



Estudi de la biologia reproductiva de la cabra de mar, *Maja brachydactyla*: aparell reproductor i qualitat de les postes en captivitat

Carles Garcia Simeó

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Estudi de la biologia reproductiva
de la cabra de mar, *Maja brachydactyla*:
aparell reproductor i qualitat
de les postes en captivitat.**

CARLES GARCIA SIMEÓ

Departament de Biologia Cel·lular,
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Programa de doctorat d'Aqüicultura, bienni 2005-2007
Tesi realitzada a l'IRTA Sant Carles de la Ràpita

Directora de tesi

Dra. Guiomar Rotllant

Programa Aqüicultura
Subprograma de Cultius Aqüícoles
IRTA Sant Carles de la Ràpita

Tutor

Dr. Enric Ribes

Departament de Biologia Cel·lular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Discussió

La discussió relaciona els resultats d'aquesta tesi amb diferents aspectes de la reproducció dels braquiüers, per tal de proposar línies d'estudi i processos de producció aqüícola que es deurién considerar per al desenvolupament de la reproducció en captivitat de la cabra de mar. Per aquest motiu, la discussió està dividida en quatre apartats:

1. La gestió dels mascles. En aquesta secció es relacionen els aspectes morfològics de l'aparell reproductor masculí (capítol 1, article 1) amb els resultats obtinguts en el capítol 2 (article 6) sobre la necessitat de la gestió de la presència dels mascles.
2. La glàndula andrògena i els cultius d'un sol sexe. La localització i descripció de la glàndula andrògena en l'estudi morfològic de l'aparell reproductor masculí (capítol 1, article 1) es relaciona amb el desenvolupament del cultiu exclusiu de femelles (capítol 2, article 6), que es podria assolir mitjançant la manipulació d'aquesta glàndula.
3. La morfologia i viabilitat de l'esperma. Els treballs morfològics de l'espermatogènesi i l'espermatozoide (capítol 1, articles 2, 3 i 4), i els resultats de viabilitat de l'esperma emmagatzemat en els receptacles seminals (capítol 2, article 6) es relacionen amb la possibilitat de desenvolupar protocols de criopreservació de l'esperma, inseminació i incubació d'ous artificial.
4. La domesticació dels reproductors. En aquesta secció, s'estudia l'efecte en la qualitat dels reproductors, producció larvària i composició bioquímica de les larves obtingudes d'estocs de reproductors de diferents anys (capítol 2), i es relaciona amb la domesticació dels reproductors, és a dir, la utilització de reproductors cultivats en captivitat.

Les discussions dels objectius específics de cada capítol dels Resultats es poden consultar en cadascun dels articles.

1. La gestió dels mascles

Els resultats del capítol 2 (article 6) sobre l'efecte de la presència dels mascles en el rendiment reproductiu i la composició de les larves acabades de descloure mostren que la presència de mascles resulta en una major producció de larves. Tanmateix, l'elevada mortalitat de les femelles en presència de mascles al final de l'experiment contrasta amb el aproximadament 60%

de supervivència de les femelles en absència de mascles, la qual cosa provoca una disminució del rendiment reproductiu en condicions de captivitat. L'observació de fragments de potes de femelles en el tanc, femelles ferides i comportaments postcopulatoris de defensa de la femella suggereixen que la presència dels mascles en el tanc de les femelles deuria ser gestionada. La gestió dels mascles, a més a més, deuria considerar altres factors com ara les estratègies de competència d'espermatozoides que donen lloc a complexos mecanismes de control de la paternitat.

1. 1 *La morfologia del testicle i les estratègies reproductives de la cabra de mar*

Els testicles dels braquiürs presenten dues morfologies: lobular i tubular (Nagao i Munehara, 2003). Cada tipus morfològic es troba present en varies superfamílies (Taula 5), i cadascuna presenta només un tipus de testicle, amb l'excepció de la superfamília Grapsoidea, les descripcions morfològiques dels testicles d'aquest grup deurien ser revisades per confirmar aquest fet. El testicle de la cabra de mar és de tipus tubular (Nagao i Munehara, 2003; Simeó et al., 2009), com el descrit en altres Majoidea (Kon i Honma, 1970; Sapelkin i Fedoseev, 1981; Sal Moyano et al., 2010). Altres espècies del gènere *Maja*, *Maja squinado* i *Maja crispata* també presenten el testicle tubular (observació personal).

Els braquiürs, juntament amb els anomurs, han estat els últims grups de crustacis decàpodes en aparèixer (Ahyong i O'Meally, 2004; Tsang et al., 2008). El fet de què el testicle tubular sembla estar present exclusivament en alguns braquiürs entre els crustacis decàpodes (Simeó et al., 2009) suggereix que es tracta d'un caràcter apomòrfic, mentre que el testicle lobular (en diferents versions) seria el caràcter plesiomòrfic. La causa de l'aparició del testicle tubular és desconeguda. Tanmateix, tenint en compte què la cabra de mar presenta unes estratègies reproductives particulars entre els braquiürs, com ara la separació de les fases de creixement i reproducció per la muda terminal (González-Gurriarán et al., 1995) o el desenvolupament larvari abreviat (Guerao et al., 2008), és possible que el testicle tubular presenti algun avantatge reproductiu.

