

Tesis Doctoral

Evaluación de factores físicos,
hormonales y maternos para optimizar la
producción de la langosta de pinzas rojas
Cherax quadricarinatus (Decapoda,
parastacidae)

Tropea, Carolina

2011

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

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

Cita tipo APA:

Tropea, Carolina. (2011). Evaluación de factores físicos, hormonales y maternos para optimizar la producción de la langosta de pinzas rojas *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, parastacidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Tropea, Carolina. "Evaluación de factores físicos, hormonales y maternos para optimizar la producción de la langosta de pinzas rojas *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, parastacidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Evaluación de factores físicos, hormonales y maternos para optimizar la producción de la langosta de pinzas rojas *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae)

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Carolina Tropea

Directora de tesis: Dra. Laura S. López Greco

Consejera de Estudios: Dra. Laura S. López Greco

Buenos Aires, 2011

Evaluación de factores físicos, hormonales y maternos para optimizar la producción de la langosta de pinzas rojas *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae)

Resumen

Cherax quadricarinatus es una especie de importancia comercial, cuya introducción en Argentina resultó en una producción limitada, debido entre otros motivos a la falta de tecnologías de cultivo que permitan incrementar el rendimiento en carne y optimizar la producción de “semilla”. Por lo tanto, los objetivos generales de la presente tesis son inducir un mayor crecimiento somático de las hembras y machos, manipular la proporción sexual para incrementar la cantidad de machos (dado que los machos crecen más que las hembras), y evaluar la calidad de la progenie. En el marco de dichos objetivos se evaluó el efecto de: (1) un factor físico (exposición a temperatura alta (TA)) sobre el crecimiento; (2) un factor hormonal (administración de dopamina (DA)) sobre la maduración ovárica y el crecimiento de las hembras; (3) otro factor hormonal (ablación de la glándula androgénica (GA)), sobre la reversión sexual de los machos, para obtener “neo-hembras” como paso previo a la producción de cultivos monosexo sólo macho; y (4) dos factores maternos (tamaño de la hembra y número de puestas) sobre la calidad de las progenies. La TA provocó una disminución en el crecimiento somático de los machos y aceleró la espermatogénesis, mientras que no afectó el crecimiento de las hembras y aceleró la maduración ovárica. La DA tuvo cierto efecto sobre el crecimiento y maduración ováricos sólo cuando fue inyectada en hembras de 4-14 g, sin que esto resulte en un mayor crecimiento somático. La ablación de la GA no provocó la reversión sexual de los machos, si bien se observaron alteraciones en el desarrollo de los caracteres sexuales primarios y secundarios. Finalmente, de los

parámetros de calidad de progenie estudiados, sólo el número de juveniles independizados por hembra varió con el tamaño de la madre, mientras que la tasa de puestas tendió a disminuir con las puestas consecutivas. Se discuten las posibles implicancias que estos resultados tendrían para el cultivo de la especie.

Palabras claves: *Cherax quadricarinatus*; calidad de los huevos; calidad de los juveniles; calidad de progenie; caracteres sexuales secundarios; crecimiento somático; cultivo monosexo; dopamina; espermatogénesis; glándula androgénica; maduración ovárica; “neo-hembras”; número de puestas; producción de carne; reversión sexual; sistema reproductor; tamaño de la hembra; temperatura; variables de producción.

**Evaluation of physical, hormonal and maternal factors to optimize
production of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*
(Decapoda, Parastacidae)**

Abstract

Cherax quadricarinatus is cultured worldwide with commercial purposes, with its introduction in Argentina resulting in a low production, mainly due to the absence of technologies that would allow an increase in meat yields and “seed” production. Hence, the general objectives of the present thesis are to induce a higher somatic growth of females and males, to manipulate sexual proportion in order to increase the amount of males (since growth is higher in males than in females), and to evaluate the offspring quality. In the context of these objectives, it was evaluated the effect of: (1) a physical factor (exposure to high temperature (HT)) on somatic growth; (2) one hormonal factor (administration of dopamine (DA)) on ovarian maturation and somatic growth of females; (3) another hormonal factor (ablation of the androgenic gland (AG)) on sexual reversion of males, to obtain “neo-females”, as a previous step for the production of all-male monosex cultures; and (4) two maternal factors (female size and consecutive spawning) on offspring quality. HT decreased male somatic growth and accelerated spermatogenesis, while it had no effect on female growth and accelerated ovarian maturation. DA influenced ovarian growth and maturation when injected in females of 4-14 g, but no increase in somatic growth was observed. AG ablation resulted in no sexual reversion of males, although some alterations were observed in the development of primary and secondary sexual characters. Finally, of the offspring quality parameters studied, only the number of independent juveniles *per* female varied with mother size,

while the spawning rate tended to decrease with consecutive spawning. The possible implications of these results for the species culture were discussed.

Keywords: androgenic gland; *Cherax quadricarinatus*; consecutive spawning; dopamine; egg quality; female size; juvenile quality; meet production; monosex culture; “neo-females”; offspring quality; ovarian maturation; production variables; reproductive system; secondary sexual characters; sexual reversion; somatic growth; spermatogenesis; temperature.

Agradecimientos

- A la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por financiar el presente proyecto a través de los subsidios UBACYT X143 (2004-2007), UBACYT X458 (2008-2010), UBACYT 20020100100003 (2011-2014), PICT 01187 y PIP 129, otorgados a la directora de tesis.
- A mi directora y consejera de estudios, la Dra. Laura López Greco, por los conocimientos transmitidos durante estos cinco años.
- A Fabi Lo Nostro, por introducirme en el mundo de la histología y a Gla Hermida por ayudarme a recorrerlo.
- A mi familia, porque sin ella nada de esto hubiera sido posible!
- A mi hermana del alma y a Fer por escucharme y aconsejarme constantemente, y por no dejar que pierda tiempo con los detalles de edición de la tesis!
- A Rocío, por alegrarme los domingos con su hermosa sonrisa...
- A Marqui, por bancarme en todo!!
- A mis amigas de Santa Fe (Emi, Eva, Maru, Ivi, Pato, Flo), por acompañarme cada una a su manera, algunas más cerquita y otras más lejos, pero todas siempre presentes.
- A Agus, Dai, Facu, Juli, Pau, Ste y Vic, amigos que transitaron junto a mí toda la carrera y que me acompañaron durante todo el doctorado, entendiendo mejor que nadie el esfuerzo y dedicación invertidos constantemente.
- A Eleo, por estar en todo momento, por su apoyo y contención constantes.
- A todos los langostólogos: los del 1 (Mede, Naty, Vero, Lili, Ale), los del 50 (Hernán, Ana Laura, Fer), y los que alguna vez lo fueron pero ya no lo son (Anu, Anita, Xime, Silvia, Mati, Jime) por dejarme aprender de ellos, y compartir con ellos muy buenos momentos.

- A Malala, por darme una mano con mis experimentos y soportar hacer las tareas más aburridas siempre con buena onda!
- A Ferchu, por haberme recibido con una sonrisa el primer día que llegué al laboratorio, y por haberme ayudado a transitar el primer año del doctorado enseñándome muchas cosas sobre el manejo de las langostas, y respondiendo a todas mis preguntas (que eran muchas!).
- Y muy especialmente a Naty y Lia, porque estoy feliz de haber tenido compañeras de trabajo como ellas...compañeras que me ayudaron y aconsejaron siempre de manera desinteresada, que me escucharon y contuvieron cuando lo necesité, que soportaron mis días de malhumor con una sonrisa, que se divertieron conmigo en mis días de buen humor. Compañeras con las que aprendí muchísimas cosas relacionadas con el trabajo, pero que también me brindaron enseñanzas de vida. Compañeras que se convirtieron nada más ni nada menos que en AMIGAS.

*“A mi sobrina Rocío, por ayudarme día a día a no perder de vista aquellas cosas
que realmente importan en la vida...admiro la fortaleza que
“el frijol” encierra en toda su aparente pequeñez”*

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Introducción general	1
1.1 <i>Cherax quadricarinatus</i>	2
1.2 Técnicas de manejo en cultivo	4
1.3 Factores evaluados para optimizar la producción de carne	6
1.3.1 <i>Factor físico: Temperatura</i>	6
1.3.2 <i>Factor hormonal: Glándula androgénica</i>	7
1.3.3 <i>Factor hormonal: Dopamina</i>	8
1.4 Factores evaluados para optimizar la producción de “semilla”	9
1.4.1 <i>Factores maternos: Tamaño de la madre y número de puestas</i>	9
1.5 Objetivos generales	10
1.6 Organización de la tesis	10
CAPÍTULO 2: Efecto de la temperatura sobre la supervivencia, crecimiento y parámetros reproductivos de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i>	12
2.1 Introducción	13
2.2 Objetivo	15
2.3 Materiales y métodos	16
2.3.1 <i>Obtención de los animales</i>	16
2.3.2 <i>Diseño experimental</i>	17
2.3.3 <i>Evaluación macroscópica y microscópica</i>	19
2.3.4 <i>Índices calculados</i>	23
2.3.5 <i>Análisis estadístico</i>	25
2.4 Resultados	26
2.4.1 <i>Supervivencia y crecimiento</i>	26
2.4.2 <i>Variables morfométricas</i>	30
2.4.3 <i>Sistema reproductor</i>	31
2.5 Discusión	39

CAPÍTULO 3: Efecto de la ablación de la glándula androgénica sobre el crecimiento y parámetros reproductivos de los machos de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i>	47
3.1 Introducción	48
3.2 Objetivo	52
3.3 Materiales y métodos	53
3.3.1 <i>Obtención de los animales</i>	53
3.3.2 <i>Diseño experimental</i>	54
3.3.2.1 <i>Experimento 1</i>	54
3.3.2.2 <i>Experimento 2</i>	56
3.3.3 <i>Evaluación macroscópica y microscópica</i>	56
3.3.4 <i>Índices calculados</i>	59
3.3.5 <i>Análisis estadístico</i>	60
3.4 Resultados	60
3.4.1 <i>Supervivencia y crecimiento</i>	60
3.4.2 <i>Caracteres sexuales secundarios</i>	64
3.4.2.1 <i>Experimento 1</i>	64
3.4.2.2 <i>Experimento 2</i>	65
3.4.3 <i>Sistema reproductor</i>	68
3.5 Discusión	73
CAPÍTULO 4: Efecto de la administración prolongada de dopamina sobre la maduración ovárica y el crecimiento somático de las hembras de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i>	81
4.1 Introducción	82
4.2 Objetivo	85
4.3 Materiales y métodos	85
4.3.1 <i>Obtención de los animales</i>	85
4.3.2 <i>Diseño experimental</i>	86
4.3.2.1 <i>Experimento 1: administración de DA a través del alimento</i>	86
4.3.2.2 <i>Experimento 2: administración de DA a través de su inyección</i> ..	87
4.3.3 <i>Evaluación macroscópica y microscópica</i>	90

4.3.4	<i>Índices calculados</i>	92
4.3.5	<i>Análisis estadístico</i>	93
4.4	Resultados	94
4.4.1	<i>Experimento 1</i>	94
4.4.1.1	<i>Supervivencia y crecimiento</i>	94
4.4.1.2	<i>Sistema reproductor</i>	94
4.4.2	<i>Experimento 2</i>	100
4.4.2.1	<i>Supervivencia y crecimiento</i>	100
4.4.2.2	<i>Sistema reproductor</i>	102
4.5	Discusión	106
CAPÍTULO 5: Influencia del tamaño de la hembra y del número de puestas sobre la calidad de la progenie en la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i>		114
5.1	Introducción	115
5.2	Objetivo	118
5.3	Materiales y métodos	119
5.3.1	<i>Obtención de los animales</i>	119
5.3.2	<i>Diseño experimental</i>	119
5.3.3	<i>Calidad de los huevos</i>	121
5.3.4	<i>Calidad de los juveniles</i>	124
5.3.5	<i>Índices calculados</i>	127
5.3.6	<i>Análisis estadístico</i>	128
5.4	Resultados	129
5.4.1	<i>Primeras puestas</i>	129
5.4.1.1	<i>Variables de producción</i>	129
5.4.1.2	<i>Variables morfológicas</i>	131
5.4.2	<i>Segundas puestas</i>	137
5.4.2.1	<i>Variables de producción</i>	138
5.4.2.2	<i>Variables morfológicas</i>	139
5.5	Discusión	142
5.5.1	<i>Primeras puestas</i>	142

5.5.2 <i>Segundas puestas</i>	150
CAPÍTULO 6: Discusión general y conclusiones	152
BIBLIOGRAFÍA CITADA	160

CAPITULO 1

Introducción General

1.1 *Cherax quadricarinatus*

Los crustáceos decápodos poseen un gran potencial para la acuicultura, siendo los camarones peneidos uno de los grupos más importantes desde un punto de vista comercial (Food and Agriculture Organization, 2010). El cultivo de langostas de agua dulce pertenecientes al género *Cherax* ha comenzado a desarrollarse en tiempos relativamente recientes. Dicho género pertenece a la Familia Parastacidae, que contiene más de 100 especies, de las cuales solamente tres son cultivadas: la langosta de pinzas rojas *Cherax quadricarinatus*, la “marron” *C. tenuimanus* y la “yabbie” *C. destructor*. Estas especies son nativas de Australia (Fig. 1.1), donde habitan en ríos y cuerpos de agua epicontinentales como lagos y presas (Masser & Rouse, 1997; Lawrence & Jones, 2002). Su potencial como especies cultivables fue reconocido inicialmente por Smith (1912), quien sugirió la producción de estos animales debido a la textura y sabor superiores de la carne y a su ciclo de vida relativamente simple.

C. quadricarinatus presenta ciertos atributos biológicos y comerciales que la aventajan respecto de las demás especies mencionadas y la convierten en una excelente opción para la acuicultura de crustáceos. Si bien es nativa del norte de Australia y el sur de Papua Nueva Guinea (Jones, 1997), ambas zonas tropicales, crece bien a temperaturas comprendidas entre 24 y 30°C, bajo las cuales alcanza la talla comercial (70-120 g) en un periodo aproximado de 7 meses. Por otro lado, es capaz de tolerar un amplio rango de condiciones de calidad de agua, incluyendo bajas concentraciones de oxígeno, dureza y alcalinidad en un rango de entre 20 y 300 ppm, y pH entre 6,5 y 9. Además, tolera condiciones de cultivo a altas densidades, ya que es relativamente gregaria y no muestra gran comportamiento territorial (Masser & Rouse, 1997; Luchini, 2004; Panné Huidobro et al., 2004). Ciertos aspectos reproductivos, tales como una

fecundidad relativamente alta, un ciclo de vida simple y la incubación de los huevos por parte de las hembras hasta su eclosión facilitan también, y en gran medida, el cultivo de la especie (King, 1993; Jones, 1997; Austin, 1998; Jones & Ruscoe, 2000).

Las características mencionadas previamente favorecieron su producción en Australia desde 1985, y su introducción en varios países tropicales y subtropicales, tales como China, Israel, Ecuador, México, Estados Unidos y Argentina (Medley et al., 1994; Rouse, 1995; Masser & Rouse, 1997; Rodgers et al., 2006; Wicky et al., 2008), donde es cultivada en sistemas de tipo intensivo y semi-intensivo (Morrissy et al., 1990; Lawrence & Jones, 2002; Edgerton, 2005).

En Argentina la especie fue introducida a principios de la década de 1990, y desde ese momento los acuaristas la cultivan como animales ornamentales debido a sus atractivos colores, particularmente en los machos. También se la cultiva para mercados de consumo en sistemas semi-intensivos, los cuales incluyen las distintas fases de su ciclo de vida. De este modo, la reproducción se lleva a cabo bajo techo (*hatchery*), mientras que las fases de preengorde y de engorde se realizan en tanques de cemento bajo sombreado y en estanques excavados en tierra a cielo abierto, respectivamente (Luchini, 2004). Sin embargo, el crecimiento de la producción en el país ha sido poco significativo, lo cual se ha debido, entre otros motivos, a la ausencia de tecnologías específicas de cultivo, y a la falta de disponibilidad de “semilla” en distintas fases para su comercialización, lo que obliga a los productores a realizar el ciclo de vida completo de la especie (Wicky et al., 2008). Por lo tanto, se hace necesario el desarrollo en el país de estrategias que permitan incrementar el rendimiento en carne de los sistemas de cultivo, y mejorar los índices reproductivos e incrementar así la producción de “semilla” en las *hatcheries*.

1.2 Técnicas de manejo en cultivo

C. quadricarinatus presenta un crecimiento sexualmente dimórfico, dado que los machos crecen más y más rápido que las hembras, y en particular presentan un mayor desarrollo de las “pinzas” (quelas) en relación al cuerpo (Gu et al., 1994; Curtis & Jones, 1995; Karplus et al., 1995; Sagi et al., 1997; Jones & Ruscoe, 2001; Rodgers et al., 2006). Por este motivo, entre las técnicas de manejo a nivel mundial se destaca el cultivo monosexo sólo macho (CMM), que implica la separación manual de los sexos en los estanques de cultivo, y cuyo resultado es un mayor crecimiento y rendimiento en carne respecto de los cultivos monosexo sólo hembra y los cultivos mixtos (Curtis & Jones, 1995; Sagi et al., 1997; Jones & Ruscoe, 2001; Aflalo et al., 2006; Rodgers et al., 2006). Sin embargo, la separación manual de los animales es un procedimiento muy laborioso y costoso (Curtis & Jones, 1995), lo cual pone en evidencia la necesidad de desarrollar métodos alternativos que permitan obtener de modo más directo una mayor proporción de machos, o idealmente CMM, en los estanques de cultivo. Para ello, es importante estudiar aquellos factores (físicos y hormonales) que regulan la diferenciación sexual en la especie, de tal modo que la manipulación de dichos factores lleve a una posible reversión sexual y culmine en el objetivo previamente mencionado.

Una estrategia alternativa para optimizar el rendimiento en carne en los sistemas de producción constituye el desarrollo de metodologías que permitan incrementar el crecimiento de las hembras, asemejándose a aquel de los machos. En este sentido, se ha observado en *C. albidus* que las hembras crecen a la misma tasa que los machos hasta una talla aproximada de 20 g, a partir de la cual su crecimiento comienza a ser menor (Woodland, 1967). Dicha talla se corresponde con el inicio de la madurez sexual, la cual implica, al igual que en *C. quadricarinatus*, la producción y acumulación de grandes

cantidades de vitelo en los oocitos. Este proceso demanda una mayor cantidad de energía que la producción de espermatozoides en los machos, lo cual explicaría, al menos en parte, el crecimiento diferencial de los sexos (Hyatt, 1948; Dworschak, 1988; Fukui, 1988). Por lo tanto, la inhibición de la maduración ovárica podría traducirse en una mayor derivación de energía hacia el crecimiento somático en las hembras.

Por otro lado, si bien *C. quadricarinatus* se reproduce fácilmente en cautiverio y su desarrollo es directo, lo cual elimina la necesidad de desarrollar tecnologías complejas en las *hatcheries*, la producción comercial de juveniles requiere un manejo adecuado de los animales utilizados como reproductores. En relación a ello, factores tales como la alimentación y las condiciones de temperatura, fotoperiodo y densidad bajo las que se mantiene a los lotes de reproductores han sido evaluados en numerosos estudios con el objetivo de estimular la puesta de huevos bajo condiciones artificiales (Barki & Karplus, 2000; Karplus et al., 2003a; Rodríguez-González et al., 2006). Sin embargo, la posible influencia materna sobre la calidad de las progenies constituye un tema poco estudiado hasta el momento en *C. quadricarinatus*, siendo un factor biológico de gran importancia a tener en cuenta si el objetivo es incrementar la cantidad y calidad de juveniles producidos.

En este contexto, la presente tesis evaluará el efecto de un factor físico (exposición a distintas temperaturas del agua) y de dos factores hormonales (manipulación de la glándula androgénica y administración de dopamina) sobre la reversión sexual y/o crecimiento somático de *C. quadricarinatus*, para incrementar la producción de carne. A su vez, se evaluará el efecto de dos factores maternos (tamaño de la madre y número de puestas) sobre la calidad de las progenies, para optimizar la producción de “semilla”.

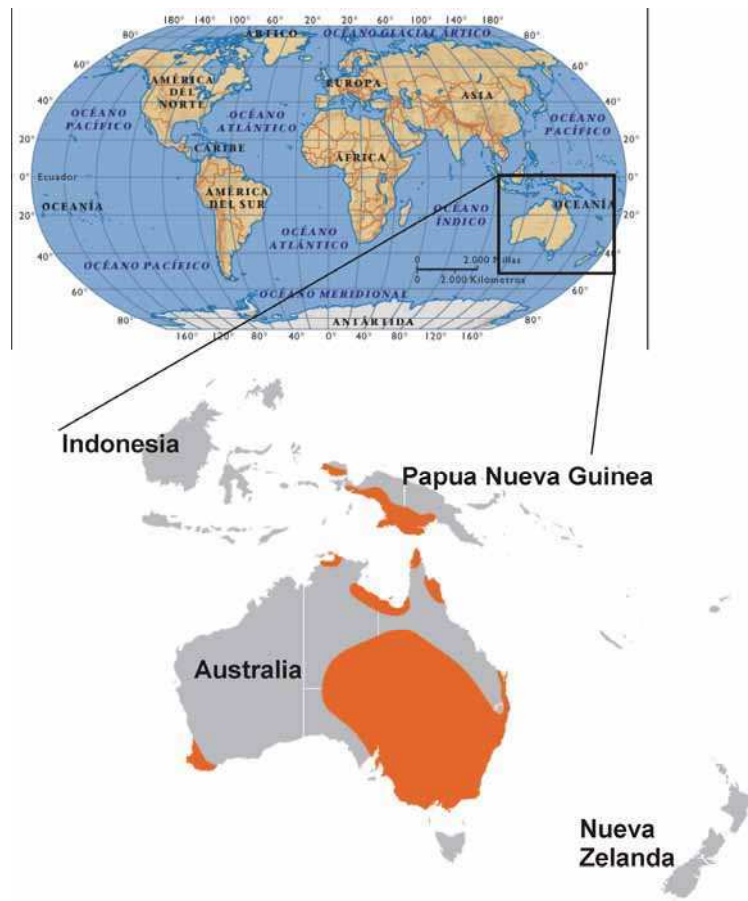


Fig. 1.1. Distribución geográfica de las langostas de agua dulce pertenecientes al género *Cherax* (Parastacidae). Reproducido de <http://es.wikipedia.org/wiki/Cherax>.

1.3 Factores evaluados para optimizar la producción de carne

1.3.1 Factor físico: Temperatura

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes que modulan el crecimiento en las langostas de agua dulce. En este sentido, se sabe que el crecimiento ocurre a partir de una determinada temperatura y se incrementa con la misma hasta alcanzar un óptimo específico de cada especie. Por debajo de la temperatura mínima, las langostas se muestran inactivas y se alimentan poco, mientras que temperaturas por

encima del óptimo llevan a retrasos en la muda y a un incremento en la mortalidad luego de la misma (Jussila & Evans, 1996; Reynolds, 2002).

En el caso de *C. quadricarinatus* se observa el mismo patrón, influyendo la temperatura tanto en el crecimiento como en la supervivencia (King, 1994; Jones, 1997). Resultados parciales obtenidos en nuestro laboratorio muestran también un posible efecto de la temperatura sobre la diferenciación y la reversión sexual de hembra a macho (Sánchez de Bock & López Greco, 2010; Vazquez, 2011), convirtiendo a este factor físico en una potencial herramienta para incrementar el rendimiento económico en los sistemas de cultivo de esta especie de langosta.

1.3.2 Factor hormonal: Glándula androgénica

La glándula androgénica (GA) es la única glándula que específicamente se relaciona con la diferenciación de los caracteres sexuales primarios y secundarios en los machos de los crustáceos malacostracos (Charniaux-Cotton, 1954; Legrand, 1955; Nagamine et al., 1980a,b; Nagamine & Knight, 1987; Taketomi et al., 1990; Suzuki & Yamasaki, 1991; Taketomi & Nishikawa, 1996; Fowler & Leonard, 1999; Khalaila et al., 2001; Manor et al., 2004; Cui et al., 2005).

Se cree además que el crecimiento diferencial de ciertas especies de crustáceos decápodos, tales como el camarón *Macrobrachium rosenbergii* y la langosta *C. quadricarinatus*, se debe en parte o completamente a la presencia de la GA (Manor et al., 2004; Manor et al., 2007; Ventura et al., 2009).

Dado que la producción de hormonas masculinizantes y de gametas se lleva a cabo en la GA y el testículo, respectivamente (Ginsburger-Vogel & Charniaux-Cotton, 1982; Charniaux-Cotton & Payen, 1988), es posible manipular la diferenciación sexual

mediante la manipulación de la GA, sin que esto altere la estructura gonadal. En este sentido, se ha desarrollado una técnica en *M. rosenbergii* que consiste en la producción de hembras funcionales a partir de la reversión sexual completa de machos de reciente diferenciación sexual, luego de ablacionarles la GA. Estas hembras, llamadas “neo-hembras”, producen al aparearse con machos normales progenies con mayor proporción de animales de este sexo, convirtiendo a la ablación de la GA en una herramienta de posible aplicación para la producción de CMM (Sagi & Cohen, 1990; Malecha et al., 1992; Sagi & Aflalo, 2005; Aflalo et al., 2006; Rungsin et al., 2006).

1.3.3 Factor hormonal: Dopamina

La dopamina (DA) es un neurotransmisor que se encuentra distribuido en el sistema nervioso y hemolinfa de numerosas especies de crustáceos decápodos (Cournil et al., 1994; Wood & Derby, 1996; Tierney et al., 2003; Tinikul et al., 2009a), y modula varios procesos fisiológicos (Fingerman & Fingerman, 1977; Quackenbush & Fingerman, 1984; Kulkarni & Fingerman, 1986; Lüschen et al., 1993; Kuo et al., 1995; Sarojini et al., 1995c; Kuo & Yang, 1999). Particularmente, la DA ha demostrado ser un potente inhibidor de la maduración ovárica en *Procambarus clarkii* (Sarojini et al., 1995d; Sarojini et al. 1996), y *M. rosenbergii* (Chen et al., 2003; Tinikul et al., 2008; Tinikul et al., 2009b). Dado que la maduración del sistema reproductor es un proceso que compite desde un punto de vista energético con el crecimiento somático (Conan, 1985; Hartnoll, 1985; Provenzano, 1985; Sokol, 1988; Nelson, 1991), la inhibición de la maduración ovárica mediante la administración de DA podría constituir una herramienta valiosa para incrementar el crecimiento de las hembras.

1.4 Factores evaluados para optimizar la producción de “semilla”

1.4.1 Factores maternos: Tamaño de la madre y número de puestas

La calidad de las progenies depende en gran medida del estado fisiológico del lote parental, el cual está dado principalmente por su tamaño corporal, estado nutricional y el número de puestas consecutivas (Racotta et al., 2003).

Se ha demostrado en ciertas especies de crustáceos decápodos que algunos indicadores de la calidad de prole, tales como la fecundidad, el tamaño de huevos y larvas, y la supervivencia y resistencia larval a la inanición dependen del tamaño de la madre (Litulo, 2005; Maguire et al., 2005; Kozák et al., 2006; Sáez-Royuela et al., 2006; Figueiredo et al., 2008; Sato & Yoseda, 2008; Moland et al., 2010; Sato & Suzuki, 2010), y del número de puestas (Emmerson, 1980; Hansford & Marsden, 1995; Marsden et al., 1997; Kobayashi, 2001; Wu et al., 2010).

En el cultivo de *C. quadricarinatus* se recomienda seleccionar a los animales más grandes (de un peso mayor o igual a 50-60 g) para ser utilizados como reproductores, dado que se supone son los animales que presentan las mejores cualidades (Lawrence & Jones, 2002), y se utilizan todas las puestas producidas por hembra (de 3 a 5 por periodo reproductivo) (Masser & Rouse, 1997). Sin embargo, dicho criterio de selección no se basa en estudios que hayan determinado de manera concluyente el efecto del tamaño de la madre y del número de puestas sobre la calidad de los huevos y juveniles. Por lo tanto, se hace necesario evaluar estos factores maternos, con perspectivas de desarrollar nuevas técnicas de manejo a partir de los resultados obtenidos, y producir de este modo lotes de crías más numerosos y de mejor calidad.

1.5 Objetivos generales

- (A) Manipular la proporción sexual para incrementar la cantidad de machos de *C. quadricarinatus*.
- (B) Inducir un mayor crecimiento somático de las hembras de *C. quadricarinatus*.
- (C) Inducir un mayor crecimiento somático de los machos de *C. quadricarinatus*.
- (D) Evaluar la calidad de progenie en función del tamaño de la madre y del número de puestas en *C. quadricarinatus*.

1.6 Organización de la tesis

La tesis está organizada en 6 capítulos. En el Capítulo 1 se realiza una breve descripción de la especie en estudio y del potencial para su cultivo. Asimismo, se mencionan los objetivos generales de trabajo y se describen brevemente los antecedentes sobre cada temática abordada.

En cada uno de los capítulos siguientes se aborda un objetivo particular de trabajo junto con las hipótesis correspondientes, de tal modo que cada capítulo incluye su propia metodología, resultados y discusión.

Particularmente, en el Capítulo 2 se evalúa el efecto de la exposición de juveniles de *C. quadricarinatus* de reciente diferenciación sexual a diferentes temperaturas, sobre el crecimiento y aspectos reproductivos.

En el Capítulo 3 se evalúa el efecto de la ablación de la GA en juveniles macho de *C. quadricarinatus* sobre el crecimiento y aspectos reproductivos.

En el Capítulo 4 se evalúa el efecto de la administración de dopamina a juveniles hembra de *C. quadricarinatus* sobre la maduración ovárica y crecimiento somático.

En el Capítulo 5 se evalúa el efecto del tamaño de la madre y del número de puestas sobre la calidad de las progenies de *C. quadricarinatus*.

Finalmente, los resultados obtenidos en los capítulos precedentes son integrados en una discusión general, en la cual se destacan las conclusiones principales de la tesis. Dichas consideraciones finales constituyen el Capítulo 6.

CAPITULO 2

Efecto de la temperatura sobre la supervivencia, crecimiento y parámetros reproductivos de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

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

TROPEA, C., PIAZZA, Y. AND LÓPEZ GRECO, L.S.

Effect of long-term exposure to high temperature on growth, survival and reproductive parameters of the “redclaw” crayfish *Cherax quadricarinatus*.

Aquaculture Abril 2010; 302(1-2):49-56.

2.1 Introducción

En numerosos trabajos se ha analizado el efecto de ciertas variables físicas, tales como la temperatura y salinidad, sobre el crecimiento y supervivencia de camarones peneidos (Bartlett et al., 1990; Lester & Pante, 1991; Bray et al., 1994; Wyban et al., 1995; Ponce-Palafox et al., 1997), langostas marinas (Thomas et al., 2000), y langostas de agua dulce (Morrissy, 1990; King, 1994; Jones, 1997; Verhoef & Austin, 1999; Meade et al., 2002; García-Guerrero et al., 2003b; Carmona-Osalde et al., 2004; Hammond et al., 2006; Harlioğlu, 2009; Kozák et al., 2009). La temperatura en particular demostró ser un importante factor físico que influye sobre la actividad metabólica (Thomas et al., 2000; Meade et al., 2002; García-Guerrero et al., 2003b), la alimentación (Whitmore, 1997) y el crecimiento (Ponce-Palafox et al., 1997; Verhoef et al., 1998; Thomas et al., 2000; Carmona-Osalde et al., 2004; Harlioğlu, 2009) de los crustáceos decápodos.

Para mejorar el rendimiento económico en los sistemas de cultivo, muchos de los estudios mencionados previamente se centraron en determinar los límites superior e inferior del rango de temperaturas óptimo, bajo el cual los parámetros de crecimiento y supervivencia son máximos (Morrissy, 1990; King, 1994; Jones, 1997; Ponce-Palafox et al., 1997; García-Guerrero et al., 2003b; Carmona-Osalde et al., 2004; Hammond et al., 2006). En el caso particular de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*, King (1994) y Meade et al. (2002) observaron que los juveniles recién eclosionados alcanzan una tasa de crecimiento y un incremento de peso máximos a la temperatura de 30°C y 28°C, respectivamente, mientras que la supervivencia es máxima en un rango de 24-30°C, resultando letales aquellas temperaturas inferiores a los 15°C. Por su parte, Jones (1997) y Masser & Rouse (1997) observaron que el crecimiento de juveniles de la

misma especie en un estadio de desarrollo más avanzado (0,50-1,50 g) resulta óptimo entre 24 y 28°C, reduciéndose fuertemente por debajo de los 20°C y por encima de los 34°C, mientras que su supervivencia es significativamente menor a dicha temperatura. A su vez, resultados preliminares obtenidos en el laboratorio muestran un efecto negativo de temperaturas mayores a 31°C sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles tempranos (0,02-1,00 g) (Vazquez, 2011) y sobre la adherencia de los huevos en las hembras ovígeras (López Greco, comunicación personal). De acuerdo a estas observaciones, se considera que el rango de temperaturas óptimo de la especie se encuentra entre los 24 y los 30°C.

Por otro lado, Sánchez de Bock & López Greco (2010) han demostrado en *C. quadricarinatus* que la proporción sexual puede ser manipulada en juveniles de reciente diferenciación sexual hacia una mayor proporción de machos o intersexos macho con un desarrollo normal de las gónadas y *appendices masculinae*, mediante el incremento de la temperatura. En dicho trabajo se propone hacer uso de la plasticidad sexual de la especie como una herramienta para obtener cultivos monosexo sólo macho, mediante los cuales se incrementaría la producción de carne (Curtis & Jones, 1995; Jones & Ruscoe, 2001; Aflalo et al., 2006; Rodgers et al., 2006).

En relación a la influencia de la temperatura sobre los parámetros reproductivos de los crustáceos decápodos, se sabe que en ciertas especies de langostas marinas y de agua dulce el incremento de temperatura reduce la producción espermática (Bugnot & López Greco, 2009a), y acelera la maduración ovárica (Matsuda et al., 2002; Carmona-Osalde et al., 2004; Sánchez de Bock & López Greco, 2010). En camarones peneidos la temperatura también afecta la calidad espermática, la maduración ovárica y la tasa de puesta (Bray et al., 1985; Pascual et al., 1998; Perez Velazquez et al., 2001; Hoang et al., 2002a).

El conjunto de trabajos mencionados analizó el efecto de la temperatura en determinados estadios del ciclo de vida de la especie correspondiente (periodos experimentales cortos), y sólo algunos de ellos han estudiado el efecto de la temperatura sobre los sistemas reproductores masculino y femenino desde un punto de vista histológico (Bugnot & López Greco, 2009a; Sánchez de Bock & López Greco, 2010).

2.2 Objetivo

Evaluar el efecto de la exposición prolongada (360 días) a una temperatura que se encuentra en el límite superior del rango de temperaturas óptimo de *C. quadricarinatus*, sobre el crecimiento y parámetros reproductivos de juveniles macho y hembra, desde un estadio de reciente diferenciación sexual hasta alcanzar la madurez sexual.

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

► ***Hipótesis 1:*** *la exposición de hembras juveniles de reciente diferenciación sexual a una temperatura en el límite superior del rango de temperaturas óptimo de la especie induce la reversión sexual y/o mayor crecimiento somático.*

► ***Hipótesis 2:*** *la exposición de machos juveniles de reciente diferenciación sexual a una temperatura en el límite superior del rango de temperaturas óptimo de la especie induce un mayor crecimiento somático.*

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Obtención de los animales

Los juveniles utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio, a partir de un lote de animales reproductores suministrado por el criadero Las Golondrinas, Entre Ríos, Argentina. Dichos animales reproductores fueron mantenidos en acuarios de 60x40x30 cm conteniendo 30L de agua corriente declorada a pH 7,5-7,8, con aireación constante, y aclimatados a las condiciones de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, mediante calentadores ATMAN® de 100 W, precisión 1°C), fotoperiodo (14:10 hs luz:oscuridad) y alimentación (*Eloдея* sp. y alimento balanceado para peces disco Tetracolor, TETRA®, cuya composición aproximada es: 47,5% de proteína bruta, 6,5% de lípidos, 2,0% de fibra, 6,0% humedad, 1,5% de fósforo y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vitamina C) del laboratorio durante un mes previo al inicio de los ensayos correspondientes (periodo de aclimatación).

Transcurrido dicho periodo, se dispusieron los lotes de reproductores, colocando 4 hembras y 1 macho por acuario de 60x40x30 cm ($20,8 \text{ animales}/\text{m}^2$) conteniendo 30L de agua declorada, bajo las condiciones de pH, aireación y fotoperiodo descriptas previamente. En cada acuario se colocaron tubos cilíndricos de PVC (10 cm de diámetro por 25 cm de largo) que los animales utilizan como refugios (Jones, 1995a; Austin, 1998).

Al momento de detectar una hembra ovígera con los huevos ya adheridos a los pleópodos, se procedió a su separación en acuarios de plástico individuales de 33,5x25x19 cm, bajo las mismas condiciones de aireación, fotoperiodo y alimentación que las descriptas previamente. El número total de hembras ovígeras utilizadas fue de 6.

Cuando los juveniles alcanzaron la independencia en el estadio III (Levi et al., 1999), fueron separados de sus madres. Al momento de presentar un peso aproximado de 0,20 g fueron sexados manualmente, teniendo en cuenta que las hembras presentan aberturas genitales en la base del tercer par de pereiópodos y los machos presentan aberturas genitales/órganos copuladores en la base del quinto par de pereiópodos (Fig. 2.1).

Del conjunto de las 6 camadas obtenidas, se seleccionaron al azar 72 machos y 72 hembras para el experimento. El peso inicial medio no difirió significativamente ($p > 0,05$) entre los juveniles macho ($0,21 \pm 0,02$ g) y hembra ($0,22 \pm 0,01$ g).

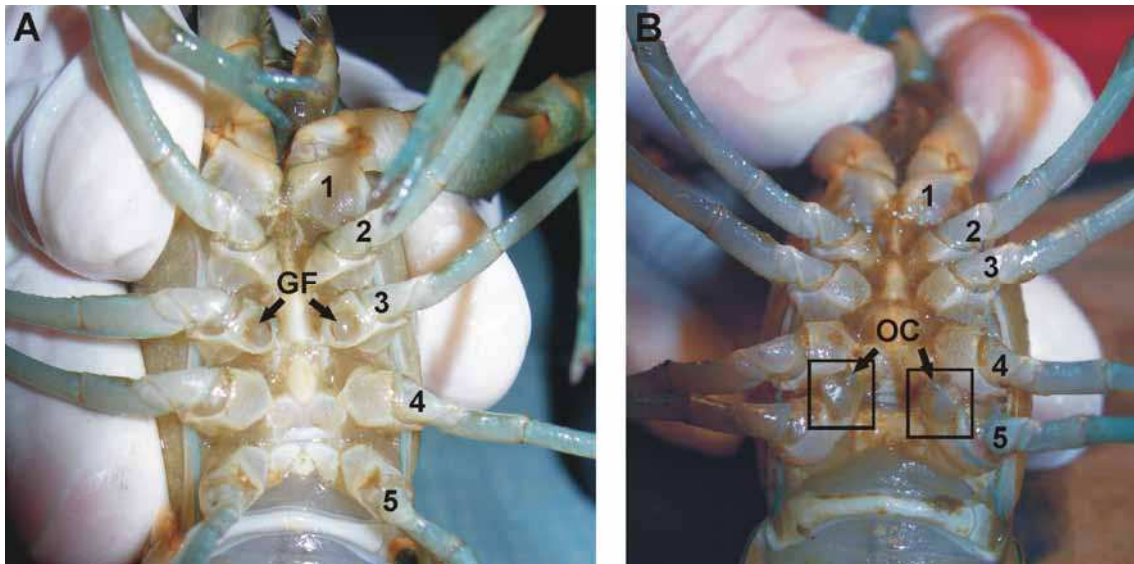


Fig. 2.1. Anatomía externa de machos y hembras de *C. quadricarinatus* en vista ventral. (A) Hembra con gonoporos femeninos (GF) en la base del tercer par de pereiópodos. (B) Macho con órganos copuladores (OC) en la base del quinto par de pereiópodos.

2.3.2 Diseño experimental

Se trabajó con ambos sexos por separado. Los juveniles macho y hembra fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos:

- *TEMPERATURA NORMAL (C)*: exposición a una temperatura del agua de $27 \pm 1^\circ\text{C}$;
- *TEMPERATURA ALTA (TA)*: exposición a una temperatura del agua de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Estas temperaturas fueron seleccionadas en base a resultados previos obtenidos en el laboratorio (Sánchez de Bock & López Greco, 2010; Vazquez, 2011). Ambas se encuentran dentro del rango de temperaturas óptimo de la especie. La Temperatura Normal está incluida entre aquellas a las que el crecimiento de los juveniles es óptimo (24-28°C), mientras que la Temperatura Alta constituye el límite superior del rango.

Se asignaron 12 animales por acuario de vidrio de 60x40x30 cm (50 animales/m²). Cada acuario contenía 30L de agua corriente declorada con aireación continua, y constituyó una réplica. De este modo, cada grupo experimental contó con 3 réplicas (3 acuarios por tratamiento y por sexo), utilizándose un número total de 12 acuarios. Los refugios utilizados consistieron en tubos de PVC (10x2x2 cm) y trozos de red de tipo “cebollera”. A lo largo del periodo experimental los refugios fueron reemplazados por tubos cilíndricos de PVC de mayor tamaño (5 cm de diámetro por 10 cm de largo), en función del crecimiento de los animales (Fig. 2.2). El experimento se llevó a cabo bajo un fotoperiodo constante de 14:10 hs luz:oscuridad. La temperatura fue monitoreada diariamente para asegurar una oscilación máxima de 1°C alrededor de los valores correspondientes a cada tratamiento. Los juveniles fueron alimentados diariamente y *ad libitum* con alimento comercial Tetracolor, TETRA®, y *Elodea* sp. Todos los acuarios fueron limpiados y el agua completamente renovada una vez a la semana. El periodo experimental fue de 360 días, durante el cual los animales fueron sexados y pesados (precisión 0,1 mg) cada 15 días, y la mortalidad fue registrada diariamente.



Fig. 2.2. Diseño experimental general: cada acuario conteniendo un determinado número de animales constituye una réplica. Tanto la temperatura como la aireación del agua son constantes. Los refugios consisten en tubos de PVC y trozos de red de tipo “cebollera”.

2.3.3 Evaluación macroscópica y microscópica

Al finalizar el experimento, todos los animales fueron pesados (precisión: 0,01 g) y se registraron las siguientes variables morfométricas (precisión: 0,01 mm): largo del cefalotórax (LC), entre el extremo anterior del rostro y el extremo posterior del cefalotórax; largo postorbital del cefalotórax (LPC), entre el margen posterior de la órbita y el extremo posterior del cefalotórax; ancho del pleon (AP), medido en el segundo segmento abdominal; largo, ancho y alto de las quelas (LQ, AQ, AIQ, respectivamente); y largo del *red patch* (LRP), cuando correspondía (Fig. 2.3). El *red patch* es una zona no calcificada de color rojo, localizada en el borde externo del

propodo de las quelas de los machos, cuya función se relaciona probablemente con la atracción de la hembra o con su manipulación durante el apareamiento, o bien con la “señalización” del tamaño y calidad del macho (Thorne et al., 1989; Karplus et al., 2003b).

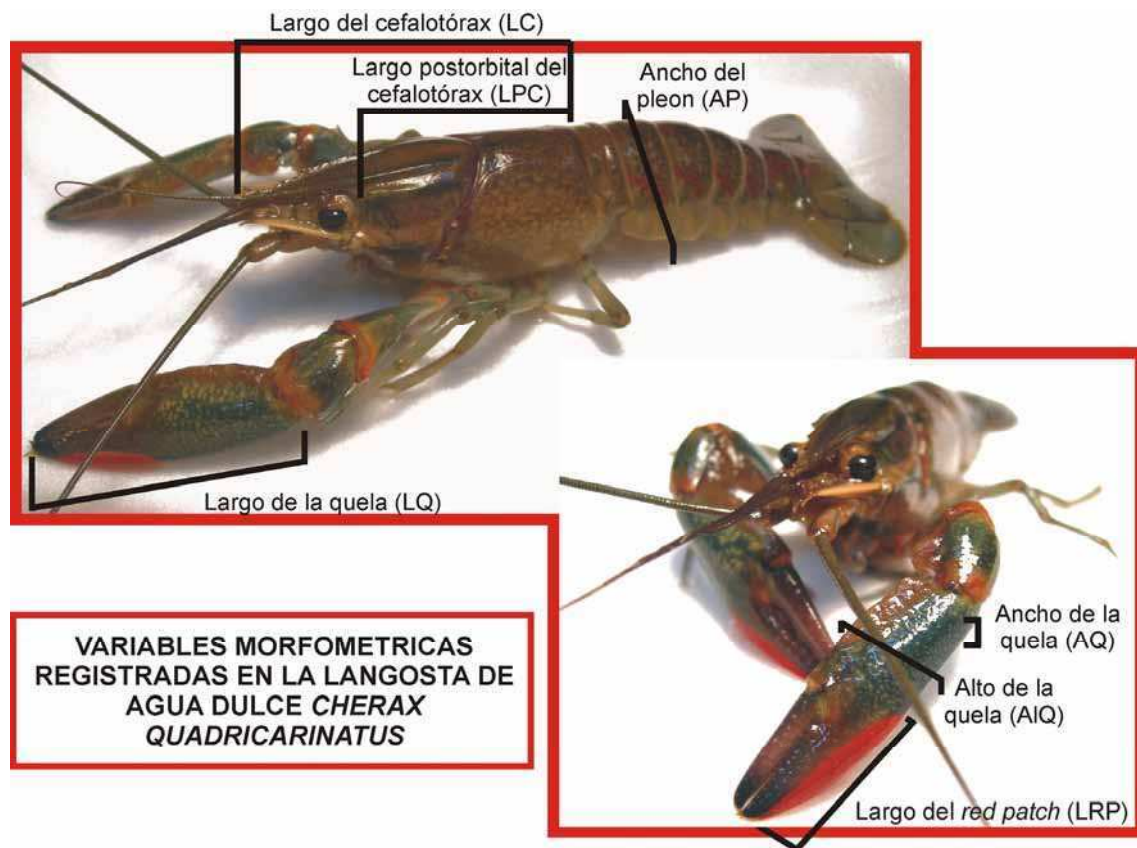


Fig. 2.3. Variables morfométricas registradas en cada animal mediante un calibre digital de precisión 0,01 mm (Schwyz®).

Luego de anestesiar a los animales con frío (se los colocó en hielo durante 15 minutos), el caparazón fue removido y se observó el sistema reproductor para determinar su tamaño relativo, forma y color.

El **sistema reproductor masculino** de *C. quadricarinatus* consiste en un par de testículos de color blanco opalescente, cada uno de los cuales se conecta en su porción media con el vaso deferente (VD). En el mismo se distinguen 3 regiones: (1) proximal (más cercana al testículo), de color similar al del testículo y con un alto grado de enrollamiento; (2) media, muy enrollada y de color blanco; y (3) distal, recta y de color blanco intenso. El diámetro del vaso deferente se incrementa desde la región proximal hacia la región distal. Esta última desemboca y se abre en los *appendices masculinae* (órganos copuladores) (López Greco et al., 2007). Los espermatozoides provenientes del testículo son empaquetados y rodeados en el vaso deferente proximal (VDP) por una fina capa denominada “capa primaria” del espermatóforo, formando el cordón espermático. En el vaso deferente medio (VDM) se sintetiza una matriz que rodea dicha capa primaria y que es llamada “capa secundaria” del espermatóforo. La misma está formada por dos componentes distribuidos de manera uniforme: la matriz homogénea y las gotas citoplasmáticas (López Greco et al., 2007; López Greco & Lo Nostro, 2008).

El **sistema reproductor femenino** de *C. quadricarinatus* consiste en un par de ovarios fusionados en su región posterior y conectados a oviductos, los cuales son estructuras delgadas y opalescentes que se extienden lateralmente para abrirse en los gonoporos (Vazquez et al., 2008). El grado de maduración de los ovarios fue determinado utilizando la siguiente escala de color: transparente (estadio I), crema a naranja pálido (estadio II), naranja con algunos oocitos verdes (estadio III), y verde oliva (estadio IV) (Vazquez et al., 2008) (Fig. 2.4).

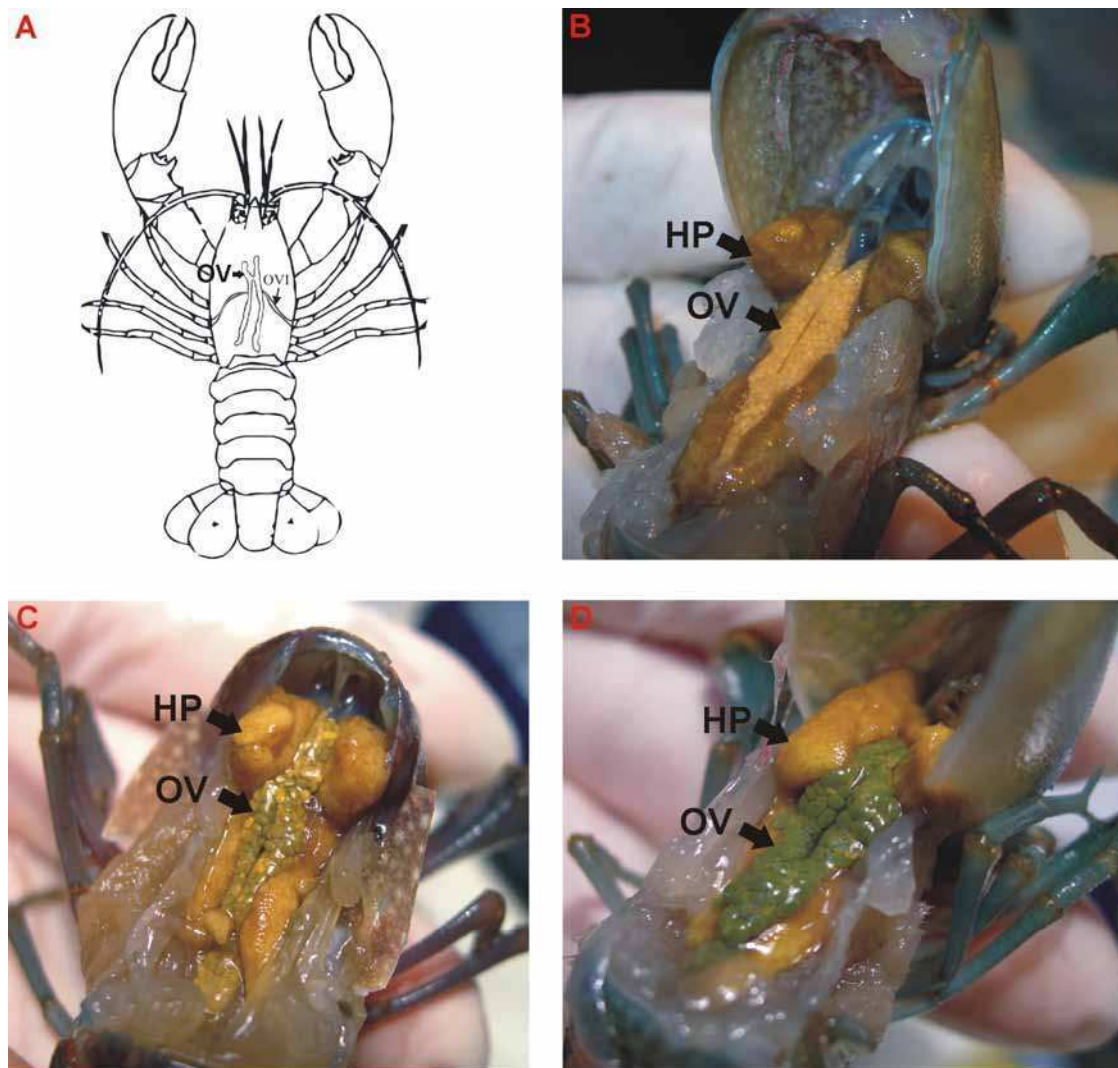


Fig. 2.4. Estadios ováricos de *C. quadricarinatus*. (A) Estadio I: ovario transparente (reproducido de Vazquez, 2011). (B) Estadio II: ovario crema a naranja pálido. (C) Estadio III: ovario naranja con algunos oocitos verdes. (D) Estadio IV: ovario verde oliva. HP: hepatopáncreas, OV: ovario, OVI: oviducto.

