INIDEP

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PESQUERO

INFORME DE ASESORAMIENTO Y TRANSFERENCIA

Número	Páginas	Fecha de aprobación
0121	15	29 ENE 2018

Dirección: DIRECCIÓN DE INFORMACIÓN, OPERACIONES Y TECNOLOGIA

Programa / Gabinete: Maricultura y Biología Experimental

Actividad: Tecnología de cultivo de pulpito Octopus tehuelchus

AVANCES EN EL DESARROLLO DE TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN COMERCIAL DE JUVENILES DE PULPITO *OCTOPUS TEHUELCHUS* 2016-2017.

Durante el periodo 2016-2017 se registró la primera puesta de huevos culminando con el desarrollo gonadal de una hembra mantenida en cautiverio desde su estadio de inmadurez virginal.Se obtuvieron datos preliminares de la composición proteica, lipídica y perfil de ác. grasos de huevos del medio natural y de cultivo.Eclosionaron 180 juveniles en cautiverio a partir de puestas del medio natural.La alimentación provista por isópodos,cangrejos y anfípodos resultó en una mayor supervivencia de los juveniles.Actualmente,se continúan los ensayos de supervivencia y alimentación con juveniles utilizando,una dieta balanceada.Con el objetivo de implementar una metodología que permita la incubación artificial de los huevos retirados del cuidado materno,se realizó una primera experiencia con 80 huevos en estadio de preorganogénesis en un incubador al cual se le agregaron copépodos a partir del día 11.Los copépodos agregados se alimentaron del film de bacterias y hongos que se desarrolla sobre el corion,limpiando la superficie de los huevos y simplificando el mantenimiento que se realizaba en forma manual con un pincel.Los embriones completaron su desarrollo en 25 días a 20 °C.La mortalidad total se registró en los primeros 10 días de la incubación.La puesta presentó una tasa de eclosión del 100%.Los juveniles sobrevivieron 27 días en inanición.Estos primeros resultados demuestran la factibilidad de la incubación artificial de las puestas de pulpito.

Citar Indicando la fuente. El contenido no debe ser reproducido total o parcialmente sin la expresa conformidad del INIDEP

SOLICITADO POR — Institución: Wohler, Otto Cristian — Cargo: DNI

PREPARADO POR

Firma:
Nombre: BERRUETA, MARIA MERCEDES

Firma:
Nombre: ARISTIZABAL ABUD, EDDIE OSCAR

Firma:
Nombre: RICCI, ESTEBAN

Firma:
Nombre: BOCCANFUSO, JUAN JOSE

APROBADO POR

Dr. Eddie O. Aristizabal
Jefe de Programa
Maricultura y Biología Experimental
Jefe de Programa / Gabinete

Lic. RAUL RETA
A/C DIRECCION DE
Dirección de Operación y Tecnología
Director de área

Director Nacional de Investigación

Dr. OTTO C. WÖHLER
DIRECTOR
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION Y DESARROLLO PESQUERO
INIDEP
Director del INIDEP

COPIA ELECTRONICA INIDEP

AVANCES EN EL DESARROLLO DE TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN COMERCIAL DE JUVENILES DE PULPITO *Octopus tehuelchus* 2016-2017.

Berrueta María Mercedes, Aristizabal Eddie, Ricci Esteban y Boccanfuso Juan José

Introducción

En los últimos años se ha incrementado el interés por diversas especies de cefalópodos, ya que presentan alto valor nutricional y menor contenido de grasas con respecto a los peces (Zlatanos *et al*., 2006). Además el rápido crecimiento (> al 15% del peso corporal día $^{-1}$) y altas tasas de conversión de alimento (Mangold y Boletzky, 1973), convierte a los pulpos en organismos atractivos para la acuicultura (Vaz-Pires *et al*., 2004).

Iniciar el cultivo de una especie requiere definir primero los parámetros ambientales y biológicos que determinan el éxito del cultivo, con particular énfasis en los aspectos que determinan la reproducción en cautiverio (Iglesias *et al*., 2004).

Tomando en cuenta la necesidad de contar con reproductores, las investigaciones para el cultivo de pulpo deberán seguir los mismos pasos que se han seguido para establecer el cultivo de especies nuevas para la acuicultura como son: garantizar los desoves a partir de reproductores silvestres, establecer los parámetros ambientales, sociales y nutricionales óptimos para el crecimiento y engorde de juveniles, así como cerrar el ciclo con la producción de reproductores de laboratorio capaces de producir desoves similares o mayores a los observados en las poblaciones silvestres (Rosas *et al*., 2006).

Las características generales del pulpito *Octopus tehuelchus*, las cuales hacen de ésta especie un recurso potencial para el cultivo ya fueron expuestas con más detalle en el Informe de Asesoramiento y Transferencia Nº 036/16.

Objetivos Actividad MARI 15

- Capturar y aclimatar ejemplares al cautiverio.
- Obtener puestas de pulpito del medio natural.

Captura y aclimatación de ejemplares

En este trabajo las capturas de ejemplares de *O. tehuelchus* durante 2016 se realizaron en los meses de enero y marzo en Mar Chiquita durante las campañas de langostino, en ésta oportunidad se obtuvieron 5 hembras con sus respectivas puestas y 2 hembras post-desove. En el mes de septiembre en la Campaña de Merluza se capturaron 3 ejemplares los cuales sobrevivieron pocos meses luego de la campaña ya que no se encontraban en buen estado debido a las condiciones de mantenimiento en el barco (exceso de temperatura, poco recambio de agua).

La aclimatación de los pulpos capturados constó primeramente de un régimen diario de comida congelada (camarones y mejillines), fotoperiodo 12 L: 12 O y temperatura acorde a los datos la estación del año.