El funcionament del testicle sembla ser similar en els dos tipus morfològics de testicle. En el testicle lobular, els espermatogonis es troben a la zona germinal, localitzada a la perifèria del lòbul seminífer (Krol et al., 1992). La maduració de les cèl·lules germinals es dona en la zona central del lòbul, i els espermatozoides passen al tub col·lector i són transportats fins el conducte deferent. La maduració dels lòbuls es pot donar sincrònica o asincrònica-

ment. De la mateixa forma, la zona germinal del testicles tubular es troba a la perifèria del tub seminífer, formant una banda a l'extrem oposat de la zona d'evacuació o tub col·lector, i l'espermatogènesi ocorre en la zona central o de maduració del tub seminífer (Hoestlandt, 1948; Sapelkin i Fedoseev, 1981; Simeó et al., 2009). Tanmateix, al llarg del tub seminífer es produeix una maduració longitudinal, anomenada onada d'espermatogènesi, en la qual es pot veure la successió dels estadis de maduració (Hoestlandt, 1948; Sapelkin i Fedoseev, 1981). A la cabra de mar, no hem pogut determinar la longitud de l'onada de l'espermatogènesi, tot i que en altres espècies com l'*Eriocheir sinensis* aquesta onada és de 3 a 4 mil·límetres (Hoestlandt, 1948).

El repartiment d'esperma (*sperm allocation*) és una estratègia reproductiva dels braquiürs que consisteix en la regulació de la quantitat d'esperma transferit a les femelles en funció de l'èxit reproductor immediat i les opcions de còpula previstes (Sato et al., 2006). En general, és acceptat que la inversió del mascle, en termes de quantitat d'esperma transferit, serà major quan major siga la competència entre mascles (*sperm competition*) per assegurar l'èxit reproductiu del mascle, tot i que també hi ha altres factors (Jivoff, 1997; Rondeau i Sainte-Marie, 2001; Williams et al., 2005). D'aquesta manera, un factor que també afecta el repartiment d'esperma és el nombre de femelles presents (Rondeau i Sainte-Marie, 2001). Així, la quantitat d'esperma assignada a cada còpula pels mascles del cranc de les neus, *Chionoecetes opilio*, disminueix en paral·lel a l'augment de la proporció de femelles per tal de fertilitzar el major nombre de femelles. Aquesta estratègia, tanmateix, no sembla donar-se en altres espècies (Sato et al., 2006; Sato i Goshima, 2007a). La qualitat de les femelles, estimada com la mida, també sembla afectar la quantitat d'esperma que els mascles els hi transfereixen, ja que les femelles més grans poden incubar més ous, els mascles també transfereixen major quantitat d'esperma (MacDiarmid i Butler IV, 1999; Sato et al., 2006; Sato i Goshima, 2007a; Magallón-Gayón et al., 2011). Un altre factor és el nombre de còpules que realitza un mascle, ja que la quantitat d'esperma disminueix amb les còpules successives (Jivoff, 1997; Rondeau i Sainte-Marie, 2001; Wolcott et al., 2005; Sato et al., 2006; Rubolini et al., 2007; Sato i Goshima, 2007a; Sato i Yoseda, 2010). El restabliment de les reserves d'esperma també juga un paper important en la quantitat d'esperma transferit, l'efecte del qual és més intens en taxes baixes com *Paralithodes brevipes* (> 28 dies, Sato et al., 2006) o *Birgus latro* (> 30 dies, Sato i Yoseda, 2010) en comparació als 9-20 dies observat a *Callinectes sapidus* (Kendall et al., 2001).

Considerant tots aquests aspectes que afecten el repartiment de l'esperma, l'estructura tubular podria tenir algun avantatge en la producció d'espermatozoides. En primer lloc, l'augment de la mida de la zona germinal en el testicle tubular, que forma una banda al llarg del tub seminífer en contrast a la disposició en cada lòbul del testicle lobular, resultaria en un major nombre d'espermatozoides produïts. Per altra banda, l'estructura tubular es podria haver seleccionat per augmentar la producció d'esperma sense afectar la mida del testicle, ja que l'enrotllament del túbul seria major respecte el testicle lobular. En aquest sentit, el testicle tubular de la cabra de mar, que mesura 7,5-8,0 cm, resulta de l'enrotllament d' aproximadament de 3 metres de tub seminífer (Simeó et al., 2009).

L'estudi morfològic i descripció del testicle planteja qüestions interessants en relació dels aspectes reproductius que tenen aplicació en el cultiu de la cabra de mar. La determinació de l'estacionalitat de l'activitat dels testicles és bàsica per a establir les condicions de manteniment dels reproductors. En les disseccions realitzades a individus dels experiments del capítol 2 s'ha constatat la presència d'espermatòfors al conducte deferent al llarg de quasi tot l'any (observació personal), la qual cosa suggereix que el testicle podria estar tot l'any actiu. La duració pràcticament anual del cicle reproductiu en les costes del Principat d'Astúries (García-Flórez i Fernández-Rueda, 2000), així com en condicions de captivitat (Andrés et al., 2010 i capítol 2) també pareix corroborar-ho. Per contra, si l'espermatogènesi fóra estacional, el nombre d'esperma podria disminuir al llarg del cicle reproductiu i provocar l'esgotament de les reserves d'esperma en el conducte deferent, de forma similar com ocorre en *Paralithodes brevipes* (Sato et al., 2005). Per altra banda, no hi ha cap estudi sobre el repartiment de l'esperma en la cabra de mar, tot i què, aquesta estratègia pot tenir una gran influència en l'èxit reproductiu com s'ha observat en les poblacions naturals (Sato et al., 2005; Sato i Goshima, 2007a; 2007b). En aquest sentit, la determinació de l'efecte dels factors abans descrits: la presència d'altres mascles competidors, del nombre de femelles, la talla de les femelles, les còpules successives i el temps de recuperació, permetria el disseny acurat de protocols de gestió de la presència dels mascles.

