura, también es de interés para el potencial cultivo de esta especie.

4.4.5. Talla de madurez sexual

Respecto a la madurez sexual, en este estudio las hembras de *S. arctus* mostraron cambios en la capacidad del abdomen respecto a los machos a partir de los 16.55 mm LC. Esta talla fue acorde con que todas las hembras capturadas presentasen pinzas en el 5º par de pereiópodos, indicando que este carácter debe aparecer en tallas inferiores a los 19.37 mm LC (talla mínima de las hembras muestreadas). También coincide con las observaciones realizadas por Vilotte (1982), en las que las hembras, de tallas comprendidas entre 8 y 18 mm de LC, todavía no habían desarrollado completamente este dácilo, encontrándose reducido a una pequeña protuberancia.

En base a caracteres macroscópicos del ovario, la madurez sexual de las hembras tiene lugar a una talla de 23.29 mm LC (LC50). Si se compara con la talla a la que aparecen cambios morfológicos, se puede concluir que los cambios alométricos del abdomen o el desarrollo del dácilo, no son buenos indicadores de la talla de madurez en *S. arctus*, dado que se producen a una talla muy inferior en comparación a la talla en que comienza la maduración de los ovarios. La madurez morfológica también se alcanza a tallas inferiores que la madurez fisiológica

en otros esciláridos, como en *Thenus* spp. (Jones, 2007), así como en palinúridos y homáridos (Aiken y Waddy, 1980).

Generalmente, la LC50 es utilizada como valor de referencia para establecer la talla mínima de captura de la especie (MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006). Sin embargo, la LC95 estimada (25.85 mm LC) es un valor más conservativo, dado que permite asegurar que el 95 % de las hembras capturadas son maduras sexualmente, y así proteger un mayor porcentaje del potencial reproductivo de la población. Además, este tamaño puede ser más adecuado como referencia, ya que está próximo a la talla estimada en la relación PG-LC (25.71 mm LC), que utiliza un criterio más preciso, como es el peso de las gónadas, en comparación a la utilización de caracteres macroscópicos como el porcentaje de ocupación, coloración, aspecto, etc. Por otra parte, el uso de la regresión segmentada también aporta una mayor robustez a las estimas, ya que evita la subjetividad en la elección de los puntos de corte y permite la comparación de los resultados con otros estudios (Goñi *et al.*, 2003; Queirós *et al.*, 2013).

En el Mediterráneo, Mura *et al.* (1984) estimaron que la madurez funcional, en base a la proporción de hembras ovadas, se alcanza en la clase de talla de 85-90 mm LT (~28-30 mm LC). Sin embargo, la utilización de este único criterio no permitió la determinación de la madurez funcional en este estudio, ya que hubo un importante número de hembras, probablemente maduras, que no pudieron ser clasificadas como maduras, al no presentar ninguna característica externa diferencial de madurez, y al escaso número de hembras de tallas pequeñas capturadas durante los meses con mayores proporciones de hembras ovadas. La aplicación de este único criterio también dificultó la estimación de la talla de madurez funcional en otros esciláridos (Kagwade y Kabli, 1996; DeMartini *et al.*, 2005). Además, su uso puede que no sea adecuado en especies con amplios periodos reproductivos, ya que puede provocar sobrestimaciones de la talla de madurez, dada la dificultad de distinguir externamente las hembras inmaduras de aquellas en proceso de maduración ovárica, y a que las hembras inmaduras más pequeñas pueden presentar una menor frecuencia de desove o desovar más tarde que las hembras más grandes durante el periodo reproductivo (MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006). La utilización de un segundo criterio, como es la presencia de sedas ovígeras en los endopoditos de los pleópodos, no fue posible debido a que las sedas ovígeras estuvieron presentes en todas las hembras muestreadas, señalando que esta característica aparece antes de alcanzar la madurez fisiológica. La presencia de sedas ovígeras tampoco fue utilizada como criterio de madurez en el

escilárido *Thenus orientalis*, ya que estas sedas también estuvieron presentes en los ejemplares inmaduros (Kagwade y Kabli, 1996). En algunos esciláridos, el análisis del crecimiento alométrico en los exopoditos de los pleópodos si ha permitido la estimación de la talla de madurez funcional (Stewart *et al.*, 1997; DeMartini *et al.*, 2005), por lo que debería ser considerado en futuras investigaciones.

Según la información obtenida en este estudio, los machos alcanzan la madurez sexual fisiológica a los 25.8 mm LC, un valor similar al estimado en las hembras. No hay muchos estudios realizados sobre la madurez sexual de los machos en la familia Scyllaridae. Stewart *et al.* (1997) utilizó las características macroscópicas de los conductos deferentes (tamaño, forma y color) y la presencia de espermatozoides maduros como criterios para estimar la madurez sexual en *Ibacus* spp.. En *S. arctus*, la presencia de espermatóforos con espermatozoides en los machos más pequeños (<24 mm LC), no permitió utilizar este criterio para determinar la madurez sexual. Por otra parte, la presencia de espermatozoides en los conductos deferentes no se considera un buen indicador de la madurez funcional, ya que su sola presencia no permite determinar si las langostas son capaces de copular, dado que podría existir también algún tipo de limitación morfológica o fisiológica (MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006). En otras langostas, para estimar la talla de madurez en los machos se han utilizado caracteres morfométricos externos, generalmente asociados a comportamientos de cortejo y al proceso de cópula (Lizarraga-cubedo *et al.*, 2003), pero en nuestro caso como en otros esciláridos, no se ha encontrado ningún indicador externo de madurez sexual, probablemente porque poseen procesos de cortejo y cópula más sencillos (Jones, 2007; Radhakrishnan *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2014).

En general, aunque existen regulaciones pesqueras para *S. arctus* a nivel regional, estas son heterogéneas y no están basadas en criterios biológicos (ver Capítulo 1). Desde el punto de vista de la gestión, la información obtenida sobre la biología reproductiva de *S. arctus* es útil para contrastar las medidas que regulan su explotación en la región de estudio, Galicia. La actual talla mínima de captura de *S. arctus* está establecida en 90 mm LT (30 mm LC; orden 15/11/1992, DOGA), una talla que está por encima de la talla de madurez sexual estimada en este estudio, tanto en las hembras (LC95=25.9 mm) como en los machos (25.7 mm LC), por lo que evita que sean pescados los ejemplares inmaduros. No obstante, para poder optimizar esta talla mínima de captura, debería utilizarse un criterio como el potencial reproductivo relativo, que utiliza además de la talla de madurez sexual, la estructura de tallas y la relación talla-fecundidad de la especie, y que permite

determinar que clases de talla contribuyen en mayor medida a la producción de huevos en la población y, por tanto, estimar que porcentaje de la producción de huevos de la población se está protegiendo (Tully *et al.*, 2001; Goñi *et al.*, 2003). En cuanto a la época de veda, el periodo establecido, desde Enero a Septiembre (orden 22/12/2014, DOGA), es bastante amplio (9 meses), y protege prácticamente todo el ciclo de cría de *S. arctus*. Otra medida como la protección de hembras ovadas es más controvertida y debe ser investigada, porque puede tener efectos negativos sobre la estructura y el potencial reproductivo de las poblaciones (Capítulo 3), dada las elevadas proporciones de hembras ovadas (>50%) durante el amplio periodo de cría (Febrero a Agosto). No obstante, dado que no existe una pesquería dirigida a *S. arctus* y no existe información precisa sobre sus capturas, es difícil evaluar el efecto de estas medidas en sus poblaciones.

Por otra parte, las diferencias geográficas que presenta *S. arctus* en su reproducción, la elevada duración de su fase larvaria (Pessani y Mura, 2007) y la conectividad existente entre sus poblaciones (Faria, 2012), ponen de relieve la importancia del establecimiento de regulaciones a distintas escalas espaciales. En este sentido, medidas de gestión como las áreas marinas protegidas, pueden jugar un papel muy importante para la conservación y sostenibilidad de las poblaciones de esta especie. De hecho, se están obteniendo resultados positivos con áreas marinas destinadas a la protección de langostas como *Palinurus elephas* (Díaz *et al.*, 2011) o *Homarus gammarus* (Moland *et al.*, 2013). En cualquier caso, ésta y otras medidas de gestión deben ir acompañadas además, de mejoras en la colaboración con el sector pesquero para obtener información más precisa sobre el estado del recurso (Kay *et al.*, 2012).

Desarrollo embrionario de *Scyllarus arctus*

5.1. Introducción

Para completar la secuencia reproductiva en *Scyllarus arctus*, y así contribuir a resolver algunas lagunas en el conocimiento en la reproducción de la familia Scyllaridae, se llevó a cabo el estudio del desarrollo embrionario. La embriogénesis es la fase inicial del ciclo de vida y por lo tanto, las pequeñas variaciones que pueda sufrir durante su desarrollo, pueden trasladarse a otras fases de vida (Giménez, 2006). De ahí, la importancia de conocer en detalle los cambios que se producen en los huevos, desde que se produce el desove hasta su eclosión.

Además de determinar los cambios morfológicos y biométricos que sufre el embrión desde el desove hasta su eclosión, conocer cuales son los principales recursos energéticos y estructurales de los que dispone, y como son utilizados durante el desarrollo embrionario, es primordial para una mejora del conocimiento de la etapa temprana del ciclo de vida. En comparación a la extensa literatura de la que se dispone sobre el desarrollo embrionario en crustáceos marinos, apenas se han desarrollado estudios en especies de la familia Scyllaridae, y menos, desde un punto de vista bioquímico. De hecho, la composición proximal, la composición de ácidos grasos y el contenido energético durante la fase embrionaria ha sido estudiada en una gran cantidad de crustáceos pelágicos y bentónicos, de aguas someras a grandes profundidades, desde los trópicos hasta las regiones polares (Biesiot y Perry, 1995; Wehrtmann y Graeve, 1998; Graeve y Wehrtmann, 2003; Rosa *et al.*, 2003; Brillon *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2005; Figueiredo y Narciso, 2008).

Los huevos de crustáceos están compuestos principalmente por agua (55-65 %), proteínas (15-25 %), lípidos (20-30 %), sales (2-5 %) y en menor medida de carbohidratos (3 %) (Pandian, 1994). Estos componentes van a ser utilizados con diferentes fines durante el desarrollo embrionario de los huevos. Las proteínas van a jugar un papel muy importante en la morfogénesis y en la provisión de energía durante la embriogénesis (Holland, 1978). Los lípidos constituyen uno de los principales recursos energéticos del embrión, contribuyendo en al menos el 60 % del gasto energético durante la embriogénesis (Holland, 1978; Wehrtmann y Graeve, 1998). Dentro de los lípidos, encontramos los ácidos grasos, que son fundamentales en el desarrollo embrionario. Entre estos destacan los ácidos grasos poliinsaturados, tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), que juegan un papel importante en el desarrollo neuronal y en el mantenimiento de la flexibilidad de las membranas celulares (Bell y Dick, 1990; Brett y Müller-Navarra, 1997; Sargent *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2002). Además, estos ácidos grasos poliinsaturados son considerados esenciales porque los crustáceos no pueden sintetizarlos *de novo*, o no lo hacen en cantidad suficiente (Anger, 2001), por lo que su contenido en los huevos va a depender del alimento asimilado por las hembras y la cantidad transferida a los huevos durante la ovogénesis. De esta forma el contenido de ácidos grasos poliinsaturados se convierte en una pieza clave para el éxito del desarrollo embrionario.

Por otro lado, como en la mayor parte de los crustáceos las larvas eclosionan con una poca o ninguna reserva de vitelo, las larvas recién eclosionadas van a presentar una elevada demanda energética y ser dependientes del alimento disponible para crecer y alcanzar la metamorfosis (McConaughy, 1985). De esta manera, la composición bioquímica de los embriones previa a la eclosión puede aportar los primeros indicios para definir los requerimientos nutricionales esenciales y su adecuada proporción en la dieta para un futuro desarrollo del cultivo larvario en laboratorio. Reducir la elevada mortalidad larvaria en langostas es un importante reto para su potencial cultivo (Nelson *et al.*, 2006), por lo que cualquier avance que se haga para aumentar el conocimiento de la historia de vida temprana y la dinámica energética de los embriones puede favorecer el éxito en el cultivo larvario.

El primer objetivo de este estudio es describir el desarrollo embrionario de *S. arctus* desde el desove hasta la eclosión de los huevos desde un punto de vista biométrico, morfológico y bioquímico. Un segundo objetivo es relacionar los cambios bioquímicos que se producen en los huevos con la morfogénesis y los

cambios biométricos que tienen lugar durante la embriogénesis. Los datos obtenidos aportarán una valiosa información para mejorar la comprensión de la composición bioquímica de los embriones de las langostas esciláridas y del primer estadio larvario.

5.2. Metodología

5.2.1. Diseño experimental y toma de muestras

Con el fin de describir el desarrollo embrionario de las puestas de huevos desde el punto de vista biométrico, morfológico y bioquímico, se utilizaron un total de 50 hembras y 50 machos de *S. arctus* capturados desde Julio a Agosto de 2010. Los ejemplares capturados fueron aclimatados y mantenidos en cautividad en las instalaciones del Aquarium Finisterrae de A Coruña hasta la finalización de la experiencia en Septiembre de 2011. Para el experimento, los ejemplares capturados fueron marcados y estabulados en 5 tanques de 60 L a una proporción 1:1 de machos y hembras. El rango de tallas de las hembras utilizadas fue 30.5-40.6 mm CL, mientras que el rango de los machos fue 31.2-39.5 mm CL. Los individuos de *S. arctus* fueron examinados con una periodicidad diaria para determinar los desoves. Tras el desove, las hembras ovadas fueron aisladas en tanques individuales (10 L) para el seguimiento del desarrollo embrionario y la recogida de muestras de huevos. Inmediatamente, tras la eclosión de las puestas, las hembras fueron reubicadas de nuevo con los machos.

Durante todo el experimento se mantuvieron en los tanques de cultivo unas condiciones ambientales similares a las del medio natural, tanto de temperatura del agua como de fotoperíodo. El agua de mar utilizada, procedente de una captación exterior situada a 25 m de la costa y 16 m de profundidad, fue filtrada hasta 1 μm . El caudal de renovación de los tanques de cultivo se mantuvo entorno a los 4 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Durante los desarrollos embrionarios analizados, la temperatura del agua osciló entre los 13.7°C y 16.9°C ($15.3 \pm 1.0^\circ\text{C}$, $M \pm ET$). La alimentación, basada principalmente en mejillones frescos (*Mytilus* spp.), fue administrada *ad libitum*. En general, todos los ejemplares capturados se adaptaron bien a las condiciones de cultivo y sobrevivieron sin problemas a la amplia duración de la experiencia.

Para el estudio biométrico y morfológico de los embriones se monitorizaron un total de 10 puestas de huevos durante el periodo de incubación. Las puestas

fueron realizadas en un corto espacio de tiempo, desde el 13/03/11 al 31/03/11. Cada puesta fue muestreada desde el desove hasta la eclosión de los huevos con una periodicidad diaria. En cada muestreo se recogió una muestra de 50-100 huevos para el análisis biométrico de los huevos y el examen morfológico de los embriones.

Para el estudio de la composición bioquímica de los huevos se utilizaron un total de 35 puestas de huevos diferentes. Las puestas utilizadas fueron realizadas durante el periodo comprendido desde el 15/03/11 al 6/05/11. Cada puesta fue muestreada desde el desove hasta la eclosión de los huevos con una periodicidad de 6 días. En cada muestreo se recogieron dos muestras, una primera muestra de 0.5 g de peso húmedo destinada al análisis bioquímico y una muestra de 50-100 huevos para la realización de mediciones de las variables biométricas del huevo y el examen morfológico de los embriones.

5.2.2. Análisis bioquímicos

Las muestras para los análisis bioquímicos fueron congeladas a -32°C , y posteriormente liofilizadas y pesadas para obtener el peso seco. Para cada muestra se determinó el contenido en agua, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y de carbono elemental. El contenido energético de los embriones fue estimado a partir de dos aproximaciones, la primera a partir del contenido en carbono elemental (E [C]) (Salonen *et al.*, 1976), y la segunda mediante la composición bioquímica (E [B]), utilizando el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos (Winberg, 1971). Todos los análisis fueron realizados según los protocolos descritos en la Metodología general (Capítulo 2). La composición los huevos se indica por mg de peso seco (PS), a excepción del contenido en agua que se indica como % del peso húmedo (PH).

Se calcularon las ratios entre los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y el contenido de proteínas porque son consideradas indicadores de la condición fisiológica del organismo a nivel celular (Mathers *et al.*, 1994; Christensen y Korsgaard, 1999). La ratio ARN:ADN es considerada un índice de la cantidad de ARN por célula, la ratio ARN:Proteínas de la capacidad de síntesis celular y la ratio Proteínas:ADN del tamaño celular.

5.2.3. Examen y medición de los huevos

El examen de los embriones y la realización de los análisis morfométricos se realizaron a partir de imágenes tomadas de las muestras de embriones *in vivo*. Para la realización de las mediciones, los huevos fueron fotografiados en un microscopio estéreo Nikon SMZ, mientras que para el examen los huevos se utilizó un microscopio óptico Nikon E400. Para la captura y el análisis de las imágenes se les acopló una cámara digital Nikon DS-Fi2 y se utilizó el software NIS elements BR de Nikon. Los análisis morfométricos (diámetro mayor y menor del huevo, área ocupada por el vitelo) se realizaron a partir de una vista sagital de 30 huevos. El volumen del huevo (V) se obtuvo con la fórmula del volumen del elipsoide oblató, $V = \pi \cdot d_1^2 \cdot d_2 / 6$, donde d_1 es el diámetro medio menor y d_2 es el mayor (Turner y Lawrence, 1979).

5.2.4. Análisis de datos

Estudio biométrico de los huevos durante el desarrollo embrionario

Para el estudio biométrico se ajustaron varios modelos a las medidas realizadas de los embriones muestreados diariamente de las puestas monitorizadas (Tabla 5.1). El objetivo fue poder cuantificar los cambios que se producen en el embrión durante su desarrollo. Las variables utilizadas fueron: el área de la pigmentación ocular, el área de ocupación del vitelo y el volumen de los huevos.

Un examen preliminar permitió seleccionar varios modelos para el ajuste de las variables, con el criterio de capturar la esencia de los datos durante el desarrollo embrionario y la importancia biológica de los parámetros estimados. Para la determinación del porcentaje de desarrollo (t) se tomó como referencia el día de desove de los huevos (0%) y el día de eclosión de los huevos, como el final de la fase embrionaria (100%); a excepción del modelo de consumo de vitelo, en la que se invirtió para ajustar la función.

Para marcar los cambios en el volumen del huevo durante el desarrollo se utilizó el modelo logístico de 4 parámetros. Este modelo permite relacionar el volumen del huevo con el porcentaje de desarrollo (t) mediante una función sigmoideal. El parámetro c indica el volumen que alcanzará el huevo cuando $t \rightarrow \infty$, d indica el volumen inicial del huevo cuando $t \rightarrow -\infty$, e indica el punto de inflexión en el aumento de volumen del huevo y f es un valor de escala entre el tiempo de desarrollo y el volumen. Cuando $t = e + f$, los huevos habrán alcanzado apro-

ximadamente un 75 % del volumen final (Pinheiro y Bates, 2000).

El consumo de vitelo fue ajustado al modelo de Michaelis-Menten, una función utilizada en cinética enzimática para la medición de la velocidad de reacción. Se ha modificado para permitir un desplazamiento de la función, sumando el parámetro c , para representar la cantidad de vitelo que permanece en el embrión en la eclosión. El valor obtenido tras sustraer el parámetro e al 100 %, indica el porcentaje de desarrollo al que se ha consumido el 50 % del vitelo, mientras que el parámetro d es la cantidad inicial de vitelo en el embrión.

El crecimiento del ojo en el embrión durante el desarrollo fue ajustado mediante un modelo logístico de 3 parámetros. El parámetro e indica el punto de inflexión en el que se alcanza la mitad del tamaño del ojo que alcanzará al final del desarrollo ($e/2$). El parámetro d es un factor de escala que nos indica la distancia desde e hasta el momento del desarrollo ($e+1/d$), en el que el tamaño del ojo es aproximadamente $0.73 \cdot c$ (Pinheiro y Bates, 2000).

Además, se calcularon las tasa absolutas de incremento de volumen del huevo (AIR), de consumo de vitelo en el embrión (ACR) y del crecimiento del ojo respecto al porcentaje de desarrollo (EGR), a partir de la derivada del modelo propuesto para cada variable (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Modelos ajustados a las biometrías del embrión, área del vitelo (Y), área del ojo (EA) y volumen del embrión (V) durante el desarrollo embrionario. Las tasas absolutas de incremento de volumen del huevo (AIR), de consumo de vitelo (ACR) y del crecimiento del ojo respecto al porcentaje de desarrollo (EGR) fueron obtenidos a partir de la derivada del modelo utilizado

Modelo	Ecuación	Tasa absoluta	Fuente
Michaelis-Menten	$Y(t) = c + \frac{d - c}{1 + \frac{e}{t}}$	$ACR(t) = \frac{e \cdot (d - c)}{(t + e)^2}$	Michaelis y Menten (1913)
Logístico 3-parám.	$EA(t) = \frac{c}{1 + e^{d \cdot (e-t)}}$	$EGR(t) = \frac{c \cdot d \cdot e^{d \cdot (e-t)}}{(e^{d \cdot (e-t)} + 1)^2}$	Verhulst (1838)
Logístico 4-parám.	$V(t) = c + \frac{d - c}{1 + e^{\left(\frac{e-t}{f}\right)}}$	$AIR(t) = \frac{(d - c) \cdot e^{\left(\frac{e-t}{f}\right)}}{f \cdot (1 + e^{\left(\frac{e-t}{f}\right)})^2}$	Nelder (1961)

Los ajustes de los modelos biométricos fueron realizados mediante mínimos cuadrados no lineales generalizados mediante la función *gnls* del paquete estadístico *nlme* de R (Pinheiro y Bates, 2000). En cada caso particular, para corregir la heterodasticidad de los residuos fueron utilizadas las funciones de varianza identidad (*varIdent*) o potencial (*varPower*).

Las diferencias entre el volumen del huevo inicial de los huevos en el desove

entre puestas fueron evaluadas con un ANOVA. Para determinar si existe una relación entre el volumen de los huevos inicial y al final del desarrollo, y la talla de los ejemplares de *S. arctus* se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Identificación de fases de desarrollo durante la embriogénesis

Para el establecimiento de los etapas o periodos durante el desarrollo embrionario, se describió la aparición y sucesión de rasgos morfológicos (apéndices, lóbulos oculares, cromatóforos, pigmentación ocular, etc.) y la coloración o el patrón cromático (de acuerdo a la Guía de Color RAL®) presentes en cada muestra diaria de huevos a lo largo de la embriogénesis, según el porcentaje de desarrollo. Además se determinó el momento del comienzo de latido del corazón y de los movimientos del embrión. El porcentaje de desarrollo de los huevos en cada día de recogida de muestra fue estimado tomando como 0% el día de desove de los huevos y como 100% el día de eclosión de los huevos.

Composición bioquímica y biométrica de los huevos durante el desarrollo embrionario

Las muestras de huevos destinadas al análisis bioquímico fueron agrupadas conforme a los periodos de desarrollo embrionario identificados previamente. Para confirmar una buena asignación de cada muestra a su correspondiente periodo, se calculó el porcentaje de desarrollo embrionario de cada muestra. Para determinar el porcentaje de desarrollo se estimó la duración de un periodo de incubación completo (días) con el modelo de Réaumur de duración del periodo de incubación (Capítulo 4) y utilizando como valor de temperatura, la temperatura media diaria desde el desove. Una vez conocida la duración total del periodo de incubación se calculó el porcentaje de desarrollo correspondiente a cada muestra a partir del número de días transcurridos desde el desove.

La variación de las características de los huevos morfométricas y bioquímicas entre periodos de desarrollo embrionario fueron evaluadas con un ANOVA de una vía, con el periodo de desarrollo como factor fijo. Cuando se encontraron diferencias fueron analizadas mediante una prueba de comparación múltiple (Prueba de Tukey). La normalidad y homogeneidad de varianza de los residuos de los análisis realizados fueron evaluados mediante la prueba de Shapiro ($P > 0.05$) y la prueba de Bartlett ($P > 0.05$). Cuando los residuos de los análisis no cumplieron

los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó una transformación de Box-Cox a los datos (Venables y Ripley, 2002).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95 % ($P < 0.05$).

5.3. Resultados

5.3.1. Caracterización biométrica

El modelo logístico de cuatro parámetros presentó un buen ajuste ($R^2=0.89$) a la trayectoria del volumen del huevo durante el periodo de incubación (Tabla 5.2). Podemos decir así, que el crecimiento del embrión sigue un patrón sigmoide de 3 fases (Fig. 5.1a). Una fase inicial, en la que el huevos en el desove ($482 \pm 13 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$, $c \pm \text{ET}$) hasta el 50 % del desarrollo incrementan ligeramente su volumen (incremento medio $< 11\%$). A continuación, una fase de rápido aumento del volumen del huevo que dura hasta alcanzar un valor máximo de AIR al 80 % del desarrollo ($11.7 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3 \text{des}^{-1}$, Fig. 5.1b). A partir de esta máxima AGR tiene lugar una tercera fase, en la que el crecimiento del embrión se ralentiza hasta alcanzar un volumen final antes de la eclosión de $1038 \pm 47 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$.

Tabla 5.2. Parámetros estimados de los modelos ajustados a las características biométricas del embrión: área del vitelo (Y), área del ojo (EA) y volumen del embrión (V) durante el desarrollo embrionario (valor estimado y ET) y la proporción de varianza explicada de cada modelo (R^2)

Modelo	Biometría	Parámetros								R^2
		c		d		e		f		
<i>Michaelis-Menten</i>	Y	6176.57	2798.86	187310.48	3816.21	21.32	2.12	-	-	0.94
<i>Logístico 3-parám.</i>	EA	10870.93	440.79	0.11	0.01	83.90	0.57	-	-	0.95
<i>Logístico 4-parám.</i>	V	481.88	13.20	1037.84	47.06	80.31	1.45	11.87	0.45	0.89

El volumen inicial medio de los huevos fue significativamente diferente entre los desoves de las diez hembras monitorizadas (ANOVA, $gl=8$, $F=13.08$, $P < 0.001$). El volumen medio al inicio estuvo correlacionado con el volumen medio alcanzado al final de la fase embrionaria en cada puesta (Coeficiente de correlación de Pearson: 0.83, $P < 0.01$) y no mostró ninguna relación con el tamaño de los individuos (Coeficiente de correlación de Pearson: -0.06, $P=0.86$).

El modelo de Michaelis-Menten también permitió un buen ajuste de los datos del área de ocupación del vitelo a lo largo del desarrollo ($R^2=0.94$; Tabla 5.2). El consumo de vitelo por parte del embrión fue moderado en la mayor parte del

desarrollo ($ACR < 2.1 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2 \text{des}^{-1}$), hasta consumir la mitad del vitelo disponible al 79% del desarrollo (Fig. 5.1c). A partir de este instante, las necesidades energéticas del embrión fueron en aumento y se produjo un rápido consumo del vitelo (Fig. 5.1d). Los huevos eclosionaron con un remanente de vitelo estimado en $6.18 \pm 2.80 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ ($c \pm ET$), del que pueden alimentarse las larvas durante sus primeras horas de vida planctónica.

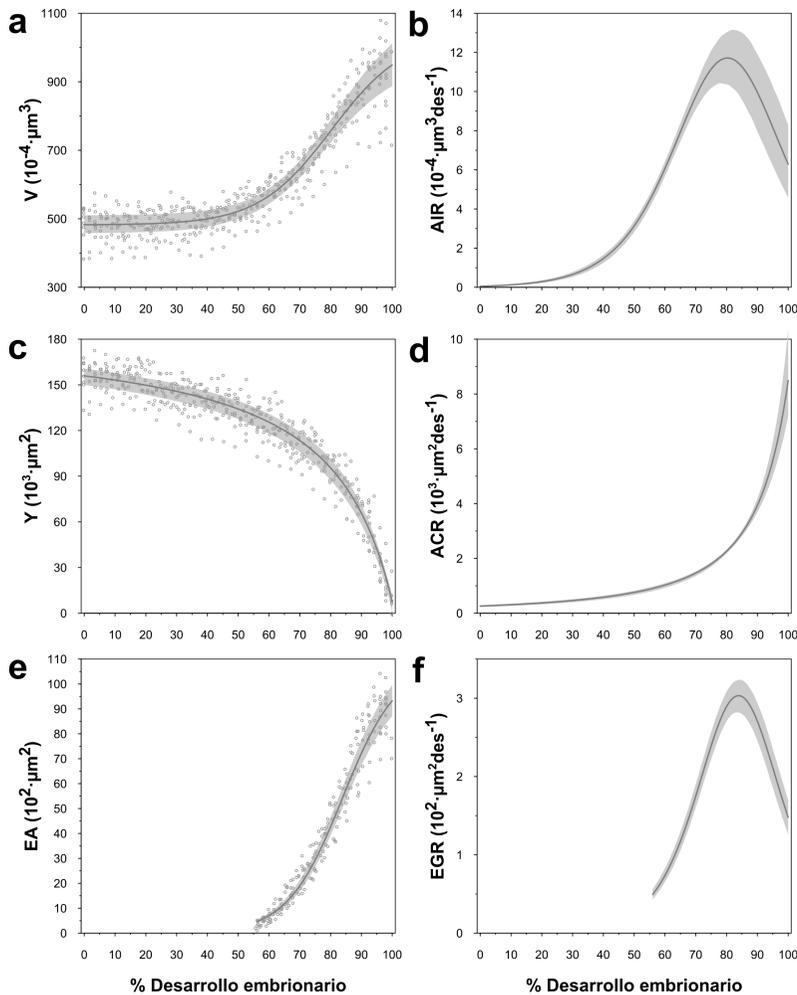


Fig. 5.1. Modelos ajustados a las variables biométricas de los huevos respecto al porcentaje de desarrollo embrionario transcurrido. **a** Modelo logístico ajustado al volumen del huevo (V) y **b** tasa absoluta de incremento del volumen (AIR). **c** Modelo de Michaelis-Menten ajustado al área ocupada por el vitelo (Y) y **d** tasa absoluta de consumo de vitelo (ACR). **e** Modelo logístico de 3 parámetros ajustado al área del ojo (EA) y **f** tasa absoluta de crecimiento del ojo (EGR). Las líneas oscuras indican los valores predichos por el modelo y el área sombreada el intervalo de confianza al 95%.

El modelo logístico de tres parámetros presentó un buen ajuste al aumento de la pigmentación ocular en el embrión durante la embriogénesis ($R^2 = 0.95$; Tabla 5.2). La pigmentación ocular comienza a observarse a partir del $56 \pm 1\%$ ($M \pm DT$) del desarrollo (Fig. 5.1e). Esta mancha ocular aumenta de tamaño exponencialmente, alcanzando la mitad de su tamaño y el mayor crecimiento al $84 \pm 1\%$ ($e \pm ET$) del desarrollo. A continuación tiene lugar una disminución de la tasa de crecimiento del ojo (Fig. 5.1f). El volumen inicial de los huevos mostró una correlación positiva con el área del ojo a final del desarrollo (Coeficiente de correlación de Pearson: 0.50, $P < 0.01$). Sin embargo, no hubo ninguna relación entre el área del ojo y el volumen final de los huevos (Coeficiente de correlación de Pearson: 0.29, $P = 0.41$).

5.3.2. Caracterización morfológica

Las hembras, tras la cópula con los machos, realizan la ovoposición de los ovocitos, que son fecundados externamente con las masas de espermátóforos (de aspecto gelatinoso y color blanquecino) que los machos depositan desde la coxa del quinto par de pereiópodos hasta el ápice del segundo segmento abdominal (Fig. 5.2a). Los huevos, una vez fecundados, son adheridos con las quelas del 5° par de pereiópodos a las sedas de cada uno de los endopoditos de los pleópodos, formando mediante la unión de los funículos agrupaciones en forma de racimos (Fig. 5.2b).

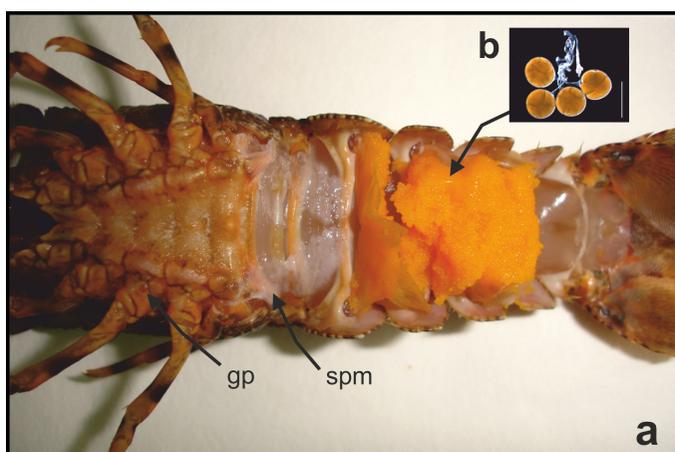
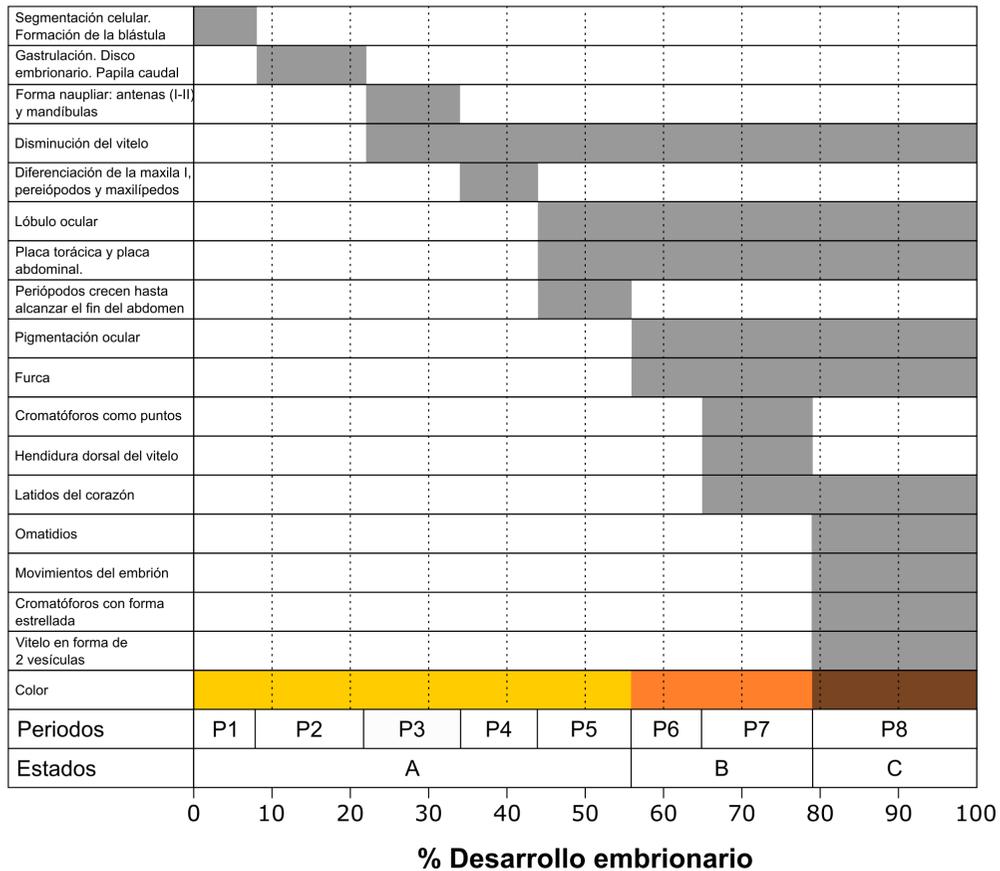


Fig. 5.2. Huevos recién fecundados en una hembra de *S. arctus*. **a** Restos esperma (spm) del macho. Gonoporo (gp) en la base del tercer pereiópodo. **b** Huevos dispuestos en racimos y unidos mediante los funículos. La barra representa 500 μm

A partir de las características morfológicas observadas durante el desarrollo embrionario se establecieron 8 periodos (Tabla 5.3):

Tabla 5.3. Descripción de la embriogénesis de *S. arctus* en base al estado, periodo y porcentaje de desarrollo en *S. arctus*.



Periodo 1: Primeras divisiones y formación de la blástula

Este periodo comienza inmediatamente después de la fecundación. Los ovocitos fecundados son macrolecíticos-centrolecíticos y tienen una forma elíptica. Se encuentran rellenos con una uniforme masa de vitelo de color naranja amarillento de aspecto granuloso (RAL® 1028). La membrana del huevo está formada por una cubierta compuesta por dos capas adheridas mutuamente entre sí, un endocorion embrionario y un exocorion materno transparente (Fig 5.3b). A las 24

horas, puede observarse como tienen lugar los primeros eventos mitóticos en el centro del huevo, con la aparición de varios núcleos como puntos oscuros (Fig 5.3a). A partir de la aparición de 2-4 núcleos, se hace visible en la superficie del huevo una división superficial y aparecen los primeros blastómeros (Fig 5.3b). Las sucesivas divisiones dan lugar a un estado de 4, 8, 16 células y así sucesivamente, hasta la formación de la blástula (Fig 5.3b-e). El blastodermo presentó una composición irregular, formado por células con un tamaño heterogéneo, en el que cada célula se encuentra rodeada por seis células vecinas. Al final de este periodo, puede distinguirse el blastoporo como una pequeña depresión.

Periodo 2: Formación del disco germinal y la formación de la papila caudal

Este periodo comienza a partir del $8.3 \pm 1.8\%$ (M \pm DT) del desarrollo del huevo, con la gastrulación. La formación del disco germinal se localiza junto al blastoporo, y adyacente a éste, aparece el esbozo de la papila caudal como una agrupación de células transparentes (Fig. 5.4a-b).

Periodo 3: Desarrollo de los apéndices naupliares

Este periodo se caracteriza por la diferenciación de la forma naupliar (inicio: $21.7 \pm 0.8\%$). Los esbozos de los primeros apéndices aparecen en una posición anterior a la papila caudal. Éstos se corresponden con las primeras antenas, segundas antenas y mandíbulas (Fig. 5.4c). El labrum se visualiza como una pequeña cresta entre las antenas II. En este periodo comienza a observarse una disminución del área ocupada por el vitelo (Fig. 5.4d).

Periodo 4: Diferenciación de los pereiópodos

Al comienzo de este periodo ($34.1 \pm 2.2\%$) puede distinguirse la maxila I, entre las mandíbulas y la papila caudal (Fig. 5.5a-b). Durante esta etapa, la papila caudal aumenta su longitud, adoptando una forma bilobulada y comienzan a diferenciarse las extremidades de los pereiópodos, que sobresalen lateralmente desde la papila caudal como yemas redondas. Al final de este periodo se distingue la maxila II y los maxilípedos II y III en la parte anterior de la placa torácico-abdominal (Fig. 5.5b).

Periodo 5: Diferenciación de la placa torácica y abdominal. Ojo naupliar

En el 44.2 ± 1.5 % del desarrollo comienza a distinguirse el lóbulo ocular como una forma elíptica aplanada sobre la antena II, que aparece bilobulada en su parte anterior (Fig. 5.5c-d). Durante esta etapa, la placa abdominal aumenta en longitud y se diferencia de la placa torácica y presenta una segmentación superficial. Los pereiópodos se alargan, curvándose durante su crecimiento, hasta alcanzar el final del abdomen. Además, comienzan a desarrollarse los exopodios de los pereiópodos (Fig. 5.5c). Externamente comienza a apreciarse un aumento del volumen del huevo. Entre la base de las antenas puede observarse una mancha triangular, el ojo naupliar.