Luego de realizar las observaciones macroscópicas correspondientes, el sistema reproductor de cada animal fue rápidamente disecado, pesado (precisión: 0,1 mg), y fijado en solución acuosa de Bouin durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados, incluidos en Glicol Metacrilato (Leica Historesin, Leica Microsystems®), cortados en secciones de 4 µm de espesor y coloreados con Azul de Toluidina y Hematoxilina-Eosina. Al menos 3 cortes por animal fueron inspeccionados bajo microscopio óptico (Imager A.1, Zeiss®) y fotografiados con cámara Nikon® de 7 mpx. En las hembras, se determinó la presencia de oocitos primarios y secundarios de acuerdo a Abdu et al. (2000) y Vazquez et al. (2008), y se midió el diámetro mayor y menor de los oocitos cuyos núcleos eran visibles, con un lente ocular micrométrico 8X (Zeiss®) calibrado mediante una placa Leitz Wetzlar de 10 µm de espaciado (Sánchez de Bock & López Greco, 2010). En los machos, se analizó cualitativamente la estructura del testículo, del VD, y de la capa primaria y secundaria del espermátforo. También se determinó el número de lóbulos testiculares maduros (conteniendo espermátides o espermatozoides; LM) e inmaduros (conteniendo espermátogonias o espermátocitos) (An et al., 2011).

Por último, se disecaron las quelas y el pleon de cada animal, los cuales fueron pesados (PQ y PP, respectivamente) (precisión: 0,01 g).

2.3.4 Índices calculados

La supervivencia fue expresada como el porcentaje de animales vivos dentro de cada tratamiento y para cada sexo al término del experimento.

Las fórmulas utilizadas para calcular los índices relativos al crecimiento somático fueron las siguientes:

- Tasa de Crecimiento Específica, $TCE = 100 * ((\log_e \text{ peso corporal final} - \log_e \text{ peso corporal inicial}) / \text{tiempo})$, donde el tiempo fue expresado en días, y el peso inicial y final correspondieron al peso promedio de los animales de cada acuario al comenzar y finalizar el experimento, respectivamente (Jussila & Evans, 1996, 1997; Reynolds, 2002);
- Incremento de Peso, $IP = 100 * ((\text{peso corporal final} - \text{peso corporal inicial}) / \text{peso corporal inicial})$, correspondiendo el peso inicial y final al peso promedio de los animales de cada acuario al comenzar y finalizar el experimento, respectivamente (Jones, 1995b);
- Ancho Relativo del Pleon, $ARP = AP/LC$;
- Peso Relativo del Pleon, $PRP = PP/\text{peso corporal final}$;
- Alto Relativo de las Quelas, $AIRQ = AIQ/LQ$;
- Peso Relativo de las Quelas, $PRQ = PQ/\text{peso corporal final}$;
- Largo Relativo del *Red Patch*, $LRRP = LRP/LQ$.

Las fórmulas utilizadas para calcular los índices relativos al sistema reproductor fueron las siguientes:

- Índice Gonadosomático, $IGS = 100 * (\text{peso del sistema reproductor} / \text{peso corporal final})$, correspondiendo el peso del sistema reproductor y el peso corporal final al peso promedio del sistema reproductor y al peso corporal final promedio de los animales de cada acuario, respectivamente (McRae & Mitchell, 1995; Sagi et al., 1996b);
- Proporción de Lóbulos Testiculares Maduros, $PLM = 100 * (\text{número de LM} / \text{número total de lóbulos testiculares})$;
- Proporción de Machos con *Red Patch*, $PMRP = 100 * (\text{número de machos con red patch} / \text{número total de machos})$;

- Proporción de Estadio Ovárico X, $PEO = 100 * (\text{número de estadios ováricos X} / \text{número total de estadios ováricos})$;
- Diámetro Oocitario Medio, $DOM = (\text{diámetro mayor} + \text{diámetro menor}) / 2$, calculándose un valor promedio para los oocitos primarios y otro para los oocitos secundarios.

Todos los índices descriptos fueron calculados para cada acuario (réplica), excepto PLM, el cual fue calculado para cada tratamiento.

2.3.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995) de 2 factores (temperatura x sexo) para comparar la supervivencia, peso final, TCE, IP, IGS y las variables morfométricas (LC, LPC, ARP, PRP, LQ, AQ, AIRQ, PRQ, LRRP) entre tratamientos para cada sexo y entre sexos dentro de cada tratamiento, y ANOVA de 1 factor para comparar el DOM y la PEO entre tratamientos para las hembras, y la PMRP entre tratamientos para los machos. La prueba exacta de Fisher (Sokal & Rohlf, 1995) fue utilizada para comparar la PLM entre tratamientos para los machos. En aquellos casos en los que no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad aún luego de realizar las transformaciones correspondientes de los datos, se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis (Sokal & Rohlf, 1995). Los resultados por tratamiento son presentados como $\text{media} \pm \text{ES}$, de acuerdo a Fotedar (2004). Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significación del 95%, mediante el programa Statistica 6.0, StatSoft Inc.

2.4 Resultados

2.4.1 Supervivencia y crecimiento

La supervivencia al final del experimento no difirió significativamente ($p>0,05$) entre tratamientos para cada sexo ni entre sexos para cada temperatura testada (Tabla 2.1).

El peso corporal (Fig. 2.5), incremento de peso (IP) (Fig. 2.5) y tasa de crecimiento específica (TCE) (Fig. 2.6) de las hembras no fueron estadísticamente diferentes entre tratamientos al término del experimento (Test de Kruskal-Wallis para el peso, $p>0,05$; Tabla 2.1). El peso final de los machos fue similar en ambos tratamientos (Test de Kruskal-Wallis, $p>0,05$; Tabla 2.1), si bien se observó una clara tendencia hacia un mayor peso de los machos C respecto a los machos TA a partir del día 90 de comenzado el experimento (Fig. 2.5). Esta tendencia fue confirmada al analizar el IP y la TCE, los cuales tendieron a diferir entre tratamientos a partir del día 270 (Figs. 2.5 y 2.6), siendo estas diferencias significativas al término del ensayo ($p=0,007$, $p=0,009$, respectivamente; Tabla 2.1).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento ($p>0,05$) entre machos y hembras expuestos a TA, si bien los valores correspondientes a las hembras fueron ligeramente mayores que aquellos correspondientes a los machos (Figs. 2.5 y 2.6; Tabla 2.1). A 27°C, se observó una tendencia hacia un mayor peso e IP en los machos que en las hembras a partir del día 270 ($17,64 \pm 0,79$ g los machos y $14,67 \pm 2,81$ g las hembras; Fig. 2.5), siendo estas diferencias significativas al término del experimento (Test de Kruskal-Wallis para el

peso, $p=0,049$; $p=0,004$ para el IP; Tabla 2.1). La TCE también fue significativamente mayor en los machos que en las hembras ($p=0,002$; Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de crecimiento y las variables morfométricas de machos y hembras de *C. quadricarinatus* luego de un periodo de exposición de 360 días.

Parámetro	Tratamiento			
	C		TA	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Número inicial	36	36	36	36
Número final	9	9	13	15
Supervivencia (%)	25,00 ± 4,81 ^a	25,00 ± 4,81 ^a	36,11 ± 7,35 ^a	44,67 ± 8,97 ^a
Peso inicial (g)	0,21 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,01 ^a
Peso final (g)	26,96 ± 1,11 ^a	17,87 ± 1,60 ^b	19,82 ± 4,75 ^a	20,36 ± 3,22 ^{ab}
IP (%)	12647,34 ± 723,83 ^a	8283,25 ± 990,66 ^b	9271,86 ± 904,47 ^b	9224,55 ± 1444,15 ^b
TCE (%/day)	1,35 ± 0,02 ^a	1,23 ± 0,03 ^b	1,26 ± 0,03 ^b	1,26 ± 0,04 ^b
LC (mm)	47,51 ± 1,20 ^a	42,48 ± 1,06 ^b	43,40 ± 4,38 ^a	45,71 ± 2,19 ^{ab}
LPC (mm)	33,10 ± 0,36 ^a	29,67 ± 0,95 ^b	30,40 ± 2,14 ^b	31,24 ± 1,53 ^{ab}
PRP (%)	26,80 ± 1,20 ^a	30,87 ± 1,43 ^b	28,44 ± 1,21 ^a	30,40 ± 0,47 ^b
ARP (%)	39,17 ± 0,75 ^a	43,86 ± 1,13 ^b	40,17 ± 1,60 ^a	43,36 ± 0,93 ^b
LQ (mm)	36,41 ± 2,04 ^a	25,66 ± 5,14 ^b	30,06 ± 3,83 ^a	28,59 ± 3,65 ^b
AQ (mm)	6,39 ± 0,48 ^a	4,13 ± 1,22 ^b	4,83 ± 0,71 ^a	4,34 ± 0,51 ^b
AIRQ (%)	30,39 ± 0,40 ^a	26,57 ± 1,73 ^b	28,59 ± 1,68 ^a	26,26 ± 0,62 ^b
PRQ (%)	6,02 ± 0,21 ^a	2,82 ± 0,98 ^b	4,17 ± 0,98 ^b	3,16 ± 0,86 ^b
LRRP (%)	55,98 ± 0,42 ^a	-	51,14 ± 6,52 ^a	-

Nota: las comparaciones se realizaron entre los tratamientos Control (C) y Temperatura Alta (TA) para cada sexo y entre sexos dentro de cada tratamiento. AQ: ancho de las quelas, ARP: ancho relativo del pleon, AIRQ: alto relativo de las quelas, IP: incremento de peso, LC: largo del cefalotórax, LPC: largo postorbital del cefalotórax, LQ: largo de las quelas, LRRP: largo relativo del *red patch*, PRP: peso relativo del pleon, PRQ: peso relativo de las quelas, TCE: tasa de crecimiento específica. El valor de cada variable presentado en la tabla corresponde al promedio de los 3 valores medios obtenidos en las 3 réplicas (acuarios) de cada grupo experimental. El peso final fue analizado mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis, mientras que el resto de las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p>0,05$).

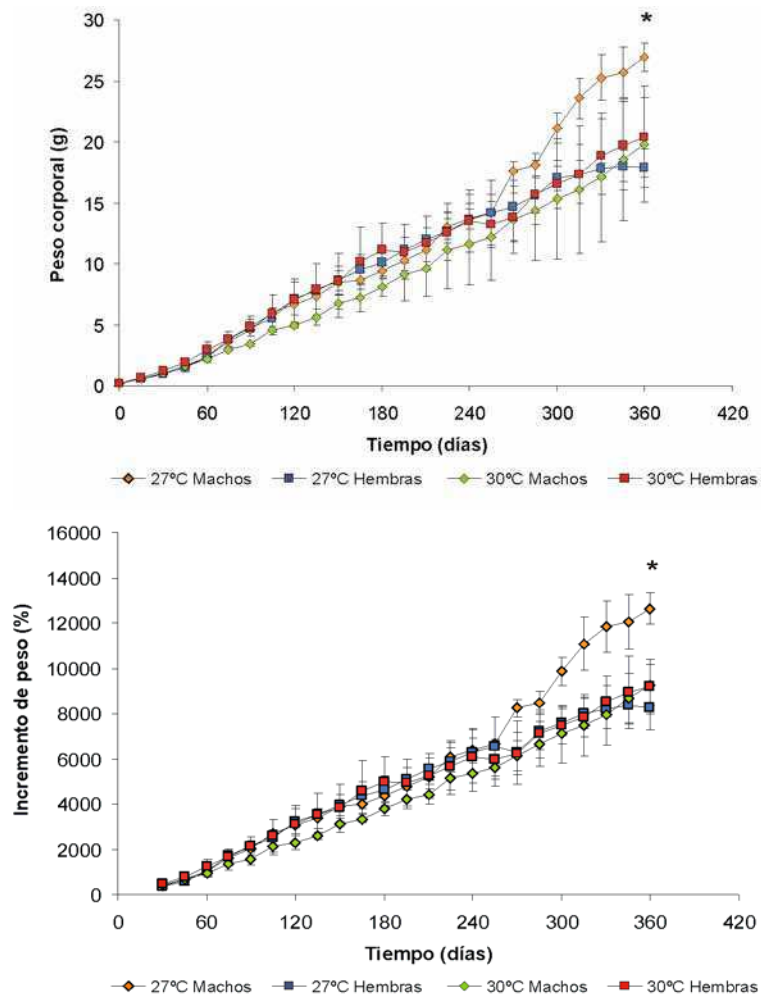


Fig. 2.5. Peso corporal (media \pm ES) e Incremento de peso acumulado (media \pm ES) de machos y hembras de *C. quadricarinatus* expuestos a dos temperaturas diferentes durante un periodo de 360 días. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre tratamientos para cada sexo y entre sexos dentro de cada tratamiento, a los 360 días de comenzado el experimento (tiempo final). El (*) indica la presencia de diferencias significativas entre los machos expuestos a 27°C y los machos expuestos a 30°C, y entre los primeros y las hembras expuestas a 27°C ($p < 0,05$).

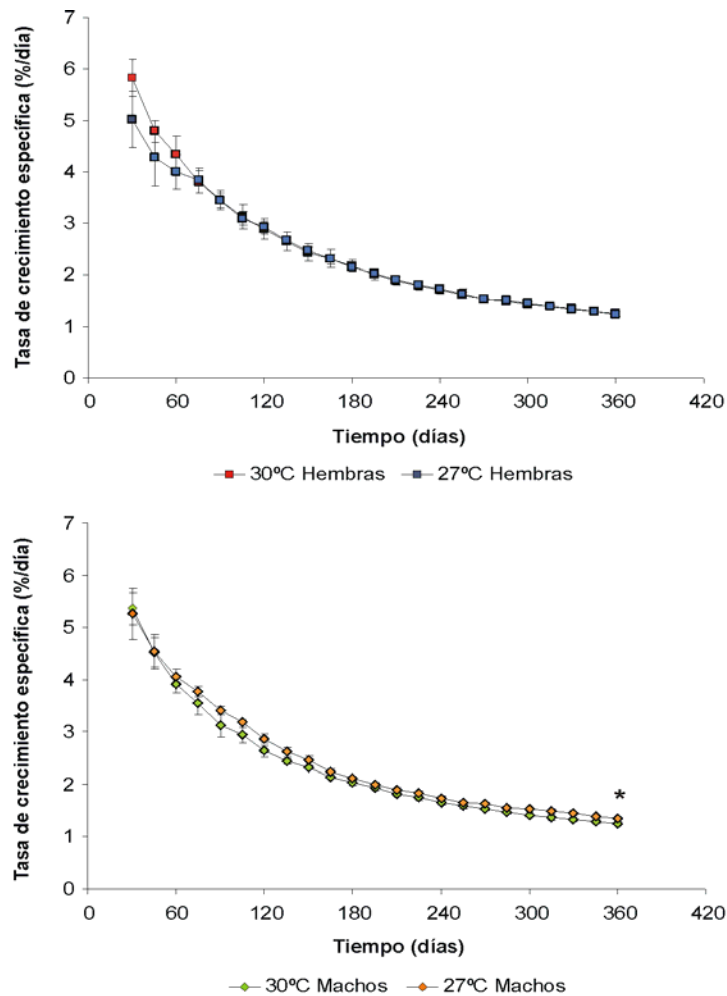


Fig. 2.6. Tasa de crecimiento específica (media \pm ES) de hembras y machos de *C. quadricarinatus* expuestos a dos temperaturas diferentes durante un periodo de 360 días. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre tratamientos a los 360 días de comenzado el experimento (tiempo final). El (*) indica la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

2.4.2 Variables morfométricas

El largo del cefalotórax (LC), largo postorbital del cefalotórax (LPC), tamaño (LQ, AQ y AIRQ) y peso relativo de las quelas (PRQ) de las hembras fueron similares ($p>0,05$) en las 2 temperaturas evaluadas, aunque se observó una tendencia hacia valores mayores en el tratamiento TA (Tabla 2.1).

Por otro lado, los machos C presentaron un LPC y un PRQ significativamente mayores que aquellos de los machos TA ($p=0,046$, $p=0,006$, respectivamente), siendo el resto de las variables morfométricas similares entre tratamientos ($p>0,05$; Tabla 2.1). Del mismo modo, la proporción de animales con *red patch* tendió a ser mayor en el tratamiento C ($p>0,05$; Tabla 2.2). En ambas temperaturas, la diferenciación de este carácter sexual secundario ocurrió a partir del día 150, cuando el peso promedio era de $6,73 \pm 1,08$ g para los machos TA y de $8,45 \pm 1,01$ g para los machos C.

En consonancia con lo observado al comparar los parámetros de crecimiento de machos y hembras, se encontraron valores significativamente mayores de LC ($p=0,044$) y LPC ($p=0,017$) en los primeros, sólo para la temperatura de 27°C. El PRQ siguió el mismo patrón ($p=0,006$) (Tabla 2.1). A su vez, se encontró que las medidas de las quelas de los machos fueron significativamente mayores que las de las hembras, independientemente de la temperatura a la que fueron expuestos (LQ, $p=0,024$; AQ, $p=0,017$; AIRQ, $p=0,003$). Sin embargo, el ancho y peso relativos del pleon de las hembras fueron significativamente mayores que aquellos de los machos ($p=0,000$ y $p=0,002$, respectivamente), en ambas temperaturas testeadas (Tabla 2.1).

2.4.3 Sistema reproductor

La temperatura no tuvo efecto sobre la reversión sexual de macho a hembra ni de hembra a macho. Sólo se observó la reversión de hembra hacia intersexo hembra (Vazquez & López Greco, 2007; Vazquez, 2011), que se produjo en igual proporción en ambas temperaturas, habiendo revertido el 83% de las hembras hacia el final del experimento. Los intersexos hembra presentaron tanto gonoporos femeninos como gonoporos masculinos (Fig. 2.7), pero sus gónadas consistieron en ovarios en todos los casos. Dado que se considera a los intersexos hembra como funcionalmente hembras, se los llamará de este modo a lo largo de todo el capítulo.

Tanto el índice gonadosomático (IGS) como la proporción de los distintos estadios ováricos fueron similares entre hembras C y TA ($p > 0,05$; Tabla 2.2). Sin embargo, la proporción de hembras con ovarios en estadio IV (ovarios maduros) tendió a ser mayor a temperatura alta, y a su vez el 20% ($n=3$) de las hembras TA ovularon a diferentes tiempos a lo largo del periodo experimental (Fig. 2.8). Los oocitos permanecieron adheridos a los pleópodos de las hembras durante un periodo de 7 días en promedio, luego del cual se observó la pérdida completa de los oocitos; en dicho periodo las hembras presentaron un claro comportamiento maternal (ej: aireación de los oocitos y una disminución en el tiempo empleado en la locomoción) (Hazlett, 1983). En las hembras expuestas a 27°C no se registró ningún evento de ovulación ni comportamiento maternal.

Por su parte, el análisis histológico de los ovarios reveló cierto efecto de la temperatura alta sobre el crecimiento gonadal, dado que el diámetro oocitario medio (DOM) de los oocitos primarios fue significativamente mayor en dicho tratamiento que en el control (Test de Kruskal-Wallis, $p=0,049$; Tabla 2.2). Respecto al DOM de los oocitos secundarios, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos

($p > 0,05$; Tabla 2.2). Por otro lado, 2 hembras TA presentaron ovarios de post-puesta o remaduración, en los que se observó la presencia de folículos vacíos delimitados por el epitelio ovárico, y una pared del ovario más gruesa y distendida (Fig. 2.9) (Vazquez et al., 2008; Vazquez, 2011).

Por otro lado, los machos TA mostraron una mayor proporción de lóbulos testiculares maduros (PLM) ($p = 0,021$; Fig. 2.10; Tabla 2.2), mientras que el IGS tendió a ser mayor en este tratamiento respecto a los machos C ($p > 0,05$; Tabla 2.2).

Desde un punto de vista histológico, los testículos no presentaron ningún tipo de alteración estructural, excepto por la presencia de un oocito previtelogénico en el 15,4% ($n = 2$) de los machos TA (Fig. 2.10C). Respecto al VD, se observó en la porción proximal y media de los machos de dicho tratamiento una tendencia hacia un incremento en la actividad secretora del epitelio y cierta estratificación de la capa secundaria del espermátforo. En la porción distal del VD, las gotas citoplasmáticas se encontraban hipertrofiadas. Asimismo, se detectó en un caso una estructura anormal de la capa primaria del cordón espermático (Figs. 2.11 y 2.12).

Tabla 2.2. Efecto de la temperatura sobre los parámetros reproductivos de machos y hembras de *C. quadricarinatus* luego de un periodo de exposición de 360 días.

Parámetro	Tratamiento			
	C		TA	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
IGS (%)	0,91 ± 0,06 ^a	1,85 ± 0,68 ^a	1,62 ± 0,28 ^a	1,65 ± 0,94 ^a
DOM de oocitos primarios (um)	-	262,83 ± 13,32 ^a	-	298,81 ± 0,93 ^b
DOM de oocitos secundarios (um)	-	879,82 ± 86,95 ^a	-	872,13 ± 118,97 ^a
Ovarios en estadio I (%)	-	0,00 ± 0,00 ^a	-	0,00 ± 0,00 ^a
Ovarios en estadio II (%)	-	40,00 ± 16,67 ^a	-	22,22 ± 14,70 ^a
Ovarios en estadio III (%)	-	20,00 ± 9,62 ^a	-	11,11 ± 8,33 ^a
Ovarios en estadio IV (%)	-	40,00 ± 25,46 ^a	-	66,67 ± 14,70 ^a
PLM (%)	30,87 ^a	-	54,78 ^b	-
PMRP (%)	91,67 ± 8,33 ^a	-	58,33 ± 12,73 ^a	-

Nota: las comparaciones se realizaron entre los tratamientos Control (C) y Temperatura Alta (TA) para cada sexo y entre sexos dentro de cada tratamiento. DOM: diámetro oocitario medio, IGS: índice gonadosomático, PLM: proporción de lóbulos testiculares maduros, PMRP: proporción de machos con *red patch*. El valor de cada variable (excepto PLM) presentado en la tabla corresponde al promedio de los 3 valores medios obtenidos en las 3 réplicas (acuarios) de cada grupo experimental. Cada valor de PLM corresponde al promedio de todos los machos de cada tratamiento. El DOM de los oocitos primarios fue analizado mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis; la PLM fue analizada mediante la prueba exacta de Fisher; el resto de las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$).

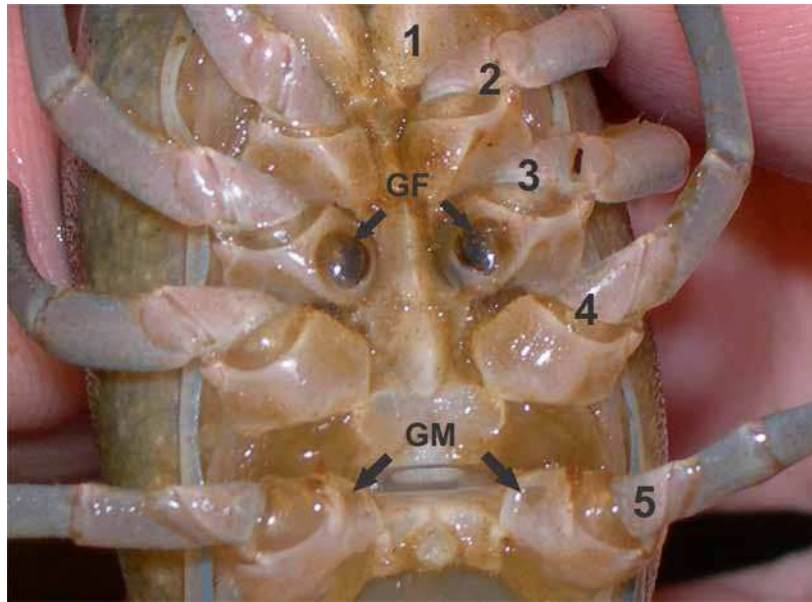


Fig. 2.7. Intersexo hembra de *C. quadricarinatus*, con gonoporos femeninos (GF) y gonoporos masculinos (GM) en la base del tercer y quinto par de pereiópodos, respectivamente.

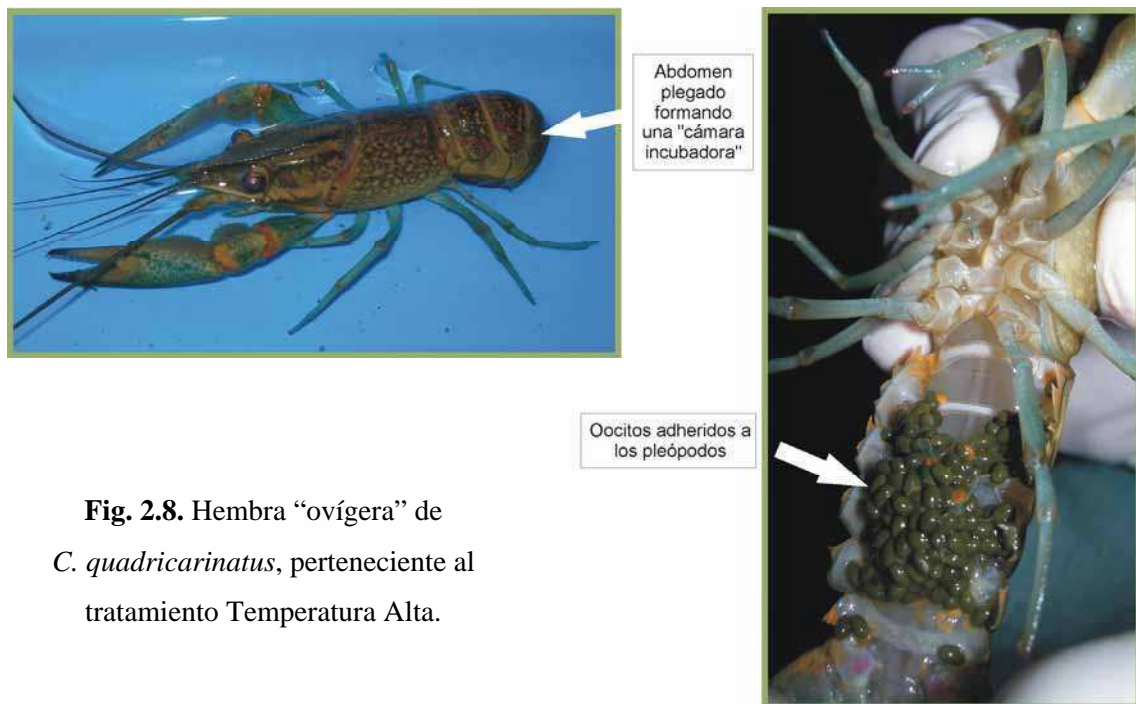


Fig. 2.8. Hembra "ovígera" de *C. quadricarinatus*, perteneciente al tratamiento Temperatura Alta.

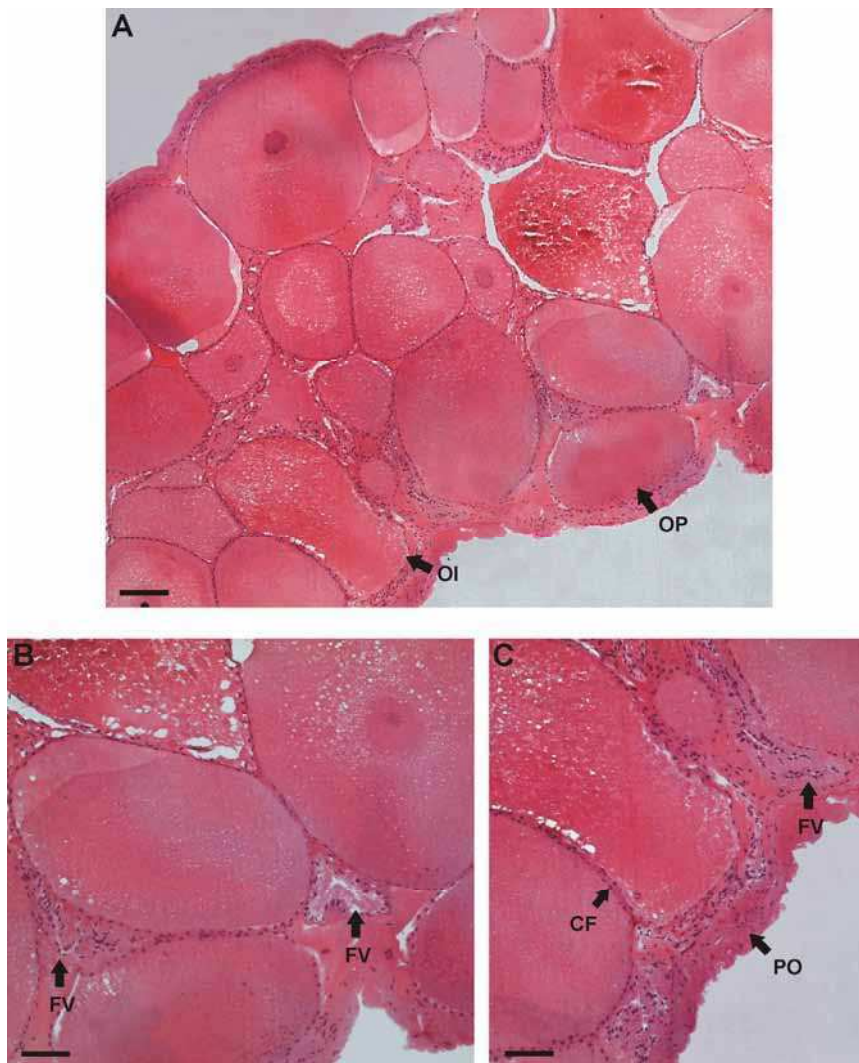


Fig. 2.9. Secciones histológicas de ovario de *C. quadricarinatus* coloreadas con Hematoxilina-Eosina. (A) Vista general y (B), (C) detalles del ovario de remaduración de una hembra expuesta a 30°C, mostrando la presencia de folículos vacíos delimitados por el epitelio ovárico, y una pared ovárica más gruesa y distendida. Barras de escala: (A): 200 μm ; (B), (C): 110 μm . CF: células foliculares, FV: folículo vacío, OI: oocito intermedio, OP: oocito primario, PO: pared ovárica.

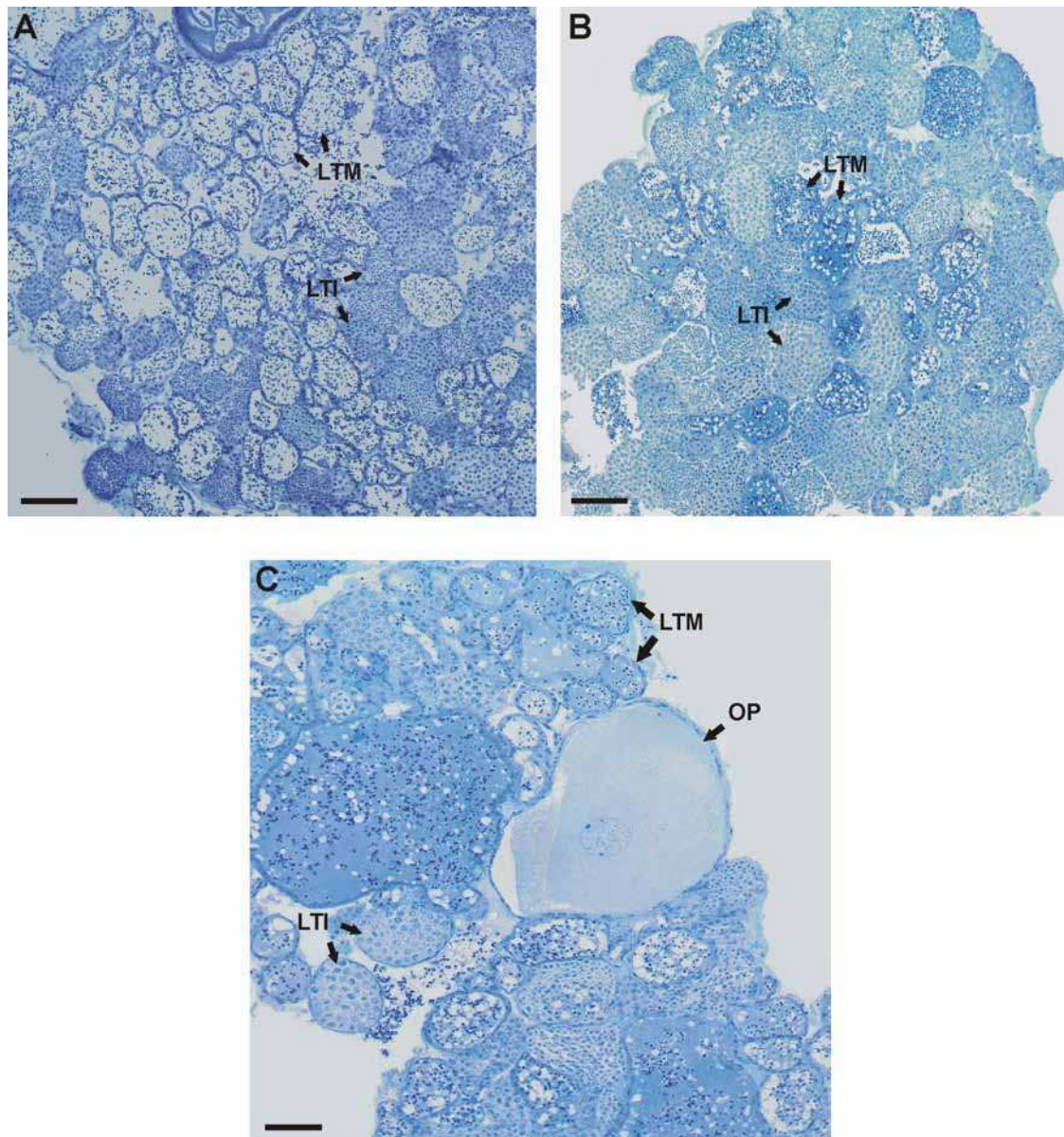


Fig. 2.10. Secciones histológicas de testículo de *C. quadricarinatus* coloreadas con Azul de Toluidina. (A) Vista general del testículo de un macho expuesto a 30°C, mostrando una mayor proporción de lóbulos testiculares maduros respecto a los inmaduros. (B) Vista general del testículo de un macho expuesto a 27°C, mostrando una mayor proporción de lóbulos testiculares inmaduros respecto a los maduros. (C) Vista general del testículo de un macho expuesto a 30°C, mostrando la presencia de un oocito primario entre los lóbulos testiculares. Barras de escala: (A), (B): 100 µm; (C): 80 µm. LTI: lóbulo testicular inmaduro, LTM: lóbulo testicular maduro.

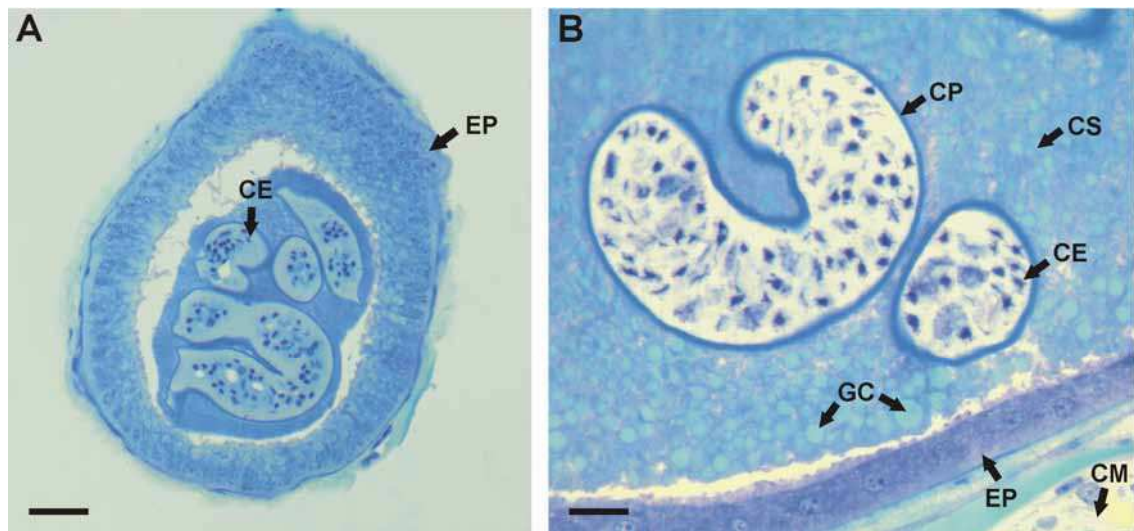


Fig. 2.11. Secciones histológicas del vaso deferente (VD) de machos de *C. quadricarinatus* expuestos a 27°C, coloreadas con Azul de Toluidina. (A) Vista general de la porción proximal del VD, y (B) detalle de la porción distal del VD, mostrando la estructura normal de la pared, del cordón espermático y la capa secundaria del espermátforo. Barras de escala: (A): 40 μ m; (B): 20 μ m. CE: cordón espermático, CM: capa muscular, CP: capa primaria del espermátforo, CS: capa secundaria del espermátforo, EP: epitelio del VD, GC: gotas citoplasmáticas.

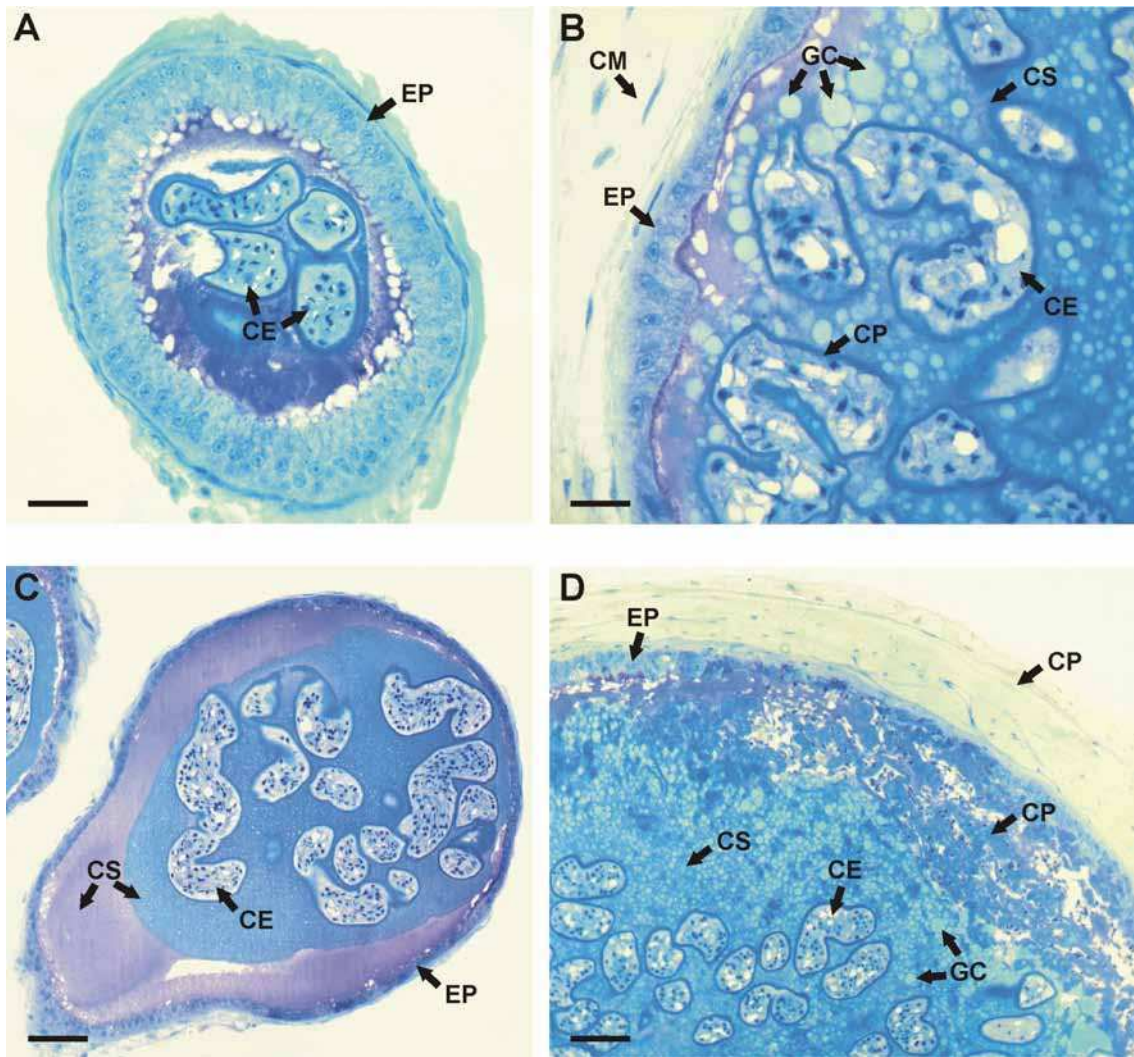


Fig. 2.12. Secciones histológicas del vaso deferente (VD) de machos de *C. quadricarinatus* expuestos a 30°C, coloreadas con Azul de Toluidina. (A) Vista general de la porción proximal del VD, mostrando un aumento de la actividad secretora del epitelio. (B) Detalle de la porción distal del VD, mostrando la presencia de gotas citoplasmáticas hipertrofiadas en la capa secundaria del espermátforo. (C) Vista general de la porción media del VD, mostrando cierta estratificación de la capa secundaria del espermátforo. (D) Detalle de la porción distal del VD, mostrando una gran desorganización de la capa primaria del espermátforo. Barras de escala: (A), (B): 40 μm ; (C): 125 μm ; (D): 15 μm . CE: cordón espermático, CM: capa muscular, CP: capa primaria del espermátforo, CS: capa secundaria del espermátforo, EP: epitelio del VD, GC: gotas citoplasmáticas.

2.5 Discusión

La presente tesis constituye el primer trabajo en el que se investigó el efecto a largo plazo de la temperatura alta sobre la supervivencia, crecimiento y parámetros reproductivos de *C. quadricarinatus*, desde un estadio de juvenil temprano (0,20 g) hasta la adquisición de la madurez sexual en las hembras y machos (peso promedio: $19,12 \pm 2,41$ g y $23,39 \pm 2,93$ g, respectivamente).

No se encontró ningún efecto de la temperatura sobre la supervivencia de machos y hembras, siendo la mayoría de las muertes causadas por canibalismo al momento de la muda. La supervivencia fue menor que aquella previamente reportada para la especie (Curtis & Jones, 1995; Jones & Ruscoe, 2001; Rodgers et al., 2006), lo cual puede atribuirse al hecho de que en la presente tesis se trabajó con una densidad inicial (50 animales/m²) y un periodo experimental (360 días) mayores respecto a los estudios previamente citados (densidad inicial entre 3 y 12,5 animales/m²; periodos experimentales entre 160 y 310 días).

Por su parte, el efecto de la temperatura sobre el crecimiento somático varió de acuerdo al sexo. En las hembras, el mismo no fue influenciado por la temperatura alta. Esto es consistente con resultados obtenidos previamente en el laboratorio, los cuales muestran la ausencia de diferencias significativas en los parámetros de crecimiento de juveniles hembra expuestos a 26 y 31°C a lo largo de un periodo de 150 días (Sánchez De Bock & López Greco, 2010). En el caso de los machos, el crecimiento somático pareció ser afectado negativamente por la temperatura alta desde un peso aproximado de 13 g. Esto podría deberse a una posible disminución en la ingesta de alimento o a una derivación de energía hacia procesos relacionados con el estrés térmico; en dicho caso, ambos factores estarían afectando en mayor medida a los machos que a las hembras. La

imposibilidad de encontrar diferencias significativas en el peso de los machos expuestos a ambos tratamientos podría atribuirse al alto grado de variabilidad entre réplicas, como ya se ha observado previamente en estudios realizados en langostas de agua dulce (Hammond et al., 2006; Rodgers et al., 2006). Estos resultados llevan a **rechazar las hipótesis de trabajo 1 y 2.**

La ausencia de efecto de la temperatura alta sobre la supervivencia de ambos sexos y sobre el crecimiento de las hembras, junto con su efecto negativo sobre el crecimiento de los machos, pareciera contradecir la tendencia general observada en otras langostas de agua dulce de importancia comercial, tales como *C. destructor* (Verhoef et al., 1998; Verhoef & Austin, 1999), *Paranephrops zealandicus* (Hammond et al., 2006), *Astacus leptodactylus* y *Pacifastacus leniusculus* (Harlioğlu, 2008; Kozák et al., 2009). En dichas especies, la supervivencia disminuye y el crecimiento aumenta al incrementarse la temperatura dentro de los correspondientes rangos de temperatura óptimos. El mismo patrón fue observado por Ponce-Palafox et al. (1997) en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, es importante ser cautelosos a la hora de comparar estos resultados con los obtenidos en la presente tesis dado que en dichos trabajos los periodos experimentales fueron más cortos, los rangos de peso (peso final-peso inicial) fueron menores, y se trabajó con ambos sexos en conjunto. Además, el hecho de que la supervivencia disminuya al aumentar la temperatura llevó inevitablemente en dichos trabajos a una variación en la densidad de animales en los tanques de experimentación, lo que a su vez pudo haber afectado el crecimiento (ver más abajo).

Cuando se compararon los parámetros de crecimiento de machos y hembras expuestos a 27°C, se observó que el crecimiento de los primeros comenzó a ser mayor que el de los segundos desde un peso aproximado de 15 g. En esta talla, las hembras se

encuentran madurando sus ovarios (Vazquez et al., 2008), proceso que compite desde el punto de vista energético con el crecimiento somático (Nelson, 1991). Este factor explicaría, al menos en parte, el tamaño diferencial de ambos sexos.

Por otro lado, los machos presentaron un mayor tamaño y peso relativos de las quelas que las hembras y éstas a su vez presentaron un mayor ancho y peso relativos del abdomen que los primeros, independientemente de la temperatura a la que fueron expuestos. Se sabe que los machos producen una mayor cantidad de músculo en las quelas y que las hembras producen una mayor cantidad de músculo en el abdomen (Gu et al., 1994), lo que explicaría el hecho de que animales del mismo tamaño (machos y hembras expuestos a 30°C) produzcan la misma cantidad total de músculo y por lo tanto pesen lo mismo. A 27°C por el contrario, la producción de músculo (y por lo tanto también el peso) fue mayor en los machos que en las hembras dado que los primeros adquirieron un mayor tamaño.

Estos resultados confirman aquellos obtenidos previamente en la especie (Curtis & Jones, 1995; Karplus et al., 1995; Sagi et al., 1997; Jones & Ruscoe, 2001; Rodgers et al., 2006), según los cuales los cultivos formados sólo por machos presentan un peso medio mayor que aquellos formados sólo por hembras o mixtos. Sin embargo, en aquellos estudios los animales se reprodujeron en los tanques experimentales debido a errores cometidos durante el sexado de los individuos al momento de su selección y/o posibles eventos de reversión sexual durante los experimentos. Este hecho llevó a un incremento en la densidad de los estanques experimentales, enmascarando posiblemente los resultados. En el presente trabajo, las hembras en ningún momento tuvieron contacto con los machos, dado que ambos sexos fueron expuestos separadamente a los distintos tratamientos. Por lo tanto, los resultados obtenidos aquí demuestran claramente que machos y hembras expuestos a una temperatura óptima de crecimiento experimentan un

crecimiento diferencial, y sugieren que el retardo en el crecimiento somático de las hembras se debe con mayor probabilidad a los procesos relacionados con la maduración ovárica que a la competencia por los recursos (alimento, refugios, etc) con los machos.