1.2 La glàndula accessòria del conducte deferent posterior i la competència dels espermatozoides

La paret del conducte deferent tendeix a presentar unes ramificacions o diverticles en els Majoidea, la funció dels quals sol ser l'emmagatzematge

d'espermatòfors i/o fluids seminals, tot i què també s'ha descrit l'absorció de materials i fagocitosi dels espermatozoides no transferits (Fasten, 1915, 1917; Mouchet, 1931; Hinsch i Walker, 1974; Sapelkin i Fedoseev, 1981; Diesel, 1991; Benhalima i Moriyasu, 2000).

La presència de diverticles en el conducte deferent de la cabra de mar ja fou descrita amb anterioritat per Mouchet (1931). A més a més, s'ha vist en aquesta tesi (capítol 1, article 1) què els diverticles apareixen de forma aïllada en la porció distal del CD anterior i augmenten la seua mida i nombre en el CD mitjà, on s'emmagatzemen els espermatòfors i els fluids seminals que els acompanyen. Mouchet (1931) també va destacar la presència d'una glàndula d'aspecte massiu a la zona posterior del CD, que en aquesta tesi s'ha denominat la glàndula accessòria del CD posterior, i la funció de la qual és la producció i emmagatzematge de fluids seminals què son transferits juntament amb els espermatòfors durant la còpula (Simeó et al., 2009). El paper d'aquest fluids sembla estar relacionada amb la competència dels espermatozoides (*sperm competition*). Donat que les femelles dels braquiürs presenten estructures d'emmagatzematge de l'esperma, les espermateques o receptacles seminals, els mascles han desenvolupat diferents tècniques per assegurar la paternitat de la descendència (Diesel, 1991). Els receptacles seminals són uns embossaments de l'aparell reproductor femení, connectats amb l'ovari mitjançant l'oviducte i amb el gonòporus per la vagina. En el cas de les femelles amb receptacles seminals tipus ventral, en els què l'oviducte se situa en la zona ventral del receptacle seminal i prop de la vagina, s'assumeix què l'esperma localitzat en la zona més ventral del receptacle seminal serà utilitzat per a la fertilització dels ous. D'aquesta manera, els mascles han desenvolupat estratègies per ser els últims en copular amb les femelles (*last male sperm precedence*) i assegurar-se la paternitat de la descendència.

En el cas dels Majoidea, els receptacles seminals de totes les espècies descrites són de tipus ventral, incloent la cabra de mar (Diesel, 1991; Rotllant et al., 2007; Sal Moyano et al., 2010). A l'interior dels receptacles seminals, els espermatòfors es troben en la zona posterior (ventral) de l'ejaculat i envoltats de fluids seminals (Sainte-Marie et al., 2000; Sal Moyano et al., 2010). D'aquesta manera, els fluids seminals arrossegueu l'esperma cap a la zona dorsal, més allunyada de la zona de fertilització, assegurant a l'últim mascle més probabilitat d'èxit reproductiu. La presència, doncs, de la massiva glàndula accessòria en el CD posterior suggereix que aquesta estratègia reproductiva és significativa en aquesta espècie.

Una altra estratègia és la exhibició de comportaments pre i postcopulatoris, els quals es basen en la protecció de la femella en períodes abans i després de la còpula per evitar la còpula amb un altre mascle (Diesel, 1991). En el cas de la cabra de mar, la protecció de la femella després de la còpula ha estat observat en almenys un cas (observació personal). En aquest cas, el mascle que acabava de copular es va situar entre la femella i el mascle rival, el qual va intentar desplaçar l'altre mascle amb agressions amb els quelípodes per capturar a la femella. Aquest comportament agonístic, que ha estat descrit en altres Majoidea (Hinsch, 1968; Schöne, 1968; Stevcic, 1971; Rondeau i Sainte-Marie, 2001) explicaria la pèrdua de potes de les femelles durant les lluites entre els mascles per copular amb elles i l'efecte deleteri en la supervivència de les femelles de la presència de dos mascles en un mateix tanc (capítol 2).

Així, sembla que aquesta espècie presenta una estratègia reproductiva per assegurar la paternitat de l'últim mascle. Tot i què són necessaris més estudis per corroborar aquest fet, se'n deriven implicacions per al cultiu en captivitat en relació a la gestió dels mascles. En aquest cas, si l'últim mascle transfeix una quantitat suficient de fluids seminals que dificulte o impossibiliti la utilització de l'esperma emmagatzemat, potser no seria recomanable que una femella copulés amb més d'un mascle abans de cada posta. Així també es minimitzaria el risc de ferides durant la còpula. Si, per altra banda, es corrobora el comportament postcopulatori de protecció de la femella, i l'efecte de la presència de més d'un mascle per tanc en la condició de les femelles, es podria desaconsellar la presència de més d'un mascle.

1.3 Models de gestió dels mascles

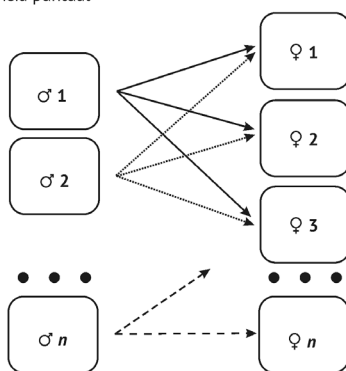
La presència contínua de varis mascles amb les femelles provoca una alta mortalitat després de dos anys de captivitat (capítol 2). La mortalitat de les femelles provoca un efecte negatiu en la producció larvària, pel què es fa necessari controlar la presència i el nombre dels mascles. En aquest sentit, també es deurien considerar els efectes de les diferents estratègies reproductives relacionades a la competència d'espermatozoides, com són el repartiment d'esperma i els mètodes de control de la paternitat. D'aquesta manera, i a falta de desenvolupar estudis específics per resoldre aquestes qüestions, es proposen dos models de presència dels mascles per al cultiu en captivitat de la cabra de mar (Figura 7):

- Model de presència puntual. En aquest model, tots els reproductors, tant els mascles com les femelles, es troben en tancs separats, i només es permet

el contacte per a la còpula. Aquest model es podria utilitzar si els mascles regulen la quantitat d'esperma en funció del nombre de femelles. A més a més, es podrien utilitzar diferents mascles per copular amb una o diferents femelles, en funció de la sincronia en la maduració dels ovaris i perimetria, en cas de què el temps de recuperació de l'esperma fora baix, assegurar la fertilització de la femella.

