

## Effect of broodstock diet on the fecundity and biochemical composition of eggs of the Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus* Gould 1852)

### Efecto de la dieta de los reproductores sobre la fecundidad y composición bioquímica de los huevos del pulpo rojo patagónico (*Enteroctopus megalocyathus* Gould 1852)

A Farías<sup>1,2\*</sup>, JC Navarro<sup>3</sup>, V Cerna<sup>4</sup>, S Pino<sup>2</sup>, I Uriarte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, PO Box 1327, Puerto Montt, Chile.

<sup>2</sup> CIEN Austral, Av. Los Pinos s/n, Puerto Montt, Chile.

<sup>3</sup> Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), E-12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain.

<sup>4</sup> Hatchery de Invertebrados Marinos, Universidad Austral de Chile, Puerto Montt, Chile.

\* Corresponding author. E-mail: afarias@spm.uach.cl

**ABSTRACT.** Twelve females of the Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus*, of  $1.4 \pm 0.2$  kg, were maintained at 12 °C under three conditioning treatments: T1 (F10%), frozen fish at 10% daily body weight (bwt d<sup>-1</sup>); T2 (FC (3:1) 10%), mix (3:1) of frozen fish and fresh crab at 10% bwt d<sup>-1</sup>; and T3 (F7.5%), frozen fish at 7.5% bwt d<sup>-1</sup>. Egg laying was observed after four months of conditioning, when from 545 to 1100 °C days had been reached, and when females had increased 1.5 times in body weight. Absolute fecundity reached 2129 eggs ( $\pm 1182$ ) per female in treatments T1 and T2, whereas in T3 fecundity reached only 56 eggs. The lowest values of perivitelline protein were obtained in T1 and T2, while total lipid content in the yolk was similar among treatments. The most frequent fatty acids in egg yolk were 16:0, 17:0, 17:1, 18:0, 20:1, 20:4n-6, 23:0, 20:5n-3, 22:5n-3, and 22:6n-3. Significant differences in fatty acid contents among treatments were observed only for 16:1 and 22:5n-3. The results showed that females can be conditioned for egg production even when fed a diet lacking crustaceans, and that a dietary reduction of 7.5% bwt d<sup>-1</sup> diminished fecundity without affecting egg quality in terms of their biochemical composition.

**Key words:** reproductive conditioning, fecundity, perivitelline protein, fatty acids, *Enteroctopus megalocyathus*.

**RESUMEN.** Doce hembras del pulpo rojo patagónico *Enteroctopus megalocyathus*, de  $1.4 \pm 0.2$  kg, se mantuvieron a 12 °C bajo tres tratamientos de acondicionamiento: T1 (P10%), pescado congelado a 10% peso corporal d<sup>-1</sup>; T2 (PJ (3:1) 10%), mezcla (3:1) de pescado congelado y jaiba fresca a 10% peso corporal d<sup>-1</sup>; y T3 (P7.5%), pescado congelado a 7.5% peso corporal d<sup>-1</sup>. Los desoves se observaron luego de cuatro meses de acondicionamiento, en periodos que variaron entre 545 y 1100 °C días acumulados, durante los cuales las hembras aumentaron 1.5 veces su peso corporal. La fecundidad absoluta obtenida de los tratamientos T1 y T2 alcanzó en promedio 2129 huevos ( $\pm 1182$ ) por hembra, mientras que con el tratamiento T3 sólo se obtuvieron 56 huevos por hembra. El contenido de proteína perivitelina fue inferior en los huevos de los tratamientos T1 y T2, mientras que el contenido de lípidos totales fue similar en los vitelos procedentes de los tres tratamientos de acondicionamiento. Los ácidos grasos más frecuentes en los vitelos de los huevos fueron 16:0, 17:0, 17:1, 18:0, 20:1, 20:4n-6, 23:0, 20:5n-3, 22:5n-3 y 22:6n-3, observándose diferencias significativas sólo en los contenidos de los ácidos grasos 16:1 y 22:5n-3. Los resultados mostraron que las hembras pueden acondicionarse y realizar la puesta aunque la dieta carezca de crustáceos, y que la reducción de la ración alimenticia a un 7.5% peso corporal d<sup>-1</sup> disminuyó la fecundidad pero no significó una pérdida de la calidad de los huevos en términos de su composición bioquímica.

**Palabras clave:** acondicionamiento reproductivo, fecundidad, proteína perivitelina, ácidos grasos, *Enteroctopus megalocyathus*.

## INTRODUCTION

The Patagonian or southern red octopus *Enteroctopus megalocyathus* (Gould 1852) and the octopus *Octopus mimus* are the two most important commercial octopus species in Chile, with annual landings fluctuating between 2000 and 5000 t (Pérez *et al.* 2006). The Patagonian red octopus is distributed only along the southernmost coasts of South America. As a result of its significant commercial exploitation in southern Chile, the fisheries authority decreed a prolonged closed season of three years for this resource,

## INTRODUCCIÓN

El pulpo del sur o pulpo rojo patagónico *Enteroctopus megalocyathus* (Gould 1852) y el pulpo *Octopus mimus* son las dos especies de pulpo de mayor importancia comercial en Chile, con capturas entre 2000 y 5000 t año<sup>-1</sup> (Pérez *et al.* 2006). El pulpo rojo patagónico se distribuye sólo en las costas australes de Sudamérica. Su explotación comercial es muy importante en el sur de Chile, lo que ha llevado a la autoridad pesquera a decretar una veda prolongada para este recurso por tres años, a contar de noviembre de 2008. La

beginning in November 2008. The fishery of this species is comparable to that of the red octopus *Octopus maya* off the Yucatán Peninsula (Mexico), a species for which urgent management measures are also required to ensure its future sustainability (Jurado-Molina 2010).

The reproductive cycle of *E. megalocyathus* begins in winter, so that maximum maturity is attained in spring and extends throughout the summer, and ends with a resting period in autumn (Chong *et al.* 2001). During this cycle, the maximum reproductive indices are observed in December and January, with an estimated fecundity between 20,000 and 100,000 oocytes per female. Oyarzún and Gacitúa (2001), based on the gonadosomatic index, determined that first sexual maturity of *E. megalocyathus* females occurred at 77 cm total length (TL) and 1.25 kg, while Chong *et al.* (2001) observed that the size at first maturity was 71.7 cm TL in females and 69.9 cm TL in males.

Octopus broodstock have adapted well to captivity, with nutrition playing a key role in their survival and growth (Cortez *et al.* 1999, Iglesias *et al.* 2000, Pérez *et al.* 2006, González 2008). Little information is available about the quality of eggs associated with that of the conditioning diet of cephalopod broodstock (Semmens *et al.* 2004). Viable eggs of *E. megalocyathus* have been obtained under controlled culture conditions, the embryonic development up to hatching taking 150 days (Uriarte *et al.* 2008). In the wild, advanced embryos have been observed to complete their development in 80 days, and first paralarvae have been observed up to 5 days after hatching (Ortiz *et al.* 2006).

This study aims to determine, for the first time, the fecundity and biochemical composition of the eggs of *E. megalocyathus* under controlled laboratory conditions.