Periodo 6: Pigmentación del ojo

Este periodo se caracteriza por la aparición de la primera pigmentación de las células retinulares (inicio: 55.9 ± 0.9 %). Inicialmente, esta mancha ocular adquiere la forma de una fina banda curvada en la parte posterior del ojo (Fig. 5.6a). Los pereiópodos continúan su desarrollo hasta alcanzar la base del lóbulo ocular. La región abdominal es rudimentaria, aunque se diferencia la furca como dos protuberancias redondeadas con un desarrollo espiniforme (Fig. 5.6b). Durante este periodo los huevos comienzan a adquirir una coloración naranja fuerte (RAL® 2000).

Periodo 7: Cromatóforos

El ojo presenta forma de media luna y comienzan a distinguirse cromatóforos como pequeños puntos de pigmentación rojiza (inicio: 65.9 ± 2.0 %, Fig. 5.6c). Estos cromatóforos se sitúan en la base de los pereiópodos y van apareciendo en zonas más distales según avanza el desarrollo. Durante este estado se puede observar el inicio de la segmentación en los pereiópodos. Dorsalmente, comienza a observarse como el vitelo presenta una hendidura longitudinal, diferenciándose en dos lóbulos (Fig. 5.6d). El corazón se hace visible como una vejiga transparente y presenta pulsaciones lentas e irregulares.

Periodo 8: Omatidios

Se inicia este periodo en el $78.6 \pm 2.8\%$ del desarrollo. Los huevos adquieren una coloración marrón (RAL® 8001). El ojo presenta una pigmentación más intensa y adquiere una forma de ovalo. En la superficie del globo ocular se distinguen las facetas hexagonales típicas de los omatidios (Fig. 5.7a). Los cromatóforos presentes en la parte distal de los pereiópodos presentan un mayor tamaño y una forma estrellada, mientras que los que están en la zona proximal son más pequeños y esféricos (Fig. 5.7b). El latido del corazón es ahora fuerte y regular. Durante este periodo comienzan a producirse contracciones musculares esporádicas en el embrión, que se transforman en movimientos frecuentes en los momentos previos a la eclosión. Al final de este periodo, permanece una pequeña cantidad de vitelo en dos pequeñas vesículas en disposición ventral (Fig. 5.7b), que representan las reservas energéticas de la prelarva durante la eclosión y en los momentos de la primera etapa de desarrollo larvario inicial. En la eclosión, la larva recién eclosionada presenta una forma curvada y una envoltura transparente, que se rompe en cuanto la larva comienza a agitar sus apéndices y adquirir la forma característica de filosoma de esciláridos.

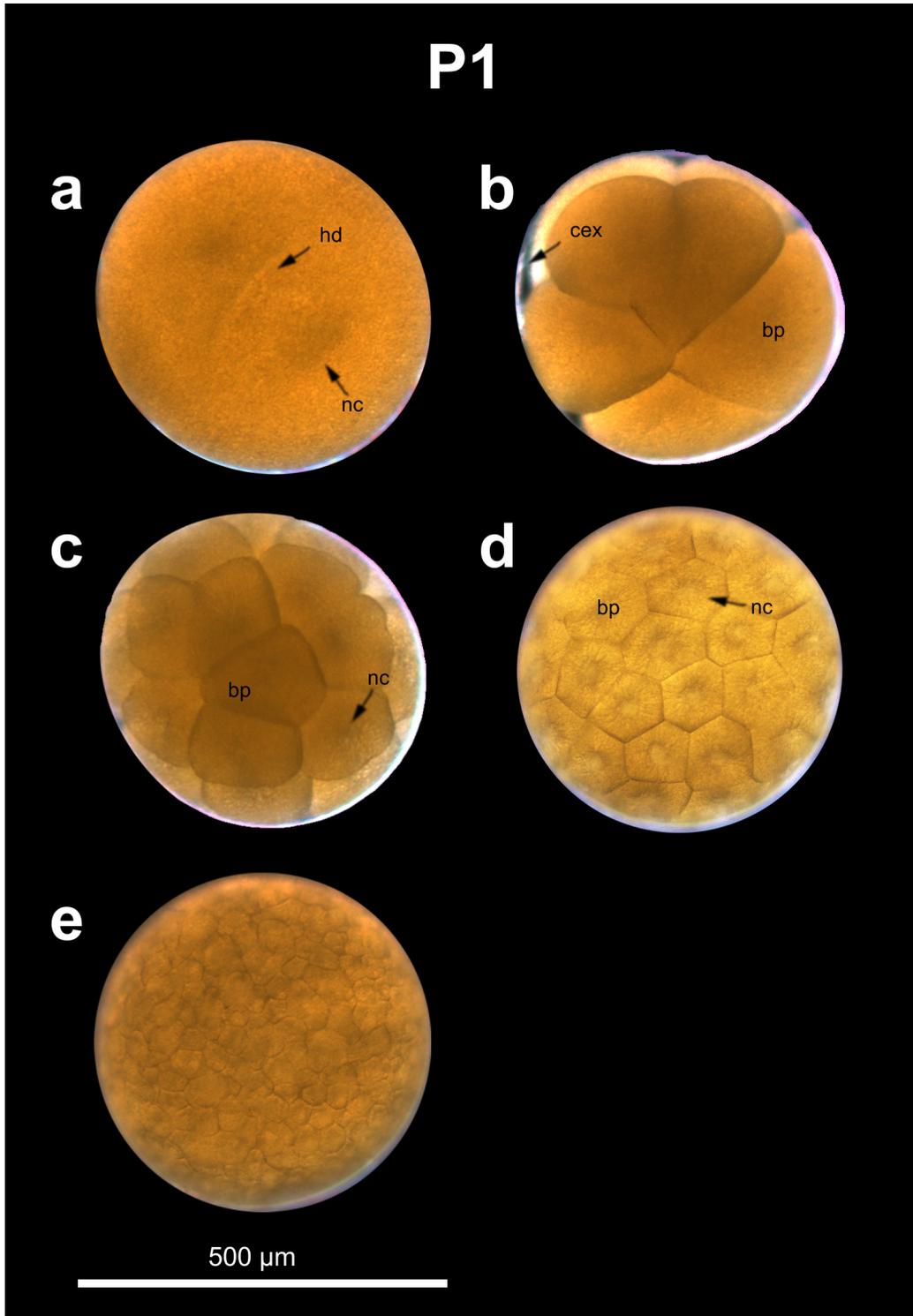


Fig. 5.3. Periodo 1 del desarrollo embrionario de *S. arctus* (P1). **a** Primera división mitótica, se diferencian dos núcleos y una hendidura superficial. **b** Embrión durante división en estado de 8 células (blastómeros). Puede distinguirse el exocorion transparente **c-d** Divisiones sucesivas en el embrión dando lugar a 16 y 32 células. **e** Estado de blástula, con un blastodermo compuesto por células irregulares. Abreviaturas: blastómeros (bp), exocorion transparente (cex), hendidura superficial (hd), núcleos (nc)

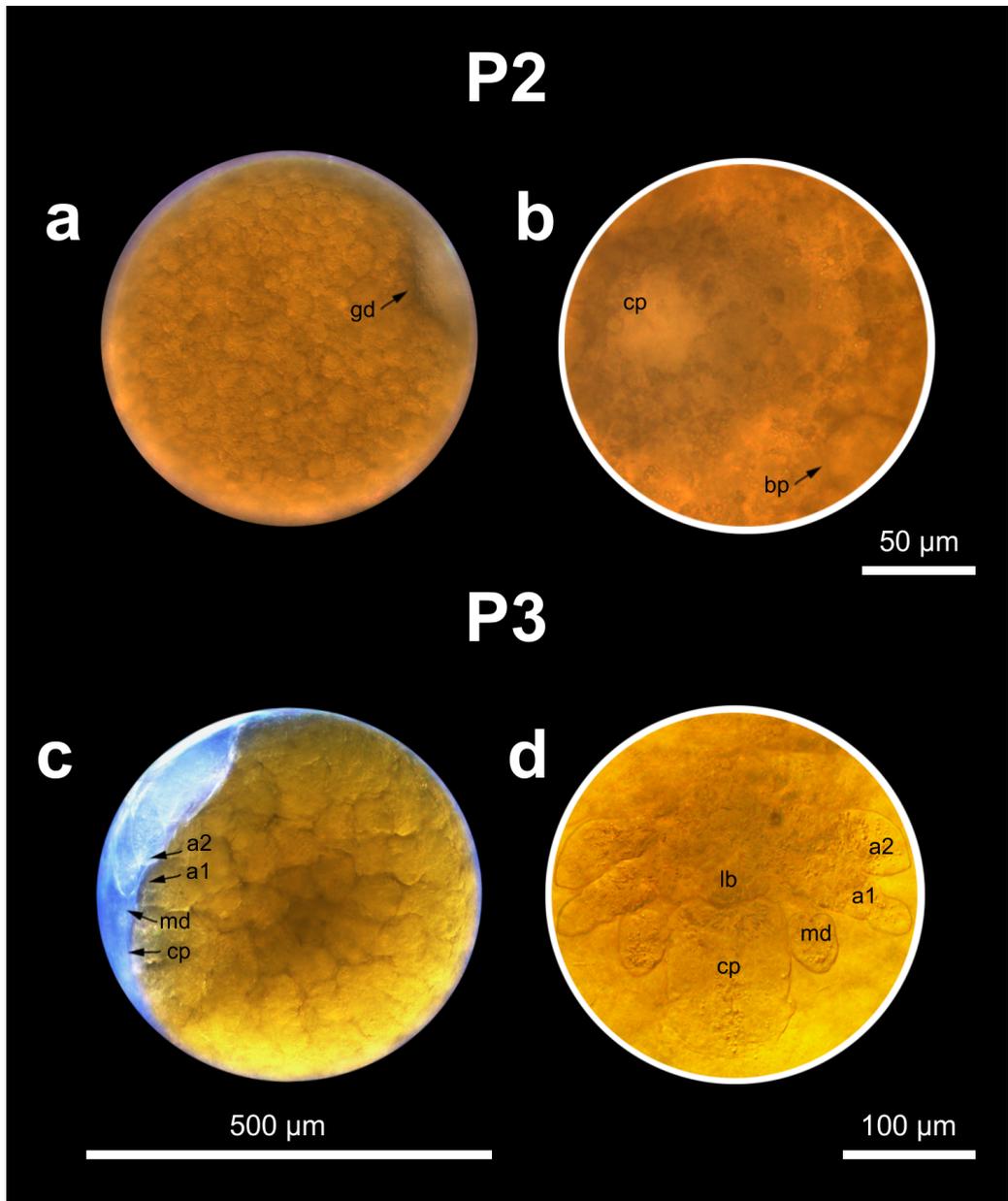


Fig. 5.4. Desarrollo embrionario desde el periodo 2 al 3 (P2-P3). Periodo P2: **a** Gastrulación, formación del disco germinal. **b** Vista ventral. Se distingue la papila caudal en las proximidades del blastoporo. Periodo P3: **c** Vista lateral del huevo, tejido embrionario en la zona sin vitelo (coloración blanca). Diferenciación de la forma naupliar con tres pares de apéndices, antenas I y II, mandíbulas **d** Vista ventral. Abreviaturas: antenas I y II (a1-a2), blastoporo (bp), disco germinal (gd), labrum (lb), mandíbulas (md) y papila caudal (cp)

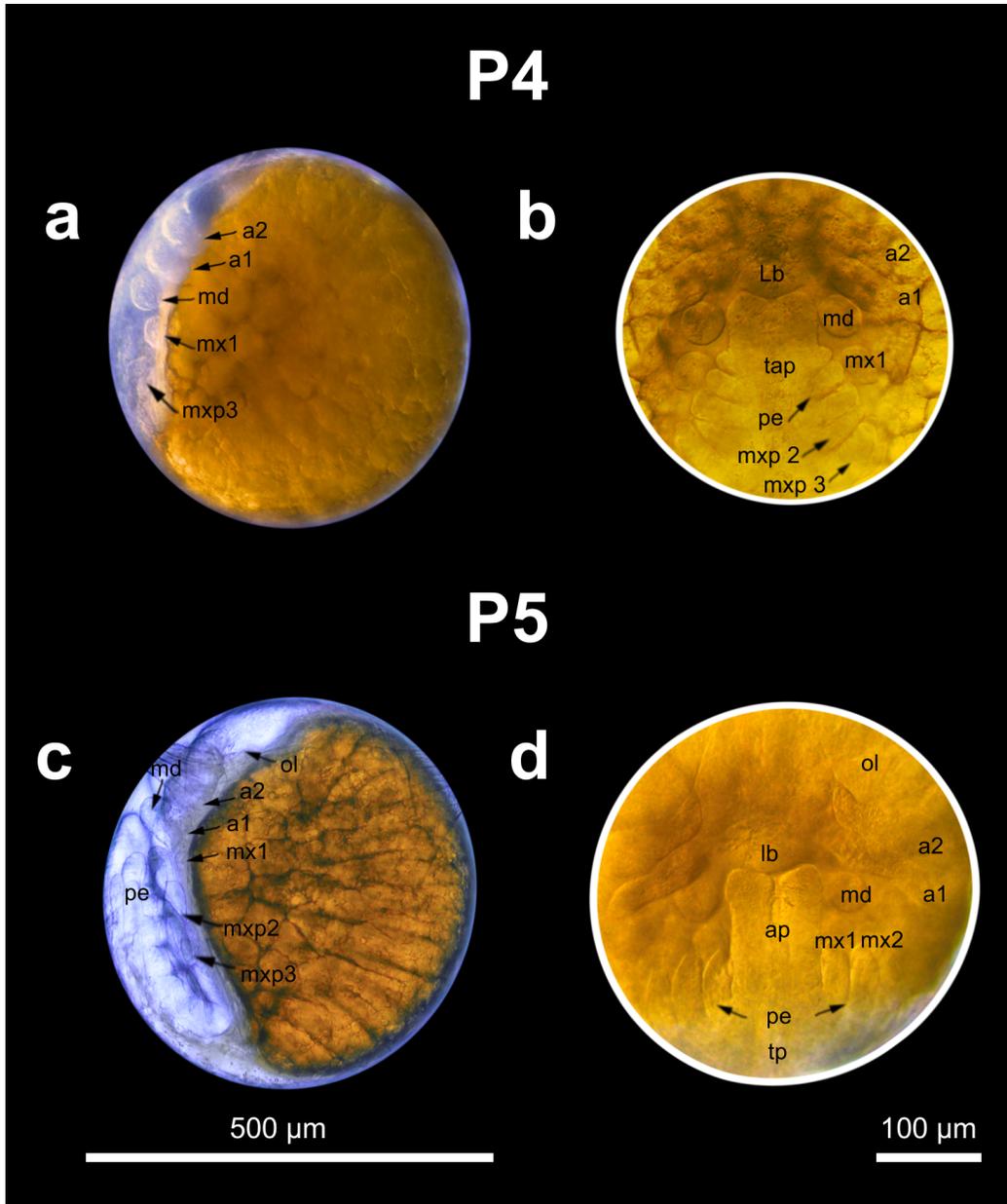


Fig. 5.5. Desarrollo embrionario desde el periodo 4 al 5 (P4-P5). P4: **a** Vista lateral, se distingue la maxila I entre la placa torácico-abdominal y las mandíbulas. **b** Vista ventral, se distinguen los periópodos y los maxilípedos. P5: **c** Vista lateral del huevo. **d** Vista ventral. Abreviaturas: antenas I y II (a1-a2), labrum (lb), mandíbulas (md), maxila I y II (mx1-mx2), maxilípedos II-III (mxp2-mxp3), papila caudal (cp), pereiópodos (pe), placa torácico-abdominal (tap), placa torácica (tp), placa abdominal (ap)

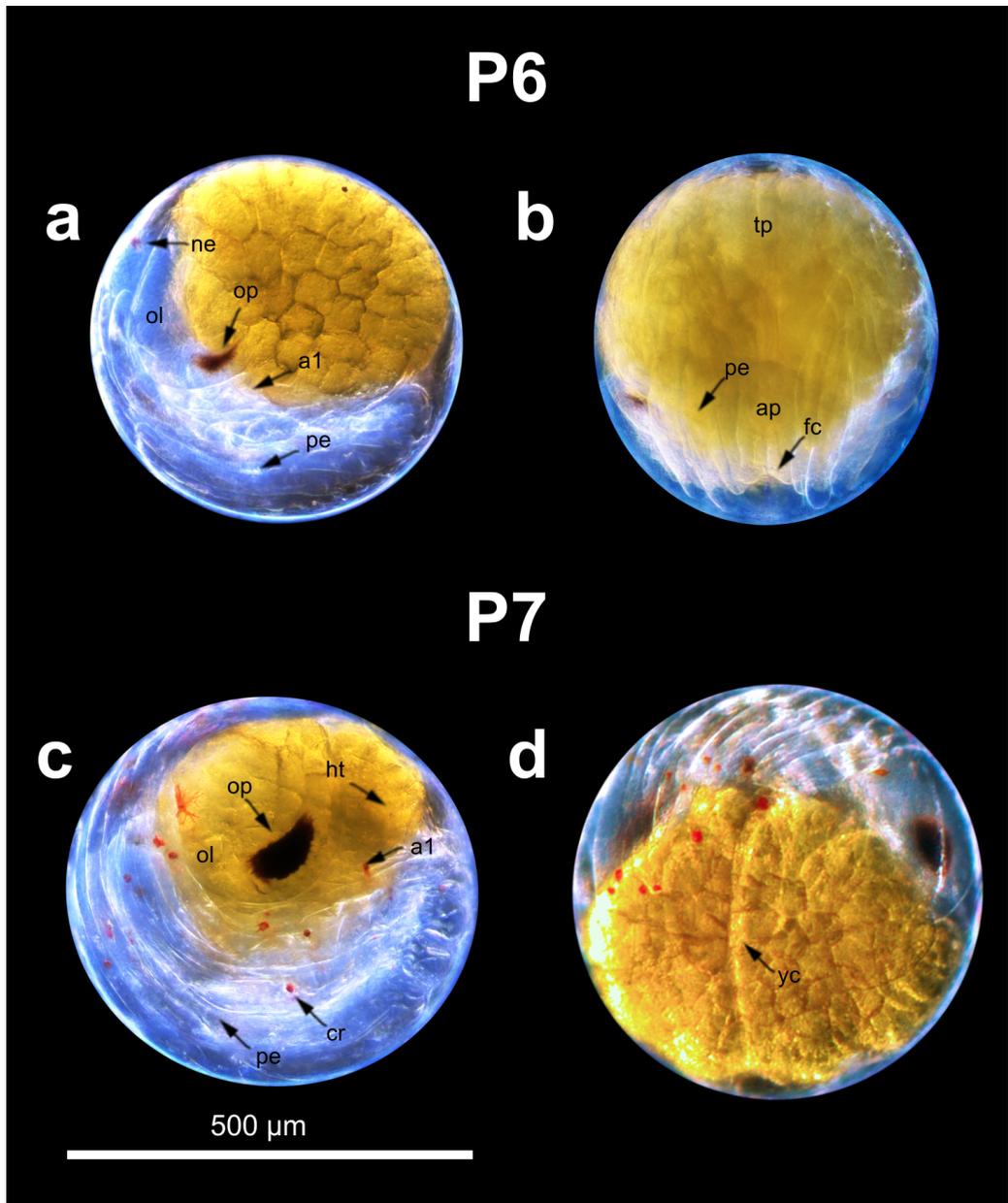


Fig. 5.6. Desarrollo embrionario desde el periodo 6 al 7 (P6-P7). P6: **a** Vista lateral, aparece la pigmentación ocular. **b** Vista ventral de la parte posterior de la placa abdominal, se distingue la furca. P7: **c** Vista lateral del huevo. **d** Vista ventral. Abreviaturas: antenas I (a1), corazón (ht), cromatóforo (cr), furca (fc), hendidura del vitelo(yc), lóbulo ocular (ol), ojo naupliar (ne), pereiópodos (pe), placa torácica (tp), placa abdominal (ap), pigmentación ocular (op)

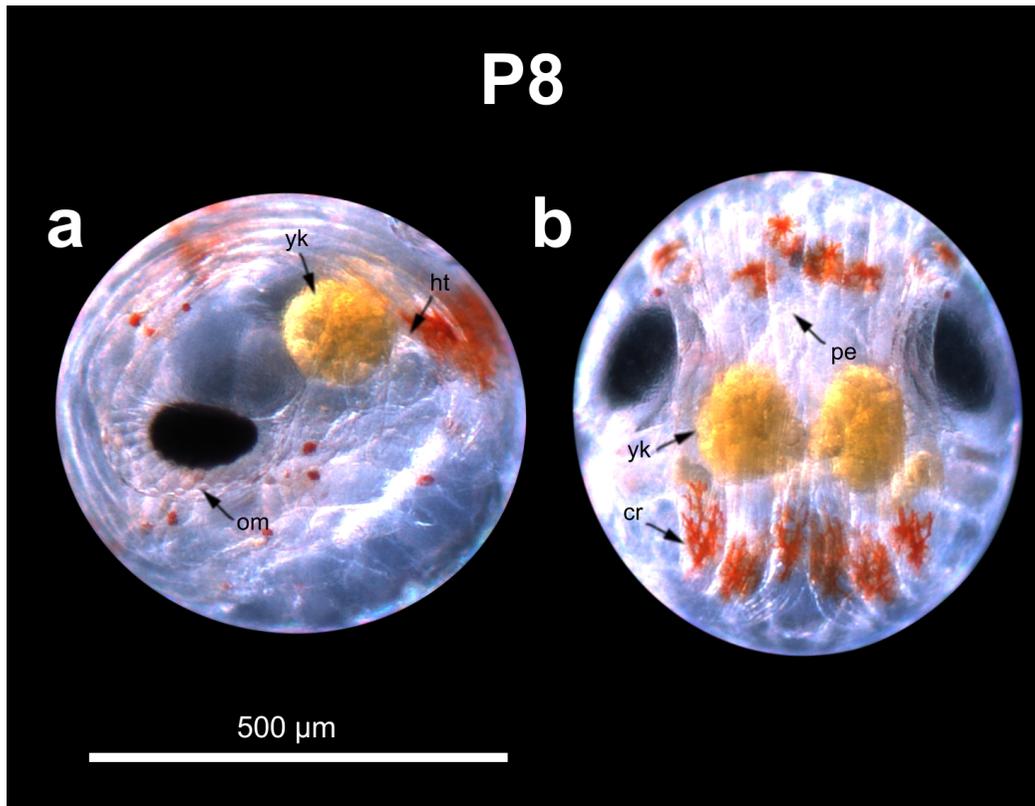


Fig. 5.7. Desarrollo embrionario periodo 8 (P8). **a** Vista lateral, se diferencian las facetas hexagonales de los omatidios. Corazón visible como vesícula transparente **b** Vista ventral, se distinguen los cromatóforos con forma estrellada y restos de vitelo. Abreviaturas: corazón, cromatóforo (cr), omatidos (om), pereiópodos (pe), vitelo (yk)

5.3.3. Composición bioquímica

Proteínas

El contenido de proteínas se mantuvo estable durante la mayor parte del desarrollo embrionario (P1 a P8; $593.5 \pm 1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$, $M \pm ET$). Sólo cuando las larvas estuvieron completamente desarrolladas se observaron diferencias significativas con el contenido de proteínas de embriones recientes ($F_{(8,67)}=3.26$, $P<0.01$; Fig 5.8). El contenido final de proteínas en los huevos con filosomas preparadas para la eclosión ($613.1 \pm 4.1 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$) fue un 4.4% superior al determinado en los huevos recién desovados ($587.2 \pm 1.2 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$).

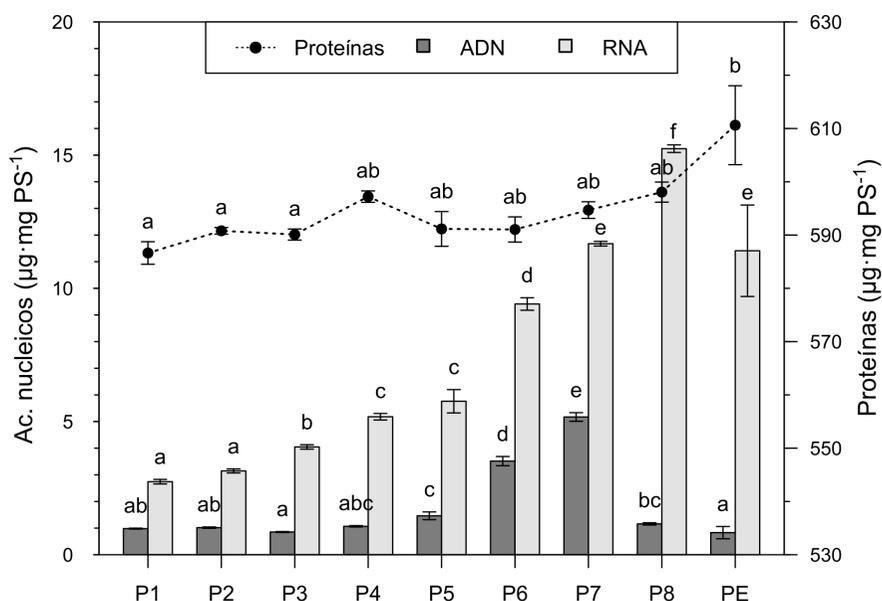


Fig. 5.8. Contenido en proteínas (puntos negros) y ácidos nucleicos (ADN, barras gris oscuro; RNA, barras gris claro) de los huevos durante el desarrollo embrionario de *S. arctus*. Los embriones se agrupan en periodos (P1 a P8) y en huevos con larvas a punto de eclosionar (PE; >98% de desarrollo). Se representan los valores medios y las barras de error indican el intervalo de confianza al 95%. Las diferencias significativas entre periodos se indican con letras diferentes

Ácidos nucleicos

El contenido total de ácidos nucleicos se incrementó en los huevos durante el desarrollo embrionario (Fig. 5.8). Respecto al ARN, éste vio incrementado hasta 5.6 veces su contenido inicial en los huevos ($2.74 \pm 0.04 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$, $M \pm ET$) du-

rante el desarrollo embrionario, hasta alcanzar un valor máximo de $15.24 \pm 0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ en el periodo P8 ($F_{(8,63)}=444.3$, $P<0.001$). El ADN se mantuvo relativamente estable en los periodos iniciales, con valores comprendidos entre 0.85 y $1.07 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ (P1-P4). A partir del 44 % del desarrollo (periodo P5), la cantidad de ADN aumentó significativamente en los huevos hasta P7 ($5.17 \pm 0.08 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$). Al final del desarrollo embrionario el contenido de ambos ácidos nucleicos se redujo significativamente ($P<0.001$; Fig. 5.8).

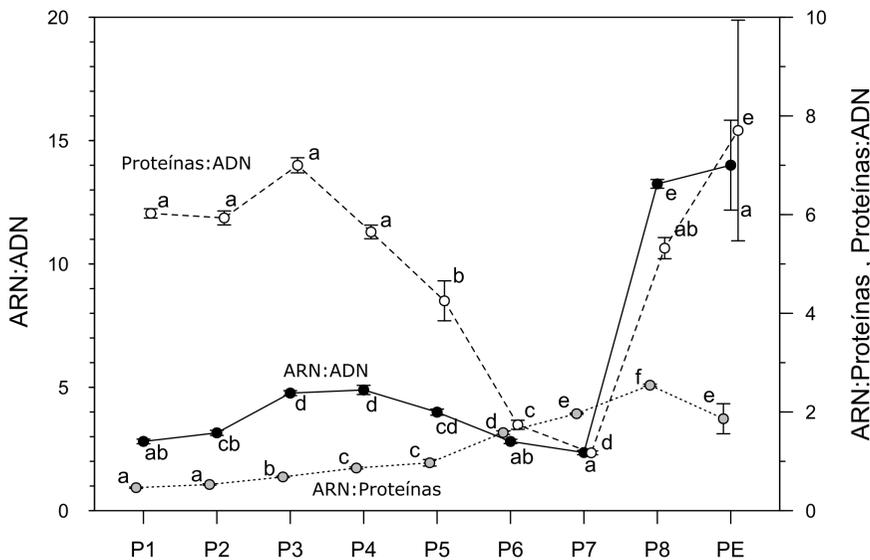


Fig. 5.9. Ratios de ARN:ADN ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$), ARN:Proteínas ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot 10^2$) y Proteínas:ADN ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot 10^{-2}$) durante el desarrollo embrionario. Los embriones se agrupan en periodos (P1 a P8) y en larvas a punto de eclosionar (PE; >98 % de desarrollo). Se representan los valores medios (puntos) y los intervalos de confianza al 95 % (barras de error). Las diferencias significativas entre periodos se indican con letras diferentes

La ratio ARN:ADN (un índice de la cantidad de ARN por célula) mostró dos periodos de elevada síntesis de ARN en las células durante la embriogénesis ($F_{(8,62)}=212.6$, $P<0.001$; Fig. 5.9). El primero durante la diferenciación del nauplio a zoea (periodos P3 y P4) y el segundo al final del desarrollo (periodos P8 y PE). La ratio ARN:Proteínas (un índice de la capacidad de síntesis) aumentó significativamente durante el desarrollo embrionario desde valores 0.5 a 2.5 ($F_{(8,62)}=465.6$, $P<0.001$, Fig 5.9). La ratio Proteínas:ADN, considerado un índice del tamaño celular, disminuyó significativamente a partir del 44 % del desarrollo (P5), indicando un importante multiplicación celular en los huevos ($F_{(8,62)}=148.3$, $P<0.001$, Fig

5.9). Al final de la embriogénesis (>79 %, P8-PE), la ratio Proteínas:ADN volvió a incrementarse, señalando un importante aumento del tamaño celular.

Lípidos

El contenido de lípidos se redujo significativamente un promedio del 53 % durante la embriogénesis ($F_{(8,67)}=118.5$, $P<0.001$; Fig. 5.10). El contenido en lípidos se mantuvo estable en los huevos desde el desove hasta el periodo P5, con valores que oscilaron entre 299.1 a 289.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$. A partir del 56 % del desarrollo, los embriones comenzaron a experimentar un descenso significativo de lípidos, hasta alcanzar un valor medio de $140.3 \pm 9.0 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ (\pm ET) al final del desarrollo. El mayor consumo de lípidos, un 19 % del contenido inicial, ocurrió entre el último periodo del desarrollo embrionario (P8, $197.4 \pm 1.9 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$) y los huevos próximos a eclosionar (PE).

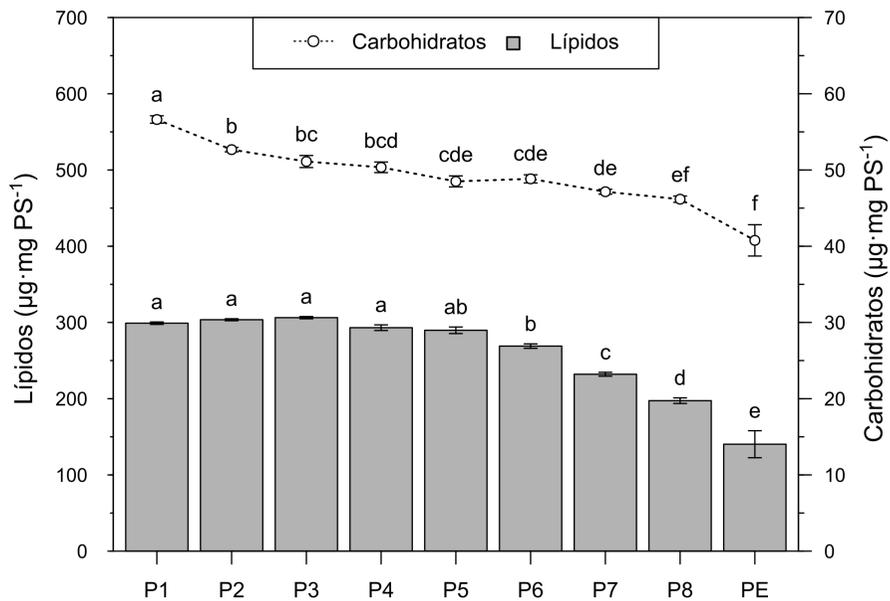


Fig. 5.10. Contenido medio de lípidos (barras grises) y carbohidratos (puntos blancos) en los huevos durante el desarrollo embrionario. Los embriones se agrupan en periodos de desarrollo (de P1 a P8) y en larvas a punto de eclosionar (PE; >98 % de desarrollo). Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95 %. Las diferencias significativas entre periodos se indican con letras diferentes

Carbohidratos

El contenido en carbohidratos experimentó un claro descenso (29 %) en los huevos desde el desove ($58.4 \pm 0.3 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$, $M \pm \text{ET}$) hasta la finalización del desarrollo embrionario ($41.2 \pm 1.1 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$; $F_{(8,69)}=19.37$, $P<0.001$). Desde el desove hasta el 22 % del desarrollo (periodo P1 a P3) se consumió el 10 % del contenido inicial de carbohidratos ($58.4 \pm 0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$). Durante el resto del desarrollo, el consumo de carbohidratos fue gradual (19 % del contenido inicial), observándose diferencias significativas principalmente entre los huevos de periodos intermedios y los huevos que están próximos a la eclosión (Fig. 5.10).

Tamaño, ocupación del vitelo, energía y agua

Los huevos incrementaron su volumen inicial de $451 \pm 7 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$ ($M \pm \text{DT}$) en el desove hasta los $784 \pm 68 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$ durante el desarrollo embrionario, incremento que supone un 74 % respecto al volumen inicial ($F_{(8,69)}=17.31$, $P<0.001$). En los huevos no se apreciaron cambios significativos de volumen desde el desove hasta el periodo P6 ($460 \pm 22 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}$, $M \pm \text{DT}$). Fue a partir del 66 % del desarrollo (periodo P7) cuando se observó un notable aumento de volumen (68 % del volumen inicial) hasta el final del desarrollo (Tabla 5.4).

El contenido en agua de los huevos también se incrementó significativamente durante el periodo de incubación ($F_{(8,68)}=206.2$, $P<0.001$; Tabla 5.4). El contenido en agua desde P1 a P3 permaneció estable ($51.2 \pm 0.5 \%$ PH, $M \pm \text{ET}$) y a continuación, sufrió un aumento del 55 % hasta el final del desarrollo en los huevos listos para la eclosión ($78.2 \pm 1.1 \%$ PH). El mayor incremento de volumen, 33 % respecto al volumen inicial, tuvo lugar entre los periodos P7 y P8, coincidiendo con el mayor aumento de agua en los huevos ($6.0 \pm 0.2 \%$ PH).

La estimas del contenido y el consumo energético variaron según el método utilizado (Tabla 5.4). El contenido inicial de los huevos y el consumo energético estimado, a partir de la composición bioquímica proximal, fue de $26.7 \text{ J}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ y del 23 %, respectivamente. A partir del contenido en C elemental, el contenido energético inicial de los huevos fue de $24.1 \text{ J}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ y un consumo del 18 %. Sin embargo, hubo una relación lineal significativa entre ambas aproximaciones y una elevada correlación ($R^2=0.968$; Fig 5.11). El consumo de lípidos proporcionó durante la embriogénesis una energía total de $6.3 \text{ J}\cdot\text{mg PS}^{-1}$, mientras que los carbohidratos sólo aportaron $0.3 \text{ J}\cdot\text{mg PS}^{-1}$.

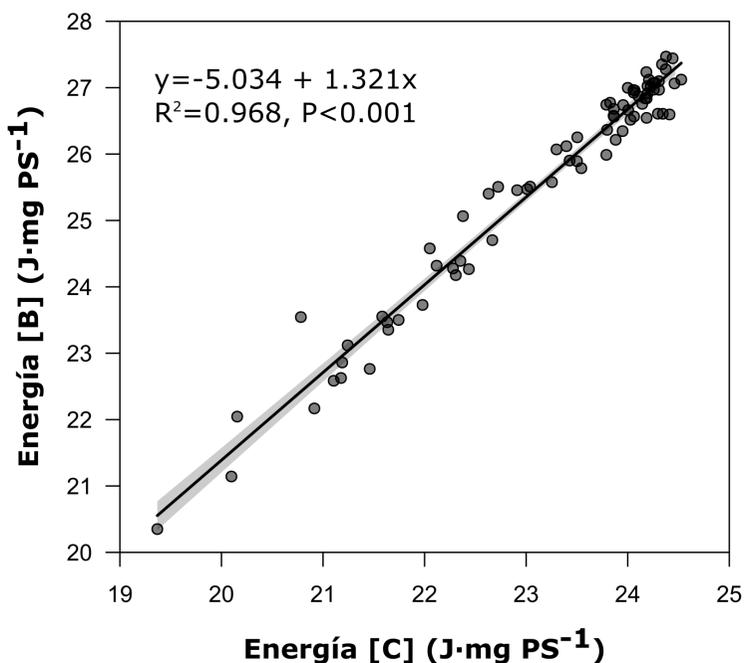


Fig. 5.11. Regresión lineal entre energía estimada en los huevos a partir del carbono elemental [C] y del contenido bioquímico [B]. Se indica la ecuación ajustada, el coeficiente de determinación (R^2), el nivel de significación (P). La sombra gris indica el intervalo de confianza al 95 %

Durante la embriogénesis, el vitelo se redujo del 100 % (% área ocupada del huevo) en los huevos recientes hasta el 4.2 ± 3.0 % en los huevos con filosas completamente desarrolladas ($F_{(8,69)}=359.80$, $P<0.001$). La disminución del área ocupada por el vitelo comenzó a ser significativa a partir del 34 % del desarrollo (Periodo P4; Tabla 5.4).

Ácidos grasos

Se detectaron un total de 56 ácidos grasos, de los que se pudieron identificar 49 (Tabla 5.5). La abundancia del contenido total de ácidos grasos disminuyó gradualmente con el desarrollo desde $204.2 \pm 4.9 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ ($M \pm ET$) en los huevos recién desovados hasta $94.6 \pm 7.1 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ en las filosas preparadas para la eclosión ($F_{(8,62)}=37.08$, $P<0.001$;). Quince ácidos grasos estuvieron presentes en los huevos a una proporción ≥ 1 % respecto al total de ácidos grasos

Tabla 5.4. Tamaño, contenido en agua, porcentaje de vitelo y energía de los huevos durante el desarrollo embrionario

	P1 (N=10)	P2 (N=13)	P3 (N=10)	P4 (N=8)	P5 (N=6)	P6 (N=8)	P7 (N=11)	P8 (N=9)	PE (N=2)	F	P
$V (10^{-4} \mu m^3)$	451 ± 7 ^a	453 ± 6 ^a	448 ± 8 ^a	433 ± 10 ^a	495 ± 13 ^{ab}	478 ± 4 ^{ab}	557 ± 5 ^b	705 ± 8 ^c	784 ± 68 ^c	17.3	<0.001
$D (\mu m)$	428 ± 2 ^a	430 ± 2 ^a	428 ± 3 ^a	425 ± 3 ^a	447 ± 4 ^{ab}	445 ± 1 ^{ab}	469 ± 1 ^b	507 ± 2 ^c	525 ± 16 ^c	16.5	<0.001
Agua (% PH)	52.2 ± 0.4 ^{ab}	50.9 ± 0.2 ^a	50.4 ± 0.5 ^a	57.2 ± 0.3 ^{bc}	59.4 ± 0.5 ^c	64.4 ± 0.4 ^d	70.4 ± 0.1 ^e	76.4 ± 0.1 ^f	78.2 ± 1.1 ^f	206.2	<0.001
Vitelo (% Area)	100.0 ± 0.0 ^a	99.1 ± 0.2 ^a	93.7 ± 0.6 ^a	85.4 ± 0.4 ^b	76.8 ± 0.9 ^c	66.8 ± 0.9 ^d	48.6 ± 0.4 ^e	31.5 ± 0.5 ^f	4.2 ± 3.0 ^g	359.8	<0.001
E [C] (J·mg·PS ⁻¹)	24.1 ± 0.0 ^{ab}	24.2 ± 0.0 ^a	24.1 ± 0.0 ^{ab}	23.9 ± 0.0 ^{ab}	23.7 ± 0.1 ^b	22.9 ± 0.0 ^c	22.1 ± 0.0 ^d	21.1 ± 0.0 ^e	19.7 ± 0.3 ^f	150.4	<0.001
E [B] (J·mg·PS ⁻¹)	26.7 ± 0.0 ^a	26.9 ± 0.0 ^{ab}	27 ± 0.0 ^{ab}	26.6 ± 0.1 ^{ab}	26.3 ± 0.1 ^b	25.5 ± 0.0 ^c	24.1 ± 0.0 ^d	22.8 ± 0.1 ^e	20.7 ± 0.3 ^f	177.4	<0.001

Los embriones se agrupan en periodos de desarrollo (de P1 a P8) y en huevos con larvas a punto de eclosionar (PE; >98 % de desarrollo). Se indican los valores medios (± error estándar) del volumen (V) y diámetro (D) de los huevos, del porcentaje del área del huevo ocupada por el vitelo, del porcentaje de agua respecto al peso húmedo (PH) y la estimación de la energía respecto al contenido de C elemental (E [C]) y a partir de la composición bioquímica proximal (E [B]). Se indica el valor de la prueba F y su significación (P). Las diferencias significativas entre periodos se indican con letras diferentes

durante el desarrollo embrionario. Seis de estos 15 ácidos grasos, 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 20:4n-6 (ácido araquidónico, ARA), 20:5n-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA), 22:6n-3 (ácido docosahexaenoico, DHA) representaron el 75-88 % del total de ácidos grasos, con un valor medio entre periodos de $86 \pm 4\%$ (\pm DT). Respecto a la utilización de cada fracción de ácidos grasos durante el desarrollo, la fracción más consumida fueron los ácidos grasos poliinsaturados (46 %), seguida de los monoinsaturados (37 %) y los saturados (14 %).