- Model de presència contínua. Aquest model es basaria en la presència contínua d'un sol mascle amb un nombre determinat de femelles, i es podria donar si els mascles no regulen la quantitat d'esperma en funció de la proporció de sexes. El nombre de femelles estaria en funció de la sincronització de la maduració dels ovaris, de la disminució de l'esperma transferit en còpules successives i de la capacitat del mascle de recuperar les reserves d'esperma. Tot i què aquest model comporta un menor control de la reproducció respecte el model de presència puntual, presenta l'avantatge de la reducció d'infraestructures (tancs, canalitzacions...), processos (neteja, alimentació...) i, conseqüentment, de costos.

A) Model de presència puntual



B) Model de presència contínua



Figura 7. Possibles models de gestió de la presència dels mascles en captivitat de *Maja brachydactyla*. En el model de presència puntual, tant mascles com femelles es troben en tancs individualitzats. Els mascles són transferits al tancs de les femelles només per a la còpula. En el model de presència contínua, només un hi ha un mascle per tanc, amb un nombre de femelles per determinar.

2. La glàndula andrògena

La glàndula andrògena (AG, abreviació de l'anglès *androgenic gland*) és el teixit responsable de la diferenciació sexual dels mascles dels crustacis, i participa en el manteniment dels caràcters sexuals masculins i l'activitat del testicle (Ventura et al., 2011). L'AG fou descrita per primera volta a *Callinectes sapidus* (Cronin, 1947), tot i què la seua funció fou determinada uns anys després (Charniaux-Cotton, 1954). L'AG produeix l'hormona de l'AG (*androgenic gland hormone*, abreviat AGH en anglès) que sembla ser la única responsable de les funcions de l'AG i té una naturalesa proteica amb una estructura semblant a la insulina, motiu pel qual actualment s'utilitza el terme *insulin-like androgenic gland factor* (abreviat en anglès *IAG*) enlloc d'AGH (Hasegawa et al., 1987; Martin et al., 1999; Manor et al., 2007; Ventura et al., 2009). L'aïllament del gen que codifica el *IAG* en espècies d'interès aquícola (Taula 8) ha estat l'objectiu durant els últims anys, ja que la separació dels òrgans que participen en la gametogènesi (els testicles) i la regulació de la diferenciació sexual (l'AG) permet el control del sexe a través de manipulacions endocrines en els crustacis. Aquestes manipulacions es feien mitjançant l'ablació o implantació de l'AG, o l'administració d'extractes de l'AG que resultaven en la feminització dels mascles o la masculinització de les femelles, respectivament (Ventura i Sagi, 2012). Recentment, s'han desenvolupat tècniques moleculars mitjançant l'administració de RNA de doble cadena del gen *IAG* (RNA d'interferència) que permeten el canvi de sexe de forma parcial (Ventura et al., 2009; Rosen et al., 2010) o total (Ventura et al., 2012).

Taula 8. Espècies de crustacis decàpodes d'interès aquícola en les que s'ha aïllat el gen que codifica per al *IAG*.

| Espècie | Gen | Referència |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>Fenneropenaeus chinensis</i> | <i>Fc-IAG 1, Fc-IAG 2</i> | Li et al., 2012 |
| <i>Marsupenaeus japonicus</i> | <i>Maj-IAG</i> | Banzai et al., 2011 |
| <i>Penaeus monodon</i> | <i>Pm-IAG</i> | Mareddy et al., 2011 |
| <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | <i>Mr-IAG</i> | Ventura et al., 2009 |
| <i>Macrobrachium lar</i> | <i>Malar-IAG</i> | Banzai et al., 2012 |
| <i>Palaemon paucidens</i> | <i>Papau-IAG</i> | |
| <i>Palaemon pacificus</i> | <i>Papac-IAG</i> | |
| <i>Cherax quadricarinatus</i> | <i>Cq-IAG</i> | Manor et al., 2007 |
| <i>Cherax destructor</i> | <i>Cd-IAG</i> | Phoungpetchara et al., 2008 |
| <i>Callinectes sapidus</i> | <i>Cas-IAG</i> | Chung et al., 2011 |
| <i>Portunus pelagicus</i> | <i>Pp-IAG</i> | Sroyraya et al., 2010 |

La manipulació del sexe és d'interès per al cultiu d'espècies de crustacis decàpodes que presenten un patró de creixement, requeriments alimentaris o comportaments diferents entre sexes amb l'objectiu de crear cultius exclusivament d'un sol sexe (Sagi i Aflalo, 2005). Els avantatges productius del cultiu d'un sol sexe són varis, com ara la prolongació de l'època de venda o l'ús dels recursos energètics únicament en el creixement. A més a més, el cultiu d'un sol sexe és més segur mediambientalment, ja que es redueix el risc d'introducció d'espècies a través d'escapaments incontrolats (Sagi i Aflalo, 2005; Ventura i Sagi, 2012).