Tanto los machos como las hembras mostraron un crecimiento bajo en ambos tratamientos en relación a lo obtenido en algunos de los estudios ya mencionados (Curtis & Jones, 1995; Jones & Ruscoe, 2001; Rodgers et al., 2006). Una nutrición deficiente de los animales podría explicar este fenómeno. Sin embargo, el alto valor nutricional del alimento comercial utilizado, junto con el estado general de los animales y el examen macroscópico de sus hepatopáncreas (color y textura) al momento de ser sacrificados reflejan en parte el buen estado nutricional de todas las langostas. La razón principal que explicaría el bajo crecimiento obtenido podría ser la condición de alta densidad a la que se mantuvo a los animales a lo largo de todo el periodo experimental. Muchos estudios han demostrado la relación inversa que existe entre la densidad y el crecimiento en langostas de agua dulce (Aiken & Waddy, 1992; Brown et al., 1995; McClain, 1995; Morrissy et al., 1995; Pinto & Rouse, 1996; Verhoef & Austin, 1998; Jones & Ruscoe, 2000; Rodríguez-Serna et al., 2000; Rodgers et al., 2006). En la presente tesis se trabajó con una densidad inicial muy alta (50 animales/m²), alcanzando una densidad final entre 2 y 20 veces más alta que aquellas reportadas en estudios previos (Curtis & Jones, 1995; Jones & Ruscoe, 2001; Rodgers et al., 2006). Como Aiken & Waddy (1992) indican, una alta densidad puede provocar el deterioro de la calidad del agua, la disminución de los recursos esenciales tales como el alimento y el refugio, y/o el incremento en la frecuencia de interacciones comportamentales. En el presente trabajo, los primeros dos factores fueron minimizados a través de una constante supervisión de las condiciones del agua y a través de la alimentación *ad libitum* de los animales. Sin embargo, el tercer efecto fue imposible de controlar. En este sentido, la

alta densidad podría haber favorecido la existencia de interacciones sociales negativas, lo cual a su vez podría haber retardado el crecimiento de los animales.

Los resultados obtenidos en relación al desempeño en el crecimiento son importantes desde un punto de vista comercial, dado que indicarían la inconveniencia de utilizar temperaturas en el límite superior del rango de temperaturas óptimo de la especie para obtener un crecimiento óptimo de los machos. La temperatura alta del agua constituiría un problema no sólo en los países tropicales en los que el agua de los estanques externos de engorde puede alcanzar fácilmente los 30°C (Masser & Rouse, 1997), sino que también en ciertas zonas de los países templados. En este sentido, Wicky et al. (2008) monitorearon la temperatura del agua de estanques de cultivo de *C. quadricarinatus* en Corrientes (Argentina) y obtuvieron valores medios de 30°C durante los meses de verano. En estos casos, se haría necesario evaluar los beneficios y costos del uso de sistemas de enfriamiento para evitar la disminución en el crecimiento de los machos. Sin embargo, no puede descartarse un efecto de la densidad sobre el crecimiento de los machos, dado que en el tratamiento TA la densidad fue ligeramente mayor que en el tratamiento C, lo cual pudo haber generado un menor crecimiento somático. Aún así, esta posibilidad se considera improbable debido a que en el caso de las hembras la densidad también fue ligeramente mayor en el tratamiento TA, sin afectar esto el crecimiento somático de las mismas.

Por otro lado, se observaron ciertos efectos de la temperatura sobre los parámetros reproductivos en ambos sexos. Algunas hembras expuestas a temperatura alta ovularon, lo cual sugiere que la exposición a 30°C estimularía la primera maduración ovárica y/o la puesta; esto se ve reflejado asimismo por la tendencia observada hacia una mayor proporción de hembras con ovarios maduros en el tratamiento TA. Estos resultados son consistentes con estudios previos realizados en las

langostas de agua dulce *P. llamas* (Carmona-Osalde et al., 2004) y *Orconectes viridis* (Portelance & Dubé, 1990). Asimismo, concuerdan con el comienzo más temprano de la vitelogénesis secundaria en hembras de *C. quadricarinatus* expuestas a temperaturas crecientes (Sánchez De Bock & López Greco, 2010) y con la mayor tasa de puesta observada en hembras expuestas a 30°C (Yeh & Rouse, 1995). Sin embargo, en este último estudio la presencia de los machos y/o la cópula podrían haber funcionado como estímulos para la puesta de huevos. Por lo tanto, es importante resaltar que en el presente trabajo las hembras fueron expuestas a una temperatura de 30°C desde un estadio juvenil hasta alcanzar la madurez sexual y que en ningún momento tuvieron contacto con machos. Aún así ovularon, y los oocitos se adhirieron a sus pleópodos. Estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento sobre los poco conocidos factores que disparan y estimulan ambos mecanismos, demostrando que la puesta es independiente de la cópula y que tanto el comportamiento maternal observado en las hembras como la adherencia de los oocitos a los pleópodos son independientes de su fertilización.

El posible efecto del tratamiento TA sobre la maduración ovárica no se evidenció al comparar la proporción de los distintos estadios ováricos, ni el IGS, ni el DOM de los oocitos secundarios con aquellos obtenidos en el tratamiento C. Esto podría haberse debido a la condición de post-puesta de algunas hembras sometidas al tratamiento TA, las cuales habrían presentado en consecuencia ovarios de re-maduración (menos desarrollados y de menor peso) al término del experimento. Un alto grado de variabilidad entre hembras dentro de cada tratamiento podría explicar también la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos.

Por otro lado, la presente tesis constituye el primer reporte sobre cierto efecto de la temperatura alta en la primera etapa de la vitelogénesis en langostas de agua dulce,

evidenciado por un mayor DOM de los oocitos primarios en las hembras expuestas a 30°C. Este resultado indicaría asimismo que dicha temperatura aceleraría el crecimiento ovárico desde sus fases tempranas, lo cual concuerda a su vez con la tendencia observada y discutida previamente hacia una maduración ovárica acelerada.

En el caso de los machos, se observó en el tratamiento TA una mayor PLM y una tendencia hacia un mayor IGS, lo cual sugiere que estos machos derivarían una mayor cantidad de energía hacia el desarrollo del sistema reproductor y que este tratamiento aceleraría la espermatogénesis. Sin embargo, Bugnot & López Greco (2009a) encontraron que machos adultos (peso medio $86,50 \pm 12,30$ g) expuestos a temperatura alta (31°C) durante un periodo de 180 días tendían a presentar testículos de menor tamaño que los machos control, con una significativa disminución en su producción espermática. Estos resultados previos, junto con el análisis histológico del contenido del VD, sugieren entonces que el mayor IGS de los machos expuestos a una temperatura alta respondería más probablemente a una mayor cantidad de secreciones en el VD que a un mayor desarrollo del sistema reproductor y/o a una producción espermática incrementada (no medida en el presente trabajo). Por otro lado, la presencia de oocitos primarios observada en los testículos de machos sometidos al tratamiento TA constituye un fenómeno previamente reportado en machos adultos de la especie expuestos a 23 y 29°C (Bugnot & López Greco, 2009a). Por lo tanto, no es clara la relación entre dicho fenómeno y la temperatura.

El efecto de la temperatura sobre los parámetros reproductivos de machos y hembras de langostas de agua dulce es un tema poco investigado. Carmona-Osalde et al. (2004) demostraron que la temperatura incrementa el desarrollo ovárico en hembras de *P. llamasii*, pero no altera la proporción de machos reproductivos *versus* no reproductivos. El presente trabajo, junto con resultados previos obtenidos en el

laboratorio (Bugnot & López Greco, 2009a; Sánchez de Bock & López Greco, 2010) representan un primer acercamiento hacia el estudio del efecto de la temperatura sobre los parámetros reproductivos de *C. quadricarinatus*. La temperatura alta utilizada demostró tener un efecto beneficioso sobre la maduración ovárica; teniendo en cuenta que los juveniles recién eclosionados presentan una tasa de crecimiento máxima a 30°C (King, 1994), se concluye que dicha temperatura podría ser utilizada en los sistemas de cría (*hatchery*) de la especie. Sin embargo, los resultados en machos no son concluyentes, y una investigación más exhaustiva se hace necesaria para determinar claramente el efecto de temperaturas cercanas al límite superior del rango de temperaturas óptimo de la especie sobre su desempeño reproductivo.

Respecto a la reversión sexual, la temperatura alta no mostró ningún tipo de efecto sobre la misma, por lo que se **rechaza la hipótesis de trabajo 1**. El único tipo de reversión sexual obtenido en ambos tratamientos fue en el sentido hembra-intersexo hembra, el cual se observa habitualmente en el laboratorio. Dichos intersexos fueron caracterizados por Vazquez (2011) como funcionalmente hembras, dado que si bien desarrollan gonoporos masculinos, presentan características gonadales similares a las de las hembras. Los presentes resultados confirman dicha caracterización.

CAPITULO 3

Efecto de la ablación de la glándula androgénica sobre el crecimiento y parámetros reproductivos de los machos de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

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

TROPEA, C., HERMIDA, G. AND LÓPEZ GRECO, L.S.

Effect of the androgenic gland ablation on growth and reproductive parameter of
Cherax quadricarinatus males (Parastacidae, Decapoda).

General and Comparative Endocrinology Noviembre 2011; 174(2):211-218.

3.1 Introducción

La glándula androgénica (GA) fue descubierta por Cronin (1947) en el cangrejo *Callinectes sapidus*. Posteriormente, Charniaux-Cotton (1954) y Legrand (1955) sugirieron que dicha glándula estaría involucrada en crustáceos anfípodos e isópodos en la regulación de la diferenciación de los caracteres sexuales masculinos primarios y secundarios, y en la inhibición de la diferenciación femenina. Posteriormente, se sugirió lo mismo para distintas especies de crustáceos decápodos, incluyendo a la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Nagamine et al., 1980a,b; Nagamine et al., 1987; Taketomi et al., 1990; Malecha et al., 1992; Taketomi & Nishikawa, 1996; Fowler & Leonard, 1999; Khalaila et al., 2001; Manor et al., 2004; Cui et al., 2005). En esta última especie fue demostrado asimismo la influencia de la GA sobre el comportamiento agonístico y de apareamiento en los animales adultos (Barki et al., 2003; Karplus et al., 2003c; Barki et al., 2006).

En los crustáceos decápodos la GA se localiza en la región terminal del vaso deferente (VD) (Charniaux-Cotton & Payen, 1988; Fowler & Leonard, 1999) (Fig. 3.1), y su estructura macroscópica consiste generalmente en delgados cordones paralelos de células epiteliales, enrollados sobre sí mismos y cubiertos de tejido conectivo (Carpenter & DeRoos, 1970; Payen et al., 1982; Joshi & Khanna, 1987). Desde un punto de vista microscópico, en algunas especies de crustáceos decápodos la GA consiste en células epiteliales con núcleos ovalados grandes, las cuales poseen en general un alto grado de vacuolización (Fingerman, 1987; Fowler & Leonard, 1999), mientras que en otras especies consiste en células con retículos endoplasmáticos rugosos bien desarrollados y abundantes mitocondrias, lo cual se asemeja a células secretoras de productos de naturaleza proteica (King, 1964; Taketomi, 1986; Okumura

& Hara, 2004). Sin embargo, hasta el momento sólo se han purificado y caracterizado parcialmente hormonas androgénicas proteicas en crustáceos isópodos. Particularmente, Martin et al. (1990), Okuno et al. (1999) y Ohira et al. (2003) han purificado, identificado y secuenciado de manera independiente la hormona androgénica de *Armadillidium vulgare*, *Porcellio scaber* y *P. dilatatus*. En crustáceos decápodos, la única molécula activa asociada a la GA que se ha purificado hasta el momento es de naturaleza lipídica (Berreur-Bonnenfant et al., 1973), se la llamó farnesyl-acetona (Ferezou et al., 1978), y afecta la síntesis de proteínas y de ARN en los órganos blanco (Berreur-Bonnenfant & Lawrence, 1984).

El rol de la glándula androgénica (GA) en la diferenciación sexual ha sido ampliamente estudiado en los crustáceos malacostracos, principalmente a través de dos metodologías alternativas: la implantación de esta glándula en hembras y su ablación (andrectomía) en machos.

La aplicación de estos dos procedimientos en crustáceos anfípodos e isópodos demostró claramente que la GA controla la diferenciación del sistema reproductor masculino y que es necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis (Balesdent-Marquet, 1958; Katakura, 1961; Charniaux-Cotton, 1962; Juchault & Legrand, 1964; Katakura, 1984; Charniaux-Cotton & Payen, 1985). Particularmente, la andrectomía resultó en la feminización parcial de los caracteres sexuales secundarios y en la feminización total de las gónadas en el isópodo *A. vulgare* (Suzuki et al., 1990; Suzuki & Yamasaki, 1991), mientras que en *Orchestia gammarella* bloqueó la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios masculinos y provocó una disminución de la espermatogénesis (Charniaux-Cotton, 1954). La implantación de la GA en isópodos también confirmó la capacidad de esta glándula de masculinizar los caracteres sexuales primarios y secundarios (Charniaux-Cotton 1954, 1955; Balesdent-Marquet, 1958;

Katakura, 1960; Juchault & Legrand, 1964), observándose en hembras de *A. vulgare* la inhibición de la vitelogénesis y la diferenciación de tejido testicular en el ovario luego de dicho procedimiento (Suzuki & Yamasaki, 1997, 1998).

En numerosas especies de crustáceos decápodos se ha llevado a cabo la implantación (o inyección) de la GA (o extracto glandular), obteniéndose un efecto más acentuado (reversión sexual completa hacia “neo-machos” fértiles) en el camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Nagamine et al., 1980a,b; Malecha et al., 1992). En aquellos estudios realizados en langostas de agua dulce, tales como *Procambarus clarkii* (Nagamine & Knight, 1987; Taketomi et al., 1990; Taketomi & Nishikawa, 1996), *C. destructor* (Fowler & Leonard, 1999), y *C. quadricarinatus* (Khalaila et al., 2001; Barki et al., 2003; Manor et al., 2004), y en cangrejos (Cui et al., 2005), la implantación de la GA indujo un grado variable de masculinización de los caracteres sexuales primarios (ej: formación de lóbulos espermátogénicos, inhibición de la vitelogénesis secundaria y/o regresión ovárica) y/o secundarios (ej: desarrollo de gonoporos masculinos y/u órganos copuladores).

Por su parte, la ablación de la GA también reveló el rol clave de esta glándula en la diferenciación sexual masculina en crustáceos decápodos. En este sentido, se observó la reversión sexual en machos de *M. rosenbergii* ablacionados en un estadio muy temprano de desarrollo hacia hembras completamente funcionales (“neo-hembras”) (Sagi & Cohen, 1990; Sagi & Aflalo, 2005; Aflalo et al., 2006). Asimismo, en juveniles intersexo de *C. quadricarinatus* (funcionalmente machos) la ablación de la GA indujo el inicio de la vitelogénesis secundaria en los ovarios inmaduros (Barki et al., 2006), y alteró la estructura histológica de los componentes femenino y masculino de sus sistemas reproductores, incrementando el diámetro oocitario y la proporción de lóbulos testiculares maduros (conteniendo espermátides), respectivamente (Khalaila et al.,

1999). Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado ninguna caracterización morfológica de los efectos de la ablación de la GA sobre los caracteres sexuales externos y el sistema reproductor en **machos** de *C. quadricarinatus*.

La obtención de “neo-hembras” en dicha especie constituiría un paso importante hacia la producción de cultivos monosexo solo macho (CMM), los cuales son ventajosos desde un punto de vista económico (Curtis & Jones, 1995; Sagi et al., 1997; Jones & Ruscoe, 2001; Rodgers et al., 2006). Esto se relaciona con la teoría propuesta por Katakura (1989), según la cual el género de muchas especies estaría determinado genéticamente, de acuerdo al esquema WZ-ZZ, constituyendo los machos el sexo homogamético y las hembras el sexo heterogamético (Malecha et al., 1992; Benzie et al., 2001; Parnes et al., 2003). Por lo tanto, el cruzamiento entre “neo-hembras” y machos, ambos genéticamente machos (ZZ), explicaría la mayor proporción de ejemplares de este sexo en la descendencia, como se observó en *M. rosenbergii* (Sagi & Cohen, 1990; Malecha et al., 1992; Rungsin et al., 2006), constituyendo un modo directo de obtener CMM.

Por otro lado, se ha estudiado tanto en *M. rosenbergii* como en *C. quadricarinatus*, un posible efecto de la GA sobre el crecimiento, dado que en dichas especies los machos crecen más y más rápido que las hembras (Sagi et al., 1986; Curtis & Jones, 1995; Karplus et al., 1995; Sagi et al., 1997; Jones & Ruscoe, 2001; Sagi & Aflalo, 2005; Rodgers et al., 2006). En el primer caso, el crecimiento somático se redujo debido a la ablación de la GA (Sagi & Cohen, 1990; Sagi et al., 1990) y en el segundo caso, se incrementó debido a la implantación de la misma (Barki et al., 2003; Manor et al., 2004). Esto último se observó también en hembras de *C. destructor* implantadas con GA (Fowler & Leonard, 1999). No está claro aún si el efecto inductor de la GA sobre el crecimiento es ejercido a través de un andrógeno (no aislado aún para estas especies;

Manor et al., 2007) de manera directa, o de manera indirecta mediante la inhibición de la gran inversión energética que significa la maduración ovárica en las hembras, o una combinación de ambos (Barki et al., 2003; Manor et al., 2004). Recientemente, se ha identificado la presencia de un gen *insulina-like* que se expresa de modo específico en la GA en machos de *C. quadricarinatus* y *M. rosenbergii*. La expresión de este gen en una glándula presente sólo en los machos podría estar asociada al efecto “masculinizante” y trófico de la misma, como fue propuesto por Manor et al. (2007) y comprobado posteriormente por Ventura et al. (2009) en *M. rosenbergii* mediante el silenciamiento *in vivo* del gen.

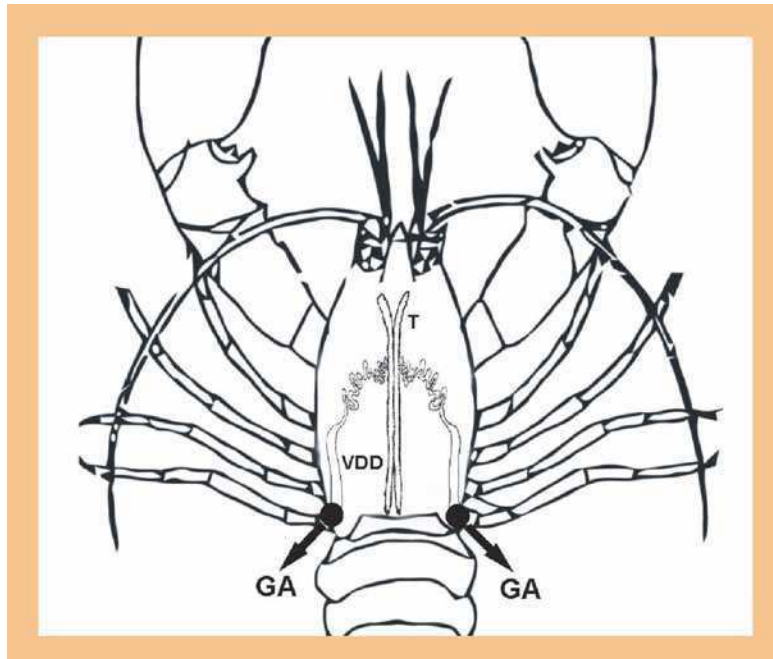


Fig. 3.1. Localización de la glándula androgénica (GA) en crustáceos decápodos (modificado de López Greco et al., 2007). T: testículo, VDD: vaso deferente distal.

3.2 Objetivo

Evaluar durante un periodo prolongado (300 días) el efecto de la ablación de la GA, realizada en un estadio temprano del desarrollo, sobre el crecimiento, estructura del

sistema reproductor y desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de los machos de *C. quadricarinatus*. Particularmente, se buscará inducir mediante dicho procedimiento la reversión sexual de los machos para obtener “neo-hembras”.

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

▶ **Hipótesis 3:** *la ablación de la glándula androgénica en machos juveniles induce la “feminización” de los caracteres sexuales primarios y secundarios (reversión sexual).*

▶ **Hipótesis 4:** *la ablación de la glándula androgénica en machos juveniles provoca una disminución en el crecimiento somático.*

▶ **Hipótesis 5:** *al aparear los machos ablacionados (“neo-hembras”) con machos normales aumenta la proporción de machos en la progenie.*

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Obtención de los animales

Los juveniles utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos a partir de dos lotes de animales reproductores suministrados por el criadero Las Golondrinas, Entre Ríos, Argentina, en el año 2007 y 2009, respectivamente. Dichos lotes fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de laboratorio descriptas en el Capítulo 2. El número total de hembras ovígeras utilizadas en cada experimento fue de 6.

Cuando los juveniles alcanzaron un peso aproximado de 0,20 g fueron sexados manualmente y los machos fueron seleccionados y mantenidos bajo las mismas

condiciones de calidad de agua, temperatura, fotoperiodo y alimentación descriptos para sus madres (ver Capítulo 2) hasta el comienzo del experimento.

3.3.2 Diseño experimental

3.3.2.1 Experimento 1

Se seleccionaron juveniles macho de un peso de $2,91 \pm 0,27$ g. Dicha talla se corresponde con el estadio II de desarrollo del sistema reproductor masculino, en el cual ya se observan espermatozoides en el testículo y VD y comienza a diferenciarse la capa secundaria del espermatóforo, si bien todavía pueden encontrarse espermatozoides libres o rodeados sólo por la capa primaria del espermatóforo. En cuanto a los caracteres sexuales secundarios, los machos de este estadio ya presentan *appendices masculinae* elongados, pero carecen de *red patch* (Vazquez & López Greco, 2010).

Los juveniles macho seleccionados fueron asignados de manera aleatoria a uno de los siguientes tratamientos:

- *ANDRECTOMÍA (AGA)*: remoción de ambos pares de patas caminadoras junto con la GA, mediante un corte en la articulación entre la coxa y el cefalotórax (Fig. 3.2);
- *CONTROL (C)*: remoción de ambos pares de patas caminadoras mediante un corte en la articulación entre la coxa y la base del pereiópodo (Fig. 3.2).

Los procedimientos quirúrgicos descriptos se realizaron de acuerdo a Khailaila et al. (1999) y Sagi et al. (1999). En ambos tratamientos, se cauterizaron los cortes mediante un soldador con punta de cerámica (Modelo JA-4040), con el fin de evitar la pérdida excesiva de hemolinfa y asegurar la remoción completa de la GA.

Luego del procedimiento quirúrgico, se inició el experimento. Los organismos fueron mantenidos en acuarios de vidrio de 60x40x30 cm, conteniendo 30L de agua corriente de clorada bajo aireación continua. Tubos de PVC (10x2x2 cm) y trozos de red de tipo “cebollera” fueron ofrecidos como refugios. A lo largo del periodo experimental los refugios fueron reemplazados por tubos cilíndricos de PVC de mayor tamaño (5 cm de diámetro por 10 cm de largo), en función del crecimiento de los animales. Cada acuario contó con 6 langostas (25 animales/m²) y constituyó una réplica. Tres réplicas fueron utilizadas por grupo experimental (6 acuarios en total). El experimento fue llevado a cabo bajo condiciones constantes de fotoperiodo (14:10 hs luz:oscuridad) y temperatura (27 ± 1°C). Los juveniles fueron alimentados diariamente y *ad libitum* con *Elodea* sp. y alimento comercial Tetracolor, TETRA®. Todos los acuarios fueron limpiados y el agua completamente renovada una vez a la semana. El periodo experimental fue de 300 días (año 2008); cada 30 días los animales fueron sexados y pesados (precisión: 0,01 g). También se registró la mortalidad, la regeneración de los pereiópodos previamente removidos, la re-formación de gonoporos masculinos y *appendices masculinae*, el desarrollo de gonoporos femeninos, y la diferenciación del *red patch*.

Debido a los resultados obtenidos en este experimento y al hecho de que se observó una gran mortalidad de animales inmediatamente luego del procedimiento quirúrgico, se decidió la realización de un segundo experimento (**Experimento 2**), en el cual se utilizaron animales de una talla inicial menor y se aplicaron mecanismos adicionales para minimizar los efectos estresantes de la ablación de la GA.

3.3.2.2 *Experimento 2*

Se seleccionaron juveniles macho de un peso de $1,85 \pm 0,03$ g (estadio II de desarrollo del sistema reproductor masculino, de acuerdo a Vazquez & López Greco, 2010), los cuales fueron asignados de manera aleatoria a los tratamientos descritos previamente.

Previo a la remoción quirúrgica de la GA, los animales fueron anestesiados con frío durante 5 minutos. Luego de la remoción de los pereiópodos y previo a la cauterización de los cortes realizados se colocó anestesia (Lidocaína (2%), Xylocaína®) sobre las heridas.

Dado que algunos juveniles murieron durante la semana posterior a la realización de las cirugías, el experimento se inició una vez que el número de animales dentro de cada tratamiento se estabilizó. Los organismos fueron mantenidos en las mismas condiciones experimentales que en el **Experimento 1**. Cada acuario contó con 4/5 langostas ($16,7-20,8$ animales/m²) y constituyó una réplica. Tres réplicas fueron utilizadas por grupo experimental (6 acuarios en total).

El periodo experimental fue de 315 días (año 2010); cada 15 días los animales fueron sexados y pesados (precisión: 0,01 g). También se registró la mortalidad, la regeneración de los pereiópodos previamente removidos, la re-formación de gonoporos masculinos y *appendices masculinae*, el desarrollo de gonoporos femeninos, y la diferenciación del *red patch*.

3.3.3 *Evaluación macroscópica y microscópica*

Al finalizar ambos experimentos, los animales fueron pesados (precisión: 0,01 g) y se registraron las siguientes variables morfométricas (precisión: 0,01 mm): largo del

cefalotórax (LC), entre el extremo anterior del rostro y el extremo posterior del cefalotórax; largo postorbital del cefalotórax (LPC), entre el margen posterior de la órbita y el extremo posterior del cefalotórax; ancho del pleon (AP), medido en el segundo segmento abdominal; largo, ancho y alto de las quelas (LQ, AQ, AIQ, respectivamente); y largo del *red patch* (LRP) (Fig. 2.3).

Luego de anestesiar a los animales con frío (se los colocó en hielo durante 15 minutos), el caparazón fue removido y se inspeccionó el sistema reproductor para determinar su tamaño relativo, forma y color. Posteriormente, fue disecado, pesado sólo en el **Experimento 2** (precisión: 0,1 mg), y fijado en solución acuosa de Bouin durante 4 horas a temperatura ambiente. Los tejidos fueron posteriormente deshidratados, incluidos en Paraplast (Leica Microsystems®) y coloreados con Tricrómico de Mason y Hematoxilina-Eosina. Al menos 3 cortes (5-7 µm de espesor) de cada animal fueron inspeccionados bajo microscopio óptico (Imager A.1, Zeiss®) y fotografiados con cámara Leica® ICC50 de 3 mpx. Se analizó cualitativamente la estructura del testículo, del VD, y del espermatóforo, incluyendo la cantidad relativa de secreciones en la capa primaria y secundaria (López Greco et al., 2007; López Greco & Lo Nostro, 2008). También se determinó en cada macho el número de secciones de cordón espermático dentro de la porción distal del VD (VDD), y el número de lóbulos testiculares maduros e inmaduros.

Por último, se disecaron las quelas y el pleon de cada animal, los cuales fueron pesados (PQ y PP, respectivamente) (precisión: 0,01 g). También se disecaron el endopodito y exopodito del primer y segundo par de pleópodos, y se analizó bajo lupa (x40) el tamaño relativo de los mismos, junto con la morfología de sus sedas. Ambos factores son importantes a la hora de evaluar la posible feminización de los machos ablacionados, dado que los machos sólo presentan sedas plumosas mientras que las

hembras desarrollan al alcanzar la madurez sexual sedas simples (ovígeras) en el endopodito, el cual es de mayor tamaño que el exopodito (Sagi et al., 1996b) (Fig. 3.3).

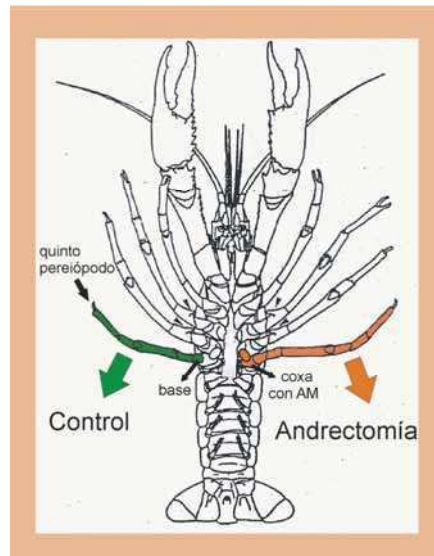


Fig. 3.2. Esquema de un macho de *C. quadricarinatus* en vista ventral indicando los cortes realizados para ambos grupos experimentales. Control: remoción quirúrgica del quinto par de pereopodos mediante un corte realizado entre la coxa y la base del pereopodo. Andrectomía: remoción quirúrgica de la GA mediante un corte realizado entre la coxa del quinto par de pereopodos y el cefalotórax. AM: *apéndices masculinae*. Modificado de Taketomi et al. (1996).

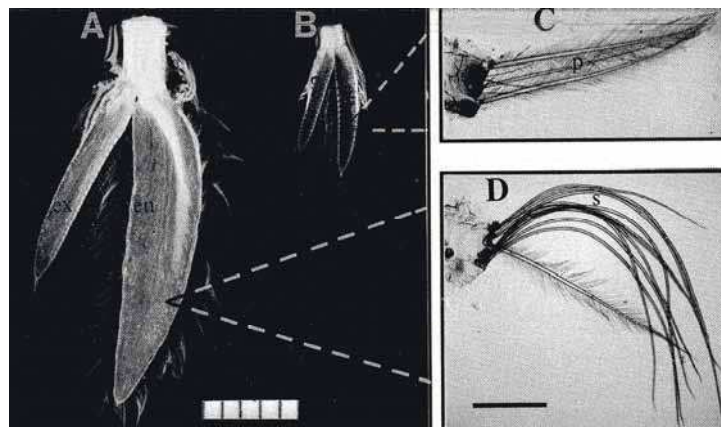


Fig. 3.3. Pleópodos de hembra de *C. quadricarinatus*. (A) Pleópodo de hembra adulta, con el endopodito de mayor tamaño que el exopodito. (B) Pleópodo de hembra juvenil, con el endopodito de igual tamaño que el exopodito. (C) Detalle de un endopodito inmaduro, con sedas plumosas. (D) Detalle de un endopodito maduro, con sedas simples (ovígeras). en: endopodito; ex: exopodito; p: sedas plumosas; s: sedas simples. Reproducido de Sagi et al. (1996b).

3.3.4 Índices calculados

En ambos experimentos la supervivencia fue expresada como el porcentaje de animales vivos dentro de cada tratamiento al término del experimento.

Las fórmulas utilizadas para calcular los índices relativos al crecimiento somático fueron las siguientes:

- Tasa de Crecimiento Específica, $TCE = 100 * ((\log_e \text{ peso corporal final} - \log_e \text{ peso corporal inicial}) / \text{tiempo})$, donde el tiempo fue expresado en días, y el peso inicial y final correspondieron al peso promedio de los animales de cada acuario al comenzar y finalizar el experimento, respectivamente (Jussila & Evans, 1996, 1997; Reynolds, 2002);
- Incremento de Peso, $IP = 100 * ((\text{peso corporal final} - \text{peso corporal inicial}) / \text{peso corporal inicial})$, correspondiendo el peso inicial y final al peso promedio de los animales de cada acuario al comenzar y finalizar el experimento, respectivamente (Jones, 1995b);
- Ancho Relativo del Pleon, $ARP = AP/LC$;
- Peso Relativo del Pleon, $PRP = PP/\text{peso corporal final}$;
- Alto Relativo de las Quelas, $AIRQ = AIQ/LQ$;
- Peso Relativo de las Quelas, $PRQ = PQ/\text{peso corporal final}$;
- Largo Relativo del *Red Patch*, $LRRP = LRP/LQ$;

Las fórmulas utilizadas para calcular los índices relativos al sistema reproductor fueron las siguientes:

- Índice Gonadosomático, $IGS = 100 * (\text{peso del sistema reproductor} / \text{peso corporal final})$, correspondiendo el peso del sistema reproductor y el peso corporal final al peso promedio del sistema reproductor y al peso corporal final promedio de

los animales de cada acuario, respectivamente (McRae & Mitchell, 1995; Sagi et al., 1996b) (sólo para el **Experimento 2**);

- Proporción de Lóbulos Testiculares Maduros, PLM = $100 \times (\text{número de LM} / \text{número total de lóbulos testiculares})$;
- Proporción de Machos con *Red Patch*, PMRP = $100 \times (\text{número de machos con red patch} / \text{número total de machos})$.

Todos los índices descriptos fueron calculados para cada acuario (réplica).

3.3.5 Análisis estadístico

Para cada experimento se realizó un análisis de varianza de 1 factor (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995) para comparar el peso final, TCE, IP, IGS, las variables morfométricas (LC, LPC, ARP, PRP, LQ, AQ, AIRQ, PRQ, LRRP), el número de secciones de cordón espermático dentro del VDD, la PLM y la PMRP entre tratamientos. La supervivencia fue comparada entre tratamientos para cada experimento mediante la prueba exacta de Fisher (Sokal & Rohlf, 1995). Los resultados por tratamiento son presentados como media \pm ES, de acuerdo a Fotedar (2004). Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significación del 95%, mediante el programa Statistica 6.0, StatSoft Inc.

3.4 Resultados

3.4.1 Supervivencia y crecimiento

En el **Experimento 1** y **2** se obtuvieron resultados similares relativos a la supervivencia y crecimiento de los animales, que se detallan a continuación.

La supervivencia, peso corporal, incremento de peso (IP) y tasa de crecimiento específica (TCE) finales fueron similares ($p>0,05$) en ambos tratamientos (Fig. 3.4; Tabla 3.1). El IP y la TCE tendieron a ser menores a lo largo de todo el periodo experimental en el **Experimento 1** respecto al **Experimento 2**, lo cual se refleja en curvas similares de peso corporal (Fig. 3.4).

Tampoco se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre ambos tratamientos en las variables morfométricas registradas (Tabla 3.2). El ancho relativo del pleon, sin embargo, fue significativamente mayor en los machos control respecto a los machos ablacionados ($p=0,006$), pero sólo en el **Experimento 1** (Tabla 3.2).

Tabla 3.1. Efecto de la ablación de la GA sobre los parámetros reproductivos y de crecimiento en machos de *C. quadricarinatus* al término del periodo experimental.

Parámetro	Experimento 1		Experimento 2	
	C	AGA	C	AGA
Número inicial	18	17	12	15
Número final	14	9	9	9
Supervivencia (%)	77,78 ^a	52,94 ^a	75 ^a	60 ^a
Peso inicial (g)	3,09 ± 0,51 ^a	2,72 ± 0,19 ^a	1,85 ± 0,02 ^a	1,85 ± 0,03 ^a
Peso final (g)	20,79 ± 3,43 ^a	22,00 ± 4,63 ^a	20,24 ± 4,62 ^a	20,69 ± 1,94 ^a
IP (%)	584,33 ± 220,41 ^a	656,98 ± 88,89 ^a	993,07 ± 234,27 ^a	1016,98 ± 113,70 ^a
TCE (%/day)	0,63 ± 0,10 ^a	0,67 ± 0,04 ^a	0,75 ± 0,07 ^a	0,76 ± 0,03 ^a
IGS (%)	-	-	1,16 ± 0,24 ^a	1,40 ± 0,06 ^a
Número de SC dentro del VDD	104,30 ± 6,46 ^a	225,44 ± 111,22 ^a	159,11 ± 29,38 ^a	157,72 ± 43,33 ^a
PLM (%)	56,35 ± 3,04 ^a	46,14 ± 7,31 ^a	56,34 ± 13,26 ^a	49,18 ± 2,09 ^a
PMRP (%)	78,57 ± 13,33 ^a	88,89 ± 11,11 ^a	77,78 ± 11,11 ^a	88,89 ± 11,11 ^a

Nota: Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos Control (C) y Andrectomía (AGA) dentro de cada Experimento. IGS: índice gonadosomático, IP: incremento de peso, PMRP: proporción de machos con *red patch*, SC: secciones de cordón espermático; SPZ: espermatozoides, TCE: tasa de crecimiento específica, VDD: vaso deferente distal. El valor de cada variable presentado en la tabla corresponde al promedio de los 3 valores medios obtenidos en las 3 réplicas (acuarios) de cada grupo experimental. La supervivencia fue analizada mediante la prueba exacta de Fisher, mientras que el resto de las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p>0,05$).

Tabla 3.2. Efecto de la ablación de la GA sobre las variables morfométricas de machos de *C. quadricarinatus* al término del periodo experimental.

Parámetro	Experimento 1		Experimento 2	
	C	AGA	C	AGA
LC (mm)	44,40 ± 1,88 ^a	45,76 ± 3,05 ^a	44,65 ± 3,16 ^a	46,06 ± 1,00 ^a
LPC (mm)	31,81 ± 1,66 ^a	31,84 ± 2,07 ^a	31,39 ± 2,87 ^a	31,93 ± 0,44 ^a
PRP (%)	29,93 ± 1,15 ^a	29,03 ± 0,68 ^a	29,00 ± 0,81 ^a	29,90 ± 0,17 ^a
ARP (%)	39,48 ± 0,56 ^a	37,92 ± 0,38 ^b	40,00 ± 0,66 ^a	39,92 ± 0,34 ^a
LQ (mm)	30,67 ± 3,30 ^a	30,12 ± 4,41 ^a	31,26 ± 2,80 ^a	32,59 ± 1,24 ^a
AQ (mm)	4,82 ± 0,75 ^a	4,90 ± 1,20 ^a	9,30 ± 1,32 ^a	9,39 ± 0,39 ^a
AIRQ (%)	28,52 ± 2,32 ^a	29,43 ± 3,06 ^a	29,66 ± 1,62 ^a	28,83 ± 1,09 ^a
PRQ (%)	4,10 ± 1,22 ^a	3,87 ± 1,64 ^a	4,15 ± 0,63 ^a	4,17 ± 0,60 ^a
LRRP (%)	50,12 ± 3,60 ^a	42,76 ± 16,18 ^a	45,47 ± 4,28 ^a	52,37 ± 11,03 ^a

Nota: Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos Control (C) y Andrectomía (AGA) dentro de cada Experimento. AQ: ancho de las quelas, ARP: ancho relativo del pleon, AIRQ: alto relativo de las quelas, LC: largo del cefalotórax, LPC: largo postorbital del cefalotórax, LQ: largo de las quelas, LRRP: largo relativo del *red patch*, PRP: peso relativo del pleon, PRQ: peso relativo de las quelas. El valor de cada variable presentado en la tabla corresponde al promedio de los 3 valores medios obtenidos en las 3 réplicas (acuarios) de cada grupo experimental. Todas las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$).

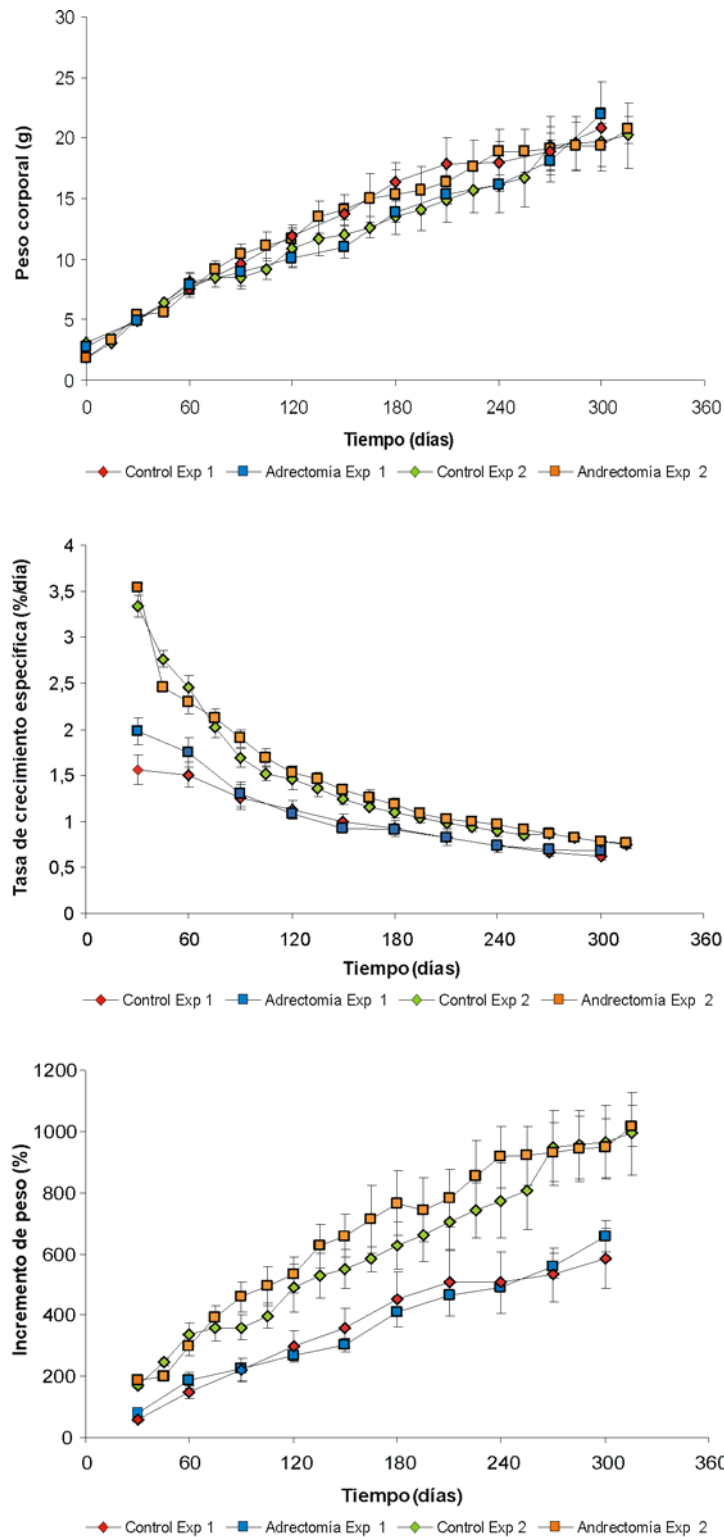


Fig. 3.4. Peso corporal (media \pm ES), Tasa de crecimiento específica (media \pm ES) e Incremento de peso acumulado (media \pm ES) de machos de *C. quadricarinatus* durante un periodo de 300 días (**Experimento 1**) o 315 días (**Experimento 2**) luego de remover el quinto par de pereiópodos (Control) o el quinto par de pereiópodos junto con la GA (Andrectomía). Las comparaciones se realizaron entre tratamientos dentro de cada Experimento, al término del periodo experimental.

3.4.2 Caracteres sexuales secundarios

3.4.2.1 Experimento 1

Todos los machos control, excepto un caso, regeneraron completamente los pereiópodos del quinto par hacia el día 30 de experimentación, y presentaron *appendices masculinae* (Fig. 3.5A; Tabla 3.3). El desarrollo de los órganos copuladores fue asimétrico en el 28,6% de los casos (Fig. 3.5B).

Los machos ablacionados (machos AGA) comenzaron a regenerar uno o ambos pereiópodos del quinto par a partir del día 30 de comenzado el ensayo (Tabla 3.3). Sólo el 33,3% de los machos desarrollaron gonoporos masculinos, pero en la base de un único pereiópodo del quinto par, nunca en la base de ambos; el resto de los animales AGA no desarrollaron aberturas genitales de ningún tipo ni *appendices masculinae* (Figs. 3.5D y 3.5E). También se observó la hipertrofia de la cuarta coxa en el 22,2% de los casos (Fig. 3.5F).

Por otro lado, el endopodito y exopodito del primer y segundo par de pleópodos fueron similares en tamaño para ambos grupos experimentales, y las sedas presentes en los endopoditos fueron plumosas en todos los casos.

El *red patch* comenzó a diferenciarse a partir del día 30 en ambos grupos experimentales (peso medio: $4,92 \pm 0,03$ g) (Tabla 3.3).

3.4.2.2 Experimento 2

Todos los machos control regeneraron completamente los pereiópodos del quinto par hacia el día 100, pero sólo el 77,8% de los animales presentaron *appendices masculinae* (Fig. 3.5A; Tabla 3.4). El restante 22,2% presentó *appendices masculinae* en la base de uno de los pereiópodos del quinto par y gonoporos masculinos en el lado opuesto hasta el final del experimento (Tabla 3.4). El desarrollo de los *appendices masculinae* fue asimétrico en el 44,4% de los machos control (Fig. 3.5B).

La mayoría de los machos andrectomizados, por su parte, no regeneró el quinto par de pereiópodos (Fig. 3.5C), mientras que un pequeño porcentaje regeneró sólo una de las patas caminadoras del quinto par hacia el día 30 (Tabla 3.4). Los animales de este grupo no presentaron aberturas genitales ni *appendices masculinae* (Fig. 3.5D; Tabla 3.4). En el 18,2% de los machos AGA se observó una cuarta coxa hipertrofiada con una abertura posterior y el quinto pereiópodo regenerado de manera anormal (Fig. 3.5F).

Por otro lado, y al igual que en el **Experimento 1**, el endopodito y exopodito del primer y segundo par de pleópodos fueron similares en tamaño para ambos grupos experimentales, y las sedas presentes en los endopoditos fueron plumosas en todos los casos.

El *red patch* comenzó a diferenciarse a partir del día 60 en ambos grupos experimentales (peso medio: $7,76 \pm 1,11$ g) (Tabla 3.4).

Tabla 3.3. Efecto de la ablación de la GA sobre los caracteres sexuales secundarios en machos de *C. quadricarinatus* a lo largo de un periodo experimental de 300 días (**Experimento 1**).

Característica	Tiempo (días)									
	30		60		90		120		300	
	AGA (N=10)	C (N=18)	AGA (N=10)	C (N=17)	AGA (N=10)	C (N=17)	AGA (N=10)	C (N=17)	AGA (N=9)	C (N=14)
Regeneración completa de un pereiópodo del quinto par (%)	50	5,9	80	5,9	80	5,9	70	0	55,6	0
Regeneración completa de ambos pereiópodos del quinto par (%)	10	94,1	10	94,1	10	94,1	20	100	33,3	100
Desarrollo del <i>red patch</i> (%)	20	33,3	30	44,4	30	64,7	40	70,6	88,9	78,6
Presencia de gonoporos masculinos (%)	0	100	0	100	0	100	0	100	33,3	100
Presencia de un <i>appendix masculina</i> (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia de ambos <i>appendices masculinae</i> (%)	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100

Tabla 3.4. Efecto de la ablación de la GA sobre los caracteres sexuales secundarios en machos de *C. quadricarinatus* a lo largo de un periodo experimental de 300 días (**Experimento 2**).

Característica	Tiempo (días)									
	30		60		90		120		300	
	AGA (N=11)	C (N=9)	AGA (N=11)	C (N=9)	AGA (N=11)	C (N=9)	AGA (N=11)	C (N=9)	AGA (N=9)	C (N=9)
Regeneración completa de un pereiópodo del quinto par (%)	27,3	33,3	27,3	11,1	27,3	11,1	27,3	0	27,3	0
Regeneración completa de ambos pereiópodos del quinto par (%)	0	66,7	0	88,9	0	88,9	0	100	0	100
Desarrollo del <i>red patch</i> (%)	0	0	27,3	11,1	54,6	11,1	63,6	77,8	88,9	77,8
Presencia de gonoporos masculinos (%)	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
Presencia de un <i>appendix masculina</i> (%)	0	33,3	0	33,3	0	33,3	0	22,2	0	22,2
Presencia de ambos <i>appendices masculinae</i> (%)	0	66,7	0	66,7	0	66,7	0	77,8	0	77,8

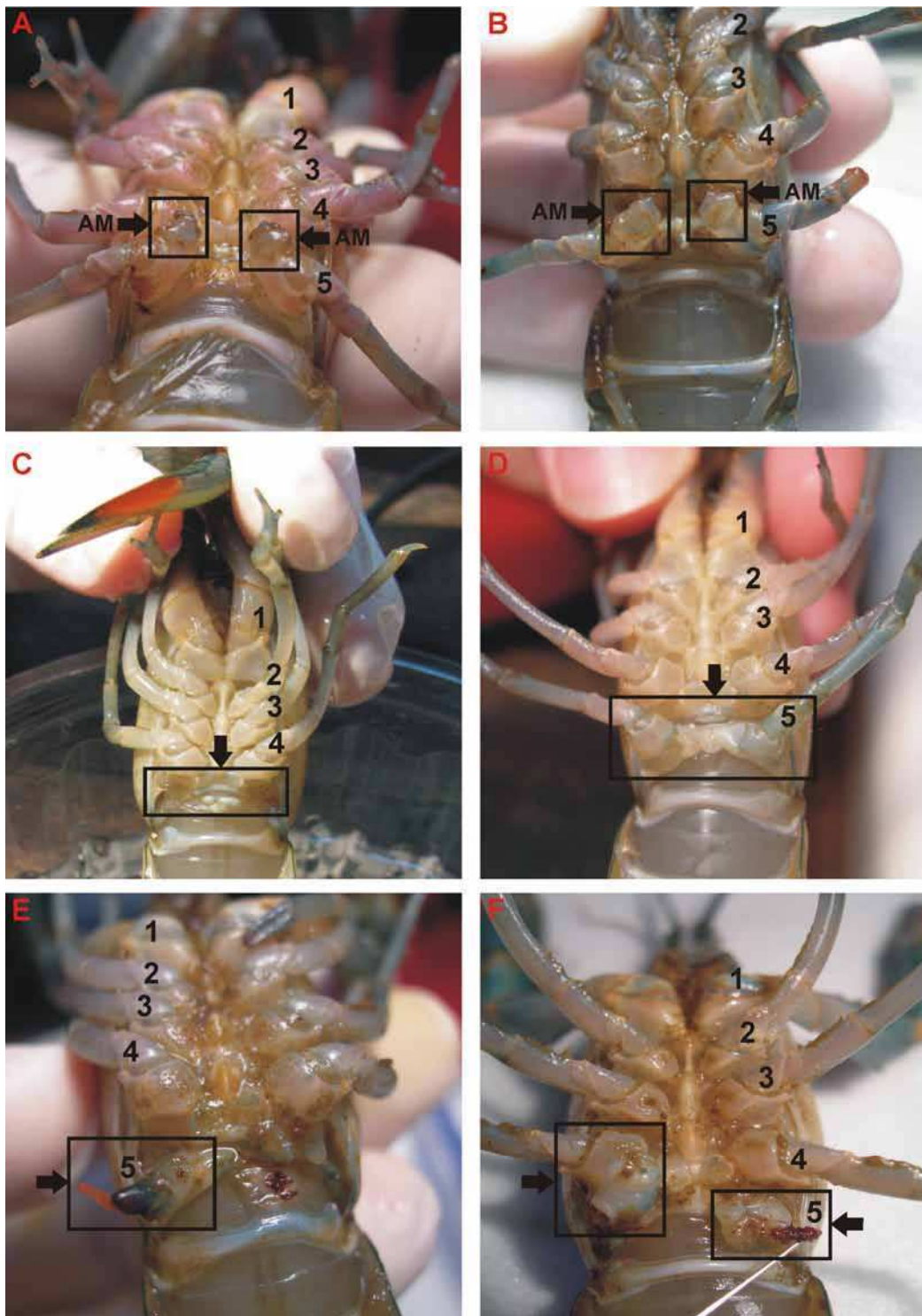


Fig. 3.5. Morfología de los caracteres sexuales secundarios en machos de *C. quadricarinatus*. (A) y (B) *Appendices masculinae* elongados en machos control: (A) *appendices masculinae* simétricos; (B) *appendices masculinae* asimétricos. (C), (D), (E) y (F) Alteraciones anatómicas en machos AGA luego de la ablación de la GA: (C) ausencia del quinto par de pereiópodos; (D) regeneración de ambos pereiópodos del quinto par sin desarrollo de gonoporos masculinos ni *appendices masculinae*; (E) regeneración anormal del quinto pereiópodo derecho con un gonoporo masculino; (F) regeneración anormal del quinto pereiópodo izquierdo e hipertrofia de la cuarta coxa derecha con un orificio posterior. AM: *appendices masculinae*.