## MATERIAL AND METHODS

Female specimens of *E. megalocyathus*, of  $1.4 \pm 0.2$  kg, were collected in Hueihue (41°52' S, 73°51' W), region X, Chile, in November 2007, and transported to the Marine Invertebrate Hatchery of the Universidad Austral de Chile (HIM-UACH), where they were maintained in a quarantine, open seawater system without food for one week. Twelve females were selected, measured, weighed, and placed in individual 1000-L tanks connected to a seawater recirculation system under the following conditions: temperature of 12 °C, salinity of 30, 10% daily water exchange, mechanical removal of organic compounds, and continuous ozone sterilization. Females were maintained in semidarkness on a 12:12 h (night:day) photoperiod. Three conditioning treatments were used: T1 (F10%), frozen fish at 10% daily body weight (bwt d<sup>-1</sup>); T2 (FC (3:1) 10%), mix (3:1) of frozen fish and fresh crab at 10% bwt d<sup>-1</sup>; and T3 (F7.5%), frozen fish at 7.5% bwt d<sup>-1</sup>. Food was supplied daily at the same time, after the daily cleaning of the tanks, until gonadal maturation had ended with the laying of batches of eggs in lairs. The fish and crab used were *Odontesthes* sp. and *Cancer edwardsii*,

pesquería de esta especie es comparable a la explotación del pulpo rojo de la península de Yucatán, que también requiere medidas urgentes de manejo para asegurar la sustentabilidad de *Octopus maya* en el futuro (Jurado-Molina 2010).

El ciclo reproductivo de *E. megalocyathus* comienza en invierno para alcanzar la máxima madurez en primavera, extendiéndose todo el verano y finalizando con un periodo de descanso en otoño (Chong *et al.* 2001). Durante este ciclo, los máximos índices reproductivos se observan en diciembre y enero, con una fecundidad estimada entre 20,000 y 100,000 ovocitos por hembra. Oyarzún y Gacitúa (2001), con base en el índice gonadosomático, determinaron que la primera madurez sexual de *E. megalocyathus* ocurría a 77 cm de longitud total y 1.25 kg de peso para las hembras, mientras que Chong *et al.* (2001) observaron la primera madurez en hembras de 71.7 cm de longitud total y en machos de 69.9 cm de longitud total.

Los reproductores de esta especie presentan una buena adaptación al cautiverio; no obstante, la alimentación es uno de los aspectos clave que afectan a la supervivencia y crecimiento (Cortez *et al.* 1999, Iglesias *et al.* 2000, Pérez *et al.* 2006, González 2008). Los antecedentes sobre la calidad de huevos asociada a la de la dieta de acondicionamiento de los reproductores de cefalópodos son escasos (Semmens *et al.* 2004). Se han obtenido huevos viables de *E. megalocyathus* bajo condiciones controladas de cultivo, observándose que el desarrollo embrionario demora 150 días hasta la eclosión (Uriarte *et al.* 2008). En la naturaleza se han descrito embriones avanzados que completan su desarrollo en 80 días y las primeras paralarvas se han observado hasta los 5 días posteclosión (Ortiz *et al.* 2006).

Hasta el momento no existen estudios que determinen la fecundidad y composición bioquímica de los huevos de *E. megalocyathus* bajo condiciones controladas de laboratorio, lo que constituye el objetivo de este estudio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron hembras de *E. megalocyathus*, de  $1.4 \pm 0.2$  kg, en Hueihue (41°52' S, 73°51' W), X región de Chile, en noviembre de 2007, y se trasladaron al Hatchery de Invertebrados Marinos de la Universidad Austral de Chile (HIM-UACH), donde se mantuvieron en sistema de cuarentena con circuito abierto de agua de mar y sin alimentar por una semana. Doce hembras fueron seleccionadas, medidas, pesadas y llevadas a estanques individuales de 1000 L conectados a un sistema de recirculación de agua de mar con las siguientes características: temperatura de 12 °C, salinidad de 30, recambio de 10% del agua al día, remoción mecánica de compuestos orgánicos y esterilización continua por ozono. Las hembras se mantuvieron en semioscuridad con un fotoperiodo 12:12 h (noche:día). Se utilizaron tres tratamientos de acondicionamiento: T1 (P10%), pescado congelado a 10% peso corporal d<sup>-1</sup>; T2 (PJ (3:1) 10%), mezcla (3:1) de pescado congelado y jaiba fresca a 10% peso corporal d<sup>-1</sup>; y

respectively. Samples of these two products were stored monthly at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for subsequent lyophilization and biochemical analysis. Cumulative thermal degrees were calculated as a measure of the conditioning time associated with temperature that allowed the laying of eggs, considering an initial basal temperature of  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , at which gametogenesis does not occur (Hahn 1989).

After laying the eggs, the females incubated them within the lairs and only fed occasionally during this incubation period. The lairs used were designed by Rosas *et al.* (pers. comm.). Two samples of 12 eggs were taken weekly from each clutch to analyze the protein in the perivitelline fluid, yolk lipids, and fatty acids of total yolk lipids. Sampling initiated on the third day after egg laying and caused minimal stress to the female. According to Uriarte *et al.* (2008), *E. megalocyathus* embryos are easily observable after the twelfth week of incubation at  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , so sampling was conducted weekly during the first 12 weeks and discontinued when embryonic development was no longer observed or the eggs became contaminated. Morphologically, tainted eggs show swelling, yellow coloring, decreased turgidity, and occasionally, hair-like filaments on the surface (Uriarte *et al.* 2008). The most common bacteria in the contaminated eggs are *Neptunomonas naphthovorans* and *Pseudomonas fulva* (Uriarte *et al.* 2008).

The sampled eggs were measured individually for length, using a vernier caliper ( $\pm 0.1\text{ mm}$ ), and wet weight, using a Sartorius analytical balance ( $\pm 0.0001\text{ g}$ ). Separation of the perivitelline fluid and egg yolk, and the content of perivitelline protein were obtained following the method proposed by Uriarte *et al.* (2009). Total lipid content was determined gravimetrically after extraction of yolk samples according to Bligh and Dyer (1959). Methylation and quantification of fatty acids was performed according to Bell *et al.* (1993). The fatty acid methyl esters (FAME) of total lipids were analyzed in a Thermo Scientific FOCUS GC gas chromatograph, equipped with an autosampler and a split/splitless injector. Separation was performed using hydrogen as carrier gas in a Restek RT-2560 capillary column ( $100\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$  internal diameter  $\times 0.2\text{ }\mu\text{m}$  film thickness), programmed at an initial temperature of  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by an ascent from  $140$  to  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min at a rate of  $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , and held at  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  for the last 20 min, with the detector at  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nonadecanoic acid (19:0) was used as internal standard. The FAME were identified by comparing the retention times with those of the Supelco 37 Component FAME Mix and docosapentaenoic acid (DPA, 22:5n-3) standards (Sigma).

Analysis of variance (ANOVA) was used when the biochemical composition data of the eggs showed homogeneous variances and normal distribution; otherwise, the Kruskal-Wallis nonparametric test was applied. Fecundity data were evaluated by ANOVA, introducing female weight as covariable. The Tukey test was used to determine differences between groups (Sokal and Rohlf 1995).

T3 (P7.5%), pescado congelado a  $7.5\%$  peso corporal  $\text{d}^{-1}$ . El alimento se suministró diariamente a la misma hora, después de la limpieza diaria de los estanques, hasta que finalizó la maduración gonadal con la puesta de racimos de huevos en las guaridas. El pescado utilizado fue pejerrey marino *Odontesthes* sp. y la jaiba utilizada fue *Cancer edwardsii*. Las muestras de estos dos productos se almacenaron mensualmente a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior liofilización y análisis bioquímico. Se calcularon los grados térmicos acumulados como una medida del tiempo de acondicionamiento asociado a la temperatura que permitió la puesta de huevos, considerando una temperatura basal inicial de  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a la cual no se produce gametogénesis (Hahn 1989).