En el capítol 1, article 1 (Simeó et al., 2009), l'AG de la cabra de mar es va localitzar adherida al conducte ejaculador, la descripció histològica de la qual és semblant a la anteriorment descrita en altres espècies de crustacis (Charniaux-Cotton, 1958; Charniaux-Cotton et al., 1966). El citoplasma de les cèl·lules de l'AG presenta un reticle endoplasmàtic rugós ben desenvolupat, suggerint, com en altres espècies, que el producte de la glàndula és de tipus proteic (Meusy, 1972). Tot i que no hi ha cap estudi al respecte en la cabra de mar, els gens que codifiquen per al a IAG d'altres crancs com *Callinectes sapidus* (Chung et al., 2011) i *Portunus pelagicus* (Sroyraya et al., 2010) han estat aïllats recentment i presenten una estructura i funció semblant a la descrita en altres crustacis decàpodes. L'aplicació de les tècniques de manipulació endocrina del sexe en la cabra de mar podrien ser d'interès per al cultiu exclusiu de femelles que són més apreciades i amb una major valor econòmic que els mascles pels ovaris i presència dels ous (Anònim, 2007). En aquest sentit, l'esquema de producció d'un cultiu de femelles de la cabra de mar requeriria la inversió sexual de femelles en neo-mascles (individus genèticament femelles i fenotípicament mascles), que en creuar-se amb un mascle normal generaria una descendència 100% de femelles (Figura 8).

3. Viabilitat de l'esperma, inseminació i incubació artificial

L'esperma dels braquiürs emmagatzemat als receptacles seminals roman viable almenys un cicle reproductiu, i en algunes espècies, fins dos anys (Paul, 1984; Sainte-Marie, 1993; Yamaguchi, 1998; Nagao i Munehara, 2007; Darnell et al., 2009). De forma similar, els resultats del capítol 2, article 6 mostren que la viabilitat de l'esperma de la cabra de mar és almenys de 18 mesos (dues temporades de reproducció), estimada aquesta com la presència de larves acabades de descloure en els tancs en absència de mascles. Malgrat les dades de longevitat de l'esperma dels braquiürs, hi ha poca

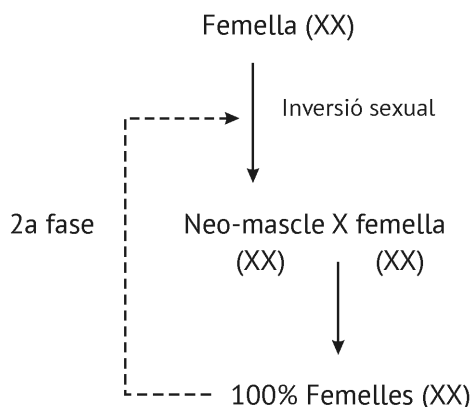


Figura 8. Possible esquema de producció d'un cultiu de femelles exclusivament de *Maja brachydactyla*, a partir del proposat per a braquiüers de Ventura i Sagi (2012). Esquema modificat amb el consentiment de l'editor. Aquest model es basa en què les femelles de braquiüers són homogamètiques, tenen dos cromosomes sexuals homòlegs (XX) i els mascles heterogamètics (XY). Els mètodes d'inversió sexual de les femelles no estan desenvolupats.

informació sobre els factors que l'afecten. Com a la resta de grups animals, s'assumeix que la viabilitat de l'esperma decreix amb el temps (Darnell et al., 2009). Tanmateix, els fluids seminals presenten uns pèptids amb activitat antibacteriana que protegeixen l'esperma durant l'emmagatzematge al receptacle seminal (Jayasankar i Subramoniam, 1999; Huang et al., 2006). A més a més, els fluids seminals en els que espermatozoides són transferits presenten quantitats significatives de proteïnes, lípids i carbohidrats que serveixen per cobrir les necessitats metabòliques dels espermatozoides, la qual cosa és molt important degut al temps que els espermatozoides poden arribar a estar al receptacle seminal (Subramoniam, 1991). L'esperma sembla que presenta activitat metabòlica, tant en vies aeròbiques com anaeròbiques, mentre està emmagatzemat al conducte deferent i al receptacle seminal (Jeyalectumie i Subramoniam, 1987; Anilkumar et al., 1996). En aquest sentit, l'absència de mitocondris i d'activitat d'enzims oxidatius com la citocrom C oxidasa suggereixen que la via metabòlica principal dels espermatozoides és anaeròbia (Subramoniam, 1991). En el cas de la cabra de mar, al llarg de l'espermatogènesi s'observà una degradació dels mitocondris, els quals romanen associats al complex d'estructures i òrgans (complex SO) a l'espermatozoide (Simeó et al., 2010a; Simeó et al., 2010b). Aquests mitocondris podrien presentar alguna activitat oxidativa, donat que presenten

algunes crestes encara que molt reduïdes, i tenir un paper important en la viabilitat de l'esperma durant l'emmagatzematge en el receptacle seminal. En aquest sentit, l'estudi de la composició bioquímica dels fluids seminals produïts per la glàndula accessòria del conducte deferent posterior, així com del metabolisme dels espermatozoides, incloent el paper del complex SO serien d'interès per determinar els factors que afecten la viabilitat dels espermatozoides i la seua aplicació al cultiu.