Durante marzo de 2017 se realizó una campaña de captura en Puerto Madryn, lo detalles de la misma se encuentran en el Informe de Comisión Nº043/17. En los meses posteriores se obtuvieron hembras con puestas en la zona de San Clemente. La incubación de los huevos se llevó a cabo en la Estación de Maricultura, y los juveniles eclosionados forman parte de una experiencia de supervivencia, la cual se desarrolla con éxito, superando los 70 días de post-eclosión.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Primer desove en cautiverio

Durante el mes de abril de 2016, se registró la primera puesta de huevos (n=200) (Fig.1a) culminando así con el desarrollo gonadal de una hembra mantenida en cautiverio desde su estadio de evolución gonadal M0 (Inmadurez virginal, según Pujals 1986), hasta un largo dorsal del manto LDM y peso final de 70 mm y 200 g, controlando uno de los factores más importantes que inciden en su desarrollo gonadal implicado directamente con su glándula óptica: *Intensidad lumínica*. Cabe destacar la importancia del manejo de este parámetro, ya que desencadena la gametogénesis. La postura de huevos de *O. tehuelchus* es una evidencia de la capacidad adaptativa que muestran las especies del género Octopus para reproducirse en condiciones de cautiverio (Zuñiga *et al.,* 1995). Como parte de las características de esta especie, la hembra cuidó de los huevos (Fig. 2b) alimentándose de manera periódica durante 3 meses, lapso durante el cual sin contaminación aparente, los huevos no presentaron desarrollo embrionario (Fig. 2 a y b), dicha característica ha sido observada en otras especies mantenidas en cautiverio tales como *Enteroctopus megalocyathus* y *Robsonella fontaniana* (Farías *et al*., 2011). Los cortes histológicos (realizados por la Téc. Marta Estrada el Área de Histología) de glándula oviductal de la hembra (lugar donde aloja los espermatóforos), confirmaron que los huevos estaban fecundados debido a la presencia de espermatozoides (Fig.3 a y b), sumado al escaso deterioro de los mismos durante el largo periodo de incubación darían indicios de estar fecundos, pero tal vez alguna condición del cultivo controlado no permitió el desarrollo normal de los embriones.

En el mes de septiembre, luego de 14 meses de cautiverio, la hembra muere según otra característica de esta especie, la semelparidad. Su ciclo de vida se ajustó a lo esperado de aproximadamente 18 meses (ciclo de vida corto) (Ré, 1989).

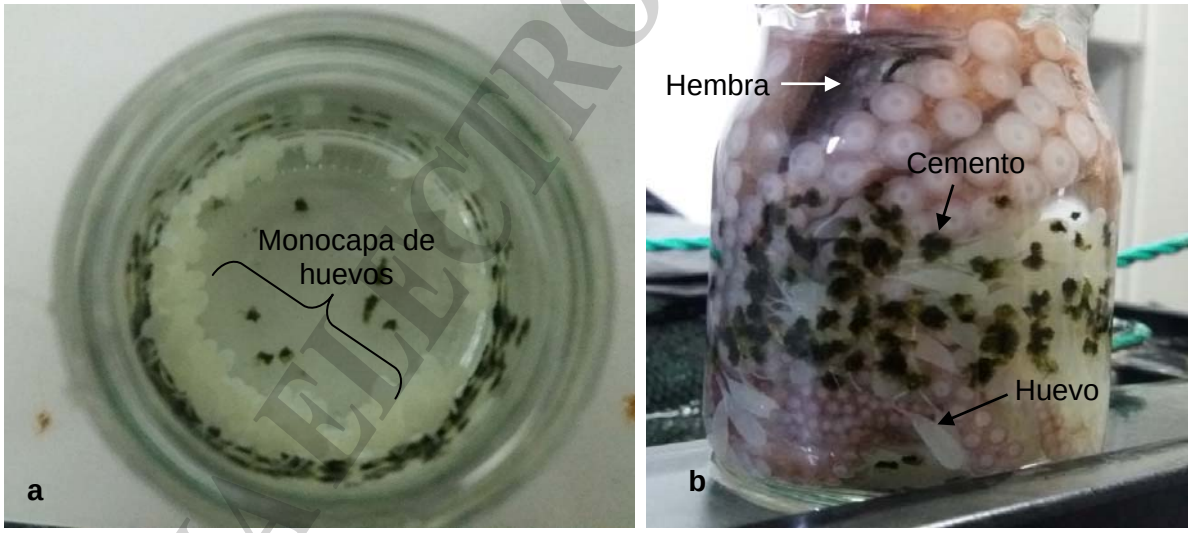

Figura 1. a) Hembra cuidando la puesta huevos. b) Puesta de *O. tehuelchus.* monocapa de huevos adherida a las paredes del frasco mediante cemento generado por la hembra.

Resultados preliminares de la composición proteica, lipídica y perfil de ácidos grasos de huevos del medio natural y de cultivo.

Mediante la colaboración de la Dra. Águeda Massa (Programa PROD) se realizaron los primeros microanálisis (Massa y Temperoni, 2017) de proteínas del líquido perivitelino, lípidos del vitelo y ácidos grasos de los lípidos totales de huevos del pulpito *O. tehuelchus* obtenidos de puestas del medio natural (silvestres) y de cultivo (INIDEP).

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

El contenido de proteína fue levemente inferior en los huevos de cultivo, mientras que el contenido de lípidos totales fue similar en los vitelos de ambas muestras (Tabla 1). Los ácidos grasos más frecuentes en los vitelos de los huevos de ambas muestras fueron 16:0,18:0, 18:1n-9, 18:3n-3, 22:0, 22:1n-9 y 22:6n-3 (DHA) (Tabla 2 y 3).

