

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL
DESARROLLO LARVAL DE LA JAIBA
AZUL, *Callinectes sapidus*
(DECAPODA: BRACHYURA)**

Gloria Helena Ospina Salazar

Universidad Nacional de Colombia
Instituto de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR
Convenio Universidad Nacional de Colombia - INVEMAR
Santa Marta, D.T.C.H., Colombia
2023

INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL DESARROLLO LARVAL DE LA JAIBA AZUL, *Callinectes sapidus* (DECAPODA: BRACHYURA)

Gloria Helena Ospina Salazar

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias – Biología

Director:

Doctor en Ciencias Biológicas Sven Eloy Zea Sjoberg

Codirector:

Doctor en Ciencias Anselmo Miranda Baeza

Línea de Investigación:

Biología Marina

Grupo de Investigación:

Fauna Marina de Colombia: Biodiversidad y Usos

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR

Convenio Universidad Nacional de Colombia - INVEMAR

Santa Marta, D.T.C.H., Colombia

2023

El hombre es la especie más insensata; venera a un Dios invisible y masacra a una naturaleza visible, sin saber que esta naturaleza que él masacra es ese Dios invisible que él venera."

Hubert Reeves

Agradecimientos

El desarrollo de un proyecto de doctorado requiere la ayuda de muchas personas que en algún momento aportaron su granito de arena para lograr armar mi sueño. Desde el inicio hasta el final del doctorado, siempre estuvo conmigo mi compañero incondicional de vida, mi esposo David Alonso, quien me alentó, me consoló, me acompañó y me cargo en los momentos en los que ya no podía continuar, sufrió y se alegró con mis triunfos y derrotas, amor, esta tesis es tan tuya como mía. A mis padrecitos por ese amor incondicional, a mis suegros, familia y amigos, quienes sacrificaron cumpleaños, aniversarios, karaokes, noches de cantina, pizzas, vinos, tardes de playa y juegos, recuerdos que no pudieron crearse por estar enfocados en este proyecto, gracias por la espera, paciencia y apoyo. A Kelly Polo quien a través de la recuperación de mis rodillas, me enseñó a volver a caminar, y que el esfuerzo y la constancia todo lo puede.

Mis dos pilares en el AcuiLab fueron Marlon Montero y Jhon Byron Bernal, el primero trabajó codo a codo 24/7 en el día a día armando el laboratorio, cuidando los cultivos y haciendo suyos mis sueños, Marconi te emocionaste con los avances y sufriste con los atrasos, creciste y también te formaste en este proceso, gracias por tu sentido de pertenencia mi ahora tecnólogo en acuicultura, eres mi orgullo. El segundo, mi querido proesorrr con todo el montaje de equipos y sistemas, y que siempre estuvo allí ayudándome a salir de las emergencias que se presentaban, dándome ideas de diseños y ayudándome a realizarlos, ninguno de los dos jamás me dio la espalda.

En la Universidad Nacional de Colombia, en el CECIMAR quiero darle las gracias a mi incondicional director Sven Zea, quien nunca dudo de mí, me apoyo de tantas maneras, y me aportó siempre su lógica cuando perdía el camino, que paciencia tuviste. A Néstor Campos con quien compartimos el amor y ganas de conocimiento por los crustáceos, y el apoyo constante de Ana Milena Cárdenas quien con su paciencia infinita siempre me

ayudó en los procesos administrativos de este proceso, eso sí a cambio de su cafecito. De las alianzas externas agradezco a mi co-director Anselmo Baeza, de la Universidad Estatal de Sonora, México, quien dispuso de su tiempo y aportes para completar este esfuerzo.

De mi primera alma mater, la Universidad Jorge Tadeo Lozano, le debo a Andrés Franco en aquel entonces director de la Sede Santa Marta, un especial agradecimiento, ya que apoyó esta idea cuando apenas era un sueño, sin ti el montaje del laboratorio de acuicultura (AcuiLab) en donde hice todos los experimentos, no hubiese sido posible. En este equipo destaco también el apoyo de Adolfo Sanjuan, y Alfonso Gamero, que siempre me dieron su apoyo, y de todo el personal de la UTADCO, y Mundo Marino en cabeza de Hernando Valencia, que ayudaron en muchas formas a que el proyecto avanzara.

A mi asesor molecular Juan Fernando Alzate, director del Centro Nacional de Secuenciación Genómica de la Universidad de Antioquia, gracias, sin ti no hubiese podido aterrizar la idea a la vida real. El apoyo de Jairo Mesa mi Besty, quien me ayudó en las extracciones y procesamiento de las muestras e informes, y me dió ideas para seguir tratando de entender el tema, además de ser mi paño de lágrimas. Y a mi ángel molecular Gilberto Orozco, sin quien jamás jamás, hubiera podido de verdad aprender el paso a paso de la transcriptómica, hiciste posible lo imposible, me hiciste trascender.

Gracias al INVEMAR por todo el proceso de formación a lo largo de los años que trabajé en el Instituto que permitieron me preparara para enfrentar muchos de los retos que se presentaron durante el desarrollo de mi Doctorado, en especial al laboratorio de Bioprospección en cabeza de Javier Gómez León, quien permitió el uso del ultracogelador y el liofilizador para el procesamiento de algunas de mis muestras, y de Lina Blandon y Miguel Sánchez quienes me apoyaron en este proceso.

Este trabajo pudo realizarse gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia —Minciencias, bajo el marco del proyecto: “Influencia de la dieta en la actividad enzimática digestiva y su expresión génica durante el desarrollo larvario del cangrejo azul *Callinectes sapidus* Rathburn, 1895 (Crustacea: Decapoda: Portunidae)” (Referencia: 110171451096, contrato: 149-2016). Y por la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Programa de Biología Marina, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, bajo la financiación del proyecto: “Evaluación del potencial de cultivo de larvas de cangrejo

azul *Callinectes sapidus* (Decapoda: Brachyura), en condiciones de laboratorio, fase I” (código: 746 -13-16). Así como por la financiación como becaria de la convocatoria 617 de Minciencias, para conformar bancos de elegibles para formación de alto nivel para la ciencia, la tecnología y la innovación (semilleros y jóvenes investigadores, doctorados nacionales, en el exterior e inserción laboral).

A mis estudiantes Karen Carvajal, Lina Paola Roa, Vanessas Mora, Adrian Devia y Carolina Roza, quienes me ayudaron a formar como docente, sacándome algunas canas eso sí, pero enseñándome a comunicar y compartir el conocimiento a través del desarrollo de sus tesis y sus procesos de crecimiento profesional. Este proceso tampoco habría podido culminarse sin el apoyo del profe de acuicultura de la UTADEO Carlos Borreo, quien estuvo lado a lado como co-director de los trabajos de pregrado, además de prestar sus servicios de psicología gratuita para llenarnos de paciencia en la revisión y correcciones de los manuscritos, y algunos tips para simplificar mi trabajo.

Muchas otras personas se fueron apareciendo en el camino para ayudarme y soy ingrata por no recordarlas a todas en estos momentos, pero agradezco al IMET (*Institute of Marine and Environment Technology*), especialmente al departamento de la Dra. Sook Chung con quien en mi pasantía en Baltimore entrené los protocolos básicos para el desarrollo de mis bioensayos. A Luisa Villamil por apoyar mi proceso de formación en el campo molecular y conectarme con mi asesor molecular. A la profesora Martha Janeth Prieto de la Universidad de Córdoba y a su colaborador César Jiménez quienes donaron los rotíferos y nos dieron los tips para iniciar su cultivo. A la empresa Ceniagua sin la cual no hubiésemos podido iniciar el cultivo de las microalgas a partir de cepas puras y limpias. a Jaime Rojas, mi querido Jaimico quien desde el CEINER nos colaboró con materiales, implementos y tips de cultivo cuando tocamos a su puerta. Al señor Hector Rodríguez y los pescadores de la Cooperativa de la Boca de la Barra en Ciénaga, quienes nos apoyaron en la colecta y transporte de las jaibas. Al laboratorio de análisis químico y bromatológico de la UNAL sede Medellín, en especial a Siria Ruiz quien hizo posible los análisis de mis dietas ajustándose a las necesidades de mi investigación, gracias por flexibilizarse y apoyarme. Y seguramente muchas personas más que han quedado por fuera, pero que llevo en el corazón, cada uno fue un ángelito que apareció en el momento más oportuno cuando no tenía más ideas, o más opciones, y me ofreció su mano para ayudarme a levantarme, por todos ustedes hoy estoy aquí, gracias.

Resumen

Se evaluó el efecto del alimento vivo enriquecido (rotífero *Brachionus plicatilis*) con siete proporciones de proteínas y lípidos (P/L): 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 y 40/60, durante el desarrollo larval de la jaiba azul *Callinectes sapidus*. El contenido de lípidos aumentó significativamente de 100/0 a 40/60 (7,48 a 11,47 g 100 g⁻¹), al igual que la energía (21,88 a 23,16 kJ g⁻¹), y aparentemente el contenido de proteínas no fue un factor limitante (63,93 a 67,50 g 100 g⁻¹). Las dietas 50/50 y 40/60 evidenciaron las mejores respuestas en todas las variables estudiadas. Se presentaron hasta ocho estadios de zoea, y la metamorfosis a megalopa ocurrió desde la quinta muda, entre 49 a 57 días. La supervivencia fluctuó entre 6 y 34 %, y el ciclo de muda fue haciéndose significativamente más corto de 100/0 a 40/60. Mediante RNA-seq se realizó un análisis transcriptómico *de novo* entre el primer (inicial) y segundo estadio de zoea, para observar el efecto de dos dietas con resultados opuestos durante el primer ensayo (80/20 y 40/60). En las rutas metabólicas relacionadas con la digestión y metabolismo de los nutrientes se identificaron 110 genes sobre-regulados en 40/60 vs inicial y 47 en 80/20 vs inicial. Las zoeas alimentadas con el mayor contenido de lípidos (40/60) mejoraron los niveles de expresión de los genes relacionados con este nutriente, influenciando el metabolismo de proteínas, carbohidratos, y la expresión de genes del sistema digestivo y transporte y catabolismo celular. Este estudio establece los cimientos básicos de dietas formuladas de composición bioquímica conocida, como suministro a las larvas de *C. sapidus* con el fin de optimizar y parametrizar su cultivo.

Palabras clave: *Callinectes sapidus*, desarrollo larval, influencia de la dieta, metabolismo de nutrientes, expresión génica.

Abstract

Diet influence on larval development of blue crab *Callinectes sapidus* (Decapoda: Brachyura). The effect of enriched live food (rotifer *Brachionus plicatilis*) with seven proportions of proteins and lipids (P/L), was evaluated: 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, and 40/60, during the larval development of the blue crab *Callinectes sapidus*. The lipid content increased significantly from 100/0 to 40/60 (7.48 to 11.47 g 100 g⁻¹), as did the energy (21.88 to 23.16 kJ g⁻¹), while apparently, the protein content was not a limiting factor (63.93 to 67.50 g 100 g⁻¹). The 50/50 and 40/60 diets showed the best responses in all studied variables. Up to eight zoeal stages were present, and the metamorphosis to megalopa occurred from the fifth moult, between 49 to 57 days. Survival fluctuated between 6 % and 34 %, and the molt cycle became significantly shorter from 100/0 to 40/60. Using RNA-seq, a *de novo* transcriptomic analysis was performed between the first (initial) and second instars of zoea to observe the effect of the two diets with opposite results during the first trial (80/20 and 40/60). In the metabolic pathways related to digestion and metabolism of nutrients, 110 overregulated genes were identified in 40/60 vs. initial and 47 in 80/20 vs. initial. The zoeas fed with the highest lipid content (40/60) improved the expression levels of the genes related to this nutrient, influencing the metabolism of proteins, carbohydrates, and the expression of genes of the digestive system, and of transport and cellular catabolism. This study establishes the basic foundations of formulated diets of known biochemical composition as supply to *C. sapidus* larvae to optimize and parameterize their culture.

Keywords: *Callinectes sapidus*, larval development, influence of diet, nutrient metabolism, gene expression.

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Abstract	XII
1. RELACIÓN ENTRE LA CALIDAD NUTRICIONAL DE LA DIETA Y EL DESARROLLO LARVAL DE LA JAIBA AZUL <i>Callinectes sapidus</i>	
	15
1.1 Resumen	15
1.2 Introducción	17
1.3 Materiales y métodos	22
1.3.1 Diseño e implementación del laboratorio de acuicultura - AcuiLab	22
1.3.2 Recolección, transporte, aclimatación de hembras y obtención de larvas	24
1.3.3 Manejo del alimento vivo	25
1.3.4 Preparación del alimento vivo enriquecido y análisis de su contenido	27
1.3.5 Desarrollo del experimento	28
1.3.6 Análisis estadístico	31
1.4 Resultados	33
1.4.1 Supervivencia y duración del ciclo larval	33
1.4.2 Ciclo de muda	34
1.4.3 Obtención de megalopas (MG)	36
1.4.4 Composición nutricional de las larvas, alimento vivo enriquecido y su	40
correlación con las variables poblacionales de <i>C. sapidus</i>	
1.5 Discusión	44
1.5.1 Supervivencia y duración del ciclo larval	44
1.5.2 Ciclo de muda	49
1.5.3 Obtención de megalopas (MG)	53
1.5.4 Composición nutricional de las larvas, el alimento vivo enriquecido y su	57
correlación con las variables poblacionales de <i>C. sapidus</i>	
2. CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA COMPARATIVA DEL EFECTO DE LA DIETA EN EL DESARROLLO LARVAL TEMPRANO DE LA JAIBA AZUL <i>Callinectes sapidus</i>	
	65
2.1 Resumen	65
2.2 Introducción	67
2.3 Materiales y métodos	72
2.3.1 Criterios de selección para el desarrollo de los ensayos	72
2.3.2 Desarrollo del experimento	73

2.3.3	Extracción de ARN, construcción y secuenciación de librerías de ADNc	74
2.3.4	Análisis de datos transcriptómicos	75
2.4	Resultados	80
2.4.1	Extracción de ARN y evaluación de su calidad	80
2.4.2	Secuenciación y ensamblajes <i>de novo</i> de los transcriptomas	80
2.4.3	Anotación funcional y clasificación de los transcriptomas	82
2.4.4	Identificación de los unigenes diferencialmente expresados (<i>DEGs</i>) ..	88
2.4.5	Caracterización de los genes putativos que intervinieron en la digestión de las dietas, de los <i>DEGs</i> sobre-regulados en las comparaciones 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial	89
2.5	Discusión.....	106
2.5.1	Extracción de ARN y evaluación de su calidad	106
2.5.2	Anotación funcional y clasificación de los transcriptomas	107
2.5.3	Caracterización de los genes putativos relacionados con la digestión de las dietas, de los <i>DEGs</i> sobre-regulados en las comparaciones 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial	108
3.	Conclusiones	135
4.	Bibliografía	137
A.	Anexo: Identificación de larvas de jaiba azul <i>Callinectes sapidus</i> mediante taxonomía molecular	197

1.RELACIÓN ENTRE LA CALIDAD NUTRICIONAL DE LA DIETA Y EL DESARROLLO LARVAL DE LA JAIBA AZUL *Callinectes sapidus*

1.1 Resumen

Comprender la nutrición evaluando la composición bioquímica del alimento suministrado y su efecto en el crecimiento, es esencial para desarrollar dietas formuladas en especies comercialmente importantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del alimento vivo durante el desarrollo larval de *Callinectes sapidus*, mediante el enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* con siete proporciones escalonadas de dos productos, *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch), y emulsión de S.presso (Spr), Ch/Spr: 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 y 40/60. El enriquecimiento por 24 h varía la composición nutricional del rotífero, y afecta de manera significativa el desarrollo larval de la jaiba azul. El contenido de lípidos suministrados aumentó significativamente de 100/0 a 40/60 (7,48 a 11,47 g 100 g⁻¹), al igual que la energía (21,88 a 23,16 kJ g⁻¹), aparentemente el contenido de proteínas no fue un factor limitante (63,93 a 67,50 g 100 g⁻¹). Se presentaron hasta ocho estadios de zoea, y la metamorfosis a megalopa (MG) ocurrió entre la quinta y la octava muda, entre los 49 a 57 días. La supervivencia fluctuó de 100/0 a 40/60 entre 6 y 34 %. El ciclo de muda fue haciéndose significativamente más corto de 100/0 a 40/60, afectando su patrón de comportamiento. Las variables peso, talla, factor de condición (Kn) y obtención de MG aumentaron significativamente al aumentar el contenido de Spr en las dietas. Los tratamientos 50/50 y 40/60 evidenciaron las mejores respuestas en todos los parámetros poblacionales estudiados, presentándose una correlación moderadamente fuerte entre el contenido nutricional de lípidos, cenizas y energía de las dietas y el desarrollo larval de la

jaiba azul. Nuestros datos revelan que el suministro de nutrientes mediante el enriquecimiento escalonado Ch/Spr de *B. plicatilis*, probablemente afectan el estado nutricional de las larvas de *C. sapidus* e influyen la plasticidad fenotípica durante su desarrollo larval.

Palabras clave: Jaiba azul, *Callinectes sapidus*, desarrollo larval, alimentación, dietas

1.2 Introducción

Los requerimientos nutricionales de los organismos varían a través de su ciclo de vida, en larvicultura estos empiezan cuando la larva es capaz de recibir alimento exógeno. Para la gran mayoría de especies acuícolas, este proceso se inicia al suministrarles alimento vivo, comúnmente compuesto por rotíferos del género *Brachionus* y crustáceos como la *Artemia*, que a su vez, son alimentados con cultivos de microalgas de los géneros *Tetraselmis*, *Nannochloropsis*, o *Isochrysis* (Romero-Romero y Yúfera, 2012; Ferreira *et al.*, 2018; Begum *et al.*, 2021; Fu *et al.*, 2021), y en algunos casos *Chlorella*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira* o *Pavlova* (Lucía-Pavón *et al.*, 2001; Rehberg-Haas *et al.*, 2015; Guarizo *et al.*, 2020), aunque su mantenimiento es costoso, especialmente para cultivos extensivos. Para mejorar la calidad nutricional del alimento vivo, también se emplean productos comerciales o se buscan nuevas fuentes de nutrientes, aplicando variadas técnicas, tasas de alimentación y tiempos en sus procedimientos de enriquecimiento (Agh y Sorgeloos, 2005; Romero-Romero y Yúfera, 2012; Li y Olsen, 2015; Ferreira *et al.*, 2018).

Los procesos de enriquecimiento del alimento vivo suministran a este con emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos altamente insaturados, conocidos como HUFA (por sus siglas en inglés para *Highly Unsaturated Fatty Acids*) (Kurmaly *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1996; Estudillo-del Castillo *et al.*, 2009; Haché y Plante, 2011; Li y Olsen, 2015; Li *et al.*, 2015a; Waqalevu *et al.*, 2019), o fuentes proteicas provenientes de algas congeladas, en polvo o pasta, probióticos, vitaminas y minerales (Hamre *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2011; Nordgreen *et al.*, 2013; Dhert *et al.*, 2014; Le *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2021; Khoa *et al.*, 2021). Dependiendo de las necesidades nutricionales que se deseen cubrir, estos componentes mejoran los perfiles nutricionales del alimento vivo encapsulándolo en su cuerpo, y de esta manera se pueden suministrar a las larvas y juveniles de peces y crustáceos durante el cultivo larvario.

Los enriquecedores SELCO (*Self Emulsifying Concentrates*), elaborados por la compañía INVE Aquaculture, tienen una alta composición de HUFA que conlleva a elevadas concentraciones de ácidos araquidónico - ARA, docosahexaenoico - DHA, y eicosapentaenoico - EPA (Dhert *et al.*, 2001). Productos como Culture Selco®, Selco

S.presso[®], DHA Culture Selco[®], entre otros, han sido examinados en los cultivos de alimento vivo de rotíferos (Abu-Rezq *et al.*, 2002; Park y Brown, 2004; Li y Olsen, 2015; Begum *et al.*, 2021), y *Artemia* (Lakshmanasenthil *et al.*, 2013; Asadpour-Ousalou, 2014; Khudiyi *et al.*, 2017; Nieves-Soto *et al.*, 2021), produciendo perfiles de ácidos grasos estables, comparables a los encontrados en el zooplancton silvestre, y mejores a los que se pueden lograr con mezclas de microalgas, además de mantener el contenido nutricional en sus cuerpos por períodos de tiempo más largos. De esta manera, los rotíferos y las artemias enriquecidas se han suministrado como alimento vivo, para estudiar los requerimientos nutricionales en estadios larvales de crustáceos como langostas de las especies *Jasus edwardsii* y *Panulirus homarus* (Nelson *et al.*, 2004; Chakraborty *et al.*, 2010), los cangrejos *Scylla serrata* y *S. paramamosain* (Davis, 2003; Nghia *et al.*, 2007), el camarón *Litopenaeus vannamei* (Mahmoud *et al.*, 2018), y el místico *Mysidopsis almyra* (Domingues *et al.*, 2001), los resultados indican que el tipo y la concentración de enriquecedores del alimento vivo, pueden mejorar la respuesta productiva.

Al igual que las emulsiones de aceites, también existen en el mercado varias especies de microalgas, las cuales se comercializan en forma de pasta, polvo o extracto. El género *Chlorella*, a pesar de ser una microalga de agua dulce, es muy usado en el cultivo de especies marinas por su alto contenido proteico, β -carotenos, clorofila, antioxidantes, minerales y otros nutrientes esenciales, que son similares a la composición de la microalga marina *Nannochloropsis*. Las especies de *Chlorella* más comúnmente usadas en los procesos de enriquecimiento son *C. pyrenoidosa*, *C. vulgaris*, y recientemente *C. minutissima* (Maruyama *et al.*, 1997; Ashraf *et al.*, 2011; Raja *et al.*, 2018; Arguelles, 2021). En el enriquecimiento de rotíferos, estas permiten obtener altos niveles de producción, además de mejorar sus contenidos nutricionales, esto los hace aptos para ser suministrados a los organismos de cultivo (Maruyama e Hirayama, 1993; Maruyama *et al.*, 1997; Lucía-Pavón *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2008; Mostary *et al.*, 2010). En crustáceos, el género *Chlorella* se usa ampliamente en criaderos de postlarvas de camarones *Macrobrachium rosenbergi* (Radhakrishnan *et al.*, 2014; Maliwat *et al.*, 2017, 2020), *Litopennaeus vannamei* (Palm *et al.*, 2015), *Streptocephalus proboscideus* (De Walsche *et al.*, 1991), y hasta en especies ornamentales como *Branchinella thailandensis* (Chaoruangrit *et al.*, 2018).

En braquiuros, los estudios de enriquecimiento nutricional se han enfocado en evaluar la cantidad de los lípidos suministrados, así como en el efecto de los productos utilizados sobre la composición bioquímica del alimento vivo o de las especies evaluadas. Existen registros que datan de 1975, donde durante el desarrollo larval del cangrejo *Rhithropanopeus harrisi* se estudió la variación en la composición de lípidos, proteínas y enzimas digestivas al alimentarse con nauplios de *Artemia* (Frank *et al.*, 1975). En larvas recién eclosionadas de *P. pelagicus*, *Sesarma cinereum* y *S. reticulatum*, se ha observado cómo los lípidos de los tejidos son usados como fuente energética principal, al ser sometidas a períodos prolongados de inanición (Staton y Sulkin, 1991; Wu *et al.*, 2017). El cangrejo de lodo (género *Scylla*), que incluye las especies *S. serrata*, *S. olivácea*, *S. tranquebarica* y *S. paramamosain*, conforma un grupo muy estudiado de especies de gran importancia comercial, en cuanto a requerimientos nutricionales de larvas y juveniles se refiere (Waiho *et al.*, 2018), algunos estudios en estas especies resaltan la importancia de los aminoácidos esenciales y no esenciales, así como las concentraciones de HUFA, DHA, EPA, ARA y fosfolípidos en el alimento vivo, para mejorar la supervivencia y la sincronía de las mudas (Suprayudi *et al.*, 2004, 2012; Nghia *et al.*, 2007).

Recientemente en *Menipe nodifrons* y *Callinectes danae* se evaluaron diferentes combinaciones de microalgas rotíferos y artemias para su levante en condiciones de laboratorio, sin especificar sus contenidos nutricionales (Guarizo *et al.*, 2020). En juveniles de *Portunus trituberculatus* se ha ensayado el nivel de inclusión de lípidos n-3 HUFA proveniente de aceite de pescado, kril y linaza, para la preparación de microdietas (Yuan *et al.*, 2021). Las últimas investigaciones realizadas en los requerimientos nutricionales de larvas y juveniles del cangrejo *Eriocheir sinensis*, recomiendan inclusiones de proteína del 43 % (Liu *et al.*, 2021a), entre 2.89 y 2.85 % de fosfatidilcolina (Lin *et al.*, 2021), y 4825 a 5918 IU kg⁻¹ de vitamina D₃ (Liu *et al.*, 2021b). Los estudios indican que el uso de dietas formuladas, frente a modelos generalizados producen mejores tasas de crecimiento, procesos de absorción más eficientes y mejora en la respuesta inmune (Han *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2021).

La jaiba azul *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896, es un crustáceo decápodo del infraorden brachyura, cuyo interés como especie acuícola ha venido incrementándose en las últimas décadas (Williams y Primavera, 2001; Donnelly, 2009; Daly *et al.*, 2020; Niță y Nenciu,

2021), debido a la fuerte sobre explotación pesquera a la que se encuentra sometida a nivel mundial (FAO, 2020; Francis *et al.*, 2021). Actualmente, se están desarrollando técnicas de cultivo como alternativas de conservación, ya sea para repoblar las zonas afectadas con larvas obtenidas en laboratorio, o para la producción controlada en sistemas cerrados, (Williams, 2007; Aguilar *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2008; Plough, 2017; Flowers *et al.*, 2018; Spitznagel *et al.*, 2019; Waycott, 2019; Daly *et al.*, 2020; Gulf Coast Research Laboratory, 2021; Seary *et al.*, 2021). Los intentos iniciales de cultivo de *C. sapidus*, datan desde 1882 (Brooks, 1882; Churchill, 1942), sin lograr pasar del tercer estadio de zoea. A partir de 1959, se identificaron entre siete a ocho estadios de zoea y uno de megalopa (Costlow y Bookhout, 1959b). Así mismo, se establecieron los protocolos de alimentación, determinando que la primera zoea no puede sobrevivir al ser alimentada únicamente con microalgas (Costlow y Bookhout, 1959a, 1959b; Rust y Carlson, 1960). Sulkin (1975), resaltó la importancia de los lípidos en la dieta, recalcando que las artemias (30 % peso seco), y los huevos de poliquetos (20% peso seco), contenían de dos a tres veces más grasas que los rotíferos (8 - 9 % peso seco). Muchos años después, se evaluó el efecto de la calidad de la dieta en la fisiología de las larvas y se determinó que el contenido de n-3 HUFA al enriquecer los rotíferos y artemias con SELCO en su dieta, afectó positivamente los procesos fisiológicos de respiración, crecimiento, excreción y tasas de crecimiento, pero no se especificaron los porcentajes de inserción usados (Pletl, 1992). Algunos pocos trabajos se han realizado en juveniles, estudiando los niveles de inclusión de celulosa y quitina, determinando que con 20% de uno o ambos ingredientes, se obtienen mejores crecimientos (Allman *et al.*, 2017). Así mismo, mediante la composición de isótopos estables (C y N) se pudo establecer que el contenido de aminoácidos está directamente relacionado con el contenido proteico de la dieta suministrada (Fantle *et al.*, 1999).

Si bien se han obtenido resultados satisfactorios en el cultivo larvario de la jaiba azul en condiciones controladas (Zmora *et al.*, 2005; Bembe *et al.*, 2017; Maurer *et al.*, 2017), poco se sabe sobre sus requerimientos nutricionales. La disponibilidad de nutrientes esenciales y su metabolismo, ejercerán un gran impacto en el desarrollo ontogénico, y si algún ácido graso o aminoácido esencial no está presente en las concentraciones adecuadas en la dieta, se observará un crecimiento lento, asincronía en el ciclo de muda y mayor mortalidad durante el desarrollo larval (Costlow, 1965; Sulkin, 1978; Felgenhauer *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1997b; Carter, 2015; Wang *et al.*, 2019; Codabaccus *et al.*, 2020). Es por ello que el

objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dietas enriquecidas durante el desarrollo larvario de *Callinectes sapidus* desde su eclosión (zoea 1), hasta el estadio de megalopa. Se utilizó el rotífero *Brachionus plicatilis* enriqueciéndolo por 24 h con siete dietas compuestas por una mezcla de *Chlorella pyrenoidosa* en polvo - Ch (Holistic Herbal Solutions®) y emulsión de S.presso - Spr (Selco®, Inve Aquaculture), en diferentes proporciones (Ch/Spr), con el fin de determinar su efecto en la supervivencia, duración del ciclo larval, ciclos de muda y obtención de megalopas. La información generada ayudará a profundizar el conocimiento de la nutrición larvaria de *C. sapidus*, y de manera práctica permitirá orientar la formulación de dietas que provean los requerimientos nutricionales necesarios para producir larvas en condiciones controladas.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Diseño e implementación del laboratorio de acuicultura - AcuiLab

Los experimentos se realizaron en el laboratorio Acuilab de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Sede Santa Marta. El laboratorio es una estructura rectangular de concreto de un piso y de 55,9 m² de área, diseñada específicamente para esta investigación (Figura 1 - 1).

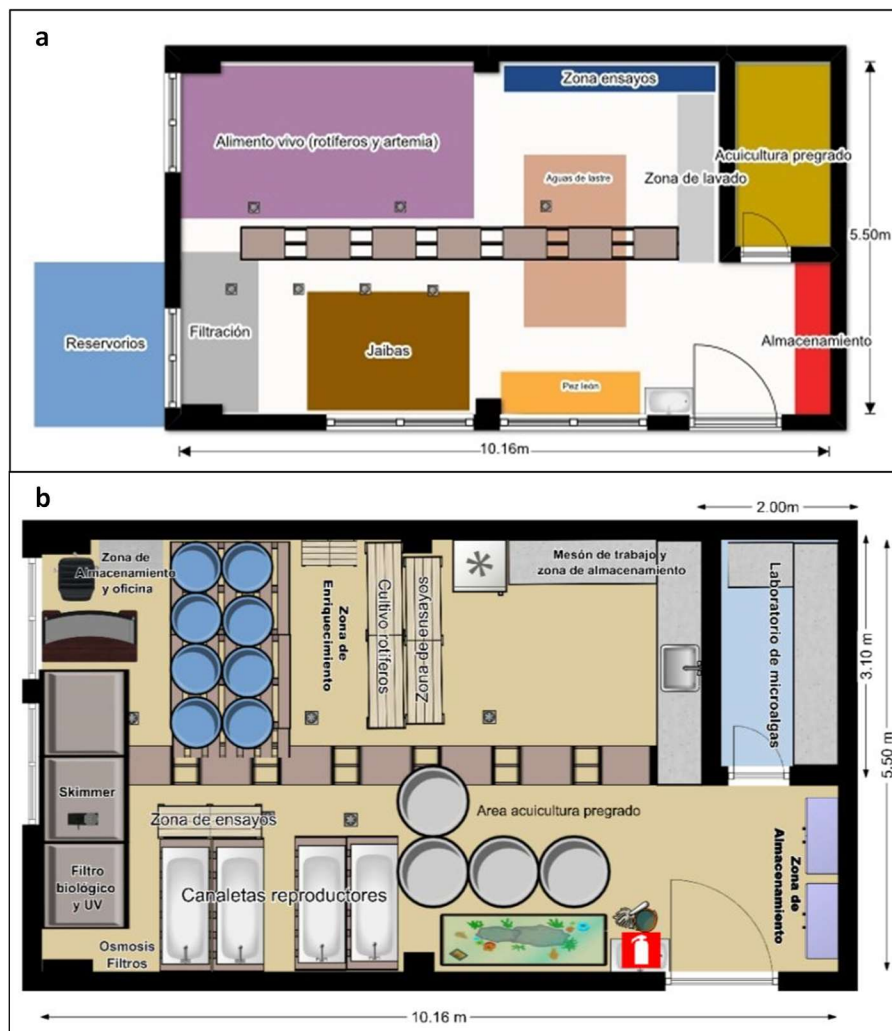


Figura 1 - 1: Diseño de zonas de uso por áreas de trabajo (a), y esquema general final de distribución de espacios en el AcuiLab (b).

El laboratorio cuenta con un sistema principal de tuberías primarias para abastecer de agua y aire toda el área, y sistemas secundarios en diferentes puntos con acceso a tanques, canaletas, filtro biológico, cultivo de rotíferos, laboratorio de microalgas, zonas para enriquecimiento, aclimatación, y montaje de ensayos (Figura 1 - 2). Además, se instalaron equipos como nevera, bombas para la recirculación del agua, lámparas de luz ultravioleta, osmosis inversa para purificar el agua, aireador o *blower*, filtros de cartucho de 1 y 20 μm y un desproteinizador o *skimmer* para la filtración de micro y macropartículas (Figura 1 - 2).



Figura 1 - 2: Montajes detallados en el AcuiLab. Tuberías primarias y secundarias (a), área de reproductores de jaiba azul (b), cultivo de rotíferos (c), zona para desarrollo de ensayos de larvicultura (d), filtro biológico (e), luces ultravioletas (f), desproteinizador o *skimmer* (g), zona de enriquecimiento (h), laboratorio de microalgas (i, j), equipo de osmosis inversa y filtros de cartucho (k), aireadores o *blowers* (l).

1.3.2 Recolección, transporte, aclimatación de hembras y obtención de larvas

Los especímenes fueron recolectados en la Boca de la Barra de la Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM), revisando las nasas puestas por los pescadores. Se seleccionaron hembras con una talla mínima de captura $\geq 11,6$ cm de ancho de caparazón (Rueda *et al.*, 2015), cuya masa ovígera presentara un color amarillo a naranja claro, indicador de las primeras fases de desarrollo embrionario (Hill *et al.*, 1989). En cada salida se seleccionaron de cuatro a seis hembras, ubicándolas en cavas plásticas para su transporte al laboratorio, usando agua de mar artificial (Premium Reef Salt Omega One®), ajustada a la salinidad y temperatura a la cual eran recolectadas (Figura 1 - 3a). Una vez en el AcuiLab, dentro de las cavas se colocaron varios puntos de aeración vigorosa, esperando de tres a cuatro horas que la temperatura del agua se ajustara a la del laboratorio (27 ± 1 °C), para trasladarlas a recipientes plásticos individuales de 10 L en las canaletas, con aeración permanente (Figura 1 - 3b).



Figura 1 - 3: Selección y recolección de hembras ovadas jaiba azul *Callinectes sapidus* en la Ciénaga Grande de Santa Marta (a), y aclimatación en el AcuiLab hasta la obtención de larvas (b).

Cada día de por medio se realizaron ajustes de aumento o disminución de dos partes a la salinidad del agua, recambiando entre el 70 a 80 % en cada recipiente, hasta llegar a una salinidad de 30, recomendado para el desarrollo larval de la especie (Costlow y Bookhout, 1959a; Sulkin *et al.*, 1976; Zmora *et al.*, 2005; Bembe *et al.*, 2017; Maurer *et al.*, 2017). En casos en que la salinidad fue ajustada rápidamente, recambios del 50 % continuaron cada día de por medio para mantener la buena calidad del agua. A partir del segundo día de

aclimatación, se inició el suministro de dieta húmeda a saciedad, una vez al día, con anillos de calamar.

Las hembras fueron mantenidas a una temperatura entre 25-27 °C, oxígeno a saturación ($\geq 5 \text{ mg L}^{-1}$) y fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad. Este proceso tuvo una duración de cinco a once días, dependiendo de la salinidad de recolección, y el estado de madurez de la masa ovígera, la cual iba cambiando de amarilla a negra, debido a la absorción del vitelo y al desarrollo del pigmento oscuro en los ojos de los embriones (Hill *et al.*, 1989). Una vez ocurrida la eclosión, la hembra se trasladó a otro recipiente con agua en iguales condiciones fisicoquímicas, dejando las larvas en el recipiente para el desarrollo de los ensayos (Figura 1 - 3b).

1.3.3 Manejo del alimento vivo

▪ Cultivo de microalgas

La cepa de *Nannochloropsis* sp., fue cultivada en lotes o *batch*, en recipientes de volúmenes escalonados (10, 250 mL, 3 y 15 L), cosechados en su totalidad cuando se encontraban en fase exponencial de crecimiento, para luego usarse como inóculos en volúmenes mayores. Fueron mantenidas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidad de 30, fotoperiodo 24:0 (luz: oscuridad), y aeración constante a partir de los 250 mL. Se sembraron en medio de cultivo (agua de mar filtrada con nutrientes), utilizando F/2 de Guillard (Lavens y Sorgeloos, 1996; Ospina-Salazar *et al.*, 2011), y agua de mar artificial (Premium Reef Salt Omega One®), para volúmenes de 10 y 250 mL. A partir de los 3 L se usó agua de mar natural filtrada con Kent Marine (Pro-Culture®), y para 15 L un medio con úrea, triple-15, complejo B y Neurobion® (Figura 1 - 4a).

▪ Cultivo de rotíferos

Los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) fueron donados por el Departamento de Ciencias Acuícolas de la Universidad de Córdoba. El cultivo base se mantuvo con una dieta viva compuesta por microalgas (*Nannochloropsis* sp.), una mezcla de levadura seca (Instant Success®) y *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Holistic Herbal Solutions®), en proporciones de 90 % y 10 % respectivamente, y aceite de hígado de bacalao (Emulsión de Scott®). La

cantidad de alimento para la mezcla se calculó usando una tasa de alimentación de 0,5 g de preparado $\times 10^6$ rot., y se homogenizó diariamente en la licuadora con agua dulce filtrada (1 L). La emulsión de Scott se diluyó por separado, mezclando diariamente 40 mL en una jarra con 4 L de agua dulce filtrada. Ambas mezclas permanecieron refrigeradas. Diariamente en las horas de la mañana se adicionaban microalgas para mantener un color verde claro en el agua, mientras que las mezclas se proporcionaban en dos raciones, una al medio día y otra al anochecer (Figura 1 - 4b).



Figura 1 - 4: Cultivo de alimento vivo en el AcuiLab. Microalgas *Nannochloropsis* sp. (a), y rotíferos *Brachionus plicatilis* (b).

La siembra inicial se efectuaba diariamente con un inóculo de 5 L, a una densidad de 100 a 200 rot. \cdot mL⁻¹. A medida que aumentaba la población del tanque, el volumen también lo hacía, diariamente se adicionaban microalgas a una concentración aproximada de 2×10^4 cél. \cdot mL⁻¹ (Acosta y Gómez-León, 2013), agua a 30 de salinidad y las mezclas descritas anteriormente. El cultivo base se mantuvo en seis botellones invertidos de 15 L, con aeración vigorosa, 24 h de iluminación, temperatura de 27 ± 1 °C, y 30 de salinidad. Los tanques se sembraron progresivamente en diferentes días de la semana, para mantener una producción constante, que se cosechaba en su totalidad después de cuatro o cinco días, obteniendo densidades que oscilaron entre 500 a 2000 rot. mL⁻¹. Al final del ciclo, los tanques, mangueras y piedras eran lavados, para iniciar nuevamente el proceso.

1.3.4 Preparación del alimento vivo enriquecido y análisis de su contenido nutricional

Se prepararon siete dietas experimentales, realizando mezclas de dos ingredientes usados a nivel comercial para el enriquecimiento del alimento vivo: 1) *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Holistic Herbal Solutions®) - Ch, como fuente de proteína y 2) Emulsión de S.presso - Spr (Selco®, Inve Aquaculture), como principal fuente de lípidos. El tratamiento testigo (Control), estuvo compuesto únicamente de Ch (100/0), para los otros seis se combinaron los dos ingredientes en diferentes proporciones Ch/Spr: 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 y 40/60.

Los rotíferos fueron extraídos de los cultivos base, para realizar el proceso de enriquecimiento; para ello, se cosechó una cantidad determinada de organismos en un tamiz de 50 μm , se enjuagaron varias veces y se depositaron en varios recipientes con agua limpia filtrada a la misma salinidad y condiciones de cultivo descritas anteriormente. El enriquecimiento se realizó en periodos de 24 h. La tasa de alimentación usada fue 2 g de dieta $\times 10^6$ rot., distribuida en cuatro raciones diarias (3 y 7 pm, 7 y 11 am). Pasado el tiempo de enriquecimiento, los rotíferos fueron nuevamente cosechados y lavados para su uso, ya fuese como alimento para larvas de jaiba azul o para el desarrollo de los análisis nutricionales.

Durante el desarrollo de los ensayos con larvas de *C. sapidus*, diariamente se cosecharon de dos a tres millones de rotíferos del cultivo base y se transfirieron a 14 botellas cónicas de 1,5 L que contenían 500 mL de agua de mar filtrada, para sembrar una densidad aproximada de 300 a 500 rot. mL^{-1} en cada botella, usando dos botellas por dieta.

Para los análisis del contenido de nutrientes, diariamente, y dependiendo de la tasa de crecimiento del cultivo base de rotíferos, se sembraron tanques de 120 L a una densidad de 200 rot. mL^{-1} , 24 h después de su enriquecimiento, se enjuagaron con agua destilada para eliminar el exceso de sal y alimento, se tamizaron (50 μm), y recolectaron en cajas de Petri. Las muestras se secaron en estufa a 105 °C por 12 h (A.O.A.C., 2000), depositándolas en recipientes plásticos almacenados en congelador a -20 °C, hasta

acumular una cantidad representativa de cada dieta (5 gr por triplicado aproximadamente), y luego fueron liofilizadas (Equipo Labconco Free Zone 4.5) y almacenadas hasta efectuarse los análisis de nutrientes. Todo el proceso de enriquecimiento y recolección de harinas fue ejecutado durante seis meses.

Los análisis del alimento vivo enriquecido se realizaron en el laboratorio de análisis químico y bromatológico de la Universidad nacional de Colombia, sede Medellín. En todas las dietas se trabajó por triplicado. Para la proteína se usó la técnica de Kjeldahl, digiriendo la muestra en ácido sulfúrico, la mezcla digerida se neutralizó y destiló con una base, el destilado se recogió en una solución de ácido bórico, y los aniones del borato se titularon con ácido clorhídrico para conocer el contenido de nitrógeno (A.O.A.C., 1984; Olvera *et al.*, 1993). Los lípidos se determinaron mediante el método Soxhlet (Equipo Velp Scientifica SER 148); las grasas contenidas en la muestra se extrajeron con éter de petróleo, para ser evaluadas como porcentaje del peso seco, luego de evaporarse el solvente (A.O.A.C., 2000). Las cenizas se calcularon por calcinación a 550 °C en una mufla por 12 h para obtener al final el contenido de minerales totales de la muestra (A.O.A.C., 1984; Olvera *et al.*, 1993). Los carbohidratos se estimaron mediante el método colorimétrico de DuBois, en una reacción de fenol y ácido sulfúrico para determinación de azúcares y sus metil-derivados, oligosacáridos y polisacáridos (DuBois *et al.*, 1956). El valor calórico bruto se obtuvo por bomba calorimétrica (Equipo Ika-Werke C 2000 basic), mediante la combustión de la muestra en atmósfera de oxígeno (A.O.A.C., 2005).

1.3.5 Desarrollo del experimento

Las larvas de *C. sapidus* se obtuvieron de hembras ovadas recolectadas en la Ciénaga Grande de Santa Marta en diferentes épocas del año, siguiendo el proceso de aclimatación y obtención de larvas descrito anteriormente. Fueron evaluados por separado cuatro nacimientos, correspondientes a cuatro hembras diferentes, y cada uno fue identificado mediante taxonomía molecular (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** De cada nacimiento, antes de iniciar se recolectó una cantidad de larvas suficientes para que fueron deshidratadas en estufa a 105 °C por 12 h (A.O.A.C., 2000) para su posterior análisis bromatológico.

Al eclosionar las larvas, la hembra fue extraída del recipiente de 10 L, instalando dos puntos de aeración suave y adicionando *Nannochloropsis* sp. a una densidad aproximada de 20.000 a 50.000 cél. mL⁻¹ (Côrtes y Tsuzuki, 2012; Acosta y Gómez-León, 2013; Shan y Lin, 2014), ya que se ha establecido que el uso de “agua verde” mejora el desarrollo y crecimiento de las larvas de peces y crustáceos (Wolcott y O’connor, 1992; Soyel y Kumlu, 2003; Guarizo *et al.*, 2020; Muangyao *et al.*, 2020). Se realizaron 10 conteos (1 mL) aleatorios de larvas en placas Bogorov, fijándolas con lugol, determinando la densidad y cantidad total de organismos eclosionados por la hembra. Para todos los ensayos se usó agua de mar artificial (Premium Reef Salt Omega One®), a 30 de salinidad, filtrada y esterilizada en autoclave, añadiendo cloranfenicol (10 mg L⁻¹), como tratamiento profiláctico preventivo recomendado para evitar infecciones en las larvas de *C. sapidus* (Sulkin y Van Heukelem, 1986).

Durante la fase de aclimatación, el lote de larvas se distribuyó en 14 recipientes de 3 L (dos por dieta), a una densidad aproximada de 30 larvas mL⁻¹, en 1 L de agua limpia con microalgas (*Nannochloropsis* sp.), para iniciar la alimentación con los rotíferos enriquecidos de cada dieta a una densidad de ~ 300 rot. mL⁻¹. Las larvas fueron mantenidas de esta manera por cuatro días, con aeración suave, a 27 ± 1 °C, y fotoperiodo 10:14 (luz:oscuridad). Diariamente en las horas de la mañana (7:30 am) se agregaron las microalgas, y en las horas de la tarde (3 pm) los rotíferos de la respectiva dieta. Durante el tiempo de aclimatación cada día de por medio se realizaron recambios del 90% del agua, con el fin de remover el exceso de microalgas, rotíferos y larvas muertas.

Al quinto día, las larvas fueron sembradas de manera individual en microplacas transparentes de cultivo de tejidos de 24 pozos, con 1 mL de agua de mar. El diseño experimental constó de siete tratamientos (alimento enriquecido Ch/Spr), cada uno con 72 réplicas (cada larva en su respectivo pozo representó una réplica), para un total de 504 unidades experimentales por ensayo. Las microplacas fueron colocadas en un lugar tranquilo, a fotoperiodo 10:14 (luz: oscuridad) y temperatura del laboratorio de 27 ± 1 °C. Diariamente, entre las 7 am y las 3 pm, las placas fueron revisadas en un estereoscopio (aumento 10x), para registrar mortalidad o presencia de mudas en los pozos. Así mismo, en las horas de la tarde (4 a 6 pm), las larvas se alimentaron con la dieta respectiva en cada pozo, con la ayuda de un gotero plástico y de acuerdo a las especificaciones de la

Tabla 1 - 1, adicionando también una gota diaria de microalgas (*Nannochloropsis* sp.) durante los primeros 10 días del ensayo. Los recambios de agua se realizaron cada día de por medio, las larvas se trasladando cuidadosamente a nuevas microplacas con agua de mar limpia mar. Los ensayos terminaron cuando la última larva alcanzó el estadio de megalopa (MG) o murió.

Se obtuvieron datos de mortalidad diaria y total, días de ocurrencia de las mudas, número de mudas por larva hasta alcanzar el estadio MG, registros de megalopas vivas y megalopas que murieron en el proceso final de muda. Cada MG fue medida y pesada, las mediciones se hicieron en estereoscópico (Software NIS- Elements Br - Nikon), registrando la longitud total (distancia desde la base del rostrum a la punta lateral del telson) (Hopkins, 1944; Stuck *et al.*, 2009; Mantelatto *et al.*, 2014); el peso se determinó en una balanza analítica (Precisa 321), para lo cual previamente se removió delicadamente el exceso de humedad con papel absorbente.

Tabla 1 - 1. Densidad y tamaño del alimento vivo enriquecido suministrado durante el desarrollo larval de la jaiba azul *Callinectes sapidus* desde su eclosión hasta megalopa. El alimento consistió en rotíferos *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas, compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo - Ch (Holistic Herbal Solutions®) y emulsión de S.presso - Spr (Selco®, Inve Aquaculture), en diferentes proporciones (Ch/Spr).

Recipiente de cultivo	Volumen de agua	Días después de la eclosión	Tamaño rotíferos (µm)*	Densidad (rot. mL ⁻¹)
Tanques plásticos de 3 L	1 a 2,5 L	0 - 4 (Fase de aclimatación)	< 120	~ 300
Microplacas de 24 pozos	1 mL	5 - 15	< 200	~ 60
Microplacas de 24 pozos	1 mL	16 – 30	> 200	~ 80
Microplacas de 24 pozos	2 mL	31 – Muda a megalopa	> 200	~ 100

* El tamaño de los rotíferos se seleccionó por medio de su filtrado por tamices de diferente ojo de malla.