Una vez obtenida la puesta, las hembras incubaron los huevos en sus guaridas y se alimentaron sólo eventualmente durante el periodo de incubación. Las guaridas fueron diseñadas por Rosas *et al.* (com. pers.). Cada semana, se tomaron dos muestras de 12 huevos de cada puesta para realizar el análisis de proteína del líquido perivitelino, lípidos del vitelo y ácidos grasos de los lípidos totales del vitelo. Los muestreos, que se iniciaron a partir del tercer día después de la puesta, se realizaron con el mínimo estrés para la hembra. De acuerdo con Uriarte *et al.* (2008), los embriones de *E. megalocyathus* son observables con facilidad después de la doceava semana de incubación a  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por lo que el muestreo se repitió semanalmente durante las primeras 12 semanas y se discontinuó cuando no se observó desarrollo embrionario o cuando los huevos se contaminaron. Morfológicamente, los huevos contaminados presentan hinchazón, color amarillo, disminución de la turgencia y, eventualmente, filamentos en forma de pelillos en su superficie (Uriarte *et al.* 2008). Las bacterias más frecuentes en los huevos contaminados son *Neptunomonas naphthovorans* y *Pseudomonas fulva* (Uriarte *et al.* 2008).

Los huevos muestreados fueron medidos individualmente en longitud, utilizando un pie de metro ( $\pm 0.1\text{ mm}$ ), y en peso húmedo, con una balanza analítica Sartorius ( $\pm 0.0001\text{ g}$ ). La separación del líquido perivitelino y del vitelo, y el contenido de proteína perivitelina se obtuvieron de acuerdo con la metodología propuesta por Uriarte *et al.* (2009). El contenido de lípidos totales se obtuvo gravimétricamente tras la extracción de muestras de vitelo según el método de Bligh y Dyer (1959). La metilación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó de acuerdo con la metodología de Bell *et al.* (1993). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) de los lípidos totales fueron analizados en un cromatógrafo de gases Thermo Scientific FOCUS GC, equipado con automuestreador y con sistema de inyección split/splitless. La separación se realizó con hidrógeno como gas transportador en una columna capilar Restek RT-2560 ( $100\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$  diámetro interno  $\times 0.2\text{ }\mu\text{m}$  de película), programado a una temperatura inicial de  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, seguido por un ascenso de  $140$  a  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 min a una tasa de  $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  y se mantuvo a  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  los últimos 20 min, con el detector a  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó ácido nonadecenoico (19:0)

## RESULTS

Spawning occurred after four months of conditioning, when cumulative thermal degrees had reached from 545 to 1100 °C days and when females had increased 1.5 times in body weight to  $2.14 \pm 0.27$  kg. Fecundity was affected by the treatments ( $F = 13.78$ ; d.f. = 2, 4;  $P = 0.016$ ). In T1 and T2 (feed ration of 10% bwt d<sup>-1</sup>), an average of  $2129 \pm 1182$  eggs per female was obtained, whereas in T3 (feed ration of 7.5% bwt d<sup>-1</sup>), only two females spawned and fecundity was less than 100 eggs per female (table 1). Female weight did not have a significant effect on fecundity. Relative fecundity was also affected by the treatments. The highest values were obtained in T1 and T2, with an average of  $774 \pm 460$  eggs kg<sup>-1</sup> for the six females that spawned in these two treatments (table 1).

A clear relation was not observed between female size and fecundity (fig. 1). Egg length (EL) and egg weight (EW), however, did depend on female weight (FW), and the linear regressions of EL and EW in relation to FW explained 42% and 47% of the variation in egg size, respectively (figs. 2, 3).

The eggs from females in T1 and T2 were able to withstand the 12 weeks of incubation, and some even withstood 19 weeks without showing contamination. Of the few eggs produced by females in T3, only the eggs from one clutch reached the ninth week of incubation without showing signs of deterioration. The eggs from different clutches and with different days of incubation showed an allometric relationship between EW and EL (fig. 4).

There were differences in the protein content of the perivitelline fluid of the eggs from the different treatments ( $F = 12.04$ ; d.f. = 2, 8;  $P = 0.004$ ). Eggs from females in T1 and T2 showed a very similar protein content (table 2), whereas those from T3 showed a higher protein content (0.48 mg protein  $\mu\text{L}^{-1}$  perivitelline fluid). The protein in the perivitelline fluid was not affected during the weeks of incubation in any of the treatments.

Total lipid content in the yolk was similar for the eggs from all three treatments, with a mean value of  $14.2 \pm 0.2\%$  yolk dry weight (table 2). This value did not vary throughout the incubation period. On the other hand, values of 4.9% dry

como estándar interno. Los FAME fueron identificados por comparación con los tiempos de retención encontrados en los estándares Supelco 37 Component FAME Mix y ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5n-3) de Sigma.

Los datos de composición bioquímica de los huevos fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) cuando mostraron varianzas homogéneas y distribución normal; en caso contrario se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los datos de fecundidad se analizaron mediante ANOVA, introduciendo el peso de las hembras como covariable. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el análisis de Tukey (Sokal y Rohlf 1995).

## RESULTADOS

El desove se observó después de cuatro meses de acondicionamiento, desde los 545 hasta los 1100 °C días, durante los cuales las hembras aumentaron en promedio 1.5 veces su peso corporal, alcanzando al momento del desove un promedio de  $2.14 \pm 0.27$  kg. Los tratamientos afectaron la fecundidad ( $F = 13.78$ ; g.l. = 2, 4;  $P = 0.016$ ). Se obtuvieron abundantes huevos de las hembras alimentadas con T1 y T2 al 10% del peso corporal d<sup>-1</sup> con un promedio de  $2129 \pm 1182$  huevos por hembra. En T3, con una ración de 7.5% peso corporal d<sup>-1</sup>, sólo dos hembras desovaron y su fecundidad fue inferior a 100 huevos por hembra (tabla 1). No hubo un efecto significativo del peso de las hembras sobre la fecundidad. Los tratamientos también afectaron la fecundidad relativa, obteniéndose los mayores valores en T1 y T2 con un promedio de  $774 \pm 460$  huevos kg<sup>-1</sup> para las seis hembras que desovaron en estos dos tratamientos (tabla 1).

No se observó una relación clara entre el tamaño de las hembras y la fecundidad (fig. 1). Sin embargo, la longitud (EL) y el peso (EW) de los huevos sí dependieron del peso de las hembras (FW), y las regresiones lineales de EL y EW con relación a FW explicaron 42% y 47% de la variación del tamaño de los huevos, respectivamente (figs. 2, 3).

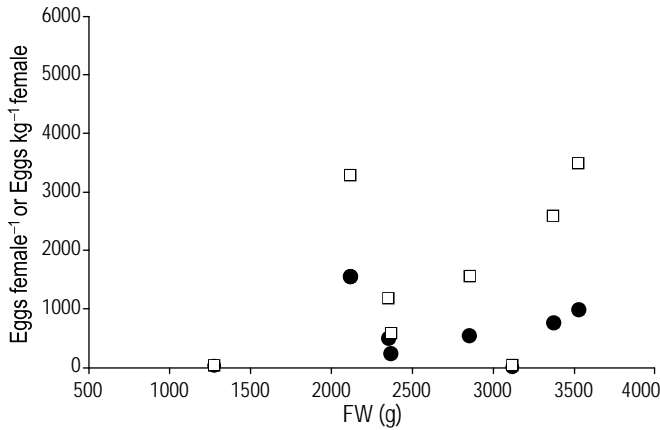
Los huevos de las hembras en T1 y T2 fueron capaces de superar las 12 semanas de incubación, incluso algunas puestas alcanzaron la semana 19 de incubación sin manifestar contaminación. De los escasos huevos producidos por las hembras en T3, sólo los huevos de una de las puestas

**Table 1.** Reproductive performance of *Enteractopus megalocyathus* females under three conditioning treatments. Data correspond to the mean  $\pm$  standard deviation of two to three replicates.

**Tabla 1.** Rendimiento reproductivo de las hembras *Enteractopus megalocyathus* bajo tres tratamientos de acondicionamiento. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de dos a tres réplicas.