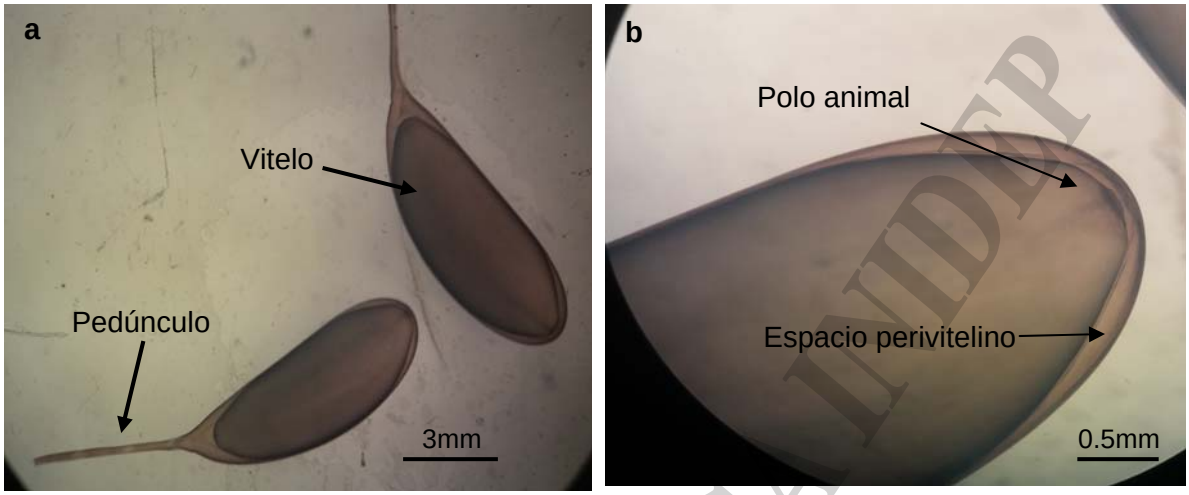

Figura 2. a) Huevos de cultivo. No se observó desarrollo embrionario durante los 3 meses de incubación. b) Detalle del polo animal sin desarrollo de blastómeros.

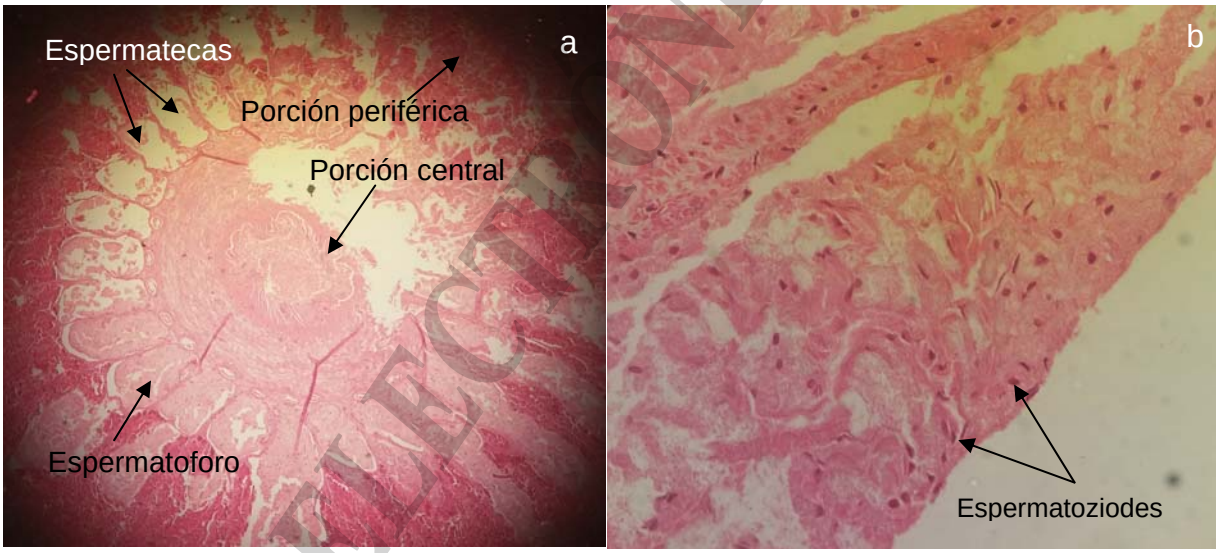

Figura 3.a) Corte transversal de glándula oviductal (100X). b) Detalle de espermateca, con espermatozoides (400x).

El contenido de proteína encontrado en los huevos de *O. tehuelchus* fue similar al máximo valor (49,0) obtenido para *E. megalocyathus* (Farías *et al.,* 2011). El valor de lípidos del vitelo fue menor al valor encontrado en paralarvas recién eclosionadas de *O. vulgaris* (14,7) (Seixas *et al.,* 2010).

Los datos morfométricos de los huevos y juveniles obtenidos del medio natural fueron:

Huevos

- Longitud promedio de los huevos: 8.44 ±0.87mm
- Peso húmedo de los huevos: 0.1±0.02g

COPIA ELECTRONICA INIDEP

Juveniles

- Largo promedio del Manto (LM): 6.50±0.52mm
- Largo promedio Total (LT): 18.95±1.65mm
- Peso húmedo:0.2±0.03g

Tabla 1. Proteína perivitelina y lípidos totales del vitelo en huevos silvestres y de cultivo de *Octopus tehuelchus.*

	Huevos silvestres %g/100g de muestra peso seco	**Huevos de cultivo** %g/100g de muestra peso seco
Proteínas solubles	50,846	47,76
Lípidos totales	9,450	10,10

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos (AG) de **huevos silvestres** expresado como % AREA. Se presentan los valores obtenidos en dos cromatografías, el promedio y el desvío estándar. AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

ACIDO GRASO	% (g/100 DE LÍPIDOS)	% (g/100 DE LÍPIDOS)	PROMEDIO	DESVÍO ESTÁNDAR
C14:0	2,150	2,080	2,115	0,0495
C15:0	0,268	0,263	0,266	0,0035
C16:0	26,048	25,960	26,004	0,0622
C16:1	0,496	0,493		0,0021
C17:1				
C18:0	6,455	6,447	6,451	0,0057
C18:1n9 t y c	4,506	4,472	4,489	0,0240
C18:1n7	1,768	1,752	1,760	0,0113
C18:1n11				
C18:2n6 t y c	0,465	0,442	0,454	0,0163
C18:3n6				
C18:3n3	6,412	6,440	6,426	0,0198
C21:0	0,250	0,249	0,250	0,0007
C22:0	6,894	6,899	6,897	0,0035
C22:1n11				
C22:1n9	15,840	14,897	15,369	0,6668
C23:0				
C20:5n3 - EPA	1,770	1,785	1,778	0,0106
C22:6n3 - DHA	21,572	21,874	21,723	0,2135
C24:0	0,246	0,240	0,243	0,0042
TOTAL AGS	42,3110	42,1380	42,225	0,1223
TOTAL AGMI	22,6100	21,6140	22,112	0,7043
TOTAL AGPI	30,2190	30,5410	30,380	0,2277