Con los datos obtenidos en cada tratamiento se realizaron los siguientes cálculos: 1) Supervivencia final y durante el desarrollo larval (Supervivencia % = No. Final de larvas/número inicial de larvas x 100) (Hosain *et al.*, 2021); 2) duración del ciclo larval hasta MG (No. días); 3) peso (mg) y talla (µm) de MG; 4) factor de condición Le Cren (Kn) en MG

($Kn=W/Wc$, W = peso observado de la larva en una determinada talla; Wc = peso esperado en la misma talla, calculado a partir de una regresión de peso y talla de todos los tratamientos agrupados) (Le Cren, 1951; Lloret *et al.*, 2013); 5) porcentaje de larvas (%) que completaron su ciclo de muda (MG vivas y muertas) y larvas que no completaron el ciclo de muda; 6) porcentaje de MG (%) obtenidas en cada muda; 7) porcentaje de larvas (%) que pasaron a cada muda; 8) patrón de tendencia de ocurrencia de las mudas (días) a lo largo del desarrollo larval (valor promedio, máximo y mínimo) y; 9) duración del ciclo inter-mudas durante el desarrollo larval hasta MG (día final – día inicial en que se presentó una misma muda).

1.3.6 Análisis estadístico

Se realizaron ANOVAS a una vía con los datos de supervivencia final (%), y valor promedio de duración de cada muda. Se analizaron mediante ANOVAS a dos vías los datos de tallas de MG (μm), y Kn (factor 1 fijo: dietas; factor 2 aleatorio: nacimientos), así como la duración del ciclo de mudas (factor 1 fijo: dietas; factor 2 fijo: duración de las mudas). Se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) para comparaciones post-hoc entre tratamientos. Para el contenido nutricional del alimento vivo enriquecido (rotíferos), se ejecutaron ANOVAS a una vía con proteína cruda, lípidos totales y carbohidratos, y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con los contenidos de cenizas y energía, empleando el test de Bonferroni para comparaciones pos-hoc entre las dietas. Las muestras fueron analizadas por triplicado, siendo cada réplica el producto de recolecciones múltiples cada dos meses aproximadamente, de nacimientos de rotíferos.

El peso de las megalopas (mg), duración del ciclo larval (días), , y porcentaje de megalopas obtenidas en cada muda (%), se evaluaron mediante el test no paramétrico de bloques de Friedman (dietas como variable categórica y nacimientos como bloque), cuando se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), se realizó el test de Conover para pruebas post-hoc en el programa RStudio versión 1.3.1093.

Finalmente se realizaron análisis de correlación de Pearson y regresiones lineales simples entre todos los componentes nutricionales del alimento vivo enriquecido (proteínas, lípidos,

carbohidratos, cenizas y energía), y las variables poblacionales de las larvas de *C. sapidus* supervivencia, duración del ciclo larval, y peso, talla y Kn de MG. Todos los análisis se ejecutaron en el programa Statgraphics versión 18, verificando inicialmente los supuestos de normalidad de los residuos del modelo y homogeneidad de varianza entre tratamientos, o combinaciones de tratamientos para ANOVA a dos vías por prueba de Barlett (Zar, 2010), usando un nivel de significancia de $P \leq 0,05$ para todas las pruebas.

1.4 Resultados

1.4.1 Supervivencia y duración del ciclo larval

La supervivencia y duración del ciclo larval fueron influenciadas significativamente por el tipo de dieta suministrada. En general, se observó que a medida que se aumentó el contenido de S.presso (lípidos) en la dieta, mejoró la supervivencia y se redujo la duración del ciclo larval de *C. sapidus* (Tabla 1 - 2; Figura 1 - 5). Los porcentajes más altos de supervivencia de las megalopas (29 a 34 %), se obtuvieron en las dietas 50/50 y 40/60 respectivamente; mientras que en 100/0, 90/10 y 80/20 fueron significativamente más bajos ($P \leq 0,05$), oscilando entre 6 al 11 %. La duración del ciclo larval mostró una tendencia similar, en las dietas 40/60, 50/50 y 60/40 osciló entre 49 y 52 días; mientras que en el resto de los tratamientos fue significativamente más largo ($P \leq 0,05$), finalizando entre 55 a 57 días (Tabla 1 - 2).

Tabla 1 - 2: Supervivencia final y duración del ciclo larval de *Callinectes sapidus*, alimentadas con *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.presso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los valores son expresados como el promedio \pm E.S. de cuatro nacimientos. Letras distintas en una columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Alimento enriquecido (Ch/Spr)	Supervivencia final (%)*	Duración del ciclo larval (promedio de días)**
100/0	6,7 \pm 1,8 ^b	55,8 \pm 6,3 ^{ab}
90/10	5,8 \pm 1,7 ^b	56,0 \pm 6,2 ^{abc}
80/20	10,6 \pm 3,4 ^b	57,0 \pm 6,1 ^{ab}
70/30	16,0 \pm 3,0 ^{ab}	55,3 \pm 4,8 ^{abc}
60/40	20,5 \pm 5,4 ^{ab}	50,5 \pm 3,1 ^{bcd}
50/50	28,8 \pm 9,4 ^a	51,5 \pm 6,4 ^{cd}
40/60	33,7 \pm 12,0 ^a	48,8 \pm 5,7 ^d

*ANOVA a una vía y prueba a-posteriori LSD. ** Prueba de Friedman y prueba a-posteriori Conover.

Durante los primeros 13 días, la pendiente de mortalidad fue marcada en todos los tratamientos, la población de zoeas disminuyó entre 45 a 57 %, posteriormente la supervivencia se mantuvo con pocos cambios hasta los 43 a 46 días (Figura 1 - 5).

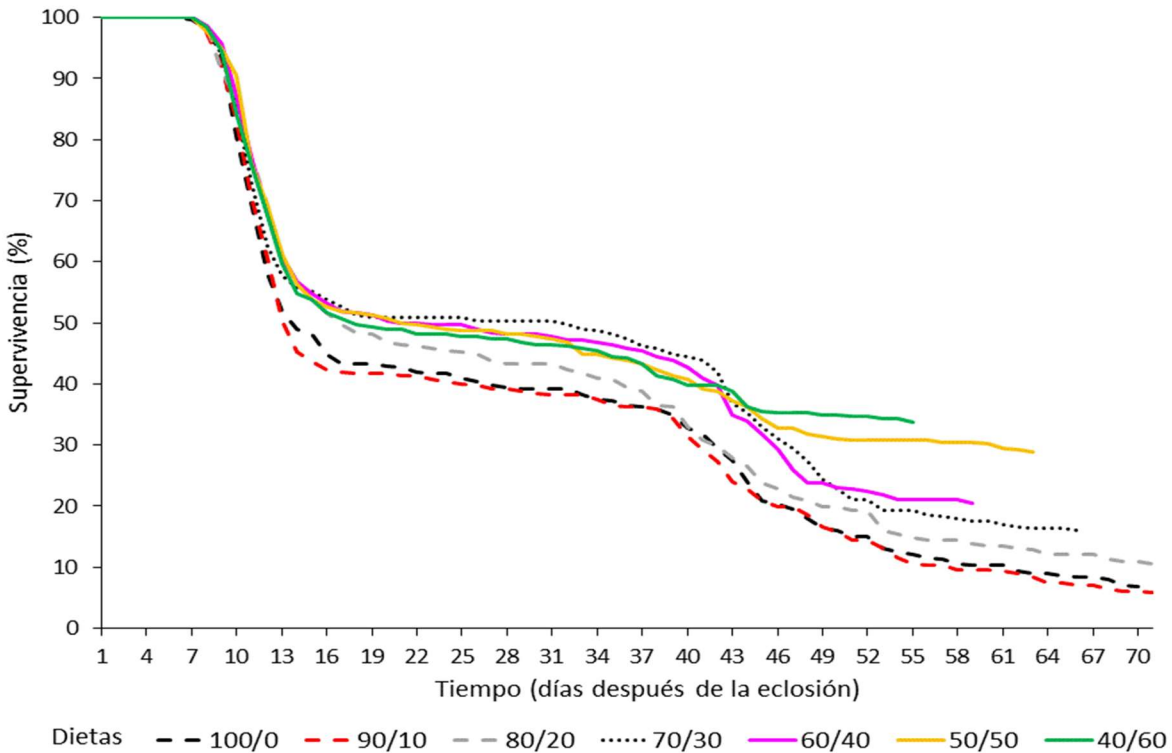


Figura 1 - 5: Supervivencia (%) durante el desarrollo larval de *Callinectes sapidus*, desde la eclosión a megalopa, alimentadas con *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales, compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch), y emulsión de S.preso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los valores se expresan como el promedio de cuatro nacimientos. El final de la curva indica el momento en que las larvas alcanzaron la fase de megalopa.

1.4.2 Ciclo de muda

Únicamente del 55 al 68 % de las zoeas lograron superar la primera muda (M1). A partir de este punto, la mortalidad fue mucho menos marcada, disminuyendo paulatinamente de un 14 a 27 % a través de las metamorfosis hasta llegar a M5 (Figura 1 - 6). Entre M5 y M8, diferentes proporciones de larvas alcanzaron la fase final a megalopa en los tratamientos evaluados; por ende, los cambios en estos porcentajes no sólo se deben a la mortalidad, sino a que también algunas jaibas habían completado el desarrollo larvario (Figura 1 - 6).

De la primera a la cuarta muda, el tiempo promedio de muda fue similar entre las dietas, la primera muda (M1) se presentó en promedio $7,90 \pm 0,11$ días después de la eclosión, mientras que M2, M3 y M4 ocurrieron entre los $12,48 \pm 0,08$, $17,29 \pm 0,26$, y $21,91 \pm 0,43$

días respectivamente. A partir de M5 se empiezan a observar mayores diferenciaciones entre las dietas (Figura 1 - 7). El tiempo en el cual ocurrieron las mudas M6, M7 y M8 se incrementó notablemente en los tratamientos 100/0, 90/10, 80/20 y 70/30, los cuales alcanzaron períodos de 10 a 15 días (Figura 1 - 7).

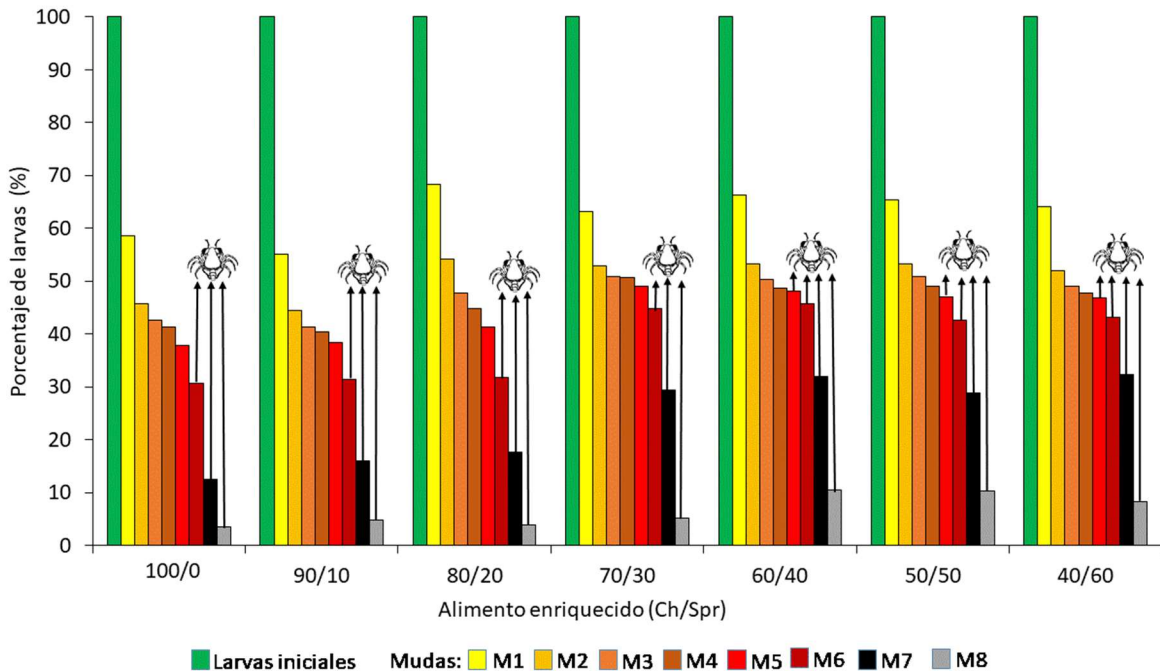


Figura 1 - 6: Porcentaje de larvas de *Callinectes sapidus* que pasaron a cada muda, desde su eclosión hasta alcanzar el estadio final de megalopa, al ser alimentadas con rotíferos *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.preso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Las flechas en cada dieta indican las mudas en las cuales se obtuvieron megalopas. Los valores son expresados como el promedio de cuatro nacimientos.

Al analizar la duración de cada muda (intervalo de tiempo en que se presenta una misma muda en cada tratamiento), se observó que, en los primeros estadios, las larvas mudaron en periodos más cortos de tiempo, pero éste fue incrementándose hasta M7, y volvió a disminuir en la última muda (M8). Aunque esta tendencia se observó en todas las dietas, los intervalos de tiempo fueron significativamente más cortos ($P \leq 0,05$) en 40/60, seguidos por 50/50, 60/40 y 70/30. Las dietas 100/0, 90/10 y 80/20 presentaron intervalos de tiempo significativamente más largos ($P \leq 0,05$) (Tabla 1 - 3).

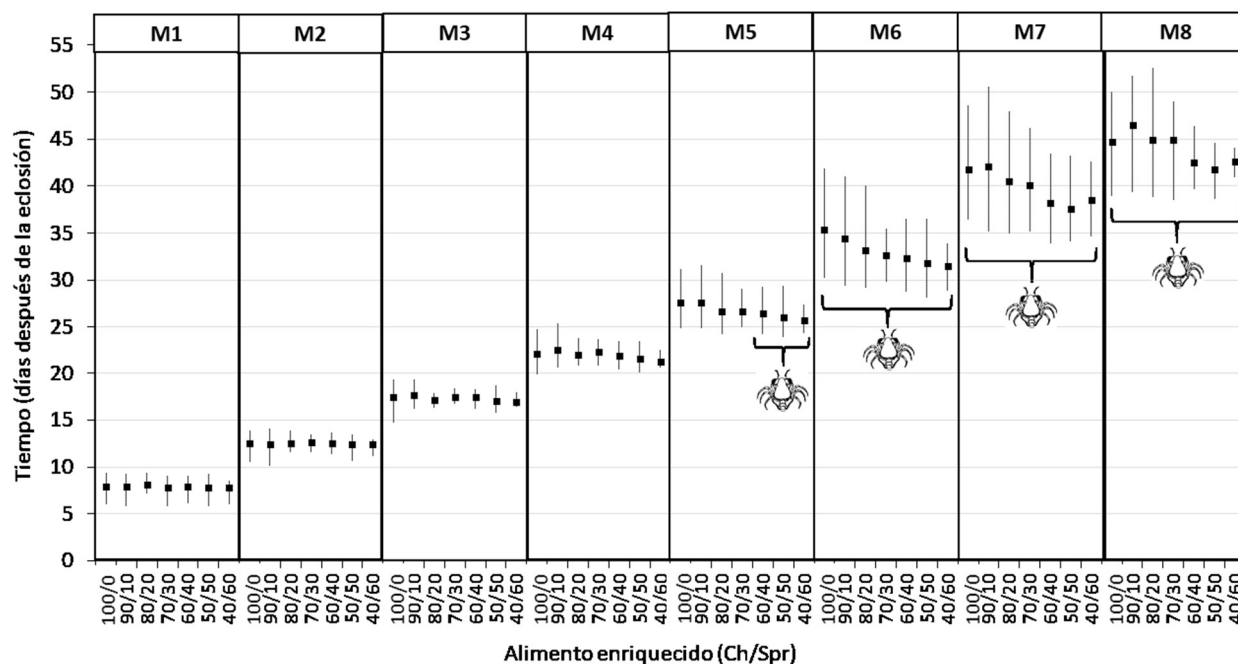


Figura 1 - 7: Patrón de comportamiento de los días en que se presentaron las mudas (promedio (▪), intervalo entre máximo y mínimo), durante el desarrollo larval de *Callinectes sapidus* desde su eclosión hasta alcanzar el estadio final de megalopa, alimentadas con rotíferos *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.presso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los corchetes indican las mudas en las cuales se obtuvieron megalopas. Los valores son expresados como el promedio de cuatro nacimientos. No se presentaron diferencias significativas en los valores promedio de duración de cada muda entre dietas (ANOVA a una vía para cada muda).

1.4.3 Obtención de megalopas (MG)

La fase de megalopa (MG) fue alcanzada entre las mudas M5 y M8. En los tratamientos 60/40, 50/50 y 40/60 se registraron después de M5, aunque en porcentajes bajos (1,1 a 1,4 %), en el resto, sólo se observaron después de M6. Considerando todos los tratamientos, la fase MG se alcanzó principalmente entre M7 (38,5 a 73,7 %), y M8 (21,1 a 45.5 %). Al comparar los porcentajes de MG obtenidos en cada muda, no se presentaron diferencias significativas entre las dietas ($P > 0.05$) (Figura 1 - 8).

Tabla 1 - 3: Duración del ciclo de mudas (día final – día inicial en que se presenta la muda en un mismo tratamiento), durante el desarrollo larval de *Callinectes sapidus*, alimentadas con *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.preso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los promedios provienen de cuatro diferentes nacimientos. Letras distintas entre dietas indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$, ANOVA a dos vías y prueba a-posteriori LSD).

Mudas	Alimento enriquecido (Ch/Spr)						
	100/0 ^a	90/10 ^a	80/20 ^{ab}	70/30 ^{bc}	60/40 ^c	50/50 ^{bc}	40/60 ^d
M1	3,23	3,36	2,18	3,19	2,75	3,37	2,37
M2	3,29	3,85	2,19	1,81	2,23	2,65	1,72
M3	4,51	3,01	1,46	1,56	1,99	2,86	1,44
M4	4,88	4,75	2,91	2,87	2,90	3,23	1,76
M5	6,24	6,68	6,46	4,03	4,90	5,31	2,92
M6	11,60	11,50	10,84	5,53	7,66	8,23	4,87
M7	12,11	15,30	12,89	10,92	9,41	9,02	7,91
M8	11,00	12,29	13,64	10,45	6,55	5,90	3,00

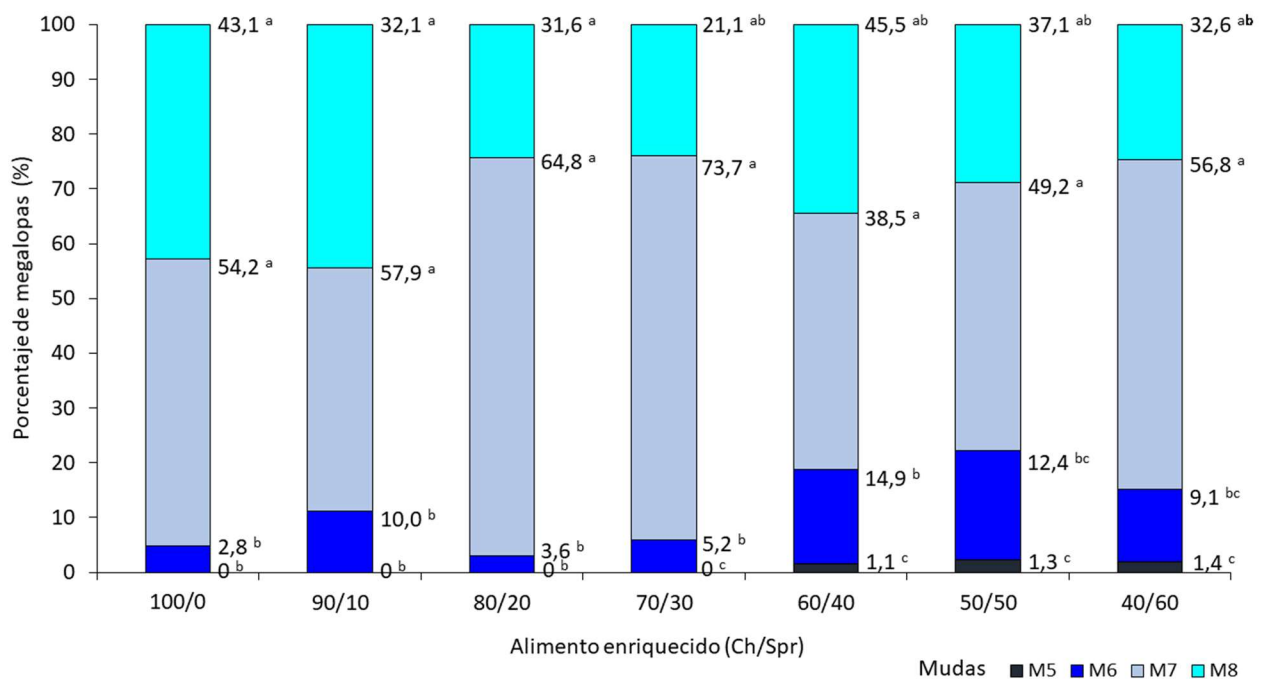


Figura 1 - 8: Porcentaje de megalopas de *Callinectes sapidus* obtenidas en cada muda (M5, M6, M7, M8), al ser alimentadas con rotíferos *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.preso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los valores son expresados como el promedio de cuatro nacimientos. No se presentaron diferencias significativas entre las dietas con respecto a los porcentajes de MG obtenidos en cada muda ($P > 0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas entre mudas ($P \leq 0,05$) de una misma dieta. Prueba de Friedman y prueba a-posteriori Conover.

En la Figura 1 - 9 se detalla la proporción (%) de MG vivas y muertas (MGv/MGm) obtenidas en cada tratamiento. En la dieta 90/10 más del 50% de las MG murieron durante el proceso de muda, entre 100/0 a 60/40 oscilaron entre 35 a 22 %, siendo más bajos entre 50/50 y 40/60 (11 y 7 % respectivamente).

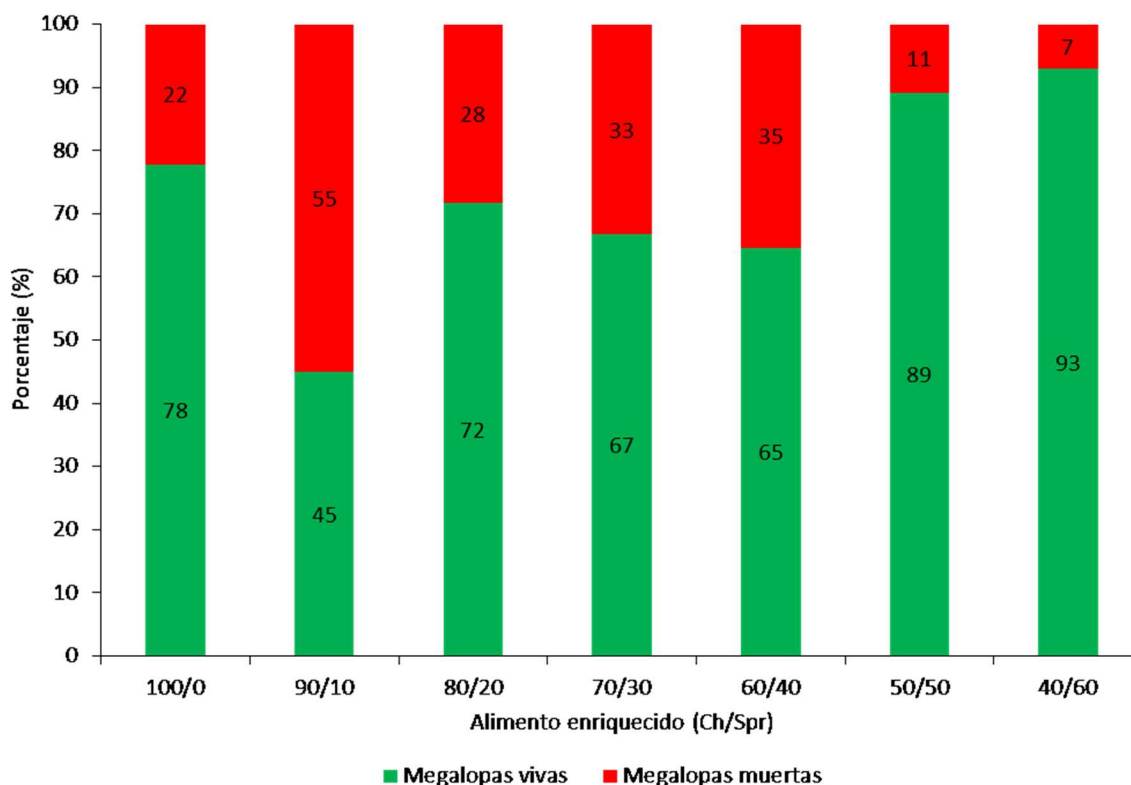


Figura 1 - 9: Proporción de larvas que completaron su ciclo a megalopas (vivas y muertas), durante el desarrollo larval de *Callinectes sapidus*, al ser alimentadas con rotíferos *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.presso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los valores son expresados como el promedio de cuatro nacimientos.

Considerando todas las dietas, el peso osciló entre 0,72 y 1,33 mg, las tallas entre 2.632 y 2.927 μm y el factor de condición (Kn) de 0,83 a 1,16. Las MG que recibieron los rotíferos enriquecidos con las relaciones Ch/Spr de 40/60 y 50/50, presentaron los valores más altos en peso, talla y Kn ($P \leq 0,05$); mientras que los valores más bajos correspondieron al tratamiento 100/0 (Tabla 1 - 4). La relación peso-talla evidencia que las MG que recibieron los rotíferos enriquecidos con la dieta 100/0 tuvieron la menor talla y el menor peso,

mientras que en las dietas 50/50 y 40/60 se observaron los mejores resultados (Figura 1 - 10).

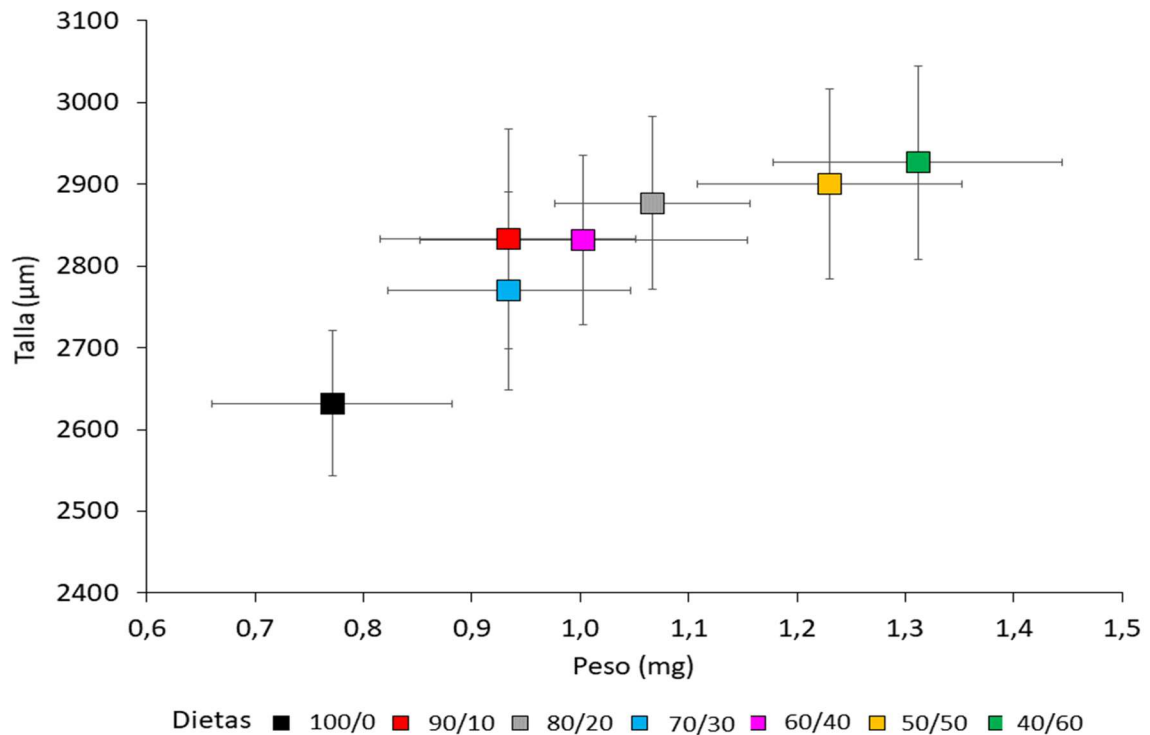


Figura 1 - 10: Relación entre la talla (μm) y el peso (mg) de larvas megalopa de *Callinectes sapidus*, alimentadas con rotíferos *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.preso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los valores son expresados como el promedio \pm E.S de cuatro nacimientos.

Al parecer, el peso se incrementó más rápidamente que la talla a medida que aumentó la concentración de S.preso (Spr) en el alimento enriquecido (Figura 1 - 10); esta progresión se mantuvo en todas las dietas, a excepción de 70/30 y 60/40. En la primera, las MG obtuvieron tallas similares a 100/0, pero pesos significativamente mayores ($P \leq 0,05$); la segunda, se ubicó intermedia entre 90/10 y 80/20, con tallas similares, pero un peso significativamente mayor ($P \leq 0,05$) que 90/10 (Tabla 1 - 4; Figura 1 - 10).

Las MG con mayor peso correspondieron a las dietas 60/40, 50/50 y 40/60; en estos tratamientos se registraron valores de 1,08 a 1,33 mg. Respecto a las tallas, la tendencia no fue muy clara, los valores estuvieron entre 2632 y 2926 μm , aunque si hubo diferencias

entre los tratamientos. Por otro lado, al comparar el factor de condición, éste indica claramente que los mejores tratamientos fueron 50/50 y 60/40 (Tabla 1 - 4).

Tabla 1 - 4: Variables de crecimiento de larvas megalopa de *Callinectes sapidus*, alimentadas con *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.presso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los valores son expresados como el promedio \pm E.S. de cuatro nacimientos. Letras distintas en una columna, indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Alimento enriquecido (Ch/Spr)	Peso megalopas (mg)*	Talla megalopas (μm)**	Factor de condición (Kn)**
100/0	0,72 \pm 0,06 ^e	2.632,0 \pm 88,8 ^c	0,83 \pm 0,11 ^c
90/10	0,92 \pm 0,07 ^d	2.833,5 \pm 134,4 ^{ab}	0,88 \pm 0,10 ^{bc}
80/20	1,02 \pm 0,05 ^{cd}	2.876,9 \pm 105,6 ^{ab}	0,97 \pm 0,08 ^{bc}
70/30	0,96 \pm 0,08 ^{cd}	2.769,8 \pm 120,8 ^{bc}	0,92 \pm 0,13 ^b
60/40	1,08 \pm 0,15 ^{bc}	2.832,0 \pm 104,0 ^{ab}	0,93 \pm 0,11 ^b
50/50	1,29 \pm 0,07 ^{ab}	2.900,2 \pm 115,9 ^a	1,11 \pm 0,11 ^a
40/60	1,33 \pm 0,05 ^a	2.926,6 \pm 118,5 ^a	1,16 \pm 0,12 ^a

*Prueba de Friedman y prueba a-posteriori Conover. **ANOVA a dos vías y prueba a-posteriori LSD.

1.4.4 Composición nutricional de las larvas, alimento vivo enriquecido y su correlación con las variables poblacionales de *C. sapidus*

Se realizaron únicamente análisis bioquímicos del contenido de proteínas, lípidos y cenizas de los cuatro lotes de larvas de *C. sapidus* usados para cada ensayo, ya que la cantidad de muestra no fue suficiente para determinar azúcares totales y valor calorífico bruto. Los contenidos de proteína de los lotes de larvas usados para los ensayos al momento de nacer y antes de recibir cualquier alimentación fueron similares, variando entre 50 y 63 g 100 g⁻¹. Por su parte, el contenido de lípidos presentó una gran variación entre los lotes, cercana al 80%, mientras que las cenizas variaron un 26 % (Tabla 1 - 5).

El contenido proteico en las dietas osciló entre 63,93 y 67,50 g 100 g⁻¹, siendo significativamente más bajo en 90/10 ($P \leq 0,05$). El mayor contenido de lípidos se observó en los tratamientos 50/50 y 40/60, disminuyendo paulatina y significativamente ($P \leq 0,05$) desde 60/40 hasta 100/0 (Tabla 1 - 6). En la dieta 50/50 los carbohidratos fueron significativamente más altos (1,38 g 100 g⁻¹) que en el resto ($P \leq 0,05$), mientras que en

60/40 fueron significativamente menores ($0,81 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). Las cenizas fueron significativamente mayores ($P \leq 0,05$) en los tratamientos con menor inclusión de Spr. El valor energético más alto se registró en 60/40 ($23,38 \text{ kJ g}^{-1}$), el cual fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$) que 100/0 (Tabla 1 - 6).

Tabla 1 - 5: Composición nutricional de larvas recién nacidas de *Callinectes sapidus* antes de iniciar los ensayos de alimentación.

	Nacimientos				Promedio	CV (%)
	N1	N2	N3	N4		
Proteína cruda (g 100 g ⁻¹)	52,50	63,00	50,00	58,80	56,08 ± 5,92	10,61
Lípidos totales (g 100 g ⁻¹)	1,49	7,72	1,57	4,07	3,71 ± 2,93	78,98
Cenizas (g 100 g ⁻¹)	30,71	19,05	35,43	23,91	27,28 ± 7,24	26,54

El coeficiente de correlación reflejó un nexo muy débil y no significativo para los contenidos de proteínas y carbohidratos de las dietas, y un nivel de asociación moderadamente fuerte de los lípidos, cenizas y energía, en relación con las variables poblacionales evaluadas (Tabla 1 - 7). En los lípidos hay correlaciones positivas ($\geq 0,81$), y significativas ($P < 0,05$) para todas las variables, a excepción de la duración del ciclo larval (DCL), y los valores de R^2 oscilaron entre 51 y 84% (Tabla 1 - 7). El contenido de cenizas se correlacionó negativamente y de manera significativa ($P \leq 0,05$) para todas las variables, con excepción de DCL en donde fue positiva, pero no significativa. Finalmente, la energía se correlacionó positivamente (R^2 46 a 84 %) con todas las variables, a excepción de DCL donde fue negativa ($-0,80$, $R^2=63,53$); y fue significativa ($P \leq 0,05$) con supervivencia, DCL, talla y obtención de MG (Tabla 1 - 7).

Tabla 1 - 6: Composición nutricional de *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas, compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.presso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los valores son expresados como el promedio \pm D.E. de tres réplicas. Letras distintas en una fila indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

	Alimento enriquecido (Ch/Spr)						
	100/0	90/10	80/20	70/30	60/40	50/50	40/60
Proteína cruda* (g 100 g ⁻¹)	66,93 \pm 1,62 ^{ab}	63,93 \pm 0,67 ^c	66,27 \pm 0,60 ^{ab}	66,90 \pm 0,20 ^{ab}	67,50 \pm 0,40 ^a	65,90 \pm 0,44 ^b	67,10 \pm 0,56 ^{ab}
Lípidos totales* (g 100 g ⁻¹)	7,48 \pm 0,20 ^e	8,80 \pm 0,26 ^d	10,10 \pm 0,20 ^c	10,24 \pm 0,13 ^c	11,07 \pm 0,03 ^b	11,47 \pm 0,31 ^a	11,30 \pm 0,12 ^{ab}
Carbohidratos* (g 100 g ⁻¹)	1,05 \pm 0,04 ^b	0,95 \pm 0,03 ^{bc}	1,00 \pm 0,04 ^{bc}	0,91 \pm 0,08 ^{cd}	0,81 \pm 0,11 ^d	1,38 \pm 0,05 ^a	0,95 \pm 0,11 ^{bc}
Cenizas** (g 100 g ⁻¹)	9,28 \pm 0,01 ^a	8,63 \pm 0,07 ^{ab}	7,74 \pm 0,30 ^{ab}	7,64 \pm 0,02 ^{ab}	7,84 \pm 0,19 ^{ab}	7,02 \pm 0,24 ^b	6,90 \pm 0,04 ^b
Energía** (kJ g ⁻¹)	21,88 \pm 0,04 ^b	22,46 \pm 0,00 ^{ab}	22,61 \pm 0,04 ^{ab}	22,67 \pm 0,08 ^{ab}	23,38 \pm 0,09 ^a	23,06 \pm 0,15 ^{ab}	23,16 \pm 0,15 ^{ab}

*ANOVA a una vía y prueba a-posteriori LSD. ** Prueba de Kruskal-Wallis y prueba a-posteriori Bonferroni.

Tabla 1 - 7: Análisis de correlación y de determinación entre los componentes nutricionales de *Brachionus plicatilis* y las variables poblacionales de larvas de *Callinectes sapidus*. Coeficiente de correlación de Pearson (r). Coeficiente de determinación (R²), de regresión lineal simple. Significatividad de las pruebas (P-valor), las correlaciones y determinaciones significativas (P ≤ 0,05) van en negrilla y subrayadas. Todas las variables presentaron distribución normal.

Variables poblacionales de <i>C. sapidus</i>	Proteína cruda (g 100 g ⁻¹)			Lípidos totales (g 100 g ⁻¹)			Carbohidratos (g 100 g ⁻¹)			Cenizas (g 100 g ⁻¹)			Energía (kJ g ⁻¹)		
	r	R ² (%)	P-valor	r	R ² (%)	P-valor	r	R ² (%)	P-valor	r	R ² (%)	P-valor	r	R ² (%)	P-valor
	Supervivencia (%)	0,42	17,36	0,35	<u>0,85</u>	<u>73,02</u>	<u>0,01</u>	0,27	7,07	0,56	<u>-0,88</u>	<u>77,16</u>	<u>0,01</u>	<u>0,79</u>	<u>62,47</u>
Duración del ciclo larval (días)	-0,44	19,40	0,32	-0,72	51,38	0,07	-0,04	0,13	0,94	0,65	42,14	0,11	<u>-0,80</u>	<u>63,53</u>	<u>0,03</u>
Megalopas peso (mg)	0,09	0,78	0,85	<u>0,84</u>	<u>71,18</u>	<u>0,02</u>	0,34	11,50	0,46	<u>-0,91</u>	<u>83,58</u>	<u>0,00</u>	0,74	54,26	0,06
Megalopas talla (µm)	-0,16	2,68	0,73	<u>0,83</u>	<u>68,12</u>	<u>0,02</u>	0,16	2,52	0,73	<u>-0,84</u>	<u>70,24</u>	<u>0,02</u>	<u>0,77</u>	<u>59,59</u>	<u>0,04</u>
Megalopas factor de condición (Kn)	0,16	2,70	2,70	<u>0,81</u>	<u>65,64</u>	<u>0,03</u>	0,41	16,55	0,37	<u>-0,91</u>	<u>82,29</u>	<u>0,00</u>	0,68	46,03	0,09

1.5 Discusión

El presente estudio, es uno de los primeros en relacionar el desarrollo larval de *Callinectes sapidus* con la composición nutricional del alimento vivo (*Brachionus plicatilis*), al ser enriquecidos progresivamente con diferentes porcentajes de proteínas y lípidos, usando *Chlorella pyrenoidosa* en polvo - Ch (Holistic Herbal Solutions®) como fuente de proteína, y emulsión de S.presso – Spr (Selco®, Inve Aquaculture), como principal fuente de lípidos. En la mayoría de los casos, a medida que la proporción de Ch disminuye, y la de Spr aumentan (Ch/Spr), las variables poblacionales evaluadas fueron mejores. Los tratamientos 40/60 y 50/50, evidenciaron las mejores respuestas en términos de supervivencia, duración del ciclo larval, variables de crecimiento de las megalopas (MG) y ciclo de muda. Los coeficientes de correlación indicaron que existe una relación entre el contenido nutricional de los lípidos, cenizas y energía de las dietas y el desarrollo larval de la jaiba azul.

1.5.1 Supervivencia y duración del ciclo larval

Tanto la supervivencia como la duración del ciclo larval se vieron influenciados por el tipo de dieta. Los valores finales de supervivencia fluctuaron progresivamente entre 6 al 34 %, de 100/0 hasta 40/60 (Ch/Spr), evidenciando una correlación significativamente fuerte con el contenido de lípidos. Estos porcentajes son similares a los encontrados por otros autores, partiendo de las bajas supervivencias (1-8 %) de Costlow y Bookhout (1959a, 1959 b) al ser los primeros en lograr completar el desarrollo larval de *C. sapidus* hasta MG, hasta los últimos trabajos reportados para la especie (Bacab *et al.*, 2002; Zmora *et al.*, 2005; Stuck *et al.*, 2009; Maurer *et al.*, 2017), oscilando entre el 19 al 64 % (Tabla 1 - 8). Por su parte, la duración del ciclo larval desde la eclosión hasta conseguir el estadio de MG (49-57 días), tiende a ser más largo (> 55 días), en las dietas 100/0 a 70/30, las cuales tienen un contenido significativamente menor de lípidos, y más corto (< 51 días) para el resto de tratamientos (60/40, 50/50 y 40/60). En desarrollos larvales reportados para *C. sapidus* los resultados también son muy variables (Tabla 1 - 8), las primeras MG pueden ser obtenidas desde los 26 días después de la eclosión (Stuck *et al.*, 2009), hasta los 65 (Maurer *et al.*, 2017).

Tabla 1 - 8: Condiciones de cultivo para el levante de larvas de *Callinectes sapidus* en laboratorio. Se incluyen solo los trabajos que lograron completar el desarrollo larval hasta megalopa (MG).

T (°C) ¹	S ²	F (L:O) ³	Dieta	Enriquecimiento	S (%) ⁴	Duración ciclo larval (días)	No. estadios zoea	Mudas a MG ⁵	Referencia
27	30	10:14	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>C. pyrenoidosa</i> (polvo) + S.presso	6-34	49-57	8	5-8	Presente estudio
23-26	23-27	NR ⁶	Larvas de erizo + Nauplios <i>Artemia</i>	NR ¹	1-8	30-39	8	7-8	(Costlow y Bookhout, 1959a)
20-30	10.5-32	12:12	Larvas de erizo + Nauplios <i>Artemia</i>	NR	1-8	31-49	8	7-8	(Costlow y Bookhout, 1959b)
25	30	14:10	Larvas de erizo + Nauplios <i>Artemia</i>	NR	NR	NR	8	6-8	(Costlow, 1965)
25	30	14:10	Combinaciones (7dietas): Protozoos + Rotíferos + Larvas de erizo + Larvas polichaetos + Nauplios <i>Artemia</i>	<i>I. galbana</i> <i>M. lutheri</i> <i>Dunaliella</i> sp. Mezclas	17-29	52	8	7-8	(Sulkin, 1975)
15-19	30	10.25: 17.75	<i>B. plicatilis</i> (Z1-Z2) <i>B. plicatilis</i> + Nauplios <i>Artemia</i> (Z2-MG)	NR	22.5-30	30-53	7	6-7	(Sulkin <i>et al.</i> , 1976)
NR	NR	NR	<i>B. plicatilis</i> + Nauplios <i>Artemia</i> (D1) <i>B. plicatilis</i> + Larvas polichaetos (D2)	NR	D1: 6-50 D2: 35-60	D1:50-58 D2:40-55	8	D1: 7-8 D2: 6-7	(Sulkin, 1978)

T (°C) ¹	S ²	F (L:O) ³	Dieta	Enriquecimiento	S (%) ⁴	Duración ciclo larval (días)	No. estadios zoea	Mudas a MG ⁵	Referencia
24.6-28	27-35	NR	<i>B. plicatilis</i> (Z1-Z5) + Nauplios <i>Artemia</i> (Z5-MG)	<i>T. chui</i>	25	27-35	6	NR	(Bacab <i>et al.</i> , 2002)
22	30	NR	<i>B. plicatilis</i> (Z1-Z8) Nauplios de <i>Artemia</i> (Z3-Z8) <i>Artemia</i> enriquecida (Z5-MG)	<i>I. galbana</i> + <i>Nannochloropsis</i> sp. + <i>T. tetrathele</i> + <i>C. gracilis</i>	30	27	8	-	(Zmora <i>et al.</i> , 2005)
25	30	12:12	<i>B. plicatilis</i> (Z1-Z2) <i>B. plicatilis</i> + Nauplios <i>Artemia</i> (Z2-MG)	NR	18-5-44.5	26-59	9	6-9	(Stuck <i>et al.</i> , 2009)
21-23	30	12:12	<i>B. plicatilis</i> (Z1-Z3) <i>B. plicatilis</i> + Nauplios <i>Artemia</i> (Z4-Z6) Nauplios <i>Artemia</i> (Z6-MG)	<i>Nannochloropsis</i> sp+ levadura	38-64	40.3-65	8	5-8	(Maurer <i>et al.</i> , 2017)

¹ Temperatura. ² Salinidad. ³ Fotoperiodo (luz:oscuridad). ⁴ Supervivencia. ⁵ No. mudas para lograr el estadio de MG. ⁶ No se reporta.

La variabilidad de resultados en la especie obedece a una plasticidad morfológica durante su desarrollo larval, la cual se ve influenciada por la manera en que los individuos interactúan con el medio ambiente (Miner *et al.*, 2005). Poco se sabe a cerca de la variabilidad intra-específica de una población o entre poblaciones separadas de muchos crustáceos decápodos. El conocimiento de la plasticidad fenotípica y la divergencia genética es de suma importancia para entender las adaptaciones evolutivas y especiación (Anger, 2001, 2006). En este caso nos referimos a larvas cultivadas en laboratorio, que provienen de hembras ovadas recolectadas del medio natural, con adaptaciones ecológicas y fisiológicas específicas de la región. En los estudios reportados, la procedencia de las larvas, sumada a factores como temperatura, salinidad, fotoperiodo, tanques de cultivo y dieta suministrada, entre otros, conllevan a diferentes tipos de respuestas en condiciones de cultivo (Tabla 1 - 8).

Los primeros 13 días después de la eclosión (DDE) reflejan el mayor evento de mortalidad durante el desarrollo larval de *C. sapidus*, ocasionando la muerte de por lo menos 43 % de las larvas durante la primera y segunda muda, sin observarse ninguna diferenciación entre los tratamientos. Este mismo comportamiento ha sido reportado para la especie durante los dos a tres primeros estadios de zoea (Z1 a Z3), entre los 6-16 DDE (Costlow y Bookhout, 1959a; Costlow, 1967; Sulkin *et al.*, 1976; Bacab *et al.*, 2002), con porcentajes de mortalidad del 30-95 %. Eventos de mortalidad de este tipo pueden estar asociados a la poca habilidad que las larvas tienen para detectar, capturar y consumir sus presas, ocasionándoles períodos de inanición que pueden ser críticos (Staton y Sulkin, 1991; Gimenez y Anger, 2005; Wu *et al.*, 2017). Cuando este tiempo excede un límite, las larvas pierden su capacidad de recobrase del estrés nutricional y este punto es llamado "Punto de no Retorno" (PNR) (Anger y Dawirs, 1981; Anger, 1987),

Al nacer, en algunas especies de camarones y cangrejos, los nutrientes remanentes del vitelo son suficientes para un período de desarrollo lecitotrófico de unos pocos estadios larvales, pero la mayoría de decápodos requieren alimento desde el momento de la eclosión (Anger, 2001). Cuando las larvas de *C. sapidus* eclosionan, ya han consumido 45-61 % de lípidos y 35-100 % de las proteínas que tenían disponibles inicialmente (Amsler y George, 1984; Li *et al.*, 2012). En este experimento el alimento se suministró 2-3 h

después de su recolección, pero es probable que la eclosión haya ocurrido en la madrugada, como es común en la especie (Epifanio, 2019; Almeida *et al.*, 2021), pudiendo generar períodos de inanición más prolongados, Aunque estudios de este tipo no han sido desarrollados para *C. sapidus*, en otros braquiuros el PNR varía ampliamente (Anger y Dawirs, 1981; Staton y Sulkin, 1991; Gimenez y Anger, 2005; Wu *et al.*, 2006), en especies muy sensibles como *Portunus pelagicus* las primeras zoeas no sobreviven más de 3.87 días (Wu *et al.*, 2017), mientras que *Hyas araneus* puede sobrevivir y desarrollarse aún después de 12 días sin haber consumido alimento (Anger y Dawirs, 1981). Pasado el PNR, aunque la larva sea alimentada, puede sobrevivir por períodos extendidos de tiempo, pero pierde su capacidad de desarrollarse normalmente, y está condenada a morir sin mudar, o después de unas pocas mudas (Anger *et al.*, 1981; Anger, 2001).

Se recomienda una densidad ~ 50 rot. mL⁻¹ para alimentar los primeros seis estadios de zoea de *C. sapidus*, con el fin de que la comida sea abundante y se evite un gasto energético adicional para capturar la presa si la densidad es menor (Maurer *et al.*, 2017). Aunque la cantidad de alimento no pudo ser un factor limitante para la supervivencia, ya que las larvas se alimentaron a saciedad (~ 60 a 100 rot. mL⁻¹), si lo pudo ser su comportamiento de caza. Al inicio de cada ensayo, fue necesario remover muchos rotíferos sobrantes, para poder alimentar con lotes recién enriquecidos, pero después de la tercera muda (M3), su consumo aumentó considerablemente. Se ha observado en los primeros estadios larvales de varios decápodos que las larvas no muestran un verdadero comportamiento de caza, las zoeas baten rápidamente sus maxilípedos para nadar y generar corrientes que le permitan encuentros fortuitos con posibles presas y de esa manera se alimentan (Moller, 1978; Schembri, 1982; Kurmaly *et al.*, 1990; Lee y Meyers, 1997; Epelbaum y Borisov, 2006; Caracappa y Munroe, 2018; Almeida *et al.*, 2021), en estos casos la supervivencia está sujeta en gran medida a una densidad de presa apropiada (Epelbaum y Borisov, 2006).