Tot i què els receptacles seminals semblen el lloc més adient per a l'emmagatzematge i viabilitat de l'esperma, la criopreservació dels espermatozoides és una tècnica d'interès per a l'aqüicultura. La criopreservació presenta com avantatges la millora de la disponibilitat d'espermatozoides, la reducció d'animals, la creació de bancs genètics o construcció de programes de cria selectiva (Bhavanishankar i Subramoniam, 1997). Tanmateix, la majoria dels estudis se centren en el desenvolupament dels protocols de preservació (substàncies conservadores, temperatura, temps) encara què recentment s'ha preservat esperma d'*Eriocheir sinensis* durant 450 dies sense alterar la capacitat de reacció acrosòmica (Jeyalectumie i Subramoniam, 1989; Bhavanishankar i Subramoniam, 1997; Kang et al., 2009). La criopreservació de l'esperma de la cabra de mar permetria un avanç tecnològic en els models de producció, minimitzant el factor dels reproductors i aprofitant els avantatges propis d'aquesta tècnica (Figura 9). L'obtenció de l'esperma es podria realitzar amb estimulacions elèctriques, com ocorre en altres espècies de crustacis decàpodes (Subramoniam, 1991), i l'esperma es podria preservar en funció de les necessitats de producció. Donat què la fecundació en els braquiüres s'assumeix que és interna, l'esperma es podria transferir directament a la femella (Bauer, 1986; Diesel, 1991). Tanmateix, també és possible practicar la fertilització *in vitro* en medi extern, com s'ha provat en *Perisesarma bidens* (Sarker et al., 2009). La incubació dels ous també es podria realitzar *in vitro*, com ja ha estat provat amb èxit en varies espècies de braquiüres tant en sistemes estàtics o de flux, i amb antibiòtics per evitar la proliferació de fongs i bacteris (Costlow Jr i Bookhout, 1960; Lee i Yamazaki, 1989; Bas i Spivak, 2000; Zeng, 2007; Lee, 2009; Sarker et al., 2009; Lee, 2011). La recol·lecció dels ous depèn de l'espècie, però el mètode més comú és el tall dels fils que subjecten els ous als pleopodis de la femella (Zeng, 2007).

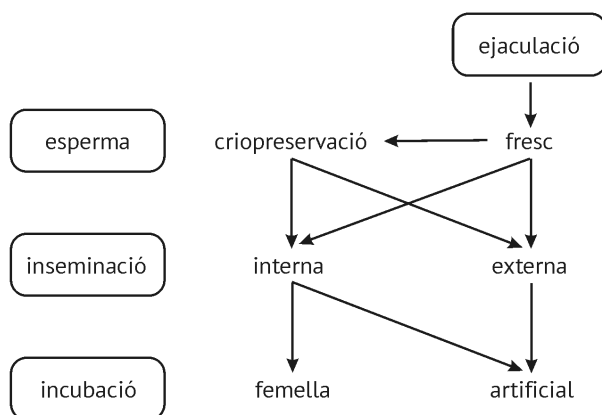


Figura 9. Possible esquema de producció de larves de la cabra de mar utilitzant distintes combinacions de criopreservació, inseminació i incubació.

4. La domesticació dels reproductors

L'èxit reproductiu dels crustacis decàpodes depèn d'una gran varietat de factors (temperatura, disponibilitat d'aliment, salinitat, temps des de la darrera muda, l'edat dels reproductors) que genèricament s'agrupen en factors ambientals i biològics (Benzie, 1997; Racotta et al., 2003; Sato et al., 2005; Sato et al., 2006; Bas et al., 2007; Darnell et al., 2009; Verísimo et al., 2011). En aqüicultura, aquests aspectes han estat estudiats principalment en els llagostins (Benzie, 1997; Racotta et al., 2003), que són el grup de crustacis decàpodes de major importància aqüícola, tant en producció com en valor (FAO, 2010). Entre els factors ambientals, la temperatura, fotoperíode, intensitat de la llum i altres paràmetres fisicoquímics de l'aigua, així com la mida dels tancs dels reproductors tenen efecte en la reproducció en captivitat (Benzie, 1997). La condició dels reproductors és un factor clau que afecta la qualitat i quantitat de les postes de llagostins, i pot ser manipulada en diferent intensitat en el procés aqüícola (Racotta et al., 2003). En aquest sentit, la nutrició, edat i origen dels reproductors, l'esgotament reproductiu, la manipulació endocrina i l'herència genètica dels reproductors són factors que afecten la condició dels reproductors (Racotta et al., 2003). En els braquiürs d'interès aqüícola, la nutrició dels reproductors és el factor que està rebent una major atenció (Paterson, 2009).

En la present tesi, s'ha estudiat l'efecte de la presència dels mascles i del fotoperíode (capítol 2). Els resultats indiquen que ambdós factors afecten el nombre de larves acabades de descloure, i poden tenir un efecte en el pes

sec individual i la composició bioquímica de les larves. En el capítol 2 article 6, el nombre de larves en absència de mascles fou significativament menor respecte la presència de mascles, degut a que les femelles en absència de mascles consumien les reserves d'esperma dels receptacles seminals, mentre que les femelles en presència de mascles copulaven i utilitzaven el nou esperma. L'esgotament de les reserves d'esperma en postes successives de femelles mantingudes en absència de mascles ha estat descrit en altres espècies (Paul, 1984). A més a més, el contingut de proteïnes de les larves també fou significativament major en presència de mascles, la qual cosa suggereix que la presència de mascles té poca influència en la composició de les larves acabades de descloure. De fet, el pes sec en presència i absència de mascles, i els continguts de proteïnes i lípids en presència de mascles variaren estacionalment, de forma similar a com havia ocorregut en un estudi previ (Andrés et al., 2010). Aquests resultats suggereixen que el temps en captivitat o el fotoperíode (únic valor modificat al llarg dels experiments) tenen un efecte significatiu en la reproducció en captivitat de la cabra de mar. De forma semblant, els resultats del capítol 2 article 7 suggereixen que el fotoperíode té un efecte en la reproducció de la cabra de mar, encara que no és suficient per modificar el comportament reproductiu. Així, el desfasament de fotoperíodes de l'experiment DP no va resultar en un endarreriment de la producció primaveral, tot i què, el fotoperíode 8L (8 hores de llum) va produir un nombre significativament major de larves que la resta de tractaments de l'experiment de fotoperíodes constants (experiment CP). La composició bioquímica de les larves acabades de descloure no varià estacionalment a l'experiment CP, la qual cosa podria ser efecte del fotoperíode en comparació amb els resultats obtinguts per Andrés et al., (2010), a l'article 6 (grup MP) i a l'article 7 (grup control de l'experiment DP) on s'observaren diferències estacionals significatives sota un fotoperíode natural. La comparació entre el pes sec individual i contingut bioquímic proximal de les larves acabades de descloure a l'experiment DP mostra diferències significatives en algunes estacions. Tanmateix, quan aquestes dades s'organitzen en funció de les estacions naturals, enlloc de les estacions experimentals, aquestes diferències ja no són significatives, la qual cosa corrobora que la modificació del fotoperíode és insuficient per modificar el comportament reproductiu de la cabra de mar.