Broodstock diet and ration	Females with egg clutches/ Total females	Fecundity (eggs female <sup>-1</sup> )	Relative fecundity (eggs kg <sup>-1</sup> female)
T1 (F10%): Fish at 10% bwt d <sup>-1</sup>	3/4	2233 $\pm$ 1484 <sup>a</sup>	673 $\pm$ 380 <sup>a</sup>
T2 (FC (3:1) 10%): Mix 3:1 fish:crab at 10% bwt d <sup>-1</sup>	3/4	2025 $\pm$ 1120 <sup>a</sup>	875 $\pm$ 594 <sup>a</sup>
T3 (F7.5%): Fish at 7.5% bwt d <sup>-1</sup>	2/4	56 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	32 $\pm$ 24 <sup>b</sup>

Superindices with different letters indicate significantly different groups analyzed by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).



**Figure 1.** Fecundity observed in each of the *Enteractopus megalocyathus* females in the conditioning treatments. Values are expressed as absolute fecundity (eggs female<sup>-1</sup>; squares) or relative fecundity (eggs kg<sup>-1</sup> female; circles). FW = female weight.

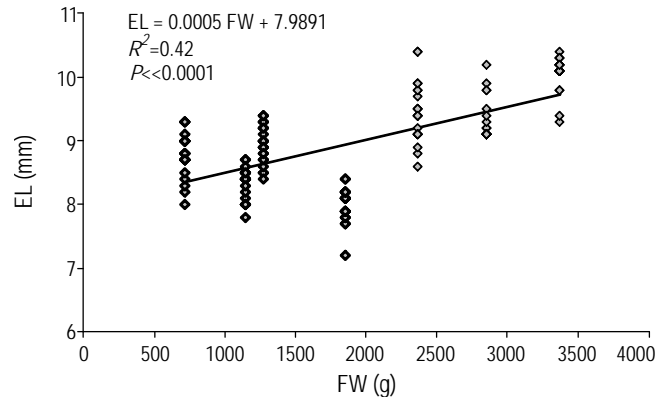
**Figura 1.** Fecundidad observada en cada una de las hembras de *Enteractopus megalocyathus* en los tratamientos de acondicionamiento. Los valores se expresan como fecundidad absoluta (huevos hembra<sup>-1</sup>; cuadrados) o como fecundidad relativa (huevos kg<sup>-1</sup> hembra; círculos). FW = peso de las hembras.

weight were observed for total lipids in frozen fish and fresh crab muscle.

Immediately after spawning, the fatty acids 16:0, 17:0, 18:0, 20:1, 20:4n-6, 23:0, 20:5n-3 (eicosapentaenoic acid, EPA), 22:5n-3, and 22:6n-3 (docosahexaenoic acid, DHA) of the yolk total lipids constituted from 74% to 95% of FAME (table 3). The saturated fatty acids (SFA) 16:0 and 18:0 represented between 20% and 37% of FAME, while the n-3 highly unsaturated fatty acids (n-3 HUFA) comprised from 19% to 43% of the total FAME. The fatty acids 16:1 ( $F = 11.29$ ; d.f. = 2, 7;  $P = 0.006$ ) and 22:5n-3 ( $F = 4.45$ ; d.f. = 2, 9;  $P = 0.045$ ) were the only ones that varied among eggs from the different conditioning treatments. DHA did not vary significantly among the eggs from the different treatments, though the values tended to be higher in T1, intermediate in T2, and lower in T3 ( $F = 3.74$ ; d.f. = 2, 11;  $P = 0.057$ ). This same tendency was observed for the DHA/EPA ratio in egg yolk ( $F = 3.86$ ; d.f. = 2, 11;  $P = 0.054$ ).

The fatty acids 16:0, 17:0, 18:0, 20:1, 20:4n-6, 23:0, EPA, 22:5n-3, and DHA constituted between 83% and 95% of the frozen fish and fresh crab components (table 4). The SFA 16:0 and 18:0 comprised from 21% to 35%, while the n-3 HUFA constituted between 11% and 42% of these components.

Fresh crab had the highest values of EPA ( $F = 54.88$ ; d.f. = 1, 3;  $P = 0.005$ ), and the lowest amounts of DHA ( $F = 23.77$ ; d.f. = 1, 4;  $P = 0.008$ ), 22:5n-3 ( $F = 17.65$ ; d.f. = 3, 1;  $P = 0.02$ ), and 18:2n-6 ( $F = 30.99$ ; d.f. = 1, 4;  $P = 0.005$ ). Frozen fish had the lowest values of 17:0 ( $F = 12.64$ ; d.f. = 1, 3;  $P = 0.037$ ) and the highest DHA/EPA ratios ( $F = 150.32$ ;



**Figure 2.** Relationship between egg length (EL) and female weight (FW) of *Enteractopus megalocyathus*.

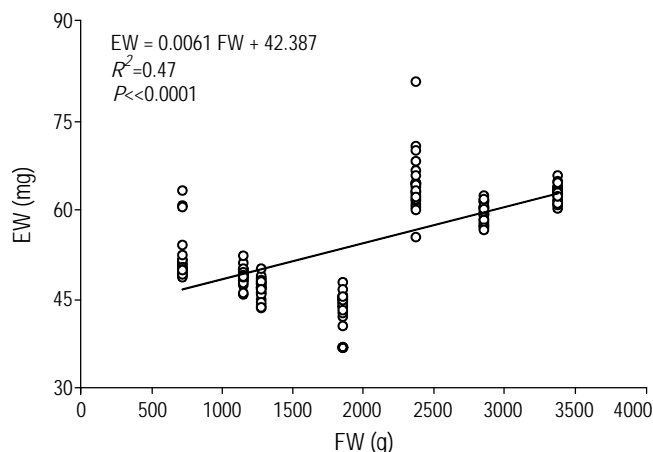
**Figura 2.** Relación entre la longitud de los huevos (EL) y el peso de las hembras (FW) de *Enteractopus megalocyathus*.

alcanzaron la semana 9 de incubación sin presentar señales de deterioro. Los huevos procedentes de las diferentes puestas y con diferentes días de incubación mostraron una relación alométrica entre el EW y la EL (fig. 4).

Hubo diferencias en el contenido de proteína perivitelina de los huevos de diferentes tratamientos ( $F = 12.04$ ; g.l. = 2, 8;  $P = 0.004$ ). Los huevos de las hembras en T1 y T2 mostraron un contenido de proteínas en el líquido perivitelino muy similar (tabla 2), mientras que los procedentes de T3 presentaron un contenido proteínico más elevado (0.48 mg proteína  $\mu\text{L}^{-1}$  líquido perivitelino). La proteína del líquido perivitelino no mostró variaciones por efecto del desarrollo durante las semanas de incubación para ninguno de los tratamientos.

El contenido de lípidos totales del vitelo fue similar en los huevos procedentes de los tres tratamientos, con un valor promedio de  $14.2 \pm 0.2\%$  del peso seco del vitelo (tabla 2). Este valor tampoco varió a lo largo del periodo de incubación. Por otro lado, en los lípidos totales del músculo del pescado congelado y de la jaiba fresca, se observaron valores de 4.9% del peso seco.