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (AG) de **huevos de cultivo** expresado como % AREA. Se presentan los valores obtenidos en dos cromatografías, el promedio y el desvío estándar. AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

ACIDO GRASO	% (g/100 DE LÍPIDOS)	% (g/100 DE LÍPIDOS)	PROMEDIO	DESVÍO ESTÁNDAR
C14:0	1,534	1,500	1,517	0,0240
C15:0	0,414	0,408	0,411	0,0042
C16:0	28,321	28,007	28,164	0,2220
C16:1	0,546	0,539	0,543	0,0049
C17:1	0,092	0,097	0,095	0,0035
C18:0	3,891	3,910	3,901	0,0134
C18:1n9 t y c	2,731	2,738	2,735	0,0049
C18:1n7	1,436	1,428	1,432	0,0057
C18:1n11	0,254	0,253	0,254	0,0007
C18:2n6 t y c	0,214	0,251	0,233	0,0262
C18:3n6		0,052	0,052	
C18:3n3	3,972	3,994	3,983	0,0156
C21:0	0,214	0,218	0,216	0,0028
C22:0	6,206	6,200	6,203	0,0042
C22:1n11	0,102	0,086	0,094	0,0113
C22:1n9	17,111	16,967	17,039	0,1018
C23:0		0,042	0,042	
C20:5n3 – EPA	1,261	1,255	1,258	0,0042
C22:6n3 - DHA	25,866	26,063	25,965	0,1393
C24:0	0,251	0,245	0,248	0,0042
TOTAL AGS	40,831	40,530	40,681	0,2128
TOTAL AGMI	22,272	22,108	22,190	0,1160
TOTAL AGPI	31,313	31,615	31,464	0,2135

Obtención de puestas del medio natural.

Durante una campaña de langostino BE 02/16 (Mar Chiquita, 37°47´47´´,12 m de profundidad, temperatura del agua 20°C) realizada en el mes de enero se obtuvieron 5 puestas de *O. tehuelchus* (Fig.4a y b) con sus respectivas hembras (cuidado parental). En los ejemplares capturados se encontraron 2 pulpos hembra en estadio de post-desove sin puesta, las cuales fueron colocados en acuarios independientes.

A partir de las puestas naturales se obtuvieron **180 juveniles** que eclosionaron en cautiverio a lo largo de un periodo de 20 días, los embriones presentaban distintos estadios de desarrollo. A medida que iban eclosionando, se los ubicó en acuarios de 15 l de capacidad a una densidad aproximada de 4ind/l, con aireación independiente y temperatura controlada (Fig.5a), conectados a un sistema de recirculación. En los acuarios se agregaron 1 ó 2 refugios por ejemplar para minimizar la competencia y se trabajó con heterogeneidad ambiental para reducir el canibalismo (Fig.5b). Se realizaron 3 experiencias (una por acuario) con diferentes dietas vivas y un grupo control (inanición). El grupo 1 fue sometido a inanición, la dieta del grupo 2: isópodos y cangrejos en una proporción por individuo 2:1 y la dieta del grupo 3 incluía isópodos, cangrejos y anfípodos en una proporción por individuos de 2:1:1, respectivamente (Fig. 6a, b y c). A medida que los juveniles de las distintas puestas iban eclosionando, se los colocaba al azar en alguno de los 3 tratamientos. Los juveniles recién eclosionados (Fig.7a) fueron alimentados diariamente. En el

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

grupo 3 se observó la mayor supervivencia de los juveniles, estimada en aproximadamente 2 meses (Fig.7b), seguida por el grupo control (1 mes), grupo 2 la supervivencia fue de 20 días. No se registró canibalismo. Cabe destacar que el dato de la supervivencia fue aproximado, ya que no se pudo realizar un seguimiento individual de los juveniles, durante esta experiencia se registra el dato del grupo. En futuros bioensayos, se individualizará a los juveniles para obtener datos de supervivencia más exactos.

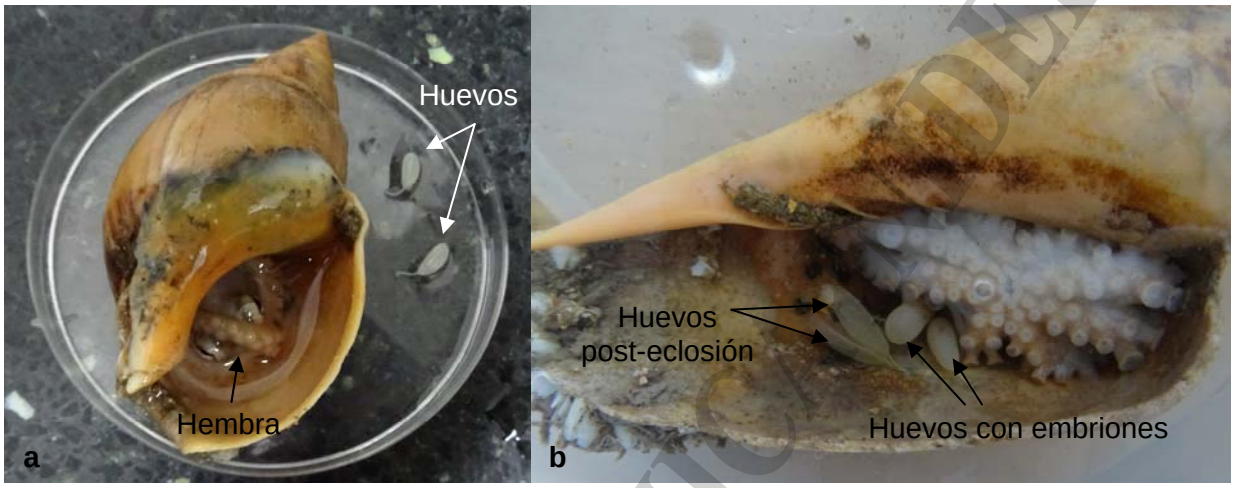

Figura 4.a) Hembra en valva de *Adelomelon brasiliana* al cuidado de sus huevos junto a 2 huevos de la puesta. b) Detalle de los huevos con embriones adheridos a la valva y restos de huevos post-eclosión.