Un altre aspecte estudiat en els llagostins d'interès aquícola és l'efecte de l'origen dels reproductors, generalment salvatges o domesticats, en el rendiment reproductiu (Racotta et al., 2003). Els resultats en aquest camp són de difícil interpretació, ja que les dades d'alguns paràmetres són contradictòries (Racotta et al., 2003). Tanmateix, l'ús de reproductors criats en captivitat és

avantatjós en alguns aspectes (Racotta et al., 2003; Wu et al., 2010). El cultiu de braquiüers depèn de reproductors salvatges que són capturats i transportats a les granges on es mantenen per a l'eclosió de les larves (Wu et al., 2007; Wu et al., 2010). Aquesta pràctica, tanmateix, limita el desenvolupament sostenible de l'activitat aquícola degut a la variació en quantitat i qualitat dels reproductors i l'entrada de patògens a les granges (Wu et al., 2010). A més a més, la utilització de reproductors salvatges pressiona les poblacions naturals d'aquestes espècies, que també solen ser espècies d'interès pesquer, compromentent la viabilitat de les poblacions naturals. La domesticació dels reproductors, entesa com la utilització de reproductors criats en captivitat (Quinitio et al., 2011) és un fet necessari per superar aquesta situació. La domesticació, per altra banda, presenta una sèrie d'avantatges com ara la reducció dels costos d'operació, la disponibilitat de llavor durant tot l'any i per tant una disminució de les variacions estacionals del producte i l'establiment de programes de millora genètica (Wu et al., 2010).

En aquest sentit, tant el sistema d'estabulació com l'origen (salvatge o domesticat) afecten la qualitat dels reproductors i de les larves en els braquiüers (Wu et al., 2007; Wu et al., 2010). En la present tesi, el rendiment reproductiu i composició de les larves acabades de descloure dels grups de reproductors utilitzats en el capítol 2 es poden comparar per determinar l'efecte de la utilització de dos estocs de reproductors d'anys diferents: 2005 i 2008. El grup 2005 es correspon al tractament MP de l'article 6 i el grup 2008 al control de l'experiment DP de l'article 7, capturats en novembre de 2004 i 2007, respectivament, a la Ria d'A Coruña per pescadors de flota artesanal i es mantingueren en les mateixes condicions d'estabulació: fotoperíode natural, 18°C, salinitat, alimentació i proporció de sexes, durant els dos anys d'experiment.

La mida i pes de les femelles variaren significativament entre els dos anys, essent les femelles de 2005 de major mida i pes (Taula 9). Aquestes diferències, tanmateix, no foren significatives en el cas dels mascles, tot i que els exemplars de l'any 2005 tenien una major mida i pes. La mida de les femelles és un dels principals factors que afecten el nombre i volum de la posta en els braquiüers, ja que la mida de la femella determina la mida de l'abdomen on s'incuben els ous (Hines, 1982, 1991). Aquest fet també ha estat observat a la cabra de mar, en la que la principal causa de la variació en el nombre d'ous i pes sec de la posta fou adscrita a la longitud de la closa de la femella (Verísimo et al., 2011). A més a més, també en aquesta espècie es varen trobar diferències interanuals significatives en la fecunditat i pes sec de la posta, però en aquest estudi foren atribuïdes al moment del mostreig (Verísimo

Taula 9. Biometries de les femelles i els mascles dels estocs de reproductors de 2005 i 2008. Les dades es presenten com mitjana±desviació estàndard i nombre d'individus mesurats (n). Els superíndexs en una mateixa fila indiquen diferències significatives (*t*-test de Student, *p*<0,05).

| | | 2005 | n | 2008 | n |
|----------|---------|-----------------------------|---|----------------------------|----|
| Femelles | CL (mm) | 163,92±5,84 ^a | 9 | 142,26±8,38 ^b | 12 |
| | Pes (g) | 1204,41±148,99 ^a | 8 | 922,58±160,27 ^b | 12 |
| Mascles | CL (mm) | 151,79±4,82 | 4 | 147,72±3,48 | 4 |
| | Pes (g) | 1138,80±95,11 | 4 | 1109,75±74,19 | 4 |

et al., 2011). En el cas de les presents dades, les diferències en longitud de closca i pes, tot i ser significatives, no semblen tenir un efecte en el nombre de larves, ja que la producció larvària al final dels experiments fou semblant en els dos grups de reproductors: 3,8 milions de larves a l'estoc de 2005 i 4,0 milions a l'estoc de 2008 (Figura 10). En relació a aquest fet, s'ha de tenir en compte que els estudis de fecunditat consideren el nombre d'ous i que al llarg de l'embriogènesi es produeix una pèrdua d'ous per causes que no estan clarificades, la qual resulta en una disminució del nombre de larves que finalment desclouen (Figueiredo et al., 2008). També s'ha de considerar que la supervivència de les femelles fou, amb excepció de la primera tardor, superior en el grup 2008, la qual cosa explicaria el major nombre de larves acabades de descloure.