Los ácidos grasos saturados en mayor proporción fueron, en orden de abundancia, ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) y mirístico (14:0)(Tabla 5.5). El descenso en el contenido total de ácidos grasos saturados (38 %) hasta un valor de $18.0 \pm 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ ($M \pm$ ET) tuvo lugar principalmente al final del desarrollo. El consumo de ácidos grasos saturados durante la embriogénesis fue explicado mayoritariamente por la utilización de 16:0 (44 % del consumo total de ácidos grasos saturados) .

Los ácidos grasos monoinsaturados más relevantes fueron 16:1n-7, 17:1n-8, 18:1n-7 y 18:1n-9, representando el 73-83 % del total de MUFA. El consumo total de ácidos grasos monoinsaturados comienza a ser significativo partir del 56 % del desarrollo (Periodo P6; Tabla 5.5). Al final del desarrollo permaneció en los huevos con larvas desarrolladas el 37 % del contenido inicial de ácidos grasos monoinsaturados en los huevos ($58.4 \pm 1.8 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$). Este marcado descenso de los ácidos grasos monoinsaturados fue explicado por la utilización de 16:1n-7 (-70 %) y en menor medida, por el 18:1n-9 y 17:1n-8.

En general, los ácidos grasos poliinsaturados más importantes fueron ARA, EPA y DHA, representando el 92-96 % del total de los ácidos grasos poliinsaturados. Respecto a ARA, no se observaron diferencias durante el desarrollo embrionario ($P=0.34$; Tabla 5.5). EPA y DHA fueron los ácidos grasos más consumidos, principalmente al final del desarrollo embrionario (P7-P8), con una tasa promedio del 48 %. Cuantitativamente EPA fue el ácido graso más abundante en los huevos recientes (23 % del contenido total de ácidos grasos) y en los huevos a punto de eclosionar (26 %). Las ratios EPA/ARA y DHA/ARA no mostraron diferencias significativas entre periodos de desarrollo ($P \geq 0.18$).

Tabla 5.5. Contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$) de los huevos de *S. arcticus* durante el desarrollo embrionario

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	PE	F	P
14:0	3.9 ± 0.3 ^{ab}	4.3 ± 0.2 ^a	4.3 ± 0.4 ^{ab}	3.0 ± 0.3 ^{bcd}	3.1 ± 0.4 ^{abcd}	3.5 ± 0.4 ^{abc}	2.6 ± 0.2 ^{cde}	2.1 ± 0.2 ^{de}	0.6 ± 0.0 ^e	2.11	0.05
16:0	19.4 ± 0.4 ^a	20.0 ± 1.0 ^a	20.6 ± 1.4 ^a	17.9 ± 1.1 ^{ab}	19.2 ± 1.0 ^{ab}	18.5 ± 0.9 ^{ab}	16.9 ± 0.6 ^{ab}	17.4 ± 1.2 ^{ab}	11.3 ± 0.5 ^b	3.00	0.01
18:0	5.0 ± 0.2 ^a	6.4 ± 0.4 ^b	6.4 ± 0.3 ^{ab}	5.8 ± 0.4 ^{ab}	6.4 ± 0.5 ^{ab}	6.1 ± 0.2 ^{ab}	5.8 ± 0.2 ^{ab}	6.1 ± 0.5 ^{ab}	4.0 ± 0.1 ^a	2.70	0.01
ΣSAT	32.4 ± 0.6 ^a	35.2 ± 1.1 ^a	36.0 ± 1.4 ^a	30.9 ± 1.2 ^a	33.4 ± 1.2 ^a	32.4 ± 1.0 ^a	29.3 ± 0.7 ^a	29.2 ± 1.4 ^{ab}	18.0 ± 0.6 ^b	4.58	<0.001
16:1n-7	18.8 ± 1.4 ^a	18.3 ± 1.1 ^a	17.1 ± 1.3 ^{ab}	15.7 ± 1.5 ^{ab}	14.4 ± 1.7 ^{abc}	12.7 ± 0.9 ^{bc}	12.9 ± 0.9 ^{bc}	10.7 ± 0.8 ^c	5.6 ± 1.8 ^d	11.04	<0.001
17:1n-8	6.7 ± 0.8 ^a	6.5 ± 0.7 ^a	5.0 ± 0.5 ^a	4.5 ± 0.5 ^a	4.3 ± 0.6 ^{ab}	3.8 ± 0.2 ^{ab}	2.4 ± 0.2 ^{bc}	1.5 ± 0.2 ^{cd}	0.6 ± 0.2 ^d	22.74	<0.001
18:1n-7	6.1 ± 0.2 ^{ab}	6.3 ± 0.3 ^a	5.9 ± 0.4 ^{ab}	4.8 ± 0.4 ^{abc}	5.0 ± 0.5 ^{abc}	4.9 ± 0.3 ^{abc}	4.7 ± 0.3 ^{bc}	5.0 ± 0.4 ^{abc}	3.0 ± 0.0 ^c	4.60	<0.002
18:1n-9	16.5 ± 0.5 ^{abc}	18.7 ± 0.9 ^a	19.4 ± 1.5 ^a	17.4 ± 1.5 ^{ab}	15.3 ± 0.8 ^{abc}	13.4 ± 1.2 ^{bc}	13.2 ± 0.9 ^{bc}	13.1 ± 0.9 ^{bc}	8.6 ± 0.7 ^c	5.98	<0.001
20:1n-9	2.8 ± 0.1 ^{abc}	3.7 ± 0.3 ^{ab}	4.5 ± 0.5 ^a	2.7 ± 0.2 ^{bc}	2.9 ± 0.2 ^{abc}	3.2 ± 0.4 ^{abc}	2.4 ± 0.2 ^{cd}	1.8 ± 0.1 ^d	0.9 ± 0.0 ^e	21.26	<0.001
23:1n-9	1.1 ± 0.1 ^{ab}	1.4 ± 0.2 ^{ab}	2.4 ± 0.8 ^{ab}	2.5 ± 0.6 ^{ab}	3.9 ± 1.4 ^a	3.6 ± 0.8 ^a	2.0 ± 0.3 ^{ab}	1.3 ± 0.3 ^{ab}	0.6 ± 0.1 ^b	3.33	<0.01
ΣMUFA	58.4 ± 1.8 ^a	62.7 ± 1.7 ^a	62.3 ± 2.4 ^a	55.4 ± 2.4 ^{ab}	52.8 ± 2.5 ^{ab}	47.4 ± 1.8 ^{bc}	42.5 ± 1.4 ^{bc}	37.1 ± 1.3 ^{cd}	21.3 ± 2.0 ^d	16.74	<0.001
20:4n-6 (ARA)	11.0 ± 0.8	11.3 ± 1.1	13.5 ± 2.1	13.4 ± 2.7	14.3 ± 3.2	14.8 ± 2.8	11.1 ± 1.3	8.9 ± 1.5	6.5 ± 0.1	1.15	0.34
20:5n-3 (EPA)	47.4 ± 3.1 ^a	47.5 ± 3.6 ^a	41.5 ± 2.6 ^{ab}	41.9 ± 3.3 ^{ab}	36.2 ± 2.6 ^{ab}	39.4 ± 1.9 ^{ab}	33.5 ± 1.9 ^b	29.0 ± 1.6 ^b	24.3 ± 4.3 ^b	5.67	<0.001
22:5n-3	1.9 ± 0.2 ^{cd}	2.2 ± 0.1 ^{abc}	3.1 ± 0.4 ^{abc}	3.6 ± 0.3 ^a	3.1 ± 0.3 ^{abc}	3.3 ± 0.5 ^{ab}	2.1 ± 0.2 ^{bcd}	1.4 ± 0.2 ^{de}	0.6 ± 0 ^e	9.53	<0.001
22:6n-3 (DHA)	39.4 ± 3.2 ^a	37.5 ± 2.2 ^a	42.6 ± 3 ^a	43.8 ± 4.7 ^a	39.8 ± 5.8 ^a	36.8 ± 3.5 ^{ab}	32.6 ± 2.7 ^{ab}	22.3 ± 2.3 ^b	20.6 ± 5.2 ^b	3.89	<0.001
ΣPUFA	103.6 ± 4.5 ^{ab}	102.8 ± 4.4 ^{ab}	105.7 ± 4.5 ^{ab}	107.3 ± 6.3 ^a	98.1 ± 7.1 ^{ab}	98.8 ± 4.9 ^{ab}	82.8 ± 3.6 ^{bc}	64.4 ± 3.2 ^c	53.7 ± 6.8 ^c	9.26	<0.001
No identif. 1	4.7 ± 0.6 ^a	3.1 ± 0.6 ^{ab}	2.4 ± 0.6 ^{abc}	1.6 ± 0.3 ^{bcd}	1.5 ± 0.5 ^{bcd}	1.7 ± 0.2 ^{abc}	1.3 ± 0.2 ^{bcd}	0.8 ± 0.1 ^{cd}	0.3 ± 0.0 ^d	5.97	<0.001
No identif. 5	2.2 ± 0.3	1.6 ± 0.3	2.3 ± 0.3	1.9 ± 0.3	2.2 ± 0.6	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.3	2.67	0.01
ΣOtros	9.7 ± 0.7 ^a	7.4 ± 0.7 ^{ab}	7.2 ± 0.7 ^{ab}	5.9 ± 0.5 ^{abc}	6.1 ± 0.8 ^{abc}	5.8 ± 0.5 ^{abc}	4.9 ± 0.3 ^{bc}	3.2 ± 0.2 ^{cd}	1.6 ± 0.3 ^d	8.22	<0.001
$\Sigma(n-3)/\Sigma(n-6)$	6.8 ± 1.7	6.4 ± 1.5	5.4 ± 1.5	5.6 ± 1.7	4.8 ± 1.7	4.7 ± 1.4	5.3 ± 1.4	4.9 ± 1.4	5.9 ± 3.7	0.38	0.93
18:1n-7/18:1n-9	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.53	0.17
EPA/DHA	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.24	0.29
EPA/ARA	4.3 ± 0.4	4.2 ± 0.5	3.1 ± 0.5	3.1 ± 0.7	2.5 ± 0.6	2.7 ± 0.5	3.0 ± 0.4	3.2 ± 0.6	3.7 ± 0.7	1.50	0.18
ΣFA	204.2 ± 4.9 ^{ab}	208.2 ± 4.9 ^a	211.2 ± 5.4 ^a	199.5 ± 6.9 ^{ab}	190.4 ± 7.7 ^{ab}	184.4 ± 5.5 ^{bc}	159.5 ± 3.9 ^c	135.6 ± 3.7 ^d	94.6 ± 7.1 ^e	37.08	<0.001

Los datos son mostrados como M ± ET en cada periodo de desarrollo (P1-P8) y en los huevos a punto de eclosionar (PE; >98% del desarrollo). Se muestran los ácidos grasos mayoritarios presentes a una proporción $\geq 1\%$ en algún periodo. ARA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaico; DHA, ácido docosahexaico; SAT, ácidos grasos saturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; Otros, ácidos grasos no identificados. Los ácidos grasos presentes a una proporción <1%: SAT: 10:0, 12:0, 13:0, 15:0, 17:0, 20:0, 21:0, 22:0, 24:0, SAT ramificados: Iso 15:0, Anteiso 17:0; MUFA: 14:1n-5 cis, 15:1n-5, 16:1n-5, 17:1, 18:1n-13, 20:1n-14, 20:1n-15, 22:1n-9, 23:1n-9, 24:1n-9; MUFA ramificados: Iso 16:1, Anteiso 16:1, Iso 17:1; PUFA: 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:2n-9, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3; Otros: no identificados (n=5); son tenidos en cuenta en el sumatorio de cada grupo mayoritario y en la suma total de ácidos grasos (ΣFA).

Se indica el valor de la prueba F y su significación (P). Las diferencias significativas entre periodos se indican con letras diferentes

5.4. Discusión

5.4.1. Caracterización biométrica y morfológica

Los sistemas utilizados para identificar etapas en el desarrollo embrionario en crustáceos siguen generalmente dos criterios, el uso del tiempo absoluto transcurrido desde el desove o el porcentaje de desarrollo, y la sucesión de eventos (Browne *et al.*, 2005). El uso del porcentaje de desarrollo permite una mayor precisión en la asignación del tiempo transcurrido entre procesos, y además eliminar los huecos que pueden aparecer si la descripción esta basada en una sucesión de eventos durante un proceso continuo, como es el desarrollo embrionario (Bentley *et al.*, 1979). En este estudio, el uso del porcentaje de desarrollo favoreció la comparación de los cambios morfológicos y biométricos que tienen lugar en los huevos entre puestas diferentes. Sin embargo, se combinaron ambos criterios para favorecer la realización de comparaciones con las descripciones de los desarrollos embrionarios de otros crustáceos.

Las características morfológicas utilizadas para definir los periodos embrionarios: primeras divisiones celulares, disco embrionario, primeros apéndices, pereiópodos, diferenciación de la placa torácico abdominal, pigmentación ocular, cromatóforos y omatidios, fueron similares a los utilizados por otros autores (Pandian, 1970; Amsler y George, 1984; Helluy y Beltz, 1991). Estas características permitieron identificar hasta ocho periodos durante el desarrollo embrionario de *S. arctus*.

La etapa inicial de la embriogénesis se caracterizó por el desarrollo de la fase nauplio en el interior de la membrana embrionaria y, en una segunda etapa, su diferenciación mediante morfogénesis en una zoea en el interior del huevo. Este tipo de desarrollo en el que se produce la eclosión de una larva zoea es una característica compartida con otras langostas (Aiken y Waddy, 1980; Helluy y Beltz, 1991). No obstante, la zoea de *S. arctus* es un tipo de larva altamente modificada denominada filosoma, que está presente únicamente en las familias Palinuridae, Scyllaridae y Synaxidae, que integran el infraorden Achelata (Palero *et al.*, 2009a). En otros géneros del orden Achelata como *Jasus*, *Ibacus* y *Scyllarides* también se ha descrito un estado de prezoa denominado naupliosoma, que no se observa en *S. arctus*, y que es considerado por algunos autores como un carácter plesiomórfico (Baisre, 1994; Wahle y Fogarty, 2006).

La secuencia de aparición de cambios morfológicos durante el desarrollo em-

brionario de *S. arctus* siguió el patrón establecido en otros crustáceos decápodos (Lang, 1973; Helluy y Beltz, 1991; Valdés *et al.*, 1991a; Webb *et al.*, 2007). No obstante, la tasa de desarrollo en la que aparecen los diferentes caracteres morfológicos muestra diferencias respecto a otras especies. Una característica común en la descripción de los desarrollos embrionarios, y que permite comparar con otros estudios, es la aparición de la pigmentación ocular. En *S. arctus*, este carácter aparece en los embriones al 56 % del desarrollo, una tasa que se encuentra en el rango mostrado por langostas palinúridas como *Panulirus japonicus* 54-68 % (Shiino, 1950), *Sagmariasus verreauxi* 54-64 % (Moss *et al.*, 2004) o *Jasus frontalis* entre el 55-63 % (Dupré, 1988), pero que difiere bastante de la tasa del 12 % descrita en langostas homáridas como *Homarus americanus* (Helluy y Beltz, 1991). Así, el uso de índices que se basan en el crecimiento de la pigmentación ocular, como el de Perkins (1972) en homáridos, no permitirían estimar el grado de desarrollo de los huevos durante la primera mitad de la embriogénesis en *S. arctus*, ni tampoco en langostas palinúridas. En cambio, la función de Michaelis-Menten ajustada en este estudio, que utiliza el área ocupada por el vitelo, si permite la estimación del grado de desarrollo de los embriones durante este periodo inicial, ya que el vitelo disminuye desde los momentos iniciales hasta el final de la embriogénesis.

Durante la embriogénesis, los cambios morfológicos en los huevos estuvieron acompañados de cambios biométricos. Hasta el 50 % del desarrollo no comenzó a apreciarse un claro aumento del volumen del huevo. En crustáceos decápodos este incremento está asociado a la entrada de agua al interior del huevo (Pandian, 1970; Oh y Hartnoll, 2004; Rosa *et al.*, 2007). Por otra parte, el desarrollo morfológico indica que este aumento de volumen, a su vez, está relacionado con un elevado crecimiento de las estructuras internas del embrión durante los periodos 4-5, y la necesidad de espacio disponible en el interior del huevo. Este aumento de volumen alcanzó su máximo al 80 % del desarrollo, coincidiendo con el inicio del último periodo de desarrollo (P8). En este momento, el embrión sólo ha experimentado un aumento de tamaño del 50 % respecto al incremento total, y todavía posee el 50 % del vitelo disponible para completar la embriogénesis. Así, durante este último periodo va tener lugar el mayor gasto energético realizado durante la embriogénesis, en comparación a los periodos previos. Es probable que el aumento de la tasa cardíaca y de los movimientos del embrión que tiene lugar en estos periodos finales sean los responsables del elevado consumo de vitelo, y que se refleja en el incremento exponencial en la correspondiente tasa de consumo. Este patrón en la utilización de vitelo en *S. arctus* se aproximó bastante al observado en

los embriones de otros crustáceos decápodos (Lavarías *et al.*, 2002; Stevens, 2006; Walker *et al.*, 2006).

Los embriones tras el desove mostraron diferencias de tamaño que se conservaron durante el periodo de incubación. Esto implica que las diferencias observadas en los huevos recientes pueden trasladarse a las larvas recién eclosionadas. La estrategia de una mayor inversión energética por huevo tendría su lógica si el desarrollo temprano en *S. arctus* fuese lecitotrófico. Sin embargo, tras la eclosión de los huevos, las larvas necesitan alimento para continuar con su desarrollo. Por lo tanto, este mayor tamaño del huevo podría estar más relacionado, como indica la elevada correlación del tamaño del huevo y del área ocupada por la pigmentación ocular en los huevos preparados para eclosionar, con el tamaño corporal que alcanzan las larvas en el momento de la eclosión. Esta relación entre el tamaño inicial de los huevos y el tamaño de las larvas en el momento de la eclosión también se ha encontrado en otros decápodos (Shirley *et al.*, 1987; Wehrtmann y Kattner, 1998; Hamasaki *et al.*, 2003; Giménez *et al.*, 2004; Brillon *et al.*, 2005).

Tras la eclosión de los huevos se observó que en las larvas recién eclosionadas permanecen restos de vitelo en el hepatopancreas (4% del vitelo inicial). Otros decápodos también muestran este remanente de vitelo en los huevos antes de la eclosión (Biesiot y Perry, 1995; Stevens, 2006; Walker *et al.*, 2006), por lo que es posible que ésto también suceda en el medio natural. Este vitelo residual puede ayudar a la larvas recién eclosionadas a subsistir hasta el primer alimento en situaciones de disponibilidad de alimento poco predecible.

Como los cambios que tienen lugar en los embriones son procesos graduales y continuos, las clasificaciones categóricas a partir de características visuales externas no siempre son válidas para experimentos con desarrollos embrionarios (Styf *et al.*, 2013). En cambio, la utilización de variables cuantitativas como el volumen del huevo, el área de vitelo y del ojo, junto con los modelos ajustados, van a favorecer la selección de los embriones en un determinado momento del desarrollo de una forma más precisa, rápida y sin causar daño, aspectos de suma importancia para la realización estudios bioquímicos, ecotoxicológicos y fisiológicos (Lavarías *et al.*, 2002).

5.4.2. Composición bioquímica

En general, el tamaño de los huevos es un buen indicador de la duración de la etapa inicial del ciclo de vida en los decápodos marinos (Herring, 1974). En la

familia Scyllaridae, el tamaño de los huevos es bastante variable entre especies (0.4-1.2 mm de diámetro), aunque por lo general, de los géneros con huevos más grandes eclosionan larvas en un estado más avanzado de desarrollo y que presentan fases larvarias breves (p. ej. *Thenus*, *Ibacus*), mientras que de los que poseen huevos más pequeños como en *S. arctus*, eclosionan huevos con larvas que deben pasar numerosos estadios larvarios (ver Sekiguchi *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo embrionario los huevos experimentaron un incremento del 74 % respecto a su volumen inicial. Un incremento que está dentro del rango del 50 al 175 % estimado por Wear (1974) en 19 especies de decápodos marinos. Este incremento de volumen está asociado al aumento del contenido en agua en los huevos (55 %), un patrón común observado en otros crustáceos (Pandian, 1970; Oh y Hartnoll, 2004). Su origen se encuentra en la entrada de agua al interior del huevo, que tiene lugar como respuesta osmótica al aumento de la permeabilidad de la membrana embrionaria que protege al huevo en los periodos previos a la eclosión (Charmantier y Charmantier-Daures, 2001). Aunque, otra parte puede proceder de la retención de agua metabólica, que se genera como subproducto de la respiración (Amsler y George, 1984).

La calidad y la cantidad de los nutrientes en el vitelo del huevo dependen de las reservas maternas, la capacidad de biosíntesis y la dieta durante la maduración de los ovarios (Harrison, 1990). En los crustáceos el componente mayoritario del vitelo del huevo es la lipovitelina, la cual está compuesta principalmente de proteínas y lípidos, y en menor medida de carbohidratos (Lee, 1991; Walker *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en *S. arctus*, tanto a nivel bioquímico como en el área ocupada por el vitelo, mostraron que las reservas energéticas de los embriones no son consumidas a una tasa constante durante la embriogénesis. El aumento de la demanda energética de los embriones, antes de la eclosión de los huevos, provocó un rápido descenso de estas reservas, principalmente en el contenido lipídico. Esta drástica disminución del contenido lipídico señala a los lípidos como la fuente principal de energía durante la embriogénesis. De ahí, que el patrón mostrado en la utilización de los lípidos se aproxime a la tasa de consumo de vitelo durante el desarrollo. La utilización de los lípidos como principal recurso energético durante la embriogénesis es común en otros crustáceos decápodos (Holland, 1978; Clarke *et al.*, 1990; Kattner *et al.*, 1994; Morais *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 2003). No obstante, la utilización de los nutrientes durante el desarrollo embrionario no siempre sigue un mismo patrón entre especies. Gardner (2001) encontró en el braquiuro *Pseudocarcinus gigas* una preferencia por la utilización de

las proteínas en lugar de los lípidos durante la embriogénesis, al igual que sucede en cirrípedos como *Balanus balanoides* y *Balanus balanus* (Barnes, 1965). Al final del desarrollo, los lípidos representaron aproximadamente el 14 % de la materia seca en los huevos con filosomas preparadas para la eclosión, un valor similar al estimado en las filosomas recién eclosionadas de langostas palinúridas (Phleger *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2012).

La secuencia temporal de utilización de los recursos energéticos del embrión señala a los carbohidratos como fuente inicial (o inmediata) de energía en el comienzo del desarrollo embrionario en *S. arctus*. Este consumo inicial también se ha descrito en la embriogénesis de *Macrobrachium rosenbergii* (Jun-jie *et al.*, 2006). Aunque los carbohidratos generalmente contribuyen en menor medida al metabolismo del embrión (Holland, 1978), su importancia no sólo recae en la obtención de energía durante el desarrollo embrionario, sino por ser además un precursor de la quitina, el componente principal del exoesqueleto en los crustáceos (Amsler y George, 1984). Así, una elevada síntesis del exoesqueleto de la larva antes de la eclosión de los huevos permitiría explicar el consumo de carbohidratos al final del desarrollo embrionario (>79 % del desarrollo).

El contenido de proteínas en el embrión no experimentó una gran variación durante la mayor parte del desarrollo embrionario, sugiriendo que las proteínas utilizadas son convertidas de nuevo en otros componentes corporales. Sin embargo, existen diferencias en la evolución del contenido en proteínas durante la embriogénesis entre los estudios realizados en otros decápodos marinos. Algunos estudios muestran una reducción general de las proteínas durante el desarrollo del embrión (Amsler y George, 1984; Petersen y Anger, 1997; Gardner, 2001; Sibert *et al.*, 2004), mientras que en otros se observa un aumento del nivel de proteínas al final del desarrollo (Pandian, 1967; Jun-jie *et al.*, 2006). En nuestro caso, el contenido de proteínas aumentó significativamente en los huevos con larvas a punto de eclosionar. Una posible explicación de esta tendencia puede deberse a la utilización del contenido del nitrógeno elemental para estimar las proteínas. Petersen y Anger (1997) sugieren que la formación de otros compuestos nitrogenados en los huevos puede provocar cambios en la relación N:proteínas y que así, los valores estimados de proteínas a partir del contenido en N sean más elevados. Jun-jie *et al.* (2006) explicaron también un aumento similar del contenido proteico por el continuo incremento del contenido total de aminoácidos, los cuales además de ser importantes componentes estructurales, participan en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos (Nelson y Cox, 2013).

En general, la fase embrionaria se caracterizó por un fuerte incremento del contenido de ácidos nucleicos en los huevos. Este incremento indica un aumento del número y tamaño de las células durante el desarrollo del embrión. Sin embargo, las ratios ARN:ADN y ADN:proteínas permitieron identificar a nivel celular tres periodos diferentes durante el desarrollo embrionario. El primero durante la diferenciación del nauplio a zoea (22 a 44 % del desarrollo), en el que la ratio ARN:ADN mostró una elevada actividad de síntesis a nivel celular. Un segundo periodo entre el 44 % y el 79 % del desarrollo, en el que la ratio proteínas:ADN indica una elevada multiplicación celular debido probablemente al crecimiento y diferenciación del embrión. Y un tercer periodo al final de la embriogénesis (>79 % del desarrollo), en el que un aumento de la ratio proteínas:ADN indica que puede tener lugar una hipertrofia celular, al igual que sucede en los momentos previos a la metamorfosis en larvas de peces planos (Fukuda *et al.*, 1986; Christensen y Korsgaard, 1999). Por otro lado, el descenso en las cantidades de ADN y ARN recuperado al final de la embriogénesis probablemente también refleja una mayor proporción de tejido acelular, debido por ejemplo, a la formación de la cutícula, en la que tiene lugar una importante acumulación de sales minerales y quitina (Gorokhova y Kyle, 2002).

El contenido energético de los huevos estimado a partir del contenido en carbono elemental presentó siempre valores inferiores al obtenido mediante el contenido bioquímico. En general, los datos obtenidos en base al carbono elemental parece que subestiman el contenido real de energía en los huevos, mientras que las estimaciones obtenidas a partir de los componentes bioquímicos son algo más realistas. Aun así, estos valores todavía son inferiores al contenido energético real de los huevos, ya que componentes de menor importancia tales como ácidos nucleicos, quitina, etc. no son considerados en las estimas de energía (Urzúa *et al.*, 2012).

Los huevos recientes de *S. arctus* presentaron altos niveles de 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 20:4n-6, 20:5n-3 (EPA), 22:6n-3 (DHA), una característica común con otros huevos de crustáceos decápodos (Wehrtmann y Graeve, 1998; Rosa *et al.*, 2007; Figueiredo y Narciso, 2008). El patrón de utilización de los ácidos grasos durante el desarrollo embrionario puede presentar variaciones interespecíficas (Wehrtmann y Graeve, 1998; Narciso y Morais, 2001; Torres *et al.*, 2008; Calado *et al.*, 2010). En general, en los huevos de *S. arctus* se observó una clara disminución de los ácidos grasos durante el desarrollo embrionario, especialmente de los ácidos grasos insaturados, que se metabolizaron a una tasa más elevada que los saturados. La

utilización preferente de los ácidos grasos insaturados frente a los saturados durante la embriogénesis también ha sido observada en otros crustáceos decápodos (Rosa *et al.*, 2003; Figueiredo y Narciso, 2008). Por otra parte, la aparente menor utilización de los ácidos grasos saturados puede deberse a que estos ácidos grasos no resultan esenciales, ya que pueden ser obtenidos a partir de la desaturación de los ácidos grasos insaturados (Rosa *et al.*, 2003).

El alto contenido de ácidos grasos previa a la eclosión de los huevos de *S. arctus* hace presuponer que las filosomas poseen un remanente energético durante los primeros instantes de su larga vida planctónica. Esta reserva energética a nivel bioquímico se ha podido observar también en otros decápodos marinos (Morais *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2008). Del contenido total de estos ácidos grasos en los huevos de *S. arctus*, un 57 % fueron ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados son componentes principales de los fosfolípidos, los cuales poseen la importante función de mantener la integridad estructural y funcional de las membranas celulares, y la actividad del sistema nervioso del embrión y de la futura larva (Chapelle, 1986). De ahí, que un contenido elevado de estos ácidos grasos en los huevos, principalmente de EPA y DHA, este asociado a una mejora en la tasa de eclosión de los huevos y a un aumento de la supervivencia de las larvas recién eclosionadas (Cavalli *et al.*, 1999, 2001; Jun-jie *et al.*, 2006).

Por otra parte, la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en los huevos a punto de eclosionar indica la necesidad, por parte de las filosomas recién eclosionadas, de un primer alimento rico en esta fracción de ácidos grasos. Esta necesidad se confirma también por la presencia de una importante proporción de EPA y DHA en las filosomas recién eclosionadas de langostas palinúridas (Phleger *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002, 2003). Futuros estudios sobre el desarrollo larvario de *S. arctus* deberían considerar la utilización de dietas enriquecidas con EPA y DHA. Por otro lado, hay que tener en cuenta que este estudio se ha realizado en laboratorio sin conocer la condición nutricional y fisiológica de los reproductores, por lo que la interpretación de los resultados ha de realizarse con precaución. Para confirmar o completar los resultados obtenidos es necesario el estudio de la composición de los embriones procedentes medio natural.

Caracterización biométrica y bioquímica de las puestas de *Scyllarus arctus*

6.1. Introducción

Los invertebrados poseen cierta plasticidad fenotípica, que presumiblemente les permite optimizar el esfuerzo reproductivo bajo diferentes condiciones ambientales (Hadfield y Strathmann, 1996). Esta optimización de los recursos destinados a la reproducción consiste principalmente en un balance entre invertir más por huevo o aumentar la fecundidad (Allen *et al.*, 2008). Este balance plantea la cuestión de cuales son las ventajas que aporta la producción de pocos huevos pero más grandes, en lugar de huevos más pequeños pero en un mayor número. En general, los huevos grandes están asociados con desarrollos larvarios breves (Steele y Steele, 1975; Paschke *et al.*, 2004), una mayor resistencia de las larvas recién eclosionadas a periodos de inanición (Wilhelm y Schindler, 2000; Paschke *et al.*, 2004) y a un mayor tamaño larvario, que puede trasladarse a fases posteriores del ciclo de vida (Giménez, 2006).

Los decápodos marinos, al igual que otros invertebrados, han sido objeto de numerosos estudios por las diferentes estrategias reproductivas que muestran frente a la variación de las condiciones ambientales, principalmente a largo de gradientes latitudinales o batimétricos (Wehrtmann y Kattner, 1998; Lardies y Castilla, 2001; Laptikhovsky, 2006; Fischer y Thatje, 2008; Fischer *et al.*, 2009a; Lardies *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha prestado menos atención a su respuesta frente a los cambios estacionales que se producen en el ambiente, a pesar de ser considerados una importante fuente de variación intraespecífica en la reproduc-

ción de los invertebrados marinos (Ghiselin, 1987). De hecho, el estudio del efecto estacional en la inversión reproductiva de crustáceos marinos, ha permitido identificar una importante fuente de variabilidad en la fecundidad y el tamaño de los huevos en cangrejos braquiuros (Sampedro *et al.*, 1997; Bas *et al.*, 2007; Verísimo *et al.*, 2011; Siders y Koopman, 2013), cangrejos anomuros (Gebauer *et al.*, 2013), camarones (Urzúa *et al.*, 2012) y en langostas (Fonseca-Larios y Briones-Fourzan, 1998; Pérez-González *et al.*, 2012; Koopman *et al.*, 2015). Además, ha permitido constatar que la inversión destinada a la reproducción también puede mostrar importantes variaciones interanuales (Urzúa *et al.*, 2012; Koopman *et al.*, 2015).

Otra importante fuente de variación intraespecífica en la inversión reproductiva importante en decápodos marinos es el tamaño materno, que está fuertemente relacionado con la fecundidad y la calidad de los huevos (Attard y Hudon, 1987; Fischer *et al.*, 2009a). Además, el estado nutricional de los reproductores también puede influir en la inversión destinada a la reproducción (Cahu *et al.*, 1995; Wen *et al.*, 2002; Racotta *et al.*, 2003), aunque este aspecto ha sido poco estudiado en el medio natural.

El tamaño de los huevos es un carácter ampliamente utilizado como indicador de la inversión materna, pero que por sí sólo no refleja la calidad de los huevos (Moran y Mcalister, 2009). Los huevos son lecitotróficos, por lo que el desarrollo del embrión va a depender de la cantidad y calidad de los nutrientes aportados inicialmente por la hembra durante el proceso de ovogénesis. En este sentido, algunos componentes bioquímicos, como los lípidos, son recursos indispensables, ya que representan la fuente más importante de energía y su aporte puede suponer en los crustáceos marinos al menos el 60 % del gasto energético realizado durante la embriogénesis (Wehrtmann y Graeve, 1998). En particular, los ácidos grasos que, además de jugar un papel energético, también formarán parte de las membranas celulares de las nuevas células manteniendo su actividad (p. ej., el transporte de iones) y sus propiedades estructurales (p. ej., frente a cambios en la temperatura), convirtiéndose así en elementos esenciales para el desarrollo y funcionamiento de algunos tejidos, como los que conforman el sistema nervioso (Wu *et al.*, 2007). De ahí, que la presencia y abundancia relativa de los ácidos grasos en la composición inicial de los huevos haya sido relacionada con el número de desoves durante el periodo reproductivo, el número de huevos producidos, el éxito del desarrollo embrionario, la tasa de eclosión de los huevos y la supervivencia larvaria (Racotta *et al.*, 2003).

En una región templada, como en el noroeste de la costa gallega, con una

marcada estacionalidad en la temperatura del mar, que oscila desde los 14°C en invierno hasta los 18.5°C en verano (Gómez-Gesteira *et al.*, 2008), y en la productividad primaria, que se incrementa desde los 0.5-1 mg·m⁻³ (clorofila a) en invierno hasta los 1.5-3 mg·m⁻³ en primavera y verano, debido a dos principales eventos de afloramiento costero (Álvarez *et al.*, 2012); y en la que *S. arctus* muestra un amplio periodo reproductivo, durante el cual puede realizar hasta tres puestas, plantea la cuestión de si la inversión reproductiva realizada por una hembra en número, tamaño y calidad de los huevos en cada puesta varía a lo largo del periodo reproductivo. Si estos aspectos muestran variabilidad, esto podría indicar la presencia de una estrategia reproductiva en *S. arctus* para adaptarse a los cambios ambientales estacionales que se suceden en esta región.

El primer objetivo de este estudio fue medir la variación estacional e interanual en el potencial reproductivo de *S. arctus*, en términos de fecundidad y tamaño de los huevos de las puestas, tanto en estado reciente, como avanzado estado de desarrollo, durante los periodos reproductivos de 2008 y 2009. Un segundo objetivo fue determinar la calidad de los huevos de las puestas recién desovadas, en base a su composición bioquímica, así como el análisis de la variación estacional e interanual, y explorar la influencia de los posibles factores ambientales y maternos que la condicionan.

6.2. Metodología

6.2.1. Muestreo y selección de muestras

Para este capítulo fueron seleccionadas 205 hembras del total de ejemplares muestreados con puestas, tanto en estado reciente de desarrollo embrionario, como en estado avanzado de desarrollo. Para la selección de las muestras se tuvo en cuenta la época de puesta y el estado de desarrollo embrionario, en el periodo comprendido entre Febrero de 2008 y Mayo de 2009 (Tabla 6.1).

Se establecieron tres periodos de puesta debido a la amplitud del periodo de desove durante el ciclo reproductivo, caracterizado por la presencia de hembras ovígeras con huevos en diferentes estados de desarrollo durante la mayor parte del año, la capacidad de realizar hasta tres puestas durante un ciclo reproductivo y a las diferentes condiciones ambientales de cada periodo (temperatura, alimento disponible, etc.). Se estableció una fase temprana del ciclo reproductivo entre Diciembre y Febrero, caracterizada como “puesta de invierno”, una segunda fa-

se entre Abril y Mayo, considerada como “puesta de primavera”, y una tercera fase, la “puesta de verano”, caracterizada por las puestas de las hembras ovadas obtenidas de Julio a Septiembre.

La determinación del estado de desarrollo de las puestas fue realizada según criterios macroscópicos (coloración de los huevos) y microscópicos (desarrollo del embrión y % de ocupación del vitelo). Se consideraron puestas recientes, aquellas constituidas por huevos de color amarillo-anaranjado (RAL® 1028) y con el vitelo ocupando la mayor parte (>95 %) del área del huevo (Periodo de desarrollo embrionario P1-P3, Capítulo 5), y puestas en un estado avanzado de desarrollo, aquellas caracterizadas por huevos de color marrón (RAL® 8001) con larvas desarrolladas y con un área de ocupación del vitelo <10 % o ausente (Periodo P8, Capítulo 5) .

Tabla 6.1. Resumen de las puestas analizadas según el estado de desarrollo embrionario, época de puesta y año.

Año	Época	Reciente		Avanzado
		Características biométricas	Composición bioquímica	Características biométricas
2008	Invierno	27	10	23
	Primavera	31	10	19
	Verano	24	10	21
2009	Invierno	29	10	
	Primavera	31	10	

6.2.2. Determinación de las características biométricas de las puestas

Volumen y diámetro de los huevos

Las muestras de huevos conservadas en formol neutralizado al 4 % fueron examinadas y fotografiadas con una cámara digital Nikon DXM 1200 acoplada al microscopio estereoscópico Nikon SMZ 1500. Con un análisis de imagen (NIS Elements de Nikon) se determinó el diámetro medio (D), mayor y menor de 30 huevos. El volumen del huevo (V) se obtuvo con la fórmula del volumen del elipsoide oblató, $V = \pi \cdot d_1^2 \cdot d_2 / 6$, donde d_1 es el diámetro medio menor y d_2 es el mayor (Turner y Lawrence, 1979).