Inmediatamente después de la puesta, se observó que los ácidos grasos 16:0, 17:0, 18:0, 20:1, 20:4n-6, 23:0, 20:5n-3 (ácido eicosapentanoico, EPA), 22:5n-3 y 22:6n-3 (ácido docosahexanoico, DHA) de los lípidos totales del vitelo de los huevos constituían de 74% a 95% de los FAME (tabla 3). Los ácidos grasos saturados (SFA) 16:0 y 18:0 representaron entre 20% y 37% de los FAME, mientras que los ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3 (HUFA n-3) variaron de 19% a 43% del total de los FAME. Los ácidos grasos 16:1 ( $F = 11.29$ ; g.l. = 2, 7;  $P = 0.006$ ) y 22:5n-3 ( $F = 4.45$ ; g.l. = 2, 9;  $P = 0.045$ ) fueron los únicos que variaron entre huevos procedentes de las diferentes dietas de acondicionamiento. El DHA no varió significativamente entre los huevos procedentes de diferentes tratamientos, pero sí mostró una tendencia a mayor valor en T1, valor intermedio en T2 y menor valor en T3 ( $F = 3.74$ ; g.l. = 2, 11;  $P = 0.057$ ). Esta



**Figure 3.** Relationship between egg weight (EW) and female weight (FW) of *Enteroctopus megalocyathus*.

**Figura 3.** Relación entre el peso de los huevos (EW) y el peso de las hembras (FW) de *Enteroctopus megalocyathus*.

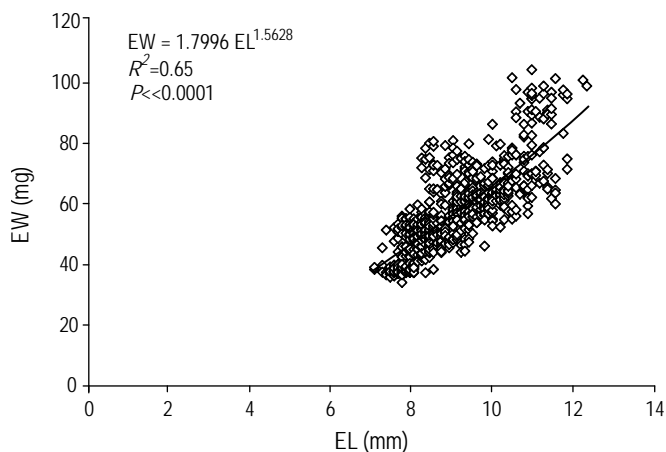
d.f. = 1, 4;  $P = 0.00025$ ). The fatty acid 18:3n-3, which was not observed in octopus eggs, was found only in frozen fish.

## DISCUSSION

In this study, egg clutches of *E. megalocyathus* were obtained under controlled conditions, when females were fed only fish (T1 and T3) as well as a fish and crab mix (T2). Female fecundity, however, was determined by the daily ration. In T1 and T2, with a ration of 10% bwt d<sup>-1</sup>, many eggs were laid, but in T3, when the ration was reduced to 7.5% bwt d<sup>-1</sup>, fecundity decreased significantly. Uriarte *et al.* (2008) proposed a ration of 10% bwt d<sup>-1</sup> for a diet that included crustaceans. Our findings indicate that neither egg laying nor fecundity were affected by the absence of crustaceans in the diet.

In growth studies, the best results have been obtained when live crustaceans formed part of the octopus diet (Cagnetta and Sublini 2000, Iglesias *et al.* 2000), while variable results have been obtained when diets containing fish or bivalves (García-García and Aguado 2002, Pérez *et al.* 2006) and artificial diets (Lee *et al.* 1991) were used. However, there are no studies on the effect of diets on the reproductive development of cephalopods (Semmens 2004).

Female fecundity in our conditioning treatments only reached 10% of the potential fecundity estimated by Chong *et al.* (2001) for natural populations of *E. megalocyathus*. According to Boyle and Chevis (1992), the calculation of fecundity in natural populations, based on the number of oocytes found in the ovaries, always overestimates the true octopus fecundity, since it has been shown that during the maturation process, part of the oocytes stop growing and degenerate. In the case of the holobenthic species *Octopus lapillus*, the calculated potential fecundity was 910 eggs per female, but the effective fecundity was 422 eggs (Leporati *et al.* 2008), which is around 46% of the potential fecundity.



**Figure 4.** Allometric relationship between egg weight (EW) and egg length (EL) for clutches of *Enteroctopus megalocyathus* females sampled during 12 weeks.

**Figura 4.** Relación alométrica entre el peso (EW) y la longitud (EL) de los huevos de las puestas de hembras de *Enteroctopus megalocyathus* evaluadas durante 12 semanas de incubación.

misma tendencia se observó en la razón DHA/EPA del vitelo de los huevos ( $F = 3.86$ ; g.l. = 2, 11;  $P = 0.054$ ).

Por otro lado, en los componentes pescado congelado y jaiba fresca, los ácidos grasos 16:0, 17:0, 18:0, 20:1, 20:4n-6, 23:0, EPA, 22:5n-3 y DHA constituían entre 83% y 95% (tabla 4). Los SFA 16:0 y 18:0 variaron entre 21% y 35%, mientras que los HUFA n-3 representaron entre 11% y 42% de estos componentes.

La jaiba mostró los mayores valores de EPA ( $F = 54.88$ ; g.l. = 1, 3;  $P = 0.005$ ), así como los menores contenidos de DHA ( $F = 23.77$ ; g.l. = 1, 4;  $P = 0.008$ ), 22:5n-3 ( $F = 17.65$ ; g.l. = 3, 1;  $P = 0.02$ ) y 18:2n-6 ( $F = 30.99$ ; g.l. = 1, 4;  $P = 0.005$ ). En el pescado congelado se observaron los menores valores de 17:0 ( $F = 12.64$ ; g.l. = 1, 3;  $P = 0.037$ ), así como las mayores razones DHA/EPA ( $F = 150.32$ ; g.l. = 1, 4;  $P = 0.00025$ ). El pescado congelado se caracterizó por ser el único con 18:3n-3, el cual no fue observado en los huevos de pulpos.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se consiguieron puestas de huevos de *E. megalocyathus* en condiciones controladas, tanto cuando las hembras se alimentaron sólo con pescado (T1 y T3) como cuando se alimentaron con una mezcla de pescado y jaiba (T2). Sin embargo, la ración diaria determinó la fecundidad de las hembras. En los tratamientos T1 y T2, con una ración del 10% peso corporal d<sup>-1</sup>, se obtuvieron puestas abundantes, mientras que en T3, al reducir la ración al 7.5% peso corporal d<sup>-1</sup>, la fecundidad descendió significativamente. Uriarte *et al.* (2008) propusieron una ración del 10% peso corporal d<sup>-1</sup>, aunque manteniendo siempre crustáceos en la oferta alimenticia. El presente trabajo indica que ni la

**Table 2.** Perivitelline protein and total lipid in the yolk of three-day-old eggs of *Enteroctopus megalocyathus* from clutches produced in the tanks under three conditioning treatments. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of two to three replicates.

**Tabla 2.** Proteína perivitelina y lípidos totales del vitelo en huevos de *Enteroctopus megalocyathus* recién puestos (tres días de edad) en los estanques bajo tres tratamientos de acondicionamiento. Cada valor representa el promedio  $\pm$  la desviación estándar de dos o tres réplicas.

Broodstock diet and ration	Perivitelline protein (mg protein $\mu\text{L}^{-1}$ )	Yolk total lipid (% dry weight)
T1 (F10%): Fish at 10% bwt d <sup>-1</sup>	0.24 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	14.5 $\pm$ 0.6
T2 (FC (3:1) 10%): Mix 3:1 fish:crab at 10% bwt d <sup>-1</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	13.8 $\pm$ 0.2
T3 (F7.5%): Fish at 7.5% bwt d <sup>-1</sup>	0.49 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	14.4 $\pm$ 0.0

Superindices with different letters indicate significantly different groups analyzed by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Fatty acids of total lipids (% area) in the yolk of three-day-old eggs of *Enteroctopus megalocyathus*. Data correspond to the mean  $\pm$  standard deviation of two to three replicates.

**Tabla 3.** Ácidos grasos de los lípidos totales (% área) en vitelos de huevos de *Enteroctopus megalocyathus* de tres días de edad. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de dos a tres réplicas.