Figura 5. a) Acuarios para juveniles; b) Detalle de heterogeneidad ambiental.

COPIA ELECTRONICA DEP

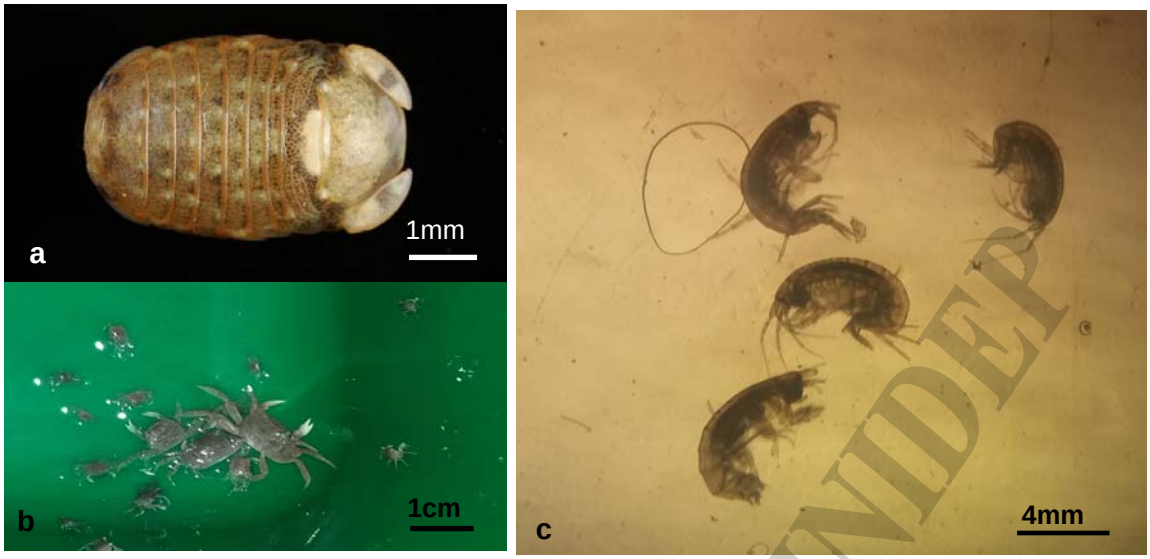

Figura 6. a) Isópodos *Sphaera serratum,* b) juveniles de cangrejos *Neohelice granulata,* c) anfípodos *Hyale grandicornis.*

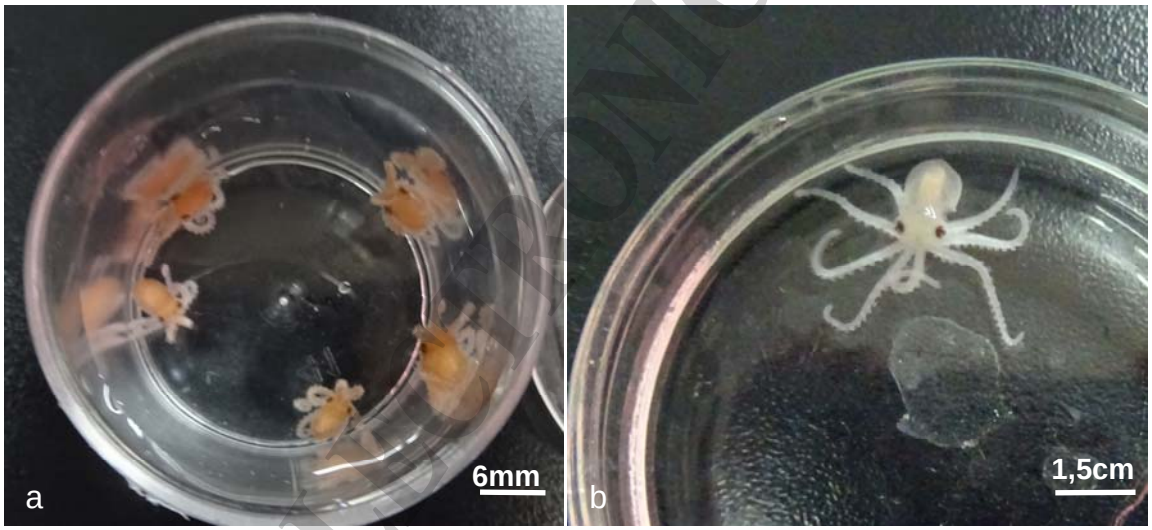

Figura 7. a) Juveniles de pulpito recién eclosionados, b) Juvenil del grupo 3.

COPIA ELECTRONICA INIDEP

Mantenimiento de puesta de huevos sin cuidado parental

Una de las 5 puestas quedó sin el cuidado de la hembra, ya que posiblemente debido al estrés del traslado, sacó los huevos del refugio para eliminarlos. Los huevos (n=80) se retiraron del acuario de la hembra y se los colocó en un incubador que fue diseñado en la EEM especialmente para este tipo de huevos, con burbujeo suave y recambio de agua diario (Fig.8). El mantenimiento diario de los huevos durante los primeros 10 días consistió en la limpieza de cada huevo bajo lupa utilizando un pincel de cerdas finas, para evitar que se depositen sobre la superficie bacterias y hongos que impiden el ingreso de oxígeno al embrión (Fig.9). Luego, se colocaron copépodos en el eclosionador, los cuales se alimentaron del film de bacterias y hongos limpiando la superficie de los huevos de manera exitosa, evitando la manipulación con el pincel (Fig.10).

Figura 8. Huevos y juveniles de pulpito en eclosionador.