Mientras que la captura de alimento de las larvas obedece a un encuentro fortuito, la ingestión parece depender de señales químicas. Algunos ensayos en adultos han demostrado que *C. sapidus* es muy sensible a estímulos olfativos que le permiten fácilmente localizar y seleccionar a sus presas (Weissburg y Zimmer-Faust, 1991, 1993,

1994; Keller *et al.*, 2003; Aggio *et al.*, 2012), pero a diferencia de los adultos, las larvas responden a un espectro más amplio de quimio-atrayentes y estimuladores de la alimentación que les permiten explotar posibles nuevos recursos de alimento, las sustancias que generan una reacción particular, son a menudo componentes orgánicos dominantes en el tejido de las presas que usualmente la especie consume (Weissburg y Zimmer-Faust, 1991; Lee y Meyers, 1997; Williams, 2007), en *Macrobrachium rosenbergii* se ha demostrado como las postlarvas utilizan los sentidos visuales, químicos y táctiles para la localización y captura de su alimento (Moller, 1978), sin embargo se requieren estudios específicos con el fin de comprender como estos mecanismos se desarrollan, integran y perfeccionan a lo largo del desarrollo larval de *C. sapidus*.

Todos los factores anteriormente mencionados, afectan la ingesta de alimento de las larvas, especialmente durante las primeras etapas de vida, sometiéndolas a períodos de inanición que podrán ser críticos o no, dependiendo de las reservas energéticas iniciales. Aunque las larvas recién eclosionadas de braquiuros posean algunas habilidades quimiorreceptoras (Weissburg y Zimmer-Faust, 1991), es solo a medida que crecen, que la suma de los mecanismos locomotores, visuales y quimiorreceptores mejorarán frente a estímulos alimenticios (Moller, 1978; Weissburg y Zimmer-Faust, 1993; Waiho *et al.*, 2018), afectando consecuentemente la supervivencia, especialmente durante los primeros DDE como se discutió anteriormente.

1.5.2 Ciclo de muda

Aunque el ciclo de muda se encuentre controlado principalmente por el sistema endocrino desde los primeros estadios larvales y aún desde estadios embrionarios tardíos (McCarthy, 1979; Anger y Spindler, 1987; Chung, 2010; Chang y Mykles, 2011; Snyder y Chang, 2016; Webster y Dirksen, 2016), se ha comprobado que factores externos como temperatura, salinidad, nutrición o química del agua también condicionan su regulación (Anger, 2001). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el ciclo de muda también es influenciado por el contenido nutricional de las dietas, haciéndolo más largo si la dieta es inadecuada (Figura 1 - 11).

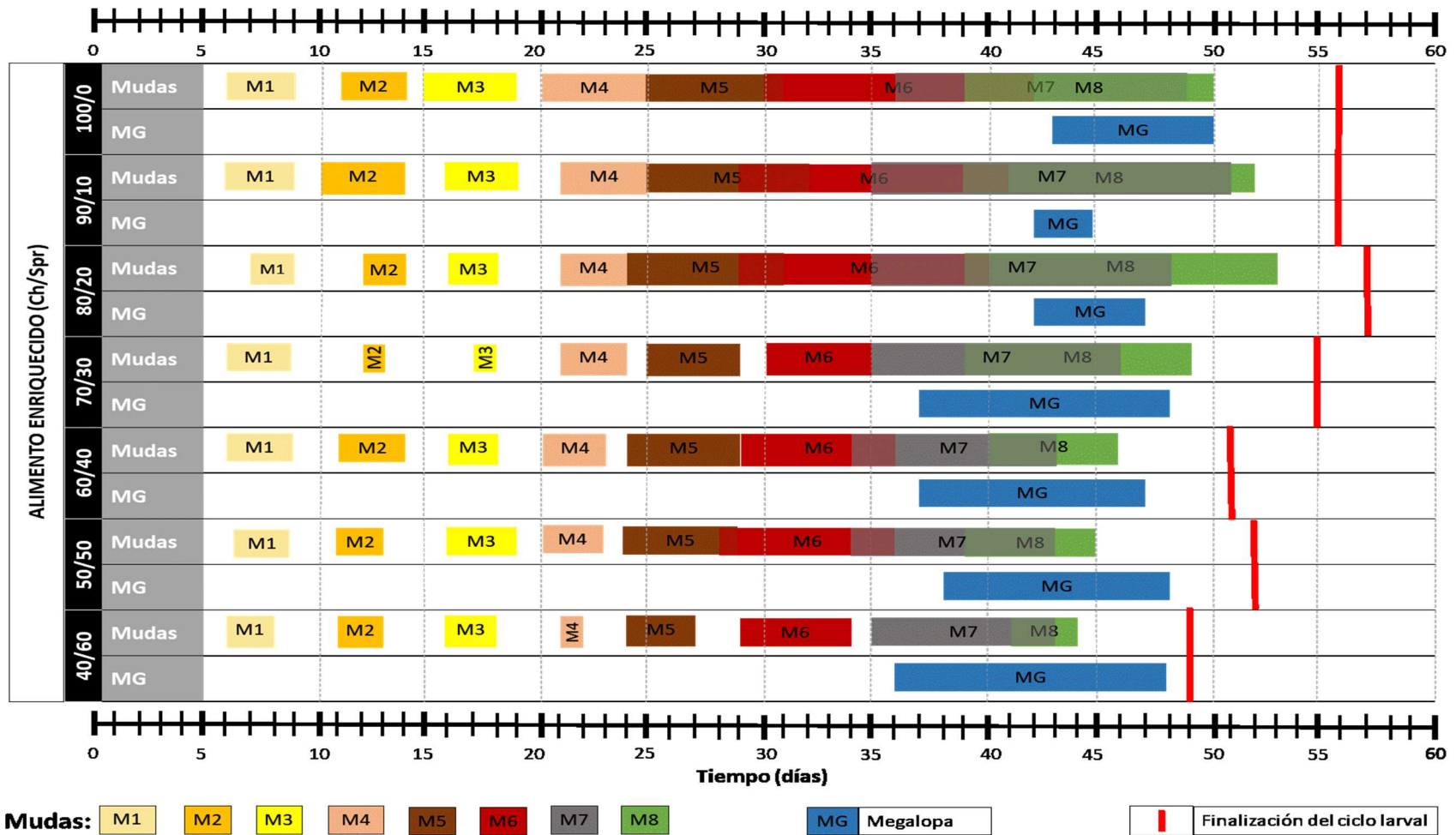


Figura 1 - 11: Línea de tiempo para el ciclo de muda en todos los estadios larvarios de *Callinectes sapidus* al ser alimentadas con rotíferos *Brachionus plicatilis* enriquecidos por 24 h con siete dietas experimentales compuestas por *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) y emulsión de S.presso (Spr), en diferentes proporciones (Ch/Spr). Los valores son expresados como el promedio en días de cuatro nacimientos.

En párrafos anteriores, ya se ha discutido cómo la privación de alimento durante las etapas iniciales puede afectar la supervivencia y el desarrollo de las larvas (PNR). Sin embargo, los efectos de inanición temporales también deben tenerse en cuenta. Desde el período tardío de premuda, las larvas dejan de alimentarse hasta la postmuda temprana, donde no sólo la cutícula de sus apéndices para cazar es muy blanda, sino que también el intestino anterior y molino gástrico son muy suaves para garantizar una maceración eficaz del alimento (Anger, 2001; Lemos y Weissman, 2020). Por ende, la larva solo cuenta con un determinado tiempo entre la postmuda tardía, intermuda y premuda temprana para alimentarse, lo que equivale en varias larvas de decápodos a un tercio o la mitad que dura todo un estadio específico (Anger, 1983, 1987). Durante este período, las larvas deben acumular suficiente materia orgánica o reservas energéticas para alcanzar el Punto de Saturación de la Reserva (PSR), en el cual la larva se vuelve independiente del alimento y puede completar satisfactoriamente el resto de su ciclo de muda (Anger, 1983, 2001; Gore, 1985). El PSR ha sido utilizado como indicador de la vulnerabilidad nutricional en estadios larvales de varias especies de decápodos, incluyendo algunos braquiuros (Anger y Dawirs, 1981; Anger, 1987; Anger y Spindler, 1987), pero no ha sido reportado para larvas de *C. sapidus*.

En este estudio en particular, más del 55 % de las zoeas logró sobrevivir el primer evento de muda (M1), el cual ocurre entre los primeros 7 a 9 DDE. Luego, en mayor o menor medida, los contenidos nutricionales del alimento suministrado le permitieron a *C. sapidus* mudar y pasar por los subsecuentes estadios con pocas pérdidas de larvas hasta M5, como se observa en las gráficas de supervivencia y porcentaje de larvas que pasaron a cada muda. Para que la primera muda se presentara, se pueden suponer dos cosas: 1) Que las larvas aún podrían contener suficientes reservas de vitelo, alcanzando su PSR antes de eclosionar o mudar, como ocurre con otras larvas de decápodos (Gore, 1985; Anger, 1987; Anger y Spindler, 1987), o 2) Que estas iniciaron la alimentación exógena a tiempo, sobrepasando exitosamente su PNR. Para lograr las subsiguientes mudas (M2 a MG), necesariamente tuvieron que depender de la disponibilidad de nutrientes ofrecidos en las dietas, y como la cantidad de rotíferos no fue una limitante, dicha dependencia estuvo directamente relacionada con la calidad nutricional del alimento suministrado.

Entre M1 y M4, los intervalos de tiempo entre las zoeas que presentaron una misma muda, en un mismo tratamiento, no fueron mayores de cinco días; de allí en adelante, los rangos incrementaron paulatinamente, y fueron mucho más amplios entre las dietas 100/0 a 70/30, en comparación con el resto. Consecuentemente el desarrollo de las larvas se retrasó y la diferenciación entre los tratamientos se hizo mucho más marcada (Figura 1 - 11). A pesar de que son pocos los estudios que reportan y discuten el comportamiento de las líneas de tiempo durante el ciclo de muda de *C. sapidus*, los autores también reportan cómo los rangos de muda se van ampliando después de M3 o M4, ocasionando como en el presente estudio, que las últimas mudas se presenten en intervalos de tiempo mayores, aún bajo las mismas condiciones de cultivo (Costlow y Bookhout, 1959b; Costlow, 1965; Sulkin, 1978).

La captación y acumulación de energía y nutrientes esenciales como esteroides, ácidos grasos poliinsaturados (HUFA) y proteínas del alimento suministrado son factores que interactúan con la regulación endocrina del ciclo larval de muda en varias especies de crustáceos (Anger, 1983, 1987; Anger y Spindler, 1987; Nghia *et al.*, 2007; Williams, 2007). En larvas de *Hyas araneus*, *Carcinus maenas* y otros decápodos, se han observado retrasos en la fase de intermuda al someterlas a diferentes períodos de inanición, lo cual implica un retraso en la producción de la hormona de la muda y la ocurrencia de la apólisis tegumentaria (etapa D₀), tomándoles más tiempo igualar la misma biomasa y reservas necesarias para el PSR, que a las larvas que fueron alimentadas continuamente (Dawirs, 1984; Anger, 1987; Anger y Spindler, 1987).

Durante los ayunos temporales que las larvas normalmente sobrellevan en cada ciclo de muda, las células B (*blisterlike*) absorben los nutrientes descargados por las células R (*resorptive*) en el hepatopáncreas para poder mantener al organismo, ocasionando que el peso total de este órgano disminuya notablemente (Ceccaldi, 1997; Jones *et al.*, 1997b; Anger, 2001), y estas pérdidas orgánicas e inorgánicas solo pueden suplirse durante el período de tiempo en el que las larvas se alimentan (Gore, 1985; Anger, 2001). Entonces, si los nutrientes suministrados no son los requeridos, o no poseen la concentración adecuada, las larvas necesitarán mayor tiempo para reponer la biomasa perdida y lograr el umbral para suplir sus reservas energéticas e iniciar el ciclo de muda. Si esa condición se mantiene como ocurrió en esta investigación, a medida que pase el tiempo se originarán mayores retrasos. La respuesta a factores extrínsecos del ciclo de

muda opera a una escala temporal, y la tasa de plasticidad depende no sólo de la influencia que el factor tenga como tal, sino también del tiempo de manifestación del fenotipo inducido y la duración bajo ese cambio ambiental provocado (Anger, 2001; Torres *et al.*, 2019; Daly *et al.*, 2020). Sin embargo, se requieren estudios con esta y otras especies de braquiuros, para elucidar la interrelación nutrición, crecimiento, desarrollo y regulación hormonal del ciclo de muda.

1.5.3 Obtención de megalopas (MG)

Aunque el desarrollo ontogénico de los crustáceos esté genéticamente determinado, varias especies de decápodos en el medio natural y en laboratorio, exhiben algún grado de plasticidad durante su desarrollo larval mediante la adición u omisión de estadios (Maurer *et al.*, 2017), especialmente en Carideos (Oliphant y Thatje, 2013) y algunos braquiuros que presentan numerosos estadios larvales de zoea, como *Callinectes sapidus* (Costlow, 1965) *Metasesarma rubripes* (Montu *et al.*, 1990), *Eriocheir sinensis* (Montú *et al.*, 1996; Sui *et al.*, 2008), o *Portunus pelagicus* (Sugumar *et al.*, 2013). La plasticidad, en el caso particular de esta investigación, está asociada al número de zoeas resultantes después de cada evento de muda, ya que no se realizaron descripciones morfológicas para definir cada estadio. La ecdisis es utilizada para definir estadios larvales sucesivos en crustáceos, debido a que después de las mudas generalmente exhiben un incremento en la complejidad locomotora, talla y el desarrollo de sus apéndices alimentarios; sin embargo en algunos casos, la muda no está asociada con cambios morfológicos significativos y algunas veces ni siquiera con incremento en la talla (Costlow, 1965; Anger, 2001; Moller *et al.*, 2020).

Durante el desarrollo larval de *C. sapidus* se presentaron hasta ocho estadios de zoea, y la metamorfosis a MG ocurrió entre la quinta y la octava muda (M5 a M8). En los tratamientos con mayores contenidos de lípidos (60/40, 50/50 y 40/60), se obtuvieron MG a partir de M5, aunque en muy bajos porcentajes ($\leq 1,4$ %), esta aparición temprana de MG también fue reportada por Maurer *et al.*, (2017), pero en un mayor porcentaje (10 a 40 %). Los estudios realizados para la especie describen de 6 a 9 estadios de zoea y entre 5 a 9 mudas para llegar a MG, siendo más frecuente la obtención de MG entre M7 y M8, al igual que en el presente estudio (Tabla 1 - 8).

En individuos débiles o expuestos a condiciones desfavorables, la ecdisis es un punto crítico en el desarrollo de larvas de decápodos y otros artrópodos. La mortalidad se incrementa dramáticamente al momento de aproximarse la muda como un típico pero inespecífico síndrome de estrés donde muchas larvas no logran expulsar la exuvia completa, estos individuos "lisiados" mueren más tarde por no comer, nadar y crecer normalmente (Anger, 2001), y este punto crítico se denomina "umbral de exuviación" (Anger, 1987). En el presente estudio, esta situación fue especialmente frecuente durante la transición de zoea a MG, donde entre el 22 al 55 % de larvas murieron durante su proceso de muda en los tratamientos 100/0 a 60/40, mientras que en las dietas con mayor inserción de Spr (50/50 y 40/60), los porcentajes fueron mucho más bajos (11 y 7 % respectivamente). Este fenómeno fue reportado previamente para la especie por Costlow y Bookhout (1959a), y Sulkin (1978) cuando las larvas mudaron de Z8 a MG, aunque dichos autores utilizaron protocolos de alimentación y enriquecimiento diferentes al del presente estudio. En el cultivo de otros braquiuros como *Ucides cordatus* (da Silva *et al.*, 2012), *Portunus trituberculatus* (Dan *et al.*, 2015), y las especies del género *Scylla* (Dan y Hamasaki, 2011; Syafaat *et al.*, 2021), este fenómeno es común durante el cultivo bajo condiciones controladas, y se reconoce como "síndrome de muerte por muda (SMM)" durante la transición del último estadio de zoea a MG, o de MG a juvenil.

Las variables peso, talla, y factor de condición (Kn), también revelaron una correlación positiva con el contenido de lípidos y energía. En *C. sapidus*, la transición de la fase pelágica a la bentónica, además de todos los cambios morfológicos y fisiológicos asociados al cambio de hábitat (Jones *et al.*, 1997b; Gebauer *et al.*, 2003, 2020), se ve influenciado por un efecto acumulativo del componente nutricional. De acuerdo con los ANOVAS, el peso y Kn parecen ser mejores indicadores de la respuesta al efecto de las dietas. Los pocos reportes en talla revelan que las MG cultivadas en condiciones de laboratorio provenientes del Caribe colombiano, tienden a ser más pequeñas que las cultivadas en otras latitudes, y aunque los rangos en talla obtenidos directamente del plancton tienden a ser los más bajos (Stuck *et al.*, 2009), esto puede estar condicionado por la afectación directa de las estaciones climáticas entre primavera verano y otoño, y la disponibilidad de alimento en el medio natural (Tabla 1 - 9). El efecto de variación en el ambiente interactúa con el desarrollo y los procesos fisiológicos para determinar un fenotipo específico de un organismo (Giménez, 2006).

Cada dieta produjo una respuesta fisiológica específica, que afectó el crecimiento de los organismos (tanto en longitud como en peso), conjugados finalmente en Kn, el cual puede ser usado como un indicador de la salud. En este caso fue evidente que los mejores índices coincidieron con la mayor inclusión de Spr (40/60 y 50/50); los cuales además mostraron las mayores supervivencias y pesos promedio.

Algunos estudios resaltan el efecto que tienen las condiciones ambientales primarias en el desarrollo, fenotipo, desempeño y supervivencia de crustáceos y bivalvos. Estas inician a partir de la distribución de reservas por parte de la hembra en sus huevos, la eclosión de las larvas y su metamorfosis a la fase juvenil. Condiciones deficientes en los embriones o larvas pueden correlacionarse positiva o negativamente con la talla, biomasa y supervivencia de los juveniles, es decir los enlaces fenotípicos conllevan a efectos en las cohortes que a su vez afectan la dinámica poblacional (Gebauer *et al.*, 1999, 2003; Giménez y Anger, 2001; Phillips, 2002, 2004; Giménez, 2003, 2006, 2010; Torres y Giménez, 2020; Paran *et al.*, 2022). El factor de condición de Le Creen (Le Cren, 1951) ha sido usado en pocas especies de braquiuros (Amaro y Fiscarelli, 2009; Fassatoui *et al.*, 2021), y los estudios se centran en adultos, relacionando el peso con el ancho del caparazón o su longitud total, sexos y estaciones, pero no hay reportes para larvas. Se ha propuesto que este tipo de medidas morfométricas, sumadas a alguna medición del contenido de lípidos, puede usarse como primer paso para evaluar la disponibilidad de reservas energéticas de los organismos estudiados (Lloret *et al.*, 2013), y en nuestro caso reflejan como los valores de Kn van cambiando de acuerdo a la presencia de lípidos de las dietas.

Tabla 1 - 9. Rango de tallas en megalopas de *Callinectes sapidus* cultivadas en diferentes áreas geográficas, y estaciones climáticas.

Referencia	Zona geográfica	Dieta	Enriquecimiento	Época de recolección	Obtención de larvas	T (°C) ³	S ⁴	MG ⁵ (mm)
Presente estudio	Caribe Colombiano (CGSM ¹)	<i>B. plicatilis</i>	<i>C. pyrenoidosa</i> (polvo) + S.presso (siete dietas)	Todo el año	Eclosionan en laboratorio	27	30	2,632 – 2,927 (2,82)
(Bookhout y Costlow, 1977)	Atlántico norte (Carolina del Norte)	Larvas erizo + Nauplios <i>Artemia</i>	NR ²	NR	Eclosionan en laboratorio	22-25	30	(2,977)
(Stuck <i>et al.</i> , 2009)	Norte Golfo de México (Mississippi Sound y Dog Keys Pass)	<i>B. plicatilis</i> (Z1-Z2) <i>B. plicatilis</i> + Nauplios <i>Artemia</i> (Z2-MG)	NR	Primavera	Eclosionan en laboratorio	25 y >16	30	2,750 – 3,600 (3,270)
				Verano - Otoño	Eclosionan en laboratorio	25 y <30	30	2,620 – 3,800 (3,340)
				Primavera	Megalopas silvestres	NR	NR	2,060 – 2,240 (2,160)
				Otoño	Megalopas silvestres	NR	NR	1,820 – 1,960 (1,890)

¹ Ciénaga Grande de Santa Marta, Magdalena. ² No se reporta. ³ Temperatura. ⁴ Salinidad. ⁵ Rango de longitud total y promedio entre paréntesis.

1.5.4 Composición nutricional de las larvas, el alimento vivo enriquecido y su correlación con las variables poblacionales de *C. sapidus*

El éxito reproductivo y la supervivencia de las larvas son un proceso complejo que puede variar dependiendo de la zona geográfica, época climática y respuesta de las hembras a las fluctuaciones ambientales y disponibilidad de alimento al momento de producir los huevos (Giménez y Anger, 2001; Giménez, 2006; Alava *et al.*, 2007; Moran y McAlister, 2009; Belgrad y Griffen, 2016). La composición bioquímica de los cuatro lotes de larvas usados, revelaron altos contenidos de proteína ($\geq 50 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), pero niveles de lípidos muy variables ($1,49 \text{ a } 7,72 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). Aunque un alto contenido de lípidos indica que las larvas de crustáceos recién eclosionadas pueden contar con suficientes reservas que podrían permitirle sobrevivir períodos más largos de inanición antes de recibir su primera alimentación (Anger y Dawirs, 1981; Nates y McKenney, 2000; Wu *et al.*, 2017), no se observó algún tipo de relación entre estos valores y la supervivencia en los nacimientos que presentaron concentraciones de lípidos más altas con respecto a las más bajas, Li *et al.* (2012) reportan contenidos de $1,11 \pm 0,22 \%$ en larvas recién eclosionadas de la especie, similares a los encontrados en algunos de los lotes estudiados.

Los contenidos de cenizas de las larvas de *C. sapidus* no son comparables, ya que hasta el momento no hay literatura relacionada con este tema para la especie, pero el porcentaje promedio (27,28 %) es similar a lo reportado para los cangrejos *Maja brachydactyla* y *M. squinado* (20 a 30 %). En estas especies, los niveles tienden a mantenerse relativamente estables hasta el estadio de MG, y posteriormente la concentración tienden a casi duplicarse en el primer estadio juvenil (Andrés *et al.*, 2008; Rotllant *et al.*, 2014), indicando la mineralización del exoesqueleto (Codabaccus *et al.*, 2020). En larvas de crustáceos el sistema tegumentario es más delgado que en juveniles y adultos pero tiene básicamente la misma estructura; la endocutícula de los decápodos en la fase planctónica es generalmente desmineralizada y mucho más delgada que en los juveniles y adultos bentónicos (Christiansen y Costlow, 1982; Dendinger y Alterman, 1983; Skinner *et al.*, 1992; Kumari y Skinner, 1993; Anger, 2001; Azra *et al.*, 2019). La variación en los valores de cenizas presentes en este estudio (26,54 %), están relacionados directamente con el incremento o decrecimiento proporcional de los contenidos de otros nutrientes como las

proteínas y lípidos de cada lote, pero en conjunto aportan información referencial sobre el contenido bioquímico de las larvas de *C. sapidus* al momento de nacer y antes de iniciar su alimentación exógena.

La mayoría de crustáceos que se cultivan requieren alimento vivo durante sus primeras etapas larvales. No aceptan dietas artificiales que permitirían conocer de manera más sencilla sus requerimientos nutricionales, entendiendo este término como el óptimo nivel de un nutriente determinado que generalmente está asociado con la obtención de un mejor crecimiento y supervivencia (Guillaume, 1997). En el cultivo de camarones el uso de dietas artificiales desde la fase postlarval y juveniles ha sido extensamente estudiado, con muy buenos resultados (Lavens y Sorgeloos, 2000; Brito *et al.*, 2001; Pedroza-Islas *et al.*, 2004; Arias-Moscoso *et al.*, 2016; Aaqillah-Amr *et al.*, 2021; Calado *et al.*, 2022). Por el contrario, en algunas especies de braquiuros, se ha intentado reemplazar el alimento vivo con microdietas (MD) de formulación conocida, sin obtener buenos resultados en la supervivencia de las zoeas, por ello la mayoría de trabajos con MD inician a partir de la fase MG (Genodepa *et al.*, 2004; Holme *et al.*, 2007, 2009), y es por ello que el suministro de nutrientes debe hacerse mediante su encapsulamiento en el alimento vivo.

El protocolo de alimentación para el levante de *C. sapidus* desde la primera zoea (Z1) hasta megalopa (MG), sugiere un régimen de suministro progresivo entre rotíferos (*Brachionnus*), nauplios de *Artemia* y *Artemia* enriquecida, acompañados con el uso de microalgas (*Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis tetrahele*, y *Chaetoceros gracilis*) para crear un efecto de “agua verde” (Sulkin, 1975, 1978; Zmora *et al.*, 2005; Stuck *et al.*, 2009; Maurer *et al.*, 2017). En ensayos preliminares durante este estudio, los nauplios de *Artemia* (422 a 515 μm) no fueron capturados e ingeridos por las larvas de *C. sapidus*, incluso la caza se dificultó en los últimos estadios de zoea, y solo fueron capaces de capturar eficazmente y consumir rotíferos de diferentes tamaños (<120 a >200 μm), lo que impidió implementar los protocolos usuales de alimentación para la especie. Otros resultados obtenidos en laboratorio (*trabajo en preparación*), revelan que la longitud total entre los estadios de zoeas Z1 a Z8 va de 0,711 a 2,584 mm, tallas más pequeñas que las reportadas para la especie por Bookhout y Costlow (1977) para estos mismos estadios (1,013 a 3,091 mm), y Stuck *et al.* (2009) entre Z1 a Z7 (1,19 a 2,99 en primavera, y 0,94 a 3,06 mm en verano/otoño). Se ha observado en *C. sapidus* que no

existe ninguna indicación de que la talla de la hembra se pueda asociar con ninguna medida en la calidad de los huevos o la talla de las zoeas, ni siquiera la calidad de los huevos puede predecir el tamaño de las zoeas (Koopman y Siders, 2013), lo cual difiere con otros crustáceos como las langostas y otras especies de cangrejos donde existe una correlación positiva entre estas variables (Fischer *et al.*, 2009; Belgrad y Griffen, 2016).

En condiciones naturales, el tamaño de la larva determina su posición trófica en la cadena alimentaria, y las zoeas cambian de nivel trófico durante su desarrollo ontogénico (McConaughy, 1985; Le Vay *et al.*, 2001). Sulkin y Epifanio (1975) y Sulkin (1978), recomiendan suministrar un tamaño de presa $\leq 110 \mu\text{m}$ para estadios tempranos de zoeas de *C. sapidus*, y nauplios de *Artemia* después de 22 DDE, ya que aún a los 15 DDE hay larvas muy pequeñas. En *C. similis* el pequeño tamaño de las larvas tampoco les permitió consumir nauplios de *Artemia* enteros, sino pequeñas partes, logrando completar su desarrollo a MG debido a los embriones de erizo proporcionados (Bookhout y Costlow, 1977). Recientemente, en intentos de cultivo de *C. danae* manejando los protocolos usuales de alimentación (rotíferos (R), nauplios de *Artemia* (A) y R+A, no se logró sobrepasar Z3 en el cultivo, debido a la disparidad entre las larvas ($\sim 0,40 \text{ mm}$ en Z1), y el tamaño de presa proporcionado (Guarizo *et al.*, 2020). Antes de que los requerimientos nutricionales de una dieta puedan ser evaluados completamente, el comportamiento y proceso mecánico durante la alimentación larvaria debe revisarse (Jones *et al.*, 1997b; Waiho *et al.*, 2018)

Los rotíferos al ser mantenidos en cultivos de fitoplancton o con enriquecedores comerciales, varían su composición química, afectando a su vez la calidad nutricional que se proporciona a las larvas que los consumen (Frolov *et al.*, 1991; Abu-Rezq *et al.*, 2002; Dan y Koiso, 2008; Garcia *et al.*, 2008). La concentración de lípidos suministrada con las diferentes dietas estuvo entre 7,48 y 11,47 %, dentro del rango usado en el cultivo larval de varias especies de braquiuros de los géneros *Scylla* y *Portunus* (6,8 - 16 %), en donde demostraron que dietas desbalanceadas en la concentración de HUFA conllevan a bajas supervivencias y alta incidencia del SMM (Takeuchi *et al.*, 1999; Hamasaki *et al.*, 2002; Suprayudi *et al.*, 2002, 2004; Nghia *et al.*, 2007; Dan y Hamasaki, 2011; Wu *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2019). De acuerdo con la tabla nutricional, el S.presso - Spr (INVE® Aquaculture) provee 15 g 100 g⁻¹ de n-3 HUFA, y 9 de DHA/EPA en peso seco

(INVE-Aquaculture TC-SPRESSO-EN-0212), y se sabe por otros estudios que *B. plicatilis* al ser enriquecido a una densidad de 1000 rot. mL⁻¹, con una ración de 350 mg L⁻¹ de Spr por 12 h, presenta una concentración de DHA/EPA de 4.36±0.23 (Fu *et al.*, 2021). Entonces, al presentarse una correlación positiva y significativa (≥ 81 %) entre los lípidos y los indicadores de supervivencia, peso (mg), talla (µm) y Kn de MG, se puede asumir que a medida que la concentración de lípidos aumentó en las dietas suministradas, las concentraciones de n-3 HUFA y DHA/EPA también lo hicieron, siendo 50/50 y 40/60 las dietas que siempre presentaron mejores respuestas en todas las variables estudiadas, e indicando que un enriquecimiento de 24 h, a una tasa de alimentación de 0,5 g x 10⁶ rot., con inserciones entre 50 a 60 % de Spr, producirán rotíferos con niveles de lípidos entre 11,30 y 11,47 %, con una baja incidencia de SMM en las MG, y mayor sincronía del ciclo de muda, especialmente en el tratamiento 40/60. Estudios previos indicaron que el enriquecimiento por 24 h, maximiza la incorporación efectiva de lípidos en los tejidos de los rotíferos, manteniendo los niveles estables hasta un día después de haber sido alimentados (Rodríguez *et al.*, 1989, 1996; Li y Olsen, 2015).

En rotíferos enriquecidos con la emulsión EPA28® (Nippon Kagaku Shiryō Co., LTD, Japan), se recomiendan niveles de inserción de 20 a 40 µL L⁻¹ para proporcionar de 15,4 a 16,2 % de lípidos, con niveles n-3 HUFA entre 0,9 a 1,7 % como óptimos para el desarrollo larval de *P. trituberculatus* (Takeuchi *et al.*, 1999); mientras que en *S. serrata*, inclusiones de 10 a 20 µL L⁻¹ del mismo producto, proveen concentraciones de lípidos entre 19,6 a 20,3 %, y n-3 HUFA óptimos entre 0,5 a 0,8 %, niveles mayores en la dieta (40 y 80 µL L⁻¹), producen 1,3 y 3,2 % de n-3 HUFA, que conllevan a altas incidencias de SMM en las MG (Suprayudi *et al.*, 2002). En resumen, aun utilizando un mismo enriquecedor, las concentraciones de inserción recomendadas en la dieta de lípidos, así como los niveles de n-3 HUFA óptimos difieren entre especies. En esta investigación, inclusiones del 50 y 60 % de Spr en la dieta de rotíferos, produjeron las mejores respuestas durante el desarrollo larval *C. sapidus*. Sin embargo, el contenido de lípidos suministrado no superó el 11,5 %, un poco bajo comparado con lo suministrado a los braquiuros anteriormente mencionados. Esta concentración habría podido incrementarse mucho más (> 20 %), si hubiesen podido alimentarse con *Artemia*, que se sabe que promueve e incrementa los niveles de lípidos en larvas de *M. brachydactyla* (Andrés *et al.*, 2007, 2010a) y *S. serrata* (Suprayudi *et al.*, 2004), y se usa regularmente en el protocolo de alimentación de *C. sapidus* en muchos de

sus estudios (Tabla 1 - 8). En condiciones de cultivo, algunos braquiuros (*Scylla* y *Portunus*), pueden alimentarse únicamente con rotíferos, nauplios de *Artemia*, o una combinación de ambas presas (Baylon *et al.*, 2004; Ruscoe *et al.*, 2004; Redzuari *et al.*, 2012), pero se recomienda combinar varios tipos de alimento vivo para obtener mejores resultados (Baylon, 2009; Waiho *et al.*, 2018; Guarizo *et al.*, 2020). Es probable que el nivel óptimo de inserción no se haya alcanzado en este estudio, y sea necesario suministrar concentraciones mayores de Spr, determinando por lo menos el contenido de n-3 HUFA aportado por los rotíferos, para dilucidar más a fondo los requerimientos nutricionales de la especie.

En decápodos la concentración proteica en dietas formuladas varía entre 30 al 80%, dependiendo de la especie, estadio larval, fuente alimenticia suministrada y digestibilidad de su perfil de aminoácidos - AA (Hewitt, 1992; Jones *et al.*, 1997b; Le Vay *et al.*, 2001; Mente *et al.*, 2002; Holme *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2019; Jeffs y O'Rorke, 2020). La concentración de proteína proporcionada por el polvo de *Chlorella* pyrenoidosa - Ch (Holistic Herbal Solutions®) fue alta (63,93 - 67,50 %), sin importar si el nivel de inserción en la dieta de los rotíferos fue alto (100/0), o bajo (40/60). Al parecer el contenido de proteína, a diferencia de los lípidos, no fue un factor limitante en las dietas, al no presentarse una correlación alta ni significativa entre su contenido y los parámetros poblacionales de *C. sapidus*, (≤ 42 %). En otros estudios, los rotíferos alimentados con Ch aportaron un amplio rango de proteínas (27,6 - 67,3 %) y lípidos (9,5 - 12 %), con condiciones de cultivo, procesos de preparación, y tiempos de enriquecimiento muy variados (Park y Brown, 2004; Hamre *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2008; Dan y Hamasaki, 2011; Hamre, 2016; Waqalevu *et al.*, 2019), para ser comparables con este estudio. En el cultivo de larvas marinas de peces y crustáceos que usan la *Chlorella*, el enriquecimiento de las dietas usualmente se complementa con productos ricos en DHA y EPA para suplir las necesidades de n-3 HUFA (Hamasaki *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2008; Taufik *et al.*, 2016; Waqalevu *et al.*, 2019), al igual que procedió en esta investigación.

Se ha comprobado que la nutrición afecta el perfil de AA de algunas especie planctónicas de crustáceos (Brucet *et al.*, 2005). En *C. sapidus*, *M. brachydactyla* y *P. trituberculatus* los niveles de la mayoría de AA tienden a aumentar durante los primeros estadios de zoea, y bajan dramáticamente de la última zoea a MG (Tucker y Costlow, 1975; Andrés *et al.*,

2010a; Shi *et al.*, 2019). Consecuentemente, dietas con una alta digestibilidad de proteínas permiten una mayor supervivencia a través de la fase larval a juvenil (Anger, 2001; Carter y Mente, 2014; Shi *et al.*, 2019). En vista de que no fue claro el papel desempeñado por la Ch en las dietas, es probable que otros estudios puedan profundizar en la absorción metabolismo y función de sus AA en la nutrición, ya que son pocos los estudios de este tipo en crustáceos y mucho más en estadios larvales (Carter y Mente, 2014; Li *et al.*, 2021).

Resultados obtenidos en estudios anteriores con larvas de *C. sapidus* y *Scylla tranquebarica* demostraron que una dieta basada exclusivamente en *B. plicatilis* no es suficiente para sostener el desarrollo a MG (Sulkin, 1975, 1978; Sulkin *et al.*, 1976; Baylon, 2009); sin embargo, en este estudio, aún con la dieta 100/0 la cual tuvo el porcentaje más bajo de lípidos (7.48 %), el 8,7 % de las larvas alcanzaron el estadio de MG. Esto fue contrario a lo reportado por el estudio de Sulkin (1975), donde el contenido de lípidos de los rotíferos al ser enriquecidos con *Dunaliella* sp. fue similar (8 - 9 %), pero las larvas no sobrepasaron Z7, aunque en estos ensayos las fuentes de lípidos no son las mismas. También se debe tener en cuenta que hay un fuerte relación entre la proteína y la energía de las dietas (Carter y Mente, 2014), y aunque contengan mucho menos energía que los lípidos (Anger y Spindler, 1987), es probable que en las dietas con bajos contenidos de lípidos se haya utilizado la alta concentración de proteína suministrada por la Ch como fuente principal de energía, permitiendo completar el desarrollo larval.

El uso de los carbohidratos por los organismos acuáticos es relativamente bajo en comparación con los terrestres y pocos estudios examinan su metabolismo y nutrición en crustáceos (Wang *et al.*, 2016; Rodríguez-Viera *et al.*, 2021). Su inclusión en las dietas entre 20 a 30 % no afectan el crecimiento y disminuyen los costos en el cultivo de camarones juveniles y adultos (Kurmaly *et al.*, 1989; Shiau y Peng, 1992; Cruz-Suárez *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2016). Se almacenan en el hepatopáncreas en forma de glicógeno, se liberan como glucosa en la hemolinfa para suplir las demandas energéticas, y su regulación es controlada por la hormona hiper-glucémica (Sánchez-Paz *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2016; Lemos y Weissman, 2020). Aunque variaciones ontogénicas en la actividad enzimática de larvas de varios crustáceos indican el uso de fuentes de carbohidratos en las dietas (Le Moullac y Van Wormhoudt, 1994; Genodepa *et al.*, 2022a), es poca la información sobre sus requerimientos en estadios larvales de crustáceos, y los estudios se

enfocan principalmente en camarones y otros pocos en langostas y MG de *Scylla serrata*, (Pedroza-Islas *et al.*, 2004; Fiore y Tlusty, 2005; Holme *et al.*, 2009; Waiho *et al.*, 2018). La habilidad para usar carbohidratos dietéticos varía entre especies, así como entre las tallas y estadios de desarrollo. En *P. trituberculatus* se observó un aumento en la producción de algunos metabolitos relacionados con la energía como glucosa en los primeros estadios de zoeas, los cuales disminuyeron notablemente en MG y volvieron a incrementarse en el primer estadio de cangrejo. lo que indica cambios significativos en la actividad de la glicólisis durante el desarrollo larval (Shi *et al.*, 2019). Productos a base de *Chlorella vulgaris* usados en acuicultura presentan concentraciones de 0,047 g 100 g⁻¹ (Alagawany *et al.*, 2021). Los contenidos en las dietas evaluadas en este estudio fueron variados (0,81 a 1,38 g 100 g⁻¹), sin encontrar correlación significativa entre su concentración y los parámetros poblacionales. Este será un aspecto que requerirá mayor estudio, aunque ya en juveniles de *C. sapidus* se ha demostrado que los niveles de glucosa y trehalosa aumentan en hemolinfa y hepatopáncreas después de consumir alimentos (Chung, 2020).

Los contenidos de cenizas se relacionaron negativa y significativamente con los parámetros poblacionales evaluados a excepción de la duración del ciclo larval. Concentraciones entre 6,90 g 100 g⁻¹ en 40/60, a 9,28 g 100 g⁻¹ en 100/0, son similares a las reportadas en otros trabajos al ser enriquecidos con nanoplancton natural, levadura y otras microalgas en diferentes fases de crecimiento (Carić *et al.*, 1993) Los elementos traza (micronutrientes) y minerales se requieren como cofactores enzimáticos en muchas funciones metabólicas, minerales como calcio, magnesio, sodio, potasio y cloruro y elementos traza usualmente son tomados del agua a través del epitelio de la cámara branquial e intestinos o reabsorción del esqueleto (Anger, 2001; Mugnier y Justou, 2004; Codabaccus *et al.*, 2020; Lemos y Weissman, 2020). En cultivos de camarones el control del contenido de minerales en los estanques es uno de los factores claves para promover procesos de muda exitosos. Después de mudas masivas, algunos minerales pueden disminuir significativamente en el agua, y deben ir acompañados del monitoreo de la alcalinidad y el pH (Prangnell y Fotedar, 2005; Lemos y Weissman, 2020; Truong *et al.*, 2020).

De manera complementaria, una correlación negativa (-80 %) y significativa entre la duración del ciclo larval y el contenido energético de las dietas, está relacionada con las líneas de tiempo en el ciclo de muda en cada tratamiento (Figura 1 - 11). La acumulación de reservas y su conversión a energía a partir del alimento es otro factor que interactúa con la regulación endocrina del ciclo de muda (Anger, 1987). Estos eventos representan el uso de macromoléculas como combustible, y a medida que los rangos de tiempo entre cada muda son mayores, se afecta toda la estrategia de asignación de energía del animal, implicando un mayor consumo de oxígeno y de energía (Kibria, 1993; Bonilla-Gómez *et al.*, 2013). Es por ello que se hace evidente la importancia del suministro dietético adecuado de lípidos (reservas energéticas, hormonas), proteínas (constructoras del músculo y caparazón, enzimas digestivas y hormonas), carbohidratos (glucosa, circulación de energía, síntesis de quitina), y minerales (calcio, magnesio y fósforo para el exoexqueleto, y cobre para la hemocianina) en el proceso de muda (Lemos y Weissman, 2020). Aunque el presente estudio solo muestra las bases preliminares sobre el contenido nutricional del alimento enriquecido, sí establece los cimientos básicos para el establecimiento de dietas formuladas de composición bioquímica conocida, como suministro para el enriquecimiento del alimento vivo que debe ser entregado a las larvas de *C. sapidus* con el fin de optimizar y parametrizar la respuesta productiva. También puede ser usado como base para estudios en otras especies de crustáceos con características similares a *C. sapidus*.

A pesar de que en los últimos años se han obtenido buenas supervivencias en larvas de *C. sapidus* cultivadas en laboratorio, el enriquecimiento del alimento vivo suministrado es muy variado, y la composición nutricional de las presas vivas no están relacionadas directamente con su efecto en el cultivo. Este es uno de los primeros reportes que se enfocan en el entendimiento integral y cuantitativo de la nutrición de las larvas de jaiba azul mediante el enriquecimiento escalonado de rotíferos con siete niveles de enriquecimiento Ch/Spr (100/0 a 40/60). La evidencia indicó que su enriquecimiento por 24 h, mejora la composición nutricional de *B. plicatilis*, y afecta de manera significativa el desarrollo larval de *C. sapidus* en términos de supervivencia, crecimiento y ciclo de muda.

2. CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA COMPARATIVA DEL EFECTO DE LA DIETA EN EL DESARROLLO LARVAL TEMPRANO DE LA JAIBA AZUL *Callinectes sapidus*

2.1 Resumen

Desde el momento de la eclosión, las larvas de *Callinectes sapidus* inician su transición a la alimentación exógena, pero al parecer durante sus estadios tempranos de zoea cuentan con un sistema digestivo sencillo y poco desarrollado, donde los nutrientes suministrados afectan y modelan el desempeño de su digestión. Mediante el secuenciamiento por *RNA-seq*, se realizó el primer análisis comparativo, entre el primer y segundo estadio de zoea, para observar el efecto del alimento vivo enriquecido (rotífero *Brachionus plicatilis*), con dos proporciones diferentes de proteínas y lípidos (P/L): 80/20 y 40/60. Se analizaron los perfiles de expresión entre el momento de la eclosión (inicial), y nueve días después de haber sido alimentadas con la respectiva dieta. El análisis transcriptómico *de novo* reveló un total de 59.194 unigenes, de éstos 589 genes fueron expresados diferencialmente (*DEGs*) en la comparación 80/20 vs Inicial, y 1.576 en 40/60 vs Inicial. Las rutas metabólicas relacionadas con los procesos de digestión y metabolismo de los nutrientes fueron revisadas, se identificaron un total de 113 genes sobre-regulados en 40/60 vs Inicial y 47 en 80/20 vs Inicial. Las capacidades fisiológicas y metabólicas de las zoeas alimentadas con la dieta con mayor contenido de lípidos (40/60), no solo mejoraron los niveles de expresión de los genes relacionados con este nutriente, sino que también

influenciaron el metabolismo de las proteínas y los carbohidratos, y los niveles de expresión de genes relacionados con el sistema digestivo y transporte y catabolismo celular, durante los dos primeros estadios larvales de *C. sapidus*.

Palabras clave: *Callinectes sapidus*, transcriptoma, influencia de la dieta, metabolismo de nutrientes, expresión génica.

2.2 Introducción

En el proceso de digestión, el alimento consumido es degradado a moléculas más simples para que puedan ser asimiladas por el organismo, este proceso es desempeñado principalmente por las enzimas digestivas (Hammer *et al.*, 2000; Voet y Voet, 2004; Perera *et al.*, 2008). Durante el desarrollo ontogénico, la digestión es similar en la mayoría de decápodos, las larvas de los crustáceos parecen depender de pocas enzimas con altos niveles de actividad, en comparación con los adultos (De Silva y Anderson, 1994; Jones *et al.*, 1997b; Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Andrés *et al.*, 2010b). Así mismo, los mecanismos reguladores de este desarrollo se presentan a diferentes niveles y parecen estar genéticamente conectados, afectando los procesos de transcripción y traducción (Ceccaldi, 1997; Perera *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2011; Yúfera *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019a). La disponibilidad de nutrientes esenciales y su metabolismo ejercerá un gran impacto en el crecimiento; si algún ácido graso o aminoácido esencial no está presente en las concentraciones adecuadas en la dieta, se observarán efectos negativos en el desarrollo larval (Jones *et al.*, 1997b; Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2012).

El análisis de la actividad enzimática, ha demostrado ser una aproximación efectiva para entender la fisiología digestiva y determinar la calidad nutricional del alimento suministrado. Las principales proteasas, carbohidrasas y lipasas se han encontrado en todas las especies de crustáceos estudiadas (Kamarudin *et al.*, 1994; Wouters *et al.*, 2001; Carrillo-Farnés *et al.*, 2007; Perera *et al.*, 2008; Genodepa *et al.*, 2022a; Goncalves *et al.*, 2022), pero existen diferencias relacionadas con sus hábitos alimentarios. Altos niveles de proteasas y bajos de carbohidrasas se describen para especies carnívoras, y en sentido inverso para las herbívoras, mientras que los detritívoros y omnívoros se encuentran en una posición intermedia (Jones *et al.*, 1997a, 1997b; Le Vay *et al.*, 2001; Carter y Codabaccus, 2022; Muhlia-Almazán y Fernández-Gimenez, 2022). La actividad enzimática total aumenta conforme avanza el ciclo larval, reflejándose en el aumento, complejidad y desarrollo del hepatopáncreas, y las concentraciones varían al presentarse la transición a la vida bentónica y los primeros estadios juveniles (Saborowski *et al.*, 2006; Rotllant *et al.*, 2008; Andrés *et al.*, 2010b; Li *et al.*, 2015b).

Comparados con los adultos, existen pocas investigaciones en los estadios larvales de crustáceos. Los estudios iniciales sobre la digestión del alimento se restringen a la actividad de ciertas enzimas, e indicadores indirectos de respuesta como el ciclo de muda y la supervivencia (Hirche y Anger, 1987; Biesiot y Capuzzo, 1990; Lovett y Felder, 1990; Harms *et al.*, 1991; Kamarudin *et al.*, 1994; Lemos *et al.*, 2002; Saborowski *et al.*, 2006; Andrés *et al.*, 2010b). Con la aparición de la nutrigenómica, la transcriptómica se comienza a utilizar en el estudio de la nutrición acuícola, buscando desentrañar mecanismos moleculares relacionados con la alimentación de los organismos. Entre las ventajas se encuentra la identificación efectiva y el análisis de la expresión de genes candidatos involucrados en diferentes rutas metabólicas, incluidas las enzimas (Martin y Król, 2017; Chandhini y Kumar, 2019; Inbakandan, 2020).