3.4.3 Sistema reproductor

En el **Experimento 1** y **2** se obtuvieron resultados similares relativos a la morfología del sistema reproductor, los cuales se detallan a continuación.

La ablación de la GA no indujo la feminización de los caracteres sexuales primarios. En este sentido, se observó en ambos grupos experimentales un desarrollo normal del sistema reproductor masculino (Fig. 3.6A), excepto por dos machos andrectomizados que carecían de las porciones media y distal del VD izquierdo (Figs. 3.6B y 3.6C).

El tamaño relativo de los testículos no difirió cualitativamente entre tratamientos. El análisis histológico de los mismos mostró una estructura normal de los lóbulos testiculares en ambos grupos experimentales. Se observó la presencia tanto de estadios tempranos como de estadios avanzados de la espermatogénesis, siendo la proporción de lóbulos testiculares maduros (PLM) similar en los machos ablacionados y en los machos control ($p > 0,05$; Tabla 3.1).

En cuanto al VD, los machos control presentaron las siguientes características histológicas de la porción distal (VDD): (1) epitelio compuesto por una monocapa de células estrechamente adherida a una gruesa capa muscular; (2) capa secundaria del espermátforo compuesta de una matriz homogénea y gotas citoplasmáticas de un tamaño aproximadamente similar, ambos componentes distribuidos de manera uniforme; y (3) distribución uniforme de las secciones de cordón espermático, todas ellas conteniendo espermatozoides (Figs. 3.7A y 3.7B).

En los animales ablacionados se observó un notable incremento de tamaño del VDD desde un punto de vista macroscópico (Figs. 3.6B-E). Asimismo, se detectaron las siguientes anomalías desde un punto de vista histológico: (1) epitelio claramente

desorganizado, con actividad secretora aumentada; (2) en algunas regiones de la pared epitelio separado del tejido conectivo que rodea las fibras musculares; y (3) presencia de hemocitos en el espacio definido por dicha separación, los cuales fueron identificados de acuerdo a la descripción realizada por Martin & Hose (1992) (Figs. 3.7C-F). Por otro lado, la capa secundaria del espermatóforo presentó tres tipos principales de alteraciones: (1) distribución heterogénea de sus dos componentes; (2) presencia de gotas citoplasmáticas de diferente tamaño, o restos de las mismas; y (3) ausencia de las gotas citoplasmáticas (Figs. 3.8A-C). En cuanto a las secciones de cordón espermático en el VDD, se observaron 3 alteraciones principales: (1) una distribución heterogénea, con ciertas regiones carentes de cordón espermático; (2) ausencia de espermatozoides en algunas secciones; y (3) coalescencia de algunas secciones (Figs. 3.8C y 3.8-D).

Por su parte, el análisis cuantitativo mostró que el número de secciones de cordón espermático dentro del VDD fue similar en los machos control y los machos ablacionados ($p>0,05$; Tabla 3.1).

Por último, el índice gonadosomático (IGS) calculado sólo en el **Experimento 2** no difirió significativamente entre los grupos experimentales, si bien en los machos AGA tendió a ser mayor que en los machos C ($p>0,05$; Tabla 3.1).

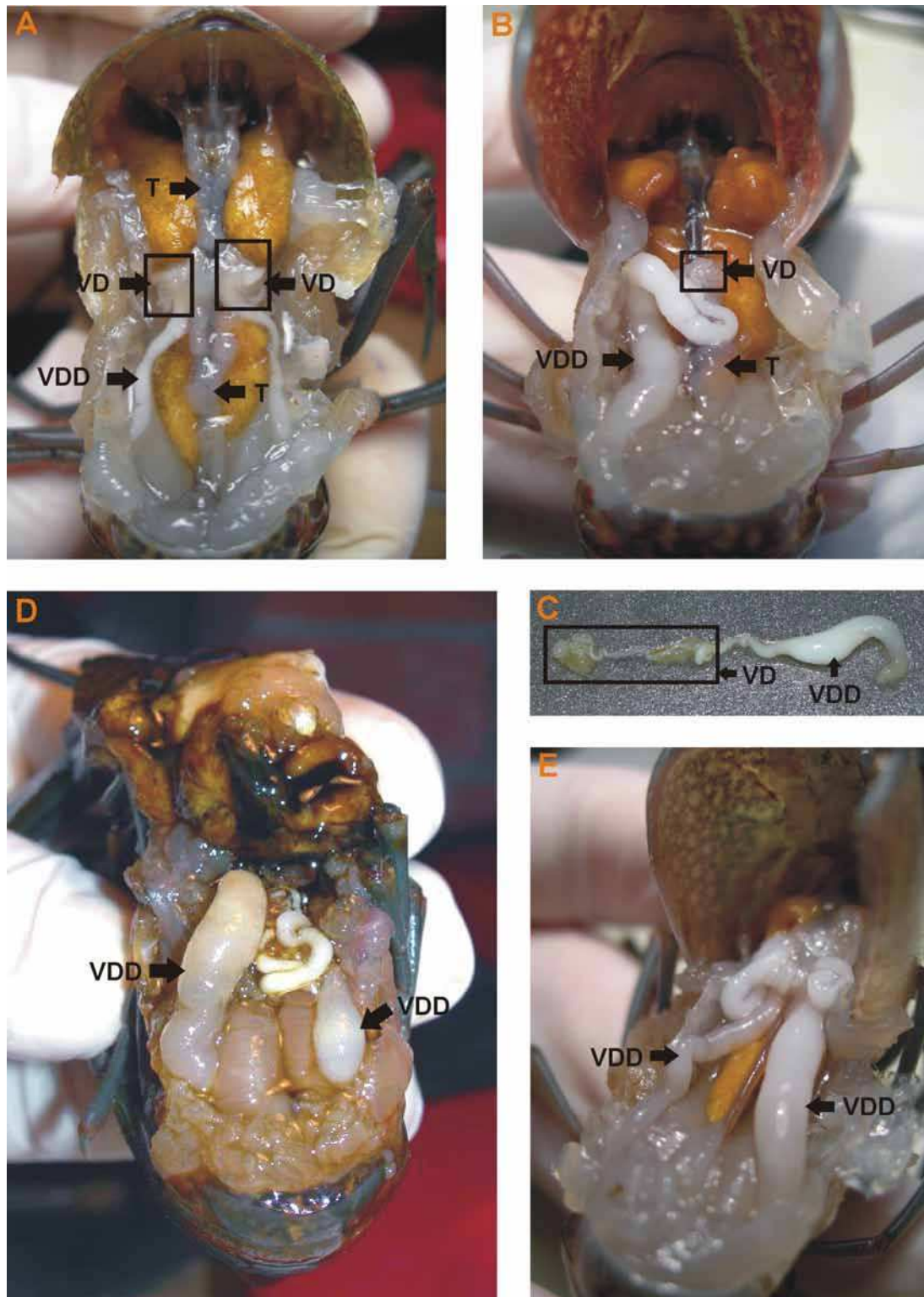


Fig. 3.6. Morfología del sistema reproductor en machos de *C. quadricarinatus*. (A) Estructura normal del sistema reproductor masculino. (B), (C), (D) y (E) Estructura anormal del sistema reproductor en machos AGA: (B) y (C) ausencia de la porción distal y media del vaso deferente izquierdo, y agrandamiento del VDD derecho; (D) y (E) agrandamiento de uno o ambos VDD. T: testículo, VD: porción proximal y media del vaso deferente, VDD: porción distal del vaso deferente.

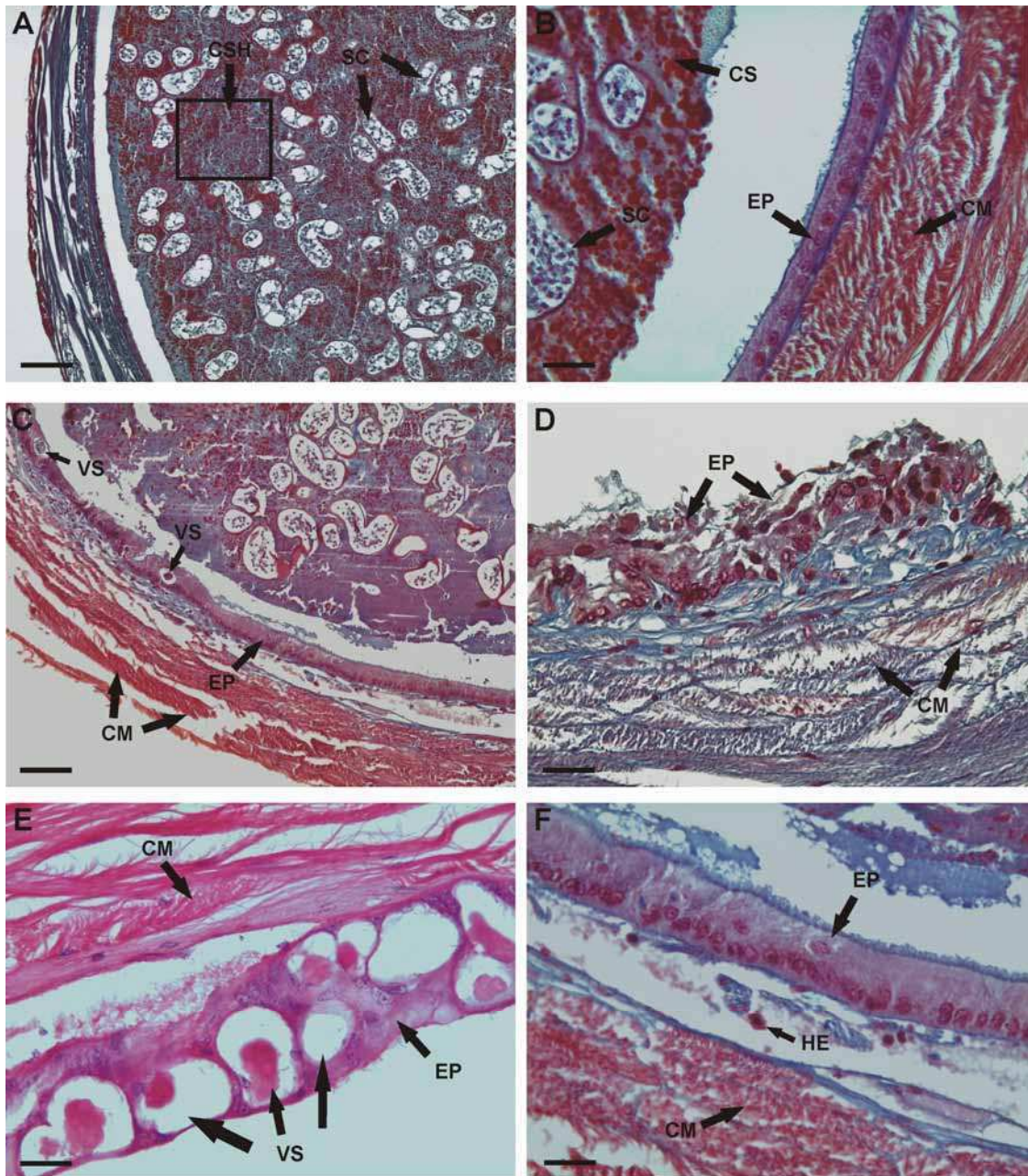


Fig. 3.7. Estructura histológica del VDD de machos de *C. quadricarinatus*, coloreado con Tricrómico de Mason y Hematoxilina-Eosina. (A) Vista general y (B) detalle del VDD de un macho control, mostrando la estructura normal del epitelio, la capa muscular, el cordón espermático y la capa secundaria del espermátforo. (C) Vista general del VDD de un macho AGA, mostrando algunas “vacuolas” de secreción anormales en el epitelio, y la separación entre el epitelio y la capa muscular. (D), (E) y (F) Detalles de las alteraciones observadas en el epitelio del VDD de un macho AGA: (D) epitelio desorganizado; (E) presencia de “vacuolas” de secreción anormales; (F) presencia de un hemocito en el espacio entre el epitelio y la capa muscular. Barras de escala: (A), (C): 45 μm ; (B), (D), (E), (F): 10 μm . CM: capa muscular, CS: capa secundaria del espermátforo, CSH: capa secundaria del espermátforo homogénea, EP: epitelio, HE: hemocito, SC: secciones de cordón espermático, VS: “vacuola” de secreción.

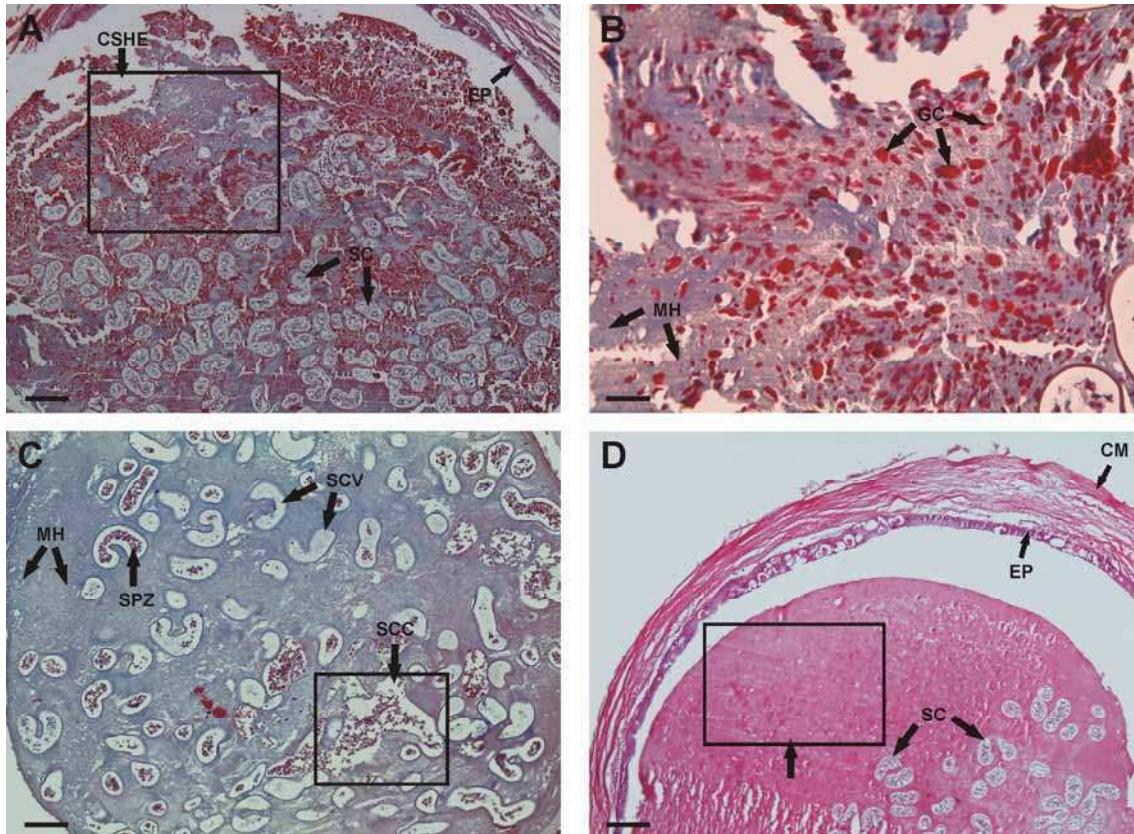


Fig. 3.8. Estructura histológica del VDD de machos de *C. quadricarinatus* andrectomizados, coloreado con Tricrómico de Mason y Hematoxilina-Eosina. (A), (B) y (C) Alteraciones observadas en la capa secundaria del espermatóforo: (A) distribución heterogénea de las gotas citoplasmáticas (coloreadas de rojo) y la matriz homogénea (coloreada de celeste); (B) tamaño heterogéneo de las gotas citoplasmáticas; (C) ausencia de las gotas citoplasmáticas. (C) y (D) Alteraciones observadas en la distribución y estructura de las secciones de cordón espermático: (C) algunas secciones coalescentes y otras secciones sin espermatozoides; (D) región en el VDD sin secciones de cordón espermático (flecha). Barras de escala: (A), (C), (D): 45 μm ; (B): 10 μm . CM: capa muscular, CSHE: capa secundaria del espermatóforo heterogénea, EP: epitelio, GC: gotas citoplasmáticas, MH: matriz homogénea, SC: secciones de cordón espermático, SCC: secciones de cordón espermático coalescentes, SCV: secciones de cordón espermático vacías, SPZ: espermatozoides.

3.5 Discusión

La presente tesis constituye el primer trabajo en el que se investigaron los efectos a largo plazo de la ablación de la GA sobre el crecimiento y aspectos reproductivos en machos de *C. quadricarinatus*, los cuales carecen de cualquier componente femenino en su sistema reproductor.

Los resultados obtenidos muestran que los machos ablacionados no desarrollaron ovarios. Por el contrario, presentaron un sistema reproductor masculino bien diferenciado, si bien se observaron algunas anomalías macroscópicas e histológicas en el VDD. Adicionalmente, la mayoría de los machos AGA no desarrollaron gonoporos masculinos ni *appendices masculinae*.

Khalaila et al. (1999) y Barki et al. (2003) trabajaron con individuos intersexo de la misma especie, los cuales presentan aberturas genitales tanto femeninas como masculinas y son encontrados tanto en la naturaleza como en los sistemas de cultivo (Medley et al., 1994; Curtis & Jones, 1995; Sagi et al., 1996a, 2002; Vazquez & López Greco 2007). Los autores obtuvieron interesantes resultados luego de estudiar los efectos de la ablación de la GA sobre la morfología del sistema reproductor de intersexos funcionalmente machos. Los mismos presentan un ovario inmaduro (detenido en vitelogénesis primaria) de un lado y testículo y VD con espermátóforo del lado contrario (Sagi et al., 1996a; Vazquez, 2011). En ambos estudios, la andrectomía provocó un incremento del IGS y del diámetro oocitario en el componente femenino del sistema reproductor, además de la activación de la vitelogénesis.

Estos resultados, junto con los obtenidos en el presente trabajo, sugieren que la ausencia de la GA eliminaría la inhibición sobre la maduración del sistema reproductor

femenino, pero no provocaría la reversión del sistema reproductor masculino hacia uno femenino cuando el primero ya se ha diferenciado.

En otra especie de crustáceo decápodo, el camarón de agua dulce *M. rosenbergii*, la ablación de la GA realizada en un estadio de desarrollo muy temprano (postlarva) llevó a una reversión sexual completa de macho a hembra (Nagamine et al., 1980a; Sagi & Aflalo, 2005; Aflalo et al., 2006). Sin embargo, la ablación realizada en estadios de desarrollo más tardíos llevó a una feminización nula del sistema reproductor masculino, si bien inhibió el desarrollo de ciertos caracteres sexuales secundarios (Nagamine et al., 1980a). Esto sugiere que la GA sería crucial para el desarrollo de los caracteres sexuales primarios en un estadio temprano del desarrollo, luego del cual sería responsable del desarrollo y/o mantenimiento de ciertos caracteres sexuales secundarios, tales como los gonoporos masculinos y los órganos copuladores, como se ha demostrado también para las langostas de agua dulce *C. destructor* (Fowler & Leonard, 1999) y *P. clarkii* (Taketomi et al., 1996). De este modo, el efecto de la ablación de la GA en estas especies y en *C. quadricarinatus* podría depender, en principio, del momento durante el desarrollo en el que se lleve a cabo, como se observó respecto a la diferenciación del *red patch* en la presente tesis (ver más adelante).

Las alteraciones histológicas observadas en los machos ablacionados indican por su parte, que la glándula estaría también involucrada en el mantenimiento de la estructura del sistema reproductor a lo largo de la vida del animal, particularmente del VDD, y en la organización estructural del espermatóforo. Algunas de las alteraciones del VDD coinciden con aquellas observadas previamente por Bugnot & López Greco (2009b), quienes estudiaron la estructura del sistema reproductor en machos adultos de *C. quadricarinatus* criados en cautiverio. Las autoras detectaron también en machos anormales una actividad secretora aumentada del epitelio del VDD, junto con la

presencia de hemocitos granulares y hialinos. En cuanto a la organización del espermátforo, la ausencia y estructura anormal de las gotas citoplasmáticas (uno de los dos componentes de la capa secundaria) observada en los machos AGA posee importantes implicancias, dado que las mismas serían responsables, al menos en parte, de las propiedades adhesivas del espermátforo, el cual debe adherirse inmediatamente después del apareamiento al esterno de la hembra para asegurar la fertilización de los oocitos (López Greco & Lo Nostro, 2008). La presente tesis constituye, de esta manera, el primer registro de una relación potencial entre la GA y la formación del espermátforo en los machos de *C. quadricarinatus*.

Por otra parte, se observó una estructura completamente normal del testículo en los machos andrectomizados. La presencia de espermatozoides tanto en los lóbulos testiculares como en el VDD sugiere que la eliminación de la GA no tendría efecto sobre el inicio y compleción de la espermatogénesis. Esto concuerda con resultados obtenidos por Payen & Amato (1978), quienes observaron en algunos Reptantia que la espermatogénesis puede realizarse en ausencia de la hormona producida por la GA si este proceso fue previamente iniciado por acción de la misma (como habría ocurrido en el presente trabajo, dado que la ablación de la GA fue realizada en machos que ya presentaban espermatozoides en el testículo). Asimismo, Nagamine et al. (1980a) y Sagi et al. (1990) demostraron que la ablación de la GA en machos de *M. rosenbergii* no inhibe la espermatogénesis. Sin embargo, en el presente trabajo algunos machos AGA presentaron en el VDD regiones del cordón espermático sin espermatozoides, lo cual sugiere que la tasa de liberación de espermatozoides desde el testículo hacia el VD (Khalaila et al., 1999) o la intensidad de la espermatogénesis (Charniaux-Cotton & Payen, 1988) podrían estar afectadas por la ablación de la GA.

En relación al IGS, la tendencia observada hacia un mayor valor en los machos AGA respecto a los control podría deberse con mayor probabilidad a una actividad secretora aumentada del epitelio que a una producción aumentada de espermatozoides. El valor de IGS obtenido en ambos tratamientos fue mayor que el reportado por Vazquez & López Greco (2010) para los machos en un estadio equivalente de desarrollo del sistema reproductor (peso: 6-20 g; LC: 27,64-48,51 mm); este resultado podría estar relacionado con el momento del ciclo anual en el que los animales fueron sacrificados, dado que Bugnot & López Greco (2009a) encontraron que el peso del sistema reproductor de los machos de *C. quadricarinatus* se incrementa en verano e invierno.

En cuanto a los caracteres sexuales secundarios, se observó en la presente tesis que si bien los machos ablacionados no desarrollaron gonoporos ni *appendices masculinae*, diferenciaron *red patch* y presentaron un crecimiento de las quelas de modo similar al de los machos control. El desarrollo de estos dos últimos caracteres no concuerda con los resultados obtenidos por Barki et al. (2003) y Manor et al. (2004), quienes demostraron que la presencia de GA (mediante su implantación) en juveniles hembra de la especie provoca el desarrollo de dichos caracteres sexuales secundarios. Sin embargo, Khalaila et al. (1999) no encontraron ningún tipo de alteración del *red patch* en intersexos ablacionados a lo largo de todo el periodo experimental (50 días). Más aún, en el laboratorio se han encontrado esporádicamente hembras funcionales con *red patch* en uno o ambos quelípedos (no publicado), previamente reportadas también por Thorne et al. (1989). Sobre esta base, pareciera que la presencia de la GA provocaría la diferenciación del *red patch*, y que su ausencia desde un determinado estadio de desarrollo no afectaría ni la diferenciación ni el mantenimiento de este carácter. Sin embargo, es importante recalcar que los machos ablacionados a una talla menor (**Experimento 2**) comenzaron a diferenciar este carácter más tardíamente que los

machos ablacionados del **Experimento 1**, resultado que indicaría un mayor efecto de la ablación de la GA cuando la misma se realiza más tempranamente en el desarrollo.

Por otro lado, aquellos caracteres asociados a la incubación de los huevos, tales como el ancho relativo del endopodito de los pleópodos, y la estructura de las sedas del endopodito, no difirieron significativamente entre los grupos experimentales. Tampoco se observó un mayor ancho del pleon (carácter femenino) en los animales ablacionados. Resultados similares fueron obtenidos en machos andrectomizados de *M. rosenbergii*, los cuales desarrollaron ovario y gonoporos femeninos luego de la ablación de la GA, pero no desarrollaron cámara incubadora ni sedas reproductivas (Nagamine et al, 1980a). Se ha sugerido que durante la vitelogénesis secundaria el ovario secreta una hormona (hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis, VSOH) que promueve la formación de caracteres sexuales externos (Charniaux-Cotton & Payen, 1985). Esto es consistente con el desarrollo de caracteres maternos inducido por la implantación de tejido ovárico maduro en machos andrectomizados de *M. rosenbergii* (Nagamine & Knight, 1987), y en crustáceos anfípodos (Charniaux-Cotton, 1952, 1953). Asimismo, Sagi et al. (1996b) encontraron en hembras de *C. quadricarinatus* una correlación entre el grado de maduración ovárica y cambios en el tamaño y estructura de los pleópodos, asociados a la incubación de los huevos. En el presente trabajo, no hubo desarrollo de tejido ovárico en los machos andrectomizados, y por lo tanto la morfología de los pleópodos podría haber resultado de la ausencia de dicho/s factor/es ovárico/s. Sin embargo, esta afirmación requiere de estudios futuros que determinen la existencia real de la/s hormona/s ovárica/s en la especie.

El conjunto de resultados descriptos previamente, lleva a **rechazar la hipótesis de trabajo 3**, dado que la ablación de la GA no provocó la feminización del sistema reproductor masculino ni de los caracteres sexuales secundarios de *C. quadricarinatus*,

si bien la regeneración de los gonoporos masculinos y de los *appendices masculinae* se vio afectada por dicho procedimiento quirúrgico. Dado que no se obtuvieron “neohembras”, **no fue posible poner a prueba la hipótesis de trabajo 5.**

Con respecto al crecimiento somático, se ha hipotetizado que el crecimiento diferencial entre sexos de esta especie se debe a una mayor inversión de energía realizada por las hembras en la maduración ovárica que aquella realizada por los machos en la espermatogénesis, y no a la competencia por los recursos (Manor et al., 2004; Capítulo 2 de esta tesis). También se ha propuesto que la GA induce un mayor crecimiento somático en machos por acción directa de una hormona (Fowler & Leonard, 1999; Manor et al., 2004). Si éste hubiera sido el caso, entonces los machos ablacionados deberían haber presentado valores menores de crecimiento, como se ha observado en machos ablacionados de *M. rosenbergii* (Sagi et al., 1990, 1997). Sin embargo, en el presente trabajo no se encontraron diferencias en la TCE e IP entre los machos control y los ablacionados, lo cual estaría indicando que en *C. quadricarinatus* la GA tendría un efecto indirecto sobre el crecimiento, mediante la inhibición del desarrollo y maduración ovárica. Como se mencionó previamente, la diferenciación del sistema reproductor fue similar en los machos andrectomizados y en los machos control. Por lo tanto, es esperable que la inversión energética en el mantenimiento de la estructura del mismo haya sido similar en ambos grupos experimentales, lo cual habría llevado a un crecimiento somático equivalente. Este análisis se ve sustentado por estudios previos en los que se implantó GA en juveniles hembra de *C. quadricarinatus*, y se mostró una disminución en la expresión del gen de la vitelogenina y en los niveles de vitelogenina en hemolinfa, seguidos de un incremento en la tasa de crecimiento (Barki et al., 2003; Manor et al., 2004).

El hecho de que el crecimiento fuera mayor en los animales pertenecientes al **Experimento 2** respecto a aquellos pertenecientes al **Experimento 1** podría explicarse por la talla inicial de los machos (mayor en el **Experimento 1**), dado que en las langostas de agua dulce la frecuencia de los eventos de muda y la tasa de crecimiento disminuyen al incrementarse la talla (Hartnoll, 1982, 1983; Reynolds, 2002).

A partir de los resultados descritos previamente, **se rechaza la hipótesis de trabajo 4.**

La manipulación de la GA en especies de crustáceos decápodos de valor económico y con crecimiento diferencial de los sexos pareciera ser una manera interesante de producir mayores beneficios y ganancias relacionados con su cultivo (Sagi et al., 1986; Curtis & Jones, 1995; Karplus et al., 1995; Sagi et al., 1997; Lawrence et al., 2000; Jones & Ruscoe, 2001; Sagi & Aflalo, 2005; Rodgers et al., 2006). En particular, la tecnología de “neo-hembras” desarrollada en el camarón de agua dulce *M. rosenbergii* representaría una manera directa de obtener CMM (Sagi & Cohen, 1990; Lawrence et al., 2000; Nair et al., 2006), sin los costos y problemas asociados con el sistema de sexado manual (Curtis & Jones, 1995; Sagi & Aflalo, 2005; Aflalo et al., 2006; Rungsin et al., 2006).

Dado los resultados obtenidos en el presente trabajo, dicha tecnología no parece ser aplicable en *C. quadricarinatus*, ya que los machos ablacionados no revirtieron a hembras. Pattillo (2010), quien ablacionó juveniles III (juveniles recién independizados de la madre y no diferenciados sexualmente) de la especie, tampoco logró la reversión sexual. El crecimiento y supervivencia de los juveniles ablacionados no difirió de los de los animales control. Sin embargo, el autor observó un efecto de la ablación de la GA sobre el desarrollo de los gonoporos masculinos y órganos copuladores. Estos resultados sugieren que aún realizando la ablación en un estadio de desarrollo muy

temprano la reversión de los caracteres sexuales primarios es muy difícil de lograr en la especie, lo cual concuerda a su vez con el hecho de que hembras implantadas con GA no desarrollaron testículo ni VD (Khalaila et al., 2001; Manor et al., 2004). Además, debe tenerse en cuenta que la reversión sexual completa en *M. rosenbergii* sólo se obtuvo luego de realizar la andrectomía en un estadio de desarrollo más temprano (estadio de postlarva que precede al de juvenil) que aquel posible en *C. quadricarinatus*, dado que dicho camarón tiene, a diferencia de la especie en estudio, desarrollo indirecto. Aún así, la ablación de la GA causó una alta mortalidad y resultó en un bajo porcentaje de “neo-hembras” (entre 1 y 27%) (Aflalo et al., 2006; Rungsin et al., 2006). Teniendo en cuenta estas limitaciones, se necesitaría probablemente una gran cantidad de machos genéticos de *C. quadricarinatus* en un estadio de desarrollo muy temprano (previo al de JIII) para alcanzar el objetivo deseado.

CAPITULO 4

Efecto de la administración prolongada de dopamina sobre la maduración ovárica y el crecimiento somático de las hembras de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

4.1 Introducción

La dopamina (DA) es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso y hemolinfa de numerosas especies de crustáceos decápodos (Elofson et al., 1982; Elekes et al., 1988; Barthe et al., 1989; Mercier et al., 1991; Cournil et al., 1994; Wood & Derby, 1996; Tierney et al., 2003; Tinikul et al., 2009a). Se ha demostrado que la DA modula variadas funciones fisiológicas, tales como la liberación de hormonas concentradoras de pigmentos (Fingerman & Fingerman, 1977; Quackenbush & Fingerman, 1984; Kulkarni & Fingerman, 1986), y la liberación de la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) desde el complejo órgano X-glándula del seno (Lüschen et al., 1993; Kuo et al., 1995; Sarojini et al., 1995c; Kuo & Yang, 1999).

La DA también parece modular ciertas funciones reproductivas, tales como la liberación de la hormona estimuladora de la vitelogénesis/gónada (GSH), secretada por el cerebro y el ganglio torácico (no identificada ni caracterizada hasta el momento), y la liberación de la hormona inhibidora de la vitelogénesis/gónada (GIH), producida y secretada por el complejo órgano X-glándula del seno (presente en el pedúnculo ocular) (Sarojini et al., 1995e; Fingerman, 1997).

La vitelogénesis es un proceso que ocurre durante el desarrollo y maduración ováricos de los crustáceos, y consta de dos fases: (1) la vitelogénesis primaria o previtelogénesis, que consiste en la producción endógena de glicoproteínas y lipoproteínas por parte de los oocitos llamados primarios (Charniaux Cotton & Payen, 1988); y (2) la vitelogénesis secundaria, de alta demanda energética. Esta última consiste en la síntesis endógena por parte de los oocitos primarios de la vitelogenina (precursora de la vitelina, la principal proteína del vitelo), y/o en su captación exógena cuando la misma es sintetizada fuera del ovario (en el hepatopáncreas en la mayoría de

las especies). La vitelogenina es luego modificada y transformada en una lipoglicocarotenoproteína y es almacenada en forma de plaquetas en el citoplasma (Subramonian, 2011). Esto determina un crecimiento exponencial de los oocitos, denominados secundarios.

Los estudios *in vivo* realizados en hembras del camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* demostraron que la inyección de DA disminuye la síntesis de vitelogenina y el diámetro oocitario medio (DOM), y prolonga el periodo de maduración ovárica (Chen et al., 2003; Tinikul et al., 2008, 2009b). Dado que la DA no fue detectada en los pedúnculos oculares, y que resultados similares se observaron en individuos de la misma especie aún luego de ablacionarles dichas estructuras (Chen et al., 2003), se sugirió que la DA ejercería su efecto mediante la inhibición de la liberación de GSH y no mediante la estimulación de la liberación de GIH. Sainath & Sreenivasula Reedy (2011) también observaron una disminución del índice gonadosomático (IGS), DOM y nivel de vitelogenina en el ovario luego de la administración de DA a hembras del cangrejo de agua dulce *Oziotelphusa senex senex*, pero sólo luego de la ablación de los pedúnculos oculares. Por otro lado, Tinikul et al. (2008) mostraron que los niveles de DA endógena en el cerebro, ganglio torácico y ovarios son máximos cuando el ovario se encuentra en estadio I/II y disminuyen a valores mínimos cuando los ovarios completan el proceso de maduración (estadio IV).

Estudios *in vivo* realizados en la langosta de agua dulce *Procambarus clarkii* también demostraron el efecto inhibitorio de la DA sobre la maduración ovárica (Sarojini et al. 1995d). En un estudio posterior realizado *in vitro* se sugirió como posible mecanismo de acción de la DA la inhibición de la liberación de GSH desde el cerebro y ganglio torácico (Sarojini et al. 1996).

Asimismo, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* evaluaron el efecto de la administración exógena de spiperona (antagonista de la DA) sobre el crecimiento ovárico en crustáceos decápodos, obteniendo, entre otros resultados, valores aumentados de IGS y de DOM (Cahansky et al., 2002; Rodríguez et al., 2002; Zapata et al., 2003; Alfaro et al., 2004).

El rol de la DA en los procesos reproductivos de crustáceos se ha demostrado también en machos de las especies *Uca pugilator* (Sarojini et al., 1995a), *P. clarkii* (Sarojini et al., 1995b) y *M. rosenbergii* (Poljaroen et al., 2011), en los que se observó que dicho neurotransmisor inhibe la maduración testicular.

El crecimiento diferencial de los sexos en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* podría deberse a una menor inversión de energía de los machos en la producción de espermatozoides que aquella de las hembras en la producción de oocitos secundarios (Hyatt, 1948; Dworschak, 1988; Fukui, 1988). Considerando asimismo que la maduración ovárica es un proceso que compite desde el punto de vista energético con el crecimiento somático (Conan, 1985; Hartnoll, 1985; Provenzano, 1985; Sokol, 1988; Nelson, 1991), entonces la inhibición del desarrollo gonadal podría resultar en valores incrementados del crecimiento en las hembras de esta especie.

En este sentido, la administración de hormonas y/o neuroreguladores en el alimento para inducir distintos procesos fisiológicos ha demostrado ser una herramienta disponible de interesantes resultados en camarones, cangrejos y langostas de agua dulce de importancia comercial (Laufer et al., 1998; Yano, 2000; Zapata et al., 2003; Cahansky et al., 2008). Particularmente, Zapata et al. (2003) obtuvieron resultados similares al administrar spiperona mediante su inyección y su incorporación en el alimento. Estos resultados convierten al alimento en una vía alternativa de

administración de hormonas/neuroreguladores en los sistemas de cultivo, presentando la ventaja de que puede aplicarse a gran escala y sin provocar estrés en los animales.

4.2 Objetivo

Evaluar el efecto de la administración prolongada de DA, mediante su inyección e inclusión en el alimento, sobre la maduración ovárica y el crecimiento somático de hembras de *C. quadricarinatus*.

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

► **Hipótesis 6:** *la inclusión de DA en el alimento de hembras juveniles inhibe la maduración ovárica, incrementando el crecimiento somático.*

► **Hipótesis 7:** *la inyección de DA en hembras juveniles inhibe la maduración ovárica, incrementando el crecimiento somático.*

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Obtención de los animales

Los juveniles utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos a partir de dos lotes de animales reproductores suministrados por el criadero Las Golondrinas, Entre Ríos, Argentina, en el año 2009 y 2010, respectivamente. Dichos lotes fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de laboratorio descritas en el capítulo 2. El número total de hembras ovígeras utilizadas en cada experimento fue de 6.

Cuando los juveniles alcanzaron un peso aproximado de 0,20 g fueron sexados manualmente y las hembras fueron seleccionadas y mantenidas bajo las mismas condiciones de calidad de agua, temperatura, fotoperiodo y alimentación descriptos para sus madres hasta el comienzo del experimento correspondiente.

4.3.2 Diseño experimental

4.3.2.1 Experimento 1: administración de DA a través del alimento

Se seleccionaron juveniles hembra de un peso de $4,25 \pm 0,11$ g, correspondiente a la talla mínima aproximada a partir de la cual las hembras comienzan a madurar sus ovarios, de acuerdo a Vazquez et al. (2008). Dichas hembras fueron asignadas al azar a uno de los siguientes tratamientos:

- *CONTROL (C)*: alimentación diaria con alimento balanceado Tetracolor, TETRA® y los fines de semana con *Elodea* sp.;
- *DOPAMINA (DOPA)*: alimentación 3 veces por semana con alimento balanceado Tetracolor, TETRA®, enriquecido con dopamina (DA, Sigma). El resto de los días las hembras fueron alimentadas con Tetracolor, TETRA®, y los fines de semana con *Elodea* sp. La DA fue ofrecida en una dosis de $2,5 \times 10^{-6}$ moles/animal, de acuerdo a trabajos previos (Chen et al., 2003). Luego de ser disuelta en solución fisiológica (SF) para langostas de agua dulce (conteniendo 12 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 1,99 g/l CaCl₂.H₂O, 0,31 g/l MgCl₂.6H₂O y 0,2 g/l NaHCO₃ (Van Harreveld, 1936)), la DA fue adicionada al alimento previamente humedecido. La mezcla resultante fue fraccionada nuevamente en pellets y secada en estufa a 40°C durante 24 horas.

En ambos tratamientos, el porcentaje de alimento suministrado equivalió al 2-10% del peso de los animales (Jones, 1997).

Los organismos fueron mantenidos en acuarios de vidrio de 60x40x30 cm, conteniendo 30L de agua corriente declorada bajo aireación continua. Tubos de PVC (10x2x2 cm) y trozos de red de tipo “cebollera” fueron ofrecidos como refugios. A lo largo del periodo experimental los refugios fueron reemplazados por tubos cilíndricos de PVC de mayor tamaño (5 cm de diámetro por 10 cm de largo), en función del crecimiento de los animales. El experimento fue llevado a cabo bajo condiciones constantes de fotoperiodo (14:10 hs luz:oscuridad) y temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$).

Se asignaron 4 réplicas (4 acuarios) por tratamiento, con 7 animales por réplica ($29,2 \text{ animales/m}^2$). Una vez por semana se limpió y renovó el volumen total de agua de cada acuario. Los animales de cada tratamiento fueron pesados (precisión: 0,01 g) y sexados cada 15 días, durante un total de 300 días. La mortalidad fue registrada diariamente.

Debido a que este experimento no arrojó los resultados esperados se decidió administrar la DA de manera más directa (mediante su inyección) en un nuevo experimento, el cual se detalla a continuación.

4.3.2.2 Experimento 2: administración de DA a través de su inyección

Se seleccionaron 3 grupos de juveniles hembra:

- GRUPO A: 42 hembras de un peso de $4,15 \pm 0,02 \text{ g}$
- GRUPO B: 36 hembras de un peso de $9,65 \pm 0,10 \text{ g}$
- GRUPO C: 24 hembras de un peso de $13,98 \pm 0,06 \text{ g}$

En primera instancia se realizó un experimento con el Grupo A (*Ensayo 1*). Como la mortalidad de las hembras no permitió continuar dicho experimento hasta la talla final deseada (coincidente con la talla final del **Experimento 1**), se realizó en una segunda instancia y una vez finalizado el Ensayo 1, un segundo experimento con el Grupo B (*Ensayo 2*), utilizando hembras de un peso inicial similar al peso final de las hembras del Ensayo 1. Con dicho ensayo se presentó el mismo problema de mortalidad de las hembras, con lo cual se debió realizar, una vez finalizado el Ensayo 2, un tercer experimento con el Grupo C (*Ensayo 3*), siguiendo el mismo criterio relativo a la talla inicial de las hembras utilizadas (Fig. 4.1). De este modo, los 3 ensayos realizados abarcaron un rango de pesos comprendido entre el peso mínimo aproximado a partir del cual las hembras comienzan a madurar sus ovarios (4-6 g) y el peso correspondiente a la madurez sexual temprana (18 g), de acuerdo a Vazquez et al. (2008).

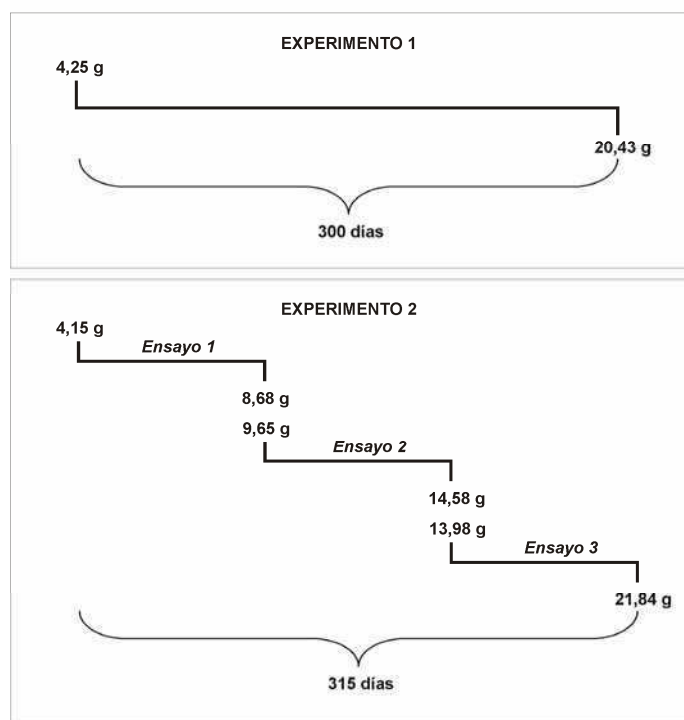


Fig 4.1. Esquema indicando la duración y tallas iniciales y finales de las hembras de *C. quadricarinatus* correspondientes al **Experimento 1** (administración de DA a través del alimento) y al *Ensayo 1*, *Ensayo 2* y *Ensayo 3* del **Experimento 2** (administración de DA mediante su inyección).

Debido a las limitaciones en la disponibilidad de animales, los 3 ensayos no fueron realizados de manera consecutiva y abarcaron distintas épocas del año y distintos años (*Ensayo 1*: entre febrero y mayo del 2010; *Ensayo 2*: entre julio y septiembre del 2010; *Ensayo 3*: entre julio y octubre del 2011). Por lo tanto, y debido a las posibles diferencias en los resultados dadas por dichos factores, las comparaciones para todas las variables fueron llevadas a cabo dentro de cada ensayo.

A continuación se describe el diseño experimental común a los 3 ensayos.

Dentro de cada grupo, las hembras fueron asignadas al azar a uno de los siguientes tratamientos:

- *CONTROL (C)*: inyección de 0,05 ml de SF por animal;
- *DOPAMINA (DOPA)*: inyección de DA (Sigma®) previamente disuelta en 0,05 ml de SF, en una dosis de $2,5 \times 10^{-6}$ moles/animal, de acuerdo a Chen et al. (2003).

Las hembras fueron inyectadas 2 veces por semana en la articulación entre la coxa del cuarto par de pereiópodos y el cefalotórax, utilizando jeringas para insulina de 1 ml (Bremen®). Luego de cada inyección, los animales presentaron ciertas alteraciones, tales como una disminución en la actividad locomotora, y un aumento del batido de los pleópodos. Dichas alteraciones desaparecían aproximadamente a los 15 minutos de realizada la inyección, y fueron previamente reportadas en otras especies de crustáceos decápodos (Martinez et al., 1988; Barthe et al., 1989).

Los organismos fueron mantenidos en las mismas condiciones descriptas para el **Experimento 1**. Cada tratamiento contó con 3 réplicas (3 acuarios), con 7 animales por acuario para el Grupo A, 6 para el Grupo B y 4 para el Grupo C (29, 25 y 17 animales/m², respectivamente). El número total de acuarios fue de 6 para cada ensayo.

Los juveniles fueron alimentados diariamente y *ad libitum* con *Eloдея* sp. y alimento comercial Tetracolor, TETRA®. Todos los acuarios fueron limpiados y el

agua completamente renovada una vez a la semana. El periodo experimental fue de 105 días para el Grupo A, 90 días para el Grupo B y 120 días para el Grupo C. Cada 15 días los animales fueron sexados y pesados (precisión: 0,01 g), mientras que la mortalidad fue registrada diariamente.

4.3.3 Evaluación macroscópica y microscópica

Al finalizar ambos experimentos, los animales fueron pesados (precisión: 0,01 g) y se registraron las siguientes variables morfométricas (precisión: 0,01 mm): largo del cefalotórax (LC), entre el extremo anterior del rostro y el extremo posterior del cefalotórax; largo postorbital del cefalotórax (LPC), entre el margen posterior de la órbita y el extremo posterior del cefalotórax; ancho del pleon (AP), medido en el segundo segmento abdominal; y largo, ancho y alto de las quelas (LQ, AQ, AIQ, respectivamente) (Fig. 2.3).

Luego de anestesiar a los animales con frío (se los colocó en hielo durante 15 minutos), el caparazón fue removido y se inspeccionó el sistema reproductor para determinar su tamaño relativo, forma y color. El grado de maduración de los ovarios fue determinado utilizando la escala de color descrita en el Capítulo 2 (Fig. 2.4). Posteriormente, el sistema reproductor fue disecado, pesado (precisión: 0,1 mg), y fijado en solución acuosa de Bouin durante 4 horas a temperatura ambiente.

Para el *Ensayo 1* y *Ensayo 2* del **Experimento 2**, los tejidos fueron posteriormente deshidratados, incluidos en Paraplast® (Leica Microsystems) y coloreados con Hematoxilina-Eosina. Al menos 3 cortes (5-7 µm de espesor) de cada animal fueron inspeccionados bajo microscopio óptico (Imager A.1, Zeiss®) y fotografiados con cámara Leica® ICC50 de 3 mpx. La presencia de oocitos primarios y secundarios fue determinada de acuerdo a Abdu et al. (2000) y Vazquez et al. (2008). La

proporción de oocitos primarios (o previtelogénicos) es máxima (100%) en los estadios ováricos I y II, y disminuye en los sucesivos estadios hasta alcanzar un valor mínimo (11%) en el estadio IV (ovario maduro). Asimismo, la proporción de oocitos secundarios es mínima (0%) en los estadios ováricos I y II y aumenta gradualmente hasta alcanzar un valor máximo en el estadio IV (73%) (Vazquez et al., 2008). Se midió el diámetro mayor y menor de los oocitos cuyos núcleos eran visibles, con un lente ocular micrométrico calibrado 8X (Zeiss®) (Sánchez de Bock & López Greco, 2010).

En el caso del **Experimento 1** y del *Ensayo 3* del **Experimento 2**, los ovarios maduros presentados por la mayoría de las hembras contenían una cantidad muy grande de vitelo, lo cual dificultó en gran medida su procesamiento histológico. Por lo tanto, el diámetro mayor y menor de los oocitos fue medido bajo lupa (Zeiss®) con un lente ocular micrométrico calibrado. Para ello se seleccionaron por hembra al azar 10 oocitos secundarios si el ovario estaba maduro (estadio IV), 10 oocitos primarios si el ovario estaba inmaduro (estadio II), o 10 oocitos primarios y 10 secundarios si el ovario se encontraba en el estadio III.

Para cada ensayo del **Experimento 2** se determinó el porcentaje de humedad de los ovarios, para lo cual se pesó un trozo de ovario por hembra (precisión: 0,1 mg) y luego cada trozo fue secado en estufa a 60°C hasta alcanzar un peso constante (48 horas).

Por último, se disecaron las quelas y el pleon de cada animal, los cuales fueron pesados (PQ y PP, respectivamente) (precisión: 0,01 g).

4.3.4 Índices calculados

En ambos experimentos la supervivencia fue expresada como el porcentaje de animales vivos dentro de cada tratamiento al término del experimento.