Determinación del peso del huevo y la fecundidad

El peso seco por huevo y la fecundidad fueron determinados a partir del método gravimétrico. Antes de estimar estos dos parámetros, se realizó una calibración para determinar el tamaño óptimo de muestra de huevos (250, 500, 750 y 1000 huevos), que permite una mejor estimación del peso seco por huevo y, por lo tanto, del número de huevos de toda una puesta (Verísimo *et al.*, 2011). Para la estima del peso seco medio del huevo se utilizaron, de acuerdo al tamaño óptimo seleccionado previamente, tres réplicas de huevos liofilizados de peso conocido. Los huevos de cada réplica fueron separados en una placa Petri con una solución de alcohol al 70 % y contados mediante un microscopio estereoscópico Nikon DXM 1200, provisto de una cámara digital Nikon DXM 1200, con un análisis de imagen (NIS elements de Nikon)(Fig. 6.1). Una vez conocido el peso seco de cada huevo, se estimó la fecundidad de cada puesta a partir del peso seco de toda la puesta.

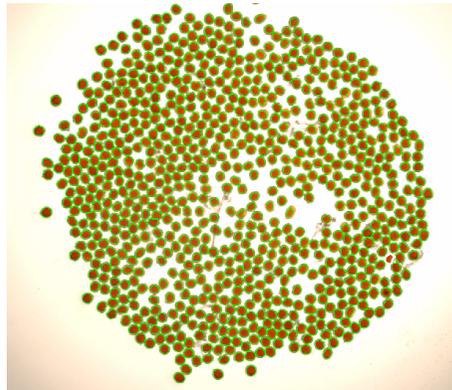


Fig. 6.1. Contaje de huevos con el análisis de imagen

6.2.3. Determinación de la composición bioquímica

Una vez determinado el peso seco del huevo, las muestras de huevos fueron homogeneizadas para analizar su composición bioquímica. La composición bioquímica fue determinada en las puestas con huevos recientes. Se analizaron 10 puestas en cada periodo de puesta (invierno, primavera y verano) durante los años 2008 y 2009 considerados en este estudio (Tabla 6.1). Se determinó el contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, ácidos nucleicos (ADN y ARN), agua y cenizas según las técnicas descritas en la Metodología general (Capítulo 2). El contenido energético de los huevos fue estimado en base al conte-

nido de lípidos, proteínas y carbohidratos (Winberg, 1971), y partir del contenido de carbono obtenido mediante el análisis de la composición elemental (Salonen *et al.*, 1976).

La composición bioquímica los huevos se indica tanto por mg de peso seco como porcentaje del peso seco (composición relativa), y también respecto al contenido de un huevo individual (composición absoluta). El contenido por huevo fue obtenido a partir del contenido bioquímico relativo y el peso seco medio estimado por huevo de cada puesta.

6.2.4. Estudio de las variables implicadas en la inversión por huevo

Determinación del estado nutricional de las hembras

El hepatopáncreas generalmente es utilizado como un indicador del estado nutricional en los crustáceos decápodos, ya que en esta glándula tiene lugar la síntesis y la secreción de enzimas, la digestión, la absorción de nutrientes y el almacenamiento de reservas (Calvo *et al.*, 2011). Además, puede considerarse un buen representante de la inversión materna destinada a la reproducción, dado que el contenido lipídico de los ovarios en desarrollo tiende a ser dependiente de las reservas almacenadas en el hepatopáncreas (Rosa y Nunes, 2002).

Para estimar el estado nutricional de cada hembra se utilizó un índice basado en el peso seco del hepatopáncreas, por ser considerado una buena aproximación de su composición bioquímica (Jones y Obst, 2000; Watts *et al.*, 2014). Dado que el tamaño del hepatopáncreas está relacionado con el tamaño del organismo, se calculó un índice hepatosomático estandarizado (IHS) que permitió la comparación del estado nutricional de hembras recolectadas en diferentes estaciones del año.

Para el cálculo del índice hepatosomático, se transformó la variable longitud del cefalotórax (LC) mediante logaritmos naturales, y se ajustó un modelo lineal generalizado utilizando una familia de distribución de error de tipo gamma y con la función vínculo logarítmica, para linealizar la relación con el peso seco (g) de cada hepatopáncreas (PSH), utilizando los datos de los organismos recogidos desde Febrero de 2008 a Mayo de 2009. A partir de la relación final obtenida ($PSH_i = e^{2.99 \cdot \log LC_i - 11.99}$, $n=1169$) se definió el IHS_i como:

$$IHS_i = PSH_i - \overline{PSH}_i$$

Donde PSH_i representa el peso seco del hepatopáncreas de un individuo i y \overline{PSH}_i es el valor predicho por la regresión para un individuo del mismo tamaño. La interpretación de este índice es sencilla, ya que al estar centrado en cero, que un individuo presente un índice positivo es indicativo de una mayor estado energético respecto a su talla. Por el contrario, un individuo con un menor estado nutricional mostrará un índice negativo.

Estimación de la duración de la ovogénesis

La inversión por huevo que van a mostrar las puestas en el desove depende del proceso de ovogénesis que tiene lugar en los ovarios. Una mayor duración de la ovogénesis puede permitir una mayor acumulación de nutrientes en los ovocitos y provocar cambios temporales en las características de los huevos desovados (Sheader, 1996). Aunque también puede ocurrir el fenómeno contrario, de forma que largos periodos de desarrollo ovárico podrían ser indicadores de una baja eficiencia metabólica en la acumulación de reservas en los huevos.

Para determinar la duración de la ovogénesis se ha utilizado el modelo de Reaumur de duración del desarrollo embrionario (Capítulo 4). Se parte de la premisa de que la duración del periodo de incubación de una puesta es equiparable a la duración del periodo de desarrollo ovárico, y que ambas están relacionadas con la temperatura del agua. El modelo de Reaumur permitió determinar así, que fracción del proceso de ovogénesis tiene lugar cada día a una temperatura dada. Posteriormente, mediante un proceso iterativo de suma acumulada hacia atrás se calcula el número de días necesarios para completar el proceso de ovogénesis para una puesta recién desovada tipo para cada día.

Temperatura en el desove y fotoperiodo

La temperatura y el fotoperiodo son dos importantes variables ambientales que intervienen en el control de la maduración de los ovarios y en la realización de los desoves (Aiken y Waddy, 1989; Matsuda *et al.*, 2002; Hamasaki *et al.*, 2004; Nagaraju, 2011). Así, la variación de estos parámetros a lo largo del periodo reproductivo puede intervenir en la inversión que las hembras destinan a los huevos (Smith *et al.*, 2003; Fischer y Thatje, 2008; Weiss *et al.*, 2009). Las variables consideradas fueron la temperatura y el fotoperiodo durante el desove. Como aproximación de la temperatura en el momento del desove se utilizó la media de los valores de temperatura de los 15 días anteriores a la fecha de muestreo

de cada hembra. Los datos de temperatura utilizados se corresponden a mediciones diarias realizadas en una zona próxima al área objeto de estudio de esta tesis durante el periodo comprendido entre 2007 y 2009 (coordenadas: 43° 23.11' N 8° 24.63' O, datum WGS84; fuente: Aquarium Finisterrae). El fotoperiodo (horas de luz) correspondiente al periodo y zona de estudio fue obtenido mediante el paquete *maptools* del software R (Bivand y Lewin-Koh, 2015).

6.2.5. Análisis de datos

6.2.5.1. Estudio del tamaño óptimo de muestra para la estima del peso del huevo y la fecundidad

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías anidado con el tamaño de muestra como factor fijo y la puesta (o hembra) como factor anidado, para evaluar las variaciones en las estimas del peso del huevo respecto a la utilización de cuatro tamaños diferentes de muestra (250, 500, 750 y 1000 huevos).

6.2.5.2. Análisis de las características biométricas de las puestas

Las características biométricas de las puestas (fecundidad, peso seco de la puesta, peso seco y volumen de los huevos) fueron analizadas en función de la talla de las hembras, el periodo y año del ciclo de puesta, y el estado de desarrollo de los huevos. Según el estado de desarrollo embrionario de las puestas se definió la fecundidad como: fecundidad realizada, fecundidad estimada a partir de puestas con huevos en un estado de desarrollo reciente, y fecundidad efectiva, estimada a partir de puestas con huevos próximos a la eclosión. Para el análisis de datos, fue necesario transformar mediante logaritmos naturales los datos de fecundidad, peso seco de la puesta, LC, peso seco y volumen del huevo (Somers, 1991).

Para estudiar la influencia de la talla se ajustaron regresiones lineales entre cada variable con la LC mediante mínimos cuadrados. Las diferencias temporales en los dos ciclos reproductivos, tanto de puestas de huevos en estado reciente como avanzado, se analizaron mediante análisis de covarianza (ANCOVA) utilizando LC como covariable. Se realizaron ANCOVAs de dos vías para evaluar las diferencias en las características reproductivas entre años (2008 y 2009) y estaciones (invierno, primavera y verano) para puestas de huevos en estado reciente. Para puestas de huevos en estado avanzado, se llevaron a cabo ANCOVAs de una

vía para evaluar las diferencias en las características reproductivas entre estaciones durante el año 2008. Además, se realizó un ANCOVA de dos vías entre la fecundidad realizada y efectiva con los factores estación y estado, para evaluar la variabilidad estacional en la pérdida de huevos durante el período de incubación durante el periodo reproductivo de 2008. Las interacciones entre los factores categóricos (año, estación y estado) y la covariable LC fueron probadas en todos los análisis. Dado que las interacciones no fueron significativas (homogeneidad de pendientes), los términos de interacción fueron eliminados y los modelos fueron reajustados.

El coeficiente de correlación de Pearson fue utilizado para evaluar la relación lineal entre el peso y el volumen de los huevos. Finalmente, las diferencias en el peso y el volumen de los huevos entre estados de desarrollo y periodos de desove fueron evaluadas utilizando mínimos cuadrados generalizados (GLS), utilizando la estructura de la varianza identidad, dada la heterogeneidad observada entre estados de desarrollo (Pinheiro y Bates, 2000).

6.2.5.3. Modelo de fecundidad que incorpora la variabilidad temporal

En una etapa posterior, se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM) para analizar las variaciones de la fecundidad inicial y la importancia relativa de diferentes variables potencialmente relacionadas con la variable respuesta, con el fin de desarrollar un modelo predictivo de la fecundidad a lo largo del ciclo reproductivo. Las variables de predicción consideradas fueron: el mes (M), LC y el volumen del huevo. El estudio de la distribución de los residuos respecto a las variables estudiadas previa a su inserción en el modelo permitió determinar un patrón para la variable mes, que fue incluida en el modelo con un término cuadrático. Se comenzó con un modelo donde fueron incluidas todas las variables. En el proceso de selección de variables (por eliminación secuencial), se utilizaron el criterio de información de Akaike (AIC ; Akaike, 1974) y el porcentaje de la varianza explicada (devianza- D^2) para detectar la importancia relativa de cada variable y determinar las variables que deben incluirse en el modelo final y en qué orden (Zuur *et al.*, 2007). El análisis de la devianza para evaluar la significación de las variables incluidas en el modelo final se llevó a cabo también por un procedimiento paso a paso (prueba F). La elección del modelo, la función vínculo más adecuada y la distribución del error se hicieron en base a la distribución de los residuos. Una distribución gamma con una función vínculo "log" resultó ser

la más adecuada, lo que implica que las variables explicativas tienen un efecto multiplicativo en el parámetro de respuesta (Green *et al.*, 2009). El modelo final obtenido fue:

$$\log(E(\widehat{FE}_i)) = \eta_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot \log LC + \beta_2 \cdot M^2 + \beta_3 \cdot M$$

Donde la fecundidad media $E(\widehat{FE}_i) = \mu_i$ para una observación i es estimada por $\widehat{\mu}_i = \exp(\eta_i)$.

6.2.5.4. Estudio del potencial reproductivo

El potencial reproductivo fue analizado respecto a la estructura de tallas y la proporción de hembras ovadas del stock capturadas durante un año de muestreo, desde Febrero de 2008 a Enero de 2009. Para estimar el potencial reproductivo relativo (PRR), se aplicó el modelo de fecundidad determinado previamente a cada hembra ovígera capturada según el mes de captura. El PRR fue obtenido para cada mes o para cada clase de talla según la siguiente expresión:

$$PRR1_m = \frac{\sum_{j=1}^G Nov_{m,j} \cdot FE_{m,j}}{\sum_{m=1}^{12} \sum_{j=1}^G Nov_{m,j} \cdot FE_{m,j}} \cdot 100 \quad PRR1_j = \frac{\sum_{m=1}^{12} Nov_{m,j} \cdot FE_{m,j}}{\sum_{j=1}^G \sum_{m=1}^{12} Nov_{m,j} \cdot FE_{m,j}} \cdot 100$$

Donde $Nov_{m,j}$ es la proporción de hembras ovígeras y $FE_{m,j}$ es la fecundidad estimada respecto al mes de captura m y la clase de talla de cada hembra ovígera j .

Se realizó una segunda aproximación utilizando la proporción de hembras maduras (Pm_j , obtenida a partir de la ecuación logística ajustada para estimar la talla de madurez sexual, Capítulo 4), la proporción de hembras (N_j) y la fecundidad (FE_j) de cada clase de talla j (Tully *et al.*, 2001). La fecundidad fue determinada sin permitir la variación mensual (se fijó un mes para todas las estimas de fecundidad). El PRR fue calculado a partir de la expresión:

$$PRR2_j = \frac{Pm_j \cdot FE_j N_j}{\sum_{j=1}^G Pm_j \cdot FE_j N_j} \cdot 100$$

Las diferencias en las distribuciones del PRR fueron analizadas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (prueba K-S).

6.2.5.5. Análisis de la composición bioquímica

La composición bioquímica absoluta de las puestas fue evaluada según el periodo de puesta en cada año del ciclo reproductivo (2008, 2009) mediante un ANCOVA con la covariable LC, mientras que la composición bioquímica relativa fue evaluada con ANOVAs. Además se evaluó la presencia de diferencias interanuales utilizando en los análisis como factores el periodo de puesta y el año. Para determinar el efecto de la talla en la composición relativa de las puestas se realizaron análisis de regresión por mínimos cuadrados con cada componente y la LC.

6.2.5.6. Análisis de los perfiles de ácidos grasos

Para estudiar la variabilidad temporal en la composición de ácidos grasos en las puestas, el contenido de cada ácido graso fue expresado como porcentaje respecto al contenido total de ácidos grasos. Para los análisis, se seleccionaron aquellos ácidos grasos con una concentración media superior al 1 % en el perfil completo de ácidos grasos identificados en todas las puestas. A estos perfiles de ácidos grasos y a las fracciones que los agrupan (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) se les aplicó un análisis de componentes principales (PCA) para explorar similitudes entre las puestas analizadas. El PCA permitió también determinar la contribución de cada ácido graso y fracción a la separación entre los periodos de puesta en base a la combinación lineal de las variables que componen los componentes principales, en base la dirección dada por el autovector y su magnitud, que es el autovalor.

Para investigar en detalle los cambios temporales en los perfiles de ácidos grasos de las puestas, se realizó un análisis de similaridad con los factores temporales año y estación (ANOSIM de dos vías; 9999 permutaciones) sobre la matriz de similaridad obtenida mediante el índice de Bray-Curtis. La interpretación se centró principalmente en el valor ANOSIM-R, más que en el nivel de significación debido al pequeño número de muestras utilizadas. Los valores de ANOSIM-R > 0.75 indican una fuerte separación entre los grupos, R > 0.5 indica cierto grado de solapamiento, pero formando grupos claramente diferentes, y valores de R < 0.25 indican que los grupos apenas están separados (Clarke y Gorley, 2006). Posteriormente se utilizó el procedimiento de análisis de porcentaje de similitudes (SIMPER, 9999 permutaciones) para explorar que ácidos grasos generan el patrón observado e identificar los ácidos grasos con mayor influencia.

Las diferencias estacionales en la composición relativa de los ácidos grasos en las puestas fueron evaluadas según el periodo de puesta en cada ciclo reproductivo (2008, 2009) mediante ANOVAs. Además se evaluó la presencia de diferencias interanuales utilizando en los análisis como factores el periodo de puesta y el año.

6.2.5.7. Estudio de los factores que determinan la inversión por huevo

Un primer paso fue la realización de un análisis visual del comportamiento de cada variable (temperatura en el desove, duración de la ovogénesis, fotoperiodo y estado nutricional) a lo largo del año durante 2008 y 2009. Para el caso particular del estado nutricional de las hembras a lo largo del año, el IHS calculado fue analizado mediante un modelo aditivo generalizado (GAM). Este tipo de modelo permite evaluar la trayectoria no lineal del estado energético de las hembras en relación a una variable explicativa, en este caso el día:

$$IH_i = \alpha + f_1(Día) + \varepsilon_i$$

Donde *Día* es el día ordinal, número de días desde el 1 de Enero de 2008, α es la intersección, f_1 es una función suave de los datos y ε_i es el error residual.

Antes de analizar qué factores tienen efecto sobre la inversión por huevo, se investigó la presencia de colinealidad entre las variables objeto de estudio mediante gráficas de dispersión, coeficientes de correlación de Spearman y mediante el factor de inflación (FIV) de la varianza (Zuur *et al.*, 2007). También se analizó la relación de cada variable con la inversión por huevo de forma individual mediante un GAM. Como indicador de la inversión por huevo se utilizó el contenido en lípidos de los huevos ($\mu\text{g} \cdot \text{huevo}^{-1}$), al considerarse la principal fuente de energía de los embriones de *S. arctus* durante el desarrollo embrionario (Capítulo 5).

Finalmente, se decidió aplicar un método de suavizado como el GAM porque los análisis preliminares mostraron que la relación entre la variable respuesta (μg de lípidos $\cdot \text{huevo}^{-1}$) y algunas de las variables predictoras (p. ej. duración ovogénesis y día ordinal) no fue lineal (Fig. 6.12). Para el ajuste del modelo aditivo, el número óptimo de grados de libertad de cada función de suavizado se obtuvo mediante validación cruzada (Wood, 2006). En el proceso de validación del modelo se utilizó la prueba de Razón de Verosimilitud para comparar modelos anidados (Wood, 2006). Todos los GAMs fueron ajustados utilizando el paquete *mgcv* en R (Wood, 2011).

6.2.5.8. Normalidad y homogeneidad

La normalidad y homogeneidad de varianza de los residuos de los análisis realizados (ANOVAs y ANCOVAs) fueron evaluados mediante la prueba de Shapiro ($P>0.05$) y la prueba de Bartlett ($P>0.05$). Cuando los residuos de los análisis no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó una transformación de Box-Cox a los datos, determinada con el paquete estadístico MASS de R. Cuando se encontraron diferencias significativas, éstas fueron analizadas mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P<0.05$).

En los modelos ajustados (GLM y GAM) se comprobó la normalidad y la presencia de valores anómalos mediante el protocolo descrito por (Zuur *et al.*, 2010).

6.3. Resultados

6.3.1. Características biométricas

6.3.1.1. Tamaño óptimo de muestra

El estudio del tamaño óptimo de muestra encontró diferencias significativas en el peso medio por huevo entre los diferentes tamaños de muestra utilizados (ANOVA anidado, $F_{(3,250)}=6.32$, $P<0.001$). El peso por huevo estimado a partir del tamaño de muestra de 250 huevos fue diferente al determinado con el resto de tamaños de muestra (500, 750 y 1000 huevos), en los que las estimas del peso por huevo no mostraron variaciones significativas. No obstante, se seleccionó para este estudio el tamaño de muestra de 750 huevos, por ser él tamaño de muestra que presentó una menor variabilidad en las estimas del peso seco por huevo (Fig 6.2).

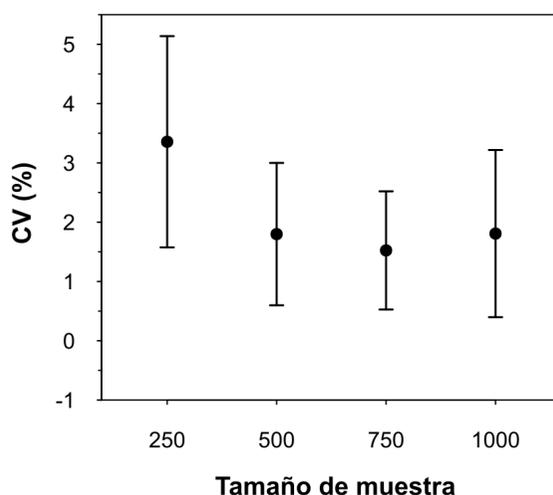


Fig. 6.2. Coeficiente de variación medio (CV) en las estimas del peso del huevo para cada tamaño de muestra. Las barras de error indican la desviación típica.

Las estimas realizadas del peso por huevo en las puestas analizadas, con el tamaño de muestra seleccionado, mostraron un coeficiente de variación medio <1 % (IC95 %: 0.81-0.96 %).

6.3.1.2. Esfuerzo reproductivo

Para la estimación de la fecundidad realizada de las hembras de *S. arctus* se utilizaron 142 individuos con un rango de tallas comprendido entre 24.4 y 44.8 mm (34.5 ± 4.0 mm, $M \pm DT$), y un peso húmedo corporal entre 11.8 y 71.9 g (35.2 ± 12.1 g). Las puestas estudiadas presentaron una gran variabilidad tanto en peso, con un peso húmedo entre 0.76 y 7.03 g (2.74 ± 1.11 g) y un peso seco entre 0.32 y 2.50 g (1.05 ± 0.40 g), como en el número de huevos: 14,370-108,029 huevos ($45,292 \pm 16,265$ huevos). La inversión en peso de la puesta respecto al peso corporal de esta langosta osciló durante el ciclo reproductivo entre un 4.9 % y un 12.1 % (7.7 ± 1.1 %). La producción de huevos por gramo corporal también mostró una gran variación, con un rango de 924.6 a 1742.2 huevos \cdot g⁻¹ (1293.5 ± 175.5 huevos \cdot g⁻¹).

La fecundidad efectiva fue determinada para un rango de tallas similar al utilizado para la determinación de la fecundidad realizada, entre 28.5 y 44.6 mm (35.3 ± 4.4 mm, $M \pm DT$; N=63), y un peso húmedo corporal entre 18.2 y 73.4 g

(37.7 ± 13.4 g). El número de huevos estimado en las puestas con huevos avanzados osciló entre 11,425 y 77,417 huevos (37141 ± 16587 huevos) para un peso húmedo de la puesta entre 1.04 y 9.58 g (3.89 ± 1.82 g), y un peso seco de 0.23 a 1.80 g (0.85 ± 0.39 g). El número medio de huevos por gramo corporal determinado para puestas en estado avanzado fue de 987.7 huevos \cdot g⁻¹ (DT=212.3 huevos \cdot g⁻¹; rango: 551.9-1418.7 huevos \cdot g⁻¹).

En lo que se refiere a los huevos individuales, el volumen de los huevos recién desovados se incrementó un 22.2 % desde $499 \pm 62 \cdot 10^{-4}$ mm³ (M \pm DT) hasta los $610 \pm 67 \cdot 10^{-4}$ mm³ (huevos en estado avanzado). El diámetro medio de los huevos recientes (459 ± 19 μ m) también aumentó un 6.8 % hasta los 490 ± 18 μ m en los huevos en estado avanzado. Respecto al peso seco individual, los huevos recientes presentaron una gran variación, oscilando desde 19.1 a 29.2 μ g (23.3 ± 2.2 μ g), mientras que para huevos a punto de eclosionar, el peso medio varió entre 15.6 y 27.1 μ g (22.2 ± 2.1 μ g).

6.3.1.3. Influencia del tamaño materno

La fecundidad y el peso de la puesta mostraron una fuerte relación con la talla de las hembras en las puestas recientes, medida como LC, con valores de R² que oscilaron entre 0.713-0.953 (Tabla 6.2). Tanto la relación de la fecundidad como el peso de la puesta con la talla, con unas pendientes medias estimadas de 2.86 (IC95 %: 2.68-3.03) y 3.10 (IC95 %: 2.95-3.27) respectivamente, indican la existencia de una isometría (b=3; prueba t, P=0.10). La influencia de la talla en el tamaño de la puesta permaneció constante entre las estaciones analizadas (ANCOVA, homogeneidad de pendientes, P>0.08; Tabla 6.3). Por otra parte, el tamaño relativo de la puesta (número de huevos por gramo de peso corporal) no mostró ninguna relación con el tamaño de las langostas (coeficiente de Pearson, r=0.05, P=0.43).

Respecto a las características de los huevos de puestas recientes, el tamaño materno tuvo un efecto significativo en el peso del huevo (P<0.001; Tabla 6.3), permitiendo explicar el 9.3 % de la varianza total. La relación entre el peso del huevo y la talla mostró una pendiente media de 0.25 (IC95 %: 0.16-0.34; Tabla 6.2). Por otra parte, el volumen de los huevos no presentó ninguna relación con la talla de las hembras (ANCOVA, P=0.15), aunque sí mostró una correlación positiva con el peso del huevo (coeficiente de Pearson, r=0.55, P<0.001).

Tanto la fecundidad como el peso de las puestas en estado avanzado de desarrollo mostraron una relación positiva significativa con la talla de las langostas

($P < 0.001$; Tabla 6.3), a pesar de la evidente pérdida de huevos que tiene lugar durante el periodo de incubación (Fig. 6.3). Esta pérdida de huevos constante sobre el rango de tallas analizado (homogeneidad de pendientes; ANCOVA dos vías, $P > 0.08$) permite que un alto porcentaje de la variación del tamaño de las puestas en estado avanzado sea explicado por la talla de las hembras ($>75\%$).

Por otra parte, la influencia del tamaño materno sobre el peso del huevo permaneció en huevos en estado avanzado de desarrollo ($P < 0.001$; Tabla 6.3), con una pendiente media de 0.22 (IC95 %: 0.07-0.37) y explicando el 18.9 % de la varianza. Para el volumen, no se encontró ninguna relación significativa con la talla de los individuos ($P = 0.28$) o el peso del huevo (coeficiente de Pearson, $r = 0.10$, $P = 0.42$).

Tabla 6.2. Relaciones Log-Log ajustadas entre la fecundidad (FE), el peso seco (PS) de la puesta y por huevo con la longitud del cefalotórax (mm) para cada estación durante 2008 y 2009 en puestas recientes y en estado avanzado de desarrollo. Se indican los coeficientes estimados y su error estándar, el coeficiente de determinación (R^2), el valor de la prueba F y su significación (P), y el número de muestras utilizadas (N)

Puestas de huevos	Rasgo reproductivo	Año	Estación	a	b	R ²	F	P	N
Estado reciente	FE (n.º de huevos)	2008	Invierno	0.19 (0.53)	2.95 (0.15)	0.935	376.1	<0.001	27
			Primavera	0.27 (0.64)	2.96 (0.18)	0.902	276.2	<0.001	31
			Verano	2.17 (1.11)	2.39 (0.31)	0.713	58.1	<0.001	24
		2009	Invierno	0.31 (0.61)	2.90 (0.17)	0.910	283.9	<0.001	29
			Primavera	-0.20 (0.81)	3.10 (0.23)	0.855	178.2	<0.001	31
	PS puesta (g)	2008	Invierno	-11.13 (0.59)	3.14 (0.17)	0.931	349.7	<0.001	27
			Primavera	-11.40 (0.55)	3.23 (0.15)	0.936	439.4	<0.001	31
			Verano	-9.85 (1.01)	2.75 (0.29)	0.799	92.5	<0.001	24
		2009	Invierno	-11.46 (0.48)	3.24 (0.14)	0.953	570.8	<0.001	29
			Primavera	-10.92 (0.84)	3.10 (0.24)	0.849	169.2	<0.001	31
PS huevo (µg)	2008	Invierno	2.49 (0.34)	0.20 (0.10)	0.106	4.1	0.054	27	
		Primavera	2.14 (0.29)	0.27 (0.08)	0.251	11.1	0.002	31	
		Verano	1.79 (0.45)	0.37 (0.13)	0.237	8.1	0.009	24	
	2009	Invierno	2.05 (0.42)	0.34 (0.12)	0.205	8.2	0.008	29	
		Primavera	3.10 (0.29)	0.00 (0.08)	-0.034	0.0	0.994	31	
Estado avanzado	FE (n.º de huevos)	2008	Invierno	-2.03 (1.31)	3.51 (0.37)	0.803	90.8	<0.001	23
			Primavera	-2.19 (1.65)	3.57 (0.46)	0.766	59.9	<0.001	19
			Verano	0.58 (1.60)	2.74 (0.46)	0.637	36.0	<0.001	21
	PS puesta (g)	2008	Invierno	-14.04 (1.16)	3.89 (0.32)	0.866	143.2	<0.001	23
			Primavera	-13.24 (1.44)	3.67 (0.4)	0.822	84.2	<0.001	19
			Verano	-11.15 (1.53)	3.01 (0.44)	0.700	47.6	<0.001	21
		2008	Invierno	1.81 (0.60)	0.38 (0.17)	0.160	5.2	0.033	23
			Primavera	2.76 (0.39)	0.1 (0.11)	0.379	0.8	0.379	19
			Verano	2.08 (0.41)	0.27 (0.12)	0.182	5.5	0.031	21
	PS huevo (µg)	2008							

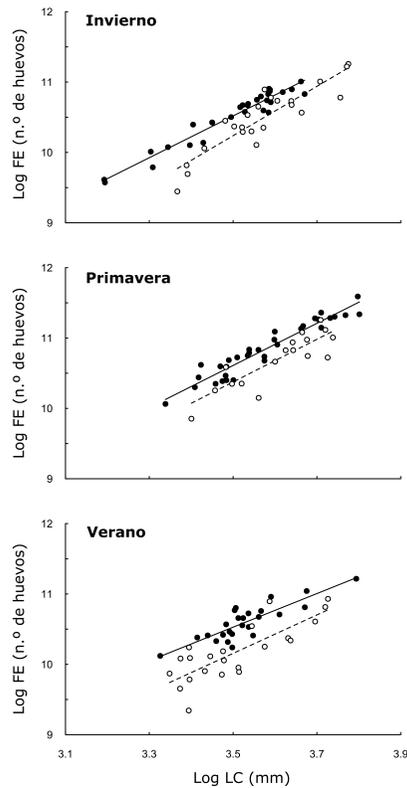


Fig. 6.3. Pérdida de huevos en cada estación (invierno, primavera y verano) durante 2008. Se representan las relaciones Log-Log entre la fecundidad realizada (puntos negros y línea sólida) y efectiva (puntos blancos y línea discontinua) con la talla de las hembras de *S. arctus* (LC, mm). Las ecuaciones de regresión ajustadas se muestran en la Tabla 6.2.

6.3.1.4. Variación temporal

Los ANCOVAs mostraron una variabilidad temporal significativa, tanto estacional como interanual, en el tamaño de las puestas (fecundidad y peso) y de los huevos (peso y volumen) recientes durante el ciclo reproductivo, siendo la estación del año la principal fuente de variación (Tabla 6.3). La fecundidad realizada de una hembra en primavera fue un 17.3 % superior a la fecundidad de una puesta desovada en invierno y un 13.4 % respecto al verano (Fig. 6.4a). Esta variación estacional también se observó en el peso de la puesta, la inversión realizada en las puestas de invierno y verano fue menor que en las puestas de primavera, un 4.4 % y un 15.3 % respectivamente (Fig. 6.4c).

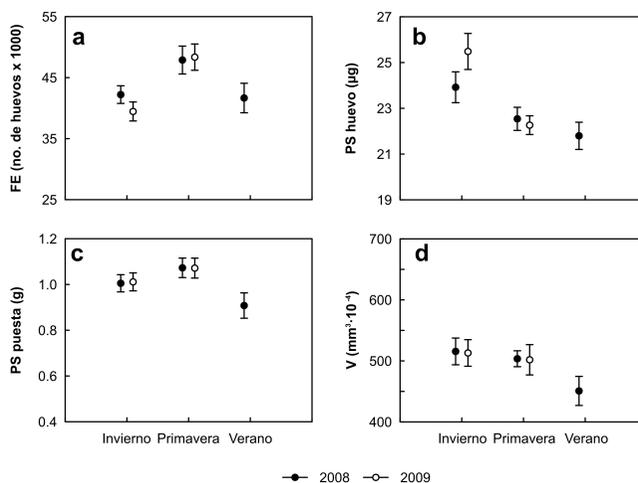


Fig. 6.4. Variación temporal de la fecundidad (FE, n.º de huevos), la inversión en peso seco (PS) de la puesta, el peso seco y volumen de los huevos de puestas recientes en cada estación (invierno, primavera y verano) durante 2008 y 2009. Los puntos representan el valor predicho de cada rasgo reproductivo en cada estación para una talla de 35 mm LC, a excepción del volumen de los huevos que es el valor medio de los datos. Las barras de error indican el intervalo de confianza al 95 %

En el invierno, las puestas recientes mostraron una mayor inversión en peso seco respecto a los períodos de primavera y verano, del 12.2 % y 14.1 %, respectivamente (Fig. 6.4c). El peso del huevo también mostró diferencias entre años e interacciones significativas con la estación ($P < 0.006$, 6.3). El peso medio del huevo en la primavera de los dos años de estudio fue similar ($22.4 \pm 1.2 \mu\text{g}$, $M \pm DT$), mientras que los huevos de invierno de 2009 ($25.9 \pm 2.1 \mu\text{g}$) fueron un 7.5 % más pesados que los del invierno de 2008 ($24.1 \pm 1.7 \mu\text{g}$) (Fig. 6.4b). Por otra parte, aunque el volumen de los huevos no varió significativamente entre las puestas realizadas en invierno ($526 \pm 50 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$) y en primavera ($503 \pm 56 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$), este se vió reducido en las puestas de verano un 10.2 % ($462 \pm 68 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$) (Fig. 6.4d).

Las puestas con huevos próximos a la eclosión conservaron el patrón estacional observado en las puestas recientes en la fecundidad, peso de la puesta y peso del huevo, a pesar de la variabilidad generada por la pérdida de huevos y los cambios que se producen en los huevos durante el periodo de incubación ($P < 0.02$; Tabla 6.3).

Respecto a la fecundidad realizada, las puestas de primavera presentaron un mayor número de huevos que las puestas de invierno (11 %) y verano (24 %),

aunque sólo estas diferencias fueron significativas con respecto a las puestas de verano (Fig. 6.5a). El estudio entre la fecundidad realizada y efectiva durante el año 2008 mostró una pérdida evidente de huevos en las puestas (ANCOVA dos vías, $F_{(1,142)}=94.6$, $P<0.001$). Esta pérdida de huevos fue igualmente proporcional entre las épocas analizadas y se estimó que supone el 31.3 % del número de huevos inicial en las puestas (ANCOVA dos vías, $F_{(2,142)}=1.6$, $P=0.20$; Fig. 6.3). Por otra parte, la inversión efectiva en el peso de la puesta mostró una disminución significativa del 28.2 % y 34.1 % en las puestas de verano respecto a las puestas de invierno y primavera, respectivamente (Fig. 6.5c).

El peso de los huevos de las puestas en estado avanzado experimentó una reducción significativa del 12.7 % y 7.5 % en las puestas de verano respecto a las puestas del invierno y primavera, respectivamente (Fig. 6.5b). No se observaron diferencias significativas en el volumen de los huevos entre los periodos de puesta analizados ($P=0.363$), por lo que se estimó un volumen medio para los tres periodos de puesta de $605 \pm 92 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3 (\pm \text{DT})$. En comparación a los huevos de las puestas recientes, los huevos de las puestas en estado avanzado mostraron un aumento significativo de su volumen inicial (GLS, $P<0.001$). El incremento medio de volumen estimado fue de un $25.4 \pm 9.5 \% (\pm \text{DT})$.

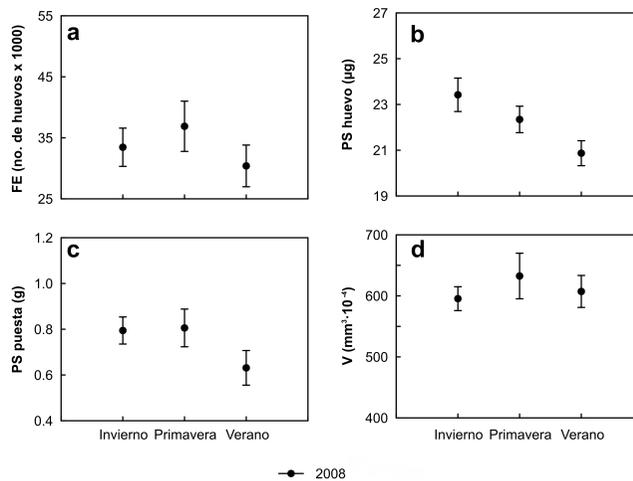


Fig. 6.5. Variación temporal de la fecundidad (FE, n.º de huevos), la inversión en peso seco (PS) de la puesta, el peso seco (PS) y volumen (V) de los huevos de puestas en estado avanzado de desarrollo en cada estación (invierno, primavera y verano) durante 2008 y 2009. Los puntos representan el valor predicho de cada rasgo reproductivo en cada estación para una talla de 35 mm LC, a excepción del volumen de los huevos que es el valor medio de los datos. Las barras de error indican el intervalo de confianza al 95 %

Tabla 6.3. ANCOVAs de dos vías evaluando diferencias en las características de las puestas entre épocas de puesta y años con la talla de las hembras como covariable (LC, mm). Las características analizadas son la fecundidad (FE), la inversión en peso seco (PS) de la puesta y el peso seco (PS) y volumen (V) de los huevos. Las diferencias significativas son representadas con asteriscos (* P<0.05; ** P<0.01, *** P<0.001) y las no significativas con ^{ns}.

Puestas de huevos	Rasgo reproductivo	Fuente de variación	gl	SC	F	P	
Estado reciente	Log FE (n.º de huevos)	Log LC	1	16.259	1120.11	< 0.001	***
		Año	1	0.001	0.07	0.796	ns
		Estación	2	0.798	27.49	< 0.001	***
		Año x Estación	1	0.063	4.34	0.039	*
		Error	136	1.974			
	Log PS puesta (g)	Log LC	1	18.983	1477.89	< 0.001	***
		Año	1	0.085	6.65	0.011	*
		Estación	2	0.274	10.66	< 0.001	***
		Año x Estación	1	0.007	0.52	0.471	ns
		Error	136	1.747			
	Log PS huevo (µg)	Log LC	1	0.1054	29.07	< 0.001	***
		Año	1	0.0682	18.81	< 0.001	***
		Estación	2	0.4415	60.89	< 0.001	***
		Año x Estación	1	0.0285	7.87	0.006	**
		Error	136	0.4931			
	Log V (10 ⁻⁴ mm ³)	Log LC	1	0.0287	2.09	0.150	ns
		Año	1	0.0182	1.33	0.251	ns
		Estación	2	0.1842	6.71	0.002	**
		Año x Estación	1	0.0073	0.53	0.467	ns
		Error	136	1.8668			
Estado avanzado	Log FE (n.º de huevos)	Log LC	1	9.808	204.70	<0.001	***
		Estación	2	0.412	4.30	0.018	*
		Error	59	2.827			
	Log PS puesta (g)	Log LC	1	12.251	279.74	<0.001	***
		Estación	2	0.940	10.74	<0.001	***
		Error	59	2.584			
	Log PS huevo (µg)	Log LC	1	0.136	20.87	<0.001	***
		Estación	2	0.197	15.15	<0.001	***
		Error	59	0.384			
	Log V (10 ⁻⁴ mm ³)	Log LC	1	0.035	1.18	0.282	ns
		Estación	2	0.062	1.03	0.363	ns
		Error	59	1.758			

6.3.1.5. Modelo de fecundidad que incorpora la variabilidad temporal

El análisis de la variación de la fecundidad con respecto a la talla y épocas de puesta, pone de manifiesto el interés de elaborar un modelo para predecir la fecundidad a lo largo del período reproductivo de *S. arctus*. Para ello, los datos mensuales de fecundidad de 2008 y 2009 fueron analizados conjuntamente al no encontrarse diferencias significativas en la fecundidad entre años.