La mayoría de los estudios se centran principalmente en camarones por su importancia comercial. En algunos peneidos, durante los estadios de protozoas (herbívoras), se incrementan los niveles de carbohidrasas y peptidasas y sus niveles de expresión, alcanzando un pico al acercarse la transición a mysis, declinando al volverse carnívoros, mientras que el comportamiento de las lipasas es variable (Lovett y Felder, 1990; Carrillo-Farnés *et al.*, 2007; Sainz y Cordova, 2009; Wei *et al.*, 2014a; Lage *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2022). Otros decápodos como *Procambarus clarkii* pueden usar carbohidratos, proteínas, y en menor proporción lípidos como nutrientes desde estadios tempranos de desarrollo, pero los patrones de expresión enzimáticos no se relacionan con cambios en los requerimientos nutricionales (Hammer *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2009). A diferencia de otros decápodos que tienen estadios planctónicos como *Macrobrachium rosenbergii*, *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *Panulirus argus*, y *Cherax quadricarnatus*, donde generalmente las proteasas (especialmente la tripsina), son enzimas dominantes y sus contenidos varían, dependiendo de la composición del alimento suministrado, siendo capaces de reducir sus niveles cuando se alimentan con zooplancton altamente proteico en comparación con una dieta basada en microalgas, baja en proteínas (Kamarudin *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1997a; Le Vay *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2008; Muhlia-Almazán y Fernández-Gimenez, 2022). Así mismo, post-larvas de *L. vannamei* y *L. stylirostris*, incrementan la expresión de genes relacionados con su sistema inmune y la actividad de proteasas, amilasas y lipasas, al

alimentarse con probióticos o biofloc (Cardona *et al.*, 2015; Miandare *et al.*, 2016, 2017; Mirbakhsh *et al.*, 2021; Mansour *et al.*, 2022).

Aunque varias especies de cangrejos se pescan y cultivan desde hace décadas, las investigaciones sobre la actividad de las enzimas durante su ontogenia son escasas en comparación con las de los camarones. Desde la eclosión, las larvas zoea en especies como los cangrejos araña (*Maja brachydactyla* y *Hyas araneus*), verdes de litoral (*Carcinus maenas*) y rey (*Lithodes santolla*), pueden ingerir y digerir lípidos, proteínas y carbohidratos, mostrando un comportamiento alimentario oportunista, exhibiendo hábitos omnívoros (Hirche y Anger, 1987; Harms *et al.*, 1991; Saborowski *et al.*, 2006; Rotllant *et al.*, 2008; Andrés *et al.*, 2010b). Estudios transcriptómicos más recientes, han permitido reconocer los genes vinculados con las enzimas digestivas; en *Eriocheir sinensis* se identificaron 62 genes de este tipo expresados diferencialmente, como glucosa deshidrogenasas, lipasas y serina proteasas, siendo mayormente expresados en el último estadio de zoea (Z5) que en megalopas (MG), sugiriendo que Z5 requiere usar mayor cantidad de energía para completar su transición a MG (Li *et al.*, 2015b).

Trabajos en diferentes especies de braquiuros del género *Scylla* han demostrado que la actividad de las amilasas, proteasas y lipasas se ven influenciadas por el estadio larval, tipo de dieta suministrada y la interacción de ambos factores (Jiang *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2012). En *S. paramamosain* los niveles de tripsina expresados fueron mayores en Z1, disminuyendo paulatinamente durante su desarrollo larval e incrementándose abruptamente en el primer estadio de juvenil (Jiang *et al.*, 2011). El comportamiento enzimático en larvas de *S. serrata* alimentadas con alimento vivo, dieta artificial o su combinación, reveló una diferenciación de expresión entre estadios larvales: tripsina > leucina aminopeptidasa > amilasa, y solo la leucina aminopeptidasa fue la variable predecible para discriminar entre las dietas (Serrano *et al.*, 2012). Mientras que en *M. brachydactyla* las actividades de la tripsina, amilasa y enterasa, tienden a incrementarse durante el desarrollo larval (Andrés *et al.*, 2008).

Conocer las rutas metabólicas relacionadas con un determinado nutriente, son una herramienta útil para el desarrollo de un alimento óptimo en cualquier especie cultivada

(Martin y Król, 2017). En las larvas de crustáceos los requerimientos nutricionales basados en dietas formuladas y la actividad enzimática sobre estas dietas, no han sido estudiados en muchas especies, debido a que en la fase planctónica su consumo es bajo frente al alimento vivo (Waiho *et al.*, 2018). Hasta la fecha se sabe que solo algunos peneidos (Kurmaly *et al.*, 1989; Le Moullac y Van Wormhoudt, 1994; Le Moullac *et al.*, 1997), langostas como *Homarus americanus* (Biesiot y Capuzzo, 1990), y los últimos estadios larvales de braquiuros del género *Scylla* (Serrano *et al.*, 2012), son capaces de aprovechar dietas artificiales, observando que la actividad enzimática de las amilasas, proteasas y lipasas son moduladas por su composición nutricional.

Recientemente el estudio de los perfiles transcriptómicos y la expresión de las rutas metabólicas y enzimas relacionadas con un determinado nutriente durante el desarrollo ontogénico suministrando alimento artificial, o diferentes combinaciones de alimento vivo están proporcionando las bases en relación al desarrollo larval y el metabolismo de la nutrición, siendo las especies de crustáceos más estudiadas *L. vannamei* (Rivera-Pérez *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2014a, 2014b; Lage *et al.*, 2017; Miandare *et al.*, 2017; Mirbakhsh *et al.*, 2021; Seychelles *et al.*, 2022), *P. sinensis* (Li *et al.*, 2018), *C. quadricarnatus* (Luo *et al.*, 2008), *Euphausia superba* (Seear *et al.*, 2010), *Homarus grammarus* (Goncalves *et al.*, 2022), *P. argus* (Perera *et al.*, 2008), *P. ornatus* (Genodepa *et al.*, 2022a, 2022b), *E. sinensis* (Zheng *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015b; Yang *et al.*, 2023), *M. brachydactyla* (Andrés *et al.*, 2010b; Castejón *et al.*, 2019), y *S. paramamosain* (Jiang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2018). Son necesarios estudios adicionales basados en el suministro de alimento vivo de composición bioquímica conocida, evaluando por lo menos los requerimientos de proteínas, carbohidratos y lípidos, especialmente si es posible modificar su composición nutricional (Jones *et al.*, 1997a).

A pesar de que la jaiba azul *Callinectes sapidus* es una especie de importancia comercial, cuyo potencial pesquero ha disminuido casi en un 70% en las últimas dos décadas (Zohar *et al.*, 2008; Rueda *et al.*, 2020; Frolova *et al.*, 2022), hay pocas investigaciones relacionadas con el suministro de dietas y sus perfiles enzimáticos. Solo se han desarrollado estudios en adultos, describiendo el comportamiento de carbohidrasas A y B, y aminopeptidasas en hepatopáncreas y tracto digestivo, observando una capacidad fisiológica para degradar algunos componentes de las plantas como el almidón (Dendinger,

1987; McClintock *et al.*, 1991), y celulosa y quitina usada como ingrediente de las dietas (Allman *et al.*, 2017). Se han detectado proteasas como la tripsina y quimotripsina, pero su actividad enzimática difiere de otros decápodos como *Macrobranchium rosenbergii* y *Penaeus* sp. (Dendinger, 1987; Dendinger y O'Connor, 1990). En adultos pertenecientes a un mismo género como *C. belicosus* y *C. arcuatus*, también se detectó la presencia de tripsina y quimotripsina en los jugos gástricos (Díaz-Tenorio *et al.*, 2006), y en juveniles de *C. arcuatus* se determinó que la actividad de las proteasas es casi nula durante el proceso de muda, mientras que las de las amilasas y lipasas aumentan (Vega-Villasante *et al.*, 1999).

Este es el primer análisis comparativo que se realiza del transcriptoma en larvas de *C. sapidus*, entre el primer y segundo estadio de zoea, desde el momento de su nacimiento e inicio de la alimentación exógena, hasta nueve días después de ser alimentadas con alimento vivo (rotífero *Brachionus plicatilis*), enriquecido con una mezcla del alga verde *Chlorella pyrenoidosa* en polvo - Ch (Holistic Herbal Solutions®), y emulsión de S.presso - Spr (Selco®, Inve Aquaculture), en dos diferentes proporciones Ch/Spr (80/20 y 40/60). Esto con el objetivo de observar los genes diferencialmente expresados y sobre-regulados, relacionados con el sistema digestivo, transporte y catabolismo de los procesos celulares, y enzimas relacionadas con las rutas metabólicas de lípidos, proteínas y carbohidratos. El estudio se hizo en dos de las condiciones nutricionales previamente estudiadas (ver capítulo anterior), una con pobres respuestas en crecimiento, supervivencia y ciclo de muda (80/20), y otra con el mejor desempeño (40/60). Su estudio proporciona información inicial sobre los patrones de expresión durante las primeras dos fases larvales de *C. sapidus*, con el fin de vislumbrar el funcionamiento de sus procesos digestivos y su afectación de acuerdo con el tipo de dieta suministrada.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Criterios de selección para el desarrollo de los ensayos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos presentados en el primer capítulo, en relación con la calidad nutricional de la dieta y el desarrollo larval de *C. sapidus*, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

La recolección, transporte, aclimatación de hembras y obtención de larvas, se realizó de la misma manera a la descrita en el capítulo anterior (numeral 1.3.2.). Para la alimentación de los lotes de larvas se seleccionaron dos de los siete tratamientos evaluados en los ensayos anteriores, que demostraron diferencias contrastantes en: 1) Supervivencia, 2) Duración del ciclo larval, 3) Ciclo de muda, 4) Obtención de megalopas y 5) Composición nutricional del alimento suministrado, enfocado principalmente al contenido de lípidos. Los tratamientos seleccionados fueron 80/20 y 40/60. Aunque los tratamientos 100/0, 90/10 y 80/20 presentaron los resultados más bajos, se seleccionó el tratamiento 80/20 con el fin de poder obtener la cantidad de muestra requerida para los análisis moleculares posteriores, ya que en 100/0 y 90/10 al ser tan bajas las supervivencias, era probable no lograr la cantidad de muestra suficiente. En contraste, el mejor tratamiento con el cual se obtuvieron casi siempre las mejores respuestas en los criterios anteriormente mencionados fue 40/60.

De acuerdo con los datos provistos por los ensayos de nutrición, el $88,83 \pm 5,16$ % de las larvas presentan su primera muda entre los cinco a nueve días después de la eclosión, pasando del primer estadio de zoea (Z1) al momento de eclosionar, al segundo (Z2), el cual es claramente identificable debido a la formación del pedúnculo ocular que proyecta los ojos hacia afuera (Costlow y Bookhout, 1959b). Basados en esto, se determinó una duración de nueve días para los ensayos.

El manejo del alimento vivo (rotíferos *B. plicatilis*), así como su enriquecimiento, se ejecutó de la misma manera descrita en el capítulo anterior (numerales 1.3.3 y 1.3.4), enriqueciéndolos con *Chlorella pyrenoidosa* en polvo (Ch) como principal fuente de

proteínas, y una emulsión comercial (S.presso, Inve ®), como principal fuente de lípidos (Spr), en dos proporciones Ch/Spr: 80/20 y 40/60. Los rotíferos enriquecidos de esta manera, se denominarán de aquí en adelante como dietas.

2.3.2 Desarrollo del experimento

Se determinaron dos momentos para recolectar las muestras por triplicado para los análisis moleculares: 1) Al momento de la eclosión, zoeas recién eclosionadas (Z1) sin alimentar (muestras iniciales), y 2) Zoeas (Z2), después de nueve días de alimentarse con la dieta 80/20 (muestras 80/20), o la dieta 40/60 (muestras 40/60). Las réplicas correspondieron a la repetición de este experimento, con tres diferentes nacimientos evaluados por separado, provenientes de distintas hembras ovadas, recolectadas en la Boca de la Barra de la Ciénaga Grande de Santa Marta. De cada lote recién nacido se recolectaron muestras para identificación mediante taxonomía molecular (Anexo A).

Una vez ocurrida la eclosión y después de retirar a la hembra del recipiente, se recolectaron aproximadamente 1,5 g de Z1 que estuvieran nadando activamente en la columna de agua, enjuagándolas varias veces con agua de osmosis inversa, depositando las muestras en crioviales de 2 mL y fijándolas en nitrógeno líquido para almacenarlas en ultracongelador a -80 °C (Muestras Iniciales). El lote restante se mantuvo con aeración suave, adicionando entre 20,000 a 50,000 cél. mL⁻¹ de la microalga *Nannochloropsis* sp., recomendada para el mantenimiento de la especie (Zmora *et al.*, 2005), mientras se realizaron 10 conteos aleatorios en placas Bogorov (1 mL), fijándolas con lugol, para determinar la cantidad total de zoeas.

Las larvas fueron sembradas en ocho recipientes plásticos de 3 L (cuatro por dieta), a una densidad de ~ 50 larvas mL⁻¹, en 1,5 L de agua limpia con 20.000 a 50.000 cél. mL⁻¹ de *Nannochloropsis* sp. (Côrtes y Tsuzuki, 2012; Acosta y Gómez-León, 2013; Shan y Lin, 2014), a modo de “agua verde” (Wolcott y O’connor, 1992; Soyel y Kumlu, 2003; Guarizo *et al.*, 2020; Muangyao *et al.*, 2020), e iniciando la alimentación con rotíferos cernidos por un tamiz de 120 µm, enriquecidos con la respectiva proporción Ch/Spr (80/20 y 40/6), a una densidad de ~ 500 rot. mL⁻¹. Se usó agua de mar artificial (Premium Reef Salt Omega

One®), a 30 g L⁻¹ de salinidad, filtrada, esterilizada en autoclave, añadiendo cloranfenicol (10 mg L⁻¹), como tratamiento profiláctico preventivo recomendado para evitar infecciones en larvas de *C. sapidus* (Sulkin y Van Heukelem, 1986).

Cada tanque contó con aeración suave; las larvas se mantuvieron a una temperatura de 27 ± 1 °C, y fotoperiodo 10:14 (luz : oscuridad). Diariamente, en las horas de la mañana se adicionaban las microalgas (7:30 am), y en las horas de la tarde, las dietas (3:00 pm). Cada día de por medio las larvas eran recolectadas en un tamiz de 250 µm y enjuagadas suavemente para remover los desechos de comida y larvas muertas, sembrándolas nuevamente en recipientes con agua limpia, microalgas y rotíferos frescos; este proceso se repitió hasta el noveno día, donde el total de larvas vivas de los recipientes de cada dieta fueron recolectados, enjuagados con agua de osmosis inversa varias veces, y empacados en crioviales, almacenándolos en nitrógeno líquido y posteriormente en ultra congelador a -80 °C (Muestras 80/20 y 40/60).

2.3.3 Extracción de ARN, construcción y secuenciación de librerías de ADNc

En cada uno de los tres ensayos llevados a cabo, se recolectaron tres tipos de muestras en crioviales de 2 mL para los análisis moleculares: una inicial, compuesta por Z1 recién eclosionadas sin haber sido alimentadas (inicial), y dos finales compuestas por Z2 después de haber sido alimentadas por nueve días con la dieta 80/20, o 40/60, para un total de nueve.

Las muestras fueron descongeladas y procesadas individualmente mediante macerado con mortero y pistilo en nitrógeno líquido. Una vez homogenizadas, se suspendieron en el reactivo trizol (Trizol™ Reagent, Invitrogen®) a una relación de 1 mL de trizol por cada 50 a 100 mg de muestra. Posteriormente fueron procesadas para la extracción de ARN total, siguiendo el protocolo estándar de extracción descrito por el manual del fabricante en *Trizol™ Reagent, Invitrogen; Total RNA extraction protocol* (Invitrogen, 2016). El ARN total obtenido fue cuantificado por el método colorimétrico Ribogreen, del manual *Quant-iT™*

RiboGreen™ RNA Reagent and Kit (Invitrogen, 2019), y su integridad (RIN) evaluada mediante electroforesis capilar (Xie *et al.*, 2008), en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent®).

La preparación y secuenciación de las nueve librerías fue realizada por la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea). El ADNc fue sintetizado del ARN purificado mediante secuenciación por *RNA-seq*, en la plataforma Illumina Novaseq (*Illumina-Transcriptome*), generando librerías pareadas de 100 pb (Illumina TruSeq mRNA/Illumina 100bp PE).

2.3.4 Análisis de datos transcriptómicos

La información fue cargada y analizada en la plataforma web de Galaxy, usando el servidor público usegalaxy.org (The Galaxy Community, 2022). Los datos crudos se almacenaron en formato FASTQ.gz, la limpieza de adaptadores, lecturas no pareadas, bases de baja calidad se realizó usando *Trimmomatic* v. 0.38 (Bolger *et al.*, 2014) empleando los parámetros por defecto; la calidad y longitud de las lecturas se verificó con *FastQC* v. 0.1.1.9 (Wingett y Andrews, 2018).

Todas las lecturas *trimmomatic* pareadas de las muestras (*forward* y *reverse*), se ensamblaron *de novo* con *rnaSPAdes* v.3.15.4 (Antipov *et al.*, 2016) en un solo transcriptoma denominado “transcriptoma *de novo* completo”, para usarse como secuencia de referencia. Con este archivo, *TransDecoder* (Haas *et al.*, 2013) identificó las regiones de codificación candidatas de proteínas y generó un archivo en formato GFF3 denominado “transcriptoma GFF3”. Las lecturas *trimmomatic* pareadas de cada muestra (*forward* y *reverse*), se mapearon separadamente con *HISAT2* (Kim *et al.*, 2015), usando como referencia la secuencia “transcriptoma *de novo* completo”, originando nueve archivos BAM.

Aparte, cada archivo BAM fue ensamblado en transcritos potenciales calculando la abundancia de las lecturas por *FPKM* (*fragments per kilo base of exon per million fragments mapped*) con *StringTie* (Pertea *et al.*, 2015; Kovaka *et al.*, 2019). Los archivos resultantes se fusionaron y ensamblaron en un conjunto no redundante con *StringTie merge* (Pertea *et al.*, 2015; Kovaka *et al.*, 2019). Finalmente este archivo, mediante *GFF*

compare (Trapnell *et al.*, 2010), comparó los transcritos ensamblados, usando como referencia de anotación el archivo “transcriptoma GFF3”, originando un “archivo anotado global”.

Con *FeatureCounts* (Liao *et al.*, 2014), se midió la expresión de los genes cuantificando y anotando los transcritos de cada muestra, en cada uno de los nueve archivos BAM, usando como referencia el “archivo anotado global”. Los archivos resultantes fueron usados para el análisis de expresión diferencial con *DESeq2* (Love *et al.*, 2014) en las siguientes comparaciones por triplicado: 80/20 vs Inicial, 40/60 vs Inicial y 80/20 vs 40/60, Se consideraron transcritos diferencialmente expresados (*Diferentially Expressed Genes – DEGs*) aquellos con un $P\text{-adj} \leq 0,05$ (*Adjusted P-value*) y $\log_2(\text{fold change}) > 0,5$.

Con el archivo originado en *TransDecoder* (Haas *et al.*, 2013) que identificó las regiones de codificación candidatas de proteínas del “transcriptoma *de novo* completo”, se realizó una anotación funcional con valores de corte de $E < 1,0 \times 10^{-5}$, en la base de datos de *eggNOG-mapper V2* (Cantalapiedra *et al.*, 2021), para identificar ontología de genes (*Gene Ontology - GO*), los resultados fueron procesados mediante *WEGO 2.0* (Ye *et al.*, 2018). También se usó la base de datos de NCBI Nr (*non-redundant protein*) mediante blast-p manual para observar la homología de las proteínas con las de otras especies.

Se ensamblaron *de novo* en *rnaSPAdes v.3.15.4* (Antipov *et al.*, 2016), las lecturas *trimmomatic* pareadas de cada condición por aparte, originando tres transcriptomas separados: 1) Inicial (Z1), 2) 80/20 (Z2) y 3) 40/60 (Z2). En *TransDecoder* (Haas *et al.*, 2013), se identificaron las regiones de codificación de proteínas de cada transcriptoma, y se anotaron en la base de datos de *eggNOG-mapper V2* (Cantalapiedra *et al.*, 2021), y mediante la plataforma *KASS (KEGG Automatic Annotation Server)* (Moriya *et al.*, 2007) se proporcionaron los datos de rutas metabólicas *KEGG pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG)* para cada condición.

Finalmente, mediante *KASS* (Moriya *et al.*, 2007), se identificaron las rutas *KEGG* en las comparaciones de expresión diferencial con *DESeq2* (Love *et al.*, 2014) para 80/20 vs

Inicial, y 40/60 vs Inicial, únicamente para los *DEGs* regulados positiva y significativamente ($P\text{-adj} \leq 0,05$, y $\log_2(\text{FC}) > 0,5$). De las categorizaciones *KEGG* resultantes, la revisión de los genes se centró en las categorías relacionadas directamente con la digestión del alimento (Tabla 2 - 1). En sistema digestivo y transporte y catabolismo de procesos celulares, se identificaron todos los genes sobre regulados en cada condición, mientras que, en el metabolismo de lípidos, aminoácidos (AA), otros AA, y carbohidratos (CBH), se identificaron las enzimas sobre-reguladas (Tabla 2 - 1).

Tabla 2 - 1. Rutas *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), revisadas en los genes diferencialmente expresados (*DEGs*), que se regularon positiva y significativamente ($P\text{-adjust} < 0,0.5$, y $\log_2(\text{fold change}) > 0,5$) en las comparaciones 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial, en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*.

Categoría KEGG		Referencia ko ¹	Nombre de la ruta
Sistemas del organismo (Sistema digestivo)	1	04970	Secreción salival
	2	04971	Secreción de ácido gástrico
	3	04972	Secreciones pancreáticas
	4	04973	Digestión y absorción de carbohidratos
	5	04974	Digestión y absorción de proteínas
	6	04975	Digestión y absorción de grasas
	7	04976	Secreciones biliares
	8	04977	Digestión y absorción de vitaminas
	9	04978	Absorción de minerales
	10	04979	Metabolismo de colesterol
Procesos celulares (Transporte y catabolismo)	1	04163	Autofagia de otros
	2	04137	Mitofagia animal
	3	04138	Autofagia de levadura
	4	04139	Mitofagia de levadura
	5	04140	Autofagia - animal
	6	04142	Lisosoma
	7	04144	Endocitosis
	8	04145	Fagosoma
	9	04146	Peroxisoma
Metabolismo de lípidos	1	00061	Biosíntesis de ácidos grasos
	2	00062	Elongación de ácidos grasos
	3	00071	Degradación de ácidos grasos
	4	00073	Biosíntesis de cutina, suberina y seda
	5	00100	Biosíntesis de esteroides
	6	00120	Biosíntesis primaria de ácidos biliares
	7	00121	Biosíntesis secundaria de ácidos biliares
	8	00140	Biosíntesis de hormona esteroide
	9	00561	Metabolismo de glicerolípidos
	10	00564	Metabolismo de glicerofosfolípidos
	11	00565	Metabolismo de ésteres en lípidos
	12	00590	Metabolismo de ácido araquidónico
	13	00591	Metabolismo de ácido linoléico
	14	00592	Metabolismo de ácido α -linoléico

Categoría KEGG		Referencia ko ¹	Nombre de la ruta
	15	00600	Metabolismo de esfingolípidos
	16	01040	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados
Metabolismo de aminoácidos	1	00220	Biosíntesis de arginina
	2	00250	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato
	3	00260	Metabolismo de glicina, serina y treonina
	4	00270	Metabolismo de cisteína y metionina
	5	00280	Degradación de valina, leucina e isoleucina
	6	00290	Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina
	7	00300	Biosíntesis de lisina
	8	00310	Degradación de lisina
	9	00330	Metabolismo de arginina y prolina
	10	00340	Metabolismo de histidina
	11	00350	Metabolismo de tirosina
	12	00360	Metabolismo de fenilalanina
	13	00380	Metabolismo del triptófano
	14	00400	Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano
Metabolismo de otros aminoácidos	1	00410	Metabolismo de β-alanina
	2	00430	Metabolismo de taurina e hipoturina
	3	00440	Metabolismo de fosfonato y fosfinato
	4	00450	Metabolismo de compuestos del selenio
	5	00460	Metabolismo de ácido cianoamino
	6	00470	Metabolismo de ácido D-amino
	7	00480	Metabolismo del glutatión
Metabolismo de carbohidratos	1	00010	Glucólisis / Gluconeogénesis
	2	00020	Ciclo del citrato (ciclo de TCA)
	3	00030	Ruta de la pentosa fosfato
	4	00040	Interconversión de pentosa y glucuronato
	5	00051	Metabolismo de fructosa y manosa
	6	00052	Metabolismo de galactosa
	7	00053	Metabolismo del ascorbato y aldarato
	8	00500	Metabolismo de almidón y sacarosa
	9	00520	Metabolismo de amino azúcares y nucleótidos
	10	00562	Metabolismo de inositol-fosfato
	11	00620	Metabolismo del piruvato
	12	00630	Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato
	13	00640	Metabolismo del propanoato
	14	00650	Metabolismo del butanoato
	15	00660	Metabolismo de ácido dibásico Rama-C5

1: KEGG orthology.

En la plataforma web de Galaxy (The Galaxy Community, 2022) se realizaron salidas gráficas para: 1) Un diagrama de Venn (Cock *et al.*, 2013) de los unigenes anotados en los transcriptomas inicial, 80/20 y 40/60, 2) Diagramas de volcán de los archivos de *DESeq2* para las tres comparaciones 80/20 vs Inicial, 40/60 vs Inicial y 80/20 vs 40/60 usando

ggplot2 Volcano plot, y 3) Un análisis de componentes principales (ACP) y una correlación de Spearman (Ramírez *et al.*, 2016) de las nueve muestras mapeadas en *HISAT2* para proporcionar una visión general entre las condiciones experimentales y entre las réplicas de un mismo tratamiento con *plotPCA* (Ramírez *et al.*, 2016).

2.4 Resultados

2.4.1 Extracción de ARN y evaluación de su calidad

La cantidad de ARN purificado estuvo entre los 65 a 161 µg. Los valores de RIN fueron bajos para todas las muestras, oscilando entre 1,6 a 4,7 (Tabla 2 - 2).

Tabla 2 - 2. Control de calidad del ARN extraído de los estadios larvarios tempranos (Z1 y Z2) de *Callinectes sapidus*.

Tipo de muestra ¹	Estadio larval	ARN purificado (ng/µL)	Volumen final (µL)	ARN total purificado (µg)	RIN ²
Inicial-R1	Z1	1960,78	58	113,72	1,8
Inicial-R2	Z1	2924,95	55	160,87	2,6
Inicial-R3	Z1	2238,36	29	64,91	4,7
80/20-R1	Z2	2748,75	45	123,69	2,0
80/20-R2	Z2	1805,71	45	81,26	2,8
80/20-R3	Z2	1568,99	45	70,60	3,0
40/60-R1	Z2	2739,38	46	126,01	2,4
40-60/R2	Z2	1769,37	45	79,62	3,1
40-60-R3	Z2	2725,61	45	122,65	1,6

1. Inicial, zoeas recién eclosionadas (Z1) sin haber sido alimentadas; 80/20 y 40/60, zoeas alimentadas durante nueve días con rotíferos enriquecidos con la respectiva dieta (Z2). Las réplicas (R1, R2, R3), corresponden a la repetición del experimento con tres diferentes nacimientos. 2. RIN: *RNA Integrity Number*.

2.4.2 Secuenciación y ensamblajes *de novo* de los transcriptomas

Las estadísticas de secuenciación por *RNA-seq* y el ensamblaje de nueve muestras de zoeas de *Callinectes sapidus* se resumen en la Tabla 2 - 3. Se ensamblaron nueve librerías de ADNc con un rango de 20,09 a 30,35 x 10⁶ pb de lecturas crudas. Después del procesamiento y limpieza de las secuencias de baja calidad un total de 20,01 a 30,25 x 10⁶ pb de lecturas limpias fueron obtenidas. Los porcentajes de Q20 y Q30 de cada librería estuvieron por encima de 98,87 y 95,64 % respectivamente.

Tabla 2 - 3. Estadísticas de secuenciación de los transcriptomas en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*.

Tipo de muestra ¹	Estadio larval	Lecturas crudas en pb (10 ⁶)	Lecturas limpias en pb (10 ⁶)	Lecturas limpias (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	G/C (%)
Inicial-R1	Z1	24,36	24,27	99,66	99,04	96,14	38,68
Inicial-R2	Z1	20,09	20,01	99,55	98,87	95,64	38,70
Inicial-R3	Z1	26,09	25,99	66,57	98,92	95,76	39,20
80/20-R1	Z2	20,47	20,42	99,71	99,03	96,05	34,53
80/20-R2	Z2	30,35	30,25	99,70	99,02	96,03	35,01
80/20-R3	Z2	20,86	20,79	99,67	98,98	95,86	32,86
40/60-R1	Z2	23,94	23,86	99,66	98,97	95,87	34,67
40/60-R2	Z2	26,81	26,71	99,62	98,91	95,65	34,54
40/60-R3	Z2	26,22	26,15	99,73	99,09	96,29	33,73

1. Inicial, zoeas recién eclosionadas sin haber sido alimentadas (Z1); 80/20 y 40/60, zoeas alimentadas durante nueve días con rotíferos enriquecidos con la respectiva dieta (Z2). Las réplicas (R1, R2, R3), corresponden a la repetición del experimento con tres diferentes nacimientos.

Un total de 59.194 unigenes fueron generados en el ensamblaje del transcriptoma *de novo* unificado, seguido por el inicial con 44.011 pb, y descendiendo a ~20.000 pb para 80/20 y 40/60. La longitud máxima, mínima y promedio de los unigenes estuvo entre 12.600 a 17.644 pb, 49 a 52 pb y 401 a 508 pb respectivamente. El porcentaje de GC fue similar entre los transcriptomas (41,91 a 43,00 %), y el N50 fue más bajo en las muestras 40/60 y 80/20 (~1.200), que en el inicial y el unificado (~2.000) (Tabla 2 - 4).

Tabla 2 - 4. Resumen de los resultados de los ensamblajes *de novo* por secuenciación en Illumina de las muestras durante el desarrollo larval temprano de *Callinectes sapidus*.

Cálculo	Transcriptomas			
	Unificado ¹	Inicial ²	80/20 ³	40/60 ⁴
No. unigenes (≥500 pb)	59.194	44.011	20.393	22.926
No. unigenes (> 0 pb)	306.796	220.059	99.383	122.969
Longitud máxima (pb)	17.644	14.213	13.626	12.600
Longitud mínima (pb)	49	50	52	49
Longitud promedio (pb)	480	508	424	401
Longitud total (pb)	86.393.810	68.606.723	23.311.970	25.409.533
N50	2.015	2.165	1.299	1.248
GC (%)	42,93	43,00	42,31	41,91

1. Unificado, ensamblaje de todas las muestras. 2. Inicial, ensamblaje de las tres muestras de zoeas recién nacidas sin haber sido alimentadas. 3 y 4, ensamblajes de las tres muestras de zoeas alimentadas durante nueve días con rotíferos enriquecidos con la respectiva dieta (80/20 o 40/60). Las tres réplicas de cada condición corresponden a la repetición del experimento con tres diferentes nacimientos.

El 62,1% de las secuencias originadas en el transcriptoma unificado estuvieron entre < 200 a 300 pb, seguidas en menor proporción por tamaños entre 400 a 700 pb (24,9%). La representatividad de los unigenes entre los 800 a >3.000 pb no fue mayor del 2,1% en cada rango respectivo (Figura 2 - 1).

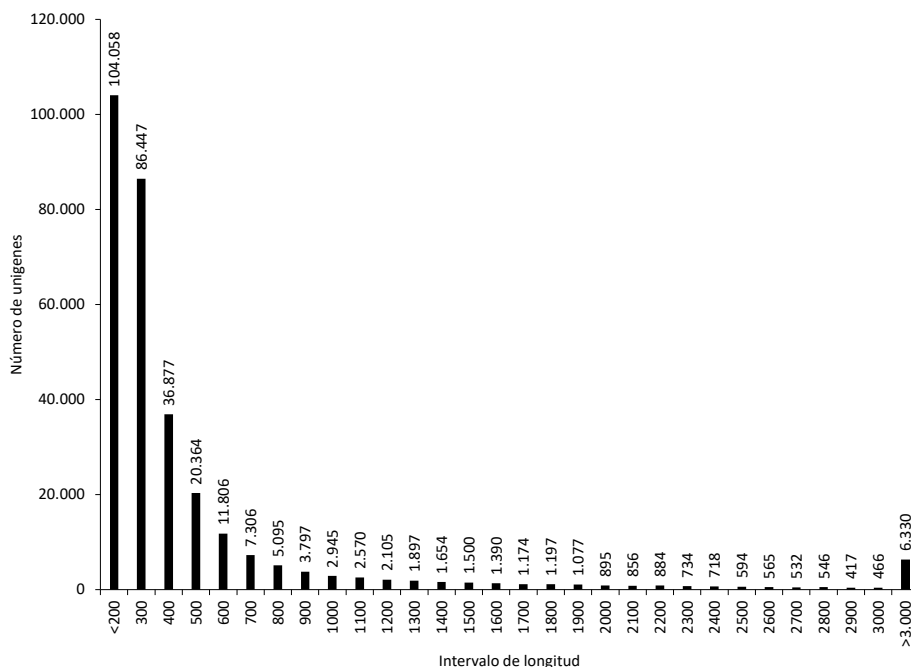


Figura 2 - 1. Distribución general de la longitud de todos los unigenes secuenciados en el transcriptoma unificado, en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*.

2.4.3 Anotación funcional y clasificación de los transcriptomas

Los unigenes ensamblados en cada transcriptoma fueron buscados en las bases de datos públicas de *eggNOG-mapper* con un porcentaje de anotación entre el 29,19 al 34,01 %. En cada archivo se depuraron más del 90% de los unigenes anotados, por estar relacionados con otro tipo de organismos como plantas, virus o bacterias (Tabla 2 – 5).

- **Transcriptoma unificado**

Basados en los resultados en *blast-p*, 940 especies presentan homologías con las secuencias de *C. sapidus*. El phylum Arthropoda abarca el mayor número de especies (69,12 %), seguido por los Cordados (30,49 %) y sólo un pequeño porcentaje (0,39 %), es

representado por otros phyla (Figura 2 - 2). Dentro de los Artrópodos, la clase Insecta ocupa el primer regular en representación de especies (39,80%), seguido por el subphylum Crustacea (20,79 %), en donde la especie más cercana perteneciente a la misma familia (Portunidae), fue *Portunus trituberculatus* con un 2,56 % de representatividad (Figura 2 - 2).

Tabla 2 - 5. Estadísticas de anotación en *eggNOG-mapper* de los transcritos ensamblados *de novo* en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*.

Transcriptomas	Unigenes				
	Totales (No.)	Anotados (No.)	Anotados (%) ⁵	Depurados (No.)	Depurados (%) ⁶
Unificado ¹	59.194	17.282	29,19	16.172	93,58
Inicial ²	44.011	14.198	32,26	13.937	98,16
80/20 ³	20.393	6.936	34,01	6.475	93,35
40/60 ⁴	22.926	6.976	30,43	6.469	92,73

1. Unificado: ensamblaje de todas las muestras. 2. Inicial: ensamblaje de las tres muestras de zoeas recién nacidas sin haber sido alimentadas (Z1). 3 y 4. 80/20 y 40/60: ensamblaje de las tres muestras de zoeas alimentadas durante nueve días con rotíferos enriquecidos con la respectiva dieta (Z2). 5. El cálculo corresponde al porcentaje de transcritos anotados con respecto al total de transcritos. 6: El cálculo corresponde al total de transcritos depurados, con respecto a los anotados.

En el transcriptoma unificado, de acuerdo con la ontología génica (GO), un total de 13.162 unigenes fueron asignados a por lo menos un término. La categoría más representada fue procesos biológicos (96,63 %), seguida por componentes celulares (94,44 %) y finalmente función molecular (86,79 %). Los términos más enriquecidos en cada categoría fueron proceso celular (10,74 %) dentro de procesos biológicos, interacción molecular (43,15 %) en función molecular, y célula y parte celular (17,82 % cada una) dentro de componentes celulares (Figura 2 - 3).

▪ Transcriptomas por condición: inicial, 80/20 y 40/60

En los transcritos ensamblados por tipo de muestra, el número de unigenes anotados fue mucho mayor en el inicial (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), esta condición corresponde al momento en que las zoeas eclosionaron en su primer estadio (Z1), antes de recibir cualquier tipo de alimentación exógena. Por el contrario, en los transcriptomas 80/20 y 40/60, el número de unigenes se redujo casi un 50 % (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), correspondiendo a la condición de las zoeas

luego de haber sido alimentadas por nueve días con cada una de las respectivas dietas, momento en el cual el $88,83 \pm 5,16$ % de las larvas han alcanzado el segundo estadio (Z2), de acuerdo con los resultados presentados en el primer capítulo de este documento.

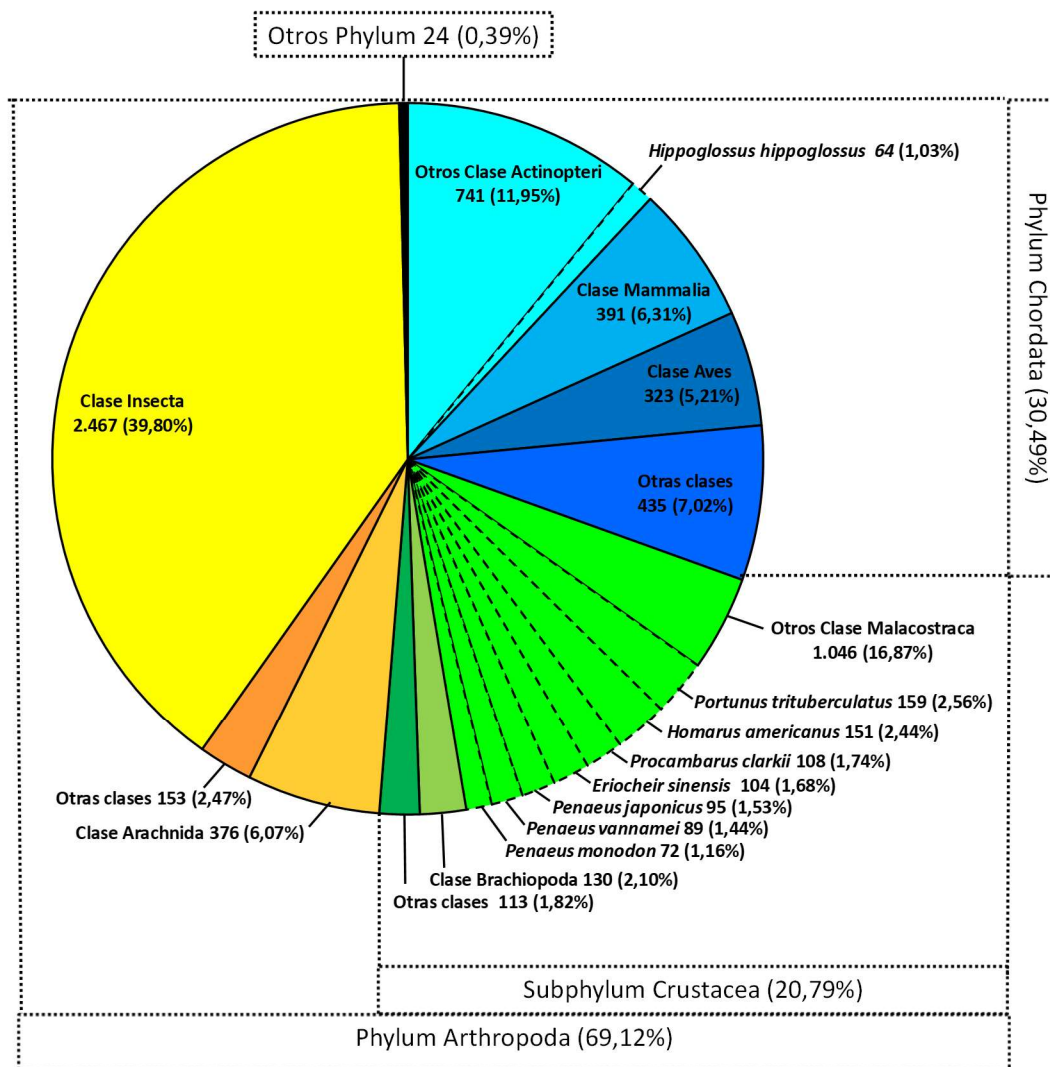


Figura 2 - 2. Resultados de distribución de especies en el transcriptoma *de novo* unificado que presentan homología con las secuencias de estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*, obtenido mediante blast-p en la base de datos de NCBI NR (*non-redundant protein*).

En el diagrama de Venn se observan los diferentes niveles de agrupación de los transcritos entre las tres condiciones (Figura 2 - 4). Únicamente el 32 % de los unigenes del transcriptoma inicial están asociados con las otras muestras, mientras que en las dietas este nivel de asociación aumentó entre un 50 a 52 % para 40/60 y 80/20 respectivamente (Figura 2 - 4).

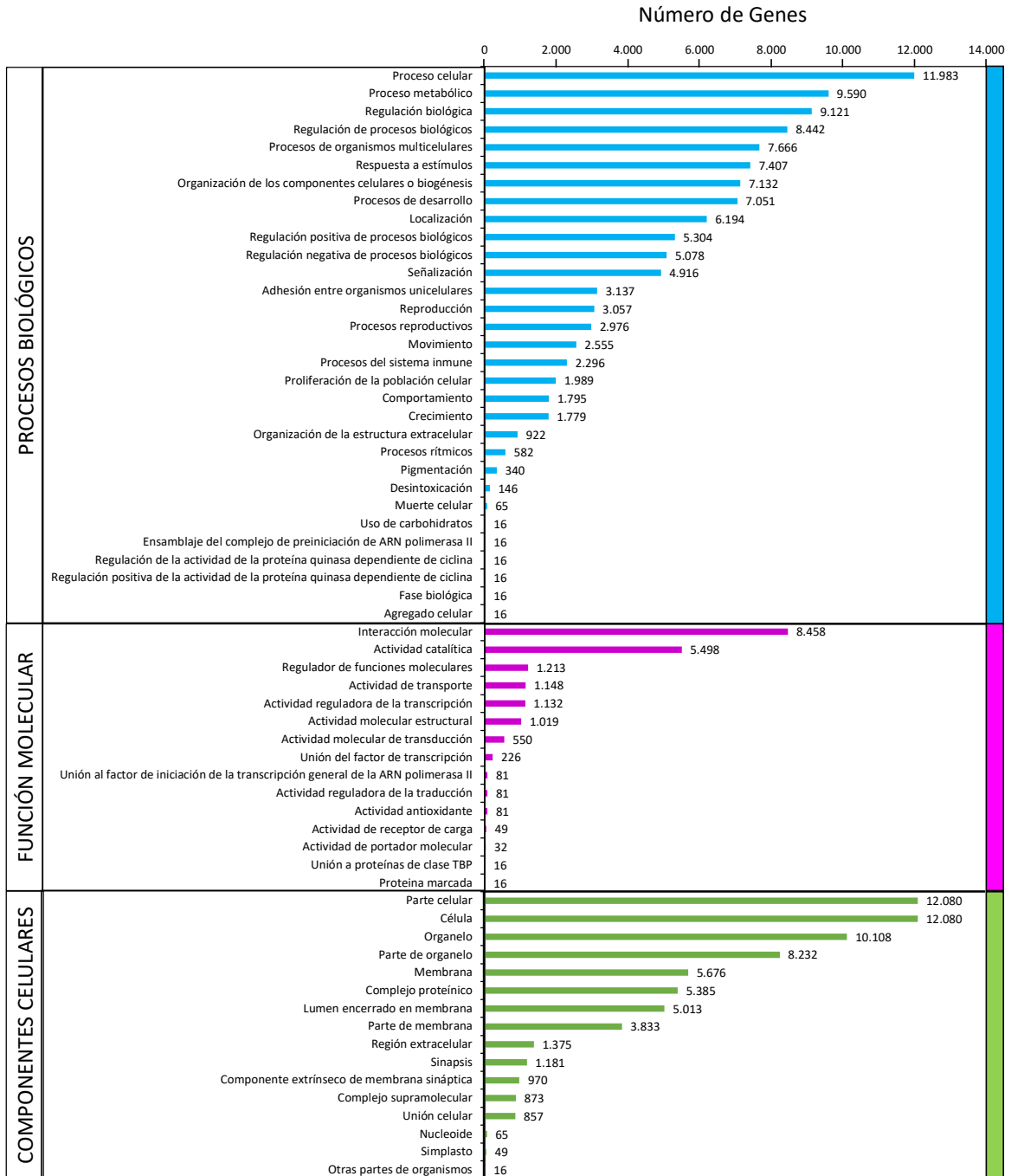


Figura 2 - 3. Clasificación de acuerdo con la ontología génica (*Gene ontology – GO*) de unigenes no redundantes ensamblados en el transcriptoma *de novo* unificado de estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*. Todos los unigenes anotados fueron agrupados en tres subcategorías funcionales en *WEGO 2.0*: procesos biológicos, función molecular y componentes celulares. El gráfico de barras muestra el número de unigenes involucrados en cada uno de los principales términos funcionales.

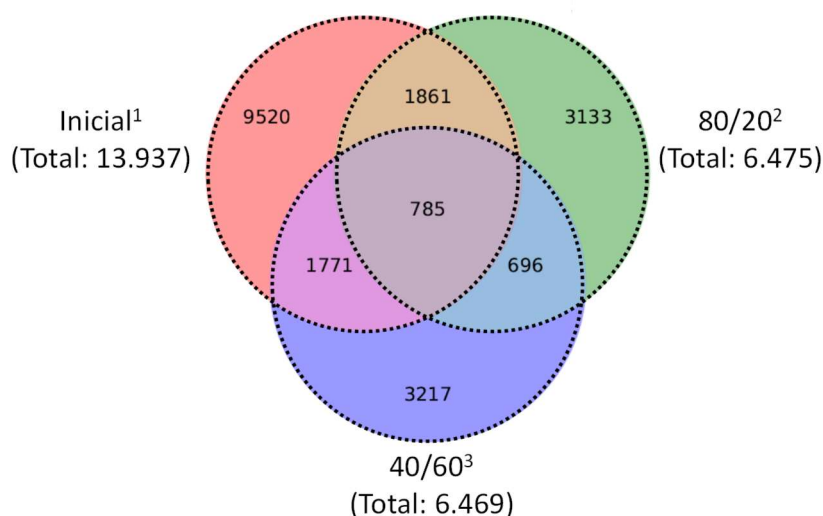


Figura 2 - 4. Diagrama de Venn de los resultados de anotación con *eggNOG-mapper V2* durante el desarrollo larval temprano de *Callinectes sapidus* en diferentes condiciones (inicial, 80/20 y 40/60). ¹ Inicial: zoeas recién eclosionadas sin haber sido alimentadas (Z1). ^{2 y 3} 80/20 y 40/60: zoeas después de haber sido alimentadas durante nueve días con la respectiva dieta (Z2).

En la clasificación de rutas en *KEGG* pudo observarse que al momento de nacer las zoeas, sin haber sido alimentadas (Z1), un total de 6.947 unigenes se encontraban activos (inicial). Después de nueve días de ser alimentadas con la dieta 80/20 y 40/60 (Z2), el número de genes se redujo a 4.813 y 4.698 respectivamente (Figura 2 - 5). En los tres transcriptomas, la categoría “sistemas del organismo” fue la más representativa (32,58 a 33,60 %), el resto presentó variaciones por categoría. El término más dominante en los transcriptomas de las cinco categorías principales fue el procesamiento de la información ambiental, representado en la transducción de señales (Figura 2 - 5).

El análisis de componentes principales permitió proporcionar una imagen general de las diferencias entre los transcritos por grupos e intra-grupos. Los dos primeros componentes principales explicaron el 72,1 % de la varianza (62,5 y 9,6 % de la varianza total, respectivamente). Se observa un agrupamiento claro de las zoeas recién nacidas (Z1) antes de haber sido alimentadas (inicial), y un grupo más disperso después de nueve días de haber sido alimentadas con las dietas 80/20 y 40/60 (Z2), donde se presentaron diferencias intra-grupales entre algunas de las réplicas (Figura 2 - 6A), que también se reflejan en los coeficientes de correlación (Figura 2 - 6B).