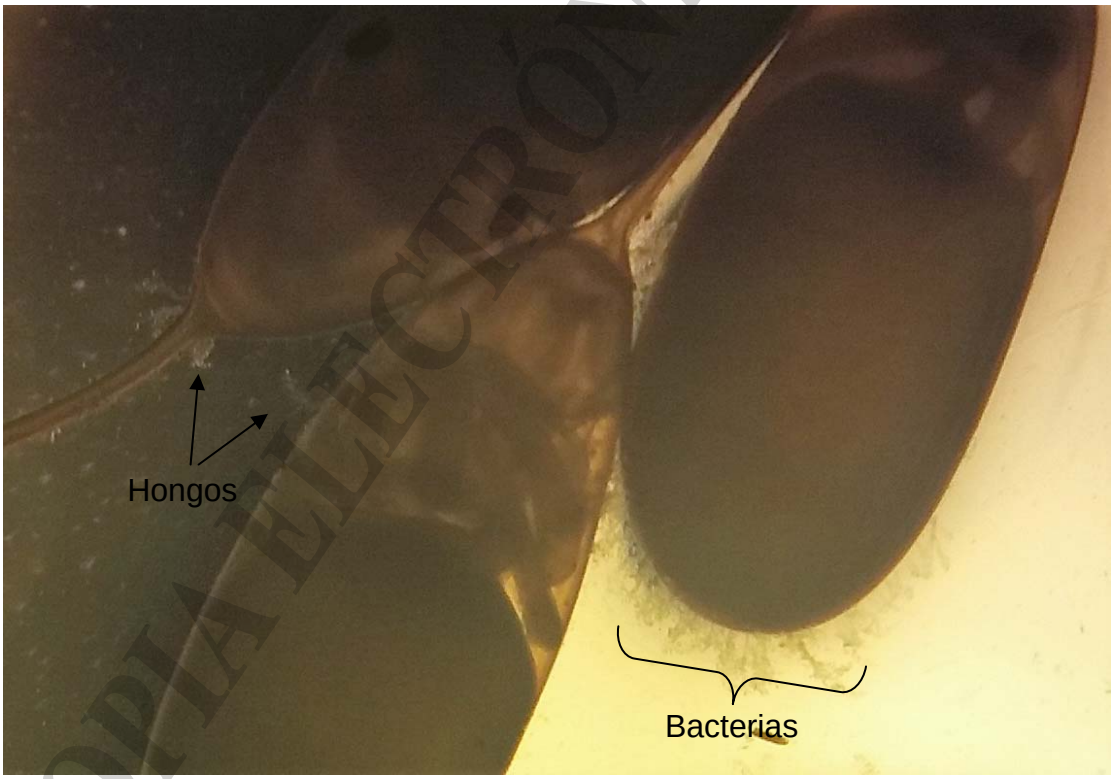

Figura 9. Deposito de bacterias y hongos sobre la superficie de los huevos, impiden el ingreso de oxígeno al embrión.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

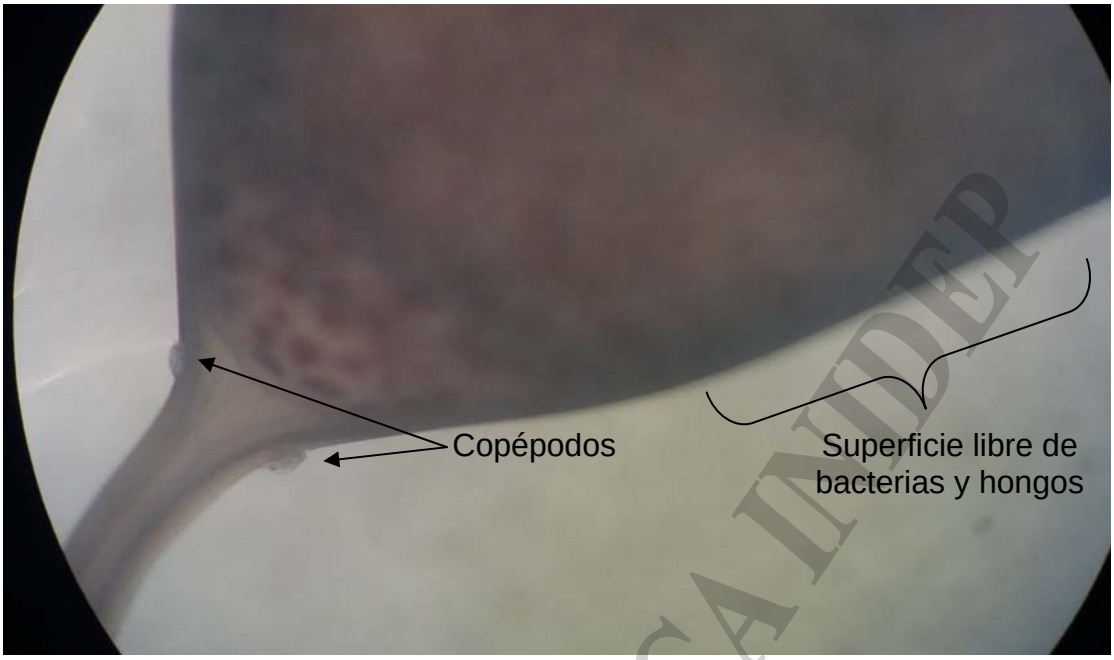

Figura 10. Imagen de copépodos alimentándose sobre la superficie de los huevos.

Se realizó un seguimiento del desarrollo embrionario durante toda la experiencia, mediante fotografías en la lupa Nikon SMZ1000. A continuación se describen algunos de los estadios de desarrollo embrionario según Naef (1928):

Pre-organogénesis

- Estadio II-IV (Fig.11a): Inicio de la experiencia, los huevos fueron colocados en el incubador. En este estadio el blastodermo cubre entre el 10-20% de la longitud del huevo.

Organogénesis

- Estadio X-XI (Fig.11b): El manto comienza a desarrollarse en la parte cercana al pedúnculo. Se observan primordios de los brazos. Comienza el desarrollo de las capsulas ópticas. El embrión ya realizó la primera inversión.

- Estadio XI-XII (Fig.11c): Los estatocistos están completamente formado. Las capsulas ópticas son evidentes. Los brazos comienzan a alargarse, todavía no se observan ventosas.

- Estadio XIII (Fig.11d): El manto cubre completamente el margen posterior del huevo (cercano al pedúnculo). La retina se pigmenta (color rojizo) y se hace evidente en las capsulas ópticas. Los brazos presentan movilidad.