El modelo que solo tuvo en cuenta la talla de las hembras explicó un 85.12 % de la variación de la fecundidad (Tabla 6.4), mientras que la incorporación del mes como término polinómico ($M + M^2$) permitió explicar un 5.87 % más de la devianza total (90.98 %). El modelo que presentó el menor AIC fue el que incluyó todas las variables (LC, M y V), siendo todas ellas significativas ($P \leq 0.002$). Aunque en este modelo, el volumen de los huevos solo llegó a explicar un 0.60 % adicional de la devianza. Además, este modelo presentó una disminución de 7 unidades en el AIC, que no supone una evidencia de mejora del modelo (Burnham, K.P. y Anderson, 2004). Por lo tanto, en base a estos criterios se decidió seleccionar un modelo más simple que no incluyera esta variable. Tampoco se encontró evidencia de una interacción de la talla con el mes del ciclo reproductivo en las estimas de fecundidad ($F=3.10$, $P>0.05$), por lo que se propone como mejor modelo para evaluar la fecundidad realizada, el que incluyó las variables LC y el mes (AIC=2945), donde todos los términos fueron significativos ($P<0.001$). De este modo, la variable mes permite explicar la relación de la fecundidad de esta langosta con la talla, con una pendiente común de 2.91 (95 % CI: 2.76-3.06) y una intersección diferente para cada mes durante el ciclo reproductivo anual (Fig. 6.6). Teniendo en cuenta todo lo anterior, se propone la siguiente expresión para la predicción de la fecundidad de *S. arctus* a lo largo del período reproductivo:

$$\log(E(\widehat{FE}_i)) = \eta_i = 0.064 + 2.907 \cdot \log LC + 0.018 \cdot M^2 + 0.174 \cdot M$$

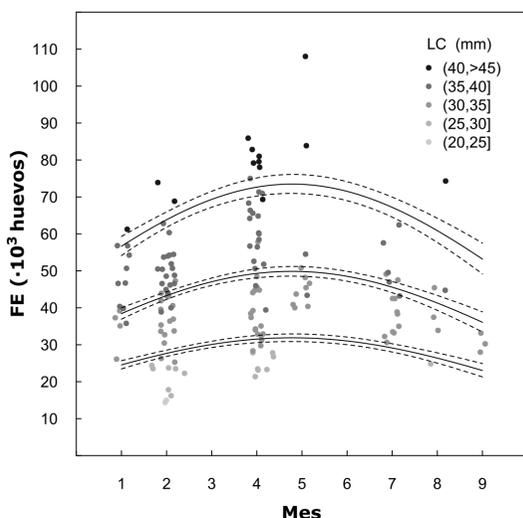


Fig. 6.6. Estimación de la fecundidad realizada mensual (FE, n.º de huevos) durante el ciclo reproductivo de *S. arctus* (Enero-Septiembre). Los puntos representan estimas de fecundidad para cada individuo y la escala de grises indica la clase de talla a la que pertenecen. Las líneas continuas muestran la fecundidad predicha para distintas tallas (30, 35 y 40 mm de LC) durante el período de desove, mientras que las líneas discontinuas indican el intervalo de confianza al 95 %

Tabla 6.4. Resultados del ajuste secuencial de modelo para la fecundidad realizada con los términos longitud de cefalotórax (LC), mes (M) y volumen del huevo (V). Las columnas representan los grados de libertad correspondientes al término añadido (*gl*), grados de libertad residuales para cada modelo (Res. *gl*), la devianza (D^2), la devianza residual (Res. D^2), la devianza residual explicada (Exp. D^2 , %), el P-valor cuando se utiliza la prueba de F como prueba de significación y el valor de *AIC*

Modelo	Parámetros	gl	Res. gl	D^2	Res. D^2	Exp. D^2	F	P	AIC
Nulo			148		19.25				
Log LC	$\beta_0 = 0.45 \pm 0.35, \beta_1 = 2.89 \pm 0.10$	1	147	16.39	2.87	85.12	1466.3	< 0.001	3016
+ M ² + M	$\beta_0 = 0.07 \pm 0.27, \beta_1 = 2.91 \pm 0.08, \beta_2 = -0.02 \pm 0.00, \beta_3 = 0.17 \pm 0.02$	2	145	1.13	1.74	90.98	50.5	< 0.001	2945
+ V	$\beta_0 = 0.22 \pm 0.27, \beta_1 = 2.93 \pm 0.07, \beta_2 = -0.02 \pm 0.00, \beta_3 = 0.17 \pm 0.02, \beta_4 = -4.69 \pm 1.47$	1	144	0.12	1.62	91.59	10.4	< 0.01	2937

6.3.1.6. Potencial reproductivo

Las distribuciones del potencial reproductivo relativo (PRR) estimado por ambos métodos (PRR1: estructura de tallas, proporción de hembras ovadas y fecundidad temporal; PRR2: estructura de tallas, proporción de hembras maduras y fecundidad fija) fueron similares a la distribución de tallas de las hembras captu-

radas (prueba K-S, $P > 0.40$). El valor modal de producción de huevos respecto a la clase de talla para la población estudiada fue el mismo en ambas distribuciones y se situó en el intervalo 34.5-36.5 mm LC (Fig. 6.7). Según el PRR1, las clases de tallas comprendidas en este intervalo produjeron el 31 % de la producción total de huevos de la población. Las clases de talla por debajo de la talla mínima de captura permitida de 90 mm LT (29.5 mm LC) representaron el 7% de las hembras capturadas y el 3% de la producción de huevos. Para poder proteger un mayor porcentaje de la producción de huevos de la población, por ejemplo un 40 %, sería necesario incluir las clases de talla menores de 35 mm LC (108 mm LT).

La distribución mensual del PRR permitió asignar el 99 % de producción anual de huevos al periodo comprendido entre Enero y Septiembre. Durante este periodo se distingue un valor modal del PRR en Abril, mes en el que se produjo el 30 % de la producción anual de huevos (Fig. 6.7). Por otro lado, la alta proporción de hembras capturadas registrada durante el periodo Abril-Julio llegó a suponer el 65 % de la producción anual de huevos.

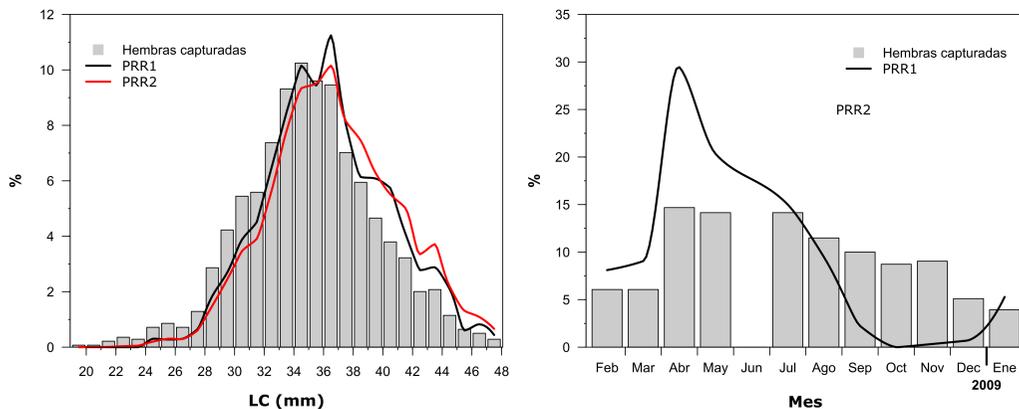


Fig. 6.7. Distribución del potencial reproductivo relativo (PRR) por cada clase de talla (arriba) y por mes (abajo) respecto al porcentaje de hembras capturadas durante el periodo Febrero de 2008 a Enero 2009. El PRR1 está basado en la estructura de tallas y la fecundidad estimada mensual de las hembras ovígeras. El PRR2 se estimó a partir de la estructura de tallas, la proporción de hembras maduras y la fecundidad estimada por clase de talla (sin variación mensual de fecundidad). El intervalo de clase de talla es 1 mm

6.3.2. Composición bioquímica

El principal componente los huevos recientes en *S. arctus* fue el agua (61.4 % del peso húmedo), mientras que la biomasa seca representó el 38.6 % del peso del huevo. Dentro de la biomasa seca, las proteínas (61.2 % del peso seco) fueron el

principal componente bioquímico, seguido en orden de abundancia por los lípidos (30.0 %), los carbohidratos (5.1 %), la materia inorgánica (3.2 %) y los ácidos nucleicos (ADN: 0.1 %, ARN: 0.4 %) (Fig. 6.8).

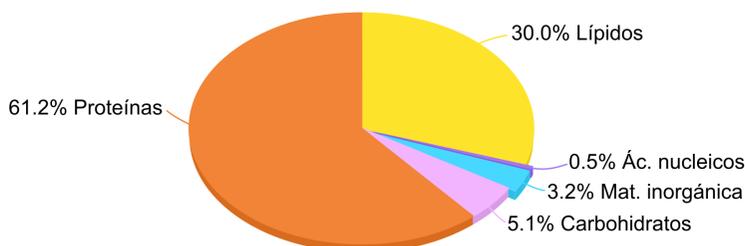


Fig. 6.8. Composición relativa (% del peso seco) de los huevos recientes

El contenido energético medio de los huevos, estimado a partir de la composición bioquímica (proteínas, lípidos y carbohidratos), fue de $26.95 \pm 0.42 \text{ J}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ ($\pm \text{DT}$). El contenido energético medio estimado a partir del carbono elemental fue de $24.07 \pm 0.31 \text{ J}\cdot\text{mg PS}^{-1}$.

6.3.2.1. Influencia de la talla

La influencia de la talla fue clara en el contenido absoluto de los principales componentes bioquímicos en los huevos (ANCOVA dos vías, $P < 0.01$), a excepción de los ácidos nucleicos y el contenido inorgánico ($P > 0.10$). Sin embargo, la talla no influyó en la composición bioquímica relativa de los huevos (análisis de regresión, $P > 0.30$). Las tallas de las hembras utilizadas en este estudio no fue similar en todas las épocas analizadas (ANOVA dos vías, $P < 0.001$; Tabla 6.5), aunque estuvieron distribuidas en un estrecho rango, desde los 29.9 a 42 mm de LC.

Tabla 6.5. Tamaño medio de las hembras con puestas caracterizadas bioquímicamente

LC (mm)	2008			2009		F	P
	Invierno	Primavera	Verano	Invierno	Primavera		
Media \pm DT	33.0 \pm 2.3 ^{ab}	35.0 \pm 3.4 ^{ab}	33.4 \pm 1.7 ^b	38.3 \pm 2.4 ^a	33.4 \pm 2.1 ^b	23.66	<0.001
Rango	29.9-36.2	30.7-41.8	30.5-36.2	34.4-42.0	31.2-37.0		

Las diferencias de talla entre las épocas analizadas fueron evaluadas con un ANOVA de dos vías con estación de puesta y año como factores. Se muestran el valor de la prueba F y la significación (P) para la interacción entre los años y estaciones. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes.

6.3.2.2. Variación temporal

El contenido absoluto de los principales componentes bioquímicos (lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos grasos y agua) y la energía por huevo mostraron el mismo patrón estacional que el peso por huevo en ambos ciclos reproductivos, a excepción del contenido en ácidos nucleicos y cenizas (Tabla 6.6). Así, los huevos en ambos inviernos presentaron un mayor contenido de cada componente y energía por huevo, que los huevos de las puestas realizadas en primavera y verano.

En general, el contenido bioquímico relativo a la biomasa seca no mostró diferencias significativas entre las épocas de puesta en ambos periodos reproductivos (Tabla 6.6). Sin embargo, hubo excepciones como el contenido en lípidos, ácidos grasos totales, cenizas y la energía ($P \leq 0.02$). El contenido de cenizas de las puestas durante 2008 aumentó gradualmente en los huevos desde los $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{huevo}^{-1}$ en las puestas realizadas en invierno hasta los $0.9 \pm 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{huevo}^{-1}$ en las puestas de verano. Por otra parte, durante 2009 las puestas en invierno mostraron un contenido relativo de lípidos y ácidos grasos superior en un $7.3 \pm 0.1\%$ y $6.3 \pm 0.3\%$, respectivamente, al determinado en las puestas de primavera, lo cual se vió reflejado también en un mayor contenido energético (Tabla 6.6).

Se observaron diferencias interanuales entre periodos de desove en el contenido absoluto de algunos componentes, como en el caso de los lípidos, ácidos grasos y carbohidratos por huevo (ANCOVA dos vías, $P < 0.02$). Entre años, los huevos de las épocas de primavera y verano presentaron un contenido similar de estos compuestos (Tabla 6.6), mientras que entre inviernos, los huevos de las puestas de 2009 mostraron un mayor contenido, con un incremento en porcentaje del $9.5 \pm 1.3\%$ en lípidos, $7.1 \pm 1.6\%$ en ácidos grasos y $17.5 \pm 0.7\%$ en carbohidratos respecto a los huevos de 2008.

Respecto al contenido bioquímico relativo, las proteínas, ácidos nucleicos y el contenido de agua mostraron diferencias entre años, aunque sin mostrar ningún patrón claro (ANOVA dos vías, $P \leq 0.02$). Los huevos desovados en 2008 presentaron un mayor contenido relativo de proteínas ($608.6 \pm 11.3 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$), ADN ($1.3 \pm 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$) y agua ($63.2 \pm 2.9\%$ PH) que durante 2009 (proteínas: $601.7 \pm 7.6 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$, ADN: $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$, agua: $58.5 \pm 1.3\%$ PH). Por otro lado, el contenido relativo de ácidos nucleicos en los huevos mostró un rango de valores

de 1.1-1.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ (ADN) y 3.3-3.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$ (ARN), que se corresponden con periodos iniciales de la embriogénesis (periodos 1 a 3, Capítulo 5).

6.3.2.3. Composición de ácidos grasos

Los ácidos grasos son un componente mayoritario de los lípidos en los huevos de crustáceos y representaron en las puestas recientes un 7.8 % del peso húmedo. En el contenido de ácidos grasos en los huevos predominó la fracción de los poliinsaturados (PUFA, 57.8 ± 0.2 %, $M \pm SE$), seguida en importancia de monoinsaturados (MUFA, 23.7 ± 0.1 %) y saturados (SAT, 18.5 ± 0.1 %). De los 26 ácidos grasos identificados, sólo 11 se encontraron en cantidades superiores a trazas (>1 %). Los principales ácidos grasos encontrados, en orden decreciente en abundancia, fueron 20:5n-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA, 28.2 ± 0.1 %), 22:6n-3 (ácido docosahexaenoico, DHA, 18.8 ± 0.1 %), 16:0 (ácido palmítico, 10.5 ± 0.0 %), 16:1n-7 (ácido palmitoleico, 9.9 ± 0.1 %), 18:1n-9 (ácido oleico, 8.5 ± 0.1 %) y 20:4n-6 (ácido araquidónico, ARA, 8.3 ± 0.1 %). Estos ácidos grasos representaron el 84 % del contenido total de ácidos grasos.

El análisis de componentes principales realizado con los perfiles de ácidos grasos de cada puesta permitió distinguir, con sólo las dos primeras componentes (69 % de la variabilidad explicada), cierto grado de agrupamiento según la época de puesta analizada (Fig. 6.9). La variación estacional entre los perfiles de ácidos grasos en cada periodo reproductivo anual fue pequeña, mostrando poca separación de las puestas realizadas en cada estación en 2008 y durante 2009 (ANOSIM-R <0.34 , $p<0.002$). Las puestas de invierno y verano durante 2008 mostraron un perfil de ácidos grasos similar (Tabla 6.7), mientras que las puestas de primavera presentaron una mayor proporción de MUFA (23-25 %; $P<0.001$), principalmente de 18:1n-9 (25-35 %; $P<0.001$) y 16:1n-9 (19-41 %; $P<0.01$). En 2009, las puestas realizadas en primavera mostraron una reducción del 11 % en los SAT y del 50 % de la ratio 18:1n-7/18:1n-9 respecto al invierno ($P<0.01$), tanto por un aumento de 18:1n-9 como por una disminución de la proporción de 18:1n-7 ($P<0.01$). Respecto a los PUFA, el contenido de ARA aumentó su proporción en las puestas de primavera hasta 1.5 veces su proporción respecto a los huevos de invierno ($P<0.001$), provocando una reducción la ratio EPA/ARA en las puestas ($P<0.01$).

Tabla 6.6. Variación estacional de las características biométricas y composición bioquímica de los huevos de puestas recientes

Variables	2008				2009				
	Invierno	Primavera	Verano	F	P	Invierno	Primavera	F	P
<i>V</i> (10^{-4} μm^3)	548 ± 66 ^a	507 ± 42 ^{ab}	479 ± 31 ^b	5.11	0.01	533 ± 32	495 ± 47	2.88	0.12
<i>D</i> (μm)	475 ± 20 ^a	464 ± 13 ^{ab}	453 ± 11 ^b	5.12	0.01	470 ± 9	458 ± 15	3.71	0.08
<i>PS</i> huevo (μg)	25.5 ± 1.8 ^a	22.7 ± 1.5 ^b	22.0 ± 0.7 ^b	20.81	<0.001	27.4 ± 1.8 ^a	21.5 ± 1.1 ^b	35.85	<0.001
Composición absoluta									
<i>Lípidos</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	7.6 ± 0.5 ^a	6.7 ± 0.5 ^b	6.4 ± 0.3 ^b	19.54	<0.001	8.4 ± 0.6 ^a	6.3 ± 0.4 ^b	37.77	<0.001
<i>Carbohidratos</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	1.3 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^{ab}	1.1 ± 0.0 ^b	6.36	<0.01	1.4 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.1 ^b	22.85	<0.001
<i>Proteínas</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	15.6 ± 1.1 ^a	13.8 ± 0.9 ^b	13.4 ± 0.6 ^b	21.99	<0.001	16.5 ± 1.1 ^a	13.1 ± 0.6 ^b	38.53	<0.001
<i>ADN</i> ($\text{ng}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	32 ± 5	31 ± 3	28 ± 4	1.42	0.26	29 ± 4 ^a	23 ± 3 ^b	7.17	0.02
<i>ARN</i> ($\text{ng}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	81 ± 21	81 ± 14	86 ± 14	1.93	0.17	92 ± 18	80 ± 17	2.15	0.17
<i>Ac. grasos</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.2 ± 0.1	2.15	0.14	5.7 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.1 ^b	9.85	<0.01
<i>Cenizas</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	0.6 ± 0.1 ^b	0.8 ± 0.3 ^b	0.9 ± 0.2 ^a	6.09	<0.01	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.21	0.66
<i>Agua</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	16.0 ± 1.6 ^a	14.1 ± 1.0 ^b	14.2 ± 1 ^b	10.51	<0.001	15.9 ± 1.1 ^a	12.7 ± 0.6 ^b	26.80	<0.001
<i>E [B]</i> ($\text{f}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	0.7 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.0 ^b	19.37	<0.001	0.7 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	44.00	<0.001
<i>E [C]</i> ($\text{f}\cdot\text{huevo}^{-1}$)	0.6 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.0 ^b	0.5 ± 0.0 ^b	9.13	<0.001	0.7 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.0 ^b	22.65	<0.001
Composición relativa									
<i>Lípidos</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	297.0 ± 11.9	295.3 ± 7.0	292.1 ± 15.6	0.45	0.64	308.5 ± 4.1 ^a	290.2 ± 8.3 ^b	41.24	<0.001
<i>Carbohidratos</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	50.3 ± 2.2	52.4 ± 4.8	50.1 ± 2.9	1.40	0.26	52.0 ± 4.0	48.7 ± 3.3	4.47	0.05
<i>Proteínas</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	607.8 ± 14.2	609.3 ± 8.6	609.0 ± 10.8	0.05	0.95	602.8 ± 6.9	600.4 ± 8.4	0.51	0.49
<i>ADN</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.78	0.19	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.03	0.87
<i>ARN</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	3.3 ± 0.6	3.6 ± 0.6	3.9 ± 0.6	2.13	0.14	3.4 ± 0.5	3.7 ± 0.8	0.64	0.44
<i>Ac. grasos</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	200.0 ± 1.7	199.0 ± 1.5	195.2 ± 1.4	0.51	0.48	212.5 ± 0.8 ^a	198.1 ± 1.5 ^b	7.16	0.02
<i>Cenizas</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	24.4 ± 3.2 ^b	38.0 ± 14.6 ^a	41.4 ± 9.7 ^a	5.59	0.01	25.7 ± 7.4	32.1 ± 8.3	2.79	0.12
<i>Agua</i> (% PH)	62.9 ± 3.1	62.3 ± 2.1	64.4 ± 3.1	1.42	0.26	58.2 ± 1.4	58.9 ± 1.2	1.63	0.22
<i>E [B]</i> ($\text{f}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	26.9 ± 0.4	27.0 ± 0.2	26.8 ± 0.6	0.51	0.61	27.3 ± 0.2 ^a	26.6 ± 0.4 ^b	28.11	<0.001
<i>E [C]</i> ($\text{f}\cdot\text{mg PS}^{-1}$)	24.1 ± 0.4	24.2 ± 0.3	23.9 ± 0.3	2.16	0.13	24.2 ± 0.2 ^a	23.9 ± 0.2 ^b	20.14	<0.001

Las características de los huevos se agrupan en biométricas, composición bioquímica absoluta, respecto al peso medio del huevo; y composición bioquímica relativa al contenido en un mg de peso seco (PS) o como % del peso húmedo (PH). Los valores mostrados son la media y la desviación estándar del volumen del huevo (V), diámetro (D), PS del huevo, el contenido en lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos (ADN y ARN), cenizas, agua y la estimación de la energía respecto al contenido de C elemental (E [C]) y a partir de la composición bioquímica proximal (E [B]). Las diferencias estacionales en las biométricas y la composición cualitativa fueron evaluadas en cada año (2008 y 2009) mediante un ANCOVA con la covariable longitud de cefalotórax, mientras que la composición cualitativa fue evaluada con ANOVAs. Se indica para la variable estación el valor de la prueba F y su significación (P). Las diferencias significativas entre estaciones se indican con letras diferentes.

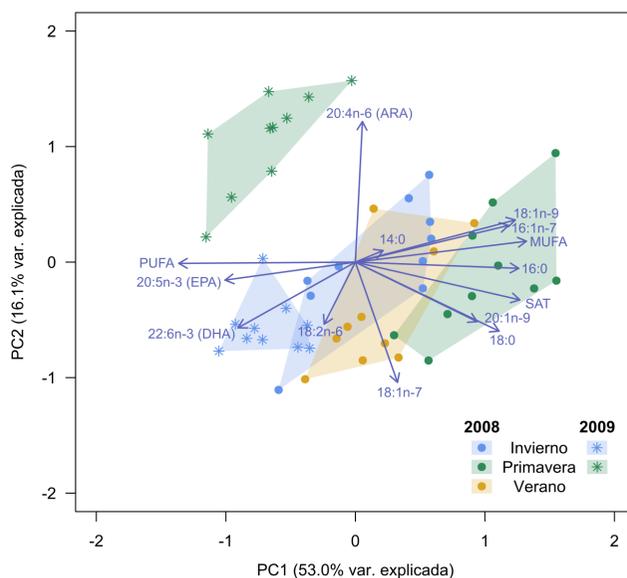


Fig. 6.9. Análisis de componentes principales de los ácidos grasos presentes (>1 %) en las puestas recientes. Se muestran como vectores los ácidos grasos que contribuyen a la separación entre puestas. Las épocas de las puestas se representan con colores diferentes y se delimitaron con un polígono, mientras que el año al que corresponden se indica con símbolos diferentes

El año del desove permitió distinguir dos claros grupos entre las puestas analizadas en función de la composición de los ácidos grasos, aunque con cierto grado de solapamiento (ANOSIM-R=0.47, $P < 0.001$). Los análisis SIMPER y PCA demostraron que los altos niveles de PUFA, principalmente DHA y EPA, en las puestas realizadas en 2009, y un alto contenido de los SAT (16:0 y 18:0) y de MUFA (16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7 y 20:1n-9) en 2008 fueron los responsables de la separación entre años de puesta (Fig. 6.9; SIMPER, $P < 0.05$). Respecto a la proporción de cada fracción principal de ácidos grasos, hubo claras diferencias entre los años estudiados. Las puestas de 2008 mostraron un 25 % más de SAT que en las puestas realizadas en 2009 (ANOVA de dos vías, $F_{(1,45)}=116.83$, $P < 0.001$). También la fracción de MUFA fue superior en un 36 % en las puestas de 2008 respecto a las del 2009 (ANOVA de dos vías, $F_{(1,46)}=38.8$, $p < 0.001$). Por el contrario, el contenido en PUFA aumentó un 21 % en las puestas de 2009 respecto a las de 2008 (ANOVA de dos vías, $F_{(1,46)}=55.4$, $p < 0.001$).

La mayor separación en los perfiles de ácidos grasos de las puestas tuvo lugar

entre las épocas de primavera analizadas (ANOSIM-R>0.87, P<0.001; Fig. 6.9). La contribución a esta separación de cada ácido graso en su correspondiente fracción fue: 54 % de 16:0 y 35 % de 18:0 en los SAT; dentro de los MUFA, 16:1n-7 un 43 %, 18:1n-9 un 38 %, 20:1n-9 un 10 % y 18:1n-7 un 9 %; mientras que en los PUFA fue determinante el ARA con un 25 % (contribución de aquellos ácidos grasos>1 %; SIMPER, P<0.004).

Tabla 6.7. Composición media de ácidos grasos en los huevos (% del contenido total de ácidos grasos, media \pm error estándar) de puestas recientes para cada estación analizada durante los años 2008 y 2009

Ácido graso	2008			F	P	2009			F	P
	Invierno	Primavera	Verano			Invierno	Primavera			
SAT										
14:0 ¹	2.6 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1	0.92	0.41	2.5 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	0.04	0.84	
15:0	1.1 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	2.89	0.07	0.9 \pm 0.0 ^a	0.7 \pm 0.0 ^b	18.26	<0.001	
16:0 ¹	10.5 \pm 0.2 ^b	12.6 \pm 0.1 ^a	10.7 \pm 0.1 ^b	9.43	<0.001	9.6 \pm 0.1	9.2 \pm 0.1	1.58	0.23	
17:0	0.7 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	1.18	0.32	0.6 \pm 0.0 ^a	0.3 \pm 0.0 ^b	96.81	<0.001	
18:0 ¹	3.8 \pm 0.0 ^b	4.5 \pm 0.0 ^a	3.9 \pm 0.0 ^b	13.10	<0.001	3.0 \pm 0.0 ^a	2.2 \pm 0.0 ^b	70.74	<0.001	
Otros	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.00	1.00	0.4 \pm 0.0 ^a	0.3 \pm 0.0 ^b	10.74	<0.01	
Total SAT¹	19.1 \pm 0.3	21.8 \pm 0.4	19.4 \pm 0.3	0.11	0.75	17.0 \pm 0.2^a	15.2 \pm 0.3^b	9.20	<0.01	
MUFA										
16:1n-7 ¹	9.7 \pm 0.2 ^b	13.1 \pm 0.2 ^a	10.5 \pm 0.2 ^b	8.34	<0.01	7.2 \pm 0.1 ^b	8.9 \pm 0.2 ^a	5.22	0.03	
17:1	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	1.13	0.34	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.04	0.85	
18:1n-7 ¹	3.1 \pm 0.0 ^b	3.3 \pm 0.0 ^a	3.5 \pm 0.0 ^a	15.45	<0.001	3.5 \pm 0.1 ^a	2.4 \pm 0.1 ^b	76.11	<0.001	
18:1n-9 ¹	9.5 \pm 0.2 ^a	11.3 \pm 0.2 ^a	8.0 \pm 0.2 ^b	14.77	<0.001	6.4 \pm 0.1 ^b	7.4 \pm 0.1 ^a	12.81	<0.01	
20:1n-9 ¹	1.8 \pm 0.0	2.1 \pm 0.0	1.9 \pm 0.1	2.45	0.11	1.2 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.51	0.49	
Otros	0.3 \pm 0.0 ^a	0.3 \pm 0.0 ^a	0.1 \pm 0.0 ^b	22.74	<0.001	0.1 \pm 0.0 ^b	0.1 \pm 0.0 ^a	5.94	0.03	
Total MUFA¹	24.8 \pm 0.3^b	30.5 \pm 0.4^a	24.4 \pm 0.3^b	9.50	<0.001	18.7 \pm 0.2^b	20.3 \pm 0.3^a	5.95	0.03	
PUFA										
18:2n-6 ¹	1.1 \pm 0.0 ^a	0.9 \pm 0.0 ^b	0.8 \pm 0.0 ^b	9.42	<0.001	1.2 \pm 0.0 ^a	0.8 \pm 0.0 ^b	63.59	<0.001	
18:3n-3	0.8 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	0.4	0.68	0.8 \pm 0.0 ^a	0.6 \pm 0.0 ^b	7.24	0.02	
20:2n-6	0.6 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.29	0.75	0.4 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.01	0.95	
20:4n-6 (ARA) ¹	9.1 \pm 0.4	7.5 \pm 0.2	6.6 \pm 0.3	2.07	0.15	6.7 \pm 0.1 ^b	11.8 \pm 0.3 ^a	20.55	<0.001	
20:5n-3 (EPA) ¹	26.5 \pm 0.6	24.0 \pm 0.3	28.2 \pm 0.5	1.9	0.17	31.5 \pm 0.3	30.5 \pm 0.5	0.53	0.48	
22:6n-3 (DHA) ¹	17.3 \pm 0.4	13.8 \pm 0.5	19.3 \pm 0.5	0.77	0.38	23.5 \pm 0.4	19.8 \pm 0.5	3.02	0.10	
Otros	0.6 \pm 0.0 ^a	0.5 \pm 0.0 ^a	0.3 \pm 0.0 ^b	6.61	<0.01	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.67	0.43	
Total PUFA¹	56.0 \pm 0.5	47.7 \pm 0.5	58.3 \pm 0.4	12.61	<0.001	66.7 \pm 0.3	66.1 \pm 0.4	0.16	0.70	
$\Sigma(n-3)$	45.0 \pm 0.8 ^{ab}	38.8 \pm 0.6 ^b	48.4 \pm 0.6 ^a	5.45	0.01	55.8 \pm 0.3 ^a	51.0 \pm 0.6 ^b	5.47	0.03	
$\Sigma(n-6)$	11.0 \pm 0.4	8.9 \pm 0.2	7.9 \pm 0.2	2.78	0.08	8.5 \pm 0.2 ^b	13.4 \pm 0.4 ^a	15.50	<0.001	
$\Sigma(n-3)/\Sigma(n-6)$	5.0 \pm 0.3	4.6 \pm 0.1	6.8 \pm 0.2	2.33	0.12	6.8 \pm 0.1 ^a	4.3 \pm 0.2 ^b	12.83	<0.01	
18:1n-7/18:1n-9	0.3 \pm 0.0 ^b	0.3 \pm 0.0 ^b	0.5 \pm 0.0 ^a	12.33	<0.001	0.6 \pm 0.0 ^a	0.3 \pm 0.0 ^b	42.75	<0.001	
EPA/DHA	1.6 \pm 0.3	2.0 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.26	0.30	1.4 \pm 0.0	1.7 \pm 0.1	1.38	0.26	
EPA/ARA	3.7 \pm 0.3	3.4 \pm 0.1	4.8 \pm 0.2	1.94	0.16	4.9 \pm 0.1 ^a	2.9 \pm 0.1 ^b	13.13	<0.01	

Otros incluye en los SAT al 12:0, 13:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0 y 24:0; en MUFA: 14:1n-5, 22:1n-9 y 24:1n-9; y en PUFA: 18:3n-6, 20:3n-3, 20:3n-6 y 22:2n-6.

¹Ácidos grasos incluidos en el análisis PCA

6.3.3. Factores que influyen en la inversión por huevo

Estado nutricional de las hembras

La evolución del índice hepatosomático estandarizado (IHS) y los grados de libertad de la variable temporal utilizada (día ordinal, $gl=8.9$) indican que los cambios que se producen anualmente en el estado nutricional de las hembras no son lineales (Fig. 6.10). La función suavizadora ajustada a los datos indica que las hembras alcanzan un máximo IHS a principios de Noviembre (0.33 g) y disminuye escalonadamente en 2 periodos consecutivos. El primero tiene lugar de Noviembre a Enero ($\Delta IHS=-0.31$ g) y, tras un ligero aumento, el IHS vuelve a descender desde Febrero a Abril ($\Delta IHS=-0.30$ g), mes en el que alcanza el valor mínimo de IHS (-0.21 g). A partir de Abril-Mayo (IHS=-0.17 g) tiene lugar un aumento escalonado del IHS hasta Noviembre en otras dos etapas. En la primera etapa alcanza un IHS de 0.12 g en Julio, mes tras el que se observa una ligera disminución del IHS hasta Septiembre ($\Delta IHS=-0.03$ g). A partir de Septiembre comienza a aumentar de nuevo el estado nutricional de las hembras hasta el máximo de Noviembre.

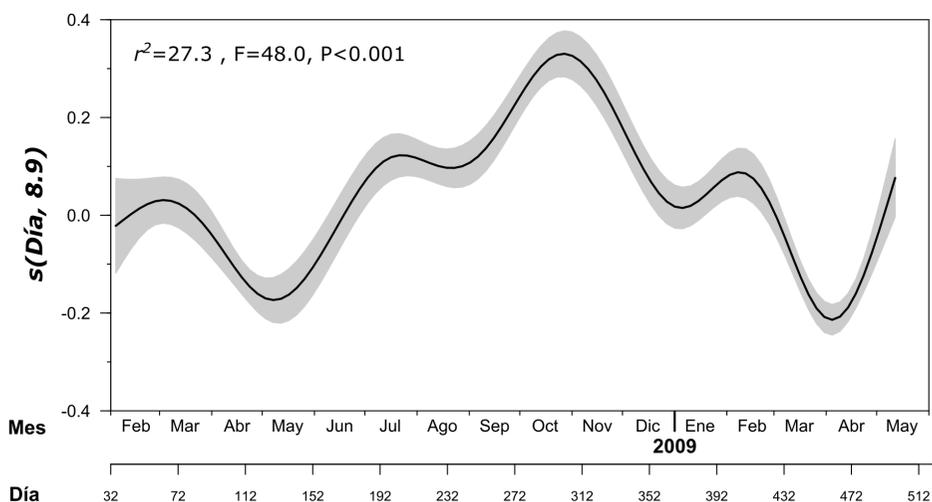


Fig. 6.10. Índice hepatosomático estandarizado (IHS) desde Febrero de 2008 a Mayo de 2009. La línea negra muestra la trayectoria estimada por la función suavizadora para el IHS y en sombreado gris el error estándar. Se indica la varianza total explicada (r^2) y la significación de la función suavizadora para la variable Día con los valores de F y P ($n=1169$ hembras). En el eje x se muestra la correspondencia temporal del día ordinal con el mes y el año.

Duración del periodo de ovogénesis, fotoperiodo y la temperatura del mar

Las duración estimada del proceso de ovogénesis mostró un mismo patrón en el periodo común analizado, con largos periodos de ovogénesis durante el invierno y primavera, que disminuyen gradualmente hacia el verano y que vuelven a aumentar de nuevo durante el otoño (Fig. 6.11a). Si se comparan los años de estudio, se puede observar como las bajas temperaturas registradas durante el invierno de 2008 a 2009 (6.11c) provocaron que las duraciones estimadas del proceso de ovogénesis de las puestas de primavera de 2009 fueran superiores a las puestas de invierno de ese mismo año y a las estimadas para ambas épocas en 2008 (Fig. 6.11a).

El fotoperiodo en la zona de estudio muestra una clara oscilación anual que alcanza un valor mínimo de 9 horas de luz en el mes de Diciembre y que aumenta hasta un máximo de 15 horas de luz a finales de Junio (Fig. 6.11b). Esta oscilación está prácticamente en fase con los datos de temperatura registrados y en oposición de fase a la variación estimada de la duración de la ovogénesis.

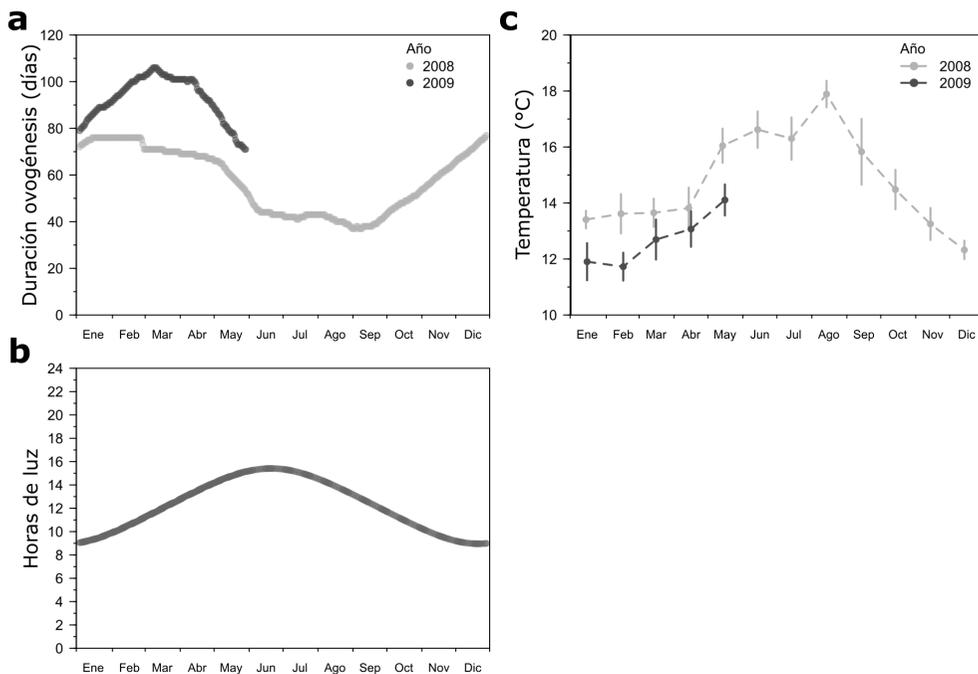


Fig. 6.11. Variación a lo largo del año de (a) la duración estimada de la ovogénesis (días) para una puesta recién desovada, (b) el fotoperiodo (número de horas de luz) y (c) la temperatura media mensual del mar (\pm DT) durante 2008 y 2009

Modelado aditivo

Después de un análisis inicial de los datos se encontró una fuerte colinealidad entre el fotoperiodo (horas de luz), la temperatura del agua en el desove y el día (FIV>15). Para decidir que variable mantener en el modelo, se observó la relación entre la inversión por huevo (μg lípidos-huevo⁻¹) con cada variable explicativa por separado (Fig 6.12). La temperatura en el desove mostró una correlación negativa significativa con la inversión por huevo (Spearman $\rho=-0.71$, $P<0.001$), aunque se decidió no incluirla en el modelo, al no poder explicar el brusco descenso en la inversión por huevo a temperaturas intermedias (13.8°C). Entre el fotoperiodo (Spearman $\rho=-0.79$, $P<0.001$) y el día (Spearman $\rho=-0.76$, $P<0.001$), se optó por mantener en el modelo el día, porque permite identificar con más facilidad la temporalidad del periodo reproductivo. Por otra parte, la variable duración de la ovogénesis mostró una relación confusa con el contenido de lípidos por huevo (Spearman $\rho=0.28$, $P=0.07$), mostrando valores bajos en la inversión por huevo en puestas con largos periodos de ovogénesis, por lo que esta variable no fue incluida en el modelo.