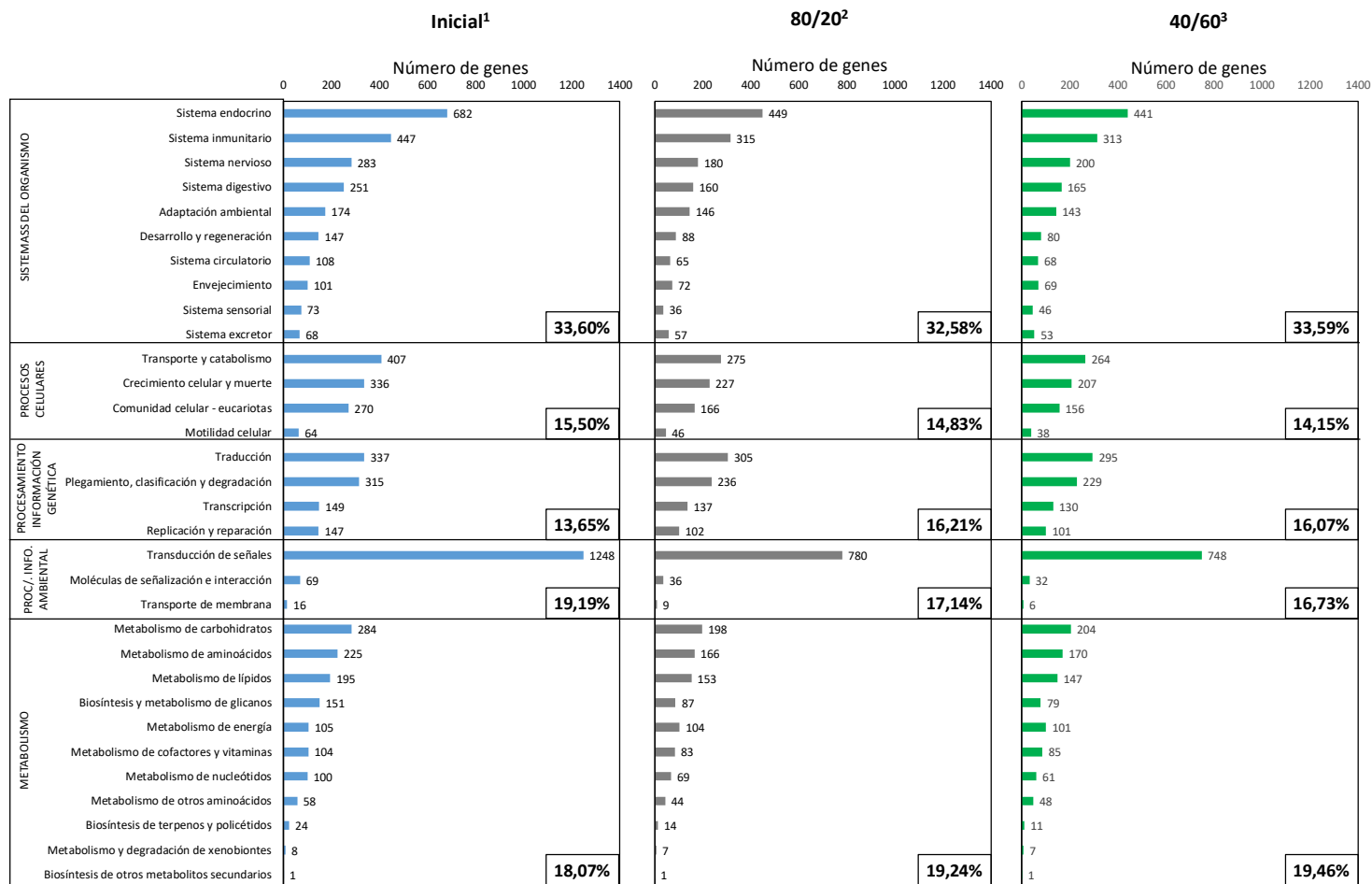


Figura 2 - 5. Clasificación de las rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) mediante KASS, de unigenes no redundantes ensamblados *de novo* en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*. Todos los unigenes anotados se asignaron a cinco categorías KEGG: síntesis del organismo, procesos celulares, procesamiento de la información genética y ambiental, y metabolismo. El gráfico de barras muestra el número de unigenes involucrados en cada ruta principal de KEGG. 1. Inicial, transcriptoma de zoeas recién nacidas sin haber sido alimentadas (Z1). 2 y 3, transcriptomas de zoeas (Z2) alimentadas durante nueve días con la respectiva dieta (80/20 y 40/60).

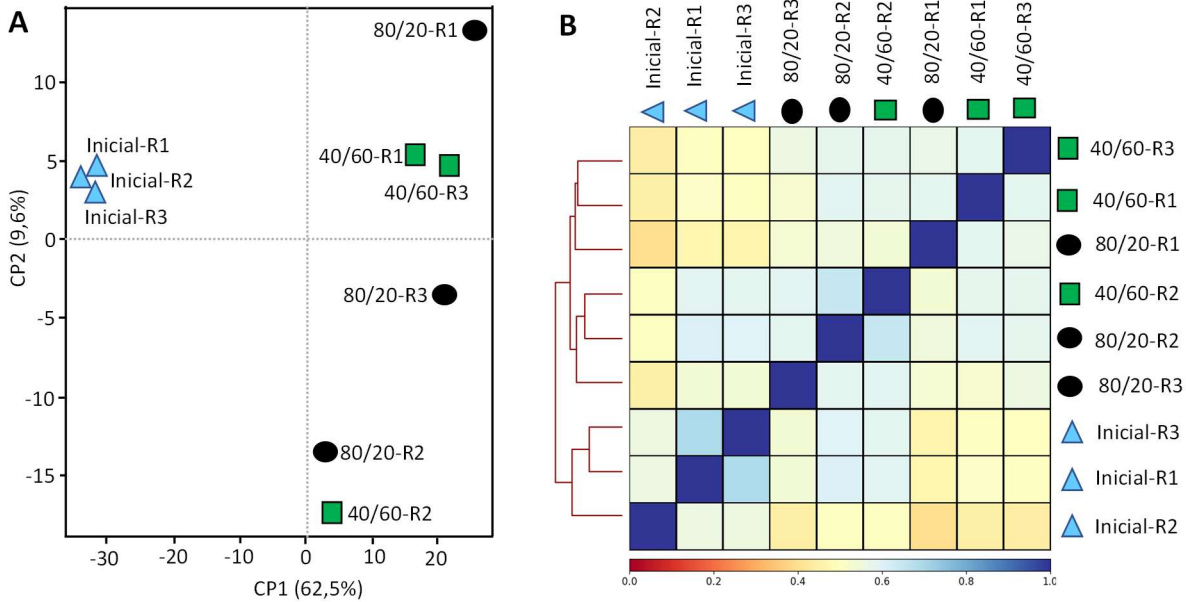


Figura 2 - 6. Análisis de componentes principales, basado en los transcriptomas originados en *HISAT2* de las muestras de estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*. Inicial: transcriptomas por réplica de zoeas recién nacidas sin haber sido alimentadas (Z1). 80/20 y 40/60: transcriptomas por réplica de zoeas (Z2) alimentadas durante nueve días con la respectiva dieta (A). Mapa de calor de los coeficientes de correlación de Spearman de los respectivos transcriptomas (B). Las tres réplicas de cada condición (R1 a R3) corresponden a la repetición del experimento con tres diferentes nacimientos.

2.4.4 Identificación de los unigenes diferencialmente expresados (DEGs)

El análisis comparativo de los transcriptomas se realizó en tres grupos: 80/20 vs Inicial, 40/60 vs Inicial y 80/20 vs 40/60. Se detectaron los genes diferencialmente expresados (P -ajustado $< 0,05$ y \log_2 (*fold change*) $> 0,5$), como respuesta a la condición de las larvas después de haber sido alimentadas durante nueve días con la respectiva dieta (80/20 o 40/60). Un total de 589 y 1.576 genes fueron significativamente expresados en 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial, mientras que entre 80/20 vs 40/60 no se presentaron diferencias significativas (Figura 2 - 7).

En la comparación 80/20 vs Inicial, un total de 223 genes se regularon positivamente, y 366 se regularon negativamente (Figura 2 - 7A). En 40/60 vs Inicial, 539 genes se regularon positivamente, y 1.037 negativamente (Figura 2 - 7B)

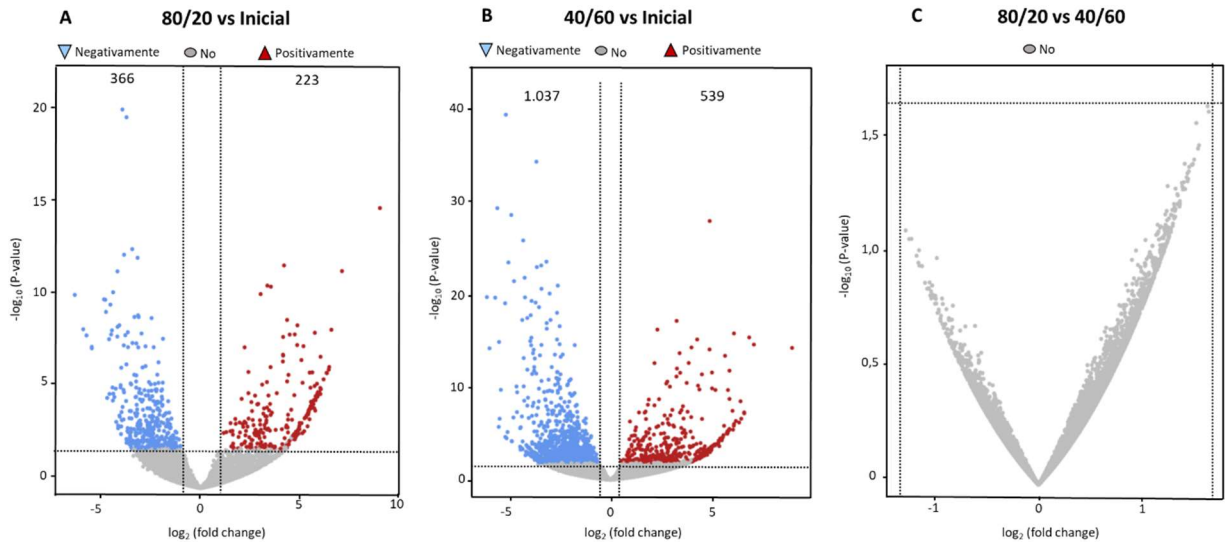


Figura 2 - 7. Gráficas de volcán de expresión de genes en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus* en los grupos de comparación 80/20 vs Inicial (A), 40/60 vs Inicial (B), y 80/20 vs 40/60 (C). Los puntos rojos y azules representan genes diferencialmente expresados (DEGs) significativamente regulados ($P\text{-ajustado} \leq 0,05$), ya sea de manera positiva ($\log_2(\text{fold change}) > 0,5$) en color rojo, o negativa ($\log_2(\text{fold change}) < 0$) en azul. Los puntos grises corresponden a genes no regulados diferencialmente.

2.4.5 Caracterización de los genes putativos que intervinieron en la digestión de las dietas, de los DEGs sobre-regulados en las comparaciones 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial

En la caracterización de los genes putativos que participaron en la digestión del alimento (DEGs regulados positiva y significativamente, $P\text{-adj} \leq 0,05$, y $\log_2(\text{FC}) > 0,5$), se observaron diferencias entre condiciones. En 80/20 vs Inicial, las zoeas presentaron cinco genes participando sólo en cuatro de las 10 rutas metabólicas del sistema digestivo: secreciones salivales (ko-04970), de ácido gástrico (ko-04971), digestión y absorción de proteínas (ko-04974) y minerales (ko-04978). En 40/60 vs Inicial se sobre-expresaron 13 genes, los identificados en las rutas mencionadas anteriormente, además de los involucrados en secreciones pancreáticas (ko-04972) y biliares (ko-04976), así como en la

digestión y absorción de grasas (ko-04975), carbohidratos (ko-04973), y colesterol (ko-04979) (Tabla 2 - 6).

Los procesos celulares relacionados con el transporte y catabolismo fueron las ruta con mayor sobre-expresión de genes, identificando un total de 13 genes en 80/20 y 46 en 40/60, donde el lisosoma (ko-04142) estuvo mayormente representado, detectando la presencia de algunas enzimas digestivas, principalmente proteasas, unas pocas glucosidasas y dos lipasas sólo en 40/60 (Tabla 2 - 6).

En las rutas relacionadas con el metabolismo de lípidos, aminoácidos (AA) y carbohidratos (CBH), se identificaron varios tipos de enzimas reguladas positiva y significativamente ($P\text{-adj} \leq 0,05$, y $\log_2(\text{FC}) > 0,5$). En las zoeas (Z2) después de nueve días de haber sido alimentadas con la dieta 80/20, se observó la presencia de cuatro enzimas que intervinieron únicamente en cuatro de las 16 rutas metabólicas existentes en el metabolismo de lípidos: biosíntesis de ácidos grasos (ko-00061), y su degradación (ko-00062), y metabolismo de ácido araquidónico (ko-00590), y de esfingolípidos(ko-00600). Las Z2 alimentadas con 40/60 presentaron actividad de 15 enzimas, y su presencia en 10 rutas metabólicas No se detectaron genes sobre-regulados en ninguna de las dos dietas para la biosíntesis secundaria de ácidos biliares (ko-00121), hormonas esteroides (ko-00140), glicerolípidos (ko-00561), ácido linoléico (ko-00591) y α -linolénico (ko-00592) (Tabla 2 - 7).

En las larvas alimentadas con la dieta 80/20, se identificaron 10 enzimas sobre-reguladas, relacionadas con el metabolismo de siete AA (arginina ko-00220, alania, aspartato y glutamato ko-00250, arginina y prolina ko-00330, histidina ko-00340, y tirosina ko-00350). En 40/60, las 12 enzimas identificadas participaron en el metabolismo de los AA anteriormente mencionados, además de la glicina, serina y treonina (ko-00260), cisteína y metionina (ko-00270), valina, leucina e isoleucina (ko-00280) y triptófano (ko-00380) (Tabla 2 - 8). Para el metabolismo de otros AA, solo se detectó en ambas condiciones, el metabolismo de β -alanina (ko-00410), compuestos del selenio (ko-00450) y glutatión (ko-00480) (Tabla 2 - 8).

El metabolismo de CBH para los tratamientos 80/20 y 40/60 identificó un total de 11 y 19 enzimas respectivamente, participando en las rutas de glucólisis/gluconeogénesis (ko-00010), ciclo del citrato (ko-00020), metabolismo de almidón y sacarosa (ko-00500), metabolismo de amino azúcares y nucleótidos (ko-00520), y metabolismo de piruvato (ko-00620) y glioxilato y dicarboxilato (ko-00640). Adicionalmente en 40/60 se detectaron enzimas en la ruta de la pentosa-fosfato (ko-00030), interconversión de pentosa y glucuronato (ko-00040), metabolismo de galactosa (ko-00052), ascorbato y aldatrato (ko-00053) y del propanato (ko-00640) (Tabla 2 - 9).

Tabla 2 - 6. Genes putativos positivamente regulados y expresados diferencialmente (P -ajustado $\leq 0,05$; \log_2 (fold change) $> 0,5$), identificados en las rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) asociados con el transporte y catabolismo de nutrientes en el sistema digestivo y procesos celulares, en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus* en los grupos de comparación 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial.

Categoría funcional	Ruta	Gen	Nombre	Comentarios	Unigene	Log ₂ (FC) ²
Sistemas del organismo (Sistema digestivo)	Secreción salival (ko-04970)	CALM	Calmodulina	Estimulación para producción de saliva	NODE_37575_length_742_cov_14.098124_g26729_i0.p1	4,79
	Secreción de ácido gástrico (ko-04971)	ACTB_G1	β -actina	Funcionamiento celular, soporte estructural	NODE_21266_length_1313_cov_60.161392_g13790_i0.p1	5,50
		CALM	Calmodulina	Regulación de secreciones gástricas	NODE_37575_length_742_cov_14.098124_g26729_i0.p1	4,79
	Dig. y abs.de proteínas (ko-04974)	PRCP	Lisosomal Pro-Xaa carboxipeptidasa	Proteasa (EC 3.4.16.2)	NODE_5861_length_3104_cov_24.479542_g3815_i0.p1	1,58
Absorción de minerales (ko-04978)	SLC39A4, ZIP4	Transportador de zinc	Absorción de zinc	NODE_20885_length_1335_cov_3.761275_g13544_i0.p1	5,39	
80/20 vs Inicial Procesos celulares (transporte y catabolismo)	Mitofagia animal (ko-04137)	RP-L40e, RPL40, UBA52	Subunidad grande de ubiquitina proteína ribosómica L40e	Proteína ribosomal	NODE_57337_length_512_cov_17.617711_g45363_i0.p1	5,57
	Autofagia animal (ko-04140)	CTSD	Catepsina D.	Proteasa (EC 3.4.23.5)	NODE_23555_length_1194_cov_5.768559_g15389_i0.p1	6,16
	Lisosoma (ko-04142)	LGMN	Legumaina	Proteasa (EC 3.4.22.34)	NODE_5816_length_3115_cov_24.495108_g3790_i0.p1	1,67
		CTSD	Catepsina D	Proteasa (EC 3.4.23.5)	NODE_23555_length_1194_cov_5.768559_g15389_i0.p1	6,16
		HEXA_B	β -L-N-acetilhexosaminidasa.	Glucosidasa (EC 3.2.1.52)	NODE_3838_length_3737_cov_250.691703_g1040_i13.p1	6,17
	Endocitosis (ko-04144)	CLTC	Clatrina	Recubre las vesículas intracelulares	NODE_20604_length_1354_cov_2.570881_g13348_i0.p1	5,08
		CLTC	Clatrina	Recubre las vesículas intracelulares	NODE_20604_length_1354_cov_2.570881_g13348_i0.p1	5,08
		TSG101, STP22, VPS23	Subunidad del complejo ESCRT-I TSG101	Invaginación de membrana	NODE_24478_length_1148_cov_8.189263_g16074_i0.p1	3,22
Fagosoma (ko-04145)	ACTB_G1	Actina F	Funcionamiento celular, soporte estructural	NODE_21266_length_1313_cov_60.161392_g13790_i0.p1	5,50	

Categoría funcional	Ruta	Gen	Nombre	Comentarios	Unigene	Log ₂ (FC) ²
Peroxisoma (ko-04146)		CALR	Calreticulina	Proteína residente del retículo endoplasmático	NODE_24037_length_1171_cov_7.591800_g1 5753_i0.p1	5,72
		TUBB	Tubulina β	Microtúbulos del citoesqueleto	NODE_18438_length_1494_cov_65.782007_g 11868_i0.p1	9,22
		PEX6	Peroxina 6	Tráfico de membrana	NODE_20733_length_1345_cov_393.175926_g13437_i0.p1	3,42
		PRDX1	Peroxisredoxina 1	Sistema antioxidante (EC 1.11.1.24)	NODE_39036_length_716_cov_13.358321_g2 8053_i0.p2	5,89
Sistemas del organismo (Sistema digestivo)	Secreción salival (ko-04970)	CALM	Calmodulina	Estimulación para la producción de saliva	NODE_37575_length_742_cov_14.098124_g2 6729_i0.p1	5,76
	Secreción de ácido gástrico (ko-04971)	ACTB_G1	β-actin	Funcionamiento celular, soporte estructural	NODE_21266_length_1313_cov_60.161392_g 13790_i0.p1	5,54
		CALM	Calmodulina	Regulación de secreciones gástricas	NODE_37575_length_742_cov_14.098124_g2 6729_i0.p1	5,76
	Secreciones pancreáticas (ko-04942)	RAC1	Rac GTPasa 1	Regulación de secreciones exocrinas	NODE_10235_length_2289_cov_35.346429_g 2397_i3.p3	1,39
	Dig. y abs. de carbohidratos (ko-04943)	AKT	Serina/treonina proteína quinasa no específica	Regulación de glucólisis (EC 2.7.11.1)	NODE_27482_length_1022_cov_31.391572_g 18338_i0.p1	2,64
	Dig. y abs. de proteínas (ko-04974)	PRCP	Lisosomal Pro-Xaa carboxipeptidasa	Proteasa (EC 3.4.16.2)	NODE_5861_length_3104_cov_24.479542_g3 815_i0.p1	1,76
	Dig. y abs. de grasas (ko-04975)	MTTP, MTP	Proteína microsomal transferidora de triglicéridos	Procesamiento y transporte de grasas de la dieta	NODE_3501_length_3880_cov_27.178282_g2 294_i0.p1	0,87
		ABCG5	Miembro 5 de subfamilia G del casete de unión a ATP	Transporte de esteroides	NODE_8880_length_2491_cov_43.297297_g5 723_i0.p1	1,05
	Secreciones biliares (ko-04976)	ABCG5	Miembro 5 de subfamilia G del casete de unión a ATP	Transporte de esteroides	NODE_8880_length_2491_cov_43.297297_g5 723_i0.p1	1,05
	Absorción de minerales (ko-04978)	SLC39A4, ZIP4	Transportador de zinc	Absorción de zinc	NODE_20885_length_1335_cov_3.761275_g1 3544_i0.p1	4,79
		FTH1	Ferritina	Almacenamiento de Fe (EC 1.16.3.2)	NODE_17107_length_1588_cov_607.359974_g4256_i4.p1	1,27
		ATP7A	ATPasa Tipo P de unión a Cobre	Absorción de cobre (EC 7.2.2.8)	NODE_4024_length_3664_cov_14.904011_g2 214_i1.p1	1,95
	Met. de colesterol (ko-04979)	ABCG5	Miembro 5 de subfamilia G del casete de unión a ATP	Transporte de esteroides	NODE_8880_length_2491_cov_43.297297_g5 723_i0.p1	1,05

40/60 vs Inicial

Categoría funcional	Ruta	Gen	Nombre	Comentarios	Unigene	Log ₂ (FC) ²
40/60 vs Inicial Procesos celulares (transporte y catabolismo)	Mitofagia animal (ko-04137)	RP-L40e, RPL40, UBA52	Subunidad grande de ubiquitina proteína ribosómica L40e	Proteína ribosomal	NODE_57337_length_512_cov_17.617711_g4 5363_i0.p1	5,49
		RP-S27Ae, RPS27A, UBA80	Subunidad pequeña de ubiquitina proteína ribosómica S27Ae	Proteína ribosomal	NODE_8299_length_2593_cov_5170.634041_ g5352_i0.p1	0,88
		UBC	Ubiquitina C	Regulador de la degradación de proteínas	NODE_17023_length_1596_cov_7.084034_g1 0940_i0.p1	3,73
	Autofagia animal (ko-04140)	AKT	Serina/treonina-proteína quinasa	Catalizadora de la fosforilación de serina o treonina (EC 2.7.11.1)	NODE_27482_length_1022_cov_31.391572_g 18338_i0.p1	2,64
		RAB1A	Proteína de unión asociada a Ras	Regula transporte de vesículas	NODE_29695_length_944_cov_5.478212_g20 098_i0.p2	4,32
		HMGB1	Proteínas de alta movilidad del grupo 1	Proteína de señalización en procesos celulares	NODE_23454_length_1198_cov_926.182768_ g15313_i0.p1	0,96
		CTSD	Catepsina D.	Proteasa (EC 3.4.23.5)	NODE_23555_length_1194_cov_5.768559_g1 5389_i0.p1	5,41
		CTS	Catepsina L	Proteasa (EC 3.4.22.15)	NODE_28830_length_974_cov_5.811892_g19 399_i0.p1	3,46
		CTSB	Catepsina B	Proteasa (EC 3.4.22.1)	NODE_5298_length_3256_cov_31.711257_g3 453_i0.p1	0,94
		LGMN	Legumaina	Proteasa (EC 3.4.22.34)	NODE_5816_length_3115_cov_24.495108_g3 790_i0.p1	1,64
		CTSA, CPY	Carboxipeptidasa C	Proteasa (EC 3.4.16.5)	NODE_3781_length_3761_cov_225.131466_g 1379_i4.p1	1,79
		CTSB	Catepsina B	Proteasa (EC 3.4.22.1)	NODE_5298_length_3256_cov_31.711257_g3 453_i0.p1	0,94
		CTSL	Catepsina L	Proteasa (EC 3.4.22.15)	NODE_28830_length_974_cov_5.811892_g19 399_i0.p1	3,46
	Lisosoma (ko-04142)	CTSD	Catepsina D	Proteasa (EC 3.4.23.5)	NODE_23555_length_1194_cov_5.768559_g1 5389_i0.p1	5,41
		TPP1, CLN2	Tripeptidil-peptidasa I	Proteasa (EC 3.4.14.9)	NODE_33524_length_833_cov_3.227041_g23 245_i0.p1	5,03
		HEXA_B	β-L-N- acetilhexosaminidasa.	Glucosidasa (EC ¹ 3.2.1.52)	NODE_3838_length_3737_cov_250.691703_g 1040_i13.p1	5,87
		uidA, GUSB	β-glucuronidasa.	Glucosidasa (EC 3.2.1.31)	NODE_12544_length_2007_cov_6.556691_g8 077_i0.p1	1,49
		SMPD1, ASM	Esfingomielina fosfodiesterasa	Esfingomielinasa (EC 3.1.4.12)	NODE_43606_length_645_cov_6.620805_g32 213_i0.p1	2,11
		PPT	Palmitoil [proteína] hidrolasa	Lipasa (EC3.1.2.22)	NODE_28011_length_1003_cov_4.492662_g1 8760_i0.p1	4,61

Categoría funcional	Ruta	Gen	Nombre	Comentarios	Unigene	Log ₂ (FC) ²	
40/60 vs Inicial	Procesos celulares (transporte y catabolismo)	Endocitosis (ko-04144)	CLTC	Clatrina	Recubre las vesículas intracelulares	NODE_20604_length_1354_cov_2.570881_g13348_i0.p1	4,39
			DNM1_3	Dinamina GTPasa	Proteasa (EC 3.6.5.5).	NODE_32677_length_853_cov_36.682836_g8994_i1.p1	2,91
			MADHIP, SARA	<i>Mothers against decapentaplegic interacting protein</i>	Vía de señalización	NODE_17887_length_1530_cov_10.894666_g5638_i1.p1	3,90
			SPG20	Espartina	Interviene en almacena-miento de lípidos	NODE_16644_length_1625_cov_6.953046_g2281_i2.p1	2,66
			CLTC	Clatrina	Recubre las vesículas intracelulares	NODE_20604_length_1354_cov_2.570881_g13348_i0.p1	4,39
			NEDD4, RSP5	E3 ubiquitina-proteína ligasa NEDD4	Interviene en degradación de proteínas (EC 2.3.2.26)	NODE_11494_length_2129_cov_8.493269_g3493_i1.p1	3,24
			ACTR3, ARP3	Proteína relacionada con actina 3	Controla la deposición de actina	NODE_15232_length_1745_cov_36.422759_g9787_i0.p1 NODE_4985_length_3345_cov_993.692658_g3255_i0.p1	1,97 1,41
			RAB5C	Proteína de unión asociada a Ras	Regula la endocitosis temprana	NODE_29302_length_957_cov_4.234581_g19776_i0.p1	4,03
			VPS35	Proteína vacuolar asociada al ortólogo 35	Implicada en autofagia	NODE_762_length_6090_cov_55.254759_g188_i2.p1	0,89
			TSG101, STP22, VPS23	Subunidad del complejo ESCRT-I TSG101	Invaginación de membrana	NODE_24478_length_1148_cov_8.189263_g16074_i0.p1	2,89
			ACTB_G1	Actina F	Funcionamiento celular, soporte estructural	NODE_21266_length_1313_cov_60.161392_g13790_i0.p1	5,54
			RAB5C	Proteína de unión asociada a Ras	Regula la endocitosis temprana	NODE_29302_length_957_cov_4.234581_g19776_i0.p1	4,03
			CALR	Calreticulina	Proteína residente del retículo endoplasmático	NODE_24037_length_1171_cov_7.591800_g15753_i0.p1	5,36
			DYNC1I, DNCI	Dineína citoplasmática 1 cadena intermedia	Transporte intracelular	NODE_3841_length_3735_cov_318.157895_g1196_i3.p1	1,57
			TUBA	Tubulina α	Microtúbulos del citoesqueleto	NODE_12183_length_2049_cov_249.283000_g7843_i0.p1	1,25
			TUBB	Tubulina β	Microtúbulos del citoesqueleto	NODE_18438_length_1494_cov_65.782007_g11868_i0.p1	8,96
			CTSL	Catepsina L.	Proteasa (EC 3.4.22.15)	NODE_28830_length_974_cov_5.811892_g19399_i0.p1	3,46
			Fagosoma (ko-04145)				

Categoría funcional	Ruta	Gen	Nombre	Comentarios	Unigene	Log ₂ (FC) ²
40/60 vs Inicial Procesos celulares (transporte y catabolismo)	Peroxisoma (ko-04146)	RAC1	Sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras	Conduce cambios en morfología nuclear	NODE_10235_length_2289_cov_35.346429_g2397_i3.p3	1,35
		PEX6	Peroxina 6	Tráfico de membrana	NODE_20733_length_1345_cov_393.175926_g13437_i0.p1	3,37
		PEX12	Peroxina 12	Tráfico de membrana	NODE_18088_length_1517_cov_121.408038_g8380_i1.p2	1,28
		PEX11	Peroxina 11	Tráfico de membrana	NODE_5726_length_3142_cov_95.195280_g3733_i0.p1	0,77
		PRDX1	Peroxirredoxina 1	Sistema antioxidante (EC 1.11.1.24)	NODE_39036_length_716_cov_13.358321_g28053_i0.p2	5,53
		SOD1	Superóxido dismutasa, familia Cu-Zn	Proteínas antioxidantes con cofactores Cu o Zn (EC 1.15.1.1)	NODE_16822_length_1610_cov_52.891095_g10809_i0.p1	1,59
		ACOX1, ACOX3	Acil-CoA oxidasa.	β-oxidación AG (EC 1.3.3.6)	NODE_13472_length_1904_cov_1703.138005_g8644_i0.p1	1,50
		HSD17B4	Enoil-CoA hidratasa 2	β-oxidación (EC 4.2.1.119)	NODE_45166_length_625_cov_3.746528_g33658_i0.p1	3,88
		fadA, fadI	Acetil-CoA aciltransferasa 1 (tiolasa)	Síntesis de mevalonato (EC 2.3.1.16)	NODE_31264_length_893_cov_3.901659_g21381_i0.p1	3,35
		CRAT	Carnitina O-acetiltransferasa.	Transporte de Ác. grasos (EC 2.3.1.7)	NODE_4487_length_3500_cov_61.591713_g2930_i0.p1	2,66

1: Es el número EINECS (*European Inventory of Existing Commercial Chemicals*) o número ELINCS (*European List of Notified Chemical Substances*). 2: Fold change (FC).

Tabla 2 - 7. Genes putativos de enzimas positivamente reguladas y expresadas diferencialmente (P -ajustado $\leq 0,05$; \log_2 (fold change) $> 0,5$), identificadas en las rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) asociadas al metabolismo de lípidos en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus* en los grupos de comparación 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial.

	Categoría funcional	Gen	Nombre de la enzima	Tipo	Código EC ²	Unigen	Log ₂ (FC) ³	No hits
80/20 vs Inicial	Biosíntesis de AG ¹ (ko-00061)	ACSBG	Acil-CoA sintetasas de cadena larga	Lg ⁴	6.2.1.3	NODE_45312_length_623_cov_4.045296_g33794_i0.p3	5,34	1
	Degradación de AG (ko-00071)	ACSBG	Acil-CoA sintetasas de cadena larga	Lg	6.2.1.3	NODE_45312_length_623_cov_4.045296_g33794_i0.p3	5,34	1
	Met.de ácido araquidónico (ko-00590)	HPGDS	Prostaglandina-D sintasa	I ⁵	5.3.99.2	NODE_23863_length_1180_cov_3.858532_g15616_i0.p2	5,05	1
					5.3.99.2	NODE_55491_length_526_cov_2.725367_g43552_i0.p1	4,71	1
Metabolismo de esfingolípidos (ko-00600)	HEXA_B	β-L-N-acetilhexosaminidasa.	H ⁶	3.2.1.52	NODE_3838_length_3737_cov_250.691703_g1040_i13.p1	6,17	1	
40/60 vs Inicial	Biosíntesis de AG (ko-00061)	ACSBG	Acil-CoA sintetasas de cadena larga	Lg	6.2.1.3	NODE_14144_length_1842_cov_3.601227_g9073_i0.p1	5,74	1
					6.2.1.3	NODE_18289_length_1504_cov_4.239175_g11769_i0.p1	0,99	1
	Elongación de AG (ko-00062)	PPT	Palmitoil[proteína] hidrolasa	H	3.1.2.22	NODE_28011_length_1003_cov_4.492662_g18760_i0.p1	4,61	1
	Degradación de AG (ko-00071)	ACSBG	Acil-CoA sintetasas de cadena larga	Lg	6.2.1.3	NODE_14144_length_1842_cov_3.601227_g9073_i0.p1	5,74	1
					6.2.1.3	NODE_18289_length_1504_cov_4.239175_g11769_i0.p1	0,99	1
		ACOX1, ACOX3	Acil-CoA oxidasa	O ⁷	1.3.3.6	NODE_13472_length_1904_cov_1703.138005_g8644_i0.p1	1,50	1
		fadA, fadI	Acetil-coenzima A aciltransferasa 1	T ⁸	2.3.1.16	NODE_31264_length_893_cov_3.901659_g21381_i0.p1	3,35	1
	Biosíntesis de esteroides (ko-00100)	DHCR7	7-dehidrocolesterol reductasa	O	1.3.1.21	NODE_9908_length_2330_cov_16.632617_g6383_i0.p1	1,47	2
Bios. primaria de ác. biliares (ko-00120)	HSD17B4	3α,7α,12α-trihidroxu-5β-colest-24-enoil-CoA desidratasa	L ⁹	4.2.1.107	NODE_45166_length_625_cov_3.746528_g33658_i0.p1	3,88	2	
				4.2.1.119	NODE_45166_length_625_cov_3.746528_g33658_i0.p1	3,88	1	
Metabolismo de glicerofosfolípidos (ko-00561)	pgsA, PGS1	CDP-diacilglicerol glicerol-3-fosfato 3-fosfatidiltransferasa	T	2.7.8.5	NODE_6633_length_2931_cov_1140.831367_g3277_i1.p1	0,72	1	

Categoría funcional	Gen	Nombre de la enzima	Tipo	Código EC ²	Unigen	Log ₂ (FC) ³	No hits
Met. de ésteres en lípidos (ko-00565)	TMEM189	Plasmanil etanolamina desaturasa	O	1.14.19.77	NODE_41712_length_672_cov_13.147673_g30470_i0.p1	2,17	1
Met.de ácido araquidónico (ko-00590)	HPGDS	Prostaglandina-D sintasa	I	5.3.99.2	NODE_23863_length_1180_cov_3.858532_g15616_i0.p2	3,91	1
Metabolismo de esfingolípidos (ko-00600)	ASAH2	Ceramidasa	H	3.5.1.23	NODE_33331_length_838_cov_3.650190_g23090_i0.p1	4,99	3
	SMPD1, ASM	Esfingomielina fosfodiesterasa	H	3.1.4.12	NODE_43606_length_645_cov_6.620805_g32213_i0.p1	2,11	1
	SMPD2	Esfingomielina fosfodiesterasa 2	H	3.1.4.12	NODE_4565_length_3477_cov_27.060677_g2989_i0.p1	0,69	1
HEXA_B	β-L-N-acetilhexosaminidasa.	H	3.2.1.52	NODE_3838_length_3737_cov_250.691703_g1040_i13.p1	5,87	1	
Bios. Ác. grasos insaturados (ko-01040)	HSD17B4	3α,7α,12α-trihidroxu-5β-colest-24-enoil-CoA dehidratasa	L	4.2.1.107	NODE_45166_length_625_cov_3.746528_g33658_i0.p1	3,88	2

1: Ácidos grasos (AG). 2: Es el número EINECS (*European Inventory of Existing Comercial Chemicals*) o número ELINCS (*European List of Notified Chemical Substances*). 3: *Fold change* (FC). 4: Ligasas (Lg). 5: Isomerasas (I). 6: Hidrolasas (H). 7: Oxidoreductasas (O). 8: Transferasas (T). 9: Liasas (L).

Tabla 2 - 8. Genes putativos de enzimas positivamente reguladas y expresadas diferencialmente (P -ajustado $\leq 0,05$; \log_2 (fold change) $> 0,5$), identificadas en las rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) asociadas al metabolismo de aminoácidos (AA), en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus* en los grupos de comparación 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial.

	Categoría funcional	Gen	Nombre de la enzima	Tipo	Código EC ¹	Unigen	Log ₂ (FC) ²	No hits
80/20 vs Inicial (Metabolismo de AA)	Biosíntesis de arginina (ko-00220)	glnA, GLUL	Glutamato—amoniaco ligasa.	Lg ³	6.3.1.2	NODE_21699_length_1289_cov_20.069355_g14073_i0.p1	6,73	1
					6.3.1.2	NODE_22079_length_1268_cov_4.971288_g14346_i0.p1	5,19	1
		argG, ASS1	Argininsuccinato sintasa.	Lg	6.3.4.5	NODE_31878_length_875_cov_3.153753_g21888_i0.p1	4,90	1
	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato (ko-00250)	argG, ASS1	Argininsuccinato sintasa.	Lg	6.3.4.5	NODE_31878_length_875_cov_3.153753_g21888_i0.p1	4,90	1
		glnA, GLUL	Glutamato—amoniaco ligasa.	Lg	6.3.1.2	NODE_21699_length_1289_cov_20.069355_g14073_i0.p1	6,73	1
	Metabolismo de arginina y prolina (ko-00330)	CKB, CKM	Creatina quinasa.	T ⁴	2.7.3.2	NODE_20799_length_1341_cov_4.449690_g13478_i0.p1	4,94	1
		speG, SAT	Diamina N-acetiltransferasa.	T	2.3.1.57	NODE_19882_length_1399_cov_4504.436296_g12832_i0.p1	2,60	1
	Metabolismo de histidina (ko-00340)	ALDH3	Aldehído deshidrogenasa (NAD(P)+).	O ⁵	1.2.1.5	NODE_33928_length_823_cov_3.282946_g23575_i0.p1	4,44	1
		TDC-1	Tirosina decarboxilasa.	L ⁶	4.1.1.25	NODE_12898_length_1968_cov_17.167275_g8293_i0.p1	2,88	1
	Metabolismo de tirosina (ko-00350)	ALDH3	Aldehído deshidrogenasa (NAD(P)+)	O	1.2.1.5	NODE_33928_length_823_cov_3.282946_g23575_i0.p1	4,44	5
HGD, hmgA		3,4-dihidroxifenil acetato 2,3-dioxigenasa	O	1.13.11.5	NODE_19696_length_1412_cov_10.050624_g12714_i0.p1	3,38	1	
80/20 vs Inicial (Met. de otros AA)	Metabolismo de β-alanina (ko-00410)	ALDH3	Aldehído deshidrogenasa (NAD(P)+)	O	1.2.1.5	NODE_33928_length_823_cov_3.282946_g23575_i0.p1	4,44	1
	Metabolismo de compuestos del selenio (ko-00450)	PAPSS	Sulfato adenililtransferasa.	T	2.7.7.4	NODE_30099_length_930_cov_80416.346198_g6277_i1.p1	3,29	1
	Metabolismo del glutatión (ko-00480)	ANPEP, CD13	Membrana alanil aminopeptidasa.	H ⁷	3.4.11.2	NODE_11690_length_2108_cov_6.063137_g7519_i0.p1	3,01	2
GST, gst			T	2.5.1.18	NODE_17815_length_1535_cov_673.555855_g5594_i2.p1	2,68	1	

Categoría funcional	Gen	Nombre de la enzima	Tipo	Código EC ¹	Unigen	Log ₂ (FC) ²	No hits	
40/60 vs Inicial (Met. de AA)		Gutación-S-Transferasa		2.5.1.18	NODE_26643_length_1054_cov_11.879602_g17699_i0.p1	5,77	1	
				2.5.1.18	NODE_23863_length_1180_cov_3.858532_g15616_i0.p2	5,05	1	
				2.5.1.18	NODE_55491_length_526_cov_2.725367_g43552_i0.p1	4,71	1	
	Biosíntesis de arginina (ko-00220)	glnA, GLUL	Glutamato—amoniaco ligasa.	Lg	6.3.1.2	NODE_21699_length_1289_cov_20.069355_g14073_i0.p1	6,41	1
					6.3.1.2	NODE_22079_length_1268_cov_4.971288_g14346_i0.p1	5,87	1
	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato (ko-00250)	glnA, GLUL	Glutamato—amoniaco ligasa.	Lg	6.3.1.2	NODE_21699_length_1289_cov_20.069355_g14073_i0.p1	6,41	1
					6.3.1.2	NODE_22079_length_1268_cov_4.971288_g14346_i0.p1	5,87	1
	Metabolismo de glicina, serina y treonina (ko-00260)	glyA, SHMT	Glicina hidroximetil transferasa	T	2.1.2.1	NODE_15651_length_1711_cov_137.521059_g10039_i0.p1	0,72	1
	Metabolismo de cisteína y metionina (ko-00270)	CDO1	Cisteína dioxigenasa	O	1.13.11.20	NODE_4912_length_3368_cov_98.227779_g3206_i0.p1	1,59	1
	Degradación de valina, leucina e isoleucina (ko-00280)	fadA, fadI	Acetil-CoA C-aciltransferasa.	T	2.3.1.16	NODE_31264_length_893_cov_3.901659_g21381_i0.p1	3,35	1
	Metabolismo de arginina y prolina (ko-00330)	CKB, CKM	Creatina quinasa.	T	2.7.3.2	NODE_21736_length_1287_cov_4.390145_g14103_i0.p1	4,96	1
		E2.7.3.3	Arginina quinasa.	T	2.7.3.3	NODE_20799_length_1341_cov_4.449690_g13478_i0.p1	4,43	1
	Metabolismo de tirosina (ko-00350)	TYR	Monofenol monoxigenasa (tirosinasa)	O	1.14.18.1	NODE_10760_length_2218_cov_4.539880_g6932_i0.p1	6,35	4
		TDC-1	Tirosina decarboxilasa	L	4.1.1.25	NODE_12898_length_1968_cov_17.167275_g8293_i0.p1	2,73	1
		HGD, hmgA	3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenasa	O	1.13.11.5	NODE_19696_length_1412_cov_10.050624_g12714_i0.p1	2,39	1
	Metabolismo del triptófano (ko-00380)	TDO2, kynA	Triptófano 2-3 dioxigenasa	O	1.13.11.11	NODE_9548_length_2382_cov_2622.298757_g6038_i1.p1	1,66	1
		KYNU, kynU	Quinureninasa	H	3.7.1.3	NODE_10427_length_2261_cov_104.742315_g6714_i0.p1	1,44	3
Metabolismo de β-alanina (ko-00410)	ACOX1, ACOX3	Acil-CoA oxidasa.	O	1.3.3.6	NODE_13472_length_1904_cov_1703.138005_g8644_i0.p1	1,50	1	

	Categoría funcional	Gen	Nombre de la enzima	Tipo	Código EC ¹	Unigen	Log ₂ (FC) ²	No hits
40/60 vs Inicial (Met. de otros AA)	Metabolismo de compuestos del selenio (ko-00450)	TXNRD	Tioredoxina-disulfuro reductasa.	O	1.8.1.9	NODE_11349_length_2146_cov_95004.270386_g5866_i2.p1	4,03	2
		PAPSS	Sulfato adenililtransferasa.	T	2.7.7.4	NODE_30099_length_930_cov_80416.346198_g6277_i1.p1	2,93	1
					2.7.7.4	NODE_34750_length_802_cov_78379.810093_g6277_i2.p1	2,67	1
	Metabolismo del glutation (ko-00480)	ANPEP, CD13	Membrana alanil aminopeptidasa.	H	3.4.11.2	NODE_11690_length_2108_cov_6.063137_g7519_i0.p1	2,86	2
		PGD, gnd, gntZ	Fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilante).	O	1.1.1.44	NODE_23462_length_1198_cov_33.365535_g13474_i1.p1	2,87	1
					2.5.1.18	NODE_17815_length_1535_cov_673.555855_g5594_i2.p1	2,14	1
					2.5.1.18	NODE_26643_length_1054_cov_11.879602_g17699_i0.p1	6,45	1
					2.5.1.18	NODE_7443_length_2750_cov_194.328027_g3842_i3.p1	1,40	1
GST, gst	Gutación-S-Transferasa	T	2.5.1.18	NODE_23863_length_1180_cov_3.858532_g15616_i0.p2	3,91	1		

1: Es el número EINECS (*European Inventory of Existing Commercial Chemicals*) o número ELINCS (*European List of Notified Chemical Substances*). 2: Fold change (FC). 3: Ligasas (Lg). 4: Transferasas (T). 5: Oxidoreductasas (O). 6: Liasas (L). 7: Hidrolasas (H).

Tabla 2 - 9. Genes putativos de enzimas positivamente reguladas y expresadas diferencialmente (P -ajustado $\leq 0,05$; \log_2 (*fold change*) $> 0,5$), identificadas en las rutas *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) asociadas al metabolismo de carbohidratos, en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus* en los grupos de comparación 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial.

Categoría funcional	Gen	Nombre de la enzima	Tipo	Código EC ¹	Unigen	Log ₂ (FC) ²	No hits
Glucólisis / Gluconeogénesis (ko-00010)	GAPDH, gapA	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (fosforilante).	O ³	1.2.1.12	NODE_22896_length_1226_cov_5.083263_g14911_i0.p1	4,54	1
	pckA, PCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	L ⁴	4.1.1.32	NODE_12079_length_2062_cov_1161.163934_g982_i3.p1	3,42	1
					NODE_11088_length_2175_cov_1296.046566_g982_i1.p1	2,27	1
ALDH3	Aldehído deshidrogenasa (NAD(P)+).	O	1.2.1.5	NODE_33928_length_823_cov_3.282946_g23575_i0.p1	4,44	1	
Ciclo del citrato (ciclo de TCA) (ko-00020)	pckA, PCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	L	4.1.1.32	NODE_12079_length_2062_cov_1161.163934_g982_i3.p1	3,42	1
					NODE_11088_length_2175_cov_1296.046566_g982_i1.p1	2,27	1
Metabolismo de almidón y sacarosa (ko-00500)	ENPP1_3	Nucleótido pirofosfatasa	H ⁵	3.6.1.9	NODE_13033_length_1952_cov_220.557015_g8369_i0.p1	3,57	1
	GBE1, glgB	Enzima ramificadora del glucógeno.	T ⁶	2.4.1.18	NODE_18049_length_1520_cov_7.991162_g6051_i2.p1	4,49	1
Metabolismo de amino azúcares y nucleótidos (ko-00520)	CHIA, CHT1	Quitinasa.	H	3.2.1.14	NODE_10018_length_2316_cov_8.455227_g6454_i0.p1	4,70	2
	HEXA_B	β -L-N- acetilhexosaminidasa.	H	3.2.1.52	NODE_3838_length_3737_cov_250.691703_g1040_i13.p1	6,17	1
	gmd, GMDS	GDP-manosa 4,6- dehidratasa.	L	4.2.1.47	NODE_23956_length_1175_cov_5.346359_g15685_i0.p2	5,91	1
Metabolismo del piruvato (ko-00620)	pckA, PCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa (GTP).	L	4.1.1.32	NODE_12079_length_2062_cov_1161.163934_g982_i3.p1	3,42	1
Metabolismo del glioilato y dicarboxilato (ko-00630)	glNA, GLUL	Glutamato—amoniaco ligasa.	Lg ⁷	6.3.1.2	NODE_21699_length_1289_cov_20.069355_g14073_i0.p1	6,73	1
					NODE_22079_length_1268_cov_4.971288_g14346_i0.p1	5,19	1

Categoría funcional	Gen	Nombre de la enzima	Tipo	Código EC ¹	Unigen	Log ₂ (FC) ²	No hits
Glucólisis / Gluconeogénesis (ko-00010)	GAPDH, gapA	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (fosforilante).	O	1.2.1.12	NODE_22896_length_1226_cov_5.083263_g14911_i0.p1	5,23	1
				4.1.1.32	NODE_11088_length_2175_cov_1296.046566_g982_i1.p1	2,31	1
	pckA, PCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	L	4.1.1.32	NODE_12079_length_2062_cov_1161.163934_g982_i3.p1	2,64	1
				4.1.1.32	NODE_14032_length_1852_cov_1252.595119_g982_i5.p1	1,69	1
				4.1.1.32	NODE_1490_length_5125_cov_672.082939_g982_i0.p1	0,89	1
Ciclo del citrato (ciclo de TCA) (ko-00020)	pckA, PCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	L	4.1.1.32	NODE_11088_length_2175_cov_1296.046566_g982_i1.p1	2,31	2
				4.1.1.32	NODE_12079_length_2062_cov_1161.163934_g982_i3.p1	2,64	1
				4.1.1.32	NODE_14032_length_1852_cov_1252.595119_g982_i5.p1	1,69	1
				4.1.1.32	NODE_1490_length_5125_cov_672.082939_g982_i0.p1	0,89	1
Ruta de la pentosa fosfato (ko-00030)	PGD, gnd, gntZ	Fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilante).	O	1.1.1.44	NODE_23462_length_1198_cov_33.365535_g13474_i1.p1	2,87	1
	gntZ, GND1	Fosfogluconato deshidrogenasa	O	1.1.1.343	NODE_23462_length_1198_cov_33.365535_g13474_i1.p1	2,87	1
Interconversión de pentosa y glucuronato (ko-00040)	uidA, GUSB	β-glucuronidasa.	H	3.2.1.31	NODE_12544_length_2007_cov_6.556691_g8077_i0.p1	1,49	1
	DHDH	D-xilosa 1-deshidrogenasa (NADP+).	O	1.1.1.179	NODE_14493_length_1809_cov_18.642045_g3711_i4.p1	1,54	1
Metabolismo de galactosa (ko-00052)	galK	Galactoquinasa	T	2.7.1.6	NODE_14590_length_1800_cov_40.362650_g9367_i0.p1	1,33	1
	malZ	α-glucosidasa	H	3.2.1.20	NODE_12925_length_1965_cov_7.891962_g3689_i1.p1	2,58	201
Metabolismo del ascorbato y aldarato (ko-00053)	uidA, GUSB	β-glucuronidasa.	H	3.2.1.31	NODE_12544_length_2007_cov_6.556691_g8077_i0.p1	1,49	1
	malZ	α-glucosidasa	H	3.2.1.20	NODE_12925_length_1965_cov_7.891962_g3689_i1.p1	2,58	2
Metabolismo de almidón y sacarosa (ko-00500)	ENPP1_3	Nucleótido pirofosfatasa	H	3.6.1.9	NODE_13033_length_1952_cov_220.557015_g8369_i0.p1	3,49	1
				3.6.1.9	NODE_13082_length_1946_cov_220.974170_g8369_i1.p1	3,25	1
	GBE1, glgB	Enzima ramificadora del glucógeno.	T	2.4.1.18	NODE_18049_length_1520_cov_7.991162_g6051_i2.p1	3,50	1
	CHIA, CHT1	Quitinasa.	H	3.2.1.14	NODE_10018_length_2316_cov_8.455227_g6454_i0.p1	4,51	2

40/60 vs Inicial

Categoría funcional	Gen	Nombre de la enzima	Tipo	Código EC ¹	Unigen	Log ₂ (FC) ²	No hits
Metabolismo de amino azúcares y nucleótidos (ko-00520)	HEXA_B	β-L-N-acetilhexosaminidasa.	H	3.2.1.52	NODE_3838_length_3737_cov_250.691703_g1040_i13.p1	5,87	1
	gmd, GMDS	GDP-manosa 4,6-dehidratasa.	L	4.2.1.47	NODE_23956_length_1175_cov_5.346359_g15685_i0.p2	4,59	1
	TSTA3, fcl	GDP-L-fucosa sintasa.	O	1.1.1.271	NODE_13778_length_1875_cov_26.414020_g8840_i0.p1	1,56	1
Metabolismo del piruvato (ko-00620)	pckA, PCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa (GTP).	L	4.1.1.32	NODE_1490_length_5125_cov_672.082939_g982_i0.p1	0,89	1
Metabolismo del glicoxilato y dicarboxilato (ko-00630)	glnA, GLUL	Glutamato—amoniaco ligasa.	L	6.3.1.2	NODE_21699_length_1289_cov_20.069355_g14073_i0.p1	6,41	1
				6.3.1.2	NODE_22079_length_1268_cov_4.971288_g14346_i0.p1	5,87	1
	glyA, SHMT	Glicina hidroximetiltransferasa.	T	2.1.2.1	NODE_15651_length_1711_cov_137.521059_g10039_i0.p1	0,72	1
Metabolismo del propanoato (ko-00640)	ACOX1, ACOX3	Acil-CoA oxidasa.	O	1.3.3.6	NODE_13472_length_1904_cov_1703.138005_g8644_i0.p1	1,50	1

1: Es el número EINECS (*European Inventory of Existing Commercial Chemicals*) o número ELINCS (*European List of Notified Chemical Substances*). 2: Fold change (FC). 3: Oxidoreductasas (O). 4: Liasas (L). 5: Hidrolasas (H). 6: Transferasas (T). 7: Ligasas (Lg).