FAME	Eggs		
	T1 (F10%)	T2 (FC (3:1) 10%)	T3 (F7.5%)
<14	2.17 $\pm$ 0.89	0.99 $\pm$ 0.20	1.70 $\pm$ 0.00
14:0	1.89 $\pm$ 0.00	0.00	0.00
14:1	0.97 $\pm$ 0.83	0.22 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.00
15:0	0.54 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.24	0.37 $\pm$ 0.00
16:0	23.74 $\pm$ 5.47	21.90 $\pm$ 6.59	27.80 $\pm$ 1.38
16:1	0.38 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>
17:0	1.89 $\pm$ 1.07	4.03 $\pm$ 1.67	1.48 $\pm$ 0.72
18:0	5.13 $\pm$ 1.51	6.54 $\pm$ 1.83	4.84 $\pm$ 0.00
18:1n-9	3.82 $\pm$ 0.69	5.02 $\pm$ 1.65	5.74 $\pm$ 1.83
18:2n-6	0.29 $\pm$ 0.08	0.53 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.21
20:0	1.21 $\pm$ 0.00	8.16 $\pm$ 0.00	0.00
20:1	3.60 $\pm$ 1.51	3.07 $\pm$ 2.43	3.76 $\pm$ 1.17
18:3n-3	0.00	0.00	0.00
20:2	0.37 $\pm$ 0.21	0.29 $\pm$ 0.13	0.26 $\pm$ 0.00
22:0	0.98 $\pm$ 0.00	0.56 $\pm$ 0.00	0.00
22:1n-9	0.77 $\pm$ 0.10	0.93 $\pm$ 0.17	0.79 $\pm$ 0.00
20:3n-3	0.00	1.38 $\pm$ 0.62	0.00
20:4n-6	3.83 $\pm$ 0.32	3.81 $\pm$ 1.22	3.08 $\pm$ 0.70
22:2	0.00	1.36 $\pm$ 0.81	0.00
20:5n-3 (EPA)	9.14 $\pm$ 2.97	10.41 $\pm$ 1.18	7.90 $\pm$ 1.04
22:5n-3	3.41 $\pm$ 2.42 <sup>ab</sup>	2.25 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	7.43 $\pm$ 3.57 <sup>b</sup>
22:6n-3 (DHA)	22.65 $\pm$ 3.13 <sup>b</sup>	18.31 $\pm$ 5.43 <sup>ab</sup>	12.77 $\pm$ 8.27 <sup>a</sup>
TOTAL	79.78 $\pm$ 10.60	83.74 $\pm$ 7.01	77.74 $\pm$ 15.10
SFA	34.61 $\pm$ 5.57	36.15 $\pm$ 2.70	35.78 $\pm$ 1.23
MUFA	8.18 $\pm$ 3.94	9.45 $\pm$ 2.72	10.19 $\pm$ 0.31
PUFA	36.99 $\pm$ 6.47	38.15 $\pm$ 5.32	31.77 $\pm$ 13.56
n-3	34.22 $\pm$ 7.33	32.07 $\pm$ 5.86	28.10 $\pm$ 12.88
n-6	3.23 $\pm$ 1.73	4.02 $\pm$ 1.39	3.54 $\pm$ 0.49
DHA/EPA	2.70 $\pm$ 0.81	1.73 $\pm$ 0.37	1.56 $\pm$ 0.84

Superindices with different letters indicate significantly different groups analyzed by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

Fecundities ranging from 3000 to 5000 eggs have been reported for *E. megalocyathus* females of 1.7–3.3 kg fed different mixtures of crab and fish, and conditioned at 12°C (Uriarte *et al.* 2008). Ortiz *et al.* (2006) reported a complete clutch found in the natural environment containing 1400 eggs from one *E. megalocyathus* female of 1.24 kg. The fecundity values recorded in the present study are within the range reported for clutches of *E. megalocyathus* obtained under

**Table 4.** Fatty acid of total lipids (% area) of diets. Data correspond to the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates.

**Tabla 4.** Ácidos grasos de los lípidos totales (% área) de las dietas. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas.

FAME	Diet	
	Fish	Crab
<14	1.12 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	4.20 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>
14:0	0.96 $\pm$ 0.22	0.88 $\pm$ 0.00
14:1	0.00	0.35 $\pm$ 0.00
15:0	0.43 $\pm$ 0.12	0.92 $\pm$ 0.26
16:0	22.50 $\pm$ 7.02	18.82 $\pm$ 5.06
16:1	2.76 $\pm$ 0.51	4.06 $\pm$ 1.15
17:0	0.34 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
18:0	5.94 $\pm$ 1.72	7.87 $\pm$ 2.55
18:1n-9	11.25 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	15.15 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>
18:2n-6	8.95 $\pm$ 2.23 <sup>b</sup>	1.67 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>
20:0	0.00	0.25 $\pm$ 0.00
20:1	0.67 $\pm$ 0.34	0.76 $\pm$ 0.46
18:3n-3	1.04 $\pm$ 0.44	0.00
20:2	0.24 $\pm$ 0.12	0.60 $\pm$ 0.23
22:0	0.00	0.00
22:1n-9	0.21 $\pm$ 0.00	0.00
20:3n-3	0.00	2.78 $\pm$ 0.00
20:4n-6	1.67 $\pm$ 0.62	4.19 $\pm$ 3.12
22:2	0.25 $\pm$ 0.00	0.00
20:5n-3 (EPA)	7.07 $\pm$ 2.20 <sup>a</sup>	17.00 $\pm$ 8.22 <sup>b</sup>
22:5n-3	2.47 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	0.36 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
22:6n-3 (DHA)	26.26 $\pm$ 5.76 <sup>b</sup>	7.25 $\pm$ 3.53 <sup>a</sup>
TOTAL	93.43 $\pm$ 1.69 <sup>b</sup>	85.18 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>
SFA	30.92 $\pm$ 9.00	31.32 $\pm$ 9.19
MUFA	14.82 $\pm$ 0.97	22.19 $\pm$ 4.72
PUFA	47.69 $\pm$ 9.14	31.67 $\pm$ 12.74
n-3	36.84 $\pm$ 8.79	25.42 $\pm$ 12.19
n-6	10.62 $\pm$ 2.19 <sup>b</sup>	5.85 $\pm$ 2.74 <sup>a</sup>
DHA/EPA	3.81 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	0.45 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>

Superindices with different letters indicate significantly different groups analyzed by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

puesta de huevos ni la fecundidad de las hembras fueron alteradas por la ausencia de crustáceos en la dieta.

En estudios de crecimiento, se han observado los mejores resultados utilizando crustáceos vivos como parte de la dieta de los pulpos (Cagnetta y Sublini 2000, Iglesias *et al.* 2000), y resultados muy variables con pescado o bivalvos (García-García y Aguado 2002, Pérez *et al.* 2006) y dieta artificial (Lee *et al.* 1991). Sin embargo, no hay estudios sobre el efecto de las dietas en el desarrollo reproductivo de los cefalópodos (Semmens 2004).

La fecundidad observada en las hembras acondicionadas sólo alcanzó el 10% de la fecundidad potencial calculada por Chong *et al.* (2001) en las poblaciones naturales de *E. megalocyathus*. De acuerdo con Boyle y Chevis (1992), la fecundidad calculada en las poblaciones naturales, basada en el número de ovocitos presentes en los ovarios, siempre sobreestima la fecundidad real en los pulpos, ya que se ha demostrado que durante el proceso de madurez, parte de los ovocitos dejan de crecer y se degeneran. En la especie holobentónica *Octopus lapillus* se ha encontrado que de la fecundidad potencial calculada de 910 huevos por hembra se logra una fecundidad efectiva de 422 huevos (Leporati *et al.* 2008), lo que significa alrededor de 46% de la fecundidad potencial.