Las fórmulas utilizadas para calcular los índices relativos al crecimiento somático dentro de cada experimento fueron las siguientes:

- Tasa de Crecimiento Específica, $TCE = 100 * ((\log_e \text{ peso corporal final} - \log_e \text{ peso corporal inicial}) / \text{tiempo})$, donde el tiempo fue expresado en días, y el peso inicial y final correspondieron al peso promedio de los animales de cada acuario al comenzar y finalizar el experimento, respectivamente (Jussila & Evans, 1996, 1997; Reynolds, 2002);
- Incremento de Peso, $IP = 100 * ((\text{peso corporal final} - \text{peso corporal inicial}) / \text{peso corporal inicial})$, correspondiendo el peso inicial y final al peso promedio de los animales de cada acuario al comenzar y finalizar el experimento, respectivamente (Jones, 1995b);
- Ancho Relativo del Pleon, $ARP = AP/LC$;
- Peso Relativo del Pleon, $PRP = PP/\text{peso corporal final}$;
- Alto Relativo de las Quelas, $AIRQ = AIQ/LQ$;
- Peso Relativo de las Quelas, $PRQ = PQ/\text{peso corporal final}$.

Las fórmulas utilizadas para calcular los índices relativos al sistema reproductor fueron las siguientes:

- Índice Gonadosomático, $IGS = 100 * (\text{peso del sistema reproductor} / \text{peso corporal final})$, correspondiendo el peso del sistema reproductor y el peso corporal final al peso promedio del sistema reproductor y al peso corporal final promedio de

los animales de cada acuario, respectivamente (McRae & Mitchell, 1995; Sagi et al., 1996b);

- Proporción de Estadio Ovárico X, $PEO = 100 * (\text{número de estadios ováricos} / \text{número total de estadios ováricos})$;
- Diámetro Oocitario Medio, $DOM = (\text{diámetro mayor} + \text{diámetro menor}) / 2$, calculándose un valor promedio para los oocitos primarios y otro para los oocitos secundarios;
- Contenido de humedad por ovario, $HO = ((\text{peso húmedo del ovario} - \text{peso seco del ovario}) * 100) / \text{peso húmedo del ovario}$.

Todos los índices descriptos fueron calculados para cada acuario (réplica), excepto PEO, el cual fue calculado para cada tratamiento.

4.3.5 Análisis estadístico

Para el **Experimento 1** y para cada ensayo dentro del **Experimento 2** se realizó un análisis de varianza de 1 factor (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995) para comparar la supervivencia, el peso final, TCE, IP, IGS, las variables morfométricas (LC, LPC, ARP, PRP, LQ, AQ, AIRQ, PRQ, LRRP), GSI, MOD y HO entre tratamientos. La prueba exacta de Fisher (Sokal & Rohlf, 1995) fue utilizada para comparar la PEO entre tratamientos. Los resultados por tratamiento son presentados como media \pm ES de acuerdo a Fotedar (2004). Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significación del 95%, mediante el programa Statistica 6.0, StatSoft Inc.

4.4 Resultados

4.4.1 Experimento 1

4.4.1.1 Supervivencia y crecimiento

Hacia el día 110 de comenzado el experimento se perdió una réplica perteneciente al tratamiento DOPA debido a problemas de aireación del acuario. Por lo tanto, para dicho tratamiento se trabajó con un número total de 3 acuarios, y la supervivencia fue calculada considerando un número inicial de 21 animales (7 por acuario).

Tanto la supervivencia como las variables morfométricas analizadas fueron similares en ambos tratamientos ($p>0,05$; Tabla 4.1). El peso final, tasa de crecimiento específica (TCE) e incremento de peso (IP) también fueron similares en las hembras control y las hembras DOPA ($p>0,05$; Tabla 4.1).

4.4.1.2 Sistema reproductor

Tanto las hembras control como las hembras DOPA presentaron en su mayoría ovarios en estadio IV (ovarios maduros). Algunos de estos ovarios contenían oocitos del color verde oliva previamente descrito para la especie (Fig. 2.4) (Vazquez et al., 2008). Sin embargo, se observaron también ovarios en estadio IV con oocitos de color verde y amarillo polarizados, u oocitos de color verde-castaño uniforme (Fig. 4.2). Para diferenciarlos, se llamó estadio IVa al primero, IVb al segundo y IVc al tercero.

Tanto el índice gonadosomático (IGS) como la proporción de los distintos estadios ováricos no difirieron significativamente entre tratamiento ($p>0,05$; Tabla 4.2).

El diámetro oocitario medio (DOM) de los oocitos primarios y de los oocitos secundarios también resultó ser similar en ambos grupos experimentales ($p>0,05$; Tabla 4.2).

Por otro lado, se observó en el 33,3% de las hembras control y en el 30,8% de las hembras DOPA la presencia de conectores (que unen los lóbulos ováricos anteriores con los posteriores) y oviductos hipertrofiados y/o de color caramelo, con un aparente exceso de secreción. Las hembras restantes presentaron conectores/oviductos opalescentes y de estructura macroscópica normal, de acuerdo a Vazquez et al. (2008) (Fig. 4.3).

Tabla 4.1. Efecto de la administración de DA a través del alimento sobre los parámetros de crecimiento y variables morfométricas de hembras de *C. quadricarinatus* al término del periodo experimental.

Parámetro	Tratamiento	
	C	DOPA
Número inicial	28	28
Número final	18	13
Supervivencia (%)	64,29 ± 4,12 ^a	61,91 ± 4,76 ^a
Peso inicial (g)	4,26 ± 0,10 ^a	4,24 ± 0,14 ^a
Peso final (g)	21,08 ± 3,82 ^a	19,58 ± 2,40 ^a
IP (%)	300,95 ± 90,87 ^a	361,17 ± 43,33 ^a
TCE (%/día)	0,53 ± 0,06 ^a	0,51 ± 0,03 ^a
LC (mm)	45,23 ± 2,19 ^a	44,02 ± 1,86 ^a
LPC (mm)	31,79 ± 1,52 ^a	31,07 ± 1,44 ^a
PRP (%)	30,37 ± 1,22 ^a	30,50 ± 0,96 ^a
ARP (%)	44,17 ± 0,67 ^a	43,79 ± 0,88 ^a
LQ (mm)	30,49 ± 2,07 ^a	28,44 ± 1,84 ^a
AQ (mm)	4,63 ± 0,24 ^a	4,43 ± 0,48 ^a
AIRQ (%)	28,46 ± 0,58 ^a	28,17 ± 1,46 ^a
PRQ (%)	3,31 ± 0,24 ^a	2,87 ± 0,52 ^a

Nota: Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos Control (C) y Dopamina (DOPA) para el **Experimento 1**. AQ: ancho de las quelas, ARP: ancho relativo del pleon, AIRQ: alto relativo de las quelas, IP: incremento de peso, LC: largo del cefalotórax, LPC: largo postorbital del cefalotórax, LQ: largo de las quelas, PRP: peso relativo del pleon, PRQ: peso relativo de las quelas, TCE: tasa de crecimiento específica. El valor de cada variable presentado en la tabla corresponde al promedio de los 4 o 3 valores medios obtenidos en las 4 (Control) o 3 (DOPA) réplicas (acuarios) de cada tratamiento. Todas las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$).



Fig. 4.2. Estadios ováricos encontrados en hembras de *C. quadricarinatus* pertenecientes al tratamiento Control y Dopamina (**Experimento 1**). (A) Estadio ovárico II. (B) Estadio ovárico III. (C) Estadio ovárico IVa, con oocitos de color verde oliva. (D) Estadio ovárico IVb, con oocitos de color verde y amarillo polarizados. (E) Estadio ovárico IVc, con oocitos de color verde y castaño. (F) Estadio ovárico IVc, con oocitos de color castaño. OV: ovario.

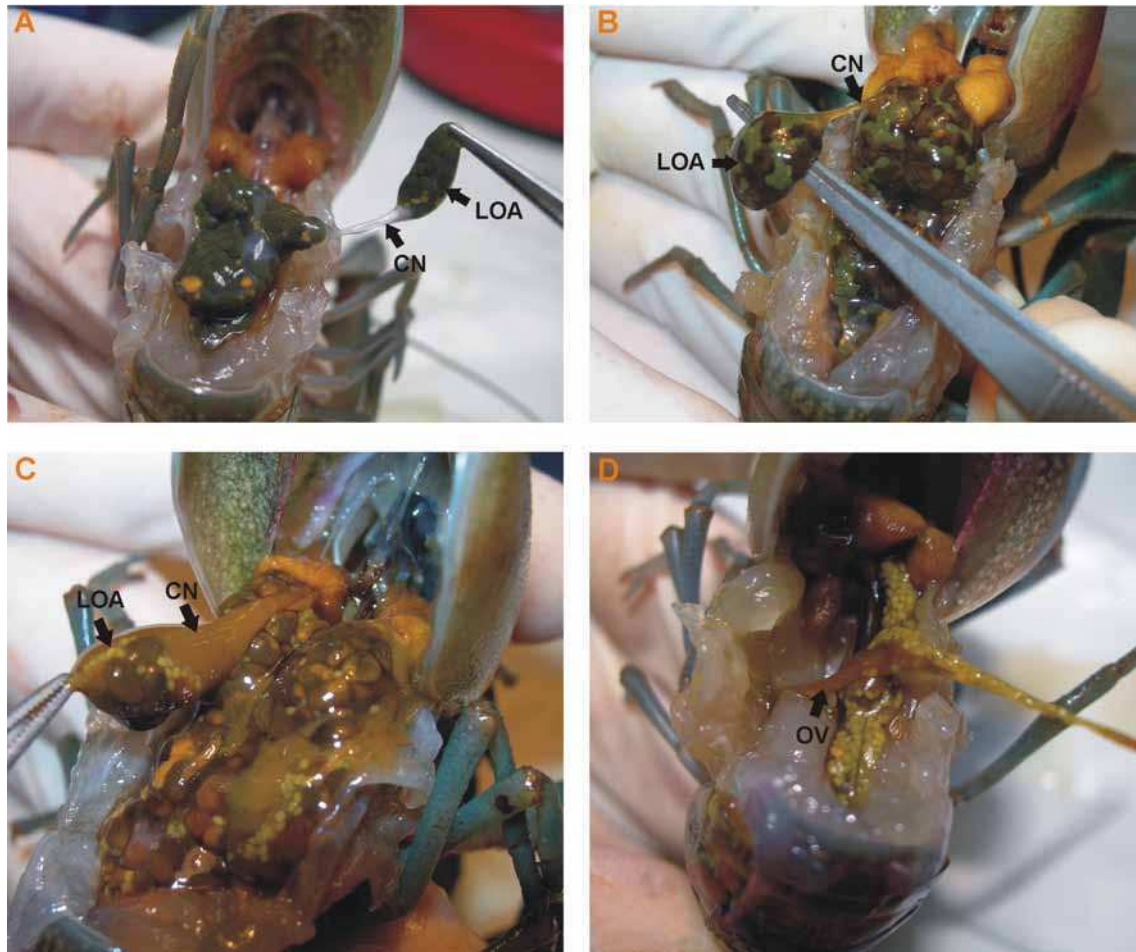


Fig. 4.3. Estructura macroscópica de los conectores ováricos y oviductos en hembras de *C. quadricarinatus* pertenecientes a los tratamientos Control y Dopamina (**Experimento 1**). (A) Conector transparente y delgado (estructura normal). (B) Conector delgado pero de color caramelo. (C) Conector hipertrofiado y de color caramelo. (D) Oviducto de color caramelo. CN: conector ovárico, LOA: lóbulo ovárico anterior, OV: oviducto.

Tabla 4.2. Efecto de la administración de DA a través del alimento sobre los parámetros reproductivos de hembras de *C. quadricarinatus* al término del periodo experimental.

Parámetro	Tratamiento	
	C	DOPA
IGS (%)	4,10 ± 1,11 ^a	4,43 ± 1,32 ^a
DOM de oocitos primarios (um)	294,92 ± 74,22 ^a	335,94 ± 21,48 ^a
DOM de oocitos secundarios (um)	1111,31 ± 120,82 ^a	965,96 ± 159,32 ^a
Ovarios en estadio I (%)	0 ^a	0 ^a
Ovarios en estadio II (%)	16,67 ^a	15,38 ^a
Ovarios en estadio III (%)	5,56 ^a	7,69 ^a
Ovarios en estadio IVa (%)	33,33 ^a	38,46 ^a
Ovarios en estadio IVb (%)	16,67 ^a	7,69 ^a
Ovarios en estadio IVc (%)	27,78 ^a	30,77 ^a

Nota: Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos Control (C) y Dopamina (DOPA) para el **Experimento 1**. DOM: diámetro oocitario medio, IGS: índice gonadosomático. Cada valor de IGS y DOM presentado en la tabla corresponde al promedio de los 4 o 3 valores medios obtenidos en las 4 (Control) o 3 (DOPA) réplicas (acuarios) de cada tratamiento. Cada valor de proporción de estadio ovárico corresponde al promedio de todas las hembras de cada tratamiento; esta variable fue analizada mediante la prueba exacta de Fisher, mientras que el resto de las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$).

4.4.2 Experimento 2

4.4.2.1 Supervivencia y crecimiento

En los Grupos A y B la supervivencia de las hembras inyectadas con DA fue significativamente menor que aquella de las hembras control ($p=0,025$ y $p=0,011$, respectivamente), mientras que en el Grupo C la supervivencia no difirió significativamente entre tratamientos ($p>0,05$; Tabla 4.3).

El peso final, IP y TCE difirieron entre tratamientos para el Grupo A ($p=0,013$, $p=0,014$ y $p=0,011$, respectivamente), pero no para el Grupo B ni C ($p>0,05$; Tabla 4.3). El largo del cefalotórax (LC) y largo de las quelas (LQ) siguieron el mismo patrón, siendo significativamente mayores en las hembras control dentro del Grupo A ($p=0,013$, $p=0,019$, respectivamente; Tabla 4.3). En los 3 grupos, el tamaño y peso relativos del pleon y quelas fueron similares en ambos tratamientos ($p>0,05$; Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Efecto de la administración de DA a través de su inyección sobre los parámetros de crecimiento y variables morfométricas de hembras de *C. quadricarinatus* al término del periodo experimental.

Parámetro	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	C	DOPA	C	DOPA	C	DOPA
Número inicial	21	21	18	18	12	12
Número final	19	11	17	8	10	10
Supervivencia (%)	90,48 ± 4,76 ^a	52,38 ± 4,76 ^b	94,44 ± 5,56 ^a	44,44 ± 5,56 ^b	83,33 ± 8,33 ^a	83,33 ± 8,33 ^a
Peso inicial (g)	4,14 ± 0,02 ^a	4,16 ± 0,01 ^a	9,63 ± 0,09 ^a	9,68 ± 0,12 ^a	13,98 ± 0,08 ^a	13,99 ± 0,05 ^a
Peso final (g)	9,30 ± 0,10 ^a	7,96 ± 0,52 ^b	14,47 ± 1,21 ^a	14,68 ± 0,19 ^a	21,96 ± 2,91 ^a	21,71 ± 0,62 ^a
IP (%)	124,53 ± 3,34 ^a	91,36 ± 12,34 ^b	50,33 ± 13,27 ^a	51,71 ± 1,31 ^a	57,21 ± 21,69 ^a	55,15 ± 4,94 ^a
TCE (%/día)	0,77 ± 0,01 ^a	0,62 ± 0,06 ^b	0,45 ± 0,10 ^a	0,46 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,11 ^a	0,37 ± 0,03 ^a
LC (mm)	34,44 ± 0,13 ^a	33,66 ± 0,29 ^b	40,60 ± 1,24 ^a	40,07 ± 1,33 ^a	45,37 ± 3,32 ^a	45,56 ± 0,45 ^a
LPC (mm)	23,77 ± 0,20 ^a	23,22 ± 0,28 ^a	27,88 ± 0,76 ^a	27,55 ± 0,85 ^a	31,20 ± 1,45 ^a	31,80 ± 0,21 ^a
PRP (%)	30,53 ± 0,65 ^a	30,84 ± 1,09 ^a	30,58 ± 0,87 ^a	30,19 ± 0,82 ^a	29,91 ± 0,53 ^a	29,65 ± 1,41 ^a
ARP (%)	40,12 ± 0,87 ^a	38,73 ± 0,20 ^a	41,09 ± 0,67 ^a	40,20 ± 0,70 ^a	43,78 ± 1,81 ^a	43,62 ± 0,40 ^a
LQ (mm)	21,96 ± 0,27 ^a	20,23 ± 0,75 ^b	24,93 ± 1,43 ^a	25,08 ± 0,79 ^a	31,89 ± 2,01 ^a	31,03 ± 1,68 ^a
AQ (mm)	3,25 ± 0,09 ^a	3,17 ± 0,38 ^a	3,63 ± 0,24 ^a	3,69 ± 0,25 ^a	4,93 ± 0,42 ^a	4,83 ± 0,24 ^a
AIRQ (%)	27,56 ± 1,01 ^a	26,86 ± 0,34 ^a	27,19 ± 0,82 ^a	27,89 ± 0,92 ^a	28,49 ± 1,22 ^a	28,17 ± 0,76 ^a
PRQ (%)	2,87 ± 0,17 ^a	2,71 ± 0,15 ^a	2,69 ± 0,52 ^a	2,93 ± 0,37 ^a	3,78 ± 0,27 ^a	3,66 ± 0,45 ^a

Nota: Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos Control (C) y Dopamina (DOPA) dentro de cada Grupo para el **Experimento 2**. AQ: ancho de las quelas, ARP: ancho relativo del pleon, AIRQ: alto relativo de las quelas, IP: incremento de peso, LC: largo del cefalotórax, LPC: largo postorbital del cefalotórax, LQ: largo de las quelas, PRP: peso relativo del pleon, PRQ: peso relativo de las quelas, TCE: tasa de crecimiento específica. El valor de cada variable presentado en la tabla corresponde al promedio de los 3 valores medios obtenidos en las 3 réplicas (acuarios) de cada tratamiento. Todas las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$).

4.4.2.2 Sistema reproductor

En el Grupo A todas las hembras presentaron ovarios en estadio II. Sin embargo, dentro de este estadio se observaron ovarios de color crema pálido (al que se denominó estadio IIa) y ovarios de color amarillo-naranja (al que se llamó estadio IIb) (Fig. 4.4). La proporción del estadio IIb difirió significativamente entre tratamientos, siendo mayor en las hembras control ($p=0,038$; Tabla 4.4). La proporción del estadio IIa, por su parte, tendió claramente a ser mayor en las hembras DOPA, si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$; Tabla 4.4). En el Grupo B se observó el mismo resultado, aunque no significativo, que aquel descrito para el Grupo A ($p>0,05$; Tabla 4.4). Las hembras control de este grupo presentaron adicionalmente ovarios en un estadio de desarrollo más avanzado (estadio III y IV) (Fig. 2.4; Tabla 4.4). En el Grupo C por su parte, no hubo diferencias significativas en los estadios ováricos entre tratamientos ($p>0,05$), presentando la mayoría de las hembras ovarios en estadio IV (Tabla 4.4).

En concordancia con estos resultados, el IGS fue menor en las hembras DOPA para los Grupos A y B ($p=0,033$ y $p=0,037$, respectivamente), pero no difirió significativamente entre tratamientos para el Grupo C ($p>0,05$; Tabla 4.4). En los 3 ensayos realizados el contenido de humedad de los ovarios (HO) fue similar en las hembras control y en las hembras DOPA ($p>0,05$; Tabla 4.4).

Por otro lado, el análisis histológico de las gónadas reveló la presencia sólo de oocitos primarios en los ovarios de las hembras del Grupo A (Fig. 4.5A), mientras que en el Grupo B las hembras control con ovarios en estadio III y IV presentaron también oocitos secundarios (Fig. 4.5B). El DOM de los oocitos primarios fue constante independientemente del tratamiento para ambos grupos de hembras ($p>0,05$; Tabla 4.4).

En el Grupo C, el 70% de las hembras (n=14) presentaron mayoritariamente oocitos secundarios, mientras que el 20% de las hembras restantes presentaron exclusivamente oocitos primarios. El DOM de los primeros fue similar en ambos tratamientos ($p>0,05$), mientras que el DOM de los segundos fue significativamente mayor en las hembras DOPA ($p=0,000$; Tabla 4.4).

Finalmente, se observó cierto grado de atresia oocitaria en hembras sometidas a ambos tratamientos dentro de los Grupos A y B, aunque la frecuencia de dicha alteración tendió a ser mayor en las hembras DOPA (Figs. 4.5C-F).

Tabla 4.4. Efecto de la administración de DA a través de su inyección sobre los parámetros reproductivos de hembras de *C. quadricarinatus* al término del periodo experimental.

Parámetro	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	C	DOPA	C	DOPA	C	DOPA
IGS (%)	0,45 ± 0,03 ^a	0,32 ± 0,06 ^b	0,57 ± 0,10 ^a	0,33 ± 0,09 ^b	2,57 ± 0,51 ^a	2,78 ± 1,99 ^a
HO (%)	96,34 ± 0,43 ^a	97,43 ± 0,33 ^a	88,84 ± 2,49 ^a	95,10 ± 0,51 ^a	61,48 ± 3,21 ^a	68,87 ± 8,09 ^a
DOM de oocitos primarios (um)	221,10 ± 2,73 ^a	210,32 ± 5,79 ^a	231,43 ± 9,43 ^a	237,39 ± 37,15 ^a	283,98 ± 1,27 ^a	358,67 ± 5,93 ^b
DOM de oocitos secundarios (um)	-	-	604,70 ± 91,58	-	994,09 ± 16,02 ^a	893,96 ± 24,68 ^a
Ovarios en estadio I (%)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Ovarios en estadio IIa (%)	26,32 ^a	90,91 ^a	41,18 ^a	76,92 ^a	0 ^a	0 ^a
Ovarios en estadio IIb (%)	73,68 ^a	9,09 ^b	41,18 ^a	23,08 ^a	8,33 ^a	19,44 ^a
Ovarios en estadio III (%)	0 ^a	0 ^a	5,88 ^a	0 ^a	19,44 ^a	0 ^a
Ovarios en estadio IV (%)	0 ^a	0 ^a	11,76 ^a	0 ^a	72,22 ^a	80,56 ^a

Nota: Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos Control (C) y Dopamina (DOPA) para el **Experimento 2**. DOM: diámetro oocitario medio, HO: contenido de humedad de los ovarios, IGS: índice gonadosomático. Cada valor de IGS, HO y DOM presentado en la tabla corresponde al promedio de los 3 valores medios obtenidos en las 3 réplicas (acuarios) de cada tratamiento. Cada valor de proporción de estadio ovárico corresponde al promedio de todas las hembras de cada tratamiento; esta variable fue analizada mediante la prueba exacta de Fisher, mientras que el resto de las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p>0,05$).

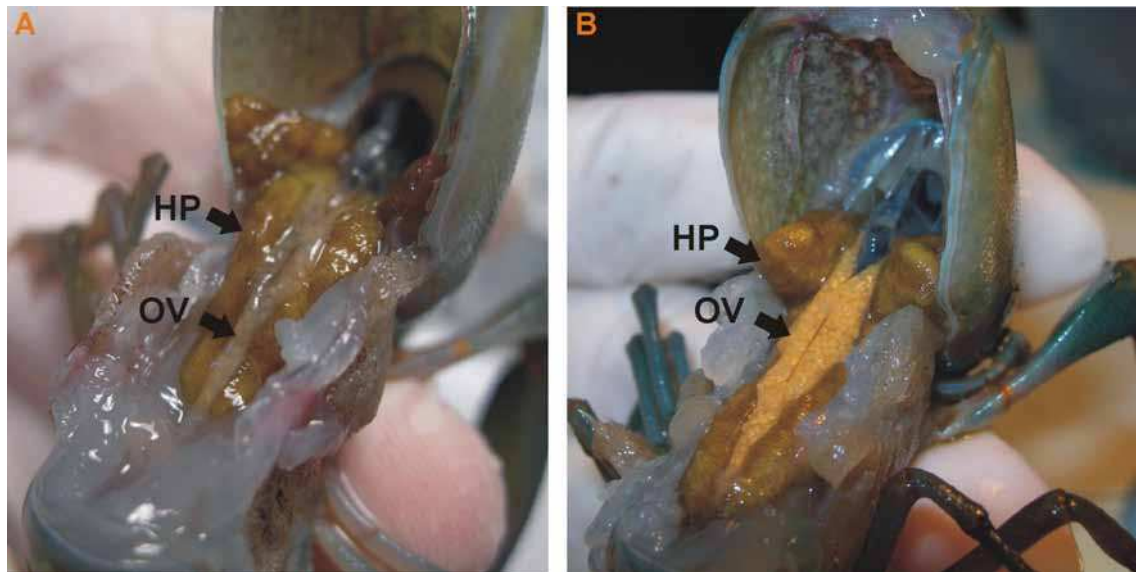


Fig. 4.4. Estadios ováricos en hembras de *C. quadricarinatus* pertenecientes a los tratamientos Control y Dopamina (**Experimento 2**). (A) Estadio ovárico IIa. (B) Estadio ovárico IIb. HP: hepatopáncreas, OV: ovario.

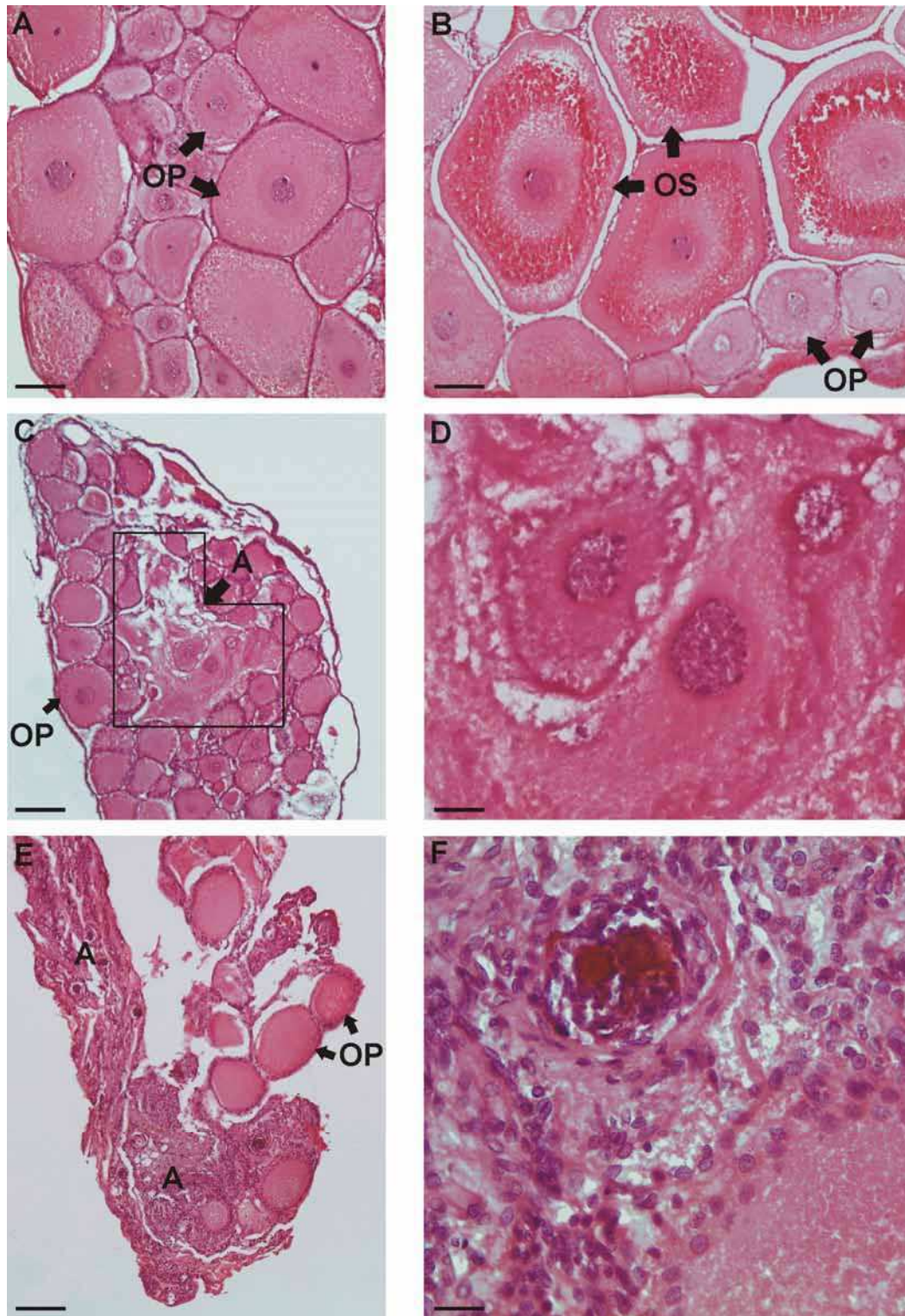


Fig. 4.5. Estructura histológica del ovario de hembras de *C. quadricarinatus*, coloreados con Hematoxilina-Eosina (**Experimento 2**). (A) Oocitos primarios y (B) oocitos secundarios de hembras pertenecientes al tratamiento Control dentro del Grupo B. (C), (E) Vista general y (D), (F) detalle de ovarios de hembras pertenecientes al tratamiento Dopamina, mostrando atresia oocitaria. Barras de escala: (A), (B): 130 μm ; (C), (E): 220 μm ; (D), (F): 20 μm . A: atresia, OP: oocito primario, OS: oocito secundario.

4.5 Discusión

Numerosos estudios han abordado el rol de los neurotransmisores en distintas funciones fisiológicas de los crustáceos decápodos, otorgando especial atención a la 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT). Tanto los trabajos *in vitro* como los trabajos *in vivo* han proporcionado evidencia de su rol estimulador en la maduración ovárica de distintas especies de camarones (Vaca & Alfaro, 2000; Alfaro et al., 2004; Meeratana et al., 2006; Wongprasert et al., 2006; Kuo et al., 2009; Santhoshi et al., 2009), del cangrejo violinista *U. pugilator* (Richardson et al., 1991; Kulkarni & Fingerman, 1992), y de la langosta de agua dulce *P. clarkii* (Kulkarni et al., 1992; Sarojini et al., 1995f). En contraste, son menos los estudios que investigaron el rol de la DA en la maduración ovárica, involucrando principalmente a dos de las especies previamente mencionadas: *P. clarkii* (Sarojini et al., 1995d, 1996) y *M. rosenbergii* (Chen et al., 2003; Tinikul et al., 2008, 2009b). Particularmente, los efectos de la administración prolongada de DA sobre el desarrollo y maduración ováricos en hembras de *C. quadricarinatus* no han sido reportados en la literatura hasta el momento.

En la presente tesis se observaron ciertas alteraciones en los parámetros reproductivos sólo cuando la DA fue administrada mediante su inyección en hembras de un peso de 4-14 g (Grupo A y Grupo B). Dichas alteraciones consistieron en un menor valor de IGS y una tendencia hacia una mayor proporción de ovarios menos desarrollados en las hembras DOPA que en las hembras control. Tanto en el Grupo A como en el Grupo B el DOM de los oocitos primarios fue similar en ambos tratamientos, y similar al valor reportado por Vazquez et al. (2008) en su trabajo sobre la caracterización del sistema reproductor femenino de *C. quadricarinatus*. Este resultado, junto con el hecho de que el contenido de humedad de los ovarios no difirió entre tratamientos, sugerirían que el menor IGS observado en las hembras DOPA del Grupo

A se habría debido a un menor número de oocitos por ovario, lo cual demostraría cierto efecto de la administración de DA sobre el crecimiento ovárico. En el Grupo B, el mayor IGS de las hembras control se debió con mayor probabilidad a la presencia de oocitos secundarios, lo cual demostraría cierto efecto de la DA sobre la maduración ovárica.

En su conjunto, estos resultados parecen contradecir aquellos obtenidos por Tinikul et al. (2009b), quienes detectaron un valor similar de IGS, pero diámetros oocitarios menores en hembras de *M. rosenbergii* inyectadas con DA respecto a las hembras control. Asimismo, Sarojini et al. (1995d) no encontraron diferencias significativas en el IGS de hembras de *P. clarkii* tratadas con DA. Sin embargo, las condiciones experimentales no fueron similares, dado que en los estudios mencionados la DA fue inyectada en hembras ya maduras a lo largo de un periodo de 49 (Tinikul et al., 2009b) y 15 días (Sarojini et al., 1995d), mientras que en el presente trabajo la DA fue inyectada en juveniles hembra, durante un periodo mayor (90-105 días). Por lo tanto, la ausencia de efecto de la DA sobre el IGS reportado en aquellos estudios pudo haberse debido simplemente a un periodo de administración demasiado corto. Además, los autores encontraron en *M. rosenbergii* un diámetro oocitario menor sólo cuando analizaron los oocitos secundarios. En ese sentido, la ausencia de diferencias significativas en el DOM de los oocitos primarios obtenida en el presente trabajo coincidiría con lo obtenido por Tinikul et al. (2009b).

En el caso del Grupo C, la inyección de DA no tuvo un efecto inhibitorio sobre la maduración ovárica, dado que las hembras tratadas con este neurotransmisor presentaron la misma proporción de ovarios maduros, y el mismo IGS y DOM de los oocitos secundarios que las hembras control. Este resultado coincide con aquel obtenido por Sainath & Sreenivasula Reedy (2011) luego de inyectar DA a hembras del cangrejo

de agua dulce *O. senex senex* durante un periodo de 28 días. Los autores no mencionan posibles explicaciones frente a los resultados obtenidos, así como tampoco mencionan la talla inicial y/o grado de madurez sexual de los cangrejos con los que trabajaron. Posiblemente, la concentración de DA utilizada no fue lo suficientemente alta como para producir un efecto detectable, considerando que el efecto inhibitorio ejercido por la DA sobre el sistema reproductor masculino y la síntesis de vitelogenina demostró ser dosis-dependiente (Sarojini et al., 1995b; Chen et al., 2003). Sin embargo, tanto en la presente tesis como en el trabajo de Sainath & Sreenivasula Reedy (2011), la concentración de DA inyectada coincide con aquella utilizada en estudios previos, en los que la misma provocó efectos claros en tiempos experimentales cortos y en hembras de una talla similar o inclusive mayor que la talla de las hembras del Grupo C (Sarojini et al., 1995d; Chen et al., 2003; Tinikul et al., 2009b). En cualquier caso, los resultados obtenidos en dicha especie de cangrejo coinciden con aquellos obtenidos en el *Ensayo 3* de la presente tesis, pero no concuerdan con los resultados del *Ensayo 1* y *Ensayo 2*, ni con los obtenidos por Sarojini et al. (1995d) y Tinikul et al. (2009b). Diferentes tiempos experimentales, diferentes tallas iniciales de los animales, así como posibles diferencias intraespecíficas, podrían explicar la discrepancia de resultados entre todos los trabajos mencionados.

Una explicación alternativa a lo observado en el *Ensayo 3* se relacionaría con el hecho de que quizás en las hembras del Grupo C la cascada hormonal que “dispara” la vitelogénesis secundaria ya hubiera estado inducida al momento de comenzar el ensayo, siendo la DA exógena incapaz de frenar dicho proceso. Para que ocurra la vitelogénesis secundaria los niveles de GSH habrían sido elevados y los de GIH mínimos, permitiendo de este modo la maduración ovárica (Adiyodi and Subramonian, 1983; Tsukimura, 2001). A su vez, para generar dicho contexto fisiológico, dos mecanismos

alternativos podrían haber ocurrido: (1) la disminución en la secreción endógena de DA, como fue observado por Tinikul et al. (2008) a lo largo del proceso de maduración ovárica en *M. rosenbergii*; y/o (2) la disminución en la respuesta del ganglio torácico (sitio de secreción de la GSH) a la DA debido a distintos mecanismos celulares, como fue propuesto por Cahansky et al. (2011) para explicar la ausencia de efecto de la spiperona sobre el crecimiento ovárico durante el periodo pre-reproductivo de hembras adultas de *C. quadricarinatus*. Bajo este contexto fisiológico probable de las hembras del Grupo C, sería esperable la ausencia de efecto de la DA exógena, independientemente de la dosis administrada. En este sentido, en las hembras del Grupo B, es poco probable que la vitelogénesis secundaria ya hubiera estado inducida al momento de comenzar el ensayo dado que la mayoría de las hembras control presentaban ovarios inmaduros al término del mismo. Por lo tanto, el contexto fisiológico de estas hembras habría sido diferente al de las hembras del Grupo C, permitiendo que la DA ejerza un efecto inhibitorio sobre la maduración ovárica. La realización de un control inicial para determinar el grado de maduración ovárica de las hembras al momento de comenzar los ensayos hubiera permitido descartar o reforzar esta hipótesis; sin embargo, esto no fue posible en la presente tesis debido a la baja disponibilidad de hembras de la talla deseada con que se contó para cada ensayo.

Por otro lado, la atresia oocitaria encontrada en las hembras del Grupo A y Grupo B es un evento ya descrito en otras especies de crustáceos decápodos (Sarojini et al., 1995g; Kogan et al., 2000; Peixoto et al., 2005). Dicha atresia fue observada en mayor proporción en las hembras DOPA, con lo cual la presente tesis constituiría el primer reporte sobre cierta alteración en la estructura ovárica de *C. quadricarinatus*, como resultado, al menos en parte, de la administración exógena de DA.

En cuanto al crecimiento somático, se observó que el efecto inhibitorio de la DA sobre el crecimiento y maduración ováricos en el **Experimento 2** no se tradujo en un mayor crecimiento de las hembras, siendo el mismo significativamente menor en el tratamiento DOPA respecto al control para el Grupo A, mientras que no difirió entre tratamientos en el Grupo B. Estos resultados podrían estar relacionados con los procesos metabólicos y fisiológicos inducidos por la inyección de DA, la cual se encuentra involucrada en la regulación de los siguientes parámetros: (1) los niveles de glucosa en sangre: la DA induce hiperglucemia (Lüschen et al., 1993; Kuo et al., 1995; Kuo & Yang, 1999) o hipoglucemia (Sarojini et al., 1995c), dependiendo de la especie; (2) la osmorregulación y balance iónico (Morris, 2001); y (3) la frecuencia cardíaca: la DA incrementa esta variable en langostas de agua dulce y marinas y en cangrejos (Berlind & Cooke, 1970; Florey & Rathmayer, 1978). Por lo tanto, si bien los efectos fisiológicos específicos de la DA no han sido estudiados en *C. quadricarinatus* hasta el momento (ni fueron analizados en el presente trabajo), un pulso repentino de DA exógena habría provocado muy probablemente en las hembras inyectadas un periodo transitorio de modulación de la energía metabólica, osmorregulación y respuesta respiratoria, como fue descrito previamente en *Penaeus monodon* (Chang et al., 2007a) y *Litopenaeus vannamei* (Chiu et al., 2006). Es decir, la inyección de DA podría haber causado una redirección de los recursos energéticos hacia funciones fisiológicas adaptativas, afectando en última instancia y a largo plazo, la energía invertida en otros procesos fisiológicos, tales como el crecimiento somático (Ottaviani & Franceschi, 1996; Maule & Vanderkooi, 1999).

El cambio en la derivación de los recursos energéticos potencialmente provocada por la inyección de DA hacia determinadas adaptaciones metabólicas podría haber afectado, asimismo, al sistema inmunológico de los animales, como fue

observado por Li et al. (2005) y Chang et al. (2007b) en hembras de camarones luego de ser inyectadas con concentraciones de DA similares a la del presente trabajo. Los autores encontraron que la inyección del neurotransmisor deprimió el sistema inmune entre 2 y 8 horas posteriores a dicho procedimiento, restableciéndose los parámetros medidos a las 16 horas del mismo. Esto provocó una mayor susceptibilidad de los camarones a determinadas cepas microbianas, lo cual podría explicar la menor supervivencia de las hembras inyectadas con DA respecto a las hembras control en el *Ensayo 1* y *Ensayo 2* de la presente tesis.

Los resultados obtenidos en su conjunto muestran que la DA inyectada tuvo cierto efecto negativo y pareciera retrasar tanto el crecimiento como la maduración ováricos en hembras juveniles de un peso comprendido entre 4-14 g, sin incrementar el crecimiento somático. Por encima de los 14 g la inyección de DA no tuvo un efecto detectable en los parámetros reproductivos de las hembras. Por lo tanto, **la hipótesis de trabajo 7 se rechaza parcialmente.**

Respecto al **Experimento 1**, las hembras DOPA presentaron parámetros reproductivos y de crecimiento similares a aquellos de las hembras control. Si bien la concentración utilizada de DA fue similar o inclusive mayor que aquella reportada para otros compuestos incorporados al alimento en estudios previos (Cahansky et al., 2002, 2003; Zapata et al., 2003; Cahansky et al., 2008), es posible que la DA se comporte de manera distinta a dichos compuestos y por lo tanto se requiera una dosis mayor a la utilizada en la presente tesis para provocar un efecto detectable en los parámetros estudiados. También podría haber ocurrido que aún siendo teóricamente efectiva la concentración final de DA en el alimento, el neurotransmisor no haya sido incorporado adecuadamente por los animales debido a la pérdida de sus propiedades químicas o a una pobre asimilación. La ausencia de trabajos previos en los que se haya evaluado la

incorporación de DA a través del alimento, y la ausencia de información sobre la dinámica de acción de las enzimas digestivas de *C. quadricarinatus*, validan ambas explicaciones posibles frente a los resultados obtenidos.

Sin embargo, si se considera que la administración directa de DA a través de su inyección en hembras que alcanzaron el mismo peso final que en el **Experimento 1** (ver *Ensayo 3*) mostró un resultado similar que con la alimentación, y que la utilización del alimento como vía para administrar hormonas/neureguladores demostró ser efectiva en esta especie (Cahansky et al., 2002, 2003, 2008), una tercera explicación posible a los resultados obtenidos en el **Experimento 1** sería que la DA no tendría un efecto inhibitorio sobre la maduración ovárica en hembras de *C. quadricarinatus*, en el rango de tallas analizado. En este experimento, la DA pudo haber tenido un efecto sobre el crecimiento y maduración ováricos cuando las hembras tenían pesos equivalentes a los pesos del *Ensayo 1* y *Ensayo 2*, pero dicho efecto pudo haberse diluido (y por lo tanto, no haber sido detectado) al seguir creciendo los animales hasta alcanzar la talla equivalente a la del *Ensayo 3*.

Por lo tanto, se concluye que la administración de DA a hembras juveniles de *C. quadricarinatus* a través del alimento en un rango de tallas de 4-20 g no tiene un efecto inhibitorio sobre la maduración ovárica.

El color de algunos ovarios en estadio IV, así como las alteraciones macroscópicas de los conectores ováricos y/o oviductos, observados en ambos tratamientos del **Experimento 1** no habían sido reportados hasta el momento en *C. quadricarinatus*. Una maduración defectuosa del ovario (como consecuencia de las condiciones experimentales) o bien un proceso de atresia de los oocitos como consecuencia de que el ovario ya maduro no fue evacuado, podrían explicar la morfología de los estadios IVb, IVc y IVd. El hecho de que la mayoría de las hembras

de similar talla final inyectadas con DA (*Ensayo 3*) no presentaron ovarios maduros con las alteraciones descritas (sólo 2 hembras presentaron ovarios en estadio IVc y IVb), sugiere como más probable a la primera explicación mencionada.

El conjunto de resultados obtenidos en el **Experimento 1** llevan a **rechazar la hipótesis de trabajo 6.**

CAPITULO 5

Influencia del tamaño de la hembra y del número de puestas sobre la calidad de la progenie en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

5.1 Introducción

La expresión “calidad de progenie” se refiere tanto a la “calidad de los huevos” como a la “calidad de las larvas/juveniles”. La primera se define como la capacidad de un huevo de ser fertilizado y de completar su desarrollo (Holcomb et al., 2004). La segunda se relaciona principalmente con el estado fisiológico de la larva/juvenil, su desempeño en cultivo (supervivencia y crecimiento) y su resistencia a pruebas de estrés (Racotta et al., 2003).

Dos criterios pueden ser utilizados para estudiar la calidad de la progenie: (1) el criterio de producción, que incluye aquellos parámetros generalmente aplicados en cultivo, tales como la fecundidad, y las tasas de puesta, de fertilización y de eclosión; y (2) el criterio morfológico, que incluye variables tales como el peso y volumen/longitud de huevos y larvas/juveniles, junto con la estructura del hepatopáncreas, el cual es responsable de la digestión, absorción y almacenamiento de nutrientes en los crustáceos (Icely & Nott, 1992; Sousa & Petriella, 2006).

Dada su función, el hepatopáncreas se utiliza como un indicador del estado fisiológico general de los animales en los sistemas de cultivo (Vogt et al., 1985). Esta glándula digestiva es un órgano compacto que ocupa gran parte del cefalotórax, y que presenta típicamente una estructura tubular (Cuartas et al., 2002; Sousa & Petriella, 2006). Cada túbulo se conecta a una luz central y en su epitelio se reconocen los siguientes tipos celulares: (1) **células B**: son las más grandes y se caracterizan por una gran vacuola central y un núcleo basal, que está encargado de producir las secreciones enzimáticas hacia el interior de los túbulos; (2) **células F** o fibrilares: son cilíndricas, y poseen un núcleo central y citoplasma basófilo; (3) **células R** o de resorción: son las más numerosas, contienen numerosas vacuolas pequeñas, su núcleo es central o basal, y

son responsables en gran parte de la digestión intracelular; y (4) **células E** o embrionarias: se localizan en la región distal de los túbulos, poseen un gran núcleo, y dan origen a los tres tipos celulares mencionados previamente (Al-Mohanna & Nott, 1987; Caceci et al., 1988; Al-Mohanna & Nott, 1989; Icely & Nott, 1992; Franceschini-Vicentini et al., 2009).

La calidad de la progenie depende principalmente del estado fisiológico del stock reproductivo, el cual está determinado a su vez por el tamaño corporal, estado nutricional y número de puestas consecutivas, entre otros factores (Racotta et al., 2003).

En relación al tamaño corporal, se ha demostrado que la fecundidad realizada (número de huevos/hembra) aumenta con el tamaño de la madre en los crustáceos decápodos (Hansford & Marsden, 1995; Sampedro et al., 1997; Pinheiro & Terceiro, 2000; Litulo, 2005; Maguire et al., 2005; Kozák et al., 2006; Sáez-Royuela et al., 2006; Figueiredo et al., 2008; Sato & Yoseda, 2008). Este hecho explicaría el motivo por el cual el tamaño de los animales constituye probablemente el criterio más utilizado para su selección como reproductores en cultivo (Racotta et al., 2003). Sin embargo, el conocimiento existente sobre la influencia materna en otros aspectos de la calidad de la progenie en crustáceos decápodos es escaso. En este sentido, se ha encontrado que el tamaño de los huevos se relaciona con el tamaño de la hembra en las langostas marinas *Homarus americanus* (Attard & Hudon, 1987; Sibert et al., 2004) y *H. gammarus* (Tully et al., 2001; Agnalt, 2008), y en ciertas especies de langostas de agua dulce (Mason, 1978; Nakata & Goshima, 2004; Maguire et al., 2005). Una correlación positiva ha sido observada también entre el tamaño de la madre y el tamaño de las larvas en *H. gammarus* y en el “cangrejo” anomuro *Birgus latro* (Jørstad et al., 2005; Moland et al., 2010; Sato & Suzuki, 2010).

Por otro lado, se ha demostrado en varias especies de crustáceos decápodos que el número de puestas afecta negativamente ciertos parámetros de la calidad de la progenie, tales como la fecundidad, el peso y tasa de eclosión de los huevos, y la supervivencia y resistencia larval a la inanición (Emmerson, 1980; Hansford & Marsden, 1995; Marsden et al., 1997; Kobayashi, 2001; Wu et al., 2010). Sin embargo, el efecto del número de puestas sobre éstas y otras variables es controversial en camarones, dado que en distintos estudios se obtuvieron resultados contradictorios.

A diferencia de la mayoría de las especies mencionadas previamente, *Cherax quadricarinatus* es una especie de crustáceo decápodo de desarrollo directo. Se han descrito 9 estadios de desarrollo embrionario, y 2 estadios de post-eclosión (juveniles I (JI) y juveniles II (JII)); estos últimos permanecen sujetos a los pleópodos de la madre (García Guerrero et al., 2003a). Todos los estadios mencionados se alimentan de las reservas de vitelo contenidas en el huevo (embrión) o en el cefalotórax (juvenil). El estadio juvenil III (JIII) es el primer estadio independiente de la madre, el cual se dispersa y alimenta de manera exógena (Levi et al., 1999).

El desarrollo directo de esta especie simplifica en gran medida su cría bajo condiciones de cultivo (Masser & Rouse, 1997; Luchini, 2004; Panné Huidobro et al., 2004), eligiéndose usualmente a los animales grandes como reproductores, dada la relación directa que existe entre el tamaño de la hembra y la fecundidad (King, 1993; Masser & Rouse, 1997). Asimismo, se sabe que las hembras pueden desovar entre 3 y 5 veces por año a lo largo de un periodo de 6 meses, a temperaturas superiores a los 22°C (Masser & Rouse, 1997). Sin embargo, no se ha realizado hasta el momento ningún estudio sobre la influencia del tamaño de la madre ni de las puestas consecutivas sobre la calidad de los huevos y de los juveniles. Dicho estudio es importante debido a que los resultados obtenidos permitirían determinar si es factible el uso de reproductores de

menor tamaño junto con el stock tradicional como una forma de incrementar el volumen de “semilla” producido, y si es conveniente utilizar puestas consecutivas para mantener un abastecimiento constante de “semilla”.

5.2 Objetivo

Evaluar la posible influencia del tamaño de la madre y del número de puestas sobre la calidad de la progenie de *C. quadricarinatus*, utilizando un criterio morfológico y uno de producción.

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

- ▶ ***Hipótesis 8:*** *para un determinado número de puesta, las variables de producción aumentan con el incremento en el tamaño de la madre.*
- ▶ ***Hipótesis 9:*** *para un determinado número de puesta, las variables morfológicas de los huevos y de los juveniles aumentan con el incremento en el tamaño de la madre.*
- ▶ ***Hipótesis 10:*** *para un determinado tamaño de la de madre, las variables de producción disminuyen con el número de puestas.*
- ▶ ***Hipótesis 11:*** *para un determinado tamaño de la de madre, las variables morfológicas de los huevos y de los juveniles disminuyen con el número de puestas.*

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Obtención de los animales

El lote de animales reproductores utilizado en el presente trabajo fue suministrado por el criadero Pinzas Rojas S.R.L., Tucumán, Argentina. Dicho lote fue mantenido bajo las mismas condiciones de laboratorio descriptas en el Capítulo 2, durante un mes previo al comienzo del experimento (periodo de aclimatación).