- Estadio XVI (Fig.12e): Los brazos se siguen extendiendo, se observan primordios de ventosas. El sifón se observa claramente en la parte ventral. Los cromatóforos son apenas notorios.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

- Estadio XVII (Fig.12f): El embrión ha consumido el 50% del vitelo. Se observan órganos internos en el manto. Los cromatóforos se hacen más visibles. Los ojos presentan mayor pigmentación. Los brazos presentan ventosas.

- Estadio XIII-IX (Fig.12g): El manto del embrión ocupa la mayor proporción del huevo. Los órganos internos van aumentando en tamaño y se pueden identificar claramente las branquias y sus corazones branquiales, como así también el corazón sistémico y la glándula gástrica. El embrión presenta un comportamiento activo, preparándose para la segunda inversión.

- Estadio XIX (Fig.12h): El embrión ha completado la segunda inversión y ocupa prácticamente la totalidad del huevo. Se observa pequeño resto de vitelo. La eclosión se realizará por el lado opuesto al pedúnculo.

- Juvenil (Fig. 13): Al momento de la eclosión la mayoría de los juveniles presenta el vitelo reabsorbido, bolsa de la tinta y cromatóforos bien desarrollados para camuflarse con el entorno. Su comportamiento es bentónico y activo durante la noche.

Los embriones completaron su desarrollo en 25 días a 20 °C. La mortalidad total fue del 10%, concentrándose exclusivamente en los primeros 10 días de la incubación. El resto de la puesta presentó una tasa de eclosión del 100%. Los juveniles sobrevivieron 27 días en inanición. Estos primeros resultados demuestran la factibilidad de la incubación artificial de las puestas de pulpito.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

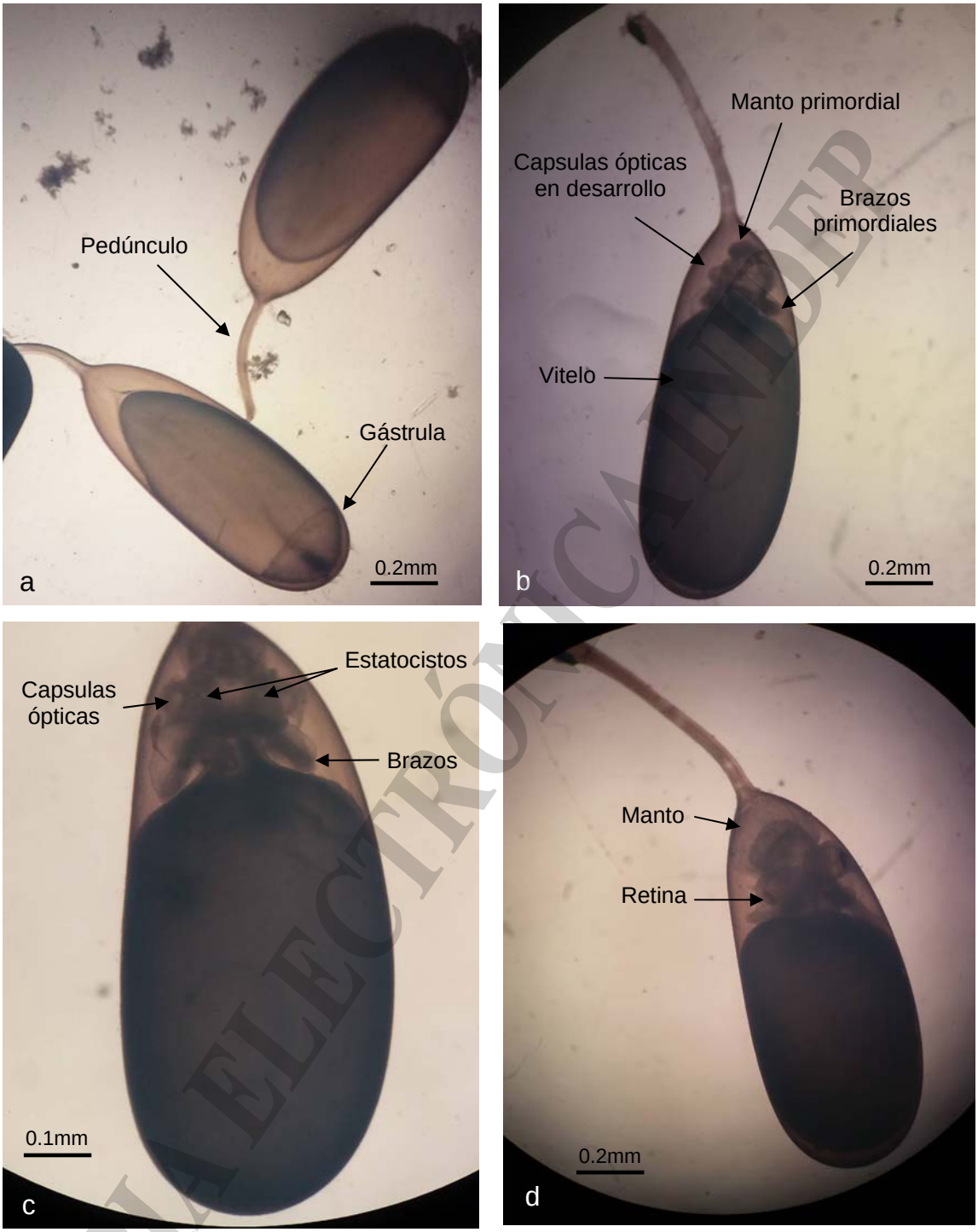

Figura 11. Detalle del desarrollo embrionario según Naef (1928) de huevos mantenidos en cautiverio sin cuidado parental. *Pre-organogénesis:* a) Estadio III-IV. O*rganogénesis:* b) Estadio X-XI, c) Estadio XI-XII, d) Estadio XII.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