Se han reportado fecundidades de 3000 a 5000 huevos para hembras de *E. megalocyathus* de entre 1.7 y 3.3 kg alimentadas con mezcla de jaiba y pescado, y acondicionadas a 12°C (Uriarte *et al.* 2008). Ortiz *et al.* (2006) reportaron una puesta completa, capturada en el medio natural, con 1400 huevos de una hembra de *E. megalocyathus* de 1.24 kg. Las fecundidades observadas en este trabajo muestran valores que se encuentran dentro del intervalo conocido para la especie en puestas bajo condiciones de laboratorio, no encontrándose una relación clara entre el tamaño de los reproductores con el número de huevos.

Leporati *et al.* (2008) mostraron que además del tamaño de la hembra, los cambios estacionales de temperatura, la disponibilidad de sustrato para la puesta, la calidad de la guarida y la tasa de reabsorción de los huevos en el ovario son los factores que podrían hacer variar la fecundidad de las hembras, y por lo tanto podría no existir una correlación entre el tamaño de las hembras y el número de huevos por puesta.

La variación en el tamaño de los huevos, en longitud o en peso húmedo, fue explicada en más de un 40% por la variación en el peso de las hembras. Esto es diferente a lo encontrado para la especie *O. lapillus* con tamaño similar de huevos, donde el tamaño del huevo no se correlacionó ni con el peso húmedo de las hembras ni con el del ovario, así como tampoco con la edad (Leporati *et al.* 2008).

Los huevos de *E. megalocyathus* mostraron una alometría significativa entre longitud y peso, pero con un exponente (1.56) inferior al observado en huevos de *Robsonella fontaniana* (2.41) por Uriarte *et al.* (2009). Esto indica que aunque *E. megalocyathus* posea huevos significativamente



controlled conditions, though a clear relation was not observed between female size and the number of eggs laid.

Leporati *et al.* (2008) showed that in addition to female size, changes in seasonal temperature, type of substrate available for egg laying, the quality of the lair, and the rate of egg resorption in the ovary are factors that may cause fecundity to vary in females; hence, a correlation may not exist between female size and the number of eggs laid per clutch.

The variation in female weight explained more than 40% of the variation in egg size (in length and wet weight). This differs to that reported for *O. lapillus* (with similar egg size to *E. megalocyathus*), where egg size was not correlated to either female or ovary wet weight, or to age (Leporati *et al.* 2008).

The eggs of *E. megalocyathus* showed significant allometry between length and weight, but with a lower exponent (1.56) than that obtained for eggs of *Robsonella fontaniana* (2.41) by Uriarte *et al.* (2009). This indicates that even though *E. megalocyathus* has significantly larger eggs than *R. fontaniana* (7.5–11.2 mm vs 2.4–4.7 mm, respectively), they are less dense.

After 12 weeks of incubation without apparent contamination, the eggs did not show embryonic development, yet according to Uriarte *et al.* (2008), at this age and temperature, advanced embryos should be observed. Moreover, perivitelline protein and total lipids did not vary throughout the incubation period, indicating that the eggs did not deteriorate because there were no embryos to use those nutrients. It could be that the eggs were not fertile or that the controlled culture conditions did not allow their normal development.

The protein content in the perivitelline fluid found in eggs of *E. megalocyathus* was higher than the maximum value obtained for *R. fontaniana* (Uriarte *et al.* 2009). The lipid content in the yolk was similar to that reported for mature gonads of *Octopus defilippi*, higher than that found for mature gonads of *O. vulgaris* (Rosa *et al.* 2004), and similar to that recorded for newly hatched paralarvae of *O. vulgaris* (14.7) (Seixas *et al.* 2010).

The DHA/EPA ratio values obtained for the eggs of *E. megalocyathus* were similar to those reported for newly hatched paralarvae of *O. vulgaris* (1.7 by Navarro and Villanueva 2000 and 1.5 by Seixas *et al.* 2010), and are within the range of variation found for mature gonads of *O. vulgaris* and *O. defilippi* (2.1 and 2.0, respectively, Rosa *et al.* 2004). According to Sykes (2007), a correlation can be found between the DHA/EPA values and the quality of the developing eggs. For *Sepia officinalis*, DHA/EPA values higher than 1.5 for newly laid eggs are associated with a normal development, while values close to 1.0 are associated with malformations or absence of development; however, the results obtained by Sykes (2007) were not conclusive.

The values given in tables 3 and 4 indicate that there is a direct effect of the amount of DHA in the diet on the amount of DHA in the eggs. Treatment T2, with a 3:1 fish:crab ratio and the respective percentages of DHA (26.3% and 7.3%),

más grandes que *R. fontaniana* (7.5 a 11.2 mm vs 2.4 a 4.7 mm, respectivamente), éstos tienen una menor densidad.

Tras 12 semanas de incubación sin contaminación aparente, los huevos no presentaron desarrollo embrionario; sin embargo, de acuerdo con Uriarte *et al.* (2008), a esta edad y temperatura ya deberían observarse embriones avanzados. A ello se suma que la proteína perivitelina y los lípidos totales no mostraron variación a lo largo del periodo de incubación, lo que implica que los huevos no sufrieron deterioro porque no hubo embriones que utilizaran estos nutrientes. Esto pudo deberse a que los huevos no eran fértiles o bien las condiciones del cultivo controlado no permitieron el desarrollo normal de los mismos.

El contenido proteínico del líquido perivitelino encontrado en los huevos de *E. megalocyathus* fue mayor que el máximo valor obtenido para *R. fontaniana* (Uriarte *et al.* 2009). El valor de lípidos del vitelo fue similar al reportado para gónadas maduras de *Octopus defilippi*, superior al de las gónadas maduras de *O. vulgaris* (Rosa *et al.* 2004) y similar al valor encontrado en paralarvas recién eclosionadas de *O. vulgaris* (14.7) (Seixas *et al.* 2010).

Los valores de la razón DHA/EPA de los huevos de *E. megalocyathus* fueron similares a los reportados para paralarvas recién eclosionadas de *O. vulgaris* (1.7 y 1.5 por Navarro y Villanueva 2000 y Seixas *et al.* 2010, respectivamente) y caen en el mismo intervalo de variación encontrado en gónadas maduras de *O. vulgaris* y *O. defilippi* (2.1 y 2.0, respectivamente, Rosa *et al.* 2004). De acuerdo con Sykes (2007), se puede encontrar una correlación entre los valores de DHA/EPA y la calidad de los huevos para desarrollarse. En *Sepia officinalis* los valores de DHA/EPA superiores a 1.5, en huevos recién puestos, llevan a un desarrollo normal y los valores cercanos a 1.0 están asociados a malformaciones o ausencia de desarrollo; sin embargo, los resultados de Sykes (2007) no fueron concluyentes.