5.3.2 Diseño experimental

Al finalizar el periodo de aclimatación, los animales fueron pesados y las hembras fueron asignadas a uno de los siguientes tratamientos, de acuerdo a su peso:

- *GRUPO A*: “hembras grandes” = 15 hembras con un peso dentro del rango 50-70 g (peso promedio: $61,27 \pm 4,50$ g);
- *GRUPO B*: “hembras pequeñas” = 21 hembras con un peso dentro del rango 20-35 g (peso promedio: $31,34 \pm 3,11$ g).

Si bien se han reportado bajo condiciones de laboratorio hembras ovígeras de hasta 200 g (Yeh & Rouse, 1994), en las *hatcheries* comúnmente son utilizadas como reproductoras hembras con un peso correspondiente al del Grupo A. Sin embargo, tanto en el laboratorio como en estanques de cultivo (Curtis & Jones, 1995) se ha observado que hembras de un peso correspondiente al del Grupo B ya son funcionalmente maduras, siendo capaces de aparearse y producir camadas viables. Ambos factores justificaron la elección de las tallas utilizadas en la presente tesis.

Cada hembra fue marcada mediante la realización de un corte en forma de “v” invertida en uno de los 4 urópodos del abanico caudal, de manera tal que en cada acuario las hembras fueron numeradas aleatoriamente del 1 al 4 según la posición de la marca. El número de marcas por urópodo correspondía al número de puestas de la hembra (primera, segunda o tercera puesta) (Fig. 5.1).

Para cada Grupo, se colocaron 3/4 hembras junto con 1 macho (peso dentro del rango 70-90 g) en acuarios de vidrio de 60x40x30 cm (12,5/20,8 animales/m²), bajo las mismas condiciones de calidad de agua, temperatura, fotoperiodo y alimentación descritas en el Capítulo 2. Se utilizaron 4 acuarios para el Grupo A y 6 para el Grupo B (10 acuarios en total). Los mismos fueron limpiados y el agua completamente renovada una vez a la semana; en el momento de la limpieza, los animales eran inspeccionados para determinar la presencia de hembras ovígeras. En la mayor parte de los casos se pudo detectar a las mismas mediante la observación del abdomen fuertemente replegado (formando una cámara incubadora temporaria) que las hembras presentan durante unos días luego del apareamiento (Fig. 2.8), hasta que los huevos se adhieren completamente a los pleópodos. A partir de ese momento las hembras “extienden” el abdomen y mueven activamente los pleópodos para la ventilación del desove (Mason, 1970; Johnson, 1979).

Aquellas hembras ovígeras con los huevos ya adheridos a los pleópodos (huevos de color verde oliva; estadio 2-3 del desarrollo embrionario, de acuerdo a García-Guerrero et al. (2003a); Fig. 2.8) fueron colocadas en acuarios de plástico individuales de 33,5x25x19 cm, conteniendo 8L de agua corriente declorada, bajo las mismas condiciones experimentales descritas en el Capítulo 2. Las hembras fueron aisladas para monitorear de manera adecuada el desarrollo embrionario y minimizar la pérdida de huevos por interacciones agresivas con otros animales.

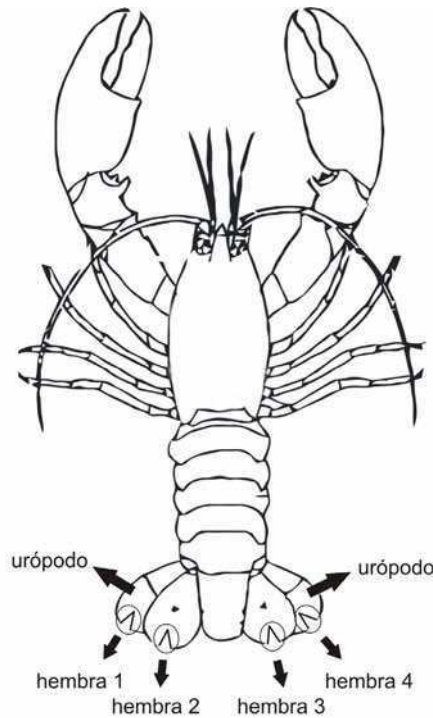


Fig. 5.1. Identificación de las hembras de *C. quadricarinatus* dentro de cada acuario mediante un corte en forma de “v” invertida en los urópodos del abanico caudal. Hembra 1: marca/s sólo en el urópodo 1; hembra 2: marca/s sólo en el urópodo 2; hembra 3: marca/s sólo en el urópodo 3; hembra 4: marca/s sólo en el urópodo 4.

5.3.3 Calidad de los huevos

Cuando los huevos adquirieron un color violeta (estadio 6-7 del desarrollo embrionario, de acuerdo a García-Guerrero et al. (2003a)) (Figs. 5.2A y 5.3), se tomó una muestra de 8-10 huevos por camada. Dado que previamente se observaron en la especie diferencias en el número de huevos adheridos al primer, segundo, tercer y cuarto par de pleópodos (Yeh & Rouse, 1994), se decidió tomar la muestra de huevos siempre del pleópodo izquierdo del primer par, para descartar posibles diferencias en las variables morfológicas de los huevos dadas por su ubicación en el abdomen de la madre. Asimismo, se trabajó siempre con el mismo estadio del desarrollo embrionario debido a

que se ha observado en diversas especies que el tamaño de los huevos aumenta a lo largo de este periodo (Thatje et al., 2004; Figueiredo et al., 2008).

El peso húmedo de cada huevo se obtuvo dividiendo el peso total de la muestra (precisión: 0,1 mg) por el número de huevos. Los mismos fueron posteriormente medidos bajo lupa (Zeiss®), registrándose la longitud dorso-ventral, anterior-posterior, y derecha-izquierda de cada uno (Fig. 5.3). Finalmente, se determinó el peso seco de los huevos (precisión: 0,1 mg), el cual es un buen indicador de la energía invertida por la madre en cada cría (Attard & Hudon, 1987). Para ello, y con el objetivo de minimizar la volatilización de los lípidos a temperaturas más altas, los huevos fueron secados en estufa a 60°C hasta alcanzar un peso constante (24 hs) (Hines, 1982).

Luego de la eclosión de los huevos (Fig. 5.2B), se registró el tiempo de incubación para cada camada. Los juveniles permanecieron con sus madres hasta alcanzar el estadio independiente JIII (Levi et al., 1999); en ese momento fueron separados de las hembras y contados. Cada madre fue devuelta al acuario correspondiente para obtener puestas consecutivas.

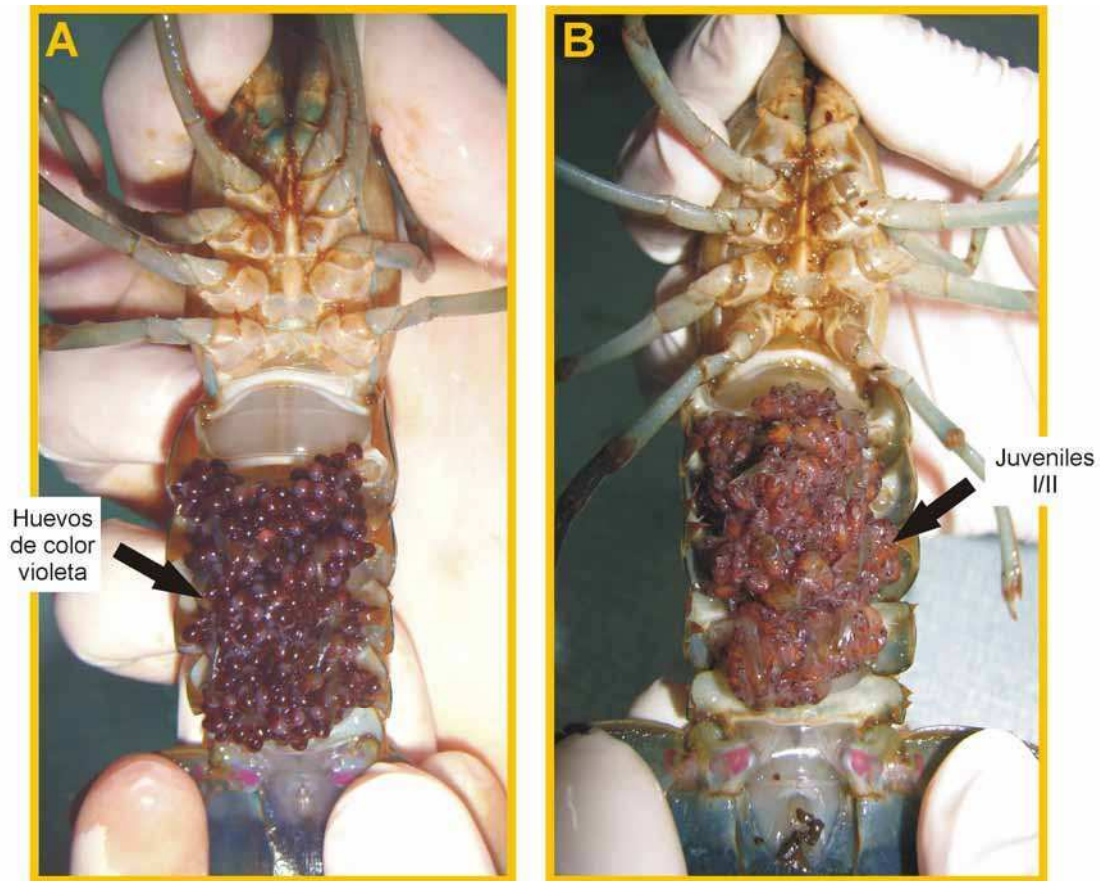


Fig. 5.2. (A) Hembra ovígera de *C. quadricarinatus* con huevos de color violeta, correspondiente al estadio 6-7 del desarrollo embrionario. (B) Hembra ovígera de *C. quadricarinatus* con crías eclosionadas sujetas a los pleópodos (juveniles I/II).

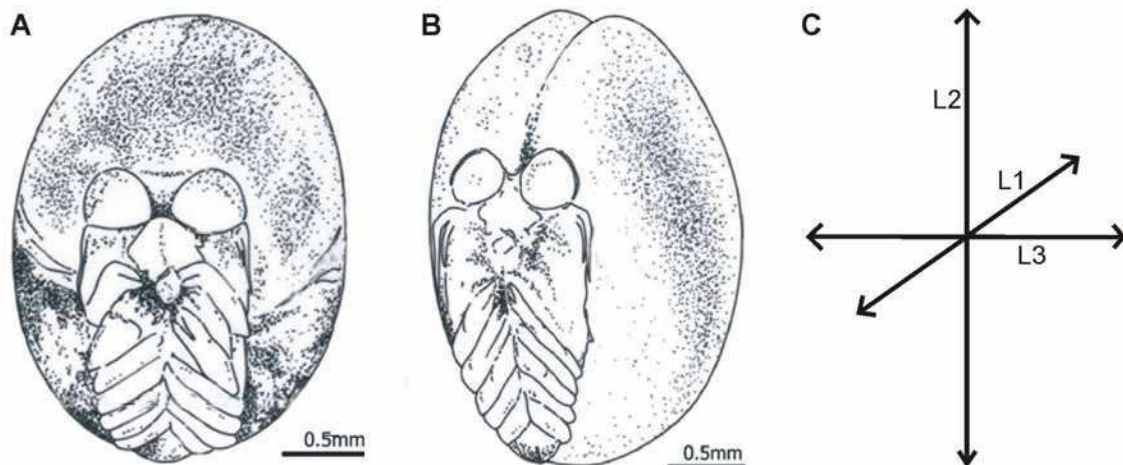


Fig. 5.3. (A) Estadio 6 y (B) estadio 7 de desarrollo embrionario de *C. quadricarinatus*, ambos correspondientes a huevos de color violeta (reproducido de García-Guerrero et al., 2003a). (C) Variables morfométricas de los huevos medidas bajo lupa. L1: longitud dorso-ventral, L2: longitud anterior-posterior, L3: longitud derecha-izquierda.

5.3.4 Calidad de los juveniles

Posteriormente, se determinó la calidad de los juveniles mediante el siguiente procedimiento:

- 1) De cada camada obtenida se tomaron 5 muestras de 8 JIII cada una (n=40), los cuales fueron anestesiados con frío y sacrificados. Posteriormente, se registró el peso corporal (PC), y se disecaron y pesaron el pleon (PP) y el hepatopáncreas (PH) de cada JIII (precisión: 0,1 mg). Se calculó un valor promedio de cada variable para el conjunto de las 5 muestras, de manera tal que cada camada constituyó una réplica.
- 2) Se disecó el hepatopáncreas de los JIII de las muestras tomadas previamente, y se fijó en solución acuosa de Bouin durante 4 horas a temperatura ambiente para su análisis histológico. Secciones de 5-7 μm de grosor fueron coloreadas con Hematoxilina-Eosina, de acuerdo a López Greco et al. (2007), y al menos 3 secciones de cada muestra fueron examinadas bajo microscopio óptico (Imager A.1, Zeiss®) y fotografiadas con cámara Leica® ICC50 de 3 mpx, para evaluar la estructura del hepatopáncreas.
- 3) De cada camada obtenida se tomó una muestra de 10 JIII y se midieron bajo lupa (Zeiss®) con un lente ocular micrométrico calibrado las siguientes variables morfométricas: largo del cefalotórax (LC), entre el extremo anterior del rostro y el extremo posterior del cefalotórax; y el largo postorbital del cefalotórax (LPC), entre el margen posterior de la órbita y el extremo posterior del cefalotórax (Fig. 2.3). Se calculó un valor promedio de cada variable para toda la muestra, de manera tal que cada camada constituyó una réplica.

4) Se llevó a cabo un Experimento de Crecimiento para analizar el desempeño de los juveniles (en términos de supervivencia y crecimiento) a lo largo de 2-3 estadios subsiguientes al estadio JIII, de modo similar a estudios realizados con larvas de camarones y cangrejos (Bray & Lawrence, 1992; Hernández-Herrera et al., 2001; Wu et al., 2010). Para ello se tomó de cada camada obtenida una muestra de 12 JIII, que fueron pesados (peso corporal inicial: PCI) y luego colocados en recipientes individuales de 500 cm³, cada uno de los cuales contaba con un trozo (4x4 cm) de red de tipo “cebollera” como refugio (Stumpf et al., 2010). Los recipientes fueron ubicados en una cuba de contención que contaba con un calentador ATMAN® y un sistema de aireación, de tal modo que la temperatura del agua se mantuvo en $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y cada recipiente recibía aireación de manera individual (Fig. 5.4). Los juveniles fueron alimentados diariamente y *ad libitum* con Tetracolor, TETRA®, y el agua de los recipientes fue completamente renovada 2 veces a la semana. La mortalidad fue registrada diariamente. Al término del periodo experimental (30 días) los animales fueron sacrificados y se registraron los siguientes parámetros: peso corporal final (PCF), LC, LPC, PP y PH. Luego se calculó un valor promedio de cada variable para toda la muestra, de manera tal que cada camada constituyó una réplica.

Todo el procedimiento descripto fue realizado tanto para las primeras como para las segundas puestas de las “hembras grandes” y “hembras pequeñas”, durante la época reproductiva de la especie en Argentina (desde agosto hasta marzo); el periodo experimental total fue de 150 días.

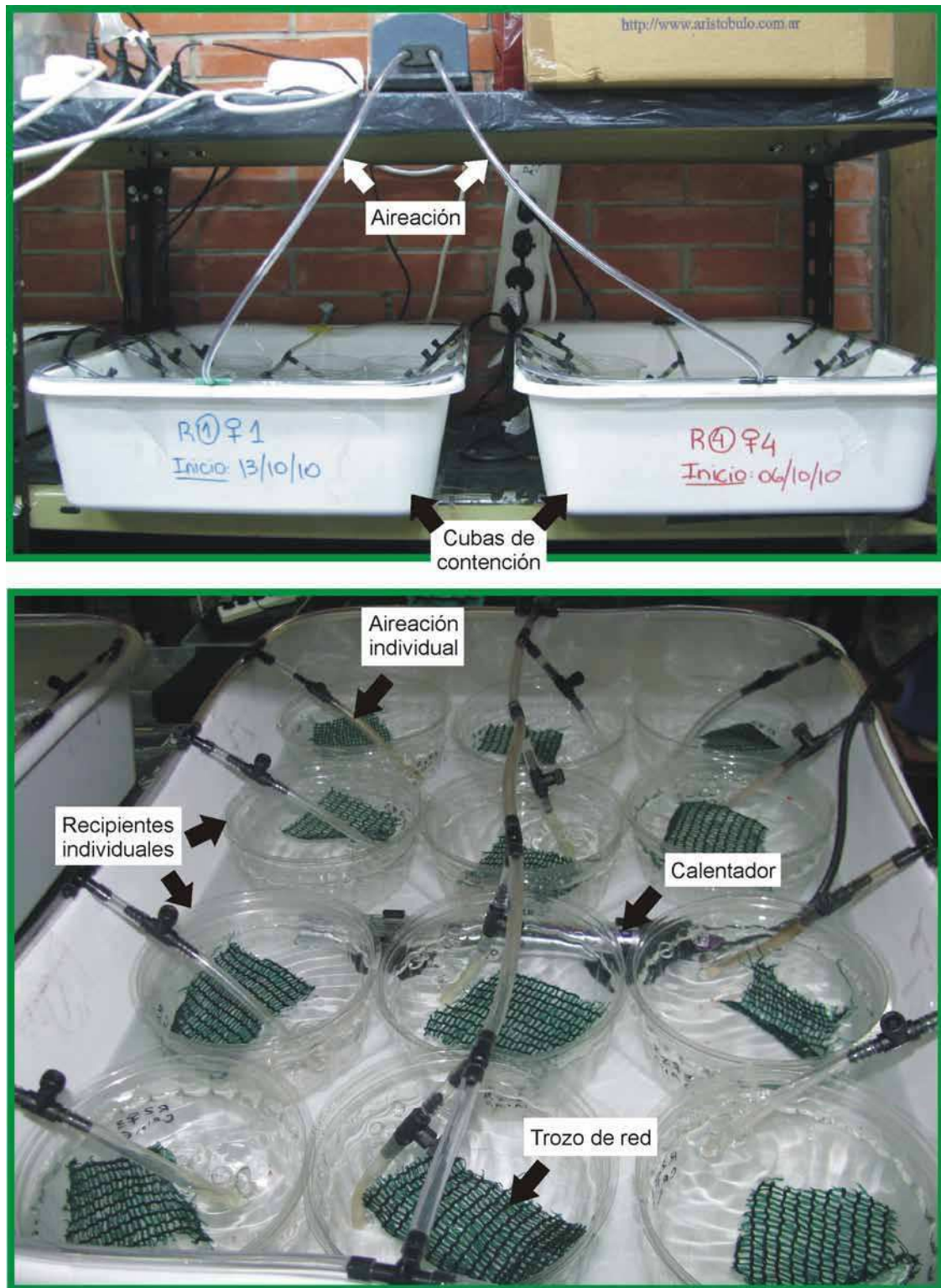


Fig. 5.4. Diseño experimental para evaluar el crecimiento de juveniles de *C. quadricarinatus* durante 1 mes: cada cuba de contención contiene 12 recipientes individuales y constituye una réplica. Tanto la temperatura como la aireación (individual) del agua son constantes. Los refugios consisten en trozos de red de tipo “cebollera”.

5.3.5 Índices calculados

Las fórmulas utilizadas para calcular los índices relativos a las variables de producción fueron las siguientes:

- Tasa de Puesta, $TP = 100 * (\text{número de hembras ovígeras} / \text{número total de hembras})$ (Wu et al., 2010);
- Tasa de Puesta Exitosa, $TPE = 100 * (\text{número de camadas que eclosionaron} / \text{número total de hembras ovígeras})$ (Wu et al., 2010);
- Fecundidad Actual, $FA = \text{número total de JIII} / \text{hembra}$ (Nhan et al., 2009; Wu et al., 2010);
- Fecundidad Actual Relativa, $FAR = \text{número total de JIII} / \text{peso corporal de la hembra}$ (Rodríguez-González et al., 2006; Nhan et al., 2009; Wu et al., 2010);
- Desempeño reproductivo, $DR = 100 * (\text{peso húmedo total de los JIII de una camada} / \text{peso corporal de la hembra})$ (Hines, 1982, 1991).

Las fórmulas utilizadas para calcular los índices relativos a las variables morfológicas de huevos y juveniles y al crecimiento de los juveniles fueron las siguientes:

- Volumen por Huevo, $VH = 4/3 * \pi * r1 * r2 * r3$, en donde $r1$, $r2$ y $r3$ son los radios correspondientes a la longitud dorso-ventral, anterior-posterior y derecha-izquierda, respectivamente (García-Guerrero & Hendrickx, 2006) (Fig. 5.3);
- Peso Relativo del Pleon para los JIII y juveniles al mes de crecimiento, $PRP = 100 * (PP/PC)$ y $PRP = 100 * (PP/PCF)$, respectivamente;
- Índice hepatosomático para los JIII y juveniles al mes de crecimiento, $IHS = 100 * (PH/PC)$ y $IHS = 100 * (PH/PCF)$, respectivamente (Jussila & Mannonen, 1997);

- Tasa de Crecimiento Específica para el Experimento de Crecimiento, TCE = $100 * ((\log_e \text{PCF} - \log_e \text{PCI}) / \text{tiempo})$, donde el tiempo fue expresado en días (Jussila & Evans, 1996, 1997; Reynolds, 2002);
- Incremento de Peso para el Experimento de Crecimiento, IP = $100 * ((\text{PCF} - \text{PCI}) / \text{PCI})$ (Jones, 1995b);
- Supervivencia durante el Experimento de Crecimiento = porcentaje de juveniles vivos al término de periodos de 5 días durante 1 mes (un total de 6 periodos).

Todos los índices descriptos fueron calculados para cada camada (réplica), excepto TP y TPE, los cuales fueron calculados para cada grupo de hembras.

5.3.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de 1 factor (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995) para comparar entre el Grupo A y B dentro de las primeras puestas y entre puestas dentro del Grupo A, las variables morfométricas (LC, LPC, VH) y pesos (PC, peso húmedo y seco de los huevos) registrados, los índices (IHS, PRP, TCE, IP) calculados tanto para los JIII como para los juveniles al mes de crecimiento, la supervivencia para estos últimos, y algunas variables de producción (FA, FAR, DR).

La TP y TPE fueron analizadas mediante la prueba exacta de Fisher (Sokal & Rohlf, 1995). Asimismo, se analizaron las siguientes relaciones mediante regresión lineal (Sokal & Rohlf, 1995): FA, VH y peso húmedo/seco de los huevos *versus* el peso de la madre; VH, y peso húmedo/seco de los huevos *versus* la FA. Se utilizó la transformación \log_{10} de los datos de FA y peso de la hembra para eliminar la correlación entre la variabilidad en la FA y el tamaño de la hembra (Sommers, 1991). Los resultados por tratamientos son presentados como $\text{media} \pm \text{ES}$, de acuerdo a Fotedar

(2004). Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significación del 95%, mediante el programa Statistica 6.0, StatSoft Inc.

5.4 Resultados

El tiempo de incubación de los huevos fue similar para todas las camadas, abarcando un periodo de 5 a 7 semanas (35-49 días), que coincide con el previamente reportado por Yeh & Rouse (1994) y Masser & Rouse (1997).

Dado que el número mínimo necesario de crías por camada para analizar las variables morfológicas de los JIII y realizar el Experimento de Crecimiento fue de 62, se decidió no incluir a aquellas camadas formadas por menos de 70 crías en el análisis de las variables de producción (excepto la TP y TPE) y de las variables morfológicas (2 camadas del Grupo A y 1 camada del Grupo B excluidas).

5.4.1 Primeras puestas

5.4.1.1 Variables de producción

Las hembras pertenecientes al Grupo A (“hembras grandes”) presentaron una fecundidad actual (FA) más alta que la de las hembras pertenecientes al Grupo B (“hembras pequeñas”) ($p=0,001$; Tabla 5.1). El rango de FA abarcó valores desde 157 hasta 447 y desde 113 hasta 249 JIII/hembra, respectivamente (Fig. 5.5A). La relación entre el peso de la hembra y la FA estuvo definida por la siguiente regresión lineal significativa: $\log_{10} FA = 0,7703 * \log_{10} (\text{peso hembra}) + 1,1145$ ($n=21$; $p=0,000$; $r^2=0,4417$) (Fig. 5.5B).

Asimismo, el Grupo A mostró una tendencia, no significativa, hacia un mayor valor de tasa de puesta (TP) ($p>0,05$; Tabla 5.1). El desempeño reproductivo (DR), por el contrario, tendió a ser mayor en el Grupo B ($p>0,05$; Tabla 5.1). Finalmente, la tasa de puesta exitosa (TPE) y la fecundidad actual relativa (FAR) no variaron con el peso de la hembra ($p>0,05$; Tabla 5.1).

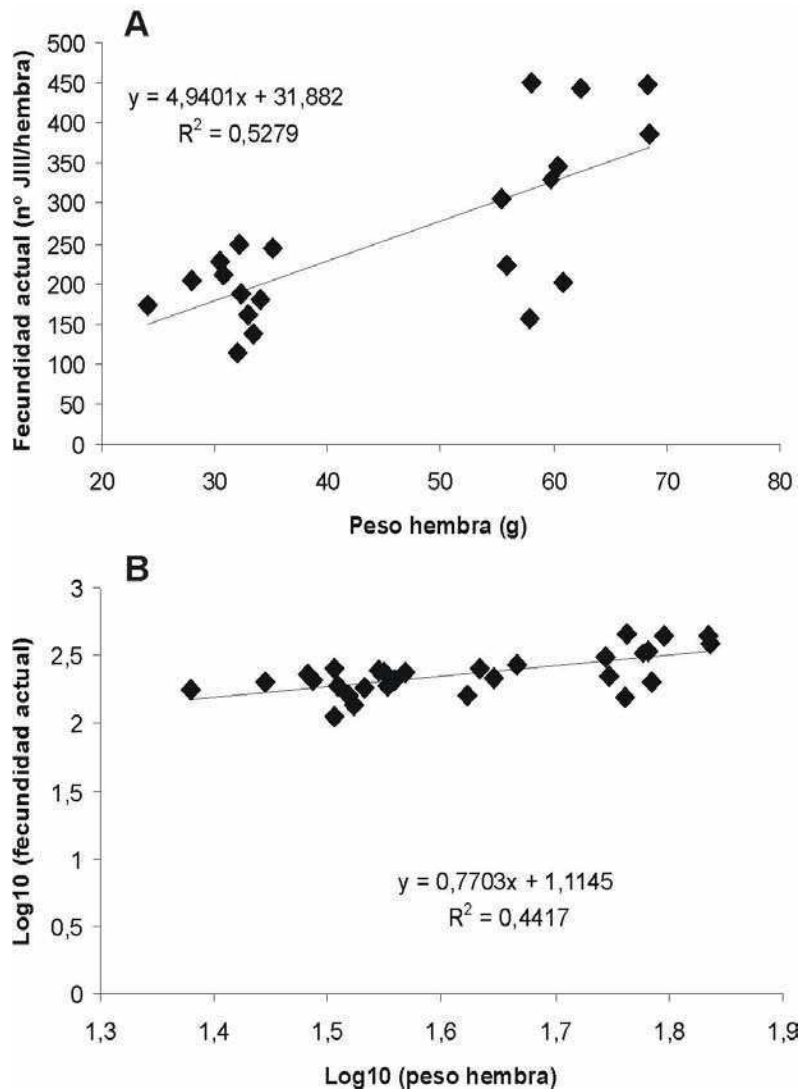


Fig. 5.5. Relación entre el peso de la hembra y la fecundidad actual para las primeras camadas de *C. quadricarinatus* (n=21). (A) Relación entre variables sin transformar. (B) Relación entre variables luego de aplicar la transformación \log_{10} .

5.4.1.2 Variables morfológicas

No se observó una regresión lineal significativa entre el volumen de los huevos y el peso húmedo/seco de los huevos *versus* la FA ($p > 0,05$; Fig. 5.6). El volumen y peso húmedo/seco de los huevos tampoco variaron con el peso de la hembra ($p > 0,05$; Fig. 5.6; Tabla 5.1).

En cuanto a los JIII, todas las variables analizadas (peso corporal: PC, largo del cefalotórax: LC, largo postorbital del cefalotórax: LPC, peso relativo del pleon: PRP, índice hepatosomático: IHS) fueron similares en las primeras camadas de los Grupos A y B ($p > 0,05$; Tabla 5.1).

Asimismo, el análisis histológico del hepatopáncreas de los JIII reveló la ausencia de diferencias estructurales entre el Grupo A y B. En ambos casos, se observó una fase de diferenciación temprana del hepatopáncreas, en relación al hepatopáncreas de juveniles de mayor tamaño (Calvo et al., 2011) y adultos (López Greco, comunicación personal), con las siguientes características: (1) ausencia de túbulos hepatopancreáticos o presencia de túbulos pequeños, escasamente desarrollados; (2) epitelio tubular compuesto principalmente por células conteniendo gran cantidad de vacuolas, las cuales constituían posiblemente células B y R en un estadio temprano de diferenciación; y (3) presencia de células F grandes, con núcleos de gran tamaño (Fig. 5.7).

Por otro lado, en el Experimento de Crecimiento la supervivencia de los juveniles tendió a ser mayor en el Grupo B respecto al Grupo A desde el día 10, si bien dicha diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$; Figs. 5.8, 5.9 y 5.10; Tabla 5.1). El incremento de peso (IP) y tasa de crecimiento específica (TCE), al igual que el LC, LPC, PC, PRP y IHS fueron similares en ambos grupos ($p > 0,05$; Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Efecto del tamaño de la madre y del número de puestas sobre las variables de producción y las variables morfológicas de los huevos, juveniles III y juveniles al término de 1 mes de crecimiento en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Parámetro	Primeras puestas		Segundas puestas	
	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
VARIABLES DE PRODUCCIÓN				
TP (%)	80,00 ^a (n=12)	57,14 ^a (n=12)	50,00 ^a (n=6)	25 ^a (n=3)
TPE (%)	100 ^a	100 ^a	66,67 ^a	66,67 ^a
FA	328,70 ± 33,77 ^a	189,64 ± 12,91 ^b	343,67 ± 40,05 ^a	202,00 ± 6,00
FAR	5,38 ± 0,49 ^a	6,11 ± 0,44 ^a	5,61 ± 0,41 ^a	6,41 ± 0,81
DR (%)	8,72 ± 0,84 ^a	11,06 ± 0,70 ^a	9,41 ± 0,63 ^a	10,6 ± 0,46
VARIABLES MORFOLOÓGICAS				
<i>Huevos</i>				
Peso húmedo (mg)	5,15 ± 0,17 ^a	5,15 ± 0,13 ^a	5,38	5,74 ± 0,57
Peso seco (mg)	2,26 ± 0,07 ^a	2,29 ± 0,07 ^a	2,38	2,38 ± 0,28
Volumen (mm ³)	6,50 ± 0,31 ^a	6,47 ± 0,17 ^a	7,52	6,90 ± 6,82
<i>Juveniles III (JIII)</i>				
PC (mg)	16,24 ± 0,32 ^a	16,66 ± 0,52 ^a	16,79 ± 0,21 ^a	16,70 ± 1,40
PRP (%)	19,62 ± 0,58 ^a	20,31 ± 0,53 ^a	18,63 ± 2,44 ^a	22,24 ± 0,84
IHS (%)	4,01 ± 0,44 ^a	4,10 ± 0,51 ^a	3,11 ± 0,13 ^a	5,03 ± 0,64
LC (mm)	4,67 ± 0,05 ^a	4,68 ± 0,04 ^a	4,81 ± 0,11 ^a	4,73 ± 0,02
LPC (mm)	3,28 ± 0,03 ^a	3,29 ± 0,03 ^a	3,39 ± 0,10 ^a	3,33 ± 0,03
<i>Juveniles de 1 mes</i>				
Supervivencia (%)	36,67 ± 11,33 ^a	64,29 ± 7,86 ^a	41,66 ± 22,05 ^a	62,50 ± 12,50
PCF (g)	123,46 ± 15,85 ^a	117,59 ± 14,45 ^a	135,10 ± 1,23	144,50 ± 25,90
PRP (%)	26,27 ± 0,68 ^a	26,23 ± 0,67 ^a	28,05 ± 0,35	28,41 ± 0,28
IHS (%)	6,06 ± 0,41 ^a	6,02 ± 0,24 ^a	6,83 ± 0,54	7,46 ± 0,54
LC (mm)	9,61 ± 0,38 ^a	9,18 ± 0,39 ^a	9,43 ± 0,04	9,43 ± 0,93
LPC (mm)	6,56 ± 0,23 ^a	6,29 ± 0,27 ^a	6,55 ± 0,23	6,66 ± 0,56
IP (%)	630,83 ± 94,23 ^a	606,25 ± 75,41 ^a	702,28 ± 8,70	774,85 ± 213,16
TCE (%/día)	6,33 ± 0,46 ^a	6,32 ± 0,38 ^a	6,87 ± 0,11	6,96 ± 0,95

Nota: las comparaciones se realizaron entre el Grupo A (“hembras grandes”) y B (“hembras pequeñas”) para cada número de puesta y entre la primera y segunda puesta dentro de cada grupo cuando esto fue posible. DR: desempeño reproductivo, FA: fecundidad actual, FAR: fecundidad actual relativa, IHS: índice hepatosomático, IP: incremento de peso, LC: largo del cefalotórax, LPC: largo postorbital del cefalotórax, PC: peso corporal, PCF: peso corporal final, PRP: peso relativo del pleon, TCE: tasa de crecimiento específico, TP: tasa de puesta, TPE: tasa de puesta exitosa. El valor de cada variable presentado en la tabla corresponde al promedio de

los valores obtenidos en las camadas de cada grupo experimental. La TP y TPE fueron analizadas mediante la prueba exacta de Fisher, mientras que el resto de las variables presentadas fueron analizadas mediante ANOVA. Aquellos valores (\pm ES) con el mismo superíndice no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$); los valores que carecen de superíndice no fueron incluidos en el análisis estadístico.

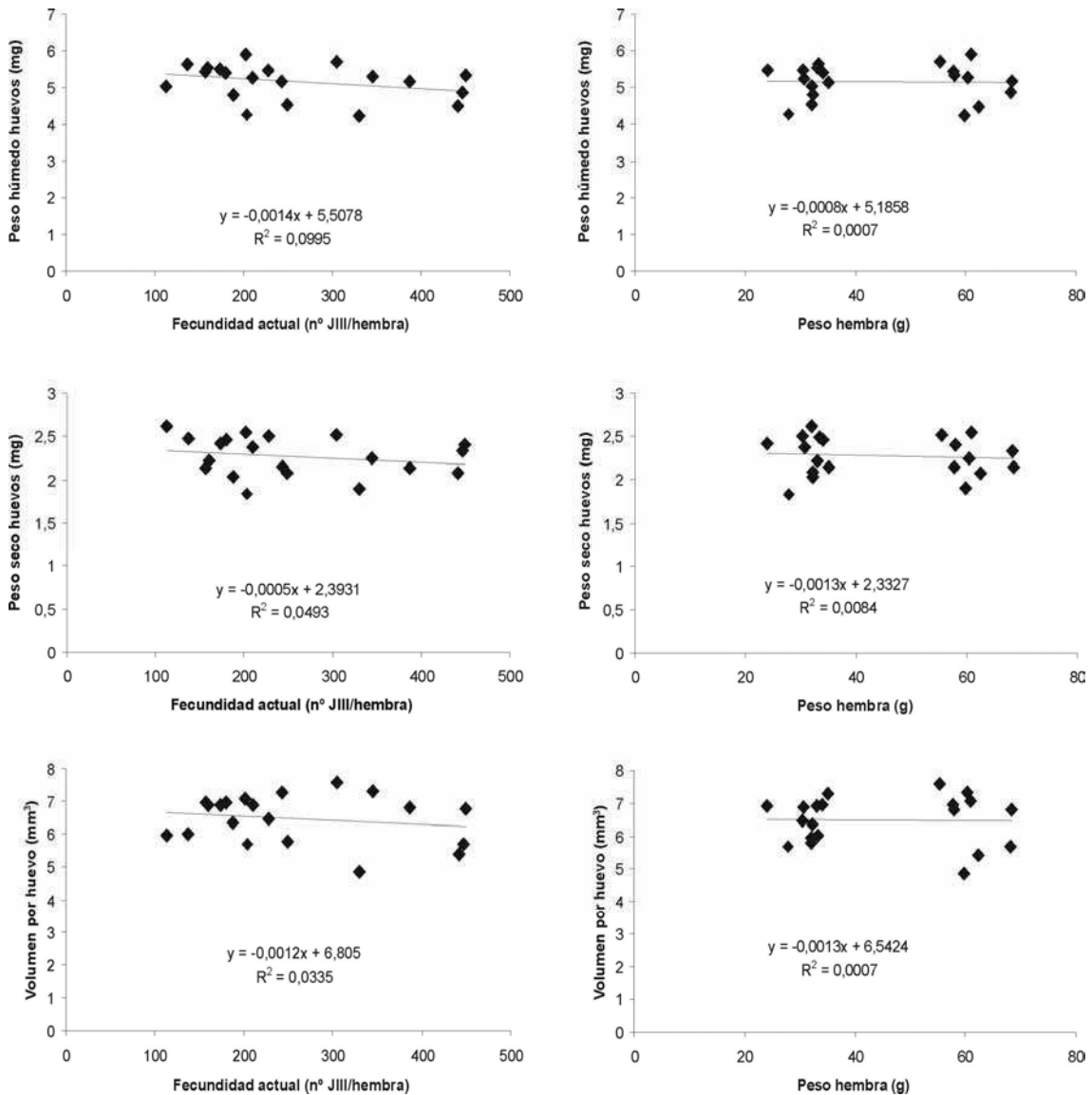


Fig. 5.6. Relación entre el peso (húmedo y seco) y volumen por huevo *versus* la fecundidad actual y el peso de las hembras para las primeras camadas de *C. quadricarinatus* (n=20).

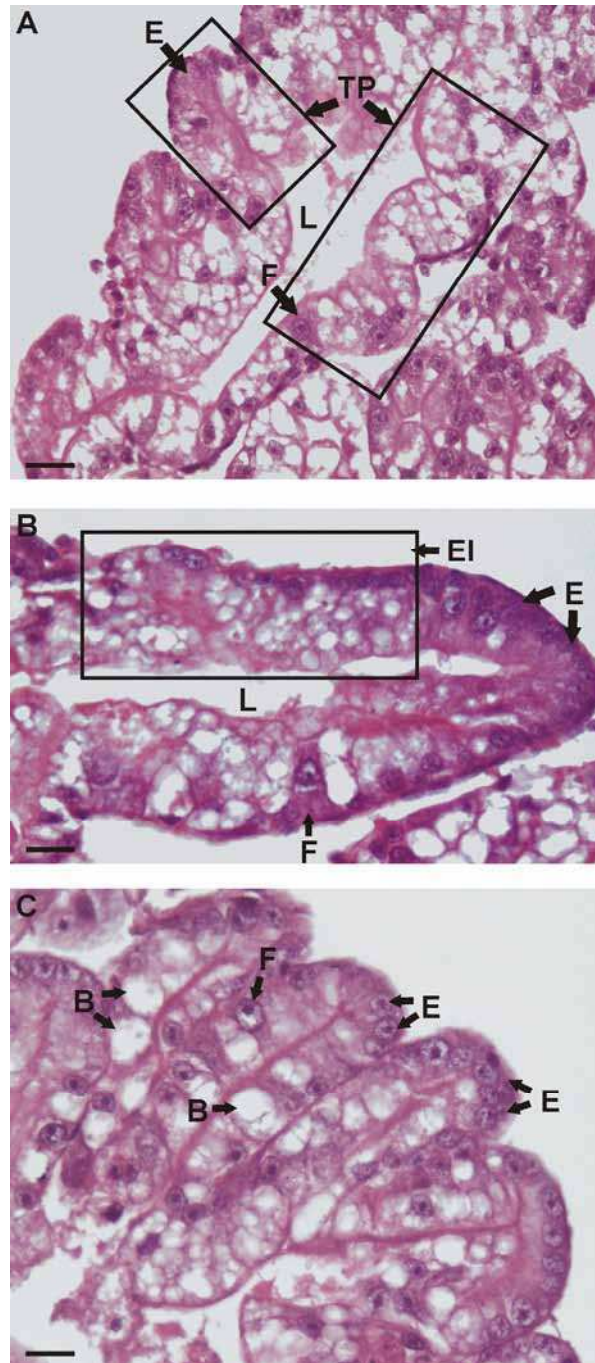


Fig. 5.7. Estructura histológica del hepatopáncreas de juveniles III de *C. quadricarinatus*, coloreado con Hematoxilina-Eosina, mostrando diferentes grados de desarrollo tubular y de diferenciación celular. (A) Sección longitudinal de un hepatopáncreas con túbulos pequeños, cuyos epitelios están compuestos por células B y R indiferenciadas, células F grandes y células E apicales. (B) Sección longitudinal de un túbulo más desarrollado, cuyo epitelio todavía presenta células B y R indiferenciadas. (C) Sección longitudinal de varios túbulos, cuyos epitelios presentan células B ya diferenciadas. Barras de escala: (A): 25 μm ; (B): 20 μm ; (C): 15 μm . B: célula B, E: célula E, EI: epitelio con células B y R indiferenciadas, F: célula F, L: lumen del túbulo, TP: túbulos hepatopancreáticos pequeños.

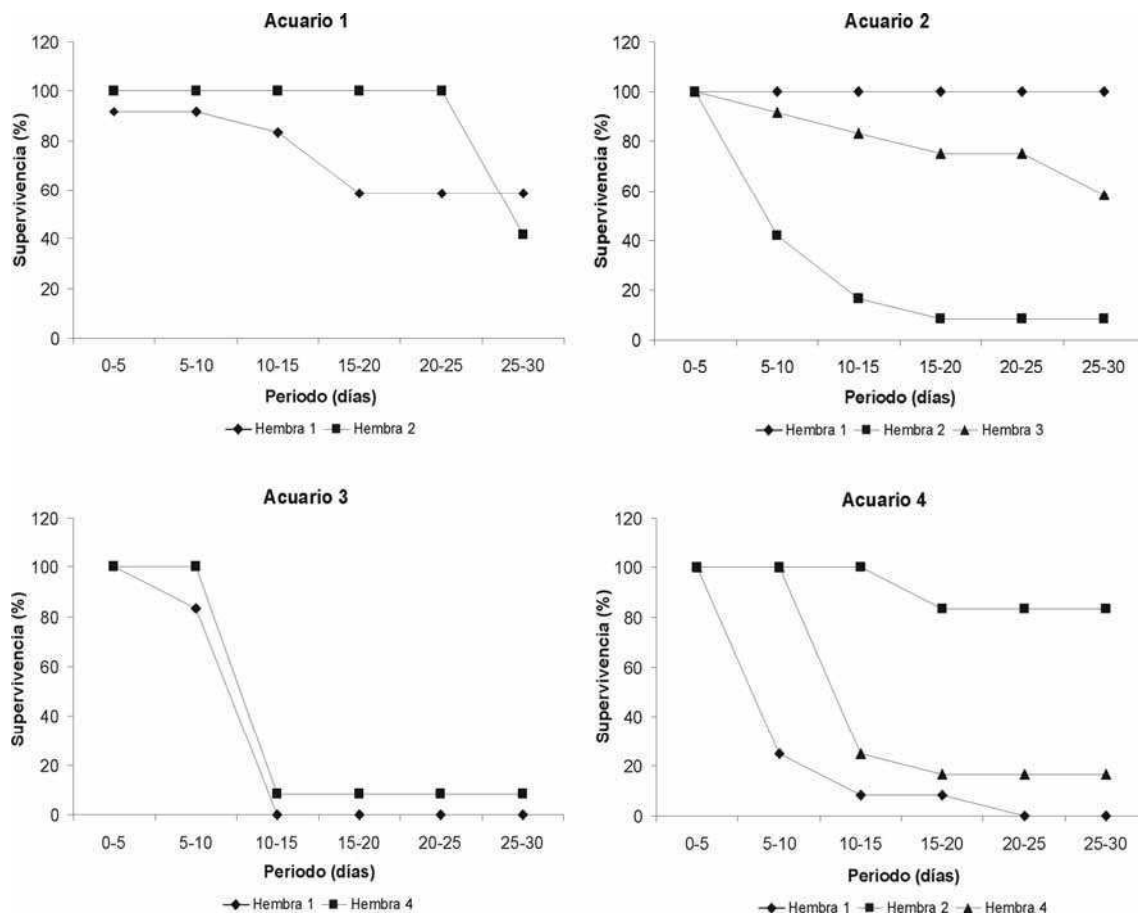


Fig. 5.8. Supervivencia de juveniles de *C. quadricarinatus* provenientes de las primeras camadas de “hembras grandes” a lo largo de un periodo de 30 días. Cada curva corresponde a una camada, y la supervivencia fue analizada en una muestra de 12 animales por camada. Aquellas hembras cuyas camadas no superaron los 70 juveniles III fueron excluidas del Experimento de Crecimiento.

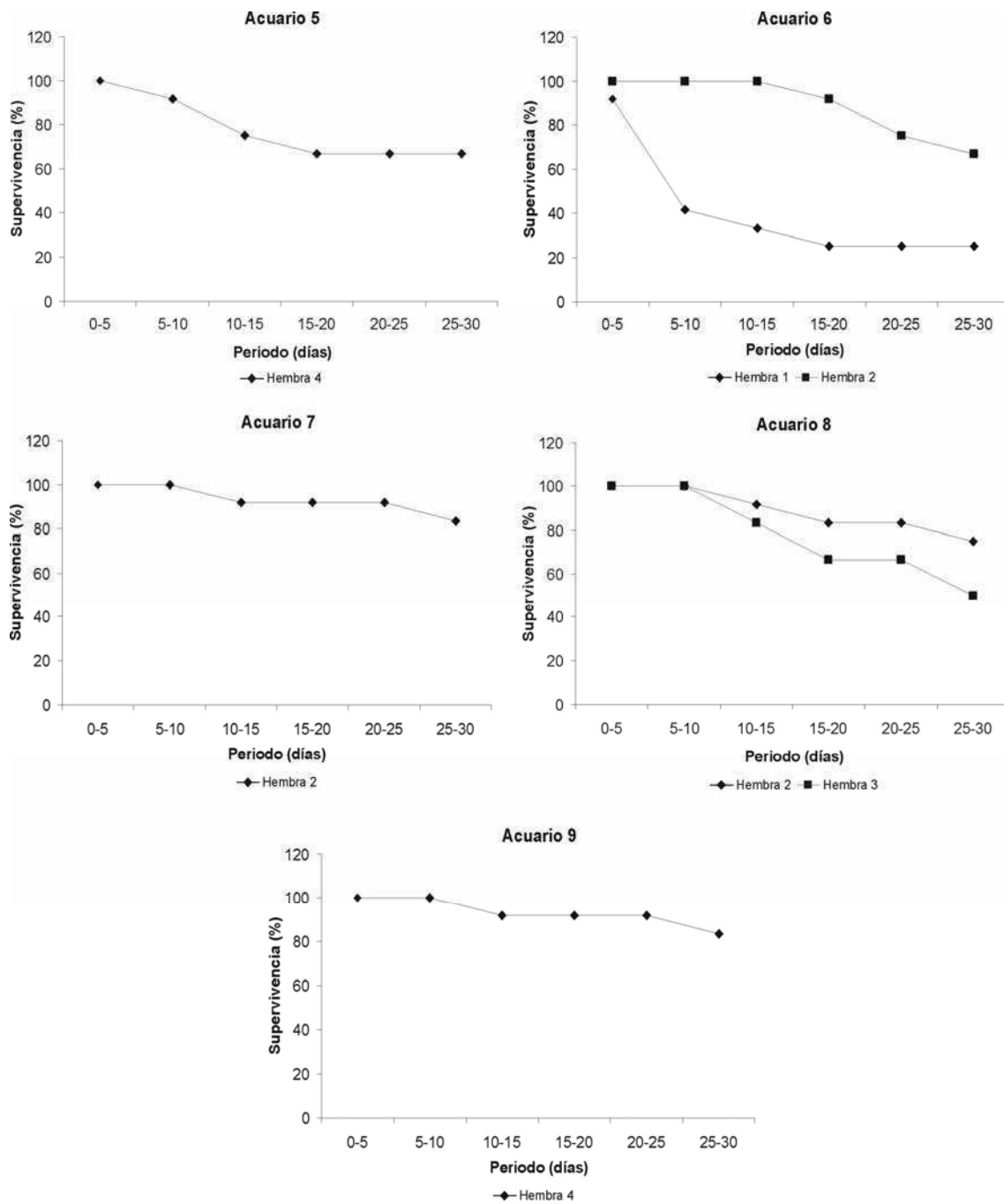


Fig. 5.9. Supervivencia de juveniles de *C. quadricarinatus* provenientes de las primeras puestas de “hembras pequeñas” a lo largo de un periodo de 30 días. Cada curva corresponde a una camada, y la supervivencia fue analizada en una muestra de 12 animales por camada. Aquellas hembras cuyas puestas no superaron los 70 juveniles III fueron excluidas del Experimento de Crecimiento.

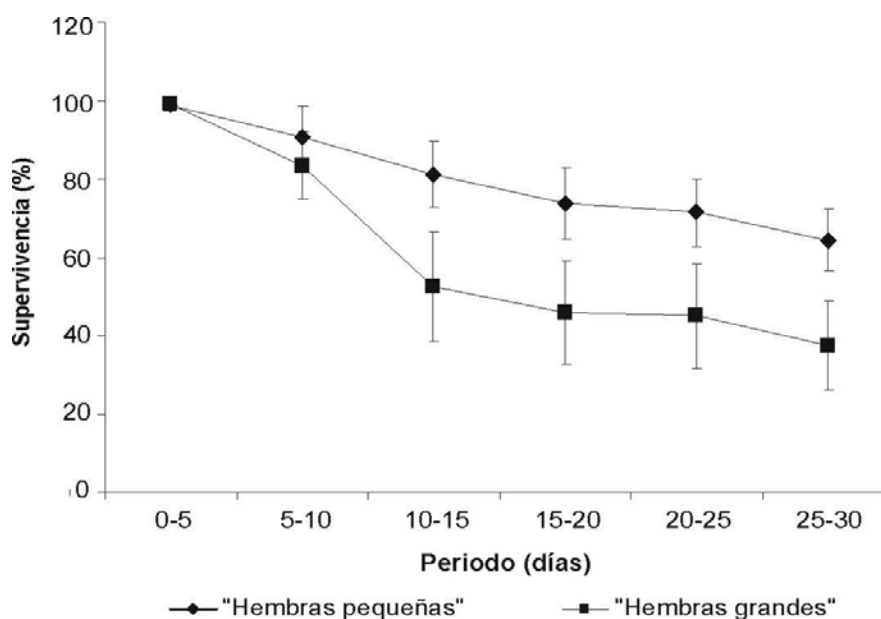


Fig. 5.10. Supervivencia promedio de juveniles de *C. quadricarinatus* provenientes de las primeras puestas de hembras de diferente peso (“hembras grandes” y “hembras pequeñas”) a lo largo de un periodo de 30 días.