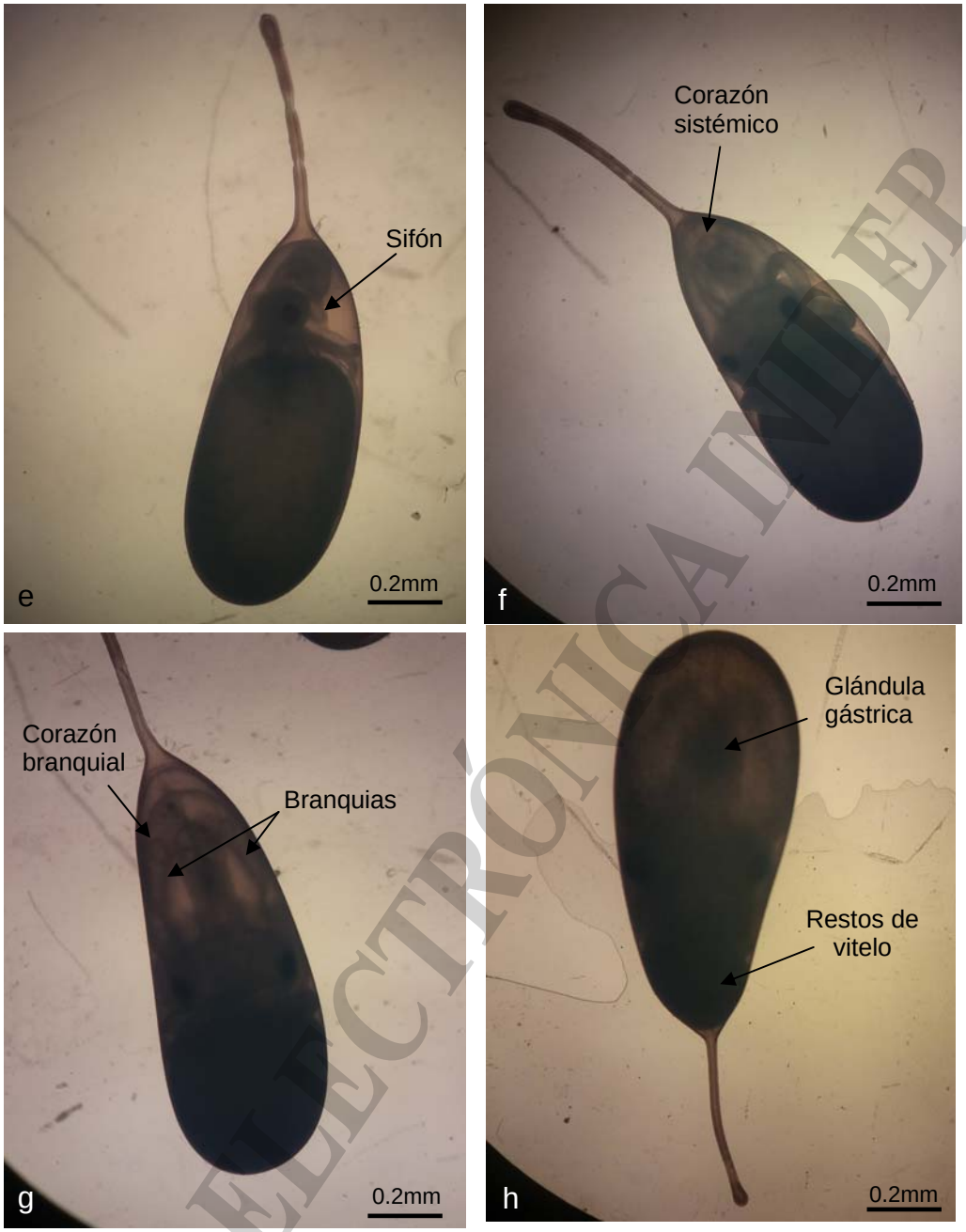

Figura 12. Detalle del desarrollo embrionario según Naef (1928) de huevos mantenidos en cautiverio sin cuidado parental. O*rganogénesis:* e) Estadio X, f) Estadio XVII, g) Estadio XIX, h) Estadio XIII-IX.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Figura 13. Juvenil de pulpito recién eclosionado.

COPIA ELECTRÓNICA

Bibliografía

FARÍAS, A; NAVARRO, C; CERNA, V; PINO, S & URIARTE, I. 2011. Effect of broodstock diet on the fecundity and biochemical composition of eggs of the Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus* Gould 1852) Ciencias Marinas, vol. 37, núm. 1, 11-21.

IGLESIAS, J., OTERO J.J., MOXICA C., FUENTES, L & SÁNCHEZ, F.J. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarvae rearing using Artemia and zoea, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. Aquacult. Int., 12: 481-487.

MANGOLD, K. & BOLETZKY, S.V. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. Mar.Biol., 19: 7-12.

MASSA & TEMPERONI. 2017. Perfil de ácidos grasos de huevos de *Octopus thuelchus* obtenidos de ejemplares salvajes y de cultivo. Inf. Ases. y Transf. INIDEP Nº 083/17. 4pp.

NAEF. A. 1928. Die Cephalopoden. Fauna Flora Golf Neapal 35 (II): 357pp.

RÉ, M. 1998. Pulpos octopódidos (Cephalopoda, Octopodidae). En BOSCHI, E.E. (Ed.) El Mar Argentino y sus Recursos Pesqueros. Tomo 2. Los moluscos de interés pesquero. Cultivos y estrategias reproductivas de bivalvos y equinodermos. Publicaciones Especiales INIDEP, Mar del Plata: 69-98.

ROSAS, C., CAAMAL, C., CAZARES, R., RODRÍGUEZ. D., ROMERO. M. & DARWIN, C., 2006. Manual preliminar para el cultivo del pulpo *Octopus maya*. Secretaria de desarrollo rural y pesca, gobierno de Yucatán, Comisión Nacional de acuacultura y pesca, México. 36pp.

VAZ-PIRES, P., SEIXAS P. & BARBOSA, A. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. Aquaculture 238(1–4):221–238.

ZLATANOS, S., LASKARIDIS, K., FEIST, C. & SAGREDOS A. 2006. Proximate composition, fatty acid analysis and protein digestibility-corrected amino acid score of three Mediterranean cephalopods. Mol. Nutr. Food Res. 50: 967–970.

SEIXAS SAMANTHA A., AMATO JOSÉ F. R. & SUZANA B. AMATO. 2010. First report of *Temnocephala rochensis* (Platyhelminthes: Temnocephalida) from *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Ampullariidae) outside Uruguay – description update based on specimens from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Zoología 27 (5): 820–828.

COPIA ELECTRONICA INIDEP