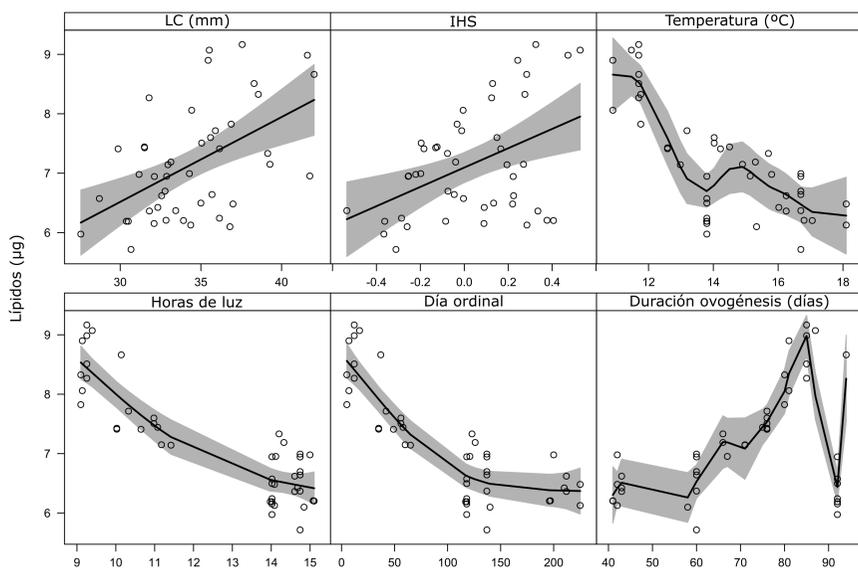


Fig. 6.12. Correlación del contenido de lípidos por huevo (μg) con diferentes variables explicativas, como la longitud de cefalotórax (LC), el índice hepatosomático (IHS), la temperatura en el desove ($^{\circ}\text{C}$), el fotoperiodo (horas de luz), el día ordinal y la duración de la ovogénesis (días). La línea negra muestra la trayectoria estimada por una función suave para cada variable explicativa, y en sombreado gris el intervalo de confianza al 95 %

El modelo aditivo resultante fue:

$$Lip_i = \alpha + f_1(LC) + f_2(IHS) + f_3(Día) + \varepsilon_i$$

Donde Lip_i es el contenido en lípidos por huevo para cada observación i , IHS es el índice hepatosomático estandarizado, y $Día$ es el día ordinal, número de días desde el 1 de Enero de 2008, α es la intersección, f es una función suave de los datos y ε_i es el error residual (información no explicada o ruido, con una distribución $\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$).

El valor de r^2 (cantidad de varianza explicada) fue 88 %, indicando que gran parte de la variación en la inversión por huevo es explicada por el estado nutricional, el tamaño materno y el avance del ciclo reproductivo. Las curvas estimadas de las funciones de suavizado se representan en la Fig. 6.13a-c. La inversión por huevo durante el ciclo reproductivo descendió gradualmente desde las puestas realizadas al comienzo del año hasta las puestas de verano de forma no lineal ($gl=2$, $F=76.8$, $P<0.001$). Por otro lado, la talla y el IHS de las hembras mostraron una relación lineal significativa con el contenido de lípidos por huevo ($gl=1$, $P<0.003$). Esta relación fue positiva, indicando que la inversión por huevo se incrementa con el aumento del tamaño de las hembras y que las hembras con un mejor estado nutricional invierten más por huevo.

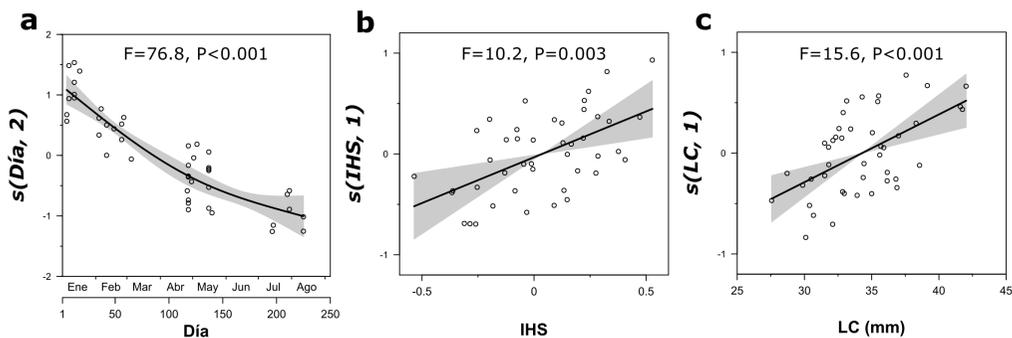


Fig. 6.13. Valores ajustados por las funciones de suavizado: (a) día ordinal ($Día$), (b) índice hepatosomático estandarizado (IHS) y (c) la longitud del cefalotórax (LC) y su error estándar (sombra gris). El eje de ordenadas muestra la contribución de cada suavizador al contenido en lípidos por huevo. Se indica la significación de cada función suavizadora mediante los valores de F y P ($n=45$ puestas).

6.4. Discusión

6.4.1. Características biométricas

Las estimas de fecundidad realizada de *S. arctus* en la población estudiada del Atlántico NE (14,370-108,029 huevos, 24-45 mm LC, N=149) mostraron que el número de huevos que pueden producir las hembras oscila en un intervalo más amplio que el indicado por estimas previas en el Mediterráneo (30,000-70,000 huevos, 28-34 mm LC, N=4; Vilotte, 1982). Estas diferencias aparentemente geográficas pueden atribuirse en parte al estrecho rango de tallas y al número de hembras utilizado utilizado en el estudio del Mediterráneo, factores metodológicos que pueden generar variaciones importantes en la estimación de la fecundidad (Currie y Schneider, 2011). Con el propósito de reducir la variabilidad y aumentar la fiabilidad de las estimas de fecundidad de *S. arctus*, en este estudio se cuidaron aspectos como el rango de tallas utilizado, en el que las hembras más pequeñas utilizadas estuvieron próximas a la talla de madurez sexual (25.71 mm LC, Capítulo 4) y las más grandes con 44.8 mm LC (162 mm LM) superaron la máxima longitud corporal citada de esta langosta en el Mediterráneo (160 mm; Relini *et al.*, 1999); la determinación de un tamaño óptimo de muestra para la realización de estimaciones de la fecundidad por el método gravimétrico; y una adecuada selección de las muestras según el estado de desarrollo embrionario de los huevos y la época de puesta.

En comparación a otros géneros, el rango de fecundidad de *S. arctus* es del mismo orden de magnitud que el determinado en otras langostas de los géneros *Thenus* e *Ibacus*, y de un orden menor que las registradas en el género *Scyllarides* (Oliveira *et al.*, 2008). Respecto al tamaño de los huevos, el diámetro medio está en el rango de 0.4-1.2 mm descrito en la familia Scyllaridae (ver Sekiguchi *et al.*, 2007). Sin embargo, se encuentra entre las especies que producen los huevos más pequeños dentro de esta familia, junto con otros congéneres como *Scyllarus depressus* y *Scyllarus americanus* (Robertson, 1968, 1971).

En general, el potencial reproductivo de *S. arctus* mostró una fuerte relación positiva con la talla de los individuos. La función que mejor definió esta relación fue la potencial. En otros esciláridos, la producción de huevos también depende del tamaño corporal, aunque el tipo de función descrita (p. ej. lineal, potencial) varía entre especies (DeMartini *et al.*, 2005; Haddy *et al.*, 2007; Jones, 2007; Oliveira *et al.*, 2008). En *S. arctus*, el aumento del número de huevos con la talla fue

isométrico ($b=3$), un claro indicador de la naturaleza volumétrica de las puestas respecto a la capacidad del abdomen de la hembra.

Hay varios factores íntimamente relacionados con el tamaño de los reproductores, que pueden llegar a reducir el potencial reproductivo en los decápodos marinos. Uno de ellos es la presencia de una senescencia reproductiva (o reducción de fecundidad con la edad), un fenómeno que ha sido descrito en poblaciones de langostas palinúridas (Chubb, 2000). Otro factor, es la pesca selectiva de machos, principalmente los grandes, ya que la capacidad de los machos para fecundar las puestas de las hembras, y en relación con ello, la cantidad de esperma que pueden producir, depende principalmente de su tamaño (MacDiarmid y Butler, 1999). La disminución de los machos puede provocar una reducción de la tasa de fecundación de las puestas, de la fecundidad, e incluso, que se produzca un bloqueo del desove, hecho que tiene importantes consecuencias negativas a nivel fisiológico para el organismo (Sainte-Marie, 1993; Sato *et al.*, 2005, 2006, 2005; Taku Sato, 2007). Esta limitación reproductiva puede alcanzar una mayor relevancia en especies que no poseen ninguna estructura para almacenar el esperma, como es el caso de *S. arctus*. Por este motivo, una medida de regulación común en la pesquerías de crustáceos como es la prohibición de capturar hembras ovadas, y que tiene como objetivo proteger el potencial reproductivo de la población, puede estar teniendo un efecto contrario en las poblaciones de *S. arctus*, ya que la elevada proporción de hembras ovadas a lo largo del año (>50 % durante Febrero-Agosto) favorece que se capturen los machos grandes. De hecho, la población de estudio muestra signos de una pesca selectiva, como son un sesgo hacia las hembras en la proporción sexual, y un mayor tamaño de las hembras respecto a los machos (Capítulo 3).

Si alguno de estos factores está influyendo en el potencial reproductivo de *S. arctus*, el tamaño relativo de las puestas debería presentar alguna alteración a lo largo del rango de tallas de las hembras analizadas. Los resultados obtenidos no mostraron ninguna disminución del tamaño relativo de las puestas al aumentar el tamaño corporal, por lo que no hay ninguna evidencia que soporte estas hipótesis. De todas formas, que no se haya encontrado un efecto de la senescencia o de la pesca selectiva de los machos en el tamaño de las puestas, es coherente con el hecho de que se trata de una población altamente explotada y los ejemplares más grandes (y viejos) son rápidamente eliminados de la población.

La pérdida de huevos durante el periodo de incubación en crustáceos es un fenómeno común, que puede llegar a reducir el potencial reproductivo de forma

considerable en algunas especies (Kuris, 1991). Las hembras de *S. arctus* durante el periodo de incubación perdieron una cantidad de huevos significativa (31.3 % del número de huevos inicial), que fue constante y proporcional en todo el rango de tallas, y para cada época del año analizada. Esto indica que la pérdida de huevos en *S. arctus* depende principalmente de factores relacionados con el tamaño corporal, como por ejemplo, el aumento de la superficie expuesta de las masas de huevos a una abrasión mecánica contra el sustrato, como consecuencia del incremento del volumen de los huevos durante el periodo de incubación. La utilización de esta tasa de pérdida de huevos va a permitir el cálculo de índices anuales de producción de huevos más robustos para esta especie, y comprender mejor así la relación entre la biomasa de reproductores y el reclutamiento.

La influencia positiva del tamaño materno también se ha observado en el peso del huevo de este escilárido. Se han descrito relaciones similares en langostas queladas como *Homarus gammarus* (Tully *et al.*, 2001; Agnalt, 2008) y *Homarus americanus* (Ouellet y Plante, 2004), y en langostas espinosas como *Palinurus elephas* (Goñi *et al.*, 2003) y *Jasus edwardsii* (Smith y Ritar, 2007), aunque este efecto no había sido descrito previamente en esciláridos. Hay varias hipótesis que permiten explicar esta relación positiva: (i) el fenotipo materno optimiza el tamaño del huevo para compensar los efectos de la densidad o la competencia en la supervivencia de la descendencia, debido a un aumento del tamaño de las puestas con el tamaño de la hembra (Parker y Begon, 1986; Hendry *et al.*, 2001); (ii) las limitaciones fisiológicas o morfológicas en el tamaño del huevo impuestas por el tamaño de la madre (Fox y Czesak, 2000); (iii) una edad- o tamaño- dependencia en la provisión de la descendencia con la condición energética materna (Sakai y Harada, 2001; Kindsvater *et al.*, 2011). Aunque no hay evidencias para apoyar estas teorías, esta cuestión debería ser planteada en futuras investigaciones para determinar el origen de este efecto materno en decápodos marinos.

Además del efecto del tamaño de los individuos, las variaciones estacionales observadas en las características de las puestas durante el período de desove en ambos años de estudio, indican la existencia de una estrategia reproductiva. Los datos obtenidos revelaron que los cambios estacionales en los rasgos reproductivos siguen un patrón cíclico, que refleja la relación inversa entre los valores de fecundidad y peso del huevo en las dos primeras épocas del período reproductivo, con un peso máximo por huevo en invierno y un máximo número de huevos producido en primavera. La variabilidad observada en las características de las puestas en este escilárido es consecuente con lo observado en otras especies de

crustáceos con un amplio periodo de reproducción, como en *Maja brachydactyla* (Verísimo *et al.*, 2011), *Panulirus inflatus* (Gracia, 1985), *Panulirus argus* (Fonseca-Larios y Briones-Fourzan, 1998), *Crangon crangon* (Oh y Hartnoll, 2004; Urzúa *et al.*, 2012) y *Cancer setosus* (Fischer *et al.*, 2009a). Sin embargo, esta relación contrasta con los valores de las puestas de verano, época en la que se observa un menor esfuerzo reproductivo en las puestas, tanto en la inversión energética total, como en las características individuales de los huevos que las conforman (peso y volumen de los huevos).

La reducción de la inversión realizada en las últimas puestas del período reproductivo se ha observado también en otras langostas y está relacionada con la capacidad de llevar a cabo varias puestas sucesivas (Chubb, 2000; Vijayakumaran *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007). De esta manera, la capacidad de las hembras de *S. arctus* para realizar desoves sucesivos durante el periodo reproductivo (hasta tres puestas sucesivas, Capítulo 4), en términos de inversión energética en las puestas, podría estar supeditado a su estado nutricional (Wen *et al.*, 2002; Lardies *et al.*, 2004). Por otra parte, el balance energético disponible para el crecimiento y la reproducción en especies con crecimiento indeterminado (que continúan creciendo después de la madurez sexual), como es el caso de *S. arctus*, podría contribuir a la disminución en la inversión en reproducción en las últimas puestas durante el verano (ver Hartnoll, 1985).

En crustáceos marinos, las diferencias estacionales encontradas en las características de las puestas han sido relacionadas también con factores ambientales como la temperatura, la disponibilidad de alimento y la duración del fotoperíodo (Pond *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 2009a; Urzúa *et al.*, 2012). En la costa gallega, la variación estacional en las características de los huevos de las puestas recientes de *S. arctus* podría estar relacionada con la variación en las condiciones oceanográficas generadas por la presencia de afloramientos de agua profunda rica en nutrientes (Álvarez *et al.*, 2011). De esta forma, las puestas que muestran una mayor inversión por huevo se producen durante el invierno (Enero-Febrero) cuando la temperatura del agua es más baja y el plancton menos abundante, mientras que la producción de huevos más pequeños ocurre durante la primavera (Abril-Mayo) y durante el verano (Julio a septiembre), cuando la temperatura del agua y las densidades de plancton están en aumento o presentan valores más elevados (Álvarez *et al.*, 2012). Este patrón estacional también estuvo presente en las puestas con huevos en estado avanzado de desarrollo, confirmando la persistencia de los rasgos de los huevos tempranos en los huevos próximos a la eclosión.

El volumen y peso de los huevos son ampliamente utilizados para determinar la inversión en la descendencia en invertebrados marinos. Sin embargo, para utilizar el volumen del huevo como indicador de la inversión maternal primero debe verificarse que existe una correlación significativa con el contenido de vitelo del huevo (Clarke, 1993). En *S. arctus*, aunque el volumen de los huevos estuvo correlacionado con el peso por huevo, no permitió determinar diferencias claras entre las puestas de las distintas épocas analizadas. Se ha comprobado que la utilización de métodos de preservación (alcohol, formol, etc.) puede llegar a alterar el diámetro de los huevos (Fleming y Ng, 1987; Turra y Leite, 2007; Frimpong y Henebry, 2012) y así su volumen, por lo que su uso puede no ser adecuado cuando el objetivo es la realización de comparaciones intraespecíficas. En decápodos marinos, el peso del huevo, medido como biomasa seca, es considerado como una mejor aproximación del tamaño de la descendencia (Giménez y Anger, 2003; Moland *et al.*, 2010; Diez y Spivak, 2012; Urzúa y Anger, 2013) e indicador de la condición fisiológica de las larvas, es decir, de la capacidad de las larvas recién nacidas para sobrevivir en condiciones ambientales muy variables (Schuh y Diesel, 1995; Hancock *et al.*, 1998; Paschke *et al.*, 2004). Así, las diferencias observadas en el peso medio de huevos en *S. arctus* pueden llegar a representar diferencias reales en el tamaño o en la condición energética de las larvas. Sin embargo, todavía se necesita investigar cómo esta variación en peso del huevo se traslada a la descendencia en esta langosta.

La variabilidad intraespecífica en la fecundidad observada puso de manifiesto el interés en el desarrollo de una relación predictiva del número de huevos producido a lo largo del período reproductivo. La utilización de un modelo lineal generalizado con una función de enlace frente a un modelo lineal clásico para estimar la fecundidad presenta algunas ventajas, ya que proporciona estimaciones en la escala original de medición y elimina la dificultad interpretativa asociada a las transformaciones posteriores (Green *et al.*, 2009). Además, la inserción de una variable temporal como es el mes con una mayor resolución temporal que la estación del año, permitió explicar una elevada variabilidad (>90 %). Estas características convierten así a este modelo en una herramienta útil para determinar del potencial reproductivo de *S. arctus*.

En general, el potencial reproductivo relativo de una población se determina a partir de la estructura de tallas, la talla de madurez y la relación talla-fecundidad (Tully *et al.*, 2001; Goñi *et al.*, 2003). Sin embargo, este método no tiene en cuenta que la fecundidad puede variar lo largo del periodo reproductivo, lo que podría

alterar la distribución del potencial reproductivo. En este trabajo, la utilización de la fecundidad mensual y la estructura de tallas mensual de las hembras ovadas (PRR1) no modificó significativamente la distribución del potencial reproductivo por clases de tallas, en comparación al estimado mediante una relación talla-fecundidad sin variación temporal (PRR2). Un factor que podría aumentar el efecto de la variación temporal de la fecundidad, e influir en la distribución del potencial reproductivo, es que el número de puestas anual de una hembra dependiera de su talla (Aiken y Waddy, 1980). Sin embargo, en *S. arctus* no se encontró ninguna relación entre el número de puestas que puede realizar una hembra durante un periodo reproductivo (hasta 3 puestas anuales) y la talla de las hembras (Capítulo 4). Por otro lado, la distribución temporal del potencial reproductivo permitió determinar con precisión en qué meses se concentra la producción de huevos durante el periodo reproductivo, convirtiéndose así en una potencial herramienta para establecer el periodo de veda.

En el estado actual de conocimiento sobre la biología reproductiva de esta langosta no está claro, si las actuales medidas de gestión regionales, con un tamaño mínimo de captura (90 mm de LT), un cierre de la pesquería (Enero-Septiembre) y la protección de hembras ovadas, son adecuadas para reconstruir la biomasa de esta especie sobreexplotada. El análisis del potencial reproductivo relativo, indica que con la talla mínima de captura actual (90 mm de LT), sólo se esta protegiendo una pequeña parte, apenas un 3 %, de la producción de huevos anual en la población. Estos resultados indican que es necesario elevar la talla mínima de captura para proteger una mayor proporción del potencial reproductivo de la población. Un aumento de la talla mínima de captura hasta los 108 mm de LT permitiría salvaguardar el 40 % del potencial reproductivo. Respecto al periodo de veda, su amplia duración actual (Enero-Septiembre) permite proteger el 99 % de la producción de huevos anual de la población. Sin embargo, hay que tener en cuenta que durante gran parte de este periodo no cesa la pesca de la especie objetivo de la pesquería, el pulpo (periodo de veda de *O. vulgaris*: del 16 Mayo a 1 Julio, Resolución 4/05/2015, DOGA), y que parte de los ejemplares de *S. arctus* capturados pueden pasar a ser comercializados fuera de las vías legales. La protección de hembras ovadas es una medida común en las pesquerías de crustáceos pero cuyos resultados, comentados anteriormente, pueden resultar negativos para la poblaciones de *S. arctus*. Aunque en este estudio no se observó ningún efecto de esta medida de regulación pesquera sobre la fecundidad relativa en las hembras de *S. arctus*, debería investigarse si la proporción y las tallas entre los sexos pue-

den actuar como factores limitantes en las cópulas, en la producción de desoves y en la fecundación de las puestas.

Por otra parte, los efectos de la estación del año y del tamaño materno en la inversión por huevo también deben ser considerados a fin de desarrollar un plan de gestión pesquera. Dado que las variaciones en el peso del huevo afectan a la etapa inicial de larvas, así como a las fases posteriores de la historia de vida de decápodos marinos (Jørstad *et al.*, 2005; Giménez, 2006; Bas *et al.*, 2008; Guay *et al.*, 2011), este rasgo podría tener implicaciones en el futuro éxito del reclutamiento y la recuperación de las poblaciones de *S. arctus*.

6.4.2. Composición bioquímica

La composición básica de los huevos recientes de *S. arctus* coincide, en términos de abundancia relativa, con la composición de los huevos de otros crustáceos, donde el agua es el principal componente, seguido de las proteínas, los lípidos y en menor proporción, los carbohidratos y el contenido inorgánico (Pandian, 1994). Sin embargo, los huevos de *S. arctus* muestran diferencias respecto al contenido relativo de lípidos. El contenido de lípidos respecto a la biomasa seca en *S. arctus* fue del 30 %, un valor próximo al obtenido en otros decápodos como *H. gammarus* (26.2 %; Rosa *et al.*, 2005), *Pandalus borealis* (28 %; Brillon *et al.*, 2005), *Callinectes sapidus* (26-22 %; Amsler y George, 1984), *M. brachydactyla* (22.7-26.1 %; Verísimo, 2015) y *Chaceon quinquedens* (28 %; Biesiot y Perry, 1995), pero superior al estimado en los huevos de *Nephrops norvegicus* (15 %; Rosa *et al.*, 2003) o *C. crangon* (15 %; Urzúa *et al.*, 2012). No obstante, la comparación de la composición bioquímica de los huevos entre diferentes trabajos puede presentar problemas, por las particularidades de las técnicas de análisis utilizadas y por el sistema empleado para determinar el estado de desarrollo de los embriones (Moran y Mcalister, 2009).

En *S. arctus*, la composición bioquímica relativa de los huevos permaneció prácticamente constante durante el periodo de estudio, por lo que las diferencias observadas en la composición bioquímica absoluta indican que la inversión materna por huevo esta definida principalmente por una mayor biomasa seca por huevo. Este resultado es acorde con las conclusiones de otros estudios en decápodos marinos, en los que la inversión por huevo también se encuentra supeditada a un mayor biomasa seca por huevo (Fischer *et al.*, 2009a; Urzúa *et al.*, 2012). Pero difiere con otras estrategias, como la observada en *M. brachydactyla*, en la que

las variaciones en la inversión por huevo ocurren principalmente a nivel de la composición bioquímica relativa (Verísimo, 2015).

Las variaciones estacionales observadas en la composición bioquímica absoluta y en la energía por huevo, indican una diferente provisión por parte de las hembras durante el periodo reproductivo, que puede tener implicaciones en la embriogénesis. La mayor provisión de los huevos en las puestas de invierno, frente a las de primavera y verano, podría estar relacionada con un aumento de las necesidades energéticas de los embriones para hacer frente a las diferentes condiciones ambientales. Fischer *et al.* (2009b) observaron una mayor inversión en los huevos de *C. setosus* a bajas temperaturas, que relacionaron con una reducción de la eficiencia metabólica de los lípidos y las proteínas durante el desarrollo embrionario. Los lípidos durante esta fase inicial del ciclo de vida constituyen la principal fuente de energía, contribuyendo en al menos el 60% del gasto energético (Holland, 1978; Wehrtmann y Graeve, 1998). Además, los lípidos tienen un importante papel estructural, fundamentalmente como constituyentes de las membranas celulares (Rosa *et al.*, 2005). Por su parte, las proteínas por su función estructural, van a jugar un papel muy importante en la morfogénesis y en menor medida en la provisión de energía (Holland, 1978).

Los ácidos grasos predominantes en los huevos recientes de *S. arctus* en el medio natural fueron 14:0, 16:0, 18:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 20:4n-6 (ARA), 20:5n-3 (EPA) y 22:6n-3 (DHA). Este perfil general coincide con los ácidos grasos mayoritarios descritos en los huevos de otros crustáceos marinos como *N. norvegicus* (Rosa *et al.*, 2003), *H. gammarus* (Rosa *et al.*, 2005), *M. brachydactyla* (Figueiredo y Narciso, 2008), *Plesionika martia martia*, *Palaemon serratus*, *Palaemon elegans* (Morais *et al.*, 2002) y *Armases cinereum* (Figueiredo *et al.*, 2008).

En este estudio, el grupo de ácidos grasos en mayor abundancia en los huevos recientes fueron los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), representando entre el 48% y el 67% del total de ácidos grasos, seguido por los monoinsaturados (MUFA, 19-31%) y los saturados (SAT, 15-22%). En general, los huevos de crustáceos muestran diferentes patrones según la proporción de estas tres fracciones de ácidos grasos, en la que pueden predominar una fracción o encontrarse todas en una misma proporción (Morais *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2007). En base al contenido de PUFA, los huevos de *S. arctus* pueden ser agrupados con los de otras especies como *P. serratus*, *P. elegans*, *M. brachydactyla*, *H. gammarus* y *Polybius henslowii*, en los que esta fracción también es mayoritaria (Morais *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2007; Figueiredo y Narciso, 2008; Leal *et al.*, 2013). Los PUFA, especialmente DHA y

EPA, han sido identificados como nutrientes esenciales en los animales marinos (Sargent *et al.*, 1999). Esto, unido su alto contenido en los huevos indica la necesidad de *S. arctus* incorporar a través de la dieta una importante cantidad para su reproducción. En cuanto a los SAT y MUFA, no son considerados ácidos esenciales, ya que pueden ser sintetizados de nuevo u obtenidos por desaturación o elongación de otros SAT, MUFA o PUFA (Sargent, 1995).

Los ácidos grasos y sus ratios son utilizados en los organismos marinos como biomarcadores porque se mantienen en los extractos lipídicos de algunos tejidos, siendo así un reflejo de su posición trófica y de la calidad de la dieta (El-Sabaawi *et al.*, 2009). La ratio EPA/DHA es uno de los indicadores empleados para definir la posición trófica, ya que tiende a disminuir hacia niveles tróficos superiores, dado que el DHA tiende a conservarse a lo largo de la red trófica y el EPA tiene su origen en las plantas (Auel *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Dalsgaard *et al.*, 2003). Por lo tanto, los altos valores de la ratio EPA/DHA (1.14-1.37) y del contenido de DHA (14-24 %) determinados en los huevos de *S. arctus* son un reflejo del nivel medio-bajo que ocupa este escilárido en la red trófica. Además, la baja proporción de 18:1n-7/18:1n-9 (0.3-0.6) y los altos valores de 18:1n-9 en los huevos (6-10 % del total de ácidos grasos) señalan que *S. arctus* posee una dieta carnívora, dado que el ácido graso 18:1n-7 procede de microorganismos eucariotas, principalmente diatomeas, y el 18:1n-9 es de los más abundantes en animales marinos (Dalsgaard *et al.*, 2003). No obstante, la proporción de 18:1n-9 fue inferior a los valores descritos en los huevos de otros crustáceos como *N. norvegicus*, *H. gammarus*, *P. martia martia*, *P. serratus* y *A. cinereum* (Morais *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2003, 2005; Figueiredo *et al.*, 2008), en los que este ácido graso llega a alcanzar una abundancia relativa >20 %, y que se caracterizan por una dieta principalmente carnívora, lo que sugiere la presencia de una dieta más variada en *S. arctus*.

Los ácidos grasos de cadena impar, principalmente 15:0, 17:0 y 19:0, están asociados a una biosíntesis por parte de bacterias heterótrofas y son particularmente abundantes en los sedimentos marinos (Perry *et al.*, 1979; Řezanka y Sigler, 2009). Así, la presencia de 15:0 y 17:0 en proporciones relativamente altas en los huevos de *S. arctus* (1.4 % del total de ácidos grasos) indica que esta langosta puede desplazarse a otros hábitats como fondos de arena o fango, y buscar alimento entre los sedimentos.

Las elevadas proporciones de EPA (24-32 %) y también de 16:1n-7 (7-13 %) registradas en los huevos reflejan una fuente basada en diatomeas (Dalsgaard *et al.*, 2003). Esta fuente puede estar relacionada con la contribución en la dieta de *S. ar-*

ctus de algunas clases de moluscos, en los que estos ácidos grasos pueden encontrarse en abundancia, como los bivalvos *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Mercenaria mercenaria*, *Mya arenaria*, *Spisula solidissima*, *Chlamys opercularis*, *Macoma balthica*, *Mytilus edulis*, *Argopecten gibbus*, *Placopecten magellanicus*, *Pecten maximus*; gasterópodos como *Crepidula fornicata*, *Neptunea antiqua*, *Haliotis laevigata*, *Haliotis rubra*, *Pattela vulgata* y *Patella depressa* (Morais *et al.*, 2003); y poliplacóforos (Latyshev *et al.*, 2004). Estas clases de moluscos se encuentran entre las principales presas en la dieta de esciláridos (Lavalli *et al.*, 2007).

Los perfiles de ácidos grasos de los huevos mostraron diferencias entre las puestas realizadas en los dos ciclos reproductivos estudiados. Estas diferencias suponen una importante variación estacional e interanual en la calidad de los huevos, y como se ha demostrado en algunas especies de peces y crustáceos, puede tener potenciales consecuencias para la supervivencia de las larvas iniciales (Racotta *et al.*, 2003; Bachan *et al.*, 2012). Esta repercusión sobre el éxito reproductivo puede todavía alcanzar una mayor relevancia si tenemos en cuenta la variación estacional en la inversión en peso por huevo.

La composición de ácidos grasos en los huevos de decápodos está afectada por la dieta de los reproductores (Cahu *et al.*, 1995; Sui *et al.*, 2011). En general, la dieta de estos invertebrados presenta una marcada variación temporal, reflejo de la abundancia, la disponibilidad y las características nutricionales de las presas, factores que a su vez dependen de las condiciones ambientales y de los ciclos de vida de las especies que la componen (Freire y González-Gurriarán, 1995; Bernárdez *et al.*, 2000). De esta forma, la composición de ácidos grasos en las presas puede representar características del hábitat, como la exposición o la profundidad (Morais *et al.*, 2003; Nerot *et al.*, 2015), así como los cambios ambientales que se producen por ejemplo, durante procesos de afloramiento de aguas profundas (Fernández-Reiriz *et al.*, 2015). Esta variación temporal de las condiciones ambientales pueden provocar cambios a nivel de ácidos grasos en los invertebrados marinos incluso a escalas de tiempo pequeñas (mes a mes) (Brazão *et al.*, 2003; Ezgeta-Balić *et al.*, 2012). En este estudio, la reducida área y rango de profundidades de la zona de muestreo, señalan a los cambios temporales en la disponibilidad y composición de presas como los factores responsables de la variabilidad en el perfil de ácidos grasos en las puestas. Por ejemplo, un aumento en la dieta de presas que se alimentan de algas marrones y algas rojas, podría explicar la alta proporción de EPA y ARA en las puestas realizadas en la primavera de 2009. Por otra parte, una dieta con un origen en la red trófica basado en diatomeas, podría

explicar la mayor proporción de los ácidos grasos 16:0 y 16:1n-7 encontrados en los huevos en las puestas de 2008, los cuales son considerados marcadores tróficos de esta clase de microalga (Dalsgaard *et al.*, 2003). No obstante, sin contar con un estudio previo que tenga en cuenta los cambios temporales en la dieta de *S. arctus* y sobre la composición de ácidos grasos de las posibles presas durante el periodo de estudio, no es posible determinar con certeza cual es el origen de las diferencias en el perfil de ácidos grasos de los huevos.

Los huevos también presentaron importantes diferencias en el contenido de 20:4n-6 (ARA) entre épocas. Durante la primavera de 2009 se llegó casi a duplicar su contenido en los huevos respecto a otras épocas. A nivel fisiológico, ARA es un precursor en la síntesis de prostaglandinas, que son sustancias que en los invertebrados tienen potentes efectos sobre la reproducción, la digestión, el sistema respiratorio, el control de la permeabilidad de iones a través de membranas, y restringen la disolución de grasa (Stanley-Samuels, 1987). Así, este ácido graso es relevante para reprimir la disolución de la grasa y obstaculizar que la membrana del huevo y el funículo crezcan, lo cual podría provocar una fijación anormal de los embriones a los pleópodos (Ying *et al.*, 2006). Por estos motivos, las variaciones observadas en la proporción de ARA en los huevos podría tener importantes consecuencias en la viabilidad de las puestas entre épocas.

Dado que las larvas de *S. arctus* son planctotróficas, las diferencias cualitativas y cuantitativas en las reservas embrionarias, incluyendo los ácidos grasos, van a condicionar su capacidad para hacer frente a los períodos de baja disponibilidad de alimento tras la eclosión. En este sentido, la variabilidad interanual observada en el contenido DHA y EPA en las puestas puede jugar un papel importante, provocando diferencias en la tasa de eclosión y la calidad de las larvas recién eclosionadas entre años (Cavalli *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2007). Una variabilidad que unida a unas condiciones poco favorables de alimento en la columna de agua puede favorecer o tener consecuencias negativas para el reclutamiento de los ejemplares de esta especie. Un caso extremo fue descrito por Kattner *et al.* (1994) durante el estudio de la reproducción anual en *C. crangon*, en el que un fallo en el reclutamiento anual fue relacionado con una inusual desaparición de los ácidos grasos insaturados en los primeros estados de desarrollo larvarios, correspondientes al principal periodo de puesta, y a un periodo de condiciones ambientales poco favorables durante la fase larvaria.

6.4.3. Factores que influyen en la inversión por huevo

El peso y el diámetro de los huevos son utilizados generalmente como indicadores de la inversión por huevo. Sin embargo, el tamaño del huevo por sí sólo, no puede explicar todas las correlaciones ecológicas, fisiológicas y evolutivas con la inversión por huevo, sino se tiene en cuenta su composición bioquímica (Moran y Mcalister, 2009). En este sentido, el contenido de lípidos puede ser un buen representante de la inversión por huevo, dado que los lípidos son componentes esenciales de las membranas celulares, proporcionan ácidos grasos esenciales y son la principal fuente de energía durante los desarrollos embrionarios (Holland, 1978; Wehrtmann y Graeve, 1998; Rosa *et al.*, 2005).

La inversión de lípidos por huevo en *S. arctus* mostró un claro patrón estacional, con una mayor inversión por huevo durante los primeros desoves en invierno, que se redujo gradualmente en las puestas de primavera y verano. Esta variación estacional en la inversión por huevo también ha sido descrita en otros decápodos (Amsler y George, 1984; Bella y Fish, 1996; Paschke *et al.*, 2004; Bas *et al.*, 2007, 2008; Verísimo *et al.*, 2011; Urzúa *et al.*, 2012). En general, las hipótesis utilizadas para explicar esta estacionalidad en la inversión por huevo sugieren que las variables ambientales (p. ej., fotoperiodo, temperatura, productividad) actúan como señales o mecanismos reguladores para que la inversión realizada se ajuste a las condiciones en las que se desarrollará la descendencia. Los resultados obtenidos en *S. arctus* indican que, entre todas las variables estudiadas que pueden actuar sobre la inversión por huevo, correspondió un mayor peso a factores maternos, como el estado nutricional o la talla, frente a parámetros ambientales como la temperatura y el fotoperiodo. No obstante, es indudable que en las especies ectotermas existe una estrecha relación entre ciertos parámetros ambientales, como los anteriormente citados, y su condición fisiológica.

Dentro de los factores ambientales, la temperatura mostró, en los momentos previos al desove, una relación inversa con la inversión en lípidos por huevo. Esta tendencia observada podría apoyar la idea de que la temperatura tiene un efecto en la inversión por huevo en *S. arctus*. Esta relación podría explicarse si la temperatura actuase de forma diferencial sobre los procesos que tienen lugar durante la maduración de los ovarios. Por ejemplo, un incremento de temperatura podría favorecer la proliferación y diferenciación de las células germinales, pero también disminuiría el tiempo disponible para acumular vitelo durante la vitelogénesis (Atkinson *et al.*, 2001). Este efecto también permitiría explicar la relación inversa

entre la inversión por huevo y el número de huevos producidos durante las puestas de invierno y primavera, pero no la menor inversión realizada en número y por huevo en las puestas de verano, señalando que otros mecanismos pueden estar interviniendo, como el estado fisiológico (la muda, el estado nutricional, etc.). En decápodos, son varios los trabajos que han encontrado importantes variaciones en la inversión por huevo en puestas producidas a diferentes temperaturas. Por ejemplo, Amsler y George (1984) observaron hasta un 20 % más de lípidos en los embriones de *C. sapidus* procedentes de puestas producidas a 16°C que en las producidas a una mayor temperatura (26°C). Fischer *et al.* (2009a) también encontraron que *C. setosus* puede invertir hasta un 32 % más en C elemental por huevo (indicador de lípidos; Petersen y Anger, 1997) a temperaturas bajas. Este patrón también es consistente en otros taxones marinos en los que predomina la evidencia de que el tamaño del huevo y el tamaño de la descendencia casi siempre muestran una correlación negativa con la temperaturas dentro de un rango ambiental relevante (Atkinson *et al.*, 2001). No obstante, como se ha observado en la elevada correlación entre el fotoperiodo y la temperatura, es muy difícil separar el efecto de una variable respecto al de otra que puede también estar actuando, principalmente cuando estas variables tienen una marcada variación estacional.

Uno de los principales factores que influye en la inversión energética destinada a la reproducción es el estado nutricional de los reproductores (Harrison, 1990). Esto es acorde con la variación estacional observada en el índice hepatosomático de las hembras en este estudio. El índice hepatosomático mostró como las hembras de *S. arctus*, antes de comenzar el periodo reproductivo, almacenan nutrientes en el hepatopáncreas hasta alcanzar un máximo estado nutricional, y que una vez alcanzado, comienzan a utilizarlos para dar soporte a los procesos de maduración ovárica. Este patrón de almacenamiento de reservas en el hepatopáncreas y su utilización durante la ovogénesis es una característica compartida entre decápodos (Gibson y Barker, 1979).

Así, es lógico pensar que durante un mismo ciclo reproductivo, en el que puede realizar hasta tres puestas anuales (Capítulo 4), las reservas nutricionales de las hembras se van agotando, con lo que tras cada puesta poseen menos recursos para invertir en una puesta siguiente, pudiendo así el estado nutricional llegar a ser un factor limitante en la reproducción y afectar a la producción de desoves, la fecundidad y la inversión por huevo (Cahu *et al.*, 1995; Millamena y Qunitio, 2000; Wen *et al.*, 2002). En *S. arctus*, la correlación entre el contenido lipídico de los huevos y el estado nutricional de las hembras, confirmada por el modelo adi-

tivo, indica que la cantidad de reservas en el hepatopáncreas va a condicionar la contribución a la inversión en lípidos por huevo. Esta reducción de las reservas del hepatopáncreas en la realización de puestas sucesivas ha sido observada en otros decápodos como *Fenneropenaeus indicus* (Vazquez Boucard *et al.*, 2004). Sin embargo, en *S. arctus* esta reducción del estado nutricional solo se observó durante la inversión realizada en las puestas de invierno (primera puesta) y primavera (segunda puesta), llegando a agotar todas las reservas almacenadas en estas dos primeras puestas. Durante el proceso de ovogénesis de la tercera puesta, las hembras experimentaron una importante recuperación del estado nutricional hasta alcanzar en Julio, los niveles mostrados antes del comienzo de la maduración ovárica de las puestas de primavera (Febrero-Marzo). Esto indica que, al contrario de lo que sucede con la producción de las puestas de invierno y primavera, la inversión realizada durante la maduración ovárica de la tercera puesta no está relacionada con la utilización de las reservas del hepatopáncreas.