2.5 Discusión

En el presente estudio se investigaron los patrones de expresión de genes relacionados con el metabolismo de los nutrientes provenientes de la dieta, entre las dos primeras fases de zoea (Z1 y Z2) de *C. sapidus*, en un ensayo de alimentación por nueve días en el cual las Z1 recién eclosionadas, se alimentaron con rotíferos enriquecidos en base a dos ingredientes (Ch/Spr) en dos diferentes proporciones: 80/20 y 40/60. Los resultados en Z2 revelaron que, dependiendo de la dieta, la expresión funcional de algunos genes es afectada, encontrando un mayor número de *DEGs* en las larvas alimentadas con la dieta con mayor contenido de lípidos (40/60). Varias rutas metabólicas reguladas positiva y significativamente ($P\text{-adj} \leq 0,05$, y $\log_2(FC) > 0,5$) fueron detalladas para conocer las enzimas y genes putativos que intervinieron en el funcionamiento al iniciarse la alimentación exógena. Desde las fases larvales tempranas, se pudo observar en *C. sapidus* que la expresión de los genes, es condicionada por el tipo de dieta suministrada,.

2.5.1 Extracción de ARN y evaluación de su calidad

La categorización del *RIN* (*RNA Integrity Number*), fue desarrollada en base a organismos modelo en su mayoría de vertebrados, principalmente humanos, ratones y ratas, teniendo en cuenta la relación entre las unidades ribosomales 18S y 28S (Schroeder *et al.*, 2006). De acuerdo a la escala establecida, valores ≥ 7 se consideran de buena calidad y apropiados para *RNA-seq*, siendo usualmente usado como un valor para garantizar resultados por las empresas de secuenciación (Jahn *et al.*, 2008). Bajo esta premisa, las muestras obtenidas en el presente estudio corresponderían a muestras fuertemente degradadas (1,6 a 4,7); sin embargo, estudios en artrópodos registran que se presenta una desnaturalización en la fracción ribosomal 28S que la subdivide en dos pequeños fragmentos produciendo una aparente degradación del ARN (McCarthy *et al.*, 2015). Estudios de la calidad del RIN en más de 25 órdenes de artrópodos, incluidos varios crustáceos decápodos, dentro de ellos *C. sapidus*, dilucidaron que este fenómeno se presentó en aproximadamente el 90 % de las especies, incluida la jaiba azul. Análisis posteriores de *RNA-seq* de alto rendimiento y ensamblajes del transcriptoma en algunas

de las muestras, ilustraron aún más las limitaciones del *RIN* para caracterizar con precisión la calidad del ARN en organismos no modelo (Deleo *et al.*, 2018), como es el caso del presente estudio. Dado que la técnica de *RNA-seq* se ha convertido en un método común para las investigaciones de ARN en los últimos años, cada vez más perfiles de ARN ribosomal de invertebrados sugieren que esta forma de desnaturalización 28S es la norma y no la excepción (Winnebeck *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2015; Yednock *et al.*, 2015; Deleo *et al.*, 2018).

2.5.2 Anotación funcional y clasificación de los transcriptomas

Los unigenes de *C. sapidus* presentaron homología en diferentes phylum, pero casi el 70% se encontró entre los artrópodos, de los cuales hacen parte los crustáceos. Las anotaciones de los *DEGs* en *KEGG* de las rutas metabólicas relacionadas con la digestión de las dietas corresponden a especies muy estudiadas, que no incluyen a *C. sapidus*, siendo la especie más cercana *Portunus trituberculatus*, que pertenece a la misma familia, y *Eriocheir sinensis* por ser otro cangrejo de importancia comercial (Tabla 2 - 10).

Tabla 2 - 10. Listado de las principales especies de crustáceos anotadas, que poseen información de genes relacionados con los procesos de digestión y absorción de nutrientes en *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

Especie	Nombre común	Código de la especie
<i>Daphnia pulex</i>	Pulga de agua	dpx
<i>Daphnia magna</i>	Pulga de agua	dmk
<i>Daphnia pulex</i>	Pulga de agua	dpz
<i>Penaeus vannamei</i>	Camarón	pvm
<i>Penaeus japonicus</i>	Camarón	pja
<i>Penaeus chinensis</i>	Camarón	pchn
<i>Penaeus monodon</i>	Camarón	pmoo
<i>Homarus americanus</i>	Langosta	hame
<i>Procambarus clarkii</i>	Cangrejo de río	pcla
<i>Portunus trituberculatus</i>	Cangrejo	ptru
<i>Eriocheir sinensis</i>	Cangrejo	esn
<i>Hyalella azteca</i>	Anfípodo	hazt
<i>Eurytemora affinis</i>	Copépodo	eaf
<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	Copépodo	lsm
<i>Pollicipes pollicipes</i>	Percebe	ppoi

El tamaño del transcriptoma y el número de unigenes anotados cuando las larvas eclosionan (Inicial), es casi el doble en comparación a los transcriptomas en las Z2 después de haber sido alimentadas con cada dieta. El diagrama de Venn refleja de manera sencilla esta condición, el 68,31 % de los unigenes identificados en el transcriptoma *de novo* inicial se encuentran únicamente en las Z1. El mayor número de genes activos (1.248), se concentran en la transducción de señales, este estadio es un momento de transición importante, al eclosionar se da por finalizada la embriogénesis y empieza el desarrollo larval, en el cual paulatinamente se completan los procesos de organogénesis, e inicia la alimentación exógena (Anger, 2001; Spitzner *et al.*, 2018).

Investigaciones con diferentes crustáceos revelan que la velocidad de desarrollo de los sistemas del organismo varía considerablemente entre individuos y especies (Anger, 2001; Loose *et al.*, 2020). En este caso, al momento de la eclosión 2.334 unigenes se encontraron activos en los sistemas del organismo, con mayor número en los asociados a los sistemas endocrino, inmunitario, nervioso y digestivo (≥ 251), pero este número disminuyó a 1.568 y 1.578 en Z2 para las dietas 80/20 y 40/60. Los primeros sistemas en desarrollarse durante las etapas tempranas de los crustáceos son el nervioso, muscular, digestivo y los órganos excretores, seguidos del sistema circulatorio, entre otros, pero el comportamiento y las condiciones ambientales de los estados post-embriónicos serán los principales factores que influirán en la velocidad de dicha organogénesis (Anger, 2001; Giménez y Anger, 2001; Spitzner *et al.*, 2018; Loose *et al.*, 2020). Esto se refleja claramente en las diferencias de tiempo en el desarrollo del sistema digestivo entre especies de desarrollo directo e indirecto, con o sin larvas lecitotróficas (Loose *et al.*, 2020).

2.5.3 Caracterización de los genes putativos relacionados con la digestión de las dietas, de los DEGs sobre-regulados en las comparaciones 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial

Desde el momento en que las larvas eclosionan (Z1), hasta nueve días después de ser alimentadas con las dietas (Z2), hay una afectación reflejada a nivel transcriptómico en los DEGs sobre-expresados debido al tipo de alimento suministrado. De manera general, las zoeas de la dieta 40/60 presentaron un mayor número, tanto de genes sobre-regulados, como de participación en más rutas metabólicas (Tabla 2 - 11).

Los análisis bromatológicos de las dietas determinaron niveles de inserción similares de proteínas entre 80/20 y 40/60 ($66,27 \pm 0,60$ y $67,10 \pm 0,56$ g 100g^{-1} respectivamente), pero significativamente mayores ($P < 0,05$) de lípidos para 40/60 ($11,30 \pm 0,12$ g 100g^{-1}), comparada con 80/20 ($10,10 \pm 0,20$ g 100g^{-1}) (ver capítulo 1). Los resultados presentados en el primer capítulo evidenciaron que el contenido de grasas fue el factor que condicionó la respuesta productiva durante el desarrollo larval de *C. sapidus*, con mejores resultados en supervivencia, crecimiento y ciclo de muda en las alimentadas con 40/60, las respuestas diferenciales a nivel molecular fortalecen este resultado, indicando que hay diferencias en algunas rutas metabólicas cuando se suministran dietas pobres vs ricas en lípidos.

Las filas resaltadas en rojo en la tabla 2 – 11 corresponden a los caminos metabólicos en los que no se identificaron genes sobre-regulados para ninguna de las dos comparaciones (80/20 vs Inicial, y 40/60 vs Inicial), y las resaltadas en amarillo son caminos metabólicos de plantas, hongos, bacterias o arqueas (Tabla 2 - 11). En los procesos celulares de transporte y catabolismo, los caminos metabólicos de autofagia y mitogafia animal, así como fagosoma no fueron tenidos en cuenta, ya que corresponden a procesos de digestión de materiales residuales de estructuras y organelos descartados por las células (Tomkinson, 1999; Forbes, 2012), pero no de los nutrientes suministrados en las dietas, en los cuales se enfocó este trabajo. En el metabolismo de lípidos, la biosíntesis de cutina, suberina y cera es característica de plantas, hongos y unos pocos insectos. Otros AA como la taurina e hipotaurina pertenecen a bacterias y archae, ciaminoácidos a plantas, y aminoácido D a bacterias. En el metabolismo de CBH la fructosa y manosa corresponden a plantas y la rama dibásica del ácido C5 a bacterias y arqueas (Tabla 2 - 11).

Tabla 2 - 11. Resumen de los genes putativos identificados en las rutas *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), relacionadas con el metabolismo y digestión de nutrientes provenientes de la dieta, en estadios larvarios tempranos de *Callinectes sapidus*. El listado de genes corresponde únicamente a los diferencialmente expresados (*DEGs*), que se regularon positiva y significativamente ($P\text{-adjust} < 0,0.5$, y $\log_2(\text{fold change}) > 0,5$) en las comparaciones 80/20 vs Inicial y 40/60 vs Inicial. Las filas resaltadas en amarillo corresponden a caminos metabólicos que no aplican dentro del metabolismo de nutrientes provenientes de las dietas, o son específicos para plantas, bacterias y Archae. Las filas resaltadas en rojo corresponden a caminos metabólicos de eucariotas en donde no se presentaron genes sobre-regulados.

Categoría KEGG ¹	Referencia ko ²	Nombre de la ruta	80/20 vs Inicial	No. genes	40/60 vs Inicial	No. genes	
Sistemas del organismo (sistema digestivo)	1	04970	Secreción salival	1. CALM	1	1. CALM	1
	2	04971	Secreción de ácido gástrico	1. ACTB_G1 2. CALM	2	1. ACTB_G1 2. CALM	2
	3	04972	Secreciones pancreáticas			1. RAC1	1
	4	04973	Digestión y absorción de carbohidratos			1. AKT	1
	5	04974	Digestión y absorción de proteínas	1. PRCP	1	1. PRCP	1
	6	04975	Digestión y absorción de grasas			1. MTTP, MTP 2. ABCG5	2
	7	04976	Secreciones biliares			1. ABCG5	1
	8	04977	Digestión y absorción de vitaminas				
	9	04978	Absorción de minerales	1. SLC39A4, ZIP4	1	1. SLC39A4, ZIP4 2. FTH1 3. ATP7A	3
	10	04979	Metabolismo de colesterol			1. ABCG5	1
Procesos celulares. (transporte y catabolismo)	1	04136	Autofagia - otros	NA ³		NA	
	2	04137	Mitofagia - animal	NA		NA	
	3	04138	Autofagia - levadura	NA		NA	
	4	04139	Mitofagia - levadura	NA		NA	
	5	04140	Autofagia - animal	NA		NA	
	6	04142	Lisosoma	1. LGMN 2. CTSD 3. HEXA_B	4	1. LGMN 2. CTSA, CPY 3. CTSB	11

Categoría KEGG ¹	Referencia ko ²	Nombre de la ruta	80/20 vs Inicial	No. genes	40/60 vs Inicial	No. genes	
			4. CLTC		4. CTSL 5. CTSD 6. TPP1, CLN2 7. HEXA_B 8. uidA, GUSB 9. SMPD1, ASM 10. PPT 11. CLTC		
					1. DNM1_3 2. MADHIP, SARA" 3. SPG20 4. CLTC		
7	04144	Endocitosis	1. CLTC 2. TSG101, STP22, VPS23	2	5. NEDD4, RSP5 6. ACTR3, ARP3 7. RAB5C 8. VPS35 9. TSG101, STP22, VPS23"	9	
8	04145	Fagosoma	NA		NA		
					1. PEX6 2. PEX12 3. PEX11 4. PRDX1		
9	04146	Peroxisoma	1. PEX6 2. PRDX1	2	5. SOD1 6. ACOX1, ACOX3 7. HSD17B4 8. fadA, fadI 9. CRAT 10. RAC1	10	
Metabolismo de lípidos	1	00061	Biosíntesis de ácidos grasos	1. ACSBG	1	1. ACSBG	1
	2	00062	Elongación de ácidos grasos			1. PPT	1
	3	00071	Degradación de ácidos grasos	1. ACSBG	1	1. ACSBG 2. ACOX1, ACOX3 3. fadA o fadI	3

Categoría KEGG ¹	Referencia ko ²	Nombre de la ruta	80/20 vs Inicial	No. genes	40/60 vs Inicial	No. genes
	4	00073	Biosíntesis de cutina, suberina y cera	NA	NA	NA
	5	00100	Biosíntesis de esteroides		1. DHCR7	1
	6	00120	Biosíntesis primaria de ácidos biliares		1. HSD17B4	1
	7	00121	Biosíntesis secundaria de ácidos biliares			
	8	00140	Biosíntesis de la hormona esteroide			
	9	00561	Metabolismo de glicerolípidos			
	10	00564	Metabolismo de glicerofosfolípidos		1. pgsA, PGS1	1
	11	00565	Metabolismo de ésteres en lípidos		1. TMEM189	1
	12	00590	Metabolismo de ácido araquidónico	1. HPGDS	1	1. HPGDS
	13	00591	Metabolismo de ácido linoléico			
	14	00592	Metabolismo de ácido α-linoléico			
	15	00600	Metabolismo de esfingolípidos	1. HEXA_B	1	1. ASAH2 2. SMPD1, ASM 3. SMPD2 4. HEXA_B
	16	01040	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados		1. HSD17B4	1
Metabolismo de AA	1	00220	Biosíntesis de arginina	1. glnA, GLUL 2. argG o ASS1	2	1. glnA, GLUL
	2	00250	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	1. glnA, GLUL 2. argG o ASS1	2	glnA, GLUL
	3	00260	Metabolismo de glicina, serina y treonina			1. glyA o SHMT
	4	00270	Metabolismo de cisteína y metionina			1. CDO1
	5	00280	Degradación de valina, leucina e isoleucina			1. fadA o fadI
	6	00290	Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina			
	7	00300	Biosíntesis de lisina			

Categoría KEGG ¹	Referencia ko ²	Nombre de la ruta	80/20 vs Inicial	No. genes	40/60 vs Inicial	No. genes		
	8	00310	Degradación de lisina					
	9	00330	Metabolismo de arginina y prolina	1. CKB, CKM 2. speG, SAT	2	1. CKB, CKM 2. E2.7.3.3	2	
	10	00340	Metabolismo de histidina	1. ALDH3	1			
	11	00350	Metabolismo de tirosina	1. TDC-1 2. ALDH3 3. HGD o hmgA	3	1. TYR 2. TDC-1 3. HGD, hmgA	3	
	12	00360	Metabolismo de fenilalanina					
	13	00380	Metabolismo del triptófano			1. TDO2, kynA 2. KYNU, kynU	2	
	14	00400	Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano					
	Met. otros AA	1	00410	Metabolismo de β-alanina	1. ALDH3	1	1. ACOX1 o ACOX3	1
		2	00430	Metabolismo de taurina e hipotaurina	NA		NA	
		3	00440	Metabolismo de fosfonato y fosfinato				
		4	00450	Metabolismo de compuestos del selenio	1. PAPSS	1	1. TXNRD 2. PAPSS	2
		5	00460	Metabolismo de ciaminoácidos	NA		NA	
		6	00470	Metabolismo de aminoácido D	NA		NA	
		7	00480	Metabolismo del glutatión	1. ANPEP, CD13 2. GST, gst	2	1. ANPEP, CD13 2. PGD, gnd, gntZ 3. GST, gst	3
Metabolismo de CBH	1	00010	Glucólisis / Gluconeogénesis	1. GAPDH, gapA 2. pckA, PCK 3. ALDH3	3	1. GAPDH, gapA 2. pckA, PCK	2	
	2	00020	Ciclo del citrato (ciclo de TCA)	1. pckA o PCK	1	1. pckA o PCK	1	
	3	00030	Ruta de la pentosa fosfato			1. PGD, gnd, gntZ 2. gntZ, GND1	2	
	4	00040	Interconversión de pentosa y glucuronato			1. uidA, GUSB 2. DHDH	2	
	5	00051	Metabolismo de fructosa y manosa	NA		NA		

Categoría KEGG ¹	Referencia ko ²	Nombre de la ruta	80/20 vs Inicial	No. genes	40/60 vs Inicial	No. genes
6	00052	Metabolismo de galactosa			galk malZ	2
7	00053	Metabolismo del ascorbato y aldarato			1. uidA, GUSB	1
8	00500	Metabolismo de almidón y sacarosa	1. ENPP1_3 2. GBE1, glgB	2	1. malZ 2. ENPP1_3 3. GBE1 o glgB	3
9	00520	Metabolismo de amino azúcares y nucleótidos	1. CHIA 2. CHIT1, HEXA_B 3. gmd, GMDS	3	1. CHIA, CHIT1 2. HEXA_B 3. gmd, GMDS 4. TSTA3, fcl	4
10	00562	Metabolismo del inositol-fosfato				
11	00620	Metabolismo del piruvato	1. pckA, PCK	1	1. pckA, PCK	1
12	00630	Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato	1. glnA, GLUL	1	1. glnA, GLUL 2. glyA, SHMT	2
13	00640	Metabolismo del propanoato			1. ACOX1, ACOX3	1
14	00650	Metabolismo de butanoato				
15	00660	Metabolismo de la rama dibásica del ácido C5	NA		NA	

1: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 2: ko: KEGG orthology. 3: No aplica.

En las secreciones de ácido gástrico (ko-04971), el gen β -actina estuvo sobre-regulado en ambos tratamientos, y en la formación de fagosomas a nivel celular (ko-04145), es un componente importante del citoesqueleto, y se expresa activamente en el desarrollo larval, siendo crucial en la migración celular durante la embriogénesis y organogénesis, (Zhang y Hu, 2007; Infante *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2018). Aunque la organogénesis del sistema digestivo no ha sido descrita en *C. sapidus*, se ha podido observar como se diferencian al momento de la eclosión en otros braquiuros (Z1), la mayoría de las estructuras del sistema digestivo (esófago, estómago cardiaco y pilórico, tracto del intestino medio, ciegos del intestino medio, hepatopáncreas, e intestino posterior), pero es un sistema tubular muy simple, que a lo largo de su desarrollo larval adquiere gradualmente tamaño, movimiento, funcionalidad y actividad enzimática (Ceccaldi, 1997; Spitzner *et al.*, 2018).

El gen calmodulina (*CALM*) es el encargado de activar el mecanismo de exocitosis en las células secretoras (Klee y Vanaman, 1982), y su acción se ve reflejada funcionalmente a la entrada del esófago, donde el alimento es lubricado por las secreciones de las glándulas mucosas, el estómago cardiaco que está lleno con fluido gástrico (Štrus *et al.*, 2019; Vogt, 2021), y en las células fibrilares (F) y vacuolares (B) del hepatopáncreas (HP), que descargan su contenido al lumen por secreciones merocrinas las primeras, y holocrinas las segundas (Vogt, 2019). En el presente estudio, la *CALM* fue detectada en las secreciones salivales (ko-04970), y de ácido gástrico (ko-04971) de ambas dietas, y en las secreciones pancreáticas (ko-04942) observadas únicamente en la dieta 40/60. Ésta, es una proteína fijadora de calcio (Ca^{2+}), esencial para la regulación de vías metabólicas de señalización dependientes del Ca^{2+} ; al unirse a este mineral, el gen experimenta un cambio conformacional que le permite interactuar con diversas proteínas objetivo, interviniendo en la regulación de la liberación de vesículas cargadas de proteínas y otros componentes en células secretoras (Klee y Vanaman, 1982; Wheatly *et al.*, 2002). Cuando se une a proteínas específicas como las quinasas dependientes de Ca^{2+} (*CaMKs*), modula su actividad desencadenando la fusión de las vesículas con la membrana celular y la liberación de su contenido en el espacio extracelular (Zanotto y Wheatly, 2002).

La interacción de *CALM* con las *CaMKs* ha demostrado un papel importante en el metabolismo de dietas formuladas ricas en zinc (Zn), promoviendo el crecimiento y lipólisis

de *L. vannamei* mediante la sobre-regulación del gen *camkk β* , involucrado en el catabolismo de lípidos inducidos por el Zn (Shi *et al.*, 2020), también aumenta los niveles de Ca²⁺ y Zn al usarse probióticos en el cultivo de camarones (Goh *et al.*, 2023). Su acción en dietas formuladas adicionando miositol en juveniles de *E. sinensis*, incrementa el uso de los lípidos y reduce su acumulación en el HP, por la activación 1,4,5-trifosfato receptor (IP3R)/proteína quinasa quinasa- β dependiente de calmodulina (*CaMKK β*) / vía de señalización de la proteína quinasa, activada por fosforilación del gen *AMPK* (*AMP-activated protein kinase*), un regulador esencial del metabolismo de los ácidos grasos celulares (Bu *et al.*, 2022).

En las secreciones pancreáticas (ko-04972), ruta metabólica que sólo se presentó en las zoeas alimentadas con 40/60, se detectó la sobre-regulación de los genes *CALM* y *RAC1* (Rac GTPasa 1). En mamíferos, estos genes forman parte del grupo de pequeñas proteínas G, implicadas en la regulación de las secreciones pancreáticas exocrinas, en acción con *CALM*. Su activación estimula la liberación de amilasas de las células acinares, que son las células secretoras primarias del páncreas (Williams *et al.*, 2009). Aunque la mayoría de estudios en crustáceos se centran en su función inmunológica en camarones (Chi *et al.*, 2013; Cha *et al.*, 2015), se ha observado su papel en la captación de glucosa en el músculo esquelético (Chiu *et al.*, 2011). En insectos lepidópteros, al estar la muda relacionada con las vías de señalización de la insulina y la metamorfosis, también está ligada con el estado nutricional (Smith *et al.*, 2014), y al detectarla en el HP de *Procambarus clarkii*, se hipotetizó su importancia en la absorción de nutrientes y la apoptosis (Zhu *et al.*, 2017), sin embargo se requieren más estudios en crustáceos para dilucidar a fondo su función en el metabolismo de CBH, lo cual no estuvo contemplado en el presente estudio.

Son muy pocos los genes sobre-regulados que se observan en la transición de Z1 a Z2 en las dietas relacionados con la digestión y absorción de nutrientes, además ningún gen estuvo sobre-regulado en la digestión y absorción de vitaminas, lo que en parte corrobora el poco desarrollo y funcionalidad que *C. sapidus* presenta en su sistema digestivo. Durante los estadios larvales de braquiuros, las zoeas están adaptadas a la vida planctónica y cuentan con un sistema morfológico complejo de sus órganos externos de masticación, pero uno interno relativamente sencillo (Factor, 1982; Abrunhosa y Melo,

2008). Es decir, desde el momento de la eclosión, aún deben pasar por muchos cambios estructurales para la completa conformación del molino gástrico, sistema de filtración y el HP (Ceccaldi, 1997; Spitzner *et al.*, 2018). Aunque en el HP se detecten desde los primeros estadios las células embrionarias (E), fibrilares (F), reabsorbentes (R) y vesiculares (B), su eficiencia digestiva mejorará sólo en la medida en que transcurra su desarrollo larval (Factor, 1982; Ceccaldi, 1997; Anger, 2001; Abrunhosa y Melo, 2008), y factores ambientales y nutricionales afectarán de manera importante el desempeño de su digestión y consecuentemente su desarrollo (Anger, 2006).

A pesar de lo dicho anteriormente, y teniendo en cuenta que en este estudio sólo transcurrieron nueve días desde el momento de la eclosión y el inicio de su alimentación exógena, se pueden observar diferencias entre las dietas en los *DEGs* regulados positivamente. En las Z2 alimentadas con 80/20 solamente se detectaron genes activos en la digestión y absorción de proteínas (ko-04974), y absorción de minerales (ko-04978), complementariamente en sus lisosomas (ko-04142), hubo tres proteasas y una glucosidasa, pero ninguna lipasa. Estos resultados permiten inferir que, en dicha condición que tiene una menor inserción de lípidos que 40/60, no se están sobre-regulando genes que intervengan en el metabolismo y degradación de lípidos. Las condiciones en las Z2 alimentadas con 40/60 reflejan además de la digestión de proteínas y minerales, sobre-regulación en la digestión y absorción de carbohidratos (ko-04943), grasas (ko-04975) y metabolismo del colesterol (ko-04979), acompañados en los lisosomas por la presencia de siete proteasas, dos glucosidasas y dos lipasas. Los lípidos son la principal fuente de reserva de los crustáceos, además de que dan integridad a las membranas celulares y son fuente primordial de las hormonas (Fang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Estudios previos indican que el enriquecimiento de lípidos en las dietas que se suministran durante las primeras etapas de vida, mejoran significativamente el crecimiento, la supervivencia y los procesos de muda (Alava *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2017).

Los resultados presentados en el primer capítulo muestran que la primera muda (M1) ocurre en promedio a los $8,11 \pm 0,98$ días en 80/20, y $7,79 \pm 1,15$ días en 40/60; es muy probable que desde el inicio del desarrollo larval en *C. sapidus*, el punto de saturación de la reserva (PSR) (Anger, 1983, 2001; Gore, 1985) empieza a verse afectado. En el período de intermuda, momento en el cual las larvas se alimentan, se puede apreciar a nivel

molecular cómo en la dieta 80/20 entre los estadios tempranos Z1 a Z2, sólo se está hidrolizando la proteína, al no haber síntesis de grasas es probable que sus reservas provengan de los lípidos remanentes del desarrollo embrionario que hayan permitido sobrepasa el PSR y permitir la muda. Al momento de la eclosión las Z1 de *C. sapidus* poseen un contenido de lípidos significativamente más bajo (0,72 µg) (Li *et al.*, 2012) que otros portunidos como *Scylla serrata* (1,94 µg) (Alava *et al.*, 2007), y *Portunus trituberculatus* (4,14 µg) (Wu *et al.*, 2006). En este estadio se inicia la transición a la alimentación exógena, y al contar con pocas reservas de lípidos, su nutrición dependerá en mayor medida del tipo de dieta suministrada y la cantidad y calidad de nutrientes que en ella se encuentren.

Las enzimas digestivas actúan en el sistema digestivo de crustáceos en el estómago cardíaco y el HP, pero sólo son sintetizadas en el HP por las células F (Vogt, 2021). Estas células tienen la estructura típica para sintetizar y exportan proteínas, con abundante retículo endoplasmático rugoso y aparatos de Golgi más grandes en comparación con los producidos en otras células del HP, producen grandes lisosomas que migran a las microvellosidades de borde, descargando su contenido por secreción merocrina en el lumen (Forbes, 2012; Štrus *et al.*, 2019). Aparentemente cada célula F del HP produce el set completo de enzimas digestivas, ya que las pruebas inmunoquímicas e hibridaciones *in situ* de decápodos, no han revelado aún tinción de subpoblaciones específicas (Vogt, 2021).

Las proteasas de los crustáceos pertenecen a la familia de las serinas, cisteínas, ácido aspártico y metalo-endopeptidasas, y a las carboxi o amino-peptidasas (Barrett, 1994). La tripsina y quimotripsina, son las serina-proteasas más representativas en el HP (Wei *et al.*, 2014b), responsables de ~60 % de la digestión de proteína dietética en camarones (Sainz y Cordova, 2009). Ambas han sido investigadas y caracterizadas mediante ensayos de actividad enzimática, y descritas a nivel molecular durante el desarrollo larval en muchos decápodos, especialmente camarones (Brito *et al.*, 2001; Lemos *et al.*, 2002; Sainz y Cordova, 2009; Wei *et al.*, 2014b; Rojo-Arreola *et al.*, 2020), y algunos pocos braquiuros como *Scylla paramamosain* (Jiang *et al.*, 2011), y *Portunus trituberculatus* (Fang *et al.*, 2021), sin embargo, ninguna de las dos fue detectada en nuestros resultados. En *C. sapidus* sólo se han realizado estudios *in vitro* en aislados de HP de machos adultos,

encontrando que su actividad enzimática difiere de otros crustáceos como los camarones *Macrobrachium rosenbergii* y *Penaeus* sp. (Dendinger, 1987; Dendinger y O'Connor, 1990). Hasta el momento, las proteasas no han sido caracterizada para la especie a nivel molecular, en los registros del NCBI sólo aparece una tripsina parcialmente enmascarada en la vitelogenina de *C. arcuatus* (Jimenez-Gutierrez *et al.*, 2019).

Otras proteasas que intervienen en la degradación de las proteínas dietéticas son las carboxipeptidasas, que participan en los estadios finales de la degradación proteica, liberando los AA de los péptidos producidos por las endopeptidasas (Barrett *et al.*, 2004). Las que más se han descrito en crustáceos son las A y B, abundantes en el HP de camarones, descritas en sus estadios larvales (Lovett y Felder, 1990; Goptar *et al.*, 2013), y caracterizadas a nivel molecular (Wei *et al.*, 2014b). En el presente estudio, la *PRCP* (carboxipeptidasa lisosomal Pro-Xaa), fue sobre-expresada en el camino metabólico de la digestión y absorción de proteínas (ko-04974). Otras dos proteasas se presentaron únicamente en los lisosomas de las Z2 alimentadas con 40/60: la *CTSA* (Carboxipeptidasa C), que en algunos artrópodos tiene una actividad muy específica para la síntesis de glutamato (Bown y Gatehouse, 2004), y la *TPP1* (Tripeptidil-peptidasa I), una serina-proteasa capaz de formar tripéptidos (Tomkinson, 1999), pero su presencia sólo ha sido brevemente descrita en análisis proteómicos del krill (Möller *et al.*, 2022).

Recientemente, el papel de las catepsinas, enzimas típicas del lisosoma, está siendo revisado dentro de los procesos fisiológicos de los crustáceos (Gul *et al.*, 2023). Se ha reportado actividad proteolítica de las catepsinas D (CTSD), L (CTSL), y B (CTSB) en el HP y fluidos gástricos, identificándolas como enzimas digestivas extracelulares (Teschke y Saborowski, 2005; Navarrete Del Toro *et al.*, 2006; Hu y Leung, 2007; Rojo *et al.*, 2010; Stephens *et al.*, 2012; Martínez-Alarcón *et al.*, 2018). Algunos autores hipotetizan que las altas concentraciones halladas en el HP, probablemente estén almacenadas en los grandes lisosomas de las células B, que por secreciones holocrinas depositan su contenido en el lumen (Martínez-Alarcón *et al.*, 2018), mientras que otros mantienen la teoría de que las células tipo F, son las precursoras de las tipo B (Hu y Leung, 2007). En los lisosomas de las Z2 alimentadas con 80/20, únicamente la CTSD estuvo expresada positiva y significativamente, mientras que en 40/60 las larvas sobre-regularon los tres tipos (CTSD, CTSL y CTSB). Su presencia y caracterización molecular ha sido reportada también

durante el desarrollo ontogénico de otros crustáceos decápodos (Qiao *et al.*, 2017; Navarrete del Toro y García-Carreño, 2019; Rojo-Arreola *et al.*, 2020).

La legumaína (LGMN), una cisteína-proteasa sobre-regulada en los lisosomas de ambas dietas, ha demostrado poseer igual efectividad de cobertura como enzima digestiva, que la tripsina en estudios de mamíferos y artrópodos (Santamaría *et al.*, 2012; Fuzita *et al.*, 2015; Soh *et al.*, 2020), pero su papel en crustáceos ha sido estudiado y descrito más a nivel inmunológico (Fan *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2022). Es probable que tanto CTSD (aspartil-proteasa), como CTSL, CTSB y LGMN (cisteína-proteasas), actúen como sustitutos de la tripsina y quimotripsina (serina-proteasas), que no se han detectado en algunos crustáceos (Teschke y Saborowski, 2005), o que su papel como proteasas sea más significativo en las primeras fases del desarrollo larval de especies como la estudiada en esta investigación, donde los pocos genes sobre-expresados encargados de la digestión del alimento, reflejan un desarrollo incipiente entre Z1 a Z2. Sólo a medida que el desarrollo ontogénico avanza, el HP adquiere mayor volumen, aumentando las secreciones enzimáticas y eficiencia de la digestión extracelular (Factor, 1982; Ceccaldi, 1997; Anger, 2001; Abrunhosa y Melo, 2008). Sin embargo, se requieren trabajos de actividad enzimática en la ontogenia de *C. sapidus*, acompañados de proteómica y citología funcional del HP, para conocer a fondo su fisiología digestiva.

El valor nutricional de las proteínas contenidas en la dieta dependen de los ingredientes usados y su contenido de aminoácidos (AA), además los requerimientos y digestibilidad de estos nutrientes pueden variar durante el desarrollo ontogénico (Anger, 2001). De los 10 AA catalogados como esenciales en larvas y adultos de crustáceos (Barrett, 1994; Anger, 2001; Barrett *et al.*, 2004), en *C. sapidus* se detectó el metabolismo sobre-regulado de solamente dos (arginina e histidina), en las Z2 alimentadas con 80/20. En tanto que las alimentadas con 40/60 metabolizaron siete (arginina, treonina, metionina, valina, leucina, isoleucina y triptófano). Los AA que no pueden ser sintetizados *de novo*, sólo pueden provenir de la ingesta de las dietas suministradas, o de reservas proteicas (Anger, 2001), y en el caso de larvas recién eclosionadas, estas reservas serán los remanentes de la lipovitelina durante la embriogénesis, que en *C. sapidus* está compuesta de cantidades aproximadamente iguales de lípidos y proteínas (48 y 50 % respectivamente), y pocos CBH (2%) (Kerr, 1969).

Las condiciones experimentales de nuestros ensayos, proveyeron a los rotíferos la misma fuente de proteína (*Chlorella pyrenoidosa* en polvo - Ch) y lípidos (S.presso –Spr), pero en diferentes proporciones (Ch/Spr). Si bien el ANOVA no reflejó diferencias significativas en las concentraciones de proteína, los datos mostraron una menor concentración en 80/20 ($66,27 \pm 0,60 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), que en 40/60 ($67,10 \pm 0,56 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), a pesar de que en 80/20 la inserción de Ch fue del 80 %, en comparación con 40/60 donde fue sólo del 40 %. Aunque no se realizaron perfiles de AA, podemos hipotetizar un efecto en cadena de esta situación: los rotíferos enriquecidos con 80/20 metabolizaron una mayor cantidad de proteína y por ende mayor cantidad de AA esenciales, compensando el bajo contenido de lípidos (Spr), a diferencia de los enriquecidos con 40/60. Consecuentemente, las larvas alimentadas con 40/60 contaron con una mayor disponibilidad de AA esenciales en su dieta que las de 80/20, lo que explicaría las diferencias encontradas a nivel molecular. Si, por el contrario, se considerara que su origen proviniese de la lipovitelina, los resultados deberían ser similares entre las dietas.

Las diferencias entre los AA esenciales detectados en cada condición, también afectaron el metabolismo de los AA no esenciales, de los cuales sólo cinco se sobre-expresaron en 80/20 (alanina, aspartato, glutamato, prolina y tirosina), mientras que ocho se observaron en 40/60 (glisina, serina, y cisteína, además de los anteriormente mencionados en 80/20). Otros AA importantes en crustáceos como β -alanina que estimula el comportamiento alimentario (Austin y Moore, 2022), y compuestos del selenio y glutatión, que protegen contra el estrés oxidativo (Anastasia *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2019), se expresaron significativamente en ambas dietas. Inserciones de glutatión en la dieta del cangrejo chino *Eriocheir sinensis* no mayores a 900 mg Kg^{-1} , mejoran su crecimiento, supervivencia, capacidad antioxidante e inmunidad (Liu *et al.*, 2020).

Los AA son los principales combustibles metabólicos para el intestino y los tejidos del HP, riñones y músculo esquelético en crustáceos, particularmente aspartato, glutamato, glutamina y alanina (Li *et al.*, 2021). Su composición durante el desarrollo larval ha sido poco estudiada, en la langosta *Homarus gammarus*, se sugiere una menor eficiencia de conversión de proteína que en el camarón *L. vannamei* (Mente *et al.*, 2001). Algunos autores argumentan que no observan una correlación directa con las dietas, al parecer la variación es inherente a la ontogenia de cada especie, pero en sus estudios las dietas son

variadas (Roustaian *et al.*, 2000; Peñaflores, 2004; Andrés *et al.*, 2010a; Bhavan *et al.*, 2010). En este experimento, al haber utilizado los mismos ingredientes, pero en diferente proporción, se puede observar cómo al inicio de la alimentación exógena, en un espacio de nueve días, las Z2 alimentadas con 40/60 parecen tener una variedad más amplia de proteasas, mayor número de AA esenciales disponibles y mayor síntesis de los no esenciales. Sin embargo, se requieren estudios más detallados, para esclarecer su dinámica a lo largo del desarrollo larval.

Todos los lípidos comparten su naturaleza hidrofóbica, pero a pesar de ello son un grupo muy heterogéneo, hay lípidos neutros como las grasas, triglicéridos, mono y di-glicéridos, ácidos grasos libres, ésteres de cera, esteroides; también hay compuestos polares como fosfolípidos, pigmentos, esfingolípidos, y además algunos se combinan con CBH (glucolípidos) y proteínas (lipoproteínas) (Anger, 2001). Debido a estas diferencias, la fuente de lípidos suministrados en las dietas de crustáceos modifica la acción de las enzimas digestivas, el perfil de lípidos presentes en el HP y por consiguiente los patrones de expresión de los genes implicados en el proceso (Martínez-Alarcón *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2021). En los resultados obtenidos en este estudio se pudo observar cómo, desde el desarrollo temprano entre Z1 a Z2, la concentración de lípidos suministrados en las dietas afectó a nivel transcriptómico la expresión de las lipasas, la biosíntesis de los ácidos grasos, y la β -oxidación en el HP y peroxisomas.

Los ácidos grasos esenciales, esteroides, fosfolípidos, colesterol y vitaminas liposolubles son particularmente críticos durante el desarrollo larval (Holme *et al.*, 2009). Ingredientes como el aceite de krill sobre-regulan la expresión de fosfolipasas (*pla2*), en comparación con el aceite de pescado en juveniles del camarón *P. trituberculatus* (Fang *et al.*, 2021). Se anotaron cinco tipos de lipasas en 43 unigenes en *L. vanammei* alimentados con spirulina y dietas formuladas en los estadios de zoea y posteriormente en mysis y poslarvas con nauplios de *Artemia* y dietas formuladas, la expresión de la enzima pancreática triaglicérol lipasa fue dominante durante todos los estadios (Wei *et al.*, 2014b). En *E. sinensis* el patrón de expresión de la lipasa pancreática identificada fue gradualmente aumentando entre Z1 a Z3, decreció dramáticamente en Z4, aumentando nuevamente en Z5, y su menor expresión fue en fase megalopa (BangHong *et al.*, 2019). Aunque estas enzimas no han sido estudiadas en *C. sapidus*, tres tipos de genes putativos de lipasas

fueron anotados en las zoeas alimentadas con 40/60: una fosfolipasa (esfingomielin fosfodiesterasa, EC 3.1.4.12), una enterasa (palmitoil-hidrolasa EC 3.1.2.22), y una ceramidasa (EC 3.5.1.23), expresándose en los caminos metabólicos de los lisosomas (ko-04142), y el metabolismo de esfingolípidos (ko-00600). Si bien la misma fuente de lípidos (S.presso, Inve®), fue incluida en ambas dietas, las diferencias en los porcentajes de inclusión originaron una concentración significativamente menor en 80/20 ($10,10 \pm 0,20 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), que en 40/60 ($11,30 \pm 0,12 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) como se discutió en el primer capítulo. A pesar de no haber realizado perfiles lipídicos de las dietas, al igual que en las proteínas, podemos inferir que esta diferencia de 1,2 gramos adicionales por cada 100 gr de dieta en 40/60, permiten una mayor disponibilidad y concentración de lípidos que no fueron metabolizados por los rotíferos en sus 24 h de enriquecimiento, y que estarían a disposición de las zoeas al momento de alimentarse.

A nivel del sistema digestivo, solo dos genes relacionados con el transporte de lípidos, el *MTP* (proteína microsomal transferidora de triglicéridos), y el *ABCG5* (Miembro 5 de la subfamilia G del casete de unión a ATP), fueron sobre-expresados en las Z2 alimentadas con 40/60; *MPT* estuvo presente solamente en la digestión y absorción de grasas (ko-04975), mientras que *ABCG5* se sobre-expresó además de en la digestión y absorción de grasas, en secreciones biliares (ko-04976) y metabolismo del colesterol (ko-04979). En 80/20, ningún gen relacionado en el sistema digestivo con la absorción y digestión de grasas fue sobre-regulado.

El gen *MTP*, que pertenece a la familia de las proteínas de transferencia de grandes lípidos (*Large Lipid Transfer Protein superfamily - LLTP*), está relacionado a nivel nutricional con el ensamblaje y empaque de una gran variedad de lípidos, permitiendo el transporte de grasas digeridas provenientes de la dieta a los tejidos del organismo (Smolenaars *et al.*, 2007). En crustáceos se resalta su papel en el ensamblaje de lipoproteínas, y el transporte de lípidos entre el HP y los ovarios durante la vitelogénesis (Subramoniam, 2010; Zeng *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2023; Hoeger y Schenk, 2023), también juega un papel importante en la maduración de las gotas de lípidos y el ensamblaje de lipoproteínas durante el desarrollo embrionario (Zeng *et al.*, 2021).

La familia de casetes de unión a ATP (ABC), son un grupo de proteínas ampliamente caracterizadas en humanos que se unen e hidrolizan ATP, para transportar sustancias a través de las membranas celulares, la subfamilia que contiene los genes *ABCG1*, *ABCG8* y *ABCG5*, está íntimamente relacionada en la regulación de los mecanismos de tráfico de lípidos y *ABCG5* juega un importante papel en la regulación de la absorción de colesterol proveniente de la dieta (Lee *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001). Aunque en crustáceos no ha sido muy estudiado, un análisis *in silico* identificó 46 posibles genes putativos de toda la familia ABC en el copépodo *Tigriopus japonicus* (Jeong *et al.*, 2014). *LvABCG* fue clonado y caracterizado en *L. vanammei*, observando un alto nivel de transcripción en el HP, algo en los intestino y el estómago y ninguna señal en el resto de tejidos examinados (Zhou *et al.*, 2009). Y en juveniles de *P. trituberculatus* la familia ABC fue definida como uno de los genes claves para evaluar las respuestas transcriptómicas en el HP, frente a diferentes fuentes de lípidos n-3 PUFA (Fang *et al.*, 2021).

La β -oxidación es una vía metabólica fundamental en la degradación de ácidos grasos (AG) para producir energía; es un proceso catabólico que ocurre en las células, específicamente en la matriz mitocondrial y al parecer en menor grado en los peroxisomas (Bartlett y Eaton, 2004). Cada reacción en este camino metabólico es catalizada por familias de enzimas catabólicas, como transferasas, ligasas, deshidrogenasas, oxidoreductasas e hidrolasas (Skottene *et al.*, 2019). Las funciones de estas moléculas han sido investigadas en muchos estudios de mamíferos e insectos (Hauerland, 1997; Plettner *et al.*, 1998; Bartlett y Eaton, 2004), pero en crustáceos aún existen vacíos de información importantes (Stewart *et al.*, 1994; Skottene *et al.*, 2019). Los análisis transcriptómicos realizados en el presente estudio, revelan la presencia de muchas de estas enzimas en los caminos metabólicos relacionados con el metabolismo de lípidos, y cómo su sobre-regulación también estuvo modulada por el tipo de dieta suministrada.

Aunque en 80/20 no se detectaron genes relacionados con el transporte de lípidos en el sistema digestivo, y no fueron sobre-reguladas enzimas digestivas (lipasas) en los lisosomas y peroxisomas, si se pudo detectar en el metabolismo de lípidos la participación de cuatro tipos de enzimas en los procesos de biosíntesis y degradación de AG (ko-00061 y ko-00071 respectivamente), así como con el metabolismo del ácido araquidónico (ko-00590) y de esfingolípidos (ko-00600). La enzima ligasa *ACSBG* (Acil-Coa sintetasa de

cadena larga), encargada de unirse a los AG para activar el mecanismo de β -oxidación en las mitocondrias (Schulz, 1991), indica la presencia de degradación de fuentes lipídicas en las Z2, esta evidencia unida a la sobre-regulación de enzimas en el metabolismo del ácido araquidónico y esfingolípidos, permite inferir que los lípidos metabolizados sean aún remanentes de las reservas de lipovitelina durante la embriogénesis, ricas en fosfolípidos como la esfingomielina, de donde pudo metabolizarse el ácido araquidónico (Tirumalai y Subramoniam, 1992; Rey *et al.*, 2015), mas no de fuentes dietéticas, debido a la ausencia específica de lipasas. A nivel de los peroxisomas solo dos genes fueron sobre-regulados, la peroxina-6 (*PEX-6*) implicada en el tráfico de membrana, y la *PRDX1* (peroxirredoxina 1) que contribuye a la protección antioxidante del organelo (Orbea *et al.*, 2000; Wanders *et al.*, 2023), pero no se detectó actividad de β -oxidación.