De los valores de las tablas 3 y 4 se puede deducir que hay un efecto directo de la proporción de DHA de la dieta sobre la proporción de DHA de los huevos. El tratamiento T2, con una proporción 3:1 de pescado:jaiba y con los respectivos porcentajes de DHA (26.3% y 7.3%), produjo huevos con un 80.8% del DHA observado en los huevos procedentes del tratamiento T1, con una ración de 10% de sólo pescado. En T3, la disminución de la ración a 7.5% de sólo pescado redujo el DHA a 56.4% del valor observado en T1, lo que indica que en T2 los huevos reciben un aporte de cerca del 25% de DHA procedente de la jaiba. Por otro lado, la reducción de la ración no afectó el contenido de lípidos ni la composición de EPA de los huevos. Los altos valores de EPA de la jaiba no afectaron la composición de los vitelos obtenidos de reproductores que se alimentaron en T2, y las razones DHA/EPA en los vitelos de los huevos se mantuvieron entre 1.6 en T3 y 2.7 en T1. La similitud en la composición bioquímica de los huevos entre tratamientos, sumada a la reducción significativa de la fecundidad en pulpos alimentados con T3, podría indicar que *E. megalocyathus* muestra una

produced eggs with 80.8% of the DHA observed in eggs from T1, containing 10% of only fish. In T3, decreasing the ration to 7.5% of only fish reduced DHA to 56.4% of the value recorded in T1, which indicates that in T2 the eggs receive around 25% of DHA from the crab. On the other hand, the decreased ration did not affect either lipid content or the composition of EPA in the eggs. The high EPA values of the crab did not affect the composition of the yolks from the T2 broodstock, and the DHA/EPA ratios for the yolks ranged from 1.6 in T3 to 2.7 in T1. The similarity in the biochemical composition of the eggs from the different treatments, together with the significant decrease in fecundity of the T3 females could indicate that, under adverse conditions, *E. megalocyathus* reduces its fecundity without sacrificing the quality of the eggs. It is necessary to compare naturally occurring and laboratory-produced clutches to determine to what extent the culture conditions affect egg quality. Ortiz *et al.* (2006) reported successful larval hatching in one of three clutches collected in the wild and after 80 days of culture, but they do not indicate if normal embryonic development occurred in the two clutches that did not produce paralarvae. Uriarte *et al.* (2008) obtained embryos of *E. megalocyathus* from laboratory clutches of up to development stage XIX (Naef 1928) in 150 days of culture. Apparently, in view of the long period of incubation of this species, it is not easy to achieve good egg development. Future studies should try to determine how the conditioning diet affects the development of the eggs until paralarvae are obtained.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by FONDECYT 1070800 (A Farías). The Spanish-Chilean exchange was possible through the Network of Cephalopod Experts created through the CONICYT-World Bank Science and Technology Bicentennial Program (I Uriarte). We thank V Espinoza (HIM-UACH) for technical assistance.

English translation by Christine Harris.

## REFERENCES

- Bell JG, Dick JR, Sargent JR. 1993. Effects of diets rich in linoleic or linolenic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Lipids* 28: 819–826.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- Boyle PR, Chevis D. 1992. Egg development in the octopus *Eledone cirrhosa*. *J. Zool. Lond.* 227: 623–638.
- Cagnetta P, Sublini A. 2000. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. Seminar on Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification, 24–27 May 1999, Zaragoza, Spain. *Cahiers d'Options Méditerranéennes* 47: 331–336.
- Chong J, Cortés N, Galleguillos R, Oyarzún C. 2001. Estudio biológico pesquero del recurso pulpo en la X y XI regiones. Informe final, FIP IT 99–20, 230 pp.
- Ortiz *et al.* (2006) sólo lograron obtener eclosión de larvas en una de tres puestas capturadas en el medio natural y tras 80 días de cultivo. Los autores no indican si hubo desarrollo embrionario normal en las dos puestas que no dieron origen a paralarvas. En puestas de laboratorio, Uriarte *et al.* (2008) consiguieron embriones de *E. megalocyathus* hasta el estado de desarrollo XIX (Naef 1928) en 150 días de cultivo. Al parecer, debido al extenso periodo de incubación de esta especie no es fácil lograr un buen desarrollo de los huevos. Futuros estudios deberán centrarse en determinar cómo la dieta del acondicionamiento afecta al desarrollo de los huevos hasta la obtención de paralarvas.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por FONDECYT 1070800 (A Farías). El intercambio entre los equipos español y chileno se realizó a través de la Red de Expertos en Cefalópodos creada a través del proyecto CONICYT-Banco Mundial Programa Bicentenario de Ciencia y Tecnología (I Uriarte). Se agradece el apoyo técnico de V Espinoza del HIM-UACH.

- Cortez T, González A, Guerra A. 1999. Growth of cultured *Octopus mimus* (Cephalopoda Octopodidae). *Fish. Res.* 40: 81–89.
- García-García B, Aguado E. 2002. Influence of diet on growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211: 171–182.
- González ML. 2008. Land-based cultures: A case study applied to Chilean aquaculture. In: Pham CK, Higgins RM, De Girolamo M, Isidro E. (eds.), *Proc. International Workshop: Developing a Sustainable Aquaculture Industry in the Azores*. Arquipélago (Life Mar. Sci.), Suppl. 7, pp. 46–48.
- Hahn KO. 1989. Nutrition and growth of abalone. In: Hahn KO (ed.), *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 135–156.
- Iglesias J, Sánchez E, Moxica J. 2000. Culture of octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. *Cah. Options Méditerr.* 47: 313–321.
- Jurado-Molina J. 2010. A Bayesian framework with implementation error to improve the management of the red octopus (*Octopus maya*) fishery off the Yucatán Peninsula. *Cienc. Mar.* 36: 1–14.
- Lee P, Forsythe J, Dimarco J, DeRusha E, Nalón R. 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bull. Mar. Sci.* 49: 362–372.
- Leporati SC, Pecl GT, Semmens JM. 2008. Reproductive status of *Octopus pallidus*, and its relationship to age and size. *Mar. Biol.* 155: 375–385.
- Naef A. 1928. *Cephalopoda Embryology*. Part I, Vol. II (final part of Monograph No. 35). In: *Fauna and Flora of the Bay of Naples*. Translated by the Smithsonian Institution Libraries, Washington, pp. 1–461.
- Navarro JC, Villanueva R. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: An approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183: 161–177.

- Ortiz N, Ré ME, Márquez F. 2006. First description of eggs, hatchlings and hatchling behaviour of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda, Octopodidae). *J. Plankton Res.* 28: 881–890.
- Oyarzún C, Gacitúa S. 2001. Análisis multivariado de la morfometría de *Enteroctopus megalocyathus*. XXI Congreso de Ciencias del Mar, 22 al 25 de mayo de 2001. Universidad de Valparaíso, Viña del Mar. Libro de Resúmenes, p.78.
- Pérez MC, López D, Águila K, González L. 2006. Feeding and growth in captivity of the octopus *Enteroctopus megalocyathus* Gould, 1852. *Aquacult. Res.* 37: 550–555.
- Rosa R, Costa PR, Nunes ML. 2004. Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of *Octopus vulgaris* and *O. defilippi* (Mollusca: Cephalopoda). *Mar. Biol.* 145: 563–574.
- Seixas P, Rey-Méndez M, Valente LMP, Otero A. 2010. High DHA content in *Artemia* is ineffective to improve *Octopus vulgaris* paralarvae rearing. *Aquaculture* 300: 156–162.
- Semmens JM, Pecl GT, Villanueva R, Jouffre D, Sobrino I, Wood JB, Rigbi PR. 2004. Understanding octopus growth: Patterns, variability and physiology. *Mar. Freshwat. Res.* 55: 367–377.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd ed. WH Freeman and Co., New York, 859 pp.
- Sykes AVAF. 2007. Hatchery technologies and nutritional contents of cuttlefish (*Sepia officinalis*) spawners, eggs, hatchlings and live prey associated. Ph.D. thesis, Algarve University, Faro, 244 pp.
- Uriarte I, Fariás A, Paschcke K, Ausburger A, Romo C. 2008. FONDEF D04 I1401 “Desarrollo científico-tecnológico de la producción de juveniles de cefalópodos”. FONDEF-CONICYT final report, Universidad Austral de Chile, Puerto Montt.
- Uriarte I, Zúñiga O, Olivares A, Espinoza V, Cerna V, Fariás A, Rosas C. 2009. Morphometric changes and growth rate during embryonic development of *Robsonella fontaniana*. *Vie Milieu* 59: 315–323.

*Received March 2010;*

*accepted August 2010.*