En *N. norvegicus* también se ha observado como la maduración ovárica no está supeditada a una reducción de las reservas del hepatopáncreas, probablemente debido a que la principal función de estas reservas es la de almacenar energía para el proceso de muda (Rosa y Nunes, 2002). Así, este cambio en el patrón de utilización de las reservas almacenadas en *S. arctus* podría deberse a la necesidad de las hembras de prepararse para un evento de muda a finales del verano (Capítulo 4). El mecanismo utilizado por las hembras para poder incrementar su estado nutricional durante este último periodo podría consistir inicialmente en un aumento de la cantidad de alimento ingerido, y en una segunda fase, a una rápida movilización de los nutrientes en el hepatopáncreas que mantendría estable su condición fisiológica. Esta necesidad de las hembras de incrementar su estado nutricional permite explicar también la reducción de la inversión destinada a las últimas puestas del ciclo reproductivo, tal y como reflejan los datos de fecundidad y lípidos por huevo de las puestas de verano.

Otro factor que también influye en el contenido de lípidos por huevo es el tamaño materno. El contenido en lípidos por huevo aumentó linealmente con la talla, señalando que las hembras más grandes producen huevos de más calidad que los de hembras más pequeñas. Esta relación de la talla con la composición elemental de los huevos también fue observada en cangrejos brachyuros como *C. setosus* (Fischer *et al.*, 2009a). Este efecto de la talla sobre la calidad de los huevos pone de relevancia la necesidad de proteger a las hembras más grandes no sólo por ser más fecundas (Birkeland y Dayton, 2005), sino también por la calidad de

sus huevos.

Cabe señalar que el tamaño de las hembras no mostró una correlación con su estado nutricional. Esto puede estar relacionado con el hecho de que la talla en *S. arctus* puede no ser un factor determinante en la obtención de alimento y la calidad de este, si tenemos en cuenta que su dieta, al igual que sucede en otros esciláridos, se basa en una gran diversidad invertebrados de pequeño tamaño (Lau, 1988; Vilotte, 1982; Kabli, 1989; Johnston, 2007; Lavalli *et al.*, 2007).

En conclusión, este estudio demuestra que la condición nutricional de las hembras de *S. arctus* es una importante fuente de variabilidad en la descendencia.

Conclusiones

Basándonos en los objetivos iniciales planteados, su desarrollo y los resultados obtenidos en esta tesis, se extraen las conclusiones que se presentan a continuación:

- El sesgo observado hacia las hembras en la proporción sexual del stock de *S. arctus* es consecuencia de una de las actuales medidas que regulan su explotación como es la protección de las hembras ovadas. Dado que las hembras se encuentran ovadas en la mayor parte del ciclo anual, la protección de hembras ovadas hace que la pesca se concentre fundamentalmente en los machos. Por lo tanto, es preciso profundizar sobre las consecuencias de esta medida de gestión sobre diferentes aspectos de la biología reproductiva: éxito en los apareamientos, número de puestas, la tasa de fecundación de las puestas, etc. a lo largo del periodo reproductivo.
- La talla mínima de captura de 90 mm de LT, aunque es superior a la talla de madurez sexual fisiológica en *S. arctus*, no garantiza que todos los individuos tengan la oportunidad de reproducirse más de una vez. Dado que sólo está protegiendo una pequeña parte, apenas un 3%, de la producción de huevos del stock. Es necesario un aumento de la talla mínima de captura para preservar una mayor proporción de la producción de huevos anual. Por ello, debe ser objetivo de futuras investigaciones la determinación de una talla mínima que proteja un potencial reproductivo que garantice la sostenibilidad de sus poblaciones en función del esfuerzo de pesca.
- El estudio del desarrollo embrionario permite concluir que el área ocupada por el vitelo es un buen indicador para la determinación del grado del

desarrollo de los embriones durante la embriogénesis, dado que el vitelo es consumido desde prácticamente el inicio del desarrollo. Este indicador permite conocer el estado de desarrollo de las puestas y realizar comparaciones entre estudios sobre diferentes características de las puestas como la fecundidad, el tamaño de los huevos, la composición bioquímica, etc.

- Los cambios en las características biométricas y bioquímicas de las puestas, con una menor fecundidad pero con huevos con mayor vitelo y contenido en lípidos en las puestas de invierno frente a una mayor fecundidad y menor inversión por huevo en las puestas de primavera, ponen de manifiesto la existencia de una estrategia reproductiva, resultado de una respuesta adaptativa a la variabilidad estacional de las condiciones ambientales del hábitat.
- Dado que *S. arctus* es una especie que realiza varias puestas anuales y teniendo en cuenta que las características biométricas y bioquímicas de las últimas puestas son peores que las de las puestas precedentes, se llega a la conclusión que a lo largo del periodo reproductivo se produce un importante desgaste fisiológico de las hembras, que se ve reflejado en las características de su última puesta.

Bibliografía

- Agnalt, A. L. (2008). Fecundity of the European lobster (*Homarus gammarus*) off southwestern Norway after stock enhancement: do cultured females produce as many eggs as wild females? *ICES Journal of Marine Science*, 65(2):164–170.
- Aguzzi, Company, y Sardà (2007). The activity rhythm of berried and unberried females of *Nephrops norvegicus* (Decapoda, Nephropidae). *Crustaceana*, 80(9):1121–1134.
- Aiken, D. E. (1980). Molting and growth. En Cobb, J. S. y Phillips, B. F., editores, *The Biology and Management of Lobsters*, volumen Vol. I, pp. 91–163. Academic Press.
- Aiken, D. E. y Waddy, S. L. (1980). Reproductive biology. En Cobb, J. S. y Phillips, B. F., editores, *The Biology and Management of Lobsters*, volumen Vol. I, pp. 215–276. Academic Press.
- Aiken, D. E. y Waddy, S. L. (1989). Interaction of Temperature and Photoperiod in the Regulation of Spawning by American lobsters (*Homarus americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(1):145–148.
- Aiken, D. E., Waddy, S. L., y Mercer, S. M. (2004). Confirmation of external fertilization in the American lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology*, 24:474–480.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6).
- Allen, R. M., Buckley, Y. M., y Marshall, D. J. (2008). Offspring size plasticity in response to intraspecific competition: an adaptive maternal effect across life-history stages. *The American naturalist*, 171(2):225–37.

- Álvarez, I., Gomez-Gesteira, M., DeCastro, M., y Dias, J. (2008). Spatio-temporal evolution of the upwelling regime along the western coast of the Iberian Peninsula. *Journal of Geophysical Research*, 113(, & J.M. Dias (2008). . , C07020).
- Álvarez, I., Gomez-Gesteira, M., DeCastro, M., Lorenzo, M., Crespo, A., y Dias, J. (2011). Comparative analysis of upwelling influence between the western and northern coast of the Iberian Peninsula. *Continental Shelf Research*, 31(5):388–399.
- Álvarez, I., Lorenzo, M. N., y DeCastro, M. (2012). Analysis of chlorophyll a concentration along the Galician coast: seasonal variability and trends. *ICES Journal of Marine Science*, 69(5):728–738.
- Amsler, M. O. L. y George, R. Y. (1984). Seasonal variation in the biochemical composition of the embryos of *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Crustacean Biology*, 4:546–553.
- Anderson, J. R., Spadaro, A. J., Baeza, J. A., y Behringer, D. C. (2013). Ontogenetic shifts in resource allocation: Colour change and allometric growth of defensive and reproductive structures in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 108(1):87–98.
- Anger, K. (1998). Patterns of growth and chemical composition in decapod crustacean larvae. *Invertebrate Reproduction and Development*, 33: 2-3:159–176.
- Anger, K. (2001). *Crustacean Issues 14: The biology of decapod crustacean larvae*. Crustacean Issues. A.A Balkema, Rotterdam, Netherlands.
- Anger, K. y Harms, J. (1990). Elemental (CHN) and proximal biochemical composition of decapod crustacean larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 97 (1):69–80.
- ASMFC (2015). American Lobster Benchmark Stock Assessment and Peer Review Report. http://www.asafc.org/uploads/file//55d61d73AmLobsterStockAssmt_PeerReviewReport_Aug2015_red2.pdf.
- Atkinson, D., Morley, S. a., Weetman, D., y Hughes, R. N. (2001). Offspring size responses to maternal temperature in ectotherms. *Environment and Animal Development: Genes, Life Histories and Plasticity*, pp. 269–285.
- Attard, J. y Hudon, C. (1987). Embryonic development and energetic investment in egg production in relation to size of female lobster (*Homarus americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(6):1157–1164.
- Auel, H., Harjes, M., Rocha, R., Stübing, D., y Hagen, W. (2002). Lipid biomarkers indicate different ecological niches and trophic relationships of the Arctic hyperiid amphipods *Themisto abyssorum* and *T. libellula*. *Polar Biology*, 25(5):374–383.

- Bañón, R., Campelos, J., García, M., Quintero, F., Ribó, J., Lamas, F., Gancedo, A., Arnaiz, R., Rodríguez, M., Garazo, A., y et al. (2007). La pesca de pulpo común con nasas en la costa gallega, 1999-2004. p. 193. Xunta de Galicia. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos. Dirección Xeral de Recursos Mariños.
- Bachan, M. M., Fleming, I. A., y Trippel, E. A. (2012). Maternal allocation of lipid classes and fatty acids with seasonal egg production in Atlantic cod (*Gadus morhua*) of wild origin. *Marine Biology*, 159(2012):2281–2297.
- Baisre, J. A. (1994). Phyllosoma larvae and the phylogeny of Palinuroidea (Crustacea: Decapoda): a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res*, 45(6):925–944.
- Barnes, H. (1965). Studies in the biochemistry of cirripede eggs. I. Changes in the general biochemical composition during development of *Balanus balanoides* and *B. balanus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 45(2):321–339.
- Barreiros, J. P. y Santos, R. S. (1998). Notes on the food habits and predatory behaviour of the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae) in the Azores. *Ciências Biológicas e Marinhas*, 16A:29–35.
- Bas, C., Spivak, E., y Anger, K. (2008). Variation in early developmental stages in two populations of an intertidal crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. *Helgoland Marine Research*, 62:393–401.
- Bas, C. C., Spivak, E. D., y 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*. *Helgoland Marine Research*, 61:225–237.
- Bell, M. V. y Dick, J. R. (1990). The fatty acid composition of phospholipids from the eyes of the northern deepwater prawn, *Pandalus borealis*. *Biochemical Society transactions*, 18(5):907–908.
- Bella, M. y Fish, J. (1996). Fecundity and Seasonal Changes in Reproductive Output of Females of the Gravel Beach Amphipod, *Pectenogammarus planicrurus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76:37–55.
- Bentley, D., Keshishian, H., Shankland, M., y Toroian-Raymond, A. (1979). Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper, *Schistocerca nitens*. *Journal of embryology and experimental morphology*, 54(Table 3):47–74.
- Bernárdez, C., Freire, J., y González-Gurriarán, E. (2000). Feeding of the spider crab *Maja squinado* in rocky subtidal areas of the Ría de Arousa (north-west Spain). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 80:95–102.

- Bianchini, M. L. y Ragonese, S. (2007). Growth of Slipper Lobsters of the Genus *Scyllarides*. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 199–219. CRC Press.
- Biesiot, P. M. y Perry, H. M. (1995). Biochemical composition of the deep-sea red crab *Chaceon quinquedens* (geryonidae): organic reserves of developing embryos and adults. *Marine Biology*, 124:407–416.
- Birkeland, C. y Dayton, P. (2005). The importance in fishery management of leaving the big ones. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(7):356–358.
- Bivand, R. y Lewin-Koh, N. (2015). *maptools: Tools for Reading and Handling Spatial Objects*. R package version 0.8-36.
- Blanton, J., Atkinson, L., Fernández De Castillejo, F., y Lavin Montero, A. (1984). Coastal upwelling off the Rias Bajas Galicia, Northwest Spain 1: hydrographic studies. *Rapports et Procès Verbaux des Réunions CIEM*, 183:79–90.
- Bligh, E. y Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37:911–917.
- Boyle, P. y Rodhouse, P. (2005). Cephalopods as Predators. En *Cephalopods*, pp. 222–233. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Brazão, S., Morais, S., Boaventura, D., Ré, P., Narciso, L., y Hawkins, S. J. (2003). Spatial and temporal variation of the fatty acid composition of *Patella* spp. (Gastropoda: Prosobranchia) soft bodies and gonads. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(3):425–441.
- Brett, M. T. y Müller-Navarra, D. C. (1997). The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*, 38(August):483–499.
- Brillon, S., Lambert, Y., y Dodson, J. (2005). Egg survival, embryonic development, and larval characteristics of northern shrimp (*Pandalus borealis*) females subject to different temperature and feeding conditions. *Marine Biology*, 147:895–911.
- Browne, W. E., Price, A. L., Gerberding, M., y Patel, N. H. (2005). Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. *Genesis*, 42 (3):124–149.
- Burnham, K.P. y Anderson, D. (2002). *Model selection and inference: a practical information-theoretic approach*. Springer-Verlag, New York, 2ª edición.
- Burnham, K.P. y Anderson, D. (2004). Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. *Sociological Methods & Research*, 33(2):261–304.

- Butler, M., MacDiarmid, A., Wahle, R., Cockcroft, A., y Chan, T. (2013). *Scyllarus arctus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <http://www.iucnredlist.org>. Online; acceso 31-Agosto-2015.
- Cahu, C. L., Cuzon, G., y Quazuguel, P. (1995). Effect of highly unsaturated fatty acids, a-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 112:417–424.
- Calado, R. y Leal, M. C. (2015). *Trophic Ecology of Benthic Marine Invertebrates with Bi-Phasic Life Cycles: What Are We Still Missing?*, volumen 71. Elsevier Ltd., 1 edición.
- Calado, R., Pimentel, T., Cleary, D., Dionísio, G., Nunes, C., Da Silva, T., Dinis, M., y Reis, A. (2010). Providing a common diet to different marine decapods does not standardize the fatty acid profiles of their larvae: a warning sign for experimentation using invertebrate larvae produced in captivity. *Marine Biology*, 157:2427–2434.
- Calvo, N. S., Stumpf, L., Pietrokovsky, S., y Greco, L. S. L. (2011). Early and late effects of feed restriction on survival, growth and hepatopancreas structure in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 319(3-4):355–362.
- Cau, A., Davini, M. A., Deiana, A. M., y Salvadori, S. (1988). Gonadal structure and gametogenesis in *Scyllarus arctus* (L.) (Crustacea, Decapoda). *Italian Journal of Zoology*, 55:299–306.
- Cavalli, R. O., Lavens, P., y Sorgeloos, P. (1999). Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture*, 179 (1-4):387–402.
- Cavalli, R. O., Tamtin, M., Lavens, P., y Sorgeloos, P. (2001). Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de man) females during maturation. *Aquaculture*, 193 (3-4):311–324.
- Chang, Y. J., Sun, C. L., Chen, Y., Yeh, S. Z., y Chiang, W. C. (2007). Reproductive biology of the spiny lobster, *Panulirus penicillatus*, in the southeastern coastal waters off Taiwan. *Marine Biology*, 151:553–564.
- Chapelle, S. (1986). Aspects of phospholipid metabolism in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 84(4):423–439.
- Charmantier, G. y Charmantier-Daures, M. (2001). Ontogeny of Osmoregulation in Crustaceans: The Embryonic Phase. *American Zoologist*, 41(5):1078–1089.
- Chittleborough, R. (1975). Environmental factors affecting growth and survival of juvenile western rock lobsters *Panulirus longipes* (Milne-Edwards). *Marine and Freshwater Research*, 26(2):177.

- Chittleborough, R. (1976). Breeding of *Panulirus longipes cygnus* George under natural and controlled conditions. *Marine and Freshwater Research*, 27(3):499.
- Christensen, M. N. y Korsgaard, B. (1999). Protein metabolism, growth and pigmentation patterns during metamorphosis of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 237(2):225–241.
- Chubb, C. F. (2000). Reproductive Biology: Issues for Management. En Phillips, B. y Kittaka, J., editores, *Spiny Lobster: Fisheries and Culture*, pp. 245–275. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Clarke, A. (1993). Egg size and egg composition in polar shrimps (Caridea; Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 168(2):189–203.
- Clarke, A., Brown, J. H., y Holmes, L. J. (1990). The biochemical composition of eggs from macrobrachium rosenbergii in relation to embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 96:505–511.
- Clarke, K. R. y Gorley, R. N. (2006). *PRIMER v6: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E. Plymouth.
- Coutures, E. (2000). *Contributions à l'étude du cycle des Palinuridae et des Scyllaridae (Crustacés Décapodes) du lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie*. Biologie des organismes, Université de la Nouvelle-Calédonie.
- Crawley, M. (2007). Regression. En *The R Book*, pp. 387–448. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Currie, J. y Schneider, D. (2011). Spatial scaling from latitudinal gradients: size-specific fecundity in the American lobster *Homarus americanus*. *Marine Ecology Progress Series*, 439:193–201.
- Dalsgaard, J., St. John, M., Kattner, G., Müller-Navarra, D., y Hagen, W. (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. En Southward, A. J., Tyler, P. A., Young, C., y Fuiman, L., editores, *Advances in Marine Biology*, volumen 46, pp. 225–340. Academic Press.
- Davies, R. B. (2002). Hypothesis testing when a nuisance parameter is present only under the alternative: Linear model case. *Biometrika*, 89(2):484–489.
- De Grave, S., Pentcheff, N., Ahyong, S. T., Chan, T., Crandall, K., Dworschak, P., Felder, D., Feldmann, R., Fransen, C., Goulding, L., Lemaitre, R., Low, M., Martin, J., Ng, P., Schweitzer, C., Tan, S., Tshudy, D., y Wetzer, R. (2009). A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology*, 21:1–109.

- de Lestang, S. D., Hall, N. G., y Potter, I. C. (2003). Reproductive biology of the blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*, Decapoda: Portunidae) in five bodies of water on the west coast Australia. *Fishery Bulletin*, 101:745–757.
- DeMartini, E. E., McCracken, M. L., Moffitt, R. B., y Wetherall, J. A. (2005). Relative pleopod length as an indicator of size at sexual maturity in slipper (*Scyllarides squammosus*) and spiny Hawaiian (*Panulirus marginatus*) lobsters. *Fishery Bulletin*, 103:23–33.
- DeMartini, E. E. y Williams, H. A. (2001). Fecundity and Egg Size of *Scyllarides squammosus* (Decapoda: Scyllaridae) at Maro Reef, Northwestern Hawaiian Islands. *Journal of Crustacean Biology*, 21(4):891–896.
- Díaz, D., Mallol, S., Parma, A., y Goñi, R. (2011). Decadal trend in lobster reproductive output from a temperate marine protected area. *Marine Ecology Progress Series*, 433:149–157.
- Diez, M. J. y Spivak, E. D. (2012). Seasonal Variations in Size, Biomass, and Elemental Composition (CHN) of *Halicarcinus planatus* (Brachyura: Hymenosomatidae) Larvae from the Beagle Channel. *Journal of Crustacean Biology*, 32(4):575–581.
- do Vale Barreto, A., de Lourdes Zani-Teixeira, M., Ivo, C. T. C., y Katsuragawa, M. (2009). Biometric relationships of the spotted lobster, *Panulirus echinatus*, from Tamandaré coastal reefs, Pernambuco State, Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(08):1601–1606.
- Dragovich, A. (1969). Review of studies of tuna food in the Atlantic Ocean. Informe técnico 593, U.S. Department of the Interior. U.S. Fish and Wildlife Service Bureau of Commercial Fisheries.
- Duarte, L. F. d. A., Severino-Rodrigues, E., Pinheiro, M. A. A., y Gasalla, M. A. (2014). Slipper lobsters (Scyllaridae) off the southeastern coast of Brazil: relative growth, population structure, and reproductive biology. *Fishery Bulletin*, 113(1):55–68.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3):350–356.
- Dupré, E. (1988). Desarrollo embrionario de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis* (Decapoda, Macrura, Palinuridae). *Investigaciones Marinas*, 16:49–62.
- Edgar, G. J. (1990). Predator-prey interactions in seagrass beds. I. The influence of macrofaunal abundance and size-structure on the diet and growth of the western rock lobster *Panulirus cygnus* George. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 139(1-2):1–22.

- El-Sabaawi, R., Dower, J., Kainz, M., y Mazumder, A. (2009). Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids. *Marine Biology*, 156:225–237.
- Ennis, G. P. (1973). Endogenous Rhythmicity Associated with Larval Hatching in the Lobster *Homarus Gammarus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53(3):531–538.
- Ezgeta-Balić, D., Najdek, M., Peharda, M., y Blažina, M. (2012). Seasonal fatty acid profile analysis to trace origin of food sources of four commercially important bivalves. *Aquaculture*, 334-337:89–100.
- FAO (2015). Fisheries and Aquaculture Department. Global Capture Fisheries Production Statistics for years 2009-2013. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/en>. Online; acceso 19-Agosto-2015.
- Faria, J. (2012). *Population structure and genetic diversity of three marine lobsters from the NE Atlantic and Mediterranean*. Tesis doctoral, University of Porto, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Farmer, A. (1974). Relative growth in *Nephrops norvegicus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). *Journal of Natural History*, 8(6):605–620.
- Fenberg, P. B. y Roy, K. (2008). Ecological and evolutionary consequences of size-selective harvesting: how much do we know? *Molecular Ecology*, 17(1):209–220.
- Fernández-Reiriz, M., Garrido, J., e Irisarri, J. (2015). Fatty acid composition in *Mytilus galloprovincialis* organs: trophic interactions, sexual differences and differential anatomical distribution. *Marine Ecology Progress Series*, 528:221–234.
- Figueiredo, J. y Narciso, L. (2008). Egg volume, energy content and fatty acid profile of *Maja brachydactyla* (Crustacea: Brachyura: Majidae) during embryogenesis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88:1401–1405.
- Figueiredo, J., Penha-Lopes, G., Anto, J., Narciso, L., y Lin, J. (2008). Fecundity, brood loss and egg development through embryogenesis of *Armases cinereum* (Decapoda: Grapsidae). *Marine Biology*, 154:287–294.
- Fischer, S. y Thatje, S. (2008). Temperature-induced oviposition in the brachyuran crab *Cancer setosus* along a latitudinal cline: Aquaria experiments and analysis of field-data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 357:157–164.
- Fischer, S., Thatje, S., y Brey, T. (2009a). Early egg traits in *Cancer setosus* (Decapoda, Brachyura): effects of temperature and female size. *Marine Ecology Progress Series*, 377:193–202.

- Fischer, S., Thatje, S., Graeve, M., Paschke, K., y Kattner, G. (2009b). Bioenergetics of early life-history stages of the brachyuran crab *Cancer setosus* in response to changes in temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 374:160–166.
- Fleming, I. a. y Ng, S. (1987). Evaluation of Techniques for Fixing, Preserving, and Measuring Salmon Eggs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(11):1957–1962.
- Fonseca-Larios, M. E. y Briones-Fourzan, P. (1998). Fecundity of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) in the Caribbean coast of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 63(1):21–32.
- Forest, J. y Holthuis, L. (1960). The occurrence of *Scyllarus pygmaeus* (bate) in the mediterranean. *Crustaceana*, 1:156–163.
- Forward, R. B. (1987). Larval release rhythms of decapod crustaceans: an overview. *Bulletin of Marine Science*, 41(2):165–176.
- Fox, C. W. y Czesak, M. E. (2000). Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annu Rev Entomol*, 45:341–69. Annual review of entomology.
- Fraga, F. (1981). Upwelling off the Galician coast North West Spain. En Richards, F. A., editor, *Coastal upwelling*, pp. 176–182. American Geophysical Union, Washington D C.
- Freire, J. y González-Gurriarán, E. (1995). Feeding ecology of the velvet swimming crab *Necora puber* in mussel raft areas of the Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Ecology Progress Series*, 119:139–154.
- Frimpong, E. A. y Henebry, M. L. (2012). Short-Term Effects of Formalin and Ethanol Fixation and Preservation Techniques on Weight and Size of Fish Eggs. *Transactions of the American Fisheries Society*, 141(6):1472–1479.
- Fukuda, M., Yano, Y., Nakano, H., y Sugiyama, M. (1986). Protein and nucleic acid changes during early developmental stages of crested flounder. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52(6):951–955.
- Gardner, C. (2001). Composition of eggs in relation to embryonic development and female size in giant crabs (*Pseudocarcinus gigas* (Lamarck)). *Marine Freshwater Research*, 52:333–338.
- Gebauer, P., Paschke, K., Barría, A., y Anger, K. (2013). Seasonal variation in dry weight and elemental composition of the early developmental stages of *Petrolisthes laevigatus* (Guérin, 1835) (Decapoda: Porcellanidae) in the Seno de Reloncaví, southern Chile. *Helgoland Marine Research*, 67:167–177.

- Gelpi, C. G., Condrey, R. E., Fleeger, J. W., y Dubois, S. F. (2009). Discovery, evaluation, and implications of blue crab, *Callinectes sapidus*, spawning, hatching, and foraging grounds in federal (US) waters offshore of Louisiana. *Bulletin of Marine Science*, 85(3):203–222.
- George, R. W. y Morgan, G. R. (1979). Linear growth stages in the rock lobster (*Panulirus versicolor*) as a method for determining size at first physical maturity. *Rapports et Procès-verbaux des Reunion. Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, 175:182–185.
- Ghiselin, M. T. (1987). Evolutionary aspects of marine invertebrate reproduction. En Giese, A. C. y Pearse, J. S., editores, *Reproduction of Marine Invertebrates*, volumen Vol. IX. General aspects: Seeking unity in diversity, pp. 609–665. Blackwell Scientific Publications and The Boxwood Press, California.
- Gibson, R. y Barker, P. (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 17(JANUARY 1979):285–346.
- Giménez, L. (2006). Phenotypic links in complex life cycles: conclusions from studies with decapod crustaceans. *Integrative and Comparative Biology*, 46 (5):615–22.
- Giménez, L. y Anger, K. (2003). Larval performance in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, is a consequence of both larval and embryonic experience. *Marine Ecology Progress Series*, 249:251–264.
- Giménez, L., Anger, K., y Torres, G. (2004). Linking life history traits in successive phases of a complex life cycle: effects of larval biomass on early juvenile development in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*. *Oikos*, 104:570–580.
- Gnaiger, E. y Bitterlich, G. (1984). Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia*, 62:289–298.
- Goñi, R. y Latrouite, D. (2005). Review of the biology, ecology and fisheries of *Palinurus* spp. species of European waters: *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) and *Palinurus mauritanicus* (Gruvel, 1911). *Cahiers de Biologie Marine*, 46:127–142.
- Goñi, R., Quetglas, A., y Reñones, O. (2003). Size at maturity, fecundity and reproductive potential of a protected population of the spiny lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) from the western mediterranean. *Marine Biology*, 143:583–592.
- Goldstein, J. S., Dubofsky, E. A., y Spanier, E. (2015). Into a rhythm: diel activity patterns and behaviour in Mediterranean slipper lobsters, *Scyllarides latus*. *ICES Journal of Marine Science*, 70(4):782–792.

- Gómez-Gesteira, M., DeCastro, M., Alvarez, I., y Gómez-Gesteira, J. L. (2008). Coastal sea surface temperature warming trend along the continental part of the Atlantic Arc (1985-2005). *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 113(4):1-9.
- González-Gurriarán, E. (1985). Reproducción de la nécora *Macropipus puber* (L.) (Decapoda, Brachyura), y ciclo reproductivo en la Ría de Arousa (Galicia, NW España). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 2:10-32.
- González-Gurriarán, E., Fernández, L., Freire, J., y Muiño, R. (1996). Reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae) based on the analysis of seminal receptacles. *ICES, Shellfish Committee.C.M.*, p. K:29:17.
- Gonzalez-Gurriarán, E., Fernández, L., Freire, J., y Muiño, R. (1998). Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (decapoda, majidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 220:269-285.
- González-Gurriarán, E., Fernández, L., Freire, J., Muiño, R., y Parapar, J. (1993). Reproduction of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura:Majidae) in the southern galician coast (NW Spain). *International Council for the Exploration of the Sea, Shellfish Committee*, pp. 1-19.
- Gorokhova, E. y Kyle, M. (2002). Analysis of nucleic acids in *Daphnia*: development of methods and ontogenetic variations in RNA-DNA content. *Journal of Plankton Research*, 24 (5):511-522.
- Gracia, A. (1985). Variación estacional en la fecundidad de la langosta *Panulirus inflatus* (Bouvier, 1895)(Crustacea: Decapoda: Palinuridae). *Ciencias Marinas*, 11:7-27.
- Graeve, M. y Wehrtmann, I. S. (2003). Lipid and fatty acid composition of Antarctic shrimp eggs (Decapoda: Caridea). *Polar Biology*, 26:55-61.
- Green, B. S., Gardner, C., Hochmuth, J. D., y Linnane, A. (2014). Environmental effects on fished lobsters and crabs. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24(2):613-638.
- Green, B. S., Gardner, C., y Kennedy, R. B. (2009). Generalised linear modelling of fecundity at length in southern rock lobsters, *Jasus edwardsii*. *Marine Biology*, 156(9):1941-1947.
- Guay, C., Sainte-Marie, B., y Brêthes, J. C. (2011). Strong maternal effects and extreme heterogeneity of progeny development in the caridean shrimp *Sclerocrangon boreas* (Crangonidae). *Marine Biology*, 158:2835-2845.
- Guerra, Á., Lens, S., y Rocha, F. (2008). Impacto del hombre sobre el ecosistema de la Ría de Vigo: hacia una gestión integrada. En *LA RÍA DE VIGO. Una aproximación integral al ecosistema marino de la Ría de Vigo*, pp. 325-369. Instituto de Estudios Vigueses, Vigo.

- Guerrero, F., Blanco, J. M., y Rodríguez, V. (1994). Temperature-dependent development in marine copepods: a comparative analysis of models. *Journal of Plankton Research*, 16(1):95–103.
- Haddy, J. A., Courtney, A. J., y Roy, D. P. (2005). Aspects of the reproductive biology and growth of balmain bugs (*Ibacus spp.*) (Scyllaridae). *Journal of Crustacean Biology*, 25:263–273.
- Haddy, J. A., Stewart, J., y Graham, K. J. (2007). Fishery and Biology of Commercially Exploited Australian Fan Lobsters (*Ibacus spp.*). En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 359–375. CRC Press.
- Hadfield, M. G. y Strathmann, M. F. (1996). Variability, flexibility and plasticity in life histories of marine invertebrates. *Oceanologica Acta*, 19(3-4):323–334.
- Hamasaki, K. (2003). Effects of temperature on the egg incubation period, survival and developmental period of larvae of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) (Brachyura: Portunidae) reared in the laboratory. *Aquaculture*, 219:561–572.
- Hamasaki, K., Fukunaga, K., y Maruyama, K. (2003). Egg development and incubation period of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Decapoda: Portunidae) reared in the laboratory. *Crustacean research*, 32:45–54.
- Hamasaki, K., Imai, H., Akiyama, N., y Fukunaga, K. (2004). Ovarian development and induced oviposition of the overwintering swimming crab *Portunus trituberculatus* (Brachyura: Portunidae) reared in the laboratory. *Fisheries Science*, 70(6):988–995.
- Hancock, M. A., Hughes, J. M., y Bunn, S. E. (1998). Influence of genetic and environmental factors on egg and clutch sizes among populations of *Paratya australiensis* Kemp (Decapoda: Atyidae) in upland rainforest streams, south-east Queensland. *Oecologia*, 115(4):483–491. *Oecologia*.
- Hardwick Jr., C. W. y Cline, G. B. (1990). Reproductive status, sex ratios and morphometrics of the slipper lobster *Scyllarides nodifer* (Stimpson) (Decapoda: Scyllaridae) in the northeastern Gulf of Mexico. *Northeast Gulf Science*, 11(2):131–136.
- Harrison, K. E. (1990). The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: A review. *Journal of Shellfish Research*, 9:1–28.
- Hartnoll, R. (1982). Growth. En Abele, L. y Bliss, D. E., editores, *Embryology, Morphology and Genetics*, volumen Vol. 2 de *The Biology of Crustacea*, pp. 111–196. Academic Press, New York.
- Hartnoll, R. G. (1985). Growth, sexual maturity and reproductive output. En Wenner, A., editor, *Crustacean Issues 3. Factors in adult growth*, pp. 101–128. A. A. Balkema, Rotterdam.

- Hartnoll, R. G. (2006). Reproductive investment in brachyura. *Hydrobiologia*, 557:31–40.
- Hawkins, S., Corte-Real, H., Pannacciulli, F., Weber, L., y Bishop, J. (2000). Thoughts on the ecology and evolution of the intertidal biota of the Azores and other Atlantic Islands. *Hydrobiologia*, 440(1/3):3–17.
- Hearn, A. (2006). Life history of the slipper lobster *Scyllarides astori* Holthuis 1960, in the Galapagos islands, Ecuador. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 328:87–97.
- Heip, C. (1974). A comparison between models describing the influence of temperature on the development rate of copepods. *Biologisch Jaarboek Dodonaea*, 42:121–125.
- Helluy, S. M. y Beltz, B. S. (1991). Embryonic development of the American lobster (*Homarus americanus*): quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. *Biological Bulletin*, 180:355–371.
- Hendry, A. P., Day, T., y Cooper, A. B. (2001). Optimal size and number of propagules: allowance for discrete stages and effects of maternal size on reproductive output and offspring fitness. *The American Naturalist*, 157(4):387–407.
- Hepper, B. T. (1966). Measurement of Carapace Length and Total Length in the Crawfish, *Palinurus vulgaris*. *ICES Journal of Marine Science*, 30(3):316–323.
- Herbert, D., Phipps, P., y Strange, R. (1971). Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiology*, 5 (B):209–344.
- Herring, P. (1974). Observations on the embryonic development of some deep-living decapod crustaceans, with particular reference to species of *Acantheephyra*. *Marine Biology*, 25(1):25–33.
- Heydorn, A. E. F. (1969). Notes on the biology of *Panulirus homarus* and on length/weight relationships of *Jasus lalandii*. Informe técnico 69, Investigational Report, Division of Sea Fisheries, South Africa.
- Hoa, N. y Wouters, R. (2009). A fresh-food maturation diet with an adequate HUFA composition for broodstock nutrition studies in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). *Aquaculture*, 297:116–121.
- Holland, D. L. (1978). Lipid reserves and energy metabolism in larvae of benthic marine invertebrates. En Malins, D. y Sargent, J. R., editores, *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, volumen Vol. 4, pp. 85–123. Academic Press, London.
- Holland, D. L. y Gabbott, P. A. (1971). A micro-analytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.*, 51:659–668.

- Holthuis, L. (1991). *FAO species catalogue. Vol.13. Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date*, volumen Vol. 13. FAO, Rome, Rome.
- Ito, Y., Hokyo, N., y Fujisaki, K. (1980). Animal population and community. pp. 246–248.
- Jacobs, J., Biesiot, P., Perry, H., y Trigg, C. (2003). Biochemical composition of embryonic blue crabs *Callinectes sapidus* Rathbun 1896 (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of Mexico. *Bulletin of the Marine Science*, 72 (2):311–324.
- Johnston, D. (2007). Feeding Morphology and Digestive System of Slipper Lobsters. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 111–132. CRC Press.
- Jones, C. (2007). Biology and Fishery of the Bay Lobster, *Thenus* spp. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 325–358. CRC Press.
- Jones, C. M. (1993). Population structure of *Thenus orientalis* and *T. indicus* (Decapoda: Scyllaridae) in northeastern Australia. *Marine ecology progress series*, 97(1993):143–155.
- Jones, P. L. y Obst, J. H. (2000). Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax Destructor* (decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 20(3):431–441.
- Jørstad, K. E., Prodöhl, P. A., Kristiansen, T. S., Hughes, M., Farestveit, E., Taggart, J. B., Agnalt, A.-L., y Ferguson, A. (2005). Communal larval rearing of European lobster (*Homarus gammarus*): Family identification by microsatellite DNA profiling and offspring fitness comparisons. *Aquaculture*, 247(1-4):275–285.
- Juinio, M. (1987). Some aspects of the reproduction of *Panulirus penicillatus* (Decapoda: Palinuridae). *Bulletin of Marine Science*, 41 (2):242–252.
- Jun-jie, Y., Yun-long, Z., Qun, W., Zhong-liang, Z., Xian-cheng, H., Xiao-wei, D., y Chuanguang, A. (2006). Biochemical compositions and digestive enzyme activities during the embryonic development of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 253:573–582.
- Kabli, L. (1989). *Biology of sand lobster, Thenus orientalis (Lund)*. Tesis doctoral, University of Bombay.
- Kagwade, P. V. y Kabli, L. M. (1996). Reproductive biology of the sand lobster *Thenus orientalis* (Lund) from Bombay waters. *Indian Journal of Fisheries*, 43(1):13–25.
- Kanciruk, P. (1980). Ecology of juvenile and adult Palinuridae (spiny lobsters). En Cobb, J. y Phillips, B., editores, *The Biology and Management of Lobsters*, pp. 59–96. Academic Press, New York.

- Kanciruk, P. y Herrnkind, W. F. (1976). Autumnal reproduction in *Panulirus argus* at Bimini, Bahamas. *Bulletin of Marine Science*, 26(4):417–432.
- Kattner, G., Wehrtmann, I., y Merck, T. (1994). Interannual variations of lipids and fatty acids during larval development of *Crangon* spp. in the German Bight, North Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 107(1):103–110.
- Kay, M. C., Lenihan, H. S., Guenther, C. M., Wilson, J. R., Miller, C. J., y Shrout, S. W. (2012). Collaborative assessment of California spiny lobster population and fishery responses to a marine reserve network. *Ecological applications: a publication of the Ecological Society of America*, 22(1):322–35.
- Kennelly, S. (1992). Distributions, abundances and current status of exploited populations of spanner crabs *Ranina ranina* off the east coast of Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 85:227–235.
- Kindsvater, H. K., Bonsall, M. B., y Alonzo, S. H. (2011). Survival costs of reproduction predict age-dependent variation in maternal investment. *Journal of evolutionary biology*, 24(10):2230–40.
- Kinne, O. (1970). Temperature: Animals-invertebrates. En *Marine ecology: a comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters*, volumen Volume I: Environmental Factors. Marine Ecology, London.
- Koopman, H. N., Westgate, A. J., y Siders, Z. a. (2015). Declining fecundity and factors affecting embryo quality in the American lobster (*Homarus americanus*) from the Bay of Fundy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 72(3):352–363.
- Kozłowski, J. (1992). Optimal allocation of resources to growth and reproduction: implications for age and size at maturity. *Tree*, 7(1):15–19.
- Kumar, K., Vijayakumaran, M., Murugan, T. S., Kumar, J. D., Sreeraj, G., y Muthukumar, S. (2009). Captive breeding and larval development of the scyllarine lobster *Petrarctus rugosus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 43:101–112.
- Kuris, A. (1991). A review of patterns and causes of crustacean brood mortality. En Wenner, A. y Kuris, A., editores, *Crustacean Issues 7. Crustacean Egg Production*, volumen 7, pp. 117–141. A. A. Balkema, Balkema, Rotterdam.
- Labropoulou, M. y Machias, A. (1998). Effect of habitat selection on the dietary patterns of two triglid species. *Marine Ecology Progress Series*, 173:275–288.
- Lang, R. (1973). The ontogenetic development of *Maja squinado* (Crustacea malacostraca, Decapoda, Brachyura) with special view on the embryonic nutrition and the development of the interstium. *Zoologische Jahrbücher. Abtheilung für Anatomie und Ontogenie der Thiere*, 90:389–449.