Las Z2 luego de nueve días de alimentarse con la dieta 40/60, revelaron la sobre-regulación de 16 enzimas en 10 de los caminos metabólicos vinculados con el metabolismo de lípidos (2 ligasas, 5 hidrolasas, 3 oxidoreductasas, 2 transferasas, 3 liasas y 1 isomerasa). En rutas relacionadas con la biosíntesis, elongación y degradación de AG en la β -oxidación mediante reacciones de deshidrogenación, hidratación, oxidación y tiólisis donde los fragmentos de acetyl-CoA pueden ingresar al ciclo de Krebs para la producción de energía (Bartlett y Eaton, 2004). También en caminos metabólicos específicos dependiendo del tipo de lípidos a metabolizar (esteroides ko-00100, glicerofosfolípidos, ésteres de lípidos, ácido araquidónico, esfingolípidos y AG insaturados), recalando nuevamente una variabilidad de lípidos disponibles en su dieta. Además de una mayor actividad de genes implicados en el tráfico de membrana en los peroxisomas, en comparación con 80/20 (*PEX6*, *PEX11* y *PEX12*), se sobre-regularon seis enzimas (tres oxidoreductasas, dos transferasas, y una ligasa), entre ellas la Carnitina-O (EC 2.3.1.7), componente clave en los sistemas que controlan la β -oxidación de AG de cadena muy larga (Lavarías *et al.*, 2009; Raghuvaran *et al.*, 2023), indicando también metabolismo de lípidos por esta vía.

Los lípidos suministrados en las dietas juegan un importante papel nutricional, además de proveer a los organismo de energía, mantienen la integridad estructural de sus membranas y funcionan como precursores de esteroides (Ali *et al.*, 2012). Consecuentemente, la composición de lípidos en los organismo refleja cambios en sus estados de desarrollo,

condiciones nutricionales y efectos de factores medioambientales (Zheng *et al.*, 2011). Cabe destacar la sobre-regulación de esteroides y su relación con el metabolismo del colesterol; este lípido constituye en camarones cerca del 90% de sus esteroides, y es esencial para la síntesis de ecdiesteroides y sesquiterpenos, hormonas reguladoras de la muda (Kumar *et al.*, 2018). Irónicamente los crustáceos no pueden sintetizarlo *de novo* y debe ser suministrado en las dietas, sus requerimientos varían dependiendo de la especie y fuentes de lípidos del alimento (Sheen, 2000; Gu *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2020).

En el presente estudio, la sobre-regulación del gen *ABCG5* específicamente en el metabolismo del colesterol (ko-04979), indica el transporte de esteroides en la dieta 40/60. La mayoría de las larvas tienen la habilidad de reconfigurar varias moléculas de esteroides de sus dietas para cumplir con sus necesidades específicas (Holme *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2017; Jeffs y O'Rorke, 2020; Goncalves *et al.*, 2022). La concentración y disponibilidad del perfil lipídico en esta dieta, aparentemente les permite a las zoeas realizar este proceso, que además se refleja en el metabolismo de lípidos en la biosíntesis de esteroides (ko-00100). También se ha sugerido que la *Chlorella* puede contener fitoesteroides que inducen un efecto hipocolesterolémico en los crustáceos (Kumar *et al.*, 2018; Carneiro *et al.*, 2020). Sea una u otra la fuente de este nutriente, la biodisponibilidad de nutrientes en 80/20, no refleja el mismo comportamiento que 40/60, a pesar de haberse usado el mismo tipo de ingredientes, ratificando nuevamente que la concentración de lípidos en la dieta afecta los perfiles de expresión.

Los caminos metabólicos relacionados con la biosíntesis de ácidos secundarios biliares (ko-00121), hormona esteroide (ko-00140), y metabolismo de glicerolípidos (ko-00561), no estuvieron expresados de manera significativa y positiva en las Z2 de ninguna de las dos dietas. Si bien ya se indicó cómo los lípidos dependiendo de su concentración en la dieta, pueden afectar la expresión de las lipasas, y el metabolismo y la síntesis de los ácidos grasos, el hecho de que estos caminos no se hayan activado pueden indicar aún el poco desarrollo del sistema digestivo entre el primer y segundo estadio de zoea en *C. sapidus*. En otras especies como *L. vanammei* estudios de su actividad enzimática han demostrado que las larvas poseen un set completo de lipasas desde sus primeros estadios larvales (Rivera-Pérez *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2014b); sin embargo, se requieren estudios específicos en la jaiba azul a lo largo de su desarrollo larval para observar si el

comportamiento y dinámica de las enzimas digestivas desde Z1 a MG se ajusta al de otros braquiuros como *Maja brachydactyla* y *C. maenas*, donde la actividad enzimática de todas las enzimas digestivas aumenta a medida que el desarrollo larval ocurre, reflejando el incremento en complejidad y volumen del HP (Harms *et al.*, 1994; Andrés *et al.*, 2010b).

Los CBH como parte de la dieta no son esenciales para los crustáceos, pueden almacenarse en los músculos y HP en forma principalmente de glucógeno, y cuando son requeridos, participan como precursores intermediarios en la producción de energía, síntesis de AA no esenciales, ácidos nucleicos y quitina cuticular (Anger, 2001). La dieta 80/20 no mostró sobre-expresión del sistema digestivo relacionado con la digestión y absorción de CBH (ko-04943). Pero en 40/60 se identificó el gen *AKT* (Serina/treonina proteína quinasa no específica EC 2.7.11.1), que codifica una enzima de tipo transferasa. Esta enzima desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo de los CBH, específicamente en la respuesta a la insulina y en la absorción de glucosa, ampliamente reconocido es los crustáceos (Zhang *et al.*, 2021, 2022; Dai *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022a). Normalmente, el transporte de glucosa se produce a través de varias vías de señalización de la insulina, como la fosfatidilinositol 3-quinasa (*PI3K*), proteína quinasa B (*AKT*), glucógeno sintasa quinasa 3 (*GSK-3 β*), y transportador de glucosa 4 (*GLUT4*). La proteína *AKT* se fosforila y se activa, desencadenando una serie de eventos que promueven la absorción de glucosa (Guo *et al.*, 2019b), así como sus efectos en los perfiles metabólicos del HP durante la regulación de la hormona hiperglucémica en los procesos de muda y formación del exoesqueleto (Li *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

Los polisacáridos son hidrolizados a oligosacáridos, dextrinas y maltosa y en los crustáceos, estos compuestos son después completamente hidrolizados a monosacáridos y transportados como glucosa (Wang *et al.*, 2016). Su comportamiento y caracterización durante la ontogenia han sido estudiados en especies como *Procambarus clarkii* (Hammer *et al.*, 2000), *Homarus grammarus* (Goncalves *et al.*, 2022), *Maja brachydactyla* (Andrés *et al.*, 2010b), y varias especies de camarones (Kamarudin *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 2014b). En términos generales, las amilasas, maltasas y quitinasas tienden a incrementarse a medida que el desarrollo larval avanza. Los perfiles transcriptómicos revelan un comportamiento similar para las α y β amilasas, isomaltasa, maltasa/ α -glucosidasa y β -galactosidasa en el desarrollo larval (Wei *et al.*, 2014b; Goncalves *et al.*, 2022). Aunque el

enfoque de la presente investigación estuvo encaminado principalmente al comportamiento de las proteínas y lípidos provenientes de la dieta, y los niveles de inserción de CBH en la dieta fueron muy bajos ($< 1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), se sobre-expresaron enzimas relacionadas con su metabolismo, con diferencias entre los tratamientos.

La quitina es el mayor componente estructural del exoesqueleto de los artrópodos (Arakane y Muthukrishnan, 2010), y su producción es sintetizada como un complejo proteína-polisacárido en los crustáceos (Horst, 1990; Skinner *et al.*, 1992; Terwilliger, 1999). La quitinasa (*CHT*), además de degradar la quitina proveniente del alimento, participa durante el estadio de premuda digiriéndola del antiguo esqueleto a una forma soluble, que es parcialmente reabsorbida para generar uno nuevo (Proespraiwong *et al.*, 2010); este gen ha sido sugerido, junto con otros, como indicador de crecimiento y desarrollo de los crustáceos (Xu *et al.*, 2017b). En *Scylla paramamosain*, y *Maja brachydactyla*, se detectaron los niveles más bajos en Z1, aumentando progresivamente hasta MG (Andrés *et al.*, 2010b; Zhou *et al.*, 2018), y durante el desarrollo larval de *S. paramamosain* su expresión aumentó significativamente durante el proceso de premuda (Zhou *et al.*, 2018).

En Z1 las larvas de *Hyas araneus* incrementaron hasta 300 % la concentración inicial de quitina ocho días después de su eclosión, sin encontrar diferencias entre larvas que fueron alimentadas y las que no se alimentaron, siendo la proteína el principal sustrato metabólico (Anger y Nair, 1979). Aunque las zoeas poseen una cutícula descalcificada, su crecimiento se realiza mediante la adición de capas orgánicas que implican deposición de nutrientes; en contraste, la cutícula en las megalopas y juveniles es más rígida y parcialmente calcificada (Anger, 2001). Este gen estuvo sobre-regulado en ambas dietas, y es probable que su presencia no se deba a procesos de digestión de CBH procedentes de la dieta debido a la baja concentración de este nutriente en el alimento, y esté más relacionada con las proteínas como se mencionó anteriormente; sin embargo, se requerirán estudios transcriptómicos más detallados con el fin de dilucidar su comportamiento y relación entre la concentración de nutrientes dietéticos y los procesos de muda. Análisis en adultos de *C. sapidus* en postmuda e intermuda indicaron que el exoesqueleto contenía 60 % de proteína y un 40% de quitina (Horst, 1990).

Algunas enzimas de tipo oxidoreductasas y liasas estuvieron sobre-reguladas en ambos tratamientos en los procesos de glucólisis y gluconeogénesis (ko-00010), y ciclo del citrato o Krebs (ko-00020), necesarios para el metabolismo basal de energía y respiración (Cuzon *et al.*, 2000); pero no es el objetivo de este trabajo discutir estos procesos. A pesar de que en el sistema digestivo no se observó la sobre-regulación de ningún gen relacionado con el aprovechamiento de los CBH, para el tratamiento 80/20 se presentaron tres hidrolasas a nivel de procesos celulares y metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos (ko-00520), la β -L-N-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52), y la quitinasa (EC 3.2.1.14); además de una pirofosfatasa (EC 3.6.1.9), en el metabolismo de almidón y sacarosa otras enzimas de tipo liasas y ligasas participaron en metabolizar el piruvato, glioxilato y dicarboxilato.

Se identificaron cinco tipos de hidrolasas en las zoeas alimentadas con 40/60, enzimas que se encontraron en los lisosomas, y participaron en el metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos. Estas fueron la β -L-N-acetilhexosaminidasa y la β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31), la última también estuvo sobre-expresada en la interconversión de pentosa y glucuronato (ko-00040) y metabolismo del ascorbato y aldatrato (ko-00053), la α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) en el metabolismo de galactosa (ko-00052), y α -glucosidasa y una pirofosfatasa (EC 3.6.1.9) en el metabolismo de almidón y sacarosa (ko-00500).

Otras enzimas de tipo oxidoreductasas, liasas y transferasas, les permitieron a las zoeas alimentadas con 40/60 un abanico más amplio de uso de sus CBH. Entre ellas está la ruta de la pentosa fosfato (ko-00030), clave en la homeostasis del carbono, procesos antioxidantes, biosíntesis de nucleótidos y AA y principal fuente de energía durante la ecdisis (Stincone *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). La expresión de fuentes alternas de energía como la galactosa (ko-00052) (Wang *et al.*, 2022b). El metabolismo de glucuronato en el ciclo de Krebs (ko-00040), que junto con el de la pentosa son altamente expresados cuando se estimula el rápido crecimiento en camarones (Huang *et al.*, 2021). Mejores respuestas antioxidantes asociadas a la producción de ascorbato y aldarato (ko-00053) (Xu *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022), y una regulación efectiva de la homeostasis mediante el metabolismo del propanoato (Wang *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2019).

A pesar de que el contenido de CBH en las dietas fue casi el mismo ($0,95 \pm 0,03$ y $0,95 \pm 0,11$ g 100 g⁻¹ para 80/20 y 40/60 respectivamente), las zoeas alimentadas con 80/20 sobre-regularon genes en solo seis de los quince caminos metabólicos relacionados con estos nutrientes, mientras que en 40/60 las Z2 lo hicieron en once. Los lípidos y los CBH están interconectados en el metabolismo energético, cuando el gasto energético aumenta, los lípidos se utilizan como fuente principal de energía y si estos están en abundante concentración, permiten ahorrar los carbohidratos almacenados (Bartlett y Eaton, 2004). La calidad de nutrientes suministrados por el S.presso (Inve®), proporcionan una alta concentración de grasas (32 %), su tabla nutricional indica una adición de 150 mg g⁻¹ de ω 3 HUFA en peso seco, y una proporción de DHA/EPA de 9. Al presentarse una mayor concentración de estos nutrientes en 40/60, es probable que este “ahorro” de CBH les permitiera a las zoeas una designación más amplia de caminos metabólicos para su aprovechamiento, a diferencia de 80/20 donde la disponibilidad de los lípidos fue mucho más limitada, y por ende lo fueron los CBH. En *Scylla parmamosain* pudo observarse como la proporción en la dieta de DHA/EPA reguló el metabolismo de los CBH a través del camino de señalización *PPAR* (receptores activados por proliferadores de peroxisomas), un grupo de proteínas receptoras nucleares que funcionan como factores de transcripción para controlar el metabolismo de CBH y lípidos (Chen y Yang, 2014; Wang *et al.*, 2022a).

Los minerales realizan una variedad de funciones bioquímicas en la homeostasis y señalización de las células, y como cofactores de enzimas, además de formar parte estructural del exoesqueleto y tejidos. Los microminerales son cobre, parte integral de los pigmentos de la hemocianina, hierro componente del citocromo y enzimas; manganeso que hace parte de algunas enzimas; selenio compuesto de la enzima oxidativa glutatión peroxidasa y zinc, componente de algunas enzimas (Saborowski, 2015). En el sistema digestivo, el camino metabólico relacionado con la absorción de minerales (ko-04978) estuvo sobre-regulado en ambos tratamientos; sin embargo, en 80/20 solo el gen *SLC39A4* (familia de transportadores de solutos 39 miembro 4), relacionado con la absorción del Zn estuvo presente, mientras que en 40/60 se sobre-expresaron el *SLC39A4*, *FTH1* (ferritina, EC 1.16.3.2), y *ATP7A* (ATPasa tipo P de unión a Cu). En adultos de *C. sapidus* fue posible demostrar cambios en la distribución citosólica del Cu y Zn en el HP, 90 min. después de la ecdisis, que se correlacionaron positivamente con la degradación de hemocianina y la liberación de Cu (Engel y Brouwer, 1993). Estos microelementos son transportados en el

organismo unidos a proteínas de transporte, y se acumulan en gránulos concéntricos en las células R del HP (Vogt, 2019, 2021).

Es probable que la acción de las carbohidrasas, proteasas y lipasas haya podido verse influenciada a pequeña escala por la adición a una baja concentración de la microalga *Nannochloropsis* sp., ya que los crustáceos decápodos poseen la habilidad durante sus primeros estadios larvales de digerirla, aunque su aporte de nitrógeno, lípidos y CBH sea pobre en comparación con otros alimentos (Kent *et al.*, 2011; Gamboa-Delgado *et al.*, 2019), o como en este caso por la calidad y concentración de los nutrientes incorporados en las dietas. Esto solo podría asegurarse observando los perfiles transcriptómicos de las zoeas alimentadas únicamente con la microalga, aunque en ensayos preliminares (sin publicar), pudo observarse que las larvas de *C. sapidus* no sobrevivieron más de cinco días al alimentarse solo con esta microalga, al igual que se ha reportado en sus primeros intentos de cultivo (Costlow y Bookhout, 1959a; Sulkin y Epifanio, 1975). Al adicionarse al agua, además de los rotíferos enriquecidos, mejoró la supervivencia de las larvas en comparación con otros ensayos piloto en los cuales no se utilizó, reafirmando la conveniencia de su uso a modo de “agua verde” en el cultivo larvario de crustáceos (Zmora *et al.*, 2005; Neori, 2011; Basford *et al.*, 2021).

A medida que el alimento es macerado y lubricado con mucus, su consistencia cambia de sólida a suave y babosa, e inicia su digestión en el estómago (Spitzner *et al.*, 2018; Vogt, 2021). Las partículas gruesas pasan directamente al intestino medio y las finas y líquidas entran al HP, y los productos de bajo peso molecular se absorben por endocitosis en las células R del HP (Štrus *et al.*, 2019; Vogt, 2021). Se ha determinado que uno de los mecanismos de ingreso de las partículas a las células es mediante endocitosis dependiente de clatrina (CLTC); la función primordial de este gen es recubrir las vesículas intracelulares (Xu *et al.*, 2017a), y fue detectado en los lisosomas de ambas dietas, como es común para este organelo (Ballabio, 2016).

Dependiendo de los nutrientes que ingresen a la célula en estas vesículas recubiertas por clatrina, los cargamentos se clasifican en distintos destinos y comprenden la participación de muchos genes, los cuales no fueron objeto de este estudio. Lo que si se desea resaltar es que en los procesos de endocitosis de las zoeas alimentadas con 80/20, solo se sobre-

regularon dos genes, el *CLTC* anteriormente mencionado y el *TSG101* (subunidad del complejo ESCRT-I TSG101), que participan en la entrega de cargas en las membranas de los endosomas tardíos (von Zastrow ybSorkin, 2007). Mientras que en 40/60 el proceso de endocitosis sobre-reguló nueve tipos de genes, entre ellos *CLTC* y *TSG101*, proteínas accesorias a la clatrina como la dinamina (*DNM1_3*), y marcadores como la ubiquitina (*NEDD4*). Esta última se asocia a una variedad de proteínas intracelulares para transmitir señales de degradación (Pickart y Eddins, 2004). También se sobre-regularon otros genes de procesos de señalización, que dependiendo de las proteínas asociadas a las membranas de los endosomas, liberarán su carga en diferentes destinos. Las células R poseen complejos de organelos celulares específicos en su parte basal y apical, la primera en contacto con el lumen, para promover la absorción de nutrientes, y la segunda para entregar los nutrientes y metabolitos a la hemolinfa (Vogt, 2021).

En suma, el conocimiento del transcriptoma y su regulación es fundamental para la interpretación articulada de los diversos constituyentes moleculares que integran la red de respuesta génica ante un determinado evento inductor. Desde el inicio de la alimentación exógena, entre el primer y segundo estadio de zoeas se pudo determinar que la sobre-regulación de los genes relacionados con el sistema digestivo, y los procesos celulares de transporte y catabolismo, así como las enzimas que participaron en los procesos de metabolismo de los lípidos, proteínas y CBH fueron significativamente influenciados por la concentración de nutrientes en la dieta. Sin embargo, el número de transcripciones fue bajo en comparación con otras especies mucho más estudiadas. Investigaciones futuras deberán estar encaminadas a dilucidar las secuencias, estructuras y funcionalidad de las enzimas, con enfoque especial en las digestivas.

Las capacidades fisiológicas y metabólicas de las zoeas alimentadas con la dieta con mayor contenido de lípidos (40/60), no solo mejoraron los niveles de expresión de los genes relacionados con este nutriente, sino que también influenciaron el metabolismo de las proteínas y los CBH, y los niveles de expresión de genes relacionados con el sistema digestivo y transporte y catabolismo celular, durante los dos primeros estadios larvales de *C. sapidus*, siendo éste el primer reporte relacionado con este tema para la especie. Futuras investigaciones permitirán dilucidar cómo el efecto a largo plazo de estas dietas

puede afectar los patrones de expresión, el metabolismo de nutrientes y sus procesos de muda, como se observó a nivel macroscópico en el primer capítulo.

3. Conclusiones

- El enriquecimiento del rotífero *B. plicatilis* durante 24 h con diferentes proporciones Ch/Spr afecta significativamente el desarrollo larvario de *C. sapidus* en términos de supervivencia, crecimiento y ciclo de muda.
- Las dietas con mayor contenido de lípidos (40/60 y 50/50) mostraron la mejor supervivencia, duración del ciclo larvario, tamaño y peso de las megalopas y cortos periodos de muda.
- Los coeficientes de correlación indicaron una relación significativa entre el contenido de lípidos, cenizas y energía de la dieta y las variables de respuesta de producción de las larvas. Los hallazgos pueden aplicarse en pruebas piloto para cultivar larvas de cangrejo azul en el Caribe y también pueden usarse para estudiar otras especies de crustáceos con características similares.
- El tamaño del transcriptoma y el número de unigenes anotados cuando las larvas eclosionan (Inicial), es casi el doble en comparación a los transcriptomas en las Z2 después de nueve días de alimentación con las dietas experimentales.
- Las zoeas de la dieta 40/60 presentaron mayor número de genes sobre-regulados, y participación en las rutas metabólicas.
- La concentración de lípidos suministrados en las dietas afectó a nivel transcriptómico la expresión de las lipasas, la biosíntesis de los ácidos grasos, y la β -oxidación en el HP y peroxisomas en las larvas de *C. sapidus*
- El contenido de lípidos en la dieta también influyó en el metabolismo de las proteínas y los CBH, así como en los niveles de expresión de genes relacionados con el sistema digestivo y transporte y catabolismo celular.

4. Bibliografía

- Aaqillah-Amr, M.A., Hidir, A., Azra, M.N., Ahmad-Ideris, A.R., Abualreesh, M.H., Noordiyana, M.N., and Ikhwanuddin, M. 2021. Use of pelleted diets in commercially farmed decapods during juvenile stages: A Review. *Animals*, 11: 1971. <https://doi.org/10.3390/ani11061761>
- Abrunhosa, F., and Melo, M. 2008. Development and functional morphology of the foreguts of larvae and postlarvae of three crustacean decapods. *Braz. J. Biol.*, 68: 221–228. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000100032>
- Abu-Rezq, T., Al-Abdul-Elah, K., Duremdez, R., Al-Marzouk, A., James, C. M., Al-Gharabally, H., Al-Shimmari, J. 2002. Studies on the effect of using the rotifer, *Brachionus plicatilis*, treated with different nutritional enrichment media and antibiotics on the growth and survival of blue-fin sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes), larvae. *Aquac. Res.*, 33: 117–128. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00658.x>
- Acosta, E., and Gómez-León, J. 2013. Influence of larval density at the initial seeding and the concentration of food on *Argopecten nucleus* larviculture (Ostreoida: Pectiniidae). *Bol. Investig. Mar. Cost.*, 42 (1): 73–90. <http://boletin.invemar.org.co:8085/ojs/index.php/boletin/article/view/60>
- Aggio, J.F., Tieu, R., Wei, A., and Derby, C.D. 2012. Oesophageal chemoreceptors of blue crabs, *Callinectes sapidus*, sense chemical deterrents and can block ingestion of food. *J. Exp. Biol.*, 215: 1700–1710. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0324-17.2017A>

- Agh, N., and Sorgeloos, P. 2005. Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture. Urmia, Iran. 61 p.
- Aguilar, R., Johnson, E.G., Hines, A.H., Kramer, M.A., and Goodison, M.R. 2008. Importance of blue crab life history for stock enhancement and spatial management of the fishery in Chesapeake Bay. *Rev. Fish. Sci.*, 16: 117–124. <https://doi.org/10.1080/10641260701681599>
- Alagawany, M., Taha, A.E., Noreldin, A., El-Tarabily, K. A., and Abd El-Hack, M.E. 2021. Nutritional applications of species of *Spirulina* and *Chlorella* in farmed fish: A review. *Aquaculture*, 542 736841. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736841>
- Alava, V.R., Quintio, E.T., De Pedro, J.B., Orosco, Z.G.A., and Wille, M. 2007. Reproductive performance, lipids and fatty acids of mud crab *Scylla serrata* (Forsskål) fed dietary lipid levels. *Aquac. Res.*, 38: 1442–1451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01722.x>
- Ali, Y.B., Verger, R., and Abousalham, A. 2012. Lipases or esterases: Does it really matter? toward a new bio-physico-chemical classification. 31–51. In: Sandoval, G. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*, Vol 861. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_2
- Allman, A.L., Williams, E.P., and Place, A.R. 2017. Growth and enzyme production in blue crabs (*Callinectes sapidus*) fed cellulose and chitin supplemented diets. *J. Shellfish Res.*, 36: 283–291. <https://doi.org/10.2983/035.036.0132>
- Almeida, E.V., Cardoso, C.S., Souza, M.S., and Bonecker, S.L.C. 2021. Swimming behavior of newly hatched larvae of six decapod species (Crustacea: Decapoda). *Nauplius*, <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2021023>
- Amaro, M.A., and Fiscarelli, A.G. 2009. Length-weight relationship and condition factor of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae). *Braz. Arch. Biol.*, 52: 397–406. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000200017>
- Amsler, M.O., and George, R.Y. 1984. Seasonal variation in the biochemical composition of the embryos of *Callinectes sapidus* Rathbun. *J. Crustac. Biol.*, 4: 546–553. <https://doi.org/10.2307/1548068>

- Anastasia, J.R., Morgan, S.G., and Fisher, N.S. 1998. Tagging crustacean larvae: Assimilation and retention of trace elements. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 362–368. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.2.0362>
- Andrés, M., Estévez, A., Anger, K., and Rotllant, G. 2008. Developmental patterns of larval growth in the edible spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 357: 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.12.015>
- Andrés, M., Estévez, A., Hontoria, F., and Rotllant, G. 2010a. Differential utilization of biochemical components during larval development of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *Mar. Biol.*, 157: 2329–2340. <http://hdl.handle.net/10261/43429>
- Andrés, M., Estévez, A., and Rotllant, G. 2007. Growth, survival and biochemical composition of spider crab *Maja brachydactyla* (Balss, 1922) (Decapoda: Majidae) larvae reared under different stocking densities, prey: larva ratios and diets. *Aquaculture*, 273: 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.10.026>
- Andrés, M., Gisbert, E., Díaz, M., Moyano, F. J., Estévez, A., and Rotllant, G. 2010b. Ontogenetic changes in digestive enzymatic capacities of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 389: 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.03.015>
- Anger, K. 1983. Moults cycle and morphogenesis in *Hyas araneus* larvae (decapoda, majidae), reared in the laboratory. *Helgolander Meeresun.*, 36: 285–302. <https://doi.org/10.1007/BF01983632>
- Anger, K. 1987. The D0 threshold: a critical point in the larval development of decapod crustaceans. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 108: 15–30. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(87\)90128-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90128-6)
- Anger, K. 2001. *The Biology of Decapod Crustacean Larvae: Crustacean Issues Volume 14*. A.A. Balkema Publishers, Pensilvania. 419 p. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00381-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00381-7)
- Anger, K. 2006. Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 49: 175–205. <https://doi.org/10.1080/07924259.2006.9652207>

- Anger, K., and Dawirs, R.R. 1981. Influence of starvation on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgolander Meeresun.*, 34: 287–311. <https://doi.org/10.1007/BF02074124>
- Anger, K., Dawirs, R.R., Anger, V., Goy, J.W., and Costlow, J.D. 1981. Starvation resistance in first stage zoeae of brachyuran crabs in relation to temperature. *J. Crustac. Biol.*, 1: 518–525. <https://doi.org/10.2307/1548128>
- Anger, K., and Nair, K.K.C. 1979. Laboratory experiments on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgol. Wiss. Meer.*, 32: 36–54. <https://doi.org/10.1007/BF02189891>
- Anger, K., and Spindler, K.D. 1987. Energetics, moult cycle and ecdysteroid titers in spider crab (*Hyas araneus*) larvae starved after the D0 threshold. *Mar. Biol.*, 94: 367–375. <https://doi.org/10.1007/BF00428242>
- Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J.S., and Pevzner, P.A. 2016. hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics*, 32: 1009–1015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>
- A.O.A.C. 1984. Official methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 13th ed. AOAC, Washington. 1038 p.
- A.O.A.C. 2000. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. Sigma-Aldrich, Washington. 2200 p.
- A.O.A.C. 2005. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. AOAC, Arlington
- Arakane, Y., and Muthukrishnan, S. 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67: 201–216. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0161-9>
- Arguelles, E. 2021. Biochemical composition and bioactive properties of *Chlorella minutissima* (Chm1) as a potential source of chemical compounds for nutritional feed supplement and disease control in aquaculture. *Curr. Appl. Sci. Technol.* 21: 65–77. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/cast/article/view/245911>
- Arias-Moscoso, J.L., Cuevas-Acuña, D.A., Rivas-Vega, M.E., Martínez-Córdova, L.R., Osuna-Amarilas, P., and Miranda-Baeza, A. 2016. Características físicas y

químicas de biofloc liofilizado producido en cultivos de camarón blanco con diferente inclusión de harina de pescado en la dieta. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44: 760-768. <http://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-12>

Asadpour-Ousalou, Y.A. 2014. Application of shark liver oil for *Artemia* enrichment and its comparison with imported Selco oil. *Glob. Vet.*, 13: 1037–1042. [http://www.idosi.org/gv/gv13\(6\)14/13.pdf](http://www.idosi.org/gv/gv13(6)14/13.pdf)

Ashraf, M.Y., Javed Iqbal, M., and Naqvi, S.A. 2011. Replacement of expensive pure nutritive media with low cost commercial fertilizers for mass culture of freshwater algae, *Chlorella vulgaris* Intensive fish culture. *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 484–490. https://www.researchgate.net/profile/Muhammad-Iqbal-147/publication/288717170_Replacement_of_Expensive_Pure_Nutritive_Media_with_Low_Cost_Commercial_Fertilizers_for_Mass_Culture_of_Freshwater_Algae_Chlorella_vulgaris/links/58f21746aca27289c2167107/Replacement-of-Expensive-Pure-Nutritive-Media-with-Low-Cost-Commercial-Fertilizers-for-Mass-Culture-of-Freshwater-Algae-Chlorella-vulgaris.pdf

Austin, E.L., and Moore, P.A. 2022. Influence of amino acid concentrations on foraging and feeding in the rusty crayfish *Faxonius rusticus* (Girard, 1852) (Decapoda: Astacidea: Cambaridae), assayed in flow-through mesocosms. *J. Crustac. Biol.*, 42: <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruac034>

Azra, M.N., Chen, J.C., Hsu, T.H., Ikhwanuddin, M., and Abol-Munafi, A.B. 2019. Growth, molting duration and carapace hardness of blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, instars at different water temperatures. *Aquac. Rep.*, 15: 100226. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100226>

Bacab, F.J., Amador, L.E., Valdes, R., and Cabrera, P. 2002. Cultivo de larvas de la jaiba azul *Callinectes sapidus* en condiciones de laboratorio en la Isla del Carmen, Campeche, México. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura - Civa, 122–128. https://www.researchgate.net/profile/Luis-Enrique-Amador-Del-Angel/publication/235256039_Cultivo_de_larvas_de_la_jaiba_azul_Callinectes_sapidus_en_condiciones_de_laboratorio_en_la_Isla_del_Carmen_Campeche_Mexico_Mexico/links/0deec52a8ee312ec10000000/Cultivo-de-larvas-de-la-jaiba-azul-

[Callinectes-sapidus-en-condiciones-de-laboratorio-en-la-Isla-del-Carmen-Campeche-Mexico-Mexico.pdf](#)

- Ballabio, A. 2016. The awesome lysosome. *EMBO Mol. Med.*, 8: 73–76.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26787653/>
- BangHong, W., ZhiGang, Y., YongXu, C., Hang, Y., and XiaoZhen, Y. 2019. Gene cloning and expression analysis of pancreatic lipase in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Gen. Appl. Biol.*, 38: 2466–2475.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193351306>
- Bartlett, K., and Eaton, S. 2004. Mitochondrial β -oxidation. *European J. Mol. Biol. Biochem.*, 271: 462–469. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x>
- Barrett, A.J. 1994. [1] Classification of peptidases. *Meth. Enzymol.*, 244: 1–15.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44003-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44003-4)
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F. 2004. *Handbook of proteolytic enzymes*. Elsevier Academic Press. Miami. 984 p.
- Basford, A.J., Makings, N., Mos, B., White, C.A., and Dworjanyn, S. 2021. Greenwater, but not live feed enrichment, promotes development, survival, and growth of larval *Portunus armatus*. *Aquaculture*, 534: 736331.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736331>
- Baylon, J.C. 2009. Appropriate food type, feeding schedule and *Artemia* density for the zoea larvae of the mud crab, *Scylla tranquebarica* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Aquaculture*, 288, 190–195.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.028>
- Baylon, J.C., Bravo, M.E.A., and Maningo, N.C. 2004. Ingestion of *Brachionus plicatilis* and *Artemia salina* nauplii by mud crab *Scylla serrata* larvae. *Aquac. Res.*, 35: 62–70.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.00987.x>
- Begum, N., Mamun Siddiky, M.N.S., Ahmmed, S. 2021. Comparison of growth performance of live feed microalgae and rotifer (*Brachionus* sp.) under different feeding medium in outdoor culture condition. *World J. Biol. Pharm. Health Sci.* 5: 025–032.
<https://doi.org/10.30574/wjbphs.2021.5.2.0008>

- Belgrad, B.A., and Griffen, B.D. 2016. The influence of diet composition on fitness of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Plos One, 11: e0145481. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26784581/>
- Bell, J.D., Leber, K.M., Blankenship, H.L., Loneragan, N.R., and Masuda, R. 2008. A new era for restocking, stock enhancement and sea ranching of coastal fisheries resources. Rev. Fish. Sci., 16: 1–9. <https://doi.org/10.1080/10641260701776951>
- Bembe, S., Liang, D., and Chung, J.S. 2017. Optimal temperature and photoperiod for the spawning of blue crab, *Callinectes sapidus*, in captivity. Aquac. Res., 48: 5498–5505. <https://doi.org/10.1111/are.13366>
- Bhavan, P.S., Devi, V.G., Shanti, R., Radhakrishnan, S., and Poongodi, R. 2010. Basic biochemical constituents and profiles of amino acids in the post larvae of *Macrobrachium rosenbergii* fed with spirulina and yeast enriched *Artemia*. J. Sci. Res., 2 539–539. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:83716180>
- Biesiot, P.M., and Capuzzo, J.M.D. 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 136: 107–122. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(90\)90190-N](https://doi.org/10.1016/0022-0981(90)90190-N)
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30: 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bonilla-Gómez, J.L., Chiappa-Carrara, X., Galindo, C., Cuzón, G., and Gaxiola, G. 2013. Effects of adaptation to laboratory conditions on growth, molting, and food consumption of juvenile *Farfantepenaeus duorarum* (Decapoda: Penaeidae). J. Crustac. Biol., 33: 191–197. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002125>
- Bookhout, C., and Costlow, J.D. 1977. Larval development of *Callinectes similis* reared in the laboratory. Bull. Mar. Sci., 27: 704–728. <https://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1977/00000027/0000004/art00006>
- Bown, D.P., and Gatehouse, J.A. 2004. Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity

- towards C-terminal glutamate residues. *Eur. J. Biochem.*, 271: 2000–2011.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04113.x>
- Brandão, M.C., Freire, A.S., and Burton, R.S. 2016. Estimating diversity of crabs (Decapoda: Brachyura) in a no-take marine protected area of the SW Atlantic coast through DNA barcoding of larvae. *Syst. Biodivers.*, 14: 288–302.
<https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1140245>
- Brito, R., Rosas, C., Chimal, M.E., Gaxiola, G. 2001. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. *Aquac. Res.*, 32: 257-266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00548.x>
- Brooks, W.K. 1882. Handbook of invertebrate zoology for laboratories and seaside work. Bradlee Whidden, Boston. 392 p.
- Brucet, S., Boix, D., López-Flores, R., Badosa, A., and Quintana, X.D. 2005. Ontogenic changes of amino acid composition in planktonic crustacean species. *Mar. Biol.*, 148: 131–139. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0068-4>
- Bu, X., Wang, X., Lin, Z., Wang, C., Li, L., Liu, S., Shi, Q., Qin, J.G., and Chen, L. 2022. Myo-inositol improves growth performance and regulates lipid metabolism of juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) fed different percentage of lipid. *Br. J. Nutr.*, 127: 666–678. <https://doi.org/10.1017/S0007114521001409>
- Calado, R., Carvalho, L., Rodrigues, A.C.M., Abe, F., Patrício, S.A.L., Soares, A.M.V.M., and Gravato, C. 2022. The physiological consequences of delaying metamorphosis in the marine ornamental shrimp *Lysmata seticaudata* and its implications for aquaculture. *Aquaculture*, 546: 737391.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737391>
- Cantalapiedra, C.P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., and Huerta-Cepas, J. 2021. eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Mol. Biol. Evol.*, 38: 5825–5829.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>
- Caracappa, J.C., and Munroe, D.M. 2018. Morphological variability among broods of first-stage blue crab (*Callinectes sapidus*) zoeae. *Biol. Bull.*, 235: 123–133.
<https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/699922>

- Cardona, E., Lorgeoux, B., Geffroy, C., Richard, P., Saulnier, D., Gueguen, Y., Guillou, G., and Chim, L. 2015. Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) reared in biofloc: Assessment by C and N stable isotope ratios and effect on key digestive enzymes. *Aquaculture*, 448: 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.035>
- Carić, M., Sanko-Njire, J., and Skaramuca, B. 1993. Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). *Aquaculture*, 110: 141–150. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90268-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90268-4)
- Carneiro, W.F., Castro, T.F.D., Orlando, T.M., Meurer, F., Paula, D.A.J., Virote, B.C.R., Vianna, A.R.C.B., and Murgas, L.D.S. 2020. Replacing fish meal by *Chlorella* sp. meal: Effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters and digestive enzymes. *Aquaculture*, 528: 735612. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735612>
- Carrillo-Farnés, O., Forrellat-Barrios, A., Guerrero-Galván, S., and Vega-Villasante, F. 2007. A review of digestive enzyme activity in penaeid shrimps. *Crustaceana*, 80: 257–275. <https://www.jstor.org/stable/20107805>
- Carter, C.G. 2015. Feeding in hatcheries. 317-348. In: Davis, D.A. (Ed.). *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Woodhead Publishing, Oxford. 432 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00013-1>
- Carter, C.G., and Codabaccus, M.B. 2022. Feeding in hatcheries. 355–398. In: Davis, D.A. (Ed.). *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Woodhead Publishing, Cambridge. 403 p.
- Carter, C.G., and Mente, E. 2014. Protein synthesis in crustaceans: A review focused on feeding and nutrition. *Cent. Eur. J. Biol.*, 9: 1–10. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0134-0>
- Castejón, D., Rotllant, G., Alba-Tercedor, J., Font-i-Furnols, M., Ribes, E., Durfort, M., and Guerao, G. 2019. Morphology and ultrastructure of the midgut gland (“hepatopancreas”) during ontogeny in the common spider crab *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Brachyura, Majidae). *Arthropod Struct. Dev.*, 49: 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2018.11.013>

- Ceccaldi, H.J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. 261–291. In: D’Abramo, L., Conklin, D., and Akiyama, D. (Eds.). Crustacean nutrition. The World Aquaculture Society, Louisiana. 587 p.
- Cha, G.H., Wang, W.N., Peng, T., Huang, M.Z., and Liu, Y. 2015. A Rac1 GTPase is a critical factor in the immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus* infection. Dev. Com. Immunol., 51: 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.04.004>
- Chakraborty, K., Chakraborty, R.D., Radhakrishnan, E.V., and Vijayan, K.K. 2010. Fatty acid profiles of spiny lobster (*Panulirus homarus*) phyllosoma fed enriched *Artemia*. Aquac. Res., 41: e393–e403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02469.x>
- Chandhini, S., and Kumar, R. 2019. Transcriptomics in aquaculture: current status and applications. Rev. Aquac., 11: 1379–1397. <https://doi.org/10.1111/raq.12298>
- Chang, E.S., and Mykles, D.L. 2011. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. Gen. Comp. Endocrinol., 172: 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.04.003>
- Chaouangrit, L., Tapaneeyaworawong, P., Powtongsook, S., and Sanoamuang, L. 2018. Alternative microalgal diets for cultivation of the fairy shrimp *Branchinella thailandensis* (Branchiopoda: Anostraca). Aquacult. Int., 26: 37–47. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0191-5>
- Chen, B., Zheng, J., Chen, C., Wu, K., Lin, F., Ning, L., Rong, H., Chen, C., Xiao, F., Zhang, H., and Wen, X. 2023. Differences in lipid accumulation and mobilization in the hepatopancreas and ovary of female mud crab (*Scylla paramamosain*, Estampador, 1949) during ovarian development. Aquaculture, 564: 739046. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739046>
- Chen, L., and Yang, G. 2014. PPARs integrate the mammalian clock and energy metabolism. PPAR Res., 2014: 653017. <https://doi.org/10.1155/2014/653017>
- Chi, Y., Li, F., Sun, Y., Wen, R., and Li, S. 2013. Expression and function analysis of Rac1 homolog in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol., 35: 927–932. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.006>

- Chiu, T.T., Jensen, T.E., Sylow, L., Richter, E.A., and Klip, A. 2011. Rac1 signalling towards GLUT4/glucose uptake in skeletal muscle. *Cell. Signal.*, 23: 1546–1554. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.022>
- Christiansen, M.E., and Costlow, J.D. 1982. Ultrastructural study of the exoskeleton of the estuarine crab *Rhithropanopeus harrisi*: Effect of the insect growth regulator Dimilin® (diflubenzuron) on the formation of the larval cuticle. *Mar. Biol.*, 66: 217–226. <https://doi.org/10.1007/BF00397025>
- Chung, J.S. 2010. Hemolymph ecdysteroids during the last three molt cycles of the blue crab, *Callinectes sapidus*: quantitative and qualitative analyses and regulation. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 73: 1–13. <https://doi.org/10.1002/arch.20327C>
- Chung, J.S. 2020. Role of hepatopancreas trehalose-6-phosphate synthase in carbohydrate levels of the blue crab *Callinectes sapidus* in feeding and emersion. *J. Shellfish Res.*, 39: 449–459. <https://doi.org/10.2983/035.039.0226>
- Churchill, E.R. 1942. The zoeal stages of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Ches. Biol. Lab. Pub.* 49. 26 p.
- Cock, P.J.A., Grüning, B.A., Paszkiewicz, K., and Pritchard, L. 2013. Galaxy tools and workflows for sequence analysis with applications in molecular plant pathology. *PeerJ*, e167. <https://doi.org/10.7717/peerj.167>
- Codabaccus, B.M., Carter, C.G., Fitzgibbon, Q.P., Trotter, A.J., and Smith, G.G. 2020. Growth and biochemical composition of hatchery reared *Scyllaridae* lobster (*Thenus australiensis*) larval stages, nisto and juvenile first stage. *Aquaculture*, 524: 735262. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735262>
- Côrtés, G., and Tsuzuki, M.Y. 2012. Effect of different live food on survival and growth of first feeding barber goby, *Elacatinus figaro* (Sazima, Moura & Rosa 1997) larvae. *Aquac. Res.*, 43: 831–834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02896.x>
- Costlow, J.D. 1965. Variability in larval stages of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.*, 128: 58–66. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.2307/1539389?journalCode=bbi>

- Costlow, J.D. 1967. The effect of salinity and temperature on survival and metamorphosis of megalops of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Elgoland. Wiss. Meer.*, 15: 84–97. <https://doi.org/10.1007/BF01618611>
- Costlow, J.D., and Bookhout, C.G. 1959a. Preliminary note on the complete larval development of *Callinectes sapidus* Rathbun under laboratory conditions. *Limnol. Oceanogr.* 4: 222–223. <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.4319/lo.1959.4.2.0222>
- Costlow, J.D., and Bookhout, C.G. 1959b. The larval development of *Callinectes sapidus* Rathbun reared in the laboratory. *Biol. Bull.* 116: 373–396. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.2307/1538947?journalCode=bbj>
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Pinal-Mansilla, J.D., and Wesche-Ebelling, P. 1994. Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*: economical impact. *Aquaculture*, 123: 349–360. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90070-1)
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G., and Van Wormhoudt, A. 2000. Utilization of carbohydrates by shrimp. 328–339. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., and Civera-Cerecedo, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V*. Mérida. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/282>
- da Silva, U.A.T., Cottens, K., Ventura, R., Boeger, W. A., and Ostrensky, A. 2012. Different pathways in the larval development of the crab *Ucides cordatus* (Decapoda, Ocypodidae) and their relation with high mortality rates by the end of massive larvicultures. *Pesquisa Vet. Brasil.*, 32: 284–288. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000400002>
- Dai, T., Zhang, X., Li, M., Tao, X., Jin, M., Sun, P., Zhou, Q., and Jiao, L. 2022. Dietary vitamin K3 activates mitophagy, improves antioxidant capacity, immunity and affects glucose metabolism in *Litopenaeus vannamei*. *Food Funct.*, 13: 6362–6372. <https://doi.org/10.1039/D2FO00865C>

- Dai, Y., Wang, T.T., Wang, Y.F., Gong, X.J., and Yue, C.F. 2009. Activities of digestive enzymes during embryonic development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda). *Aquac. Res.*, 40: 1394–1399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02237.x>
- Daly, B.J., Eckert, G.L., and Long, W.C. 2020. Moulding the ideal crab: implications of phenotypic plasticity for crustacean stock enhancement. *ICES J. Mar. Sci.*, 78: 421-434. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsaa043>
- Dan, S., and Koiso, M. 2008. Effect of microalgal addition on stability of n-3HUFA contents in enriched rotifer *Brachionus plicatilis* in large tank for seed production. *Aquac. Sci.*, 56: 603-604. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.56.603>
- Dan, S., and Hamasaki, K. 2011. Effects of salinity and dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on the survival, development, and morphogenesis of the larvae of laboratory-reared mud crab *Scylla serrata* (Decapoda, Portunidae). *Aquac. Int.*, 19: 323–338. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9374-z>
- Dan, S., Ashidate, M., and Hamasaki, K. 2015. Improved method for culturing the swimming crab *Portunus trituberculatus* larvae to prevent mass mortality during seed production. *Fish. Sci.*, 82: 113–126. <https://doi.org/10.1007/s12562-015-0935-y>
- Davis, J.A. 2003. Development of hatchery techniques for the mud crab *Scylla serrata* (Forská) in South Africa. Tesis Ph.D. in Applied Biological Sciences, Universiteit Gent, Bélgica. 165 p. <https://biblio.ugent.be/publication/521739/file/1875443.pdf#page=101>
- Dawirs, R.R. 1984. Influence of starvation on larval development of *Carcinus maenas* L. (Decapoda : Portunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 80: 47–66. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90093-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90093-5)
- Deleo, D.M., Pérez-Moreno, J.L., Vázquez-Miranda, H., and Bracken-Grissom, H.D. 2018. RNA profile diversity across arthropoda: guidelines, methodological

- artifacts, and expected outcomes. *Biol. Methods Protoc.*, 3: bpy012. <https://doi.org/10.1093/biomet/bpy012>
- De Silva, S.S., and Anderson, T.A. 1994. *Fish Nutrition in Aquaculture*. Aquaculture Series. Chapman y Hall, London. 320 p.
- De Walsche, C., Mertens, J., and Dumont, H.J. 1991. Observations on temperature optimum, cyst production, and survival of *Streptocephalus proboscideus* (Frauenfeld, 1873) (Crustacea: Anostraca), fed different diets. *Hydrobiologia*, 212: 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF00025983>
- Dendinger, J.E. 1987. Digestive proteases in the midgut gland of the atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, 88: 503–506. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90334-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90334-8)
- Dendinger, J.E., and Alterman, A. 1983. Mechanical properties in relation to chemical constituents of postmolt cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Phys.*, 75: 421–424. <http://biomimetic.pbworks.com/f/MECHANICAL+PROPERTIES+IN+RELATION+TO+Dendinger.pdf>
- Dendinger, J.E., and O'Connor, K.L. 1990. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, 95: 525–530. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90014-K](https://doi.org/10.1016/0305-0491(90)90014-K)
- Dhert, P., King, N., and O'Brien, E. 2014. Stand-alone live food diets, an alternative to culture and enrichment diets for rotifers. *Aquaculture*, 431: 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.021>
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., and Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200: 129–146. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00697-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00697-4)
- Díaz-Tenorio, L.M., García-Carreño, F.L., and Navarrete del Toro, M.A. 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab,

Callinectes arcuatus. Invertebr. Biol., 125: 125–135.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2006.00047.x>

Domingues, P.M., Turk, P.E., Andrade, J.P., and Lee, P.G. 2001. Effects of enriched *Artemia* nauplii on production, survival and growth of the mysid shrimp *Mysidopsis almyra* Bowman 1964 (Crustacea: Mysidacea). Aquac. Res., 32: 599–603. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00608.xD>

Donnelly, J.M. 2009. Blue crab farming on Maryland's eastern shore. Doctoral Thesis. University of Maryland, College Park, Maryland. 102 p.
<https://drum.lib.umd.edu/handle/1903/10054>

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Engel, D. W., and Brouwer, M. 1993. Crustaceans as models for metal metabolism: I. Effects of the molt cycle on Blue Crab Metal Metabolism and Metallothionein. Mar. Environ. Res., 35, 1–5. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(93\)90004-J](https://doi.org/10.1016/0141-1136(93)90004-J)

Epelbaum, A., and Borisov, R. 2006. Feeding behaviour and functional morphology of the feeding appendages of red king crab *Paralithodes camtschaticus* larvae. Mar. Biol. Res., 2: 77–88.
<https://doi.org/10.1080/17451000600672529>

Epifanio, C.E. 2019. Early life history of the blue crab *Callinectes sapidus*: A Review. J. Shellfish Res., 38: 1–22. <https://doi.org/10.2983/035.038.0101>

Estudillo-del Castillo, C., Gapsin, R.S., and Leño, E.M. 2009. Enrichment potential of HUFA-rich thraustochytrid *Schizochytrium mangrovei* for the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture, 293: 57–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.04.008.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.008>

Factor, J.R. 1982. Development and metamorphosis of the feeding apparatus of the stone crab, *Menippe mercenaria* (brachyura, xanthidae). J. Morphol., 172: 299–312. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051720305>

- Fang, F., Yuan, Y., Jin, M., Shi, B., Zhu, T., Luo, J., Lu, J., Wang, X., Jiao, L., and Zhou, Q. 2021. Hepatopancreas transcriptome analysis reveals the molecular responses to different dietary n-3 PUFA lipid sources in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, 543: 737016. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737016>
- Fan, L., Wang, A., Miao, Y., Liao, S., Ye, C., and Lin, Q. 2016. Comparative proteomic identification of the hepatopancreas response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 454: 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.016>
- Fan, L., Wang, L., and Wang, Z. 2019. Proteomic characterization of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under cold stress: Revealing the organism homeostasis mechanism. *Fish Shellfish Immunol.*, 92: 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.037>
- Fantle, M.S., Dittel, A.I., Schwalm, S.M., Epifanio, C.E., and Fogel, M.L. 1999. A food web analysis of the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia*, 120: 416–426. <https://doi.org/10.1007/s004420050874>
- FAO 2020. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2018/ FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma. 110 p. <https://www.fao.org/fishery/en/publications/269665>
- Fassatoui, C., Hatira, S., and Romdhane, M.S. 2021. Size-weight relationships and condition factor of the invasive Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda: Brachyura: Portunidae) from northern Tunisia: a preliminary investigation. *J. Crustac. Biol.*, 41: ruab039. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruab039>
- Felgenhauer, A., Thistle, B., and Watling, L. 1989. Functional Morphology of Feeding and Grooming in Crustacea. *Crustacean Issues* 6. A.A. Balkema, Netherlands. 224 p.