5.4.2 Segundas puestas

El número de hembras ovígeras en el Grupo A fue de 6, perdiéndose 2 camadas antes de su eclosión y excluyéndose 1 camada del análisis debido al bajo número de crías eclosionadas (menor a 70). En el Grupo B el número de hembras ovígeras fue de 3, perdiéndose 1 camada antes de su eclosión. De este modo, se obtuvieron pocas segundas puestas en ambos grupos de hembras (3 en el Grupo A y 2 en el Grupo B) y por lo tanto, algunas variables (se especifican cuando corresponde) no pudieron ser analizadas estadísticamente. En consecuencia, los resultados se presentan como observaciones preliminares que requerirían la realización de nuevos experimentos para incrementar el número de segundas puestas.

Por otro lado, se obtuvo una única tercera puesta dentro del Grupo B, por lo que no se incluyó su análisis en la presente tesis.

5.4.2.1 Variables de producción

Los datos de FA, FAR y DR correspondientes a las segundas camadas de las “hembras pequeñas” no pudieron ser incluidos en el análisis estadístico (Tabla 5.1). En el caso de las “hembras grandes”, las 3 variables de producción mencionadas fueron similares en puestas consecutivas ($p>0,05$; Tabla 5.1).

El rango de FA de las segundas puestas abarcó valores desde 290 hasta 422 y desde 196 hasta 208 JIII/hembra para el Grupo A y B, respectivamente (Fig. 5.11A). La relación entre el peso de la hembra y la FA está dada por la siguiente regresión lineal significativa: $\log_{10} FA = 0,7937 * \log_{10} (\text{peso hembra}) + 1,1142$ ($n=5$; $p=0,027$; $r^2=0,8448$) (Fig. 5.11B).

Las “hembras grandes” no difirieron en la TP ni en la TPE con las puestas consecutivas, aunque se observó una tendencia hacia valores menores de dichas variables en las segundas puestas. En las 2 hembras que perdieron los huevos antes de su eclosión, se detectó una gran invasión de hongos en los mismos. En cuanto a las “hembras pequeñas”, se observó la misma tendencia que en el Grupo A, de tal modo que no hubo diferencias significativas en la TP y TPE entre ambos grupos para las segundas puestas ($p>0,05$; Tabla 5.1).

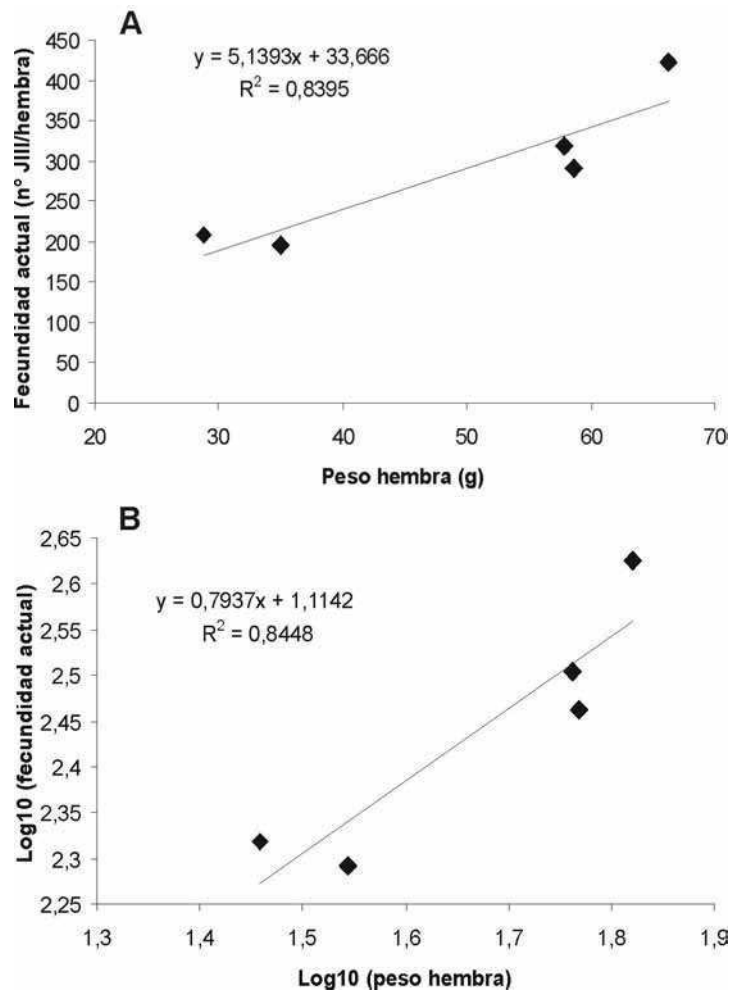


Fig. 5.11. Relación entre el peso de la hembra y la fecundidad actual para las segundas camadas de *C. quadricarinatus* (n=5). A) Relación entre variables sin transformar. (B) Relación entre variables luego de aplicar la transformación log_{10} .

5.4.2.2 Variables morfológicas

El VH y peso húmedo/seco de los huevos no pudieron ser comparados mediante ANOVA dado que se contó sólo con 1 dato para las “hembras grandes” y 2 datos para las “hembras pequeñas”. Por este motivo, tampoco se pudo determinar la existencia de una relación estadística entre el VH y el peso húmedo/seco de los huevos *versus* la FA y el peso de la hembra.

Los datos correspondientes al PC, LC, LPC, PRP y IHS de los JIII de las segundas camadas de las “hembras pequeñas” no pudieron ser incluidos en el análisis estadístico, debido a que, como se mencionó previamente, se contó solamente con 2 valores por variable. En el caso de las “hembras grandes”, las 5 variables mencionadas fueron similares en puestas consecutivas ($p>0,05$; Tabla 5.1).

El análisis histológico del hepatopáncreas de los JIII reveló la ausencia de diferencias estructurales entre las primeras y las segundas camadas. Las características encontradas se detallan en la sección previa (Fig. 5.7).

Respecto al Experimento de Crecimiento, el mismo se pudo llevar a cabo sólo con 2 segundas camadas del Grupo A y con las únicas 2 segundas camadas del Grupo B, por lo que el IP, TCE, LC, LPC, PCF, PRP y IHS no pudieron ser contrastados estadísticamente. Sin embargo, se observó una tendencia hacia valores similares de las variables mencionadas entre las segundas camadas de las “hembras grandes” y de las “hembras pequeñas”. Asimismo, los valores correspondientes al PCF, PRP, IHS, IP y TCE tendieron a ser mayores en las segundas puestas respecto a las primeras, tanto en el Grupo A como en el Grupo B. La supervivencia de los juveniles por su parte, no difirió significativamente entre las primeras y segundas puestas de las “hembras grandes” ($p>0,05$). Si bien no fue posible analizar estadísticamente los valores correspondientes a las “hembras pequeñas”, se observó una tendencia hacia una mayor supervivencia de los juveniles pertenecientes a las segundas camadas del Grupo B respecto al Grupo A (de modo similar a lo que ocurrió con las primeras puestas) (Fig. 5.12; Tabla 5.1).

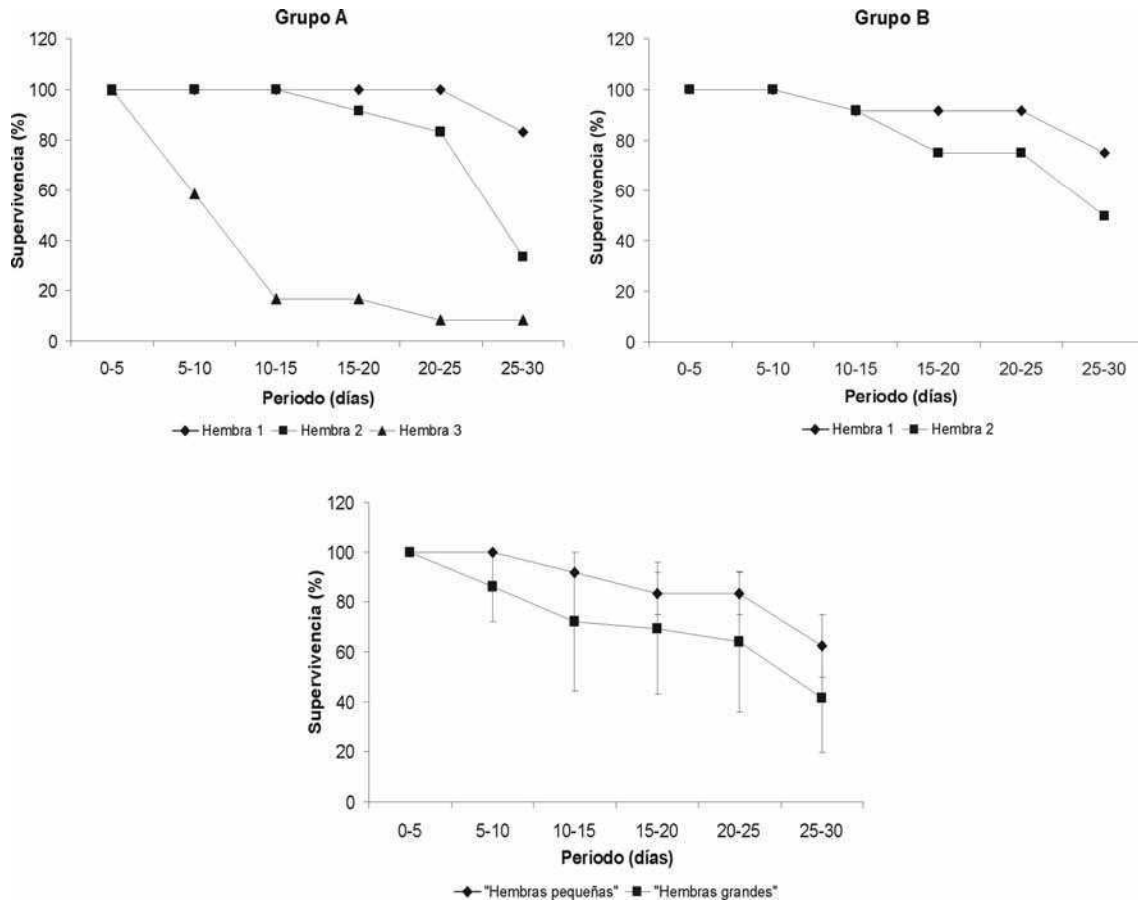


Fig. 5.12. Supervivencia de juveniles de *C. quadricarinatus* provenientes de las segundas puestas del Grupo A (“hembras grandes”) y del Grupo B (“hembras pequeñas”) a lo largo de un periodo de 30 días. Cada curva corresponde a una camada, y la supervivencia fue analizada en una muestra de 12 animales por camada. Aquellas hembras cuyas camadas no superaron los 70 juveniles III fueron excluidas del Experimento de Crecimiento.

5.5 Discusión

Se discutirán principalmente los resultados obtenidos en las primeras puestas de las “hembras grandes” y las “hembras pequeñas”, dado que se contó con un número de réplicas adecuado para todas las variables analizadas, permitiendo su contrastación estadística.

Luego se discutirán los resultados más importantes obtenidos en las segundas camadas, y su relación con aquellos obtenidos en las primeras puestas. Para la mayoría de las variables se hablará de tendencias dado que no se contó con el número de réplicas suficiente para realizar su contrastación estadística. Por este motivo, **las hipótesis de trabajo 10 y 11 no pudieron ser puestas a prueba**, y no serán mencionadas en la sección correspondiente.

5.5.1 Primeras puestas

Las variables de producción y las variables morfológicas de los huevos son las más estudiadas a la hora de analizar el desempeño reproductivo de las especies de crustáceos decápodos. Las variables de producción analizadas en el presente trabajo no variaron significativamente con el peso de la hembra, excepto la fecundidad actual (FA, medida en términos de número de juveniles independizados/hembra), la cual duplicó en “hembras grandes” aquella de las “hembras pequeñas”. Un resultado similar fue previamente reportado por Austin (1998), Truong et al. (2002) y Kozák et al. (2006) en las langostas de agua dulce *C. quadricarinatus*, *C. destructor* y *Orconectes limosus*, respectivamente. Los coeficientes de correlación hallados en el presente trabajo y en los estudios mencionados fueron altamente variables. Particularmente, el coeficiente reportado por Austin (1998) fue mayor que el encontrado en la presente tesis ($R^2=0,67$ y

$R^2=0,53$, respectivamente), debiéndose tal discrepancia quizás a las distintas poblaciones consideradas, como fue propuesto inicialmente por Carral et al. (1994).

La fecundidad se mide generalmente en términos de número de huevos/hembra (fecundidad realizada), y correlaciona comúnmente con el tamaño de la hembra en los crustáceos decápodos, tales como camarones (Hansford & Marsden, 1995; Anger & Moreira, 1998; Hoang et al., 2002b; Thatje et al., 2004), cangrejos anomuros y braquiuros (Hines, 1982; Van Dover & Williams, 1991; Sampedro et al., 1997; Pinheiro & Terceiro, 2000; Brante et al., 2003; Litulo, 2005; Figueiredo et al., 2008), langostas marinas del género *Jasus* (Arana et al., 1985; Báez et al., 1985; Annala & Bycroft, 1987), y langostas de agua dulce (Carral et al., 1994; Honan & Mitchell, 1995; Austin, 1998; Nakata & Goshima, 2004; Maguire et al., 2005; Kozák et al., 2006; Sáez-Royuela et al., 2006). La fecundidad realizada previamente registrada en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* presenta el mismo patrón (King, 1993; Jones, 1997; Masser & Rouse, 1997; Austin, 1998). En base a estas observaciones previas, es improbable que en el presente trabajo las “hembras pequeñas” hayan desovado el mismo número de huevos que las “hembras grandes” y que luego hayan perdido una mayor cantidad de huevos por una menor calidad o por un cuidado maternal deficiente.

Por lo tanto, los resultados presentes sobre la FA diferencial reflejarían una fecundidad realizada diferencial entre hembras de distinto peso, lo cual podría estar relacionada con el hecho de que hembras más grandes presentan un mayor volumen de la cavidad corporal, donde los oocitos maduran antes de la puesta, como fue propuesto por Hines (1982, 1991) y Luppi et al. (1997), quienes también observaron una correlación positiva entre el número de huevos y el tamaño corporal en varias especies de cangrejos braquiuros. King (1993) reportó que en *C. quadricarinatus* el tamaño de una camada (C, número de huevos en los pleópodos) se relaciona linealmente con el

peso húmedo de la hembra (W) mediante la fórmula: $C = 106 + 6,5^*W$. Los resultados obtenidos en la presente tesis presentan un buen ajuste a esta fórmula, si se descuenta del valor obtenido un 30% de huevos que se pierden durante la incubación, de acuerdo a Masser & Rouse (1997).

La FA resultó ser más variable para las “hembras grandes” que para las “hembras pequeñas”, hecho común en los crustáceos (Somers, 1991). Carral et al. (1994) y Sáez-Royuela et al. (2006) observaron en langostas de agua dulce una gran variabilidad en la fecundidad realizada para una determinada talla de las hembras, debido a diferencias en el tamaño de los huevos o a puestas anormalmente grandes o pequeñas. Dichos factores no explicarían la variabilidad encontrada en la presente tesis, dado que las camadas anormalmente pequeñas (con menos de 70 crías) fueron excluidas del análisis y además el tamaño de los huevos fue homogéneo (ver más abajo). Por lo tanto, y en base a los resultados obtenidos, el peso de la madre resultaría ser un mejor indicador de su potencial reproductivo (en términos de número de JIII que puede producir) para el rango de tallas correspondiente al de las “hembras pequeñas” que para aquel correspondiente al de las “hembras grandes”.

La fecundidad actual relativa (FAR), por otro lado, fue similar en el Grupo A y B, y alcanzó un valor promedio de 5,7 JIII por gramo de hembra. Este valor fue ligeramente menor que el informado por Masser & Rouse (1997), pero mayor que el informado por Austin (1998) para la misma especie. Algunos aspectos metodológicos, principalmente aquellos relacionados con el manejo de las hembras durante el periodo experimental, podrían explicar estos resultados variables. En este sentido, Smith & Ritar (2005) demostraron que el disturbio físico (ej: manipulación) de los reproductores afectan el desempeño reproductivo y larval en la langosta espinosa *Jasus edwardsii*. Sin embargo, no se puede descartar el factor genético como causante de las diferencias

observadas, dado que diversos autores han mostrado una significativa variabilidad genética, morfológica y de crecimiento entre distintas poblaciones de *C. quadricarinatus* (Gu et al., 1995; Macaranas et al., 1995; Austin & Knott, 1996).

En el caso de la tasa de puesta (TP), se observó una tendencia hacia un incremento de la misma con el tamaño de la hembra, como se encontró previamente en camarones peneidos (Menasveta et al., 1994; Palacios et al., 2000). Esto podría estar asociado con el tamaño de los machos utilizados en el experimento, dado que Masser & Rouse (1997) establecieron que la puesta de huevos puede ser suprimida en hasta un 50% si el tamaño del macho no es similar al de la hembra (en un rango de 30 g). En el presente trabajo, ambos grupos de hembras fueron colocados con machos de 70-90 g, un tamaño más cercano al de las “hembras grandes”, lo cual podría explicar la tendencia observada en la TP. Sin embargo, es importante aclarar que el uso de machos del mismo peso (dentro de un rango acotado) fue necesario para descartar un posible efecto del tamaño del macho sobre la calidad de la progenie, dado que se ha demostrado que dicho factor afecta la tasa de fertilización de los huevos, la calidad espermática y el volumen eyaculado en algunas especies de crustáceos decápodos (MacDiarmid & Butler, 1999; Ceballos-Vázquez et al., 2003; Rubolini et al., 2006; Sato et al., 2006).

La tasa de puesta exitosa (TPE), por el contrario, no varió con el tamaño de la hembra, lo cual implica que los cuidados maternos no se ven afectados por el mismo. No se ha encontrado bibliografía sobre la TPE en otras especies de crustáceos decápodos para ser comparada con los presentes resultados.

Finalmente, el desempeño reproductivo (DR) tendió a diferir con el tamaño de la hembra; los valores obtenidos en el presente trabajo implican que el peso de la camada constituye aproximadamente un 11 y 9% del peso corporal de la hembra en “hembras pequeñas” y “hembras grandes”, respectivamente. Hines (1982, 1991) encontró un valor

similar de DR al estudiar varias especies de cangrejos braquiuros, si bien el autor evaluó el peso seco de los huevos. En esta tesis, el DR fue calculado utilizando el peso total de los JIII de una camada, dado que no fue posible contar el elevado número de huevos desovados por hembra sin desprenderlos de los pleópodos.

Los resultados discutidos hasta aquí muestran que de las cinco variables de producción analizadas, sólo una de ellas (la FA) aumenta significativamente con el tamaño de la madre. Por lo tanto, **la hipótesis de trabajo 8 es aceptada parcialmente.**

Con respecto a las características morfológicas de los huevos, Clarke (1993) ha mostrado previamente una correlación positiva entre el tamaño de los huevos y el nivel de nutrientes almacenados en los mismos. Tanto el volumen como el diámetro de los huevos son fáciles y rápidos de medir; por lo tanto, se consideran generalmente como buenos indicadores de su calidad (García-Ulloa et al., 2004). En el presente trabajo, el tamaño de los huevos (medido en términos de volumen) y peso no se correlacionaron con el peso de la hembra, lo cual implicaría que la cantidad de reservas transferidas por la madre a los huevos fue similar e independiente de su tamaño. Ésta pareciera ser la tendencia general en varias especies de cangrejos (Hines, 1991; Rabalais, 1991; DeMartini & Williams, 2001; Sato & Yoseda, 2008) y langostas de agua dulce (Abrahamsson, 1971; Skurdal & Qvenild, 1986; Harlioğlu & Türkgülü, 2000; Carral et al., 2004; Nakata et al., 2004; Kozák et al., 2006; Sáez-Royuela et al., 2006). Sin embargo, en las langostas marinas *H. gammarus* (Tully et al., 2001; Jørstad et al., 2005; Agnalt, 2008; Moland et al., 2010) y *H. americanus* (Attard & Hudon, 1987), en las langostas de agua dulce *Austropotamobius torrentium* (Eversole et al., 2002; Stucki, 2002; Maguire et al., 2005), *Cambaroides japonicus* (Nakata & Goshima, 2004), *Pacifastacus leniusculus* (Mason, 1978) y *Astacus leptodactylus* (Stucki, 1999), y en algunas especies de cangrejos anomuros (Van Dover & Williams, 1991) el tamaño/peso

medio de los huevos aumenta con el tamaño de la madre. Por lo tanto, pareciera que la relación entre ambos parámetros no está asociada al tipo de desarrollo postembrionario (desarrollo directo/indirecto).

La producción de huevos, por otro lado, depende generalmente del tipo de dieta suministrada a los reproductores, dado que una porción significativa de las proteínas y lípidos sintetizados a partir del alimento ingerido son requeridos durante la maduración ovárica (Morrissey, 1975; Bromage, 1995; Harrison, 1997; García-Ulloa, 2000). En este sentido, Rodríguez-González et al. (2006) encontraron que el volumen y el peso de los huevos de *C. quadricarinatus* varían con los niveles de proteína cruda en la dieta de los reproductores. En la presente tesis, el hecho de que las “hembras pequeñas” y las “hembras grandes” hayan sido alimentadas con la misma dieta podría explicar la similitud encontrada en la calidad de sus huevos.

También se ha observado que el tamaño de los huevos no se correlaciona con la FA, siendo éste el primer reporte en una especie de langosta de la familia Parastacidae. Dicho resultado concuerda con aquellos reportados para algunas especies de langostas pertenecientes a las familias Astacidae y Cambaridae (Maguire et al., 2005; Kozák et al., 2006; Sáez-Royuela et al., 2006), si bien en dichos estudios se analizó la relación entre el tamaño de los huevos y la fecundidad realizada, no la actual. En *C. quadricarinatus*, el tamaño de los huevos pareciera ser un parámetro fijo e independiente del peso de la madre y la FA. Dado el límite en el tamaño de la puesta (ver valor de DR), huevos de un mismo tamaño resultarían en un número menor de huevos en hembras más pequeñas, como ya fue discutido al comienzo de esta sección.

Algunos autores han encontrado en langostas marinas y cangrejos que el tamaño de los huevos se relaciona estrechamente con el tamaño larval, lo cual implica que el primero es una buena aproximación del segundo (Attard & Hudon, 1987; Hamasaki et

al., 2003; Ouellet & Plante, 2004; Moland et al., 2010). Del mismo modo, la similitud observada en el presente trabajo en el volumen y peso de los huevos desovados por hembras de diferente peso resultó en un similar tamaño y peso de los JIII. Este resultado se relacionaría con el hecho de que dado que los estadios JI y JII permanecen sujetos a la madre y dependen de las reservas de vitelo localizadas en el cefalotórax, el tamaño y estado nutricional de los JIII estaría determinado en definitiva, y al momento de independizarse de la madre, por las reservas de vitelo transferidas por la misma al huevo. La evaluación del hepatopáncreas (análisis histológico e índice hepatosomático) de los JIII también sugiere que el peso de la madre no tendría ninguna influencia sobre el estado nutricional de los juveniles. En su conjunto, estos resultados muestran una clara correspondencia entre la similitud en el tamaño de los huevos y la similitud en las características morfológicas de los JIII. Asimismo, éste constituye el primer estudio que muestra la estructura del hepatopáncreas de juveniles que se encuentran atravesando una fase transicional desde organismos dependientes del vitelo (lecitotróficos) hacia organismos de alimentación libre, lo cual explicaría el estado “inmaduro” o “indiferenciado” de la glándula digestiva desde un punto de vista histológico, en comparación con juveniles de mayor tamaño (Calvo et al., 2011; López Greco et al., 2011).

La ausencia de relación entre el tamaño/peso de los JIII y el peso materno pareciera contradecir resultados previos en especies de decápodos de desarrollo indirecto, según los cuales hembras más grandes producen crías más grandes (Moland et al., 2010; Sato & Suzuki, 2010). En estas especies, la mortalidad durante la fase larval es generalmente muy elevada (Cushing, 1988), pero decrece rápidamente al incrementarse el tamaño de las larvas, dado que un mayor tamaño corporal reduce la susceptibilidad a los predadores (Miller et al., 1988), e incrementa la resistencia a

condiciones estresantes relacionadas con la disponibilidad de alimento (Mashiko, 1985; Sato & Suzuki, 2010). Por lo tanto, el tamaño de las crías al momento de la eclosión es crucial para la supervivencia larval. Varias teorías intentan explicar la razón por la que el tamaño de la progenie se correlaciona positivamente con el tamaño de la hembra en la langosta marina europea (Parker & Begon, 1986; Hendry et al., 2001; Sakai & Harada, 2001). La presente tesis constituye el primer trabajo que muestra la independencia entre el tamaño de los juveniles recién independizados y el tamaño de la madre en una especie que presenta desarrollo directo. Se requieren estudios futuros para profundizar este tema en otras especies de desarrollo directo.

Con respecto al crecimiento de los juveniles, no se detectaron diferencias entre las camadas de las “hembras grandes” y las “hembras pequeñas”. Aún así, la supervivencia tendió a ser menor en las primeras, presentándose la mayor mortalidad entre los días 10 y 15 del periodo experimental. Este tiempo coincide aproximadamente con la duración del estadio JIII (Stumpf et al., 2010), con lo cual el incremento en la mortalidad en ese momento podría estar asociado con la muda de JIII a JIV. Este resultado contribuye a expandir la escasa bibliografía disponible hasta el momento sobre la influencia materna en el desempeño de estadios más avanzados de larvas/juveniles en crustáceos decápodos. La inclusión en futuros estudios de experimentos en los que los juveniles provenientes de hembras de distinto tamaño sean expuestos a condiciones estresantes sería de gran utilidad para determinar si la influencia materna (dada por su tamaño corporal) se expresa solamente, o más fuertemente, cuando la disponibilidad de determinados recursos es limitada, como fue propuesto por Moland et al. (2010).

Dados los resultados discutidos en relación a las variables morfológicas de los huevos y los juveniles, **se rechaza la hipótesis de trabajo 9.**

5.5.2 Segundas puestas

Se observaron segundas puestas tanto en las “hembras grandes” como en las “hembras pequeñas”, si bien la TP tendió a ser mayor en las primeras que en las segundas. Del total de hembras dentro del Grupo A y B, sólo un 40% (n=6) y un 14% (n=3) desovaron por segunda vez, respectivamente, mientras que un 5% (n=1) desovó por tercera vez sólo en el Grupo B. Se sabe que hembras más grandes producen un mayor número de puestas consecutivas que hembras más pequeñas en camarones (Menasveta et al., 1994; Hoang et al., 2002b). Los resultados preliminares obtenidos en el presente trabajo no concuerdan con dichos estudios; sin embargo, el escaso número de segundas y terceras puestas obtenido hacen necesario una evaluación más profunda de este factor.

La razón por la que algunas hembras producen más de una puesta de calidad comparable y otras hembras producen sólo una puesta bajo las mismas condiciones experimentales se desconoce, pero probablemente se relacione con diferencias genéticas. Las mismas se traducirían en diferencias en la regulación endócrina, en los caminos metabólicos y en la capacidad digestiva de las hembras (Racotta et al., 2003).

El conjunto de las variables de producción analizadas fueron similares en las primeras y segundas puestas de las hembras del Grupo A. Sin embargo, la TP y TPE tendieron claramente a ser menores en las segundas puestas, hecho también observado en el Grupo B. La menor TPE se debió a la pérdida total de huevos en 3 camadas, a causa de su infección por hongos en 2 casos, y a una probable adherencia deficiente de los mismos a los pleópodos en el caso restante. En este último caso, se puede descartar como causante de la pérdida de huevos al contacto agresivo con otras langostas (Carral et al., 1994; Reynolds, 2002; Carral et al., 2004) dado que las hembras fueron mantenidas en acuarios individuales durante la mayor parte del desarrollo embrionario.

Por lo tanto, la presente tesis constituiría el primer registro de cierto grado de deterioro de algunos parámetros reproductivos con las puestas consecutivas en hembras de *C. quadricarinatus*. Este resultado preliminar es interesante desde un punto de vista comercial, dado que indicaría la necesidad de mejorar otros factores que usualmente se controlan y manejan en las *hatcheries*, tales como la cantidad y/o calidad del alimento suministrado a los reproductores (Bray et al., 1990; Marsden et al., 1997; Wyban et al., 1997; Cavalli et al., 1999; Harlioglu et al., 2002; Wu et al., 2007; Hoa et al., 2009; Rodríguez-González et al., 2011), para compensar el posible “agotamiento” de los mismos como consecuencia de las puestas consecutivas. En algunas especies de cangrejos se ha observado que la fecundidad realizada y la fecundidad realizada relativa disminuyen con las puestas consecutivas (Kobayashi, 2001; Ji et al., 2006), mientras que en otras especies ambas variables no difieren entre las primeras y segundas puestas (Millamena & Qunitio, 2000; Wu et al., 2010). La discrepancia entre resultados podría explicarse por diferencias biológicas inherentes a las especies estudiadas.

Respecto a las variables morfológicas de los JIII, no se observaron diferencias entre las primeras y segundas puestas de las “hembras grandes”, tendencia evidente también en cuanto a las variables morfológicas de los huevos y juveniles (Experimento de Crecimiento). Las “hembras pequeñas” mostraron una tendencia similar. A diferencia de estos resultados, Wu et al. (2010) encontraron un mayor tamaño de huevos y larvas del cangrejo *Portunus trituberculatus* en las primeras puestas respecto de las segundas puestas. Los autores proponen como explicación a tal resultado posibles diferencias en la alimentación de los animales durante la primera maduración ovárica (alimento natural) y la remaduración del ovario (alimento de peor calidad nutricional).

CAPITULO 6

Discusión General

El cultivo de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* constituye un campo promisorio dentro de la acuicultura en Argentina, debido a que la especie reúne numerosas ventajas respecto a otras especies de crustáceos de importancia comercial. El hecho de que sea fisiológicamente robusta, tolerando un amplio rango de condiciones ambientales, hace posible su cultivo en diversos hábitats, incluyendo aquellos afectados por la salinización o por una degradación en la calidad del agua. Por lo tanto, para esta actividad se pueden emplear terrenos no aptos para la agricultura tradicional y aguas no adecuadas para el riego (Edgerton, 2005). Asimismo, si bien la producción a gran escala de la langosta de pinzas rojas está destinada a los mercados de consumo, muchos de los juveniles son comercializados como mascotas dado su colorido (principalmente en los machos) y su baja agresividad (permitiendo su mantenimiento en espacios reducidos). De este modo, la especie presenta una importancia comercial adicional para el mercado asociado a las especies ornamentales, siendo requerida por numerosos entusiastas del acuarismo (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2004; Panné Huidobro et al., 2010).

Estos factores convierten al cultivo de la langosta de pinzas rojas en una actividad cuyo desarrollo constituiría un paso hacia un mayor aprovechamiento de los recursos naturales del país y hacia el desarrollo de las economías regionales, principalmente de la zona subtropical del país. Esta zona abarca el norte de Corrientes, de Santa Fe, parte de Tucumán, Jujuy, Santiago del Estero, Salta, Chaco, Misiones y Formosa, en donde se registran altas temperaturas durante 5-7 meses al año, favoreciendo la producción de la especie en estanques externos. El resto de las provincias son consideradas como “marginales” para el cultivo de *C. quadricarinatus* (Luchini, 2004).

En la actualidad esta actividad comercial posee sólo una riqueza potencial en Argentina dado que se carece en muchos casos del conocimiento tecnológico necesario

para su aprovechamiento completo. Esto hace que la producción actual sea baja, sin llegar a cubrir el mercado disponible, lo cual favorece a su vez la comercialización del producto a altos precios (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2004). De hecho, gran parte de las técnicas de cultivo aplicadas son relativamente sencillas, consistiendo principalmente en pequeñas modificaciones que mejoran las tasas de crecimiento y supervivencia de los animales (ej: utilización de refugios).

En la presente tesis se abordó el estudio de diferentes factores que modulan aspectos relacionados con la reproducción, el crecimiento y la calidad de las progenies, como un paso previo al desarrollo de tecnologías más complejas que permitan optimizar el rendimiento en carne y la producción de “semilla” en el cultivo de esta especie de langosta. Se buscó de este modo contribuir al mejoramiento de una actividad económica emergente en nuestro país, mediante la real transferencia del conocimiento científico-tecnológico al campo de la producción.

Cada objetivo planteado fue evaluado desde una aproximación puramente experimental, y la mayoría de las respectivas hipótesis pudieron ser respondidas de manera satisfactoria, si bien se dejan planteados algunos interrogantes derivados de los resultados obtenidos y posibles experimentos futuros para responder a los mismos.

Los tres factores que se investigaron como posibles herramientas para mejorar el rendimiento de los sistemas de cultivo (exposición a una temperatura alta (TA), ablación de la glándula androgénica (GA), y administración de dopamina (DA)), no incrementaron el crecimiento somático ni provocaron la reversión sexual de hembras (hacia machos) ni de machos (hacia “neo-hembras”). Por lo tanto, se concluye que la manipulación específica de dichos factores con la metodología ensayada en la presente tesis no constituye una herramienta eficiente para incrementar la proporción de machos ni el crecimiento de machos y hembras, dejando sin sentido su consideración a la hora

de diseñar tecnologías de cultivo en el país. Sin embargo, permanece vigente la posibilidad de evaluar otros factores, particularmente hormonales, para lograr ambos objetivos. En este sentido, se ha utilizado la administración de 17α -metiltestosterona con la dieta como una herramienta para incrementar la proporción de machos en cultivos de peces ornamentales y para consumo (Kubitza, 2000; James & Sampath, 2006), y en moluscos (Wang & Croll, 2004). Asimismo, la inyección de hormona de crecimiento humana ha demostrado estimular el crecimiento de larvas de la langosta marina *Homarus americanus* y el camarón *Litopenaeus vannamei* (Charmantier et al., 1989; Toullect et al., 1991). Finalmente, la identificación de un gen *insulina-like* que se expresa sólo en la GA de los machos en numerosas especies de crustáceos decápodos y que demostró tener un efecto masculinizante y/o trófico (Ventura et al., 2011), sugiere la posibilidad de administrar insulina para provocar la reversión sexual y/o incrementar el crecimiento somático de las hembras.

Por otra parte, los experimentos que se llevaron a cabo para cumplir con los objetivos propuestos arrojaron ciertos resultados que aportan nuevos conocimientos teóricos, contribuyendo a ampliar la información disponible sobre la biología de *C. quadricarinatus*. Particularmente, se demostró lo siguiente:

- La exposición de hembras juveniles a TA (30°C) induce la ovulación sin la existencia de cópula previa, siendo por lo tanto la puesta de huevos independiente de la cópula y la adherencia de los huevos a los pleópodos de la madre independiente de su fertilización.
- La TA acelera el crecimiento ovárico correspondiente a la primera fase de la vitelogénesis (vitelogénesis primaria) y acelera también la maduración ovárica (vitelogénesis secundaria) en las hembras, mientras que en los machos acelera la espermatogénesis. Dado que en los países tropicales, y particularmente en el

- noreste de Argentina, la temperatura del agua de los estanques de engorde externos (en donde los animales también se reproducen) puede alcanzar 30°C (Masser & Rouse, 1997; Wicky et al., 2008), sería interesante determinar si la TA incrementa también la producción espermática de los machos.
- La TA ejerce un efecto sexo-dependiente sobre los parámetros de crecimiento, no influyendo en las hembras pero disminuyendo el crecimiento somático de los machos.
 - La ausencia de la GA en los machos no resulta en un menor crecimiento somático, lo cual le resta peso a la hipótesis de que el mayor crecimiento de los machos respecto a las hembras se debe al efecto directo de un factor androgénico.
 - La GA desempeñaría cierto rol en el desarrollo de algunos caracteres sexuales secundarios en los machos, como los gonoporos masculinos y *appendices masculinae*, pero no en el desarrollo del *red patch*. Sin embargo, trabajos previos presentan resultados que no concuerdan con esto último (Barki et al., 2003; Manor et al., 2004); una manera de clarificar el papel que desempeña esta glándula en la diferenciación del *red patch* consistiría en la manipulación de la GA en juveniles III y la evaluación del efecto de dicho procedimiento hasta la talla teórica en la que se diferencia este carácter. La identificación y aislamiento de el/los factor/es sintetizados y secretados por la GA, constituiría asimismo un paso fundamental que permitiría determinar de manera concluyente y mediante procedimientos sencillos (ej: su inyección en juveniles macho de distinta talla) el rol de la GA en la diferenciación de éste y otros caracteres sexuales.
 - La GA cumpliría un rol también en la organización estructural del vaso deferente (particularmente de su porción distal) y del espermátforo en los

machos. La ausencia de esta GA no afecta el inicio ni compleción de la espermatogénesis; en este sentido, sería interesante cuantificar en futuros trabajos la producción espermática de los machos andrectomizados para determinar el rol de la GA sobre la intensidad de la espermatogénesis.

- La administración de DA retarda el crecimiento ovárico durante la vitelogénesis primaria y también la maduración ovárica, pero sólo al ser inyectada en hembras de una talla comprendida entre 4-14 g, mientras que en hembras de mayor peso la DA no ejerce ningún efecto sobre la maduración ovárica, a diferencia de las especies de crustáceos decápodos previamente estudiadas. Nuevas rutas de administración de DA podrían ser evaluadas en estudios futuros para eliminar el estrés asociado al procedimiento de inyección y la posible degradación o falta de asimilación de la DA administrada con el alimento, factores que podrían haber “enmascarado” los resultados obtenidos. En este sentido, la microencapsulación es una tecnología relativamente reciente que se utiliza para estabilizar, proteger y permitir la liberación lenta de los ingredientes del alimento, siendo utilizada para administrar compuestos químicos conocidos a los organismos acuáticos (Jones et al., 1987; Chen et al., 1992; Villamar & Langdon, 1993). El uso de microcápsulas constituye por lo tanto, una alternativa viable para la administración de DA a hembras juveniles, incrementando así las probabilidades de que mantenga su integridad durante el proceso de digestión y logre ser absorbida de forma eficaz para ejercer su función en los tejidos blanco.
- Si bien *C. quadricarinatus* presenta cierta plasticidad sexual, evidenciada por la presencia de individuos intersexo en la naturaleza y su diferenciación en laboratorio, la reversión sexual de hembra a macho y de macho a hembra (“neo-

hembra”) no es posible (bajo las condiciones experimentales de la presente tesis) mediante la manipulación de la temperatura y la GA, respectivamente.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en todos los experimentos de la presente tesis son relativos a las condiciones experimentales aplicadas en el laboratorio. Las mismas son artificiales en el sentido de que no contemplan las variaciones naturales a las que los animales se ven expuestos en su hábitat natural. Por lo tanto, los conocimientos teóricos obtenidos presentan una limitación en cuanto al grado de extrapolación que se puede realizar de ellos.

En cuanto a los factores evaluados como posibles herramientas para optimizar la producción de “semilla” en criadero (tamaño de la madre y número de puestas), se obtuvieron resultados que constituyen un avance en el conocimiento teórico del desempeño reproductivo de la especie y que presentan también cierta aplicabilidad en cultivo.

Particularmente, la calidad similar de los huevos y juveniles obtenidos a partir de hembras consideradas como pequeñas para ser utilizadas como reproductoras y de hembras que por su tamaño son comúnmente utilizadas como reproductoras en las *hatcheries*, sugiere la posibilidad de utilizar a las “hembras pequeñas” junto a las “hembras grandes”, para incrementar de manera significativa la producción de crías. Esto posibilitaría a su vez hacer uso del potencial reproductivo de las “hembras pequeñas” de manera controlada, dado que hembras de este tamaño igualmente se reproducirían en los estanques de engorde mixtos (Curtis & Jones, 1995). Asimismo, la utilización de dichas hembras permitiría optimizar el manejo del espacio y volumen de agua en las *hatcheries*, ambos limitados, dado que al ser de menor tamaño podrían ser mantenidas a una mayor densidad (cuyo límite superior podría ser determinado en trabajos futuros). Finalmente, el menor costo de alimentación de las “hembras

pequeñas” respecto a las hembras de mayor tamaño, representaría una ventaja adicional de utilizar a las primeras como reproductoras. El uso de machos cuya talla sea equivalente a la de las “hembras pequeñas” podría constituir una manera de mejorar la tasa de puesta de las mismas, si bien esta sugerencia requiere la realización de estudios futuros en los que se evalúe el posible efecto del tamaño de los machos sobre la calidad de las progenies.

Por otro lado, se evidenció cierto deterioro de algunos parámetros de calidad de progenie con las puestas consecutivas. Dado que la calidad de las reservas transferidas por la madre a los huevos depende en gran medida del tipo de alimentación ofrecida a las hembras (Morrissy, 1975; Bromage, 1995; Harrison, 1997; García-Ulloa, 2000), se debe prestar especial atención a dicho factor en las *hatcheries* para mantener una producción estable de “semilla”. En este sentido, un gradual aumento de la cantidad y/o calidad del alimento suministrado a lo largo del periodo reproductivo podría mantener un buen estado fisiológico de las hembras, y permitir de este modo la remaduración normal del ovario.

Sin embargo, se hace necesaria la evaluación futura de la calidad de progenies provenientes de un mayor número de puestas consecutivas que las obtenidas en la presente tesis, para determinar la factibilidad y conveniencia de utilizar todas las puestas de una hembra en los sistemas de cría, y el correcto manejo de la alimentación de los reproductores para compensar su posible “agotamiento” fisiológico.

Bibliografía citada

- Abdu, U., Yehezkel, G., Sagi, A., 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 37, 75-83.
- Abrahamsson, S.A.A., 1971. Density, growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. *Oikos* 22, 373-380.
- Adiyodi, R.G., Subramonian, T., 1983. Arthropoda-Crustacea. En: Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. (Eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates. Oogenesis, Oviposition and Oosorption*. John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 443-495.
- Aflalo, E.D., Hoang, T.T.T., Nguyen, V.H., Lam, Q., Nguyen, D.M., Trinh, Q.S., Raviv, S., Sagi, A., 2006. A novel two-step procedure for mass selection of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 256, 468-478.
- 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 J. Mar. Sci.* 65, 164-170.
- Aiken, D.E., Waddy, S.L., 1992. The growth process in crayfish. *Rev. Aquat. Sci.* 6, 335-381.
- Alfaro, J., Zúñiga, G., Komen, J., 2004. Induction of ovarian maturation and spawning by combined treatment of serotonin and a dopamine antagonist, spiperone in *Litopenaeus stylirostris* and *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 236, 511-522.
- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A., 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* 95, 129-137.
- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A., 1989. Functional cytology of hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Mar. Biol.* 101, 535-544.
- An, C.G., Weng, X.L., Xu, Y.Z., Fan, Y.J., Zhao, Y.L., 2011. Histological and ultrastructural studies on the male reproductive system and spermatogenesis in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *J. Crustac. Biol.* 31, 223-230.
- Anger, K., Moreira, G.S., 1998. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. *J. Crustac. Biol.* 18, 823-838.
- Annala, J.H., Bycroft, B.L., 1987. Fecundity of the New Zealand red rock lobster, *Jasus edwardsii*. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 21, 591-597.
- Arana, P., Dupré, E., Gaete, V., 1985. Ciclo reproductivo, talla de primera madurez sexual y fecundidad de la langosta de Juan Fernández (*Jasus frontalis*). En: Arana, P. (Ed.), *Investigaciones marinas en el Archipiélago de Juan Fernández*. Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile, pp. 187-211.
- Attard, J., Hudon, C., 1987. Embryonic development and energetic investment in egg production in relation to size of female lobster (*Homarus americanus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1157-1164.
- Austin, C.M., 1998. A comparison of clutch and brood size in the Red Claw, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) and the Yabby, *C. destructor* Clark (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture* 167, 135-145.

- Austin, C.M., Knott, B., 1996. Systematics of the freshwater crayfish genus *Cherax* Erichson (Decapoda: Parastacidae) in south-western Australia: electrophoretic, morphological and habitat variation. *Aust. J. Zool.* 44, 223-258.
- Báez, P., Weinborn, A., Martínez, C., 1985. Contribución al conocimiento del recurso langosta de las islas San Félix y San Ambrosio (Crustacea, Decapoda, Palinuridae). En: Arana, P. (Ed.), *Investigaciones marinas en el Archipiélago de Juan Fernández*. Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile, pp. 279-290.
- Balesdent-Marquet, M.L., 1958. Présence d'une glande androgène chez le Crustacé Isopode *Asellus aquaticus*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 247, 534-536.
- Barki, A., Karplus, I., 2000. Crowding female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under small-tanks hatchery conditions: what is the limit? *Aquaculture* 181, 235-240.
- Barki, A., Karplus, I., Khalaila, I., Manor, R., Sagi, A., 2003. Male-like behavioral patterns and physiological alterations induced by androgenic gland implantation in female crayfish. *J. Exp. Biol.* 206, 1791-1797.
- Barki, A., Karplus, I., Manor, R., Sagi, A., 2006. Intersexuality and behavior in crayfish: The de-masculinization effects of androgenic gland ablation. *Hormones and Behavior* 50, 322-331.
- Barthe, J., Mons, N., Cattaert, D., Geffard, M., Clarac, F., 1989. Dopamine and motor activity in the lobster *Homarus gammarus*. *Brain Res.* 497, 368-373.
- Bartlett, P., Bonilla, P., Quiros, L., Takano, M., 1990. Effects of high salinity on the survival and growth of juvenile *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris*, and *P. monodon*. En: *Abstracts of World Aquaculture*. National Research Council, Ontario, Canada, 90, 121/CP6.
- Benzie, J.A.H., Kenway, M., Ballment, E., 2001. Growth of *Penaeus monodon* X *Penaeus esculentus* tiger prawn hybrids relative to the parental species. *Aquaculture* 193, 227-237.
- Berlind, A., Cooke, I.M., 1970. Release of a neurosecretory hormone as peptide by electrical stimulation of crab pericardial organs. *J. Exp. Biol.* 53, 679-686.
- Berreur-Bonnenfant, J., Lawrence, F., 1984. Comparative effect of farnesylacetone on macromolecular synthesis in gonads of crustacean. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54, 462-468.
- Berreur-Bonnenfant, J., Meusy, J.J., Ferezou, J.P., Devys, M., Quesneau-Thierry, A., Barbier, M., 1973. Recherches sur la sécrétion de la glande androgène des Crustacés Malacostracés: Purification d'une substance à activité androgène. *CR. Acad. Sci. Paris* 277, 971-974.
- Brante, A., Fernández, M., Eckerle, L., Mark, F., Pörtner, H.O., Arntz, W., 2003. Reproductive investment in the crab *Cancer setosus* along a latitudinal cline: egg production, embryo losses and embryo ventilation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 251, 221-232.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. En: Fast, A.W., Lester, J.L. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, Amsterdam, pp. 93-170.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., Leung-Trujillo, J.R., 1990. Reproductive performance of ablated *Penaeus stylirostris* fed a soybean lecithin supplement. *J. World Aquac. Soc.* 20, 19A.

- Bray, W.A., Lawrence, A.L., Leung-Trujillo, J.R., 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture* 122, 133-146.
- Bray, W.A., Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., Robertson, S.M., 1985. Preliminary investigation on the effects of temperature, bacterial inoculation, and EDTA on sperm quality in captive *Penaeus setiferus*. *J. World Aquac. Soc.* 16, 250-257.
- Bromage, N., 1995. Broodstock management and seed quality-general considerations. En: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, United Kingdom, pp. 1-24.
- Brown, P.B., Wilson, K.A., Wetzel, J.E., Hoene, B., 1995. Increased densities result in reduced weight gain of crayfish *Orconectes virilis*. *J. World Aquac. Soc.* 26, 165-171.
- Bugnot, A.B., López Greco, L.S., 2009a. Sperm production in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture* 295, 292-299.
- Bugnot, A.B., López Greco, L.S., 2009b. Structural alterations in the male reproductive system of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *J. Invertebr. Pathol.* 102, 160-166.
- Caceci, T., Neck, K.F., Lewis, D.H., Sis, R.F., 1988. Ultrastructure of the hepatopancreas of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 68, 323-337.
- Cahansky, A.V., López Greco, L.S., Rodríguez, E.M., 2002. Inducción de crecimiento ovárico en *Cherax quadricarinatus*, mediante hormonas y neuroreguladores incorporados en el alimento. *CIVA 2002*, pp. 720-724. <http://www.civa2002.org>.
- Cahansky, A.V., López Greco, L.S., Rodríguez, E.M., 2003. Incremento de la producción de hembras ovígeras de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* durante el período reproductivo, mediante la administración de hormonas y neuroreguladores. *CIVA 2003*, pp. 512-517. <http://www.civa2003.org>.
- Cahansky, A.V., Medesani, D.A., Chaulet, A., Rodríguez, E.M., 2011. *In vitro* effects of both dopaminergic and enkephalinergic antagonists on the ovarian growth of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), at different periods of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 158A, 126-131.
- Cahansky, A.V., Medesani, D.A., Rodríguez, E.M., 2008. Induction of ovarian growth in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, by the enkephalinergic naloxone: *in vivo* and *in vitro* studies. *Invertebr. Reprod. Dev.* 51, 61-67.
- Calvo, N.S., Stumpf, L., Pietrokovsky, S., López Greco, L.S., 2011. Early and late effects of feed restriction on survival, growth and hepatopancreas structure in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 319, 355-362.
- Carmona-Osalde, C., Rodríguez-Serna, M., Olvera-Novoa, M.A., Gutiérrez-Yurrita, P.J., 2004. Gonadal development, spawning, growth and survival of the crayfish *Procambarus llamasii* at three different water temperatures. *Aquaculture* 232, 305-316.
- Carpenter, B.M., DeRoos, R., 1970. Seasonal morphology and histology of the androgenic gland of the crayfish *Orconectes nais*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 15, 143-157.