- Laptikhovsky, V. (2006). Latitudinal and bathymetric trends in egg size variation: a new look at Thorson's and Rass's rules. *Marine Ecology*, 27:7–14.
- Lardies, M. y Castilla, J. (2001). Latitudinal variation in the reproductive biology of the commensal crab *Pinnaxodes chilensis* (Decapoda: Pinnotheridae) along the Chilean coast. *Marine Biology*, 139(6):1125–1133. *Marine Biology*.
- Lardies, M. A., Arias, M., y Bacigalupe, L. (2010). Phenotypic covariance matrix in life-history traits along a latitudinal gradient: a study case in a geographically widespread crab on the coast of Chile. *Marine Ecology Progress Series*, 412:179–187.
- Lardies, M. A., Carter, M. J., y Bozinovic, F. (2004). Dietary effects on life history traits in a terrestrial isopod: the importance of evaluating maternal effects and trade-offs. *Oecologia*, 138(3):387–95. *Oecologia*.
- Latrouite, D. y Noel, P. (1997). Pêche de la langouste rouge *Palinurus elephas* en France. Éléments pour fixer une taille marchande. *ICES CM 1997/BB: 13*.
- Latyshev, N. A., Khardin, A. S., Kasyanov, S. P., e Ivanova, M. B. (2004). A Study on the Feeding Ecology of Chitons Using Analysis of Gut Contents and Fatty Acid Markers. *Journal of Molluscan Studies*, 70:225–230.
- Lau, C. J. (1988). Dietary comparison of two slow-moving crustacean (Decapoda: Scyllaridae) by a modified index of relative importance. En *Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium*, volumen 2, pp. 95–100, Townsville, Australia, August 8-12, 1988.
- Lavalli, K. y Spanier, E. (2007). Introduction to the biology and fisheries of slipper lobsters. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 3–21. CRC Press.
- Lavalli, K., Spanier, E., y Grasso, F. (2007). Behavior and Sensory Biology of Slipper Lobsters. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 133–181. CRC Press.
- Lavariás, S., Heras, H., Demichelis, S., Portiansky, E., y Pollero, R. (2002). Morphometric study of embryonic development of *Macrobrachium borellii* (Arthropoda: Crustacea). *Invertebrate Reproduction and Development*, 41 (1-3):157–163.
- Leal, M., Pochelon, P., Lopes da Silva, T., Reis, A., Rosa, R., y Calado, R. (2013). Variable within-brood maternal provisioning in newly extruded embryos of *Homarus gammarus*. *Marine Biology*, 160:763–772.
- Lee, R. F. (1991). Lipoproteins from the Hemolymph and Ovaries of Marine Invertebrates. En *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, volumen 7 de *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, pp. 187–207. Springer Berlin Heidelberg.

- Lepage, G. y Roy, C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25:1391–1396.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata. Impensis Direct. Laurentii Salvii, Holmiae*, volumen Tomus I. Editio decima.
- Linnane, A., Penny, S., Hawthorne, P., y Hoarea, M. (2009). Spatial differences in size of maturity and reproductive potential between inshore and offshore fisheries for southern rock lobster (*Jasus edwardsii*) in south australia. *Fisheries Research*, 96:238–243.
- Lizarraga-cubedo, H., Tuck, I., Bailey, N., Pierce, G., y Kinnear, J. (2003). Comparisons of size at maturity and fecundity of two Scottish populations of the European lobster, *Homarus gammarus*. *Fisheries Research*, 65(1-3):137–152.
- Lloret, J. y Riera, V. (2008). Evolution of a Mediterranean coastal zone: human impacts on the marine environment of Cape Creus. *Environmental management*, 42(6):977–88. Environmental management.
- MacDiarmid, A. (1988). Experimental confirmation of external fertilisation in the southern temperate rock lobster *Jasus edwardsii* (Hutton) (Decapoda: Palinuridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 120 (3):277–285.
- MacDiarmid, A. B. (1985). Sunrise release of larvae from the palinurid rock lobster *Jasus edwardsii*. *Marine Ecology Progress Series*, 21:313–315.
- MacDiarmid, A. B. y Butler, M. J. I. (1999). Sperm economy and limitation in spiny lobsters. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46(1):14–24.
- MacDiarmid, A. B. y Kittaka, J. (2000). Breeding. En Phillips, B. y Kittaka, J., editores, *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture*, pp. 485–507. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- MacDiarmid, A. B. y Sainte-Marie, B. (2006). Reproduction. En Phillips, B. F., editor, *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*, pp. 45–77. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 1st edition edición.
- Mallol, S., Mateo-Ramírez, A., Alemany, F., Álvarez Berastegui, D., Díaz, D., López-Jurado, J. L., y Goñi, R. (2014). Abundance and distribution of scyllarid phyllosoma larvae (Decapoda: Scyllaridae) in the Balearic Sea (Western Mediterranean). *Journal of Crustacean Biology*, 34(4):442–452.
- Marin, J. (1987). *Exploitation, biologie et dynamique du stock de langouste rouge de Corse, Palinurus elephas Fabricius*. Tesis doctoral, Université d'Aix-Marseille.

- Massutí, E., Gordon, J. D. M., Moranta, J., Swan, S. C., Stefanescu, C., y Merrett, N. R. (2004). Mediterranean and Atlantic deep-sea fish assemblages: differences in biomass composition and size-related structure*. *Scientia Marina*, 68(Suppl. 3):101–115.
- Mathers, E., Houlihan, D., y Burren, L. (1994). RNA, DNA and protein concentrations in fed and starved herring *Clupea harengus* larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 107:223–231.
- Matsuda, H., Takenouchi, T., y Yamakawa, T. (2002). Effects of photoperiod and temperature on ovarian development and spawning of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Aquaculture*, 205:385–398.
- McClain, C. R., Chao, S., Atkinson, L. P., Blanton, J. O., y de Castillejo, F. F. (1986). Wind-driven upwelling in the vicinity of Cape Finisterre, Spain. Frederico De Castillejo. *Journal of Geophysical Research*, 91:8470–8486.
- McConaughy, J. (1985). Larval growth. En Wenner, A., editor, *Crustacean issues 2. Larval growth*, capítulo Nutrition and larval growth, pp. 127–154. A.A. Balkema, Rotterdam.
- McGarvey, R., Ferguson, G. J., y Prescott, J. H. (1999). Spatial variation in mean growth rates at size of southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, in South Australian waters. *Marine and Freshwater Research*, 50(4):333–342.
- McGinty, E. L., Smith-Keune, C., y Jerry, D. R. (2008). A high through-put protocol for quantifying nucleic acids in individual microcrustaceans using new generation rna and dna specific dyes. *Journal of Shellfish Research*, 27(2):449–455.
- Mclaren, I. A., Corkett, C. J., y Zillioux, E. J. (1969). Temperature adaptations of copepod eggs from the arctic to the tropics. *The Biological Bulletin*, 137(3):486–493.
- McMullen, J. C. (1969). Effects of Delayed Mating on the Reproduction of King Crab, *Paralithodes camtschatica*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26(10):2737–2740.
- McQuaid, N., Briggs, R. P., y Roberts, D. (2006). Estimation of the size of onset of sexual maturity in *Nephrops norvegicus* (L.). *Fisheries Research*, 81(1):26–36.
- Mercer, J. P. (1973). *Studies on the spiny lobsters (Crustacea: Decapoda: Palinuridae) of the West Coast of Ireland with particular reference to Palinurus elephas, Fabricius 1787*. Tesis doctoral, University College, University College Galway.
- Micael, J., Azevedo, J., y Costa, A. (2006). Marine, Freshwater, and Wetlands Biodiversity Conservation. En Hawksworth, D. L. y Bull, A. T., editores, *Biodiversity and Conservation*, volumen 4 de *Topics in Biodiversity and Conservation*, pp. 307–316. Springer Netherlands, Dordrecht.

- Michaelis, L. y Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem z*, pp. 333–369.
- Millamena, O. M. y Quintio, E. (2000). The effects of diets on reproductive performance of eyestalk ablated and intact mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture*, 181:81–90.
- Moland, E., Moland Olsen, E., y Stenseth, N. (2010). Maternal influences on offspring size variation and viability in wild European lobster *Homarus gammarus*. *Marine Ecology Progress Series*, 400:165–173.
- Moland, E., Olsen, E. M., Knutsen, H., Garrigou, P., Espeland, S. H., Kleiven, A. R., André, C., Knutsen, J. A., Kleiven, R., B, P. R. S., y Andre, C. (2013). Lobster and cod benefit from small-scale northern marine protected areas: inference from an empirical before-after control-impact study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1754):1–9.
- Moller, T. H. y Branford, J. R. (1979). A circadian hatching rhythm in *Nephrops norvegicus*. En Naylor, E. y Hartnoll, R. G., editores, *Cyclic Phenomena in Marine Plants and Animals*, pp. 391–397. Pergamon Press, Oxford.
- Morais, S., Boaventura, D., Narciso, L., Réa, P., y Hawkins, S. (2003). Gonad development and fatty acid composition of *Patella depressa* Pennant (Gastropoda: Prosobranchia) populations with different patterns of spatial distribution, in exposed and sheltered sites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 294:61–80.
- Morais, S., Narciso, L., Calado, R., Nunes, M., y Rosa, R. (2002). Lipid dynamics during the embryonic development of *Plesionika martia martia* (Decapoda; Pandalidae), *Palaemon serratus* and *P. elegans* (Decapoda; Palaemonidae): relation to metabolic consumption. *Marine Ecology Progress Series*, 242:195–204.
- Moran, A. y Mcalister, J. (2009). Egg size as a life history character of marine invertebrates: Is it all it's cracked up to be? *The Biological Bulletin*, 216:226–242.
- Mori, M., Biagi, F., y De Ranieri, S. (1998). Fecundity and egg loss during incubation in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) in the North Tyrrhenian Sea. *Journal of Natural History*, 32:1641–1650.
- Morizur, Y. (1981). Evaluation de la perte d'Œufs lors de l'incubation chez *Nephrops norvegicus* (L.) dans la région Sud-Bretagne, France. *Crustaceana*, 41:301–306.
- Moss, G. A., James, P. J., Allen, S. E., y Bruce, M. P. (2004). Temperature effects on the embryo development and hatching of the spiny lobster *Sagmariasus verreauxi*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38 (5):795–801.

- Muñoz, I., García-Isarch, E., Sobrino, I., Burgos, C., Funny, R., y González-Porto, M. (2012). Distribution, abundance and assemblages of decapod crustaceans in waters off Guinea-Bissau (north-west Africa). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(03):475–494.
- Muggeo, V. M. R. (2003). Estimating regression models with unknown break-points. *Statistics in Medicine*, 22(19):3055–3071.
- Muggeo, V. M. R. (2008). segmented: An R package to Fit Regression Models with Broken-Line Relationships. *R News*, 8:20–25.
- Mura, M., Cau, A., y Deiana, A. (1984). Il genere *Scyllarus* Fabr., 1775 nel Mediterraneo centro-occidentale. *Rendiconti Seminario Facolta Scienze. Università Cagliari*, 54:266–274.
- Nagaraju, G. P. C. (2011). Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *Journal of Experimental Biology*, 214(1):3–16.
- Narciso, L. y Morais, S. (2001). Fatty acid profile of *Palaemon serratus* (Palaemonidae) eggs and larvae during embryonic and larval development using different live diets. *Journal of Crustacean Biology*, 21(3):566–574.
- Nelder, J. (1961). The fitting of a generalization of the logistic curve. *Biometrics*, 17(1):89–110.
- Nelson, D. y Cox, M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, New York, (6ª) edición.
- Nelson, M. M., Bruce, M. P., Nichols, P. D., Jeffs, A. G., y Phleger, C. F. (2006). Nutrition of Wild and Cultured Lobsters. En *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*, pp. 205–230. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Nerot, C., Meziane, T., Schaal, G., Grall, J., Lorrain, A., Paulet, Y.-M., y Kraffe, E. (2015). Spatial changes in fatty acids signatures of the great scallop *Pecten maximus* across the Bay of Biscay continental shelf. *Continental Shelf Research*, 109:1–9.
- Newman, G. G. y Pollock, D. E. (1974). Growth of the rock lobster *Jasus lalandii* and its relationship to benthos. *Marine Biology*, 24(4):339–346.
- Norman, C. P. y Jones, M. B. (1993). Reproductive ecology of the velvet swimming crab, *Necora puber* (brachyura: Portunidae) at plymouth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73(2):379–389.
- Oh, C. y Hartnoll, R. (2004). Reproductive biology of the common shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crangonidae) in the central Irish Sea. *Marine Biology*, 144:303–316.

- Oliveira, G., Freire, A. S., y Bertuol, P. R. K. (2008). Reproductive biology of the slipper lobster *Scyllarides deceptor* (Decapoda: Scyllaridae) along the southern Brazilian coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(7):1433–1440.
- O'Malley, J. M. (2011). Spatiotemporal variation in the population ecology of scaly slipper lobsters *Scyllarides squammosus* in the Northwestern Hawaiian Islands. *Marine Biology*, 158(8):1887–1901.
- Orensanz, J. M., Armstrong, J., Armstrong, D., y Hilborn, R. (1998). Crustacean resources are vulnerable to serial depletion - the multifaceted decline of crab and shrimp fisheries in the Greater Gulf of Alaska. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(2):117–176.
- Otero Schmitt, J. y Trigo Trigo, J. (1986). Contribución al conocimiento de los moluscos de las Islas Sisargas. *Iberus*, 6(1):19–27.
- Ouellet, P. y 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. *Journal of Crustacean Biology*, 24(3):481–495.
- Pagliarino, E. y Massi, D. (2013). Findings of Phyllosoma Larvae and Nistos of the Family Scyllaridae (Crustacea, Decapoda) in the Southern Mediterranean Sea. *The Open Marine Biology Journal*, 7:8–13.
- Palero, F., Crandall, K. a., Abelló, P., Macpherson, E., y Pascual, M. (2009a). Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata). *Molecular phylogenetics and evolution*, 50(1):152–62.
- Palero, F., Guerao, G., Clark, P., y Abelló, P. (2009b). The true identities of the slipper lobsters *Nisto laevis* and *Nisto asper* (Crustacea: Decapoda: Scyllaridae) verified by DNA analysis. *Invertebrate Systematics*, 23:77–85.
- Pandian, T. (1967). Changes in chemical composition and caloric content of developing eggs of the shrimp *Crangon crangon*. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 16(3):216–224.
- Pandian, T. (1970). Yolk utilization and hatching time in the Canadian lobster *Homarus americanus*. *Marine Biology*, 7(3):249–254.
- Pandian, T. (1994). Arthropoda-Crustacea. En Adiyodi, K. y Adiyodi, R., editores, *Reproductive Biology of Invertebrates*, volumen Vol. 6B, pp. 39–166. Wiley, Chichester.
- Parker, G. A. y Begon, M. (1986). Optimal Egg Size and Clutch Size: Effects of Environment and Maternal Phenotype. *The American Naturalist*, 128(4):573–592.

- Paschke, K., Gebauer, P., Buchholz, F., y Anger, K. (2004). Seasonal variation in starvation resistance of early larval North Sea shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crangonidae). *Marine Ecology Progress Series*, 279:183–191.
- Paterson, N. F. (1969). Fertilization in the Cape rock lobster, *Jasus lalandii* (H. Milne Edwards). *South African Journal of Science*, 65(5):163.
- Pérez-González, R., Valadez, L. M., Rodríguez-Domínguez, G., y Aragón-Noriega, E. A. (2012). Seasonal variation in brood size of the spiny lobster *Panulirus gracilis* (Decapoda: Palinuridae) in Mexican waters of the Gulf of California. *Journal of Shellfish Research*, 31(4):935–940.
- Perkins, H. C. (1972). Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* Milne-Edwards). *Fishery Bulletin*, 70:95–99.
- Perry, G., Volkman, J., Johns, R., y Bavor, H. (1979). Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 43(11):1715–1725.
- Pessani, D. y Mura, M. (2007). The Biology of the Mediterranean Scyllarids. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 263–286. CRC Press.
- Petersen, S. y Anger, K. (1997). Chemical and physiological changes during the embryonic development of the spider crab, *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 117 (2):299–306.
- Phleger, C. F., Nelson, M. M., Mooney, B. D., Nichols, P. D., Ritar, A. J., Smith, G. G., Hart, P. R., y Jeffs, A. G. (2001). Lipids and nutrition of the southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, from hatch to puerulus. *Marine and Freshwater Research*, 52(8):1475–1486.
- Pinheiro, J. y Bates, D. (2000). *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, New York.
- Plaut, I. (1993). Sexual maturity, reproductive season and fecundity of the spiny lobster *Panulirus penicillatus* from the Gulf of Eilat (Aqaba), Red Sea. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 44:527–535.
- Pollock, D. E. (1991). Spiny lobsters at Tristan da Cunha, South Atlantic: inter-island variations in growth and population structure. *South African Journal of Marine Science*, 10(1):1–12.
- Pollock, D. E., Cockcroft, A. C., y Goosen, P. C. (1997). A note on reduced rock lobster growth rates and related environmental anomalies in the southern Benguela, 1988–1995. *South African Journal of Marine Science*, 18(1):287–293.
- Polovina, J. J. (1989). Density dependence in spiny lobster. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(4):660–665.

- Pond, D., Harris, R., Head, R., y Harbour, D. (1996). Environmental and nutritional factors determining seasonal variability in the fecundity and egg viability of *Calanus helgolandicus* in coastal waters off Plymouth, UK. *Marine Ecology Progress Series*, 143:45–63.
- Prego, R., Guzmán-Zuñiga, D., Varela, M., DeCastro, M., y Gómez-Gesteira, M. (2007). Consequences of winter upwelling events on biogeochemical and phytoplankton patterns in a western Galician ria (NW Iberian peninsula). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73(3-4):409–422.
- Pugh, T., Goldstein, J., Lavalli, K., Clancy, M., y Watson, W. (2013). At-sea determination of female American lobster (*Homarus americanus*) mating activity: Patterns vs. expectations. *Fisheries Research*, 147:327–337.
- Queirós, A. M., Weetman, A., McLay, H. A., y Dobby, H. (2013). Geographical variation in size at the onset of maturity of male and female Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L., Homarida: Decapoda) in Scottish waters. *Fisheries Research*, 139:132–144.
- Quigley, D., Flannery, K., Herdson, D., Lord, R., y Holmes, J. (2010). Slipper lobster (*Scyllarus arctus* (L.)) (Crustacea: Decapoda) from Irish, U.K. and Channel Island waters. *Irish Naturalists Journal*, 31(1):33–39.
- R Core Team (2015). R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Racotta, I. S., Palacios, E., e Ibarra, A. M. (2003). Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227:107–130.
- Radhakrishnan, E., Manisseri, M. K., y Deshmukh, V. D. (2007). Biology and Fishery of the Slipper Lobster, *Thenus Orientalis*, in India. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 309–324. CRC Press.
- Raviv, S., Parnes, S., y Sagi, A. (2008). Coordination of Reproduction and Molt in Decapods. En *Reproductive Biology of Crustaceans*, pp. 365–390. Science Publishers.
- Relini, G., Bertrand, J., y Zamboni, A. (1999). Synthesis of the knowledge on bottom fishery resources in central Mediterranean (Italy and Corsica). *Biol. Mar. Medit.*, 6:593–600.
- Rios, A., Pérez, F., y Fraga, F. (1992). Water masses in the upper and middle North Atlantic Ocean east of the Azores. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 39(3-4):645–658.
- Robertson, P. B. (1968). The complete larval development of the sand lobster, *Scyllarus americanus* (Smith), (Decapoda, Scyllaridae) in the laboratory, with notes larvae from the zooplankton. *Bulletin of Marine Science*, 18(2):294–342.

- Robertson, P. B. (1971). The larvae and postlarva of the scyllarid lobster *Scyllarus depressus* (Smith). *Bulletin of Marine Science*, 21:841–865.
- Rosa, R., Calado, R., Andrade, A. M., Narciso, L., y Nunes, M. L. (2005). Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of european lobster, *Homarus gammarus* (crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 140:241–249.
- Rosa, R., Calado, R., Narciso, L., y Nunes, M. (2007). Embryogenesis of decapod crustaceans with different life history traits, feeding ecologies and habitats: a fatty acid approach. *Marine Biology*, 151:935–947.
- Rosa, R., Morais, S., Calado, R., Narciso, L., y Nunes, M. L. (2003). Biochemical changes during the embryonic development of norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquaculture*, 221:507–522.
- Rosa, R. y Nunes, M. L. (2002). Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of portugal. *Marine Biology*.
- Sachlikidis, N., Jones, C., y Seymour, J. (2010). The effect of temperature on the incubation of eggs of the tropical rock lobster *Panulirus ornatus*. *Aquaculture*, 305:79–83.
- Sainte-Marie, B. (1993). Reproductive cycle and fecundity of primiparous and multiparous female snow crab, *Chionoecetes opilio*, in the northwest gulf of saint lawrence. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences*, 50:584:2147–2156.
- Sakai, S. y Harada, Y. (2001). Why do large mothers produce large offspring? Theory and a test. *Am Nat*, 157(3):348–59. The American naturalist.
- Salonen, K., Sarvala, J., Hakala, I., y Viljanen, M. (1976). The relation of energy and organic carbon in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 21 (5):724–730.
- Sampedro, M. P., Fernández, L., Freire, J., y Gonzalez-Gurriarán, E. (1997). Fecundity and Reproductive Output of *Pisidia Longicornis* (Decapoda, Anomura) in the Ria De Arousa (Galicia, NW Spain). *Crustaceana*, 70(1):95–110.
- Sargent, J. (1995). Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. En *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, número 353-372. Blackwell, Oxford.
- Sargent, J., McEvoy, L. A., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., y Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179:217–229.
- Sato, T., Ashidate, M., Jinbo, T., y Goshima, S. (2006). Variation of sperm allocation with male size and recovery rate of sperm numbers in spiny king crab *Paralithodes brevipes*. *Marine Ecology Progress Series*, 312:189–199.

- Sato, T., Ashidate, M., Wada, S., y Goshima, S. (2005). Effects of male mating frequency and male size on ejaculate size and reproductive success of female spiny king crab *Paralithodes brevipes*. *Marine Ecology Progress Series*, 296(1):251–262.
- Sato, T. y Goshima, S. (2006). Impacts of male-only fishing and sperm limitation in manipulated populations of an unfished crab, *Hapalogaster dentata*. *Marine Ecology Progress Series*, 313:193–204.
- Scholtz, G. y Richter, S. (1995). Phylogenetic systematics of the reptantian Decapoda (Crustacea, Malacostraca). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 113:289–328.
- Schuh, M. y Diesel, R. (1995). Effects of Salinity and Starvation on the Larval Development of *Sesarma curacaoense* de Man, 1892, a Mangrove Crab with Abbreviated Development (Decapoda: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, 15:645–654.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the Dimension of a Model. *The Annals of Statistics*, 6(2):461–464.
- Scott, C. L., Kwasniewski, S., Falk-Petersen, S., y Sargent, J. R. (2002). Species differences, origins and functions of fatty alcohols and fatty acids in the wax esters and phospholipids of *Calanus hyperboreus*, *C. glacialis* and *C. finmarchicus* from Arctic waters. *Marine Ecology Progress Series*, 235:127–134.
- Sekiguchi, H., Booth, J., y Webber, R. (2007). Early life histories of slipper lobsters. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 69–90. CRC Press.
- Serrano, A., Velasco, F., Olaso, I., y Sánchez, F. (2003). Macrobenthic crustaceans in the diet of demersal fish in the Bay of Biscay in relation to abundance in the environment. *Sarsia: North Atlantic Marine Science*, 88(1):36–48.
- Sharp, W. C. and Hunt, J. H. y Teehan, W. H. (2007). Observations on the Ecology of *Scyllarides aequinoctialis*, *Scyllarides nodifer*, and *Parribacus antarcticus* and a description of the Florida Scyllarid lobster fishery. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 231–242. CRC Press.
- Shedder, M. (1996). Factors influencing egg size in the gammarid amphipod *Gammarus insensibilis*. *Marine Biology*, 124(4):519–526.
- Shields, J. D., Okazaki, R. K., y Kuris, A. M. (1991). Fecundity and the reproductive potential of the yellow rock crab *Cancer anthonyi*. *Fishery Bulletin*, 89(2):299–305.
- Shiino, S. (1950). Studies on the embryonic development of *Palinurus japonicus*. *J. Fac. Fish. Univ. Mie*, 1:1–168.

- Shirley, S. M., Shirley, T. C., y Rice, S. D. (1987). Latitudinal variation in the Dungeness crab, *Cancer magister*: zoeal morphology explained by incubation temperature. *Marine Biology*, 95(3):371–376.
- Sibert, V., Ouellet, P., y Brêthes, J.-C. (2004). Changes in yolk total proteins and lipid components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle. *Marine Biology*, 144:1075–1086.
- Siders, Z. A. y Koopman, H. N. (2013). Variation in egg quality in blue crabs, *Callinectes sapidus*, from North Carolina: does female size matter? *Journal of Crustacean Biology*, 33(4):481–487.
- Siegel, V., Damm, U., y Neudecker, T. (2008). Sex-ratio, seasonality and long-term variation in maturation and spawning of the brown shrimp *Crangon crangon* (L.) in the German Bight (North Sea). *Helgoland Marine Research*, 62(4):339–349. Helgol Mar Res.
- Smith, E., Ritar, A., Carter, C., Dunstan, G., y Brown, M. (2003). Morphological and biochemical characteristics of phyllosoma after photothermal manipulation of reproduction in broodstock of the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 220:299–311.
- Smith, G. G. y Ritar, A. J. (2007). Sexual maturation in captive spiny lobsters, *Jasus edwardsii*, and the relationship of fecundity and larval quality with maternal size. *Invertebrate Reproduction and Development*, 50(1):47–55.
- Smith, G. G., Ritar, A. J., Thompson, P. A., Dunstan, G. A., y Brown, M. R. (2002). The effect of embryo incubation temperature on indicators of larval viability in Stage I phyllosoma of the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 209:157–167.
- Somers, K. (1991). Characterizing size-specific fecundity in crustaceans. En Wenner, A. y Kuris, A., editores, *Crustacean Issues 7. Crustacean Egg Production*, volumen 7, pp. 357–378. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Spanier, E. y Lavalli, K. (2007). Slipper Lobster Fisheries-Present Status and Future Perspectives. En Lavalli, K. L. y Spanier, E., editores, *The Biology and Fisheries of the Slipper Lobster*, Crustacean Issues, pp. 377–390. CRC Press.
- Spanier, E. y Lavalli, K. L. (2006). Scyllarides Species. En *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*, pp. 462–496. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Spanier, E., Weihs, D., y Almog-Shtayer, G. (1991). Swimming of the Mediterranean slipper lobster. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145:15 – 31.
- Stanley-Samuels, D. W. (1987). Physiological roles of prostaglandins and other eicosanoids in Invertebrates. *Biological Bulletin*, 173(1):92.

- Steele, D. H. y Steele, V. J. (1975). Egg size and duration of embryonic development in Crustacea. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 60(5):711–715.
- Stevens, B. (2006). Embryo development and morphometry in the blue king crab *Paralithodes platypus* studied by using image and cluster analysis. *Journal of Shellfish Research*, 25 (2):569–576.
- Stewart, J., Kennelly, S. J., y Hoegh-Guldberg, O. (1997). Size at sexual maturity and the reproductive biology of two species of scyllarid lobster from new south wales and victoria, australia. *Crustaceana*, 70(3):344–367.
- Styf, H. K., Nilsson Sköld, H., y Eriksson, S. P. (2013). Embryonic response to long-term exposure of the marine crustacean *Nephrops norvegicus* to ocean acidification and elevated temperature. *Ecology and evolution*, 3(15):5055–65.
- Sui, L. Y., Sun, H. X., Wu, X. G., Wille, M., Cheng, Y. X., y Sorgeloos, P. (2011). Effect of dietary HUFA on tissue fatty acid composition and reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock. *aquaculture International*, 19:269–282.
- Taku Sato, S. G. (2007). Effects of Risk of Sperm Competition, Female Size, and Male Size on Number of Ejaculated Sperm in the Stone Crab *Hapalogaster dentata*. *Journal of Crustacean Biology*, 27(4):570–575.
- Tauti, M. y Higurashi, T. (1925). On the relation between temperature and the rate of development of fish-eggs. *Journal of the Imperial Fisheries Institute*, 21(1).
- Tenore, K. R., Alonso-Noval, M., Álvarez-Ossorio, M., Atkinson, L. P., Cabanas, J. M., Cal, R. M., Campos, H. J., Castillejo, F., Chesney, E. J., Gonzalez, N., Hanson, R. B., McClain, C. R., Miranda, A., Roman, M. R., Sanchez, J., Santiago, G., Valdes, L., Varela, M., y Yoder, J. (1995). Fisheries and oceanography off Galicia, NW Spain: Mesoscale spatial and temporal changes in physical processes and resultant patterns of biological productivity. *Journal of Geophysical Research*, 100(C6):10943.
- Thiel, M., Espinoza-Fuenzalida, N., Acuña, E., y Rivadeneira, M. (2012). Annual brood number and breeding periodicity of squat lobsters (Decapoda: Anomura: Galatheididae) from the continental shelf of the SE Pacific-Implications for fisheries management. *Fisheries Research*, 129-130:28–37.
- Tidu, C., Sarda, R., Pinna, M., Cannas, A., Meloni, M., Lecca, E., y Savarino, R. (2004). Morphometric relationships of the European spiny lobster from northwestern Sardinia. *Fisheries Research*, 69:371–379.

- Torres, P., Penha-Lopes, G., Narciso, L., Macia, A., y Paula, J. (2008). Fatty acids dynamics during embryonic development in genus *Uca* (Brachyura: Ocypodidae), from the mangroves of Inhaca Island, Mozambique. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80:307–313.
- Tully, O., Roantree, V., y Robinson, M. (2001). Maturity, fecundity and reproductive potential of the European lobster (*Homarus gammarus*) in Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81(1):61–68.
- Turner, R. L. y Lawrence, J. M. (1979). Volume and composition of echinoderm eggs: implications for the use of egg size in life-history models. En Stancyk, S. E., editor, *Reproductive Ecology of Marine Invertebrates*, pp. 25–40. University of South Carolina Press, Columbia, SC.
- Turra, A. y Leite, F. P. P. (2007). Embryonic development and duration of incubation period of tropical intertidal hermit crabs (Decapoda, Anomura). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(3):677–686.
- Urzúa, A. y Anger, K. (2013). Seasonal variations in larval biomass and biochemical composition of brown shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea), at hatching. *Helgoland Marine Research*, 67(2):267–277.
- Urzúa, A., Paschke, U., Gebauer, P., y Anger, K. (2012). Seasonal and interannual variations in size, biomass and chemical composition of the eggs of North Sea shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda: Caridea). *Marine Biology*, 159:583–599.
- Valdés, L., Álvarez-Osorio, M., y González-Gurriarán, E. (1991a). Incubation of eggs of *Necora puber* (L., 1767) (decapoda, brachyura, portunidae). volumen and biomass changes in embryonic development. *Crustaceana*, 60 (2):163–177.
- Valdés, L., Álvarez-Osorio, M., y González-Gurriarán, E. (1991b). Influence of temperature on embryonic and larval development in *Necora puber* (Brachyura, Portunidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 71:787–798.
- Van den Brink, A., McLay, C., Hosie, A., y Dunnington, M. (2011). The effect of temperature on brood duration in three *Halicarcinus species* (Crustacea: Brachyura: Hymenosomatidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, pp. 1–6.
- Varela, M., Álvarez Ossorio, M. T., Bode, A., Prego, R., Bernárdez, P., y Garcia-Soto, C. (2010). The effects of a winter upwelling on biogeochemical and planktonic components in an area close to the Galician Upwelling Core: The Sound of Corcubión (NW Spain). *Journal of Sea Research*, 64(3):260–272.
- Varela, M., Prego, R., y Pazos, Y. (2008). Spatial and temporal variability of phytoplankton biomass, primary production and community structure in the Pontevedra Ria (NW Ibe-

- rian Peninsula): oceanographic periods and possible response to environmental changes. *Marine Biology*, 154:483–499.
- Vazquez Boucard, C. G., Patrois, J., y Ceccaldi, H. J. (2004). Exhaustion of lipid reserves in the hepatopancreas of *Fenneropenaeus indicus* broodstock in relation to successive spawnings. *Aquaculture*, 236(1-4):523–537.
- Veiga, A., Cremades, J., y Barbara, I. (1998). A catalogue of the marine benthic algae of the Sisargas Islands (N.W. Iberian Peninsula, Spain). *Bol. Mus. Mun. Funcha*, 5:481–483.
- Velázquez, A. (2003). Reproductive strategies of the spiny lobster *Panulirus interruptus* related to the marine environmental variability off central Baja California, Mexico: management implications. *Fisheries Research*, 65:123–135.
- Venables, W. N. y Ripley, B. D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York, fourth edición. ISBN 0-387-95457-0.
- Verhulst, P. F. (1838). "Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement". *Correspondence Mathématique et Physique*, 10:113–121.
- Verísimo, P. (2015). *Implicaciones de la composición bioquímica y condición energética de la centolla Maja brachydactyla Balss, 1922, en su crecimiento y reproducción*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña, A Coruña.
- Verísimo, P., Bernárdez, C., González-Gurriarán, E., Freire, J., Muiño, R., y Fernández, L. (2011). Changes between consecutive broods in the fecundity of the spider crab, *Maja brachydactyla*. *ICES Journal of Marine Science*, 68(3):472–478.
- Vijayakumaran, M., Murugan, T. S., Remany, M. C., Leema, T. M., Kumar, J. D., Santhanakumar, J., Venkatesan, R., y Ravindran, M. (2005). Captive breeding of the spiny lobster, *Panulirus homarus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 39(2):325–334.
- Vilotte, O. (1982). *Recherches sur la biologie et l'élevage de la cigale de mer Scyllarus arctus (L., 1758) (Crustacea, Decapoda, Scyllaridae)*. Tesis doctoral, Université des sciences et techniques du Languedoc, Montpellier.
- Řezanka, T. y Sigler, K. (2009). Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. *Progress in Lipid Research*, 48(3-4):206–238.
- Wahle, R. A. y Fogarty, M. J. (2006). Growth and Development: Understanding and Modelling Growth Variability in Lobsters. En *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*, pp. 1–44. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Walker, A., Ando, S., Smith, D. G., y Lee, R. F. (2006). The utilization of lipovitellin during blue crab (*Callinectes sapidus*) embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 143:201–208.

- Watts, A., McGill, R., Albalat, A., y Neil, D. (2014). Biophysical and biochemical changes occur in *Nephrops norvegicus* during starvation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 457:81–89.
- Wear, R. (1974). Incubation in british decapod crustacea, and the effects of temperature on the rate and success of embryonic development. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 54:745–762.
- Webb, J., Eckert, G., Shirley, T., y Tamone, S. (2007). Changes in embryonic development and hatching in *Chionoecetes opilio* (Snow Crab) with variation in incubation temperature. *Biological Bulletin*, 213:67–75.
- Wehrtmann, I. S. y Graeve, M. (1998). Lipid composition and utilization in developing eggs of two tropical marine caridean shrimps (Decapoda: Caridea: Alpheidae, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.*, 121:457–463.
- Wehrtmann, I. S. y Kattner, G. (1998). Changes in volume, biomass, and fatty acids of developing eggs in *Nauticaris magellanica* (Decapoda: Caridea): A latitudinal comparison. *Journal of Crustacean Biology*, 18 (3):413–422.
- Weiss, M., Thatje, S., y Heilmayer, O. (2009). Temperature effects on zoeal morphometric traits and intraspecific variability in the hairy crab *Cancer setosus* across latitude. *Helgoland Marine Research*, 64(2):125–133.
- Wen, X., Chen, L., Ku, Y., y Zhou, K. (2006). Effect of feeding and lack of food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture*, 252:598–607.
- Wen, X. B., Chen, L. Q., Zhou, Z. L., Ai, C. X., y Deng, G. Y. (2002). Reproduction response of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) fed different sources of dietary lipid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 131(3):675–681.
- Wilhelm, F. M. y Schindler, D. W. (2000). Reproductive strategies of *Gammarus lacustris* (Crustacea: Amphipoda) along an elevation gradient. *Functional Ecology*, 14(4):413–422.
- Williamson, D. I. (1983). *Crustacea Decapoda: Larvae. VIII. Nephropidea, Palinuridea, and Eryonidea*, volumen 167/168. Conseil International Pour L'Exploitation de la Mer.
- Winberg, G. (1971). *Methods for estimation of production of aquatic animals*. Academic Press, New York.
- Wood, S. (2006). *Generalized Additive Models: An Introduction with R*. Chapman and Hall/CRC.

- Wood, S. N. (2011). Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 73(1):3–36.
- Wooster, W. S., Bakun, A., y McInain, W. R. (1976). The seasonal upwelling cycle along the eastern boundary of the North Atlantic. *Journal of Marine Research*, 34:131–141.
- Wu, X., Cheng, Y., Sui, L., Zeng, C., Southgate, P., y Yang, X. (2007). Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock. *Aquaculture*, 273:602–613.
- Wu, X., Smith, G., y Hall, M. (2012). Patterns of larval growth, lipid composition and fatty acid deposition during early to mid stages of development in *Panulirus ornatus* phyllosoma. *Aquaculture*, 330-333:63–73.
- Xunta de Galicia (1998). Área 3. Recursos naturales. En *Jornadas sectoriales de trabajo sobre investigación marina en Galicia. Informes de los grupos de trabajo.*, pp. 33–37. Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento.
- Xunta de Galicia (2015). Plataforma Tecnolóxica da Pesca. Estadísticas pesqueiras 2009-2013. <http://www.pescadegalicia.com/estadisticas.html>. Online; acceso 1-Agosto-2015.
- Yamanoi, T., Yoshino, K., Kon, K., y Goshima, S. (2006). Delayed copulation as a means of female choice by the hermit crab *Pagurus filholi*. *Journal of Ethology*, 24(3):213–218.
- Yang, C.-H., Bracken-Grissom, H., Kim, D., Crandall, K. A., y Chan, T.-Y. (2012). Phylogenetic relationships, character evolution, and taxonomic implications within the slipper lobsters (crustacea: Decapoda: Scyllaridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1):237–250.
- Ying, X.-P., Yang, W.-X., y Zhang, Y.-P. (2006). Comparative studies on fatty acid composition of the ovaries and hepatopancreas at different physiological stages of the chinese mitten crab. *Aquaculture*, 256:617–623.
- Yoshino, K., Goshima, S., y Nakao, S. (2002). Temporal reproductive patterns within a breeding season of the hermit crab *Pagurus filholi*: Effects of crab size and shell species. *Marine Biology*, 141(6):1069–1075.
- Zariquiey, R. (1968). *Crustáceos decápodos ibéricos*, volumen 32. Investigación Pesquera, Barcelona.
- Ziegler, P., Haddon, M., Frusher, S., y Johnson, C. (2004). Modelling seasonal catchability of the southern rock lobster *Jasus edwardsii* by water temperature, moulting, and mating. *Marine Biology*, 145:179–190.

Ziegler, T. A. (2007). *Larval release rhythms and larval behavior of palinurid lobsters: a comparative study*. Tesis doctoral, School of the Environment and Earth Sciences. Duke University.

Zuur, A., Ieno, E. N., y Smith, G. M. (2007). *Analysing Ecological Data*. Springer, New York.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., y Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1):3–14.