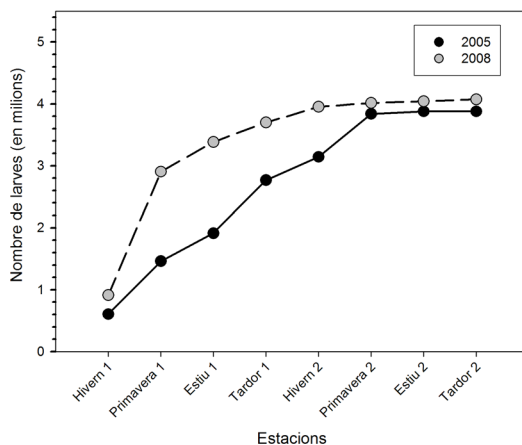


Figura 10. Producció larvària acumulada dels grups 2005 i 2008 al llarg dels dos anys de període experimental.

A l'inici de l'experiment, es van dissecar femelles i es van prendre mostres d'hepatopàncrees o glàndula digestiva, i de l'ovari per a l'anàlisi bioquímica proximal, què es va realitzar seguint els mètodes descrits en altres treballs (Andrés et al., 2007). El contingut de proteïnes i carbohidrats de l'hepatopàncrees, i els carbohidrats de l'ovari també variaren significativament entre els estocs de reproductors, i de la mateixa forma que amb les dades biomètriques, els valors de tots els components bioquímics foren majors en l'estoc de 2005 (Taula 10). Els canvis en la composició bioquímica entre els diferents estocs de reproductors poden afectar la qualitat de les larves ja què les reserves dels ous utilitzades durant la embriogènesi són mobilitzades des de l'hepatopàncrees i l'ovari (Racotta et al., 2003).

Taula 10. Contingut bioquímic, en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de pes sec, de l'hepatopàncrees i ovari de les femelles de la cabra de mar dissecades a l'inici de l'experiment dels estocs de 2005 i 2008. Les dades es presenten com mitjana±desviació estàndard. El nombre d'individus analitzats fou 2 en el grup 2005 i 8 en el grup 2008. Els superíndexs en una mateixa fila indiquen diferències significatives (t-test de Student o test de Mann-Whitney, $p<0,05$). CH, carbohidrats; LPD, lípids; PRT, proteïnes.

| | | 2005 | 2008 |
|----------------|----|--------------------|--------------------|
| Hepatopàncrees | PR | 116±1 ^a | 82±10 ^b |
| | CH | 11±3 ^a | 7±1 ^b |
| | LP | 433±156 | 412±63 |
| Ovari | PR | 418±35 | 399±48 |
| | CH | 50±11 ^a | 20±3 ^b |
| | LP | 97±31 | 140±31 |

Al llarg dels experiments es van recol·lectar mostres de larves acabades de descloure per a la seua anàlisi bioquímica proximal i estimació del pes sec individual. La comparació entre els grups s'ha realitzat agrupant les dades de totes les mostres de cada tractament. Els resultats mostren diferències significatives en tots els paràmetres entre estocs de reproductors (Figura 11). Només el pes sec de les larves fou significativament major en l'estoc de 2008, mentre que els continguts de PRT, CH i LPD resultaren majors en l'estoc de 2005. L'efecte de les variacions de pes i composició en la condició i desenvolupament larvari de la cabra de mar es desconeix, malgrat que s'han descrit possibles conseqüències de la diferent composició de les larves en altres espècies de braquiürs en relació a l'origen dels reproductors (Wu et al., 2010).

En resum, aquestes dades mostren la variabilitat de la producció larvària i la composició bioquímica de les larves acabades de descloure com efecte de la utilització de diferents d'estocs de reproductors. Les diferències observades entre els estocs de reproductors podrien tenir conseqüències en les fases

larvàries, afectant tant a paràmetres bioquímics com de cultiu, com ocorre en l'espècie *Portunus trituberculatus* (Wu et al., 2010). La domesticació de la cabra de mar suposaria un avanç important en el control de la qualitat dels reproductors, necessari per al desenvolupament d'un cultiu sostenible i profitós. En aquest sentit, a més dels estudis sobre diferents aspectes reproductius, com podrien ser la nutrició dels reproductors, seria interessant l'estudi de les condicions de cultiu per a l'engreix (cultiu de juvenils), aspecte que determinarà la qualitat dels reproductors domesticats.

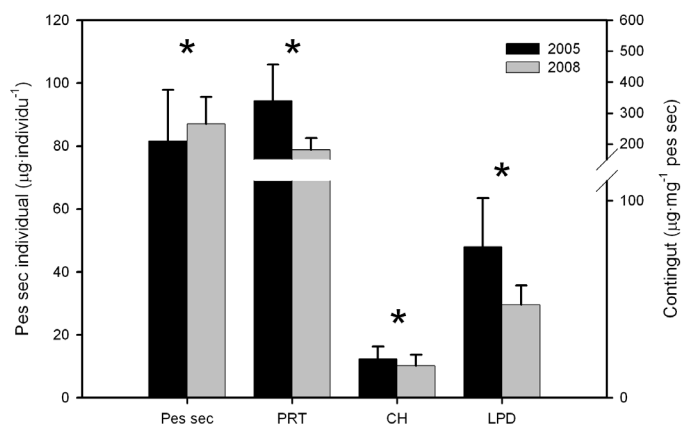


Figura 11. Pes sec (eix de l'esquerra) i contingut bioquímic (eix de la dreta) de les larves acabades de descloure de la cabra de mar obtingudes de reproductors capturats en 2005 i 2008. Les barres indiquen la mitjana i les barres les desviacions estàndards. Els asteriscos indiquen diferències significatives entre estocs de reproductors (*t*-test de Student o Mann-Whitney, $p < 0,05$). CH, carbohidrats; LPD, lípids; PRT, proteïnes.