- Carral, J.M., Celada, J.D., González, J., Sáez-Royuela, M., Gaudioso, V.R., 1994. Mating and spawning of freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet, under laboratory conditions. *Aquac. Res.* 25, 721-727.
- Carral, J.M., Pérez, J.R., Celada, J.D., Gonzalez, J., Sáez-Royuela, M., Melendre, P.M., Aguilera, A., 2004. Egg production of the freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) under laboratory conditions: Relationship between egg number, egg diameter and female size. Program and Abstracts of 15th IAA Symposium. London, UK.
- Cavalli, R.O., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1999. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture* 179, 387-402.
- Ceballos-Vázquez, B.P., Rosas, C., Racotta, I.S., 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 228, 141-151.
- Chang, C.C, Wu, Z.R., Chen, C.S., Kuo, C.M. Cheng, W., 2007a. Dopamine modulates the physiological response of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 270, 333-342.
- Chang, C.C., Wu, Z.R., Kuo, C.M., Cheng, W., 2007b. Dopamine depresses immunity in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 24-33.
- Charmantier, G., Charmantier-Dures, M., Aiken, D.E., 1989. Somatotropine stimule la croissance de jeunes homards américains, *Homarus americanus* (Crustacea, Decapoda). *C. R. Acad. Sci. Paris* 308, 21-26.
- Charniaux-Cotton, H., 1952. Castration chirurgicale chez un crustacé amphipode (*Orchestia gammarella*) et déterminisme des caractères sexuels secondaires. Premiers résultats. *C. R. Acad. Sci. Paris* 234, 2570-2572.
- Charniaux-Cotton, H., 1953. Etude du déterminisme des caractères sexuels secondaires par castration chirurgicale et implantation d'ovaire chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*). *C. R. Acad. Sci. Paris* 236, 141-143.
- Charniaux-Cotton, H., 1954. Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires males. *C. R. Acad. Sci. Paris* 239, 780-782.
- Charniaux-Cotton, H., 1955. Le déterminisme hormonal des caractères sexuels d'*Orchestia gammarella* (Crustacé, Amphipode). *C. R. Acad. Sci. Paris* 240, 1487-1489.
- Charniaux-Cotton, H., 1962. Androgenic gland of crustaceans. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1, 241-247.
- Charniaux-Cotton, H., Payen, G., 1985. Sexual differentiation. En: Bliss, D.E., Mantel, L.H. (Eds.), *Integument, Pigments, and Hormonal Processes*. Academic Press, New York, pp. 290-330.
- Charniaux-Cotton, H., Payen, G., 1988. Crustacean reproduction. En: Laufer, H., Downer, R.G.H. (Eds.), *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*. Alan R. Liss, New York, pp. 279-303.
- Chen, Y., Leu, Y.T., Roeland, I., 1992. Determination of quantitative arginine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon* using microencapsulated arginine. *Mar. Biol.* 114, 224-233.

- Chen, Y.N., Fan, H.F., Hsieh, S.L., Kuo, C.M., 2003. Physiological involvement of DA in ovarian development of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 228, 383-395.
- Chiu, H.T., Yeh, S.P., Huang, S.C., Chang, C.C., Kuo, C.M., Cheng, W., 2006. Dopamine induces transient modulation of the physiological responses of white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 251, 558-566.
- Clarke, A., 1993. Egg size and egg composition in polar shrimps (Caridea; Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 168, 189-203.
- Conan, G.Y., 1985. Periodicity and phasing of molting. En: Wenner, A.M. (Ed.), *Factors in adult growth, Crustacean issues 3*. Balkema, Rotterdam, pp. 73-99.
- Cournil, L., Helluy, S.M., Beltz, B.S., 1994. Dopamine in the lobster *Homarus gammarus*: I Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the nervous system of the juvenile. *J. Comp. Neurol.* 344, 455-469.
- Cronin, L.E., 1947. Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. *J. Morphol.* 81, 209-239.
- Cuartas, E.I., Díaz, A.C., Petriella, A.M., 2002. Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Bate) (Crustacea, Penaeoidea). *Rev. Invest. Desarr. Pesq.* 15, 5-13.
- Cui, Z., Liu, H., Sze Lo, T., Chu K.H., 2005. Inhibitory effects of the androgenic gland on ovarian development in the mud crab *Scylla paramamosain*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140A, 343-348.
- Curtis, M.C., Jones, C.M., 1995. Observations on monosex culture of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* von Martens (Decapoda: Parastacidae) in earthen ponds. *J. World Aquac. Soc.* 26, 154-159.
- Cushing, D.H., 1988. The study of stock and recruitment. En: Wiley, J., Sons, J.A. (Eds.), *Dynamics Fish Population*. Gulland, New York, pp. 105-128.
- DeMartini, E.E., Williams, H.A., 2001. Fecundity and egg size of *Scyllarides squammosus* (Decapoda: Scyllaridae) at Maro Reef, Northwestern Hawaiian Islands. *J. Crustac. Biol.* 21, 891-896.
- Dworschak, P.C., 1988. The biology of *Upogebia pusilla* (Petagna) (Decapoda, Thalassinidea). III Growth and Production. *Mar. Ecol.* 9, 51-77.
- Edgerton, B.F., 2005. Freshwater crayfish production for poverty alleviation. *World Aquac.* 36, 48-64.
- Elekes, K., Florey, E., Cahill, M., 1988. Morphology and central synaptic connections of the efferent neurons innervating the crayfish hindgut. *Cell Tissue Res.* 254, 369-379.
- Elofsson, R., Laxmyr, L., Rosengren, E., Hansson, C., 1982. Identification and quantitative measurement of biogenic amines and DOPA in the central nervous system and haemolymph of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol.* 71C, 195-201.
- Emmerson, W.D., 1980. Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2, 121-131.

- Eversole, A.G., Mazlum, Y., Fontenot, Q.C., Turker, H., 2002. Evaluation of a non-invasive technique for predicting reproductive success in white river crayfish. *Freshw. Crayfish* 13, 303-308.
- Ferezou, J.P., Barbier, M., Berreur-Bonnenfant, J., 1978. Biosynthèse de la farnésylacetone (E-E) par les glandes androgènes du crabe *Carcinus maenas*. *Helv. Chim. Acta* 61, 669-674.
- Figueiredo, J., Penha-Lopes, G., Anto, J., Narciso, L., Lin, J., 2008. Fecundity, brood loss and egg development through embryogenesis of *Armases cinereum* (Decapoda: Grapsidae). *Mar. Biol.* 154, 287-294.
- Fingerman, M., 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 7, 1-24.
- Fingerman, M., 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. *Invertebr. Reprod. Dev.* 31, 47-54.
- Fingerman, M., Fingerman, S.W., 1977. Antagonistic actions of dopamine and 5-hydroxytryptamine on color changes in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 58C, 121-127.
- Florey E., Rathmayer, M., 1978. The effects of octopamine and other amines on the heart and on neuromuscular transmissions in decapod crustaceans: further evidence for a role as neurohormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 61C, 229-237.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2010. The state of world fisheries and aquaculture. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm>.
- Fotedar, R., 2004. Effect of dietary protein and lipid source on the growth, survival, condition indices, and body composition of marron, *Cherax tenuimanus* (Smith). *Aquaculture* 230, 439-455.
- Fowler, R.J., Leonard, B.V., 1999. The structure and function of the androgenic gland in *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture* 171, 135-148.
- Franceschini-Vicentini, I.B., Ribeiro, K., Papa, L.P., Junior, J.M., Vicentini, C.A., Valenti, P.M.C.M., 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Int. J. Morphol.* 27, 121-128.
- Fukui, Y., 1988. Comparative studies on the life history of the grapsid crabs (Crustacea, Brachyura) inhabiting intertidal cobble and boulder shores. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 33, 121-162.
- García-Guerrero, M., Hendrickx, M.E., 2006. Embryology of decapod crustaceans, II: Gross embryonic development of *Petrolisthes robsonae* Glassell, 1945 and *Petrolisthes armatus* (Gibbes, 1850) (Decapoda, Anomura, Porcellanidae). *Crustaceana* 78, 1089-1097.
- García-Guerrero, M., Hendrickx, M.E., Villarreal, H., 2003a. Description of the embryonic development of *Cherax quadricarinatus* von Martens, 1868 (Decapoda, Parastacidae), based on the staging method. *Crustaceana* 76, 269-280.
- García-Guerrero, M., Villarreal, H., Racotta, I.S., 2003b. Effect of temperature on lipids, proteins, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 138A, 147-154.

- García-Ulloa, G.M., 2000. Fundamentos de nutrición acuícola. Editorial Folia Universitaria, Universidad Autónoma de Guadalajara, México, 222 pp.
- García-Ulloa, G.M., Rodríguez, H., Ogura, T., 2004. Egg quality of two prawn species (Palaemonidae) of the genus *Macrobrachium* (*M. rosenbergii*, De Man 1879, y *M. tenellum*, Smith, 1871) varying the brood stock diet: morphometric indexes. *Avances en Investigación Agropecuaria* 8, 17-27.
- Ginsburger-Vogel, T., Charniaux-Cotton, H., 1982. Sex determination. En: Abele, L.G. (Ed.), *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York, pp. 257-281.
- Gu, H., Mather, P.B., Capra, M.F., 1994. The relative growth of chelipeds and abdomen and muscle production in male and female redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* von Martens. *Aquaculture* 123, 249-257.
- Gu, H., Mather, P.B., Capra, M.F., 1995. Juvenile growth performance among stocks and families of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture* 134, 29-36.
- Hamasaki, K., Fukuanga, K., Maruyama, K., 2003. Egg development and incubation period of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Decapoda: Portunidae) reared in the laboratory. *Crust. Res.* 32, 45-54.
- Hammond, K.S., Hollows, J.W., Townsend, C.R., Lokman, P.M., 2006. Effects of temperature and water calcium concentration on growth, survival and moulting of freshwater crayfish, *Paranephrops zealandicus*. *Aquaculture* 251, 271-279.
- Hansford, S.W., Marsden, G.E., 1995. Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J. World Aquac. Soc.* 26, 396-405.
- Harlioğlu, M.M., 2009. A comparison of the growth and survival of two freshwater crayfish species, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), under different temperature and density regimes. *Aquac. Int.* 17, 31-43.
- Harlioğlu, M.M., Köprükü, K., Özdemir, Y., 2002. The effect of dietary vitamin E on the pleopodal egg number of *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Aquac. Int.* 10, 391-397.
- Harlioğlu, M.M., Türkgülü, I., 2000. The relationship between egg size and female size in freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Aquac. Int.* 8, 95-98.
- Harrison, E.K., 1997. Broodstock nutrition and maturation diets. En: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Los Angeles, pp. 390-410.
- Hartnoll, R.G., 1982. Growth. En: Bliss, D.E. (Ed.), *The Biology of Crustacea, Embriology, morphology and genetics*. Academic Press, New York, pp. 111-196.
- Hartnoll, R.G., 1983. Strategies of growth in crustaceans. *Mem. Austr. Mus.* 18, 121-131.
- Hartnoll, R.G., 1985. Growth, sexual maturity and reproductive output. En: Wenner, A.M. (Ed.), *Factors in adult growth, Crustacean issues 3*. Balkema, Rotterdam, pp. 101-128.

- Hazlett, B.A., 1983. Parental behavior in decapod Crustacea. En: Rebach, S., Dunham, D.W. (Eds.), Studies in adaptation, The behaviour of higher Crustacea. John Wiley & Sons, New York, pp. 171-193.
- Hendry, A.P., Day, T., 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. *Am. Nat.* 157, 387-407.
- Hernández-Herrera, R., Perez-Rostro, C.I., Arcos, F., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M., Palacios, E., Racotta, I.S., 2001. Predictive criteria of shrimp larval quality: an experimental approach. Larvi 2001 Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Ghent, Belgium.
- Hines, A.H., 1982. Allometric constraints and variables of reproductive effort in Brachyuran crabs. *Mar. Biol.* 69, 309-320.
- Hines, A.H., 1991. Fecundity and reproductive output in nine species of cancer crabs (Crustacea, Brachyura, Cancridae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 267-275.
- Ho, N.D., Wouters, R., Wille, M., Thanh, V., Dong, T.K., Hao, N.V., Sorgeloos, P., 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.
- Hoang, T., Lee, S.Y., Keenan, C.P., Marsden, G.E., 2002a. Maturation and spawning performance of pond-reared *Penaeus merguensis* in different combinations of temperature, light intensity and photoperiod. *Aquac. Res.* 33, 1243-1252.
- Hoang, T., Lee, S.Y., Keenan, C.P., Marsden, G.E., 2002b. Observations on growth, sexual maturity and spawning performance of pondreared *Penaeus merguensis*. *Aquac. Res.* 33, 863-873.
- Holcomb, M., Cloud, J.G., Woosley, J., Ingermann, R.L., 2004. Oxygen consumption in unfertilized salmonid eggs: an indicator of egg quality? *Comp. Biochem. Physiol.* 138A, 349-354.
- Honan, J.A., Mitchell, B.D., 1995. Reproduction of *Euastacus bispinosus* Clark (Decapoda: Parastacidae), and trends in the reproductive biology of the freshwater crayfish. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 45, 485-499.
- Hyatt, R.W., 1948. The biology of the lined shore crab *Pachygrapsus crassipes* Randall. *Pacif. Sci.* 2, 135-213.
- Icely, J.D., Nott, J.A., 1992. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. En: Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, New York, pp. 147-201.
- James, R., Sampath, K., 2006. Effect of dietary administration of methyltestosterone on the growth and sex reversal of two ornamental fish species. *Indian J. Fish.* 53, 283-290.
- Ji, Y., Sui, L.Y., Wu, X.G., Cheng, Y.X., Wille, M., Sorgeloos, P., 2006. Effects of different diets on reproductive performance and HUFA composition of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) broodstock during second spawning. *J. Fish. Sci. China* 13, 92-99.
- Johnson, H.T., 1979. Reproduction, development and breeding activity in the freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark. Master Thesis, University of Sydney, Australia.

- Jones, C.M., 1995a. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae). I. Development of hatchery and nursery procedures. *Aquaculture* 138, 221-238.
- Jones, C.M., 1995b. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae). II. Juvenile nutrition and habitat. *Aquaculture* 138, 239-245.
- Jones, C.M., 1997. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Department of Primary Industries Queensland, Queensland Government, Information Series Q, 130 pp.
- Jones, C.M., Ruscoe, I.M., 2000. Assessment of stocking size and density in the production of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae), cultured under earthen pond conditions. *Aquaculture* 189, 63-71.
- Jones, C.M., Ruscoe, I.M., 2001. Assessment of five shelter types in the production of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) under earthen pond conditions. *J. World Aquac. Soc.* 32, 41-51.
- Jones, D.A., Kurmaly, K., Arshard, A., 1987. Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture* 64, 133-146.
- Jørstad, K.E., Prodöhl, P.A., Kristiansen, T.S., Hughes, M., Farestveit, E., Taggart, J.B., Agnalt, A.L., Ferguson, A., 2005. Communal larval rearing of European lobster (*Homarus gammarus*): family identification by microsatellite DNA profiling and offspring fitness comparisons. *Aquaculture* 247, 275-285.
- Joshi, P.C., Khanna, S.S., 1987. Studies on the androgenic gland of the freshwater crab *Potamon koolooense*. *Rathbun. Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 101, 699-713.
- Juchault, P., Legrand J.J., 1964. Transformation de femelles génétiques en males physiologiques chez les Oniscoides *Porcellio dilatatus* et *Helleria brevicornis*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 258, 2197-2199.
- Jussila, J., Evans, L.H., 1996. On the factors affecting marron, *Cherax tenuimanus*, growth in intensive culture. *Freshw. Crayfish* 11, 428-439.
- Jussila, J., Evans, L.H., 1997. Freshwater crayfish growth under culture conditions: proposition for a standard reporting approach. *J. World Aquac. Soc.* 28, 11-18.
- Jussila, J., Mannonen, A., 1997. Marron (*Cherax tenuimanus*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) hepatopancreas energy and its relationship to moisture content. *Aquaculture* 149, 157-161.
- Karplus, I., Barki, A., Cohen, S., Hulata, G., 1995. Culture of the Australian red-claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel. I. Polyculture with fish in earthen ponds. *Israeli J. Aquac.-Bamidgeh* 47, 6-16.
- Karplus, I., Gideon, H., Barki, A., 2003a. Shifting the natural spring-summer breeding season of the Australian freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* into the winter by environmental manipulations. *Aquaculture* 220, 277-286.
- Karplus, I., Sagi, A., Khalaila, I., Barki, A., 2003b. The soft red patch of the Australian freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus* (von Martens)): a review and prospects for future research. *J. Zool.* 259, 375-379.

- Karplus, I., Sagi, A., Khalaila, I., Barki, A., 2003c. The influence of androgenic gland implantation on the agonistic behavior of female crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in interactions with males. *Behaviour* 140, 649-663.
- Katakura, Y., 1960. Transformation of ovary into testis following implantation of androgenic gland in *Armadillium vulgare*, an isopod crustacean. *Annot. Zool. Jpn.* 33, 241-244.
- Katakura, Y., 1961. Hormonal control of development of sexual characters in the isopod crustacean, *Armadillium vulgare*. *Annot. Zool. Jpn.* 34, 60-71.
- Katakura, Y., 1984. Sex differentiation and androgenic gland hormone in the terrestrial isopod *Armadillium vulgare*. *Symp. Zool. Soc. London* 53, 127-142.
- Katakura, Y., 1989. Endocrine and genetic control of sex differentiation in the malacostracan Crustacea. *Invertebr. Reprod. Dev.* 16, 177-182.
- Khalaila, I., Katz, T., Abdu, U., Yehezkel, G., Sagi, A., 2001. Effects of implantation of hypertrophied androgenic glands on sexual characters and physiology of the reproductive system in the female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 242-249.
- Khalaila, I., Weil, S., Sagi, A., 1999. Endocrine balance between male and female components of the reproductive system in intersex *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *J. Exp. Zool.* 283, 286-294.
- King, C., 1993. Potential fecundity of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* von Martens, in culture. *Aquaculture* 114, 237-241.
- King, C.R., 1994. Growth and survival of red claw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in relation to temperature, with comments on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland. *Aquaculture* 122, 75-80.
- King, D.D., 1964. Fine structure of the androgenic gland of the crab, *Pachygrapsus crassipes*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 4, 533-544.
- Kobayashi, S., 2001. Fecundity of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* (de Hann). *Benthos Res.* 56, 1-7.
- Kogan, M., López Greco, L.S., Romano, L.A., Rodríguez E.M., 2000. Effects of cadmium on somatic and gonadal growth of juvenile females of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura: Grapsidae). *Zool. Stud.* 39, 344-350.
- Kozák, P., Buřič, M., Kanta, J., Kouba, A., Hamr, P., Polícar, T., 2009. The effect of water temperature on the number of moults and growth of juvenile signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana. *Czech J. Anim. Sci.* 54, 286-292.
- Kozák, P., Buřič, M., Polícar, T., 2006. The fecundity, time of egg development and juvenile production in spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) under controlled conditions. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 380-381, 1171-1182.
- Kubitza, F., 2000. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. *Acqua & Imagem*, Jundiaí, Brasil.

- Kulkarni, G.K., Fingerman, M., 1986. Distal retinal pigment of the fiddler crab, *Uca pugilator*: evidences for stimulation of release of light adapting and dark adapting hormones by neurotransmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* 84C, 219-224.
- Kulkarni, G.K., Fingerman, M., 1992. Effects of 5-hydroxytryptamine agonists on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 419-423.
- Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R., Amaldoss, G., Jaiswal, R.G., Fingerman, M., 1992. *In vivo* stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* by 5-hydroxytryptamine. *Invertebr. Reprod. Develop.* 21, 231-240.
- Kuo, C.M., Chen, Y.N., Fan, H.F., Chuang, H.C., Hsieh, S.L., 2009. Enhancement of vitellogenin synthesis by serotonin in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Zool. Stud.* 48, 597-606.
- Kuo, C.M., Hsu, C.R., Lin, C.Y., 1995. Hyperglycaemic effects of dopamine in tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 135, 161-172.
- Kuo, C.M., Yang, Y.H., 1999. Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Comp. Physiol.* 169B, 49-54.
- Laufer, H., Biggers, W.J., Ahl, J.S.B., 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 113-118.
- Lawrence, C., Jones, C., 2002. *Cherax*. En: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, United Kingdom, pp. 635-669.
- Lawrence, C.S., Cheng, Y.W., Morrissy, N.M., Williams I.H., 2000. A comparison of mixed-sex vs. monosex growout and different diets on the growth rate of freshwater crayfish (*Cherax albidus*). *Aquaculture* 185, 281-289.
- Legrand, J.J., 1955. Rôle endocrinien de l'ovaire dans la différenciation des oostégites chez les Crustacés Isopodes terrestres. *C. R. Acad. Sci. Paris* 241, 1083-1087.
- Lester, L.J., Pante, J.R., 1991. Penaeid temperature and salinity responses. En: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, Amsterdam, pp. 515-534.
- Levi, T., Barki, A., Hulata, G., Karplus, I., 1999. Mother-offspring relationships in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *J. Crustac. Biol.* 19, 477-484.
- Li, J.T., Lee, P.P., Chen, O.C., Cheng, W., Kuo, C.M., 2005. Dopamine depresses the immune ability and increases susceptibility to *Lactococcus garvieae* in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 269-280.
- Litulo, C., 2005. Population biology and fecundity of the Indo-Pacific hermit crab *Clibanarius longitarsus* (Anomura: Diogenidae). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 85, 121-125.
- López Greco, L.S., Lo Nostro, F.L., 2008. Structural changes of the spermatophore in the freshwater "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Acta Zool.* 89, 149-155.
- López Greco, L.S., Tropea, C., Sacristán, H.J., Calvo, N.S., Stumpf, L., Franco Tadic L.M., Castillo Díaz, F., Arias, M., Tomás, A.L., 2011. Estructura del hepatopáncreas de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Libro de

Resúmenes de las Primeras Jornadas de Ciencias Morfológicas de las Sierras de Tandil, Buenos Aires, Argentina.

- López Greco, L.S., Vazquez, F.J., Rodríguez, E., 2007. Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Acta Zool.* 88, 223-229.
- Luchini, L., 2004. Algo más sobre el cultivo de la red claw (*Cherax quadricarinatus*). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura. Buenos Aires, Argentina. <http://www.minagri.gob.ar>.
- Luppi, T.A., Bas, C.C., Spivak, E.D., Anger, K., 1997. Fecundity of two grapsid crab species in the Laguna Mar Chiquita, Argentina. *Arch. Fish. Mar. Res.* 45, 149-166.
- Lüschen, W., Willig A., Jaros, P.P., 1993. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C, 291-296.
- Macaranas, J.M., Mather, P.B., Hoeben, P., Capra, M.F., 1995. Assessment of genetic variation in wild populations of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens 1868) by means of allozyme and RAPD-PCR markers. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 46, 1217-1278.
- MacDiarmid, A.B., Butler, M.J., 1999. Sperm economy and limitation in spiny lobsters. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64, 14-24.
- Maguire, I., Klobučar, G.I.V., Erben, R., 2005. The relationship between female size and egg size in the freshwater crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 376-377, 777-785.
- Malecha, S.R., Nevin, P.A., Ha, P., Barck, L.E., Lamadrid-Rose, Y., Masuno, S., Hedgecock, D., 1992. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 105, 201-218.
- Manor, R., Aflalo, E.D., Segall, C., Weil, S., Azulay, D., Ventura, T., Sagi, A., 2004. Androgenic gland implantation promotes growth and inhibits vitellogenesis in *Cherax quadricarinatus* females held in individual compartments. *Invertebr. Reprod. Dev.* 45, 151-159.
- Manor, R., Weil, S., Oren, S., Glazer, L., Aflalo, E.D., Ventura, T., Chalifa-Caspi, V., Lapidot, M., Sagi, A., 2007. Insulin and gender: An insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 150, 326-336.
- Marsden, G.E., McGuren, J., Hansford, S.W., Burke, M.J., 1997. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149, 145-156.
- Martin, G., Juchault, P., Sorokine, O., Van Dorselaer, A., 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Gen. Comp. Endocrinol.* 80, 349-354.
- Martin, G.G., Hose, J.E., 1992. Vascular elements and blood (hemolymph). En: Harrison, F.W., Gardiner, S.L. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapod Crustacea*. Wiley-Liss Press, New York, pp. 117-146.

- Martinez, E.A., Murray, M., Leung, M.K., Stefano, G.B., 1988. Evidence for dopaminergic and opioid involvement in the regulation of locomotor activity in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90C, 89-93.
- Mashiko, K., 1985. Comparison of survival and development between large and small neonates of a freshwater prawn under starvation conditions. *Zool. Sci.* 2, 397-403.
- Mason, J.C., 1970. Egg laying in the Western North American crayfish, *Pacifastacus trowbridgei* (Stimpson) (Decapoda: Astacidae). *Crustaceana* 44, 37-44.
- Mason, J.C., 1978. Significance of egg size in the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *Freshw. Crayfish* 4, 83-92.
- Masser, M.P., Rouse, D.B., 1997. Australian red claw crayfish. SRAC Publication No. 244. Southern Regional Aquaculture Center, Auburn University, USA.
- Matsuda, H., Takenouchi, T., Yamakawa, T., 2002. Effects of photoperiod and temperature on ovarian development and spawning of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Aquaculture* 205, 385-398.
- Maule, A.G., Vanderkooi, S.P., 1999. Stress-induced immune-endocrine interaction. En: Balm, P.H.M. (Ed.), *Stress Physiology in Animals*. Academic Press, Sheffield, UK, pp. 205-245.
- McClain, W.R., 1995. Investigations of crayfish density and supplemental feeding as factors influencing growth and production of *Procambarus clarkii*. *Freshw. Crayfish* 10, 512-520.
- McRae, T.G., Mitchell, B.D., 1995. Studies on ovarian development in the yabby, *Cherax albidus* Clark. *Freshw. Crayfish* 10, 521-531.
- Meade, M.E., Doeller, J.E., Krauss, D.W., Watts, S.A., 2002. Effects of temperature and salinity on weight gain, oxygen consumption rate, and growth efficiency in juvenile red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *J. World Aquac. Soc.* 33, 188-198.
- Medley, P.B., Jones, C.M., Avault Jr, J.W., 1994. A global perspective on the culture of Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*: production, economics and marketing. *World Aquac.* 25, 6-13.
- Meeratana, P., Withyachamnarnkul, B., Damrongphol, P., Wongprasert, K., Suseangtham, A., Sobhon, P., 2006. Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* 260, 315-325.
- Menasveta, P., Sangpradub, S., Piyatiratitivorakul, S., Fast, A.W., 1994. Effect of broodstock size and source on ovarian maturation and spawning of *Penaeus monodon* Fabricius from the Gulf of Thailand. *J. World Aquac. Soc.* 25, 41-49.
- Mercier, A., Orchard, I., Schmoeckel, A., 1991. Catecholaminergic neurons supplying the hindgut of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Can. J. Zool.* 69, 2778-2785.
- Millamena, O.S., Quintio, E., 2000. The effects of diets on reproductive performance of eyestalk ablated and intact mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture* 181, 81-90.
- Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A., Marschall, E.A., 1988. Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 1657-1670.

- Moland, E., Moland Olsen, E., Stenseth, N.C., 2010. Maternal influences on offspring size variation and viability in wild European lobster *Homarus gammarus*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 400, 165-173.
- Morris, S., 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. J. Exp. Biol. 204, 979-989.
- Morrissy, N.M., 1975. Spawning variation and its relationship to growth rate and density in marron, *Cherax tenuimanus* (Smith). Fish. Res. Bull. 16, 1-32.
- Morrissy, N.M., 1990. Optimum and favourable temperatures for growth of *Cherax tenuimanus* (Smith 1912) (Decapoda: Parastacidae). Aust. J. Mar. Freshw. Res. 41, 735-746.
- Morrissy, N.M., Bird, C., Cassells, G., 1995. Density-dependent growth of cultured marron, *Cherax tenuimanus* (Smith 1912). Freshw. Crayfish 10, 560-568.
- Morrissy, N.M., Evans, L., Huner, J.V., 1990. Australian freshwater crayfish: Aquaculture species. World Aquac. 21, 113-122.
- Nagamine, C., Knight, A.W., 1987. Masculinization of female crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). Invertebr. Reprod. Dev. 11, 77-87.
- Nagamine, C., Knight, A.W., Maggenti, A., Paxman, G., 1980a. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. Gen. Comp. Endocrinol. 41, 423-441.
- Nagamine, C., Knight, A.W., Maggenti, A., Paxman, G., 1980b. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. Gen. Comp. Endocrinol. 41, 442-457.
- Nair, C.M., Salin, K.R., Raju, M.S., Sebastian, M., 2006. Economic analysis of monosex culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* DeMan): a case study. Aquac. Res. 37, 949-954.
- Nakata, K., Goshima, S., 2004. Fecundity of the Japanese crayfish, *Cambaroides japonicus*: ovary formation, egg number and egg size. Aquaculture 242, 335-343.
- Nakata, K., Tanaka, A., Goshima, S., 2004. Reproduction of the alien crayfish species *Pacifastacus leniusculus* in Lake Shikaribetsu, Hokkaido, Japan. J. Crustac. Biol. 24, 496-501.
- Nelson, K., 1991. Scheduling of reproduction in relation to molting and growth in malacostracan crustaceans. En: Wenner, A., Kuris, A. (Eds.), Crustacean Egg Production, Crustacean Issues 7. A.A. Balkema, Rotterdam. pp. 77-113.
- Nhan, D.T., Wille, M., Hung, L.T., Sorgeloos, P., 2009. Comparison of reproductive performance and offspring quality of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) broodstock from different regions. Aquaculture 298, 36-42.
- Ohira, T., Hasegawa, Y., Tominaga, S., Okuno, A., Nagasawa, H., 2003. Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding androgenic gland hormone precursors from two porcellionidae species, *Porcellio scaber* and *P. dilatatus*. Zool. Sci. 20, 75-81.

- Okumura, T., Hara, M., 2004. Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Zool. Sci. 21, 621-628.
- Okuno, A., Hasegawa, Y., Ohira, T., Katakura, Y., Nagasawa, H., 1999. Characterization and cDNA cloning of androgenic gland hormone of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 264, 419-423.
- Ottaviani, E., Franceschi, C., 1996. The neuroendocrinology of stress from invertebrates to man. Prog. Neurobiol. 48, 421-440.
- Ouellet, P., Plante, F., 2004. An investigation of the sources of variability in American lobster (*Homarus americanus*) eggs and larvae: female size and reproductive status, and interannual and interpopulation comparisons. J. Crustac. Biol. 24, 481-495.
- Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 185, 353-371.
- Panné Huidobro, S., Alvarez, M., Luchini, L., 2004. Cultivo de la langosta australiana o Redclaw (*Cherax quadricarinatus*). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura, Argentina. <http://www.minagri.gob.ar>.
- Panné Huidobro, S., Alvarez, M., Luchini, L., 2010. Organismos Acuáticos Ornamentales: Su importación y exportación en el 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura, Argentina. <http://www.minagri.gob.ar>.
- Parker, G.A., Begon, M., 1986. Optimal egg size and clutch size: effects of environment and maternal phenotype. Am. Nat. 128, 573-592.
- Parnes, S., Khalaila, I., Hulata, G., Sagi, A., 2003. Are intersex crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens) genetically females? Genet. Res. 82, 107-116.
- Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L.A., Rosas, C., 1998. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. J. World Aquac. Soc. 29, 477-484.
- Pattillo, D.A., 2010. Improving redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) aquaculture: assessment of invasive impacts and production of all-male broods. Master Thesis, University of Auburn, Alabama.
- Payen, G.G., Amato, G.D., 1978. Données actuelles sur le contrôle de la spermatogénèse chez les Crustacés Décapodes Reptantia. Arch. Zool. Exp. Gen. 119, 447-464.
- Payen, G.G., Chim, L., Laubier-Bonichon, A., Charniaux-Cotton, H., 1982. The androgenic gland of the shrimp *Penaeus japonicus* Bate. Description, role, and control by the eyestalks. Gen. Comp. Endocrinol. 46, 384.
- Peixoto, S., Coman, G., Arnold, S., Crocos, P., Preston, N., 2005. Histological examination of final oocyte maturation and atresia in wild and domesticated *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. Aquac. Res. 36, 666-673.

- Perez Velazquez, M., Bray, W.A., Lawrence, A.L., Gatlin III, D.M., Gonzalez-Felix, M.L., 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 198, 209-218.
- Pinheiro, M.A.A., Terceiro, O.S.L., 2000. Fecundity and reproductive output of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Brachyura, Portunidae). *Crustaceana* 73, 1121-1137.
- Pinto, G.F., Rouse, D.B., 1996. Growth and survival of the Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* at three densities in earthen ponds. *J. World Aquac. Soc.* 27, 187-193.
- Poljaroen, J., Tinikul, Y., Phoungpetchara, I., Kankoun, W., Suwansa-ard, S., Siangcham, T., Meeratana, P., Cummins, S.F., Sretarugsa, P., Hanna, P.J., Sobhon, P., 2011. The effects of biogenic amines, gonadotropin-releasing hormones and corazonin on spermatogenesis in sexually mature small giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Aquaculture* 321, 121-129.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107-115.
- Portelance, B., Dubé, P., 1990. Temperature and photoperiod effects on ovarian maturation, ovarian growth and egg-laying of crayfish *Orconectes viridis*. *Freshw. Crayfish* 8, 321-330.
- Provenzano, A.J., 1985. *The Biology of Crustacea. Economic Aspects: Fisheries and Culture*, vol. 10. Academic Press, New York.
- Quackenbush, L.S., Fingerman, M., 1984. Regulation of neurohormone release in the fiddler crab, *Uca pugilator*: effects of gamma-aminobutyric acid, octopamine, met-enkephalin, and beta-endorphin. *Comp. Biochem. Physiol.* 79C, 77-84.
- Rabalais, N.N., 1991. Egg production in crabs with abbreviated development. En: Wenner, A., Kuris, A. (Eds.), *Crustacean Egg Production*, *Crustacean Issues* 7. A.A. Balkema, Rotterdam. pp. 217-234.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227, 107-130.
- Reynolds, J.D., 2002. Growth and reproduction. En: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, United Kingdom, pp. 152-163.
- Richardson, H.G., Deecaraman, M., Fingerman, M., 1991. The effect of biogenic amine on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C, 53-56.
- Rodgers, L.J., Saoud, P.I., Rouse, D.B., 2006. The effects of monosex culture and stocking density on survival, growth and yield of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in earthen ponds. *Aquaculture* 259, 164-168.
- Rodríguez, E.M., Medesani, D.A., López Greco, L.S., Fingerman, M., 2002. Effects of some steroids and other compounds on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during early vitellogenesis. *J. Exp. Zool.* 292, 82-87.

- Rodríguez-González, H., García-Ulloa, M., Hernández-Llamas, A., Villarreal, H., 2006. Effect of dietary protein level on spawning and egg quality of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 257, 412-419.
- Rodríguez-González, H., Villarreal, H., Hernández-Llamas, A., García-Ulloa, M., Vázquez-Boucard, C., Serrano-Pinto, V., 2011 Effect of dietary protein-to-energy ratio on reproduction in female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquac. Res.* 42, 1840-1847.
- Rodríguez-Serna, M., Carmona-Osalde, C., Olvera-Novoa, M.A., Arredondo-Figueroa, J.L., 2000. Fecundity, egg development and growth of juvenile crayfish *Procambarus (Autrocambarus) llamasi* (Villalobos, 1955) under laboratory conditions. *Aquac. Res.* 31, 173-179.
- Rouse, D.B., 1995. Australian crayfish culture in the Americas. *J. Shellfish Res.* 14, 569-572.
- Rubolini, D., Galeotti, P., Ferrari, G., Spairani, M., Bernini, F., Fasola, M., 2006. Sperm allocation in relation to male traits, female size, and copulation behaviour in freshwater crayfish species. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60, 212-219.
- Rungsin, W., Paankhao, N., Na-Nakorn, U., 2006. Production of all-male stock by neofemale technology of the Thai strain of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 259, 88-94.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J., Pérez, J.R., González, A., 2006. Pleopodal egg production of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet under laboratory conditions: relationship between egg number, egg diameter and female size. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 380-381, 1207-1214.
- Sagi, A., Aflalo, E.D., 2005. The androgenic gland and monosex culture in prawns: a biotechnological perspective. *Aquac. Res.* 36, 231-237.
- Sagi, A., Cohen, D., 1990. Growth, maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. *World Aquac.* 21, 87-90.
- Sagi, A., Cohen, D., Milner, Y., 1990. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 15-22.
- Sagi, A., Khalaila, I., Abdu, U., Shoukrun, R., Weil, S., 1999. A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 37-45.
- Sagi, A., Khalaila, I., Barki, A., Hulata, G., Karplus, I., 1996a. Intersex red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens): functional males with pre-vitellogenic ovaries. *Biol. Bull.* 190, 16-23.
- Sagi, A., Manor C., Segall C., Davis C., Khalaila I., 2002. On intersexuality in the crayfish *Cherax quadricarinatus*: An inducible sexual plasticity model. *Invertebr. Reprod. Dev.* 41, 27-33.
- Sagi, A., Milstein, A., Eran, Y., Joseph, D., Khalaila, I., Abdu, U., Harpaz, S., Karplus, I., 1997. Culture of the Australian red-claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel. II. Second growout season of overwintered populations. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh* 49, 222-229.

- Sagi, A., Ra'anán, Z., Cohen, D., Wax, Y., 1986. Production of *Macrobrachium rosenbergii* in monosex populations: yield characteristics under intensive monoculture conditions in cages. *Aquaculture* 51, 265-275.
- Sagi, A., Shokrum, R., Isam, K., Rise, M., 1996b. Gonad maturation, morphological and physiological changes during the first reproductive cycle of the crayfish *Cherax quadricarinatus* female. *Invertebr. Reprod. Dev.* 29, 235-242.
- Sainath, S.B., Sreenivasula Reddy, P., 2011. Effect of selected biogenic amines on reproduction in the fresh water edible crab, *Oziotelphusa senex senex*. *Aquaculture* 313, 144-148.
- Sakai, S., Harada, Y., 2001. Why do large mothers produce large offspring? Theory and a test. *Am. Nat.* 157, 348-359.
- Sampedro, M.P., Fernández, L., Freire, J., González-Gurriarán, E., 1997. Fecundity and reproductive output of *Pisidia longicornis* (Decapoda, Anomura) in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Crustaceana* 70, 95-110.
- Sánchez de Bock, M., López Greco, L.S., 2009. Sex reversal and growth performance in juvenile females of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae): effect of increasing temperature and androgenic gland extract in the diet. *Aquac. Int.* 18, 231-243.
- Santhoshi, S.; Sugumar, V.; Munuswamy, N., 2009. Serotonergic stimulation of ovarian maturation and hemolymph vitellogenin in the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 291, 192-199.
- Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerman M., 1995a. Dopaminergic inhibition of 5-hydroxytryptamine-stimulated testicular maturation in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 111C, 287-292.
- Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerman M., 1995b. *In vivo* effects of dopamine and dopaminergic antagonists on testicular maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biol. Bull.* 189, 340-346.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1995c. Dopaminergic and enkephalinergic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97, 160-170.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1995d. *In vivo* inhibition by DA of 5-hydroxytryptamine-stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Experientia* 51, 156-158.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1995e. Evidence for opioid involvement in the regulation of ovarian maturation of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 111A, 279-282.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1995f. Mode of action of the neurotransmitter-5-hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: an *in vivo* and *in vitro* study. *J. Exp. Zool.* 271, 395-400.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1995g. Naphthalene-induced atresia in the ovary of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 76-83.

- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1996. *In vitro* inhibition by DA of 5-hydroxytryptamine-stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Experientia* 52, 707-709.
- Sato, T., Ashidate, M., Jinbo, T., Goshima, S., 2006. Variation of sperm allocation with male size and recovery rate of sperm numbers in spiny king crab *Paralithodes brevipes*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312, 189-199.
- Sato, T., Suzuki, N., 2010. Female size as a determinant of larval size, weight, and survival in the coconut crab, *Birgus latro*. *J. Crustac. Biol.* 30, 624-628.
- Sato, T., Yoseda, K., 2008. Reproductive season and female maturity size of coconut crab *Birgus latro* in Hatoma Island, southern part of Japan. *Fish. Sci.* 74, 1277-1282.
- Sibert, V., Ouellet, P., Brethes, 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. *Mar. Biol.* 144, 1075-1086.
- Skurdal, J., Qvenild, T., 1986. Growth, maturity, and fecundity of *Astacus astacus* in lake Steinsfjorden, S.E. Norway. *Freshw. Crayfish* 6, 182-185.
- Smith, G.G., Ritar, A.J., 2005. Effect of physical disturbance on reproductive performance in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 39, 317-324.
- Smith, G.W., 1912. The freshwater crayfishes of Australia. *Symp. Zool. Soc. London* 1912, 144-171.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Co., New York.
- Sokol, A., 1988. The Australian Yabby. En: Holdich, D.M., Lowrey, R.S. (Eds.), *Freshwater Crayfish*, Timber Press, pp. 402-422.
- Sommers, K.M., 1991. Characterizing size-specific fecundity in crustaceans. En: Wenner, A., Kuris, A. (Eds.), *Crustacean Egg Production*, *Crustacean Issues* 7. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 357-378.
- Sousa, L.G., Petriella, A.M., 2006. Morphology and histology of *P. argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) digestive tract. *Biocell* 30, 287-294.
- Stucki, T.P., 1999. Life cycle and life history of *Astacus leptodactylus* in Chatzensee Pond (Zürich) and lake Ägeri, Switzerland. *Freshw. Crayfish* 12, 430-448.
- Stucki, T.P., 2002. Differences in life history of native and introduced crayfish species in Switzerland. *Freshw. Crayfish* 13, 463-476.
- Stumpf, L., Calvo, N.S., Pietrokovsky, S., López Greco, L.S., 2010. Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 304, 34-41.
- Subramoniam, T., 2011. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. *Fish. Sci.* 77, 1-21.
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2004. Acerca del cultivo de langosta de agua dulce australiana. <http://www.minagri.gob.ar>.

- Suzuki, S. and Yamasaki, K., 1997. Sexual bipotentiality of developing ovaries in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). *Gen. Comp. Endocrinol.* 107, 136-146.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., 1991. Sex-reversal of male *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Malacostraca, Crustacea) following andrectomy and partial gonadectomy. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 375-378.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., 1998. Sex reversal by implantation of ethanol-treated androgenic glands of female isopods, *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 367-375.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., Katakura, Y., 1990. Vitellogenin synthesis in andrectomized males of the terrestrial Isopod, *Armadillidium vulgare* (Malacostracan Crustacea). *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 283-291.
- Taketomi, Y., 1986. Ultrastructure of the androgenic gland of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Cell. Biol. Int. Rep.* 10, 131-136.
- Taketomi, Y., Murata, M., Miyawaki, M., 1990. Androgenic gland and secondary sexual characters in the crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Crustac. Biol.* 10, 492-497.
- Taketomi, Y., Nishikawa, S., 1996. Implantation of androgenic glands into immature female crayfish, *Procambarus clarkii*, with masculinization of sexual characteristics. *J. Crustac. Biol.* 16, 232-239.
- Taketomi, Y., Nishikawa, S., Koga, S., 1996. Testis and androgenic gland during development of external sexual characteristics of the crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Crustac. Biol.* 16, 24-34.
- Thatje, S., Lovrich, G.A., Anger, K., 2004. Egg production, hatching rates, and abbreviated larval development of *Campylonotus vagans* Bate, 1888 (Crustacea: Decapoda: Caridea), in subantarctic waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 301, 15-27.
- Thomas, C.W., Crear, B.J., Hart, P.R., 2000. The effect of temperature on survival, growth, feeding and metabolic activity of the southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture* 185, 73-84.
- Thorne, M.J., Fielder, D.R., Hansford, S., 1989. The red patch on the claw of *Cherax quadricarinatus*. *Freshw. Aquacult. Assoc. Newslett.* 5, 19-20.
- Tierney, A.J., Kim, T., Abrams, R., 2003. Dopamine in crayfish and other crustaceans: distribution in the central nervous system and physiological functions. *Microsc. Res. Techniq.* 60, 325-335.
- Tinikul, Y., Mercier, A.J., Sobhon, P., 2009a. Distribution of dopamine and octopamine in the central nervous system and ovary during the ovarian maturation cycle of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Tissue Cell* 41, 430-442.
- Tinikul, Y., Mercier, A.J., Soonklang, N., Sobhon, P., 2008. Changes in the levels of serotonin and dopamine in the central nervous system and ovary, and their possible roles in the ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 250-258.
- Tinikul, Y., Soonthornsumrith, B., Phoungpetchara, I., Meeratana, P., Poljaroen, J., Duangsuwan, P., Soonklang, N., Mercier, A.J., Sobhon, P., 2009b. Effects of serotonin,

- dopamine, octopamine, and spiperone on ovarian maturation and embryonic development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Crustaceana* 82, 1007-1022.
- Toullec. J.V., Le Moullac, G., Cuzon, G., Van Wormhoudt, A., 1991. Immunoreactive human growth hormone like peptides in tropical Penaeids and the effect of dietary hGH on *Penaeus vannamei* larval development. *Aquat. Living Resour.* 4, 125-132.
- Truong, K., Meewan, M., Austin, C.M., 2002. Comparison of brood size and juvenile weight between a blue strain and normal-coloured strains of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Decapoda: Parastacidae). *J. Crustac. Biol.* 22, 538-542.
- Tsukimura, B., 2001. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *Am. Zool.* 41, 465-476.
- Tully, O., Roantree, V., Robinson, M., 2001. Maturity, fecundity and reproductive potential of the European lobster (*Homarus gammarus*) in Ireland. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 81, 61-68.
- Vaca, A., Alfaro, J., 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture* 182, 373-385.
- Van Dover, C.L., Williams, A.B., 1991. Egg size in squat lobsters (Galatheaidea): Constraint and freedom. En: Wenner, A., Kuris, A. (Eds.), *Crustacean Egg Production, Crustacean Issues 7*. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 143-156.
- Van Harreveld, A., 1936. A physiological solution for freshwater crustaceans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 34, 428-432.
- Vazquez, F.J., 2011. Estudio de la diferenciación y madurez sexual en la langosta de agua dulce, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Astacidea, Parastacidae) y su aplicación en acuicultura. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Vazquez, F.J., López Greco, L.S., 2007. Intersex females in the red claw freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Rev. Biol. Trop.* 55, 25-32.
- Vazquez, F.J., López Greco, L.S., 2010. Differentiation of the sexual characters and onset of maturity in the males of the "red claw" crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) (Astacidea, Astacida, Parastacidae). *Animal Biology* 60, 195-208.
- Vazquez, F.J., Tropea, C., López Greco, L.S., 2008. Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Invertebr. Biol.* 127, 433-443.
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E.D., Weil, S., Raviv, S., Glazer, L., Sagi, A., 2009. Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. *Endocrinology* 150, 1278-1286.
- Ventura, T., Rosen, O., Sagi, A., 2011. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 381-388.
- Verhoef, G.D., Austin, C.M., 1999. Combined effects of temperature and density on the growth and survival of juveniles of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark, Part 1. *Aquaculture* 170, 37-47.

- Verhoef, G.D., Austin, C.M., Jones, P.L., Stagnitti, F., 1998. Effect of temperature on molt increment and intermolt period of a juvenile Australian fresh-water crayfish, *Cherax destructor*. J. Crustac. Biol. 18, 673-679.
- Villamar, D.F., Langdon, C.J., 1993. Delivery of dietary components to larval shrimp (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. Mar. Biol. 115, 635-642.
- Vogt, G., Storch, V., Quintio, E.T., Pascual, F.P., 1985. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). Aquaculture 48, 1-12.
- Wang, C., Croll, R.P., 2004. Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. Aquaculture 238, 483-498.
- Whitmore, N., 1997. Population ecology of the freshwater crayfish *Paranephrops zealandicus* and its effects on the community structure of a lowland stream. Master Thesis, University of Otago, New Zealand.
- Wicki, G., Rossi, F., Merino, O., Luchini, L., 2008. Engorde de la langosta de pinzas rojas (*Cherax quadricarinatus*) en el subtrópico argentino: primeros resultados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura. Buenos Aires, Argentina. <http://www.minagri.gob.ar>.
- Wongprasert, K., Asuvapongpatana, A., Poltana, P., Tiensuwan, M., Withyachumnarnkul, B., 2006. Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 261, 1447-1454.
- Wood, D.E., Derby, C.D., 1996. Distribution of dopamine-like immunoreactivity suggests a role for dopamine in the courtship display behavior of the blue crab *Callinectes sapidus*. Cell Tissue Res. 285, 321-330.
- Woodland, D.J., 1967. Population study of a freshwater crayfish *Cherax albidus* Clark: with particular reference to the ecoenergetics of a population. PhD Thesis, University of New England, Armidale.
- Wu, X., Cheng, Y., Zeng, C., Wang, C., Cui, Z., 2010. Reproductive performance and offspring quality of the first and the second brood of female swimming crab, *Portunus trituberculatus*. Aquaculture 303, 94-100.
- Wu, X.G., Cheng, Y.X., Sui, L.Y., Zeng, C.S., Southgate, P.C., Yang, X.Z., 2007. Effect of dietary supplementation of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) broodstock. Aquaculture 273, 602-613.
- Wyban, J., Martínez, G., Sweeney, J.N., 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diets improves nauplii quality. World Aquac. 28, 59-62.
- Wyban, J., Walsh, W.A., Godin, D.M., 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp. Aquaculture 138, 267-279.
- Yano, I., 2000. Endocrine control of reproductive maturation in economically important crustacea for aquaculture. En: Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. (Eds.), Reproductive Biology of Invertebrates. Wiley, New York, pp. 161-194.
- Yeh, H., Rouse, D., 1994. Indoor spawning and egg development of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. J. World Aquac. Soc. 2, 297-302.

- Yeh, H., Rouse, D., 1995. Effect of water temperature, density, and sex ratio on the spawning rate of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens). J. World Aquac. Soc. 26, 160-164.
- Zapata, V., López Greco, L.S., Medesani, D.A., Rodríguez, E.M., 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year. *In vivo* and *in vitro* studies. Aquaculture 224, 339-352.