- Ferreira, M., Cortina-Burgueño, Á., Freire, I., and Otero, A. 2018. Effect of nutritional status and concentration of *Nannochloropsis gaditana* as enrichment diet for the marine rotifer *Brachionus* sp. *Aquaculture*, 491: 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.024> .
- Fiore, D.R., and Tlusty, M.F. 2005. Use of commercial *Artemia* replacement diets in culturing larval American lobsters (*Homarus americanus*). *Aquaculture*, 243: 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.009>
- Fischer, S., Thatje, S., and Brey, T. 2009. Early egg traits in *Cancer setosus* (Decapoda, Brachyura): effects of temperature and female size. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 377: 193–202. <https://doi.org/10.3354/meps07845>
- Flowers, E.M., Johnson, A.F., Aguilar, R., and Schott, E.J. 2018. Prevalence of the pathogenic crustacean virus *Callinectes sapidus* reovirus 1 near flow-through blue crab aquaculture in Chesapeake Bay, USA. *Dis. Aquat. Organ.*, 129: 135–144. <https://doi.org/10.3354/dao03232>
- Forbes, M.S. 2012. Cell Structure. 67–83. In: Sperelakis, N. (Ed.). *Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics*, Academic Press, Canada. 1235 p.
- Francis, R., Bryan, M., Aguilar, R., Watkins, E., Lindquist, M., and Hemingway, A. 2021. The influence of blue crab movement on mark-recapture estimates of recreational harvest and exploitation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 78: 371–385. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2020-0112>
- Frank, J.R., Sulkin, S.D., and Morgan, R.P. 1975. Biochemical changes during larval development of the xanthid crab *Rhithropanopeus harrisi*. I. Protein, total lipid, alkaline phosphatase, and glutamic oxaloacetic transaminase. *Mar. Biol.*, 32: 105–111. <https://doi.org/10.1007/BF00388503>
- Frolova, A., Muffett, K., and Miglietta, M.P. 2022. Multiple occurrences of *Callinectes sapidus* larvae on Gulf of Mexico *Chrysaora chesapeakei*. *J. Plankton Res.*, 44: 966–969. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbac053>
- Frolov, A.V., Pankov, S.L., Geradze, K.N., Pankova, S.A., and Spektrorova, L.V. 1991. Influence of the biochemical composition of food on the biochemical

- composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 97: 181-202.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90264-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90264-8)
- Fuzita, F.J., Pinkse, M.W.H., Patane, J.S.L., Juliano, M.A., Verhaert, P., and Lopes, A.R. 2015. Biochemical, transcriptomic and proteomic analyses of digestion in the scorpion *Tityus serrulatus*: Insights into function and evolution of digestion in an ancient arthropod. *Plos One* 10: e0123841.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0123841>
- Fu, Z., Yang, R., Zhou, S., Ma, Z., and Zhang, T. 2021. Effects of rotifers enriched with different enhancement products on larval performance and jaw deformity of golden Pompano larvae *Trachinotus ovatus* (Linnaeus, 1758). *Front. Mar. Sci.*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626071>
- Gamboa-Delgado, J., Morales-Navarro, Y.I., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., and Cruz-Suárez, L.E. 2019. Assimilation of dietary nitrogen supplied by fish meal and microalgal biomass from *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and *Nannochloropsis oculata* in shrimp *Litopenaeus vannamei* fed compound diets. *J. Appl. Phycol.*, 31: 2379–2389.
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-1732-2>
- Gao, Q., Liu, B., Shan, F., Gu, Z., Song, C., Sun, C., and Zhou, Q. 2022. Effects of oxidized fish oil on digestive enzyme activity and antioxidant system in *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Aquac. Rep.*, 23: 101062.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101062>
- Garcia, A.S., Parrish, C.C., and Brown, J.A. 2008. Use of enriched rotifers and *Artemia* during larviculture of Atlantic cod (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758): Effects on early growth, survival and lipid composition. *Aquac. Res.*, 39: 406–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01816.x>
- Gebauer, P., Giménez, L., Hinojosa, I.A., and Paschke, K. 2020. Settlement and metamorphosis in barnacles and decapods. 223–253. In: Anger, K., Harzsch, S., and Thiel, M.(Eds.). *Developmental Biology and Larval Ecology*. Vol. 7. Oxford University Press, New York. 836 p.

- Gebauer, P., Paschke, K., and Anger, K. 1999. Costs of delayed metamorphosis: reduced growth and survival in early juveniles of an estuarine grapsid crab, *Chasmagnathus granulata*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 238: 271–281. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00219-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00219-6)
- Gebauer, P., Paschke, K., and Anger, K. 2003. Delayed metamorphosis in decapod crustaceans: evidence and consequences. Rev. Chil. Hist. Nat., 76: 169–175. <https://epic.awi.de/id/eprint/9112/>
- Genodepa, J., Zeng, C., and Southgate, P.C. 2004. Preliminary assessment of a microbound diet as an *Artemia* replacement for mud crab, *Scylla serrata*, megalopa. Aquaculture, 236: 497-509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.02.007>
- Genodepa, J., Zeng, C., Militz, T.A., and Southgate, P.C. 2022a. Ontogenetic variation in digestive enzyme activities within embryos and newly-hatched larvae of the tropical spiny lobster, *Panulirus ornatus*. Aquaculture, 548: 737595. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737595>
- Genodepa, J., Zeng, C., Militz, T.A., and Southgate, P.C. 2022b. Responses of digestive enzyme profiles to various scenarios of food availability in newly-hatched Stage I phyllosoma larvae of the tropical spiny lobster *Panulirus ornatus*. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol., 261: 110751. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2022.110751>
- Giménez, L. 2003. Potential effects of physiological plastic responses to salinity on population networks of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. Helgol. Mar. Res., 56: 265–273. <https://doi.org/10.1007/s10152-002-0127-x>
- Giménez, L. 2006. Phenotypic links in complex life cycles: conclusions from studies with decapod crustaceans. Integr. Comp. Biol., 46: 615–622. <https://doi.org/10.1093/icb/icl010>
- Giménez, L. 2010. Relationships between habitat conditions, larval traits, and juvenile performance in a marine invertebrate. Ecology, 91: 1401–1413. <https://doi.org/10.1890/09-1028.1>

- Gimenez, L., and Anger, K. 2005. Effects of temporary food limitation on survival and development of brachyuran crab larvae. *J. Plankton. Res.*, 27: 485–494. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi024>
- Giménez, L., and Anger, K. 2001. Relationships among salinity, egg size, embryonic development, and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 260: 241–257. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00258-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00258-1)
- Goh, J., Tan, L., Law, J., Khaw, K., Zengin, G., Chan, K., Letchumanan, V., Lee, L., and Goh, B. 2023. Probiotics: comprehensive exploration of the growth promotion mechanisms in shrimps. *Prog. Microbes Mol. Biol.*, 6 (1): a0000324. <https://doi.org/10.36877/pmmb.a0000324>
- Goncalves, R., Gesto, M., Rodríguez, C., Reis, D.B., Pérez, J.A., and Lund, I. 2022. Ontogenetic changes in digestive enzyme activity and biochemical indices of larval and postlarval European lobster (*Homarus gammarus*, L). *Mar. Biol.*, 169: 53. <https://doi.org/10.1007/s00227-022-04034-x>
- Goptar, I.A., Shagin, D.A., Shagina, I.A., Mudrik, E.S., Smirnova, Y.A., Zhuzhikov, D.P., Belozersky, M.A., Dunaevsky, Y.E., Oppert, B., Filippova, I.Y., and Elpidina, E.N. 2013. A digestive prolyl carboxypeptidase in *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.02.009>
- Gore, R.H. 1985. Molting and growth in decapod larvae. 1–66. In: Wenner, A.M. (Ed.). *Crustacean Issues 2: Larval Growth*. A.A. Balkema Publishers, Rotterdam. 252 p.
- Guarizo, M., Costa, T.M., and Marochi, M.Z. 2020. Effect of diet during larval development of *Menippe nodifrons* Stimpson, 1859 and *Callinectes danae* Smith, 1869. *Aquac. Int.*, 28: 1969–1980. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00569-2>
- Guillaume, J. 1997. Protein and aminoacids. 26-50. In: D'Abramo, R., Douglas, E., Conklin, D., and Akiyama, M. (Eds.). *Crustacean Nutrition*. World Aquaculture Society, Bator Rouge. 587 p.

- Gulf Coast Research Laboratory. 2021. The University of Southern Mississippi. Blue Crab Aquaculture. <https://gcrl.usm.edu/research/blue.crab.aquaculture.php>
- Gul, I., Abbas, M.N., Kausar, S., Luo, J., Gao, X., Mu, Y., Fan, W., and Cui, H. 2023. Insight into crustacean cathepsins: Structure-evolutionary relationships and functional roles in physiological processes. *Fish Shellfish Immunol.*, 139: 108852. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108852>
- Guo, H., Tang, D., Shi, X., Wu, Q., Liu, R., Tang, B., and Wang, Z. 2019a. Comparative transcriptome analysis reveals the expression and characterization of digestive enzyme genes in the hepatopancreas of the Chinese mitten crab. *Fish. Sci.*, 85: 979–989. <https://doi.org/10.1080/07420528.2023.2189481>
- Guo, Q., Chen, Z., Santhanam, R. K., Xu, L., Gao, X., Ma, Q., Xue, Z., and Chen, H. 2019b. Hypoglycemic effects of polysaccharides from corn silk (*Maydis stigma*) and their beneficial roles via regulating the PI3K/Akt signaling pathway in L6 skeletal muscle myotubes. *Int. J. Biol. Macromol.*, 121: 981–988. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.100>
- Gu, X., Fu, H., Sun, S., Qiao, H., Zhang, W., Jiang, S., Xiong, Y., Jin, S., Gong, Y., and Wu, Y. 2017. Dietary cholesterol-induced transcriptome differences in the intestine, hepatopancreas, and muscle of Oriental River prawn *Macrobrachium nipponense*. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, 23: 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2017.06.001>
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N., and Regev, A. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.*, 8: 1494–<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Haché, R., and Plante, S. 2011. The relationship between enrichment, fatty acid profiles and bacterial load in cultured rotifers (*Brachionus plicatilis* L-strain)

- and *Artemia* (*Artemia salina* strain Franciscana). *Aquaculture*, 311: 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.034>
- Hamasaki, K., Suprayudi, M.A., and Takeuchi, T. 2002. Effects of dietary N-3 HUFA on larval morphogenesis and metamorphosis to megalops in the seed production of the mud crab, *Scylla serrata* (Brachyura: Portunidae). *Aquac. Sci.*, 50: 333–340. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.50.333>
- Hammer, H.S., Bishop, C.D., and Watts, S.A. 2000. Activities of three digestive enzymes during development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda). *J. Crustac. Biol.*, 20: 614–620. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990084>
- Hamre, K. 2016. Nutrient profiles of rotifers (*Brachionus* sp.) and rotifer diets from four different marine fish hatcheries. *Aquaculture*, 450: 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.016>
- Hamre, K., Srivastava, A., Ronnestad, I., Mangor-Jensen, A., and Stoss, J. 2008. Several micronutrients in the rotifer *Brachionus* sp. may not fulfil the nutritional requirements of marine fish larvae. *Aquac. Nutr.*, 14: 51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00504.x>
- Han, W., Sun, Y., Liu, J., Zhang, Y., Lu, Z., and Cheng, Y. 2021. Effect of different feeding modes on the growth, biochemical composition, and living environment of the juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture*, 541: 736687. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736687>
- Harms, J., Anger, K., Klaus, S., and Seeger, B. 1991. Nutritional effects on ingestion rate, digestive enzyme activity, growth, and biochemical composition of *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145: 233–265. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90178-Y](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90178-Y)
- Harms, J., Meyer-Harms, B., Dawirs, R.R., and Anger, K. 1994. Growth and physiology of *Carcinus maenas* (Decapoda, Portunidae) larvae in the field and in laboratory experiments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 108: 107–118. <https://www.int-res.com/articles/meps/108/m108p107.pdf>

- Hauerland, N.H. 1997. Transport and utilization of lipids in insect flight muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 117: 475–482. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00185-5)
- Hewitt, D.R. 1992. Response of protein turnover in the brown tiger prawn *Penaeus esculentus* to variation in dietary protein content. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.*, 103: 183–187. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90261-N](https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90261-N)
- Hill, J., Fowler, D.L., and Van Den Avyle, M.J. 1989. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (mid-Atlantic) - blue crab. Biological Report - US Fish & Wildlife Service 82, 18 p. <https://apps.dtic.mil/sti/pdfs/ADA210181.pdf>
- Hirche, H.J., and Anger, K. 1987. Digestive enzyme activities during larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 87: 297–302. <https://epic.awi.de/id/eprint/1387/>
- Hoeger, U., and Schenk, S. 2023. Crustacean yolk proteins: structure, function and diversity. 38-69. In: Zupo, V. (Ed.). *Crustaceans: Endocrinology, Biology and Aquaculture*. CRS Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón. 308 p.
- Holme, M.H., Southgate, P.C., and Zeng, C. 2007. Survival, development and growth response of mud crab, *Scylla serrata*, megalopae fed semi-purified diets containing various fish oil:corn oil ratios. *Aquaculture*, 269: 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.024>
- Holme, M.H., Zeng, C., and Southgate, P. 2009. A review of recent progress toward development of a formulated microbound diet for mud crab, *Scylla serrata*, larvae and their nutritional requirements. *Aquaculture*, 286: 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.021>
- Hopkins, S.H. 1944. the external morphology of the third and fourth zoeal stages of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Biol. Bull.*, 87: 145–152. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.2307/1538344?journalCode=bbi>

- Horst, M.N. 1990. Concurrent protein synthesis is required for in vivo chitin synthesis in postmolt blue crabs. *J. Exp. Zool.*, 256: 242–254. <https://doi.org/10.1002/jez.1402560303>
- Hosain, M.E., Amin, S.M.N., Kamarudin, M.S., Arshad, A., Karim, M., and Romano, N. 2021. Effect of salinity on growth, survival, and proximate composition of *Macrobrachium rosenbergii* post larvae as well as zooplankton composition reared in a maize starch based biofloc system. *Aquaculture*, 533: 736235. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736235>
- Huang, Y., Wang, G., Liu, J., Zhang, L., Huang, S., Wang, Y., Yang, Z., and Ge, H. 2021. Analysis of transcriptome difference between rapid-growing and slow-growing in *Penaeus vannamei*. *Gene*, 787: 145642. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145642>
- Hu, K.J., and Leung, P.C. 2007. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 146: 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.09.010>
- Hu, S., Wang, J., Han, T., Li, X., Jiang, Y., and Wang, C. 2017. Effects of dietary DHA/EPA ratios on growth performance, survival and fatty acid composition of juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Aquac. Res.*, 48: 1291–1301. <https://doi.org/10.1111/are.12971>
- Huang, X., and Madan, A. 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Res.*, 9: 868–877. <https://genome.cshlp.org/content/9/9/868.short>
- Inbakandan, D. 2020. Transcriptomics in Aquaculture. 1919–1936. In: Se-Kwon, K. (ed.). *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, Volume III. John Wiley & Sons, New Jersey. 649 p. <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch84>
- INVE-Aquaculture TC-SPRESSO-EN-0212 Technical card S.Presso: complete liquid enrichment for *Artemia* and rotifers.
- Invitrogen 2016. Trizol reagent invitrogen user guide. Catalog Numbers 15596026 and 15596018 Doc. Part No. 15596026.PPS Pub. No. MAN0001271 Rev. A.0. 4 p.

- Invitrogen 2019. Quant-iT RiboGreen RNA reagent and kit user guide. Catalog Numbers R11490, R11491, T11493 Pub. No. MAN0002073 Rev. A.0. 6 p.
- Jahn, C.E., Charkowski, A.O., and Willis, D.K. 2008. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *J. Microbiol. Methods*, 75: 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.004>
- Jeffs, A., and O'Rorke, R. 2020. Feeding and nutrition of crustacean larvae. 309–331. In: Anger, K., Harzsch, S., and Thiel, M. (Eds.). *The Natural History of the Crustacea: Developmental Biology and Larval Ecology*, Volume 7. Oxford University Press, New York. 437 p.
- Jeong, C.B., Kim, B.M., Lee, J.S., and Rhee, J.S. 2014. Genome-wide identification of whole ATP-binding cassette (ABC) transporters in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *BMC Genom.*, 15: 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-651>
- Jiang, K., Zhang, F., Zhang, D., Tao, Q., Zhang, Y., Pi, Y., Qiao, Z., and Ma, L. 2011. Identification of a trypsin gene from *Scylla paramamosain* and its expression profiling during larval development. *Afr. J. Agric. Res.*, 6: 6613–6621. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.784>
- Jiang, S., Xiong, Y., Zhang, W., Zhu, J., Cheng, D., Gong, Y., Wu, Y., Qiao, H., and Fu, H. 2022. A Novel legumain-like protease in *Macrobrachium nipponense*: Identification, characterization, and function analysis in ovary maturation. *Front. Endocrinol.*, 13: 858726. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.858726>
- Jiang, X., Yang, Y., Cheng, Y., and Wu, X. 2021. Feeding history affects the crabseed quality and subsequent culture performance of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853 (Brachyura, Varunidae). *Crustaceana*, 94: 97–114. https://brill.com/view/journals/cr/94/1/article-p97_6.xml
- Jimenez-Gutierrez, S., Cadena-Caballero, C.E., Barrios-Hernandez, C., Perez-Gonzalez, R., Martinez-Perez, F., and Jimenez-Gutierrez, L.R. 2019. Crustacean vitellogenin: a systematic and experimental analysis of their genes, genomes, mRNAs and proteins; and perspective to Next Generation

Sequencing. Crustaceana, 92: 1169–1205.

<https://doi.org/10.1163/15685403-00003930>

Jones, D.A., Kumlu, M., Le Vay, L., and Fletcher, D.J. 1997a. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: A review. *Aquaculture*, 155: 285–295. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00129-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00129-4)

Jones, D.A., Yule, A.B., and Holland, D.L. 1997b. Larval nutrition. 353-389. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., and Akiyama, D.M. (Eds). *Crustacean nutrition*. World Aquaculture Society, 587 p.

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., Von Haeseler, A., and Jermin, L.S. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*, 14: 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

Kamarudin, M.S., Jones, D.A., le Vay, L., and Abidin, A.Z. 1994. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 123: 323–333. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90068-X)

Kent, M., Browdy, C.L., and Leffler, J.W. 2011. Consumption and digestion of suspended microbes by juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 319: 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.048>

Kerr, M.S. 1969. The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus*: II. A lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin. *Dev. Biol.*, 20: 1–17. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(69\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(69)90002-5)

Keller, T.A., Powell, I., and Weissburg, M.J. 2003. Role of olfactory appendages in chemically mediated orientation of blue crabs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 261: 217–231. <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v261/p217-231>

Keskin, E., and Atar, H.H. 2013. DNA barcoding commercially important aquatic invertebrates of Turkey. *Mitochondrial DNA*, 24: 440–450. <https://doi.org/10.3109/19401736.2012.762576>

- Khoa, T.N.D., Waqalevu, V., Honda, A., Matsui, H., Truong, N.X., Sakaguchi, K., Kawaji, H., Ishikawa, M., and Shiozaki, K. 2021. Enrichment effects of fermented by-product of Shochu distillery on *Brachionus plicatilis* sp. rotifer and larviculture performance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 535: 736352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736352>
- Khudiyi, O., Khuda, L., Kushniryk, O., Prusinska, M., Kolman, R., Marchenko, M. 2017. An effectiveness of *Artemia nauplii* enrichment with polyunsaturated fatty acids using a supplement easy dha selco. *Acta Biol. Univ. Daugavp.*, 17: 169–183. <https://du.lv/wp-content/uploads/2022/02/Khudiyi.pdf>
- Kibria, G. 1993. Studies on molting, molting frequency and growth of shrimp *Penaeus monodon* fed on natural and compounded diets. *Asian Fish. Sci.*, 6: 203–211. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571417125960508032>
- Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods*, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Klee, C.B., and Vanaman, T.C. 1982. Calmodulin. *Adv. Protein Chem.*, 35: 213–321. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60470-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60470-2)
- Kobayashi, T., Nagase, T., Hino, A., and Takeuchi, T. 2008. Effect of combination feeding of *Nannochloropsis* and freshwater *Chlorella* on the fatty acid composition of rotifer *Brachionus plicatilis* in a continuous culture. *Fisheries Sci.*, 74: 649–656. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01570.x>
- Koopman, H.N., and Siders, Z.A. 2013. Variation in egg quality in blue crabs, *Callinectes sapidus*, from North Carolina: Does female size matter? *J. Crustac. Biol.*, 33: 481–487. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002152>
- Kovaka, S., Zimin, A.V., Perteau, G.M., Razaghi, R., Salzberg, S.L., and Perteau, M. 2019. Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Biol.*, 20: 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1910-1>

- Kumari, S.S., and Skinner, D.M. 1993. Proteins of crustacean exoskeleton II: Immunological evidence for their relatedness to cuticular proteins of two insects. *J. Exp. Zool.*, 265: 195–210. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650302>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Romano, N., Allen, K.M., Bowman, B.A., Thompson, K.R., and Tidwell, J.H. 2018. Metabolism and nutritive role of cholesterol in the growth, gonadal development, and reproduction of crustaceans. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, 26: 254–273. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1429384>
- Kurmaly, K., Jones, D.A., and Yule, A.B. 1990. Acceptability and digestion of diets fed to larval stages of *Homarus gammarus* and the role of dietary conditioning behaviour. *Mar. Biol.*, 106: 181–190. <https://doi.org/10.1007/BF01314799>
- Kurmaly, K., Yule, A.B., and Jones, D.A. 1989. An energy budget for the larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, 81: 13–25. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90227-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90227-5)
- Lage, L.P.A., Plagnes-Juan, E., Putrino, S.M., Baron, F., Weissman, D., Guyonvarch, A., Brugger, R., Nunes, A.J.P., and Panserat, S. 2017. Ontogenesis of metabolic gene expression in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): New molecular tools for programming in the future. *Aquaculture*, 479: 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.030>
- Lakshmanasenthil, S., Vinothkumar, T., Geetharamani, D., and Maruthupandi, T. 2013. Influence of Micro algae in enrichment of *Artemia salina* for aquaculture feed enhancement Research Article *J. Algal Biomass Utiln.*, 4: 67–73. <http://www.jalgalbiomass.com/vol4-2>
- Lavarías, S., Pasquevich, M.Y., Dreon, M. S., and Heras, H. 2009. Partial characterization of a malonyl-CoA-sensitive carnitine O-palmitoyltransferase I from *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 152: 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.01.004>

- Lavens, P., and Sorgeloos, P. 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. *Aquaculture*, 191: 169-176. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00426-9)
- Lavens, P., and Sorgeloos, P. 1996. Manual of the production and use of live food for aquaculture. Food and agriculture organization on the United Nations – FAO, Rome. <http://www.fao.org/3/w3732e03.htm#2>
- Le Cren, E.D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). *J. Anim. Ecol.*, 20: 201-219. <https://www.jstor.org/stable/1540>
- Le, D.V.B., Nguyen, P.N., Dierckens, K., Nguyen, D.V., De Schryver, P., Hagiwara, A., and Bossier, P. 2017. Growth performance of the very small rotifer *Proales similis* is more dependent on proliferating bacterial community than the bigger rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Aquaculture*, 476: 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.046>
- Lee, M.H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., Srivastava, A.K., Salen, G., Dean, M., and Patel, S.B. 2001. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat. Genet.*, 27: 79–83. <https://doi.org/10.1038/83799>
- Lee, P.G., and Meyers, S.P. 1997. Chemoattraction and feeding stimulation, 292–352. In: D´Abramo, L.R., Conklin, D. E. and Akiyama, D.M. (Eds.). *Crustacean nutrition*. The World Aquaculture Society; Louisiana. 587 p.
- Lee, S.Y., Kim, D.S., and Nam, Y.K. 2012. Molecular characterization of cytoskeletal beta-actin and its promoter in the javanese ricefish *Oryzias javanicus*. *Fish. Aquatic Sci.*, 15: 317–324. https://oak.go.kr/central/journallist/journaldetail.do?article_seq=12011
- Lemos, D., Garcia-Carreño, F.L., Hernández, P., and Navarrete del Toro, A. 2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 214: 363–380. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00253-3)

- Lemos, D., and Weissman, D. 2020. Moulting in the grow-out of farmed shrimp: a review. *Rev. Aquac.*, 13: 5–17. <https://doi.org/10.1111/raq.12461>
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., and Van Wormhoud, A. 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 208: 107–125. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02671-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02671-8)
- Le Moullac, G., and Van Wormhoudt, A. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour.*, 7: 203–210. <https://doi.org/10.1051/alr:1994022>
- Le Vay, L., Jones, D.A., Puello-Cruz, A.C., Sangha, R.S., and Ngamphongsai, C. 2001. Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 128: 621–628. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00339-1)
- Li, K., Kjørsvik, E., Bergvik, M., and Olsen, Y. 2015a. Manipulation of the fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rotifers *Brachionus nevada* and *Brachionus cayman*. *Aquac. Nut.*, 21: 85–97. <https://doi.org/10.1111/anu.12140>
- Li, K., and Olsen, Y. 2015. Effect of enrichment time and dietary DHA and non-highly unsaturated fatty acid composition on the efficiency of DHA enrichment in phospholipid of rotifer (*Brachionus cayman*). *Aquaculture*, 446: 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.005>
- Li, S., Cheng, Y., Zhou, B., and Hines, A.H. 2012. Changes in biochemical composition of newly spawned eggs, prehatching embryos and newly hatched larvae of the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Shellfish Res.*, 31: 941–946. <https://doi.org/10.2983/035.031.0405>
- Li, W., Chiu, K.H., Tien, Y.C., Tsai, S.F., Shih, L.J., Lee, C.H., Toullec, J.Y., and Lee, C.Y. 2017. Differential effects of silencing crustacean hyperglycemic hormone gene expression on the metabolic profiles of the muscle and hepatopancreas in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Plos One*, 12:

e0172557.

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172557>

- Li, X., Han, T., Zheng, S., and Wu, G. 2021. Nutrition and Functions of Amino Acids in Aquatic Crustaceans. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1285: 169–198. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33770407/>
- Li, Y., Min, H., Cui, Z., Liu, Y., Song, C., and Shi, G. 2015b. Comparative transcriptomic analysis provides insights into the molecular basis of the metamorphosis and nutrition metabolism change from zoeae to megalopae in *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. - D: Genom. Proteom.*, 13: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2014.10.002>
- Li, Y., Xue, H., and Li, X. 2018. Transcriptome analysis of the Chinese grass shrimp *Palaemonetes sinensis* (Sollaud 1911) and its predicted feeding habit. *J. Oceanol. Limnol.*, 36: 1778–1787. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7189-y>
- Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30: 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lin, Z., Wang, X., Bu, X., Jia, Y., Shi, Q., Du, Z., Qin, J., and Chen, L. 2021. Dietary phosphatidylcholine affects growth performance, antioxidant capacity and lipid metabolism of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Aquaculture*, 541: 736814. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736814>
- Liu, J.D., Liu, W.B., Zhang, D.D., Xu, C.Y., Zhang, C.Y., Zheng, X. C., and Chi, C. 2020. Dietary reduced glutathione supplementation can improve growth, antioxidant capacity, and immunity on Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 100: 300–
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.064>
- Liu, Q., Wen, B., Li, X., Jiang, Y., Liang, Z., and Zuo, R. 2021a. An investigation on the effects of dietary protein level in juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) reared at three salinities: survival, growth performance, digestive

- enzyme activities, antioxidant capacity and body composition. *Aquac. Res.*, 52: 2580-2592. <https://doi.org/10.1111/are.15106>
- Liu, S., Wang, X., Bu, X., Zhang, C., Qiao, F., Qin, C., Li, E., Qin, J.G., and Chen, L. 2021b. Influences of dietary vitamin D3 on growth, antioxidant capacity, immunity and molting of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) larvae. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 210: 105862. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105862>
- Lloret, J., Shulman, G., and Love, R.M. 2013. Condition and health indicators of exploited marine fishes. John Wiley & Sons, Oxford. 247 p.
- Loose, G.J., Vogt, G., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., and Harzsch, S. 2020. Organogenesis. 80-112. In: Klaus, A., Harzsch, S., and Thiel, M. (Eds.). *Developmental Biology and Larval Ecology: The Natural History of the Crustacea, Volume 7*. University Press, Oxford., <https://doi.org/10.1093/oso/9780190648954.003.0003>
- Love M.I., Huber W., and Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, 15: 550. <http://bioconductor.org/packages/DESeq2/>
- Lovett, D.L., and Felder, D.L. 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture*, 178: 144–159. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/pdf/10.2307/1541973>
- Lucía-Pavón, E., Sarma, S.S.S., and Nandin, S. 2001. Effect of different densities of live and dead *Chlorella vulgaris* on the population growth of rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Rev. Biol. Trop.*, 49: 895–902. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/18037/18222>
- Luo, W., Zhao, Y., Zhou, Z., An, C., and Ma, Q. 2008. Digestive enzyme activity and mRNA level of trypsin in embryonic redclaw crayfish, *Cherax quadricarnatus*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 26: 62–68. <https://doi.org/10.1007/s00343-008-0062-z>

- Mahmoud, N., Mozanzadeh, M., Agh, N., Ahmadi, A., and Yaghoubi, M. 2018. Enriched *Artemia* with L-lysine and DL-methionine on growth performance, stress resistance, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *J. Appl. Aquac.*, 30: 325–336. <https://doi.org/10.1080/10454438.2018.1484838>
- Maliwat, G.C.F., Velasquez, S.F., Buluran, S.M.D., Tayamen, M.M., and Ragaza, J.A. 2020. Growth and immune response of pond-reared giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae fed diets containing *Chlorella vulgaris*. *Aquac. Fish.*, 6: 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.07.002>
- Maliwat, G.C., Velasquez, S., Robil, J.L., Chan, M., Traifalgar, R.F., and Tayamen, M. 2017. Growth and immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) postlarvae fed diets containing *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). *Aquac. Res.*, 48: 1666–1676 <https://doi.org/10.1111/are.13004>
- Mansour, A.T., Ashry, O.A., El-Neweshy, M.S., Alsaqufi, A.S., Dighiesh, H.S., Ashour, M., Kelany, M.S., El-Sawy, M.A., Mabrouk, M.M., and Abbas, E.M. 2022. Effect of agricultural by-products as a carbon source in a biofloc-based system on growth performance, digestive enzyme activities, hepatopancreas histology, and gut bacterial load of *Litopenaeus vannamei* post larvae. *J. Mar. Sci. Eng.*, 10: 1333. <https://doi.org/10.3390/jmse10101333>
- Mantelatto, F.L., Reigada, A.L.D., Gatti, A.C.R., and Cuesta, J.A. 2014. Morphology of the first zoeal stages of five species of the portunid genus *Callinectes* (Decapoda, Brachyura) hatched at the laboratory. *An. Acad. Bras.*, 86: 755–767. <https://www.scielo.br/j/aabc/a/TqKbh5yVGwPndMrXpLLnVpm/?lang=en&format=html>
- Martin, S.A.M., and Król, E. 2017. Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. *Dev. Comp. Immunol.*, 75: 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.024>
- Martínez-Alarcón, D., Hagen, W., Held, C., and Saborowski, R. 2020. Molecular aspects of lipid metabolism in the midgut gland of the brown shrimp *Crangon*

- crangon*. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.. 248–249: 110465. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110465>
- Martínez-Alarcón, D., Saborowski, R., Rojo-Arreola, L., and García-Carreño, F. 2018. Is digestive cathepsin D the rule in decapod crustaceans? Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol., 215: 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.09.006>
- Martínez-Barrio, A., Lagercrantz, E., Sperber, G.O., Blomberg, J., and Bongcam-Rudloff, E. 2009. Annotation and visualization of endogenous retroviral sequences using the Distributed Annotation System (DAS) and eBioX. BMC Bioinformatics, 10: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-S6-S18>
- Maruyama, I., and Hirayama, K. 1993. The Culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with *Chlorella vulgaris* containing vitamin B12 in its cells. J. World Aquacult. Soc., 24: 194–198. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00008.x>
- Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I., Ando, Y., and Hirayama, K. 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. 133-138. In: Hagiwara, A., Snell, T.W., Lubzens, E., Tamaru, C.S. (Eds.). Live Food in Aquaculture. Developments in Hydrobiology, vol 124. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2097-7_20
- Maurer, L., Liang, D., and Chung, J.S. 2017. Effects of prey densities and dietary supplementation on the larval development of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Brachyura: Portunidae). J. Crustac. Biol., 37: 674–682. <https://doi.org/10.1093/jcabi/rux079>
- McCarthy, J.F. 1979. Ponasterone A: A new ecdysteroid from the embryos and serum of brachyuran crustaceans. Steroids, 34: 799–806. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(79\)90092-8](https://doi.org/10.1016/0039-128X(79)90092-8)
- McCarthy, S.D., Dugon, M.M., and Power, A.M. 2015. “Degraded” RNA profiles in Arthropoda and beyond. PeerJ., 2015: e1436. <https://doi.org/10.7717/peerj.1436>
- McClintock, J.B., Klinger, T.S., Marion, K., and Hsueh, P. 1991. Digestive carbohydrases of the blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun): implications

in utilization of plant-derived detritus as a trophic resource. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 148: 233–239. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90084-A](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90084-A)

McConaughy, J.R. 1985. Nutrition and larval growth, chapter 3. 1-28. In: Shram, F.R. (Ed.). *Crustacean Issues 2*. A.A. Balkema Publishers, Boston. 252 p.

Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I., and Sorgeloos, P. 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *J. Exp. Biol.*, 205: 3107–3122. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.20.3107>

Mente, E., Houlihan, D.F., and Smith, K. 2001. Growth, feeding frequency, protein turnover, and amino acid metabolism in European lobster *Homarus gammarus* L. *J. Exp. Zool.*, 289: <https://doi.org/10.1002/jez.1023>

Miandare, H.K., Mirghaed, A.T., Hosseini, M., Mazloumi, N., Zargar, A., and Nazari, S. 2017. Dietary Immunogen® modulated digestive enzyme activity and immune gene expression in *Litopenaeus vannamei* post larvae. *Fish Shellfish Immunol.*, 70: 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.048>

Miandare, H.K., Yarahmadi, P., and Abbasian, M. 2016. Immune related transcriptional responses and performance of *Litopenaeus vannamei* post-larvae fed on dietary probiotic PrimaLac®. *Fish Shellfish Immunol.*, 55: 671–678. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.053>

Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K., and Relyea, R.A. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.*, 20: 685–692. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.002>

Mirbakhsh, M., Mahjoub, M., Afsharnasab, M., Kakoolaki, S., Sayyadi, M., and Hosseinzadeh, S. 2021. Effects of *Bacillus subtilis* on the water quality, stress tolerance, digestive enzymes, growth performance, immune gene expression, and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during the early hatchery period. *Aquac. Int.*, 29: 2489–2506. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00758-7>

Möller, L., Vainstein, Y., Wöhlbrand, L., Dörries, M., Meyer, B., Sohn, K., and Rabus, R. 2022. Transcriptome–proteome compendium of the Antarctic krill

- (*Euphausia superba*): Metabolic potential and repertoire of hydrolytic enzymes. *Proteomics*, 22: 2100404. <https://doi.org/10.1002/pmic.202100404>
- Moller, O.S., Anger, K., and Guerao, G. 2020. Patterns of larval development. 165–194. In: Anger, K., Harzsch, S., and Thiel, M. (Eds.). *Developmental Biology and Larval Ecology*. Vol. 7. Oxford University Press, New York. 449 p.
- Moller, T.H. 1978. Feeding behaviour of larvae and postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Crustacea: palaemonidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 35: 251–258. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(78\)90078-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(78)90078-3)
- Montu, M., Anger, K., and Bakker, C. 1990. Variability in the larval development of *Metasesarma rubripes* (Decapoda, Grapsidae) reared in the laboratory. *Neritica*, 5: 113–118. <https://epic.awi.de/id/eprint/5327/>
- Montú, M., Anger, K., and de Bakker, C. 1996. Larval development of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. *Helgolander Meeresun.*, 50: 223–252. <https://doi.org/10.1007/BF02367153>
- Moran, A.L., and McAlister, J.S. 2009. Egg size as a life history character of marine invertebrates: Is it all it's cracked up to be?. *Biol. Bull.*, 216: 226–242. <https://doi.org/10.1086/BBLv216n3p226>
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A.C., and Kanehisa, M. 2007. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.*, 35: W182–W185. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm321>
- Mostary, S., Rahman, M., Mandal, A., Hasan, K., Rehena, Z., and Basar, S. 2010. Culture of *Brachionus plicatilis* feeding with powdered dried *Chlorella*. *Bangladesh Vet.*, 27: 91–98. https://www.researchgate.net/profile/Md-Safiul-Basar/publication/266880015_Culture_of_Brachionus_plicatilis_feeding_with_powdered_dried_Chlorella/links/6381c2d67b0e356feb86181b/Culture-of-Brachionus-plicatilis-feeding-with-powdered-dried-Chlorella.pdf

- Muangyao, P., Fukami, K., Songsangjinda, P., and Predalumpaburt, Y. 2020. Stimulation by gutweed to increase the abundance of insect larvae as food for shrimp aquaculture in Thailand. *Aquaculture*, 519: 734740. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734740>
- Mugnier, C., and Justou, C. 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 309: 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.008>
- Muhlia-Almazán, A.T., and Fernández-Gimenez, A.V. 2022. Understanding the digestive peptidases from crustaceans: from their biochemical basis and classical perspective to the biotechnological approach. *Mar. Biotechnol.*, 24: 480–491. <https://doi.org/10.1007/s10126-022-10122-2>
- Nates, S.F., and McKenney, C.L. 2000. Ontogenetic changes in biochemical composition during larval and early postlarval development of *Lepidophthalmus louisianensis*, a ghost shrimp with abbreviated development. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 127: 459–468. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00283-2](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00283-2)
- Navarrete del Toro, M.A., and García-Carreño, F. 2019. The toolbox for protein digestion in decapod crustaceans: a review. *Rev. Aquac.*, 11: 1005–1021. <https://doi.org/10.1111/raq.12276>
- Navarrete Del Toro, M., García-Carreño, F., López, M., Celis-Guerrero, L., and Saborowski, R. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *J. Exp. Zool. A, Com. Exp. Biol.*, 305A: 645–654. <https://doi.org/10.1002/jez.a.318>
- Nelson, M.M., Crear, B.J., Nichols, P.D., and Ritz, D.A. 2004. Growth and lipid composition of phyllosomata of the southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, fed enriched *Artemia*. *Aquac. Nutr.*, 10: 237–246. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00295.x>

- Neori, A. 2011. Green water microalgae: The leading sector in world aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 23. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9531-9>
- Nghia, T.T., Wille, M., Vandendriessche, S., Vinh, Q.T., and Sorgeloos, P. 2007. Influence of highly unsaturated fatty acids in live food on larviculture of mud crab *Scylla paramamosain* (Estampador 1949). *Aquac. Res.*, 38 (4): 1512–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01815.x>
- Nieves-Soto, M., Lozano-Huerta, R., López-Peraza, D.J., Medina-Jasso, M.A., Hurtado-Oliva, M.A., and Bermudes-Lizárraga, J.F. 2021. Effect of the enrichment time with the tuna orbital oil emulsion on the fatty acids profile of juveniles of *Artemia franciscana*. *Aquac. Fish.*, 6: 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.03.008>
- Niță, V., and Nenciu, M. 2021. Laboratory testing of the American blue crab's (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) capacity of adaptation to aquaculture systems at the Romanian coast. *Sci. Papers Ser. D, Anim. Sci. Vol. LXIV, No. 1: 560-568*. https://www.animalsciencejournal.usamv.ro/pdf/2021/issue_1/Art78.pdf
- Nordgreen, A., Penglase, S., and Hamre, K. 2013. Increasing the levels of the essential trace elements Se, Zn, Cu and Mn in rotifers (*Brachionus plicatilis*) used as live feed. *Aquaculture*, 380–383: 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.032>
- Oliphant, A., and Thatje, S. 2013. Per offspring investment implications for crustacean larval development: evolutionary insights into endotrophy and abbreviated development. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 493: 207–217 <https://doi.org/10.3354/meps10496>
- Olvera, M.A., Martínez-Palacios, C.A., and Real de León, E. 1993. Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos. Documento de campo No.7. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, México. <http://www.fao.org/3/AB489S/AB489S00.htm>

- Orbea, A., Fahimi, H.D., and Cajaraville, M.P. 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochem. Cell Biol.*, 114: 393–404. <https://doi.org/10.1007/s004180000207>
- Ospina-Salazar, G.H., Santos-Acevedo, M., López-Navarro, J., Gómez-López, D.I., Álvarez-Barrera, J.E., and Gómez-León, J. 2011. Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. Santa Marta: Serie de Publicaciones Generales del INVEMAR No. 46 <http://hdl.handle.net/1834/8269>
- Palm, H., Sørensen, H., and Knaus, U. 2015. Montmorillonite clay minerals with or without microalgae as a feed additive in larval white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ann. Aquac. Res.*, 2: 1008. <https://doi.org/10.47739/2379-0881/1008>
- Paran, B.C., Jeyagobi, B., Kizhakedath, V.K., Antony, J., Francis, B., Anand, P.S.S., Radhakrishnapillai, A., Lalramchhani, C., Kannappan, S., Marimuthu, R.D., and Paulpandi, S. 2022. Production of juvenile mud crabs, *Scylla serrata*: Captive breeding, larviculture and nursery production. *Aquac. Rep.*, 22: 101003. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.101003>
- Park, H.G., and Brown, J. 2004. Biochemical composition of rotifer, *Brachionus plicatilis* enriched with different commercial enrichments. *J. Aquac.*, 17: 187–196. Available at: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200411922608006.page>
- Pedroza-Islas, R., Gallardo, P., Vernon-Carter, E.J., Garcia-Galano, T., Rosas, C., Pascual, C., and Gaxiola, G. 2004. Growth, survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquac. Nutr.* 10: 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00284.x>
- Peñaflorida, V.D. 2004. Amino acid profiles in the midgut, ovary, developing eggs and zoes of the mud crab, *Scylla serrata*. *Isr. J. Aquac. – Bamidgeh*, 56: 111–123. <https://evols.library.manoa.hawaii.edu/items/f8e34477-5db6-4357-b792-a55eea7dda7a>

- Perera, E., Moyano, F.J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Rodriguez-Viera, L., Alonso, E., Carrillo, O., and Galich, G.S. 2008. Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 151: 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.07.005>
- Pedroza-Islas, R., Gallardo, P., Vernon-Carter, E.J., Garcia-Galano, T., Rosas, C., Pascual, C., and Gaxiola, G. 2004. Growth, survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquac. Nutr.*, 10: 167-173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00284.x>
- Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T., and Salzberg, S.L. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.*, 33: 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
- Phillips, N.E. 2002. Effects of nutrition-mediated larval conditions on juvenile performance in a marine mussel. *Ecology*, 83: 2562–2574. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[2562:EONMLC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[2562:EONMLC]2.0.CO;2)
- Phillips, N.E. 2004. Variable timing of larval foods has consequences for early juvenile performance in a marine mussel. *Ecology*, 85: 2341–2346. <https://doi.org/10.1890/03-3097>
- Pickart, C.M., and Eddins, M.J. 2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, 1695: 55–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.019>
- Pletl, J.J. 1992. The growth and bioenergetics of *Callinectes sapidus* larvae and the effects of diet quality on larval physiology. PhD Thesis. Ocean & Earth Sciences. Old Dominion University, Virginia. 126 p. <https://doi.org/10.25777/kk11-4n91>
- Plettner, E., Slessor, K.N., and Winston, M.L. 1998. Biosynthesis of mandibular acids in honey bees (*Apis mellifera*): De novo synthesis, route of fatty acid

hydroxylation and caste selective β -Oxidation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 31–42. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00079-9)

Plough, L.V. 2017. Population genomic analysis of the blue crab *Callinectes sapidus* using genotyping-by-sequencing. *J. Shellfish Res.*, 36: 249–261 <https://doi.org/10.2983/035.036.0128>

Prangnell, D.I., and Fotedar, R. 2005. The effect of potassium concentration in inland saline water on the growth and survival of the western king shrimp, *Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896. *J. Appl. Aquac.*, 17: 19–34. https://doi.org/10.1300/J028v17n02_02

Proespraiwong, P., Tassanakajon, A., and Rimphanitchayakit, V. 2010. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetics, expression and activities. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 156: 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.02.007>

Qiao, Y., Wang, J., Mao, Y., Liu, M., Song, X., Su, Y., Wang, C., and Zheng, Z. 2017. Identification and molecular characterization of Cathepsin L gene and its expression analysis during early ontogenetic development of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Acta Oceanol. Sin.*, 36: 52–60. <https://doi.org/10.1007/s13131-017-0983-5>

Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Shanthi, R., and Muralisankar, T. 2014. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Basic Appl. Zool.*, 67: 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.12.003>

Raghuvaran, N., Parimal, S., Narottam, P., Shamna, N., Prasanta, J., Mritunjoy, P., Saiprasad, B., and Bhavatharaniya, U. 2023. Effect of L-carnitine supplemented diets with varying protein and lipid levels on growth, body composition, antioxidant status and physio-metabolic changes of white shrimp, *Penaeus vannamei* juveniles reared in inland saline water. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 296, 115548. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115548>

- Raja, R., Coelho, A., Hemaiswarya, S., Kumar, P., Carvalho, I.S., and Alagarsamy, A. 2018. Applications of microalgal paste and powder as food and feed: An update using text mining tool. Beni Suf Univ. J Basic Appl. Sci., 7: 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.10.004>
- Rambaut, A., Lam, T.T., Carvalho, L.M., and Pybus, O.G. 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). Virus Evol., 2. <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>
- Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., Heyne, S., Dündar, F., and Manke, T. 2016. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. Nucleic Acids Res., 44: W160–W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>
- Redzuari, A., Azra, M., Abol-Munafi, A., Aizam, Z., Hii, Y., and Ikhwanuddin, M. 2012. Effects of feeding regimes on survival, development and growth of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) larvae. World Appl. Sci. J., 18: 472–478. https://www.researchgate.net/profile/Mohamad-Nor-Azra/publication/279922559_Effects_of_Feeding_Regimes_on_Survival_Development_and_Growth_of_Blue_Swimming_Crab_Portunus_pelagicus_Linnaeus_1758_Larvae/links/559e45a008aeb45d17160911/Effects-of-Feeding-Regimes-on-Survival-Development-and-Growth-of-Blue-Swimming-Crab-Portunus-pelagicus-Linnaeus-1758-Larvae.pdf
- Rehberg-Haas, S., Meyer, S., Lippemeier, S., and Schulz, C. 2015. A comparison among different *Pavlova* sp. products for cultivation of *Brachionus plicatilis*. Aquaculture, 435: 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.029>
- Rey, F., Alves, E., Melo, T., Domingues, P., Queiroga, H., Rosa, R., Domingues, M., and Calado, R. 2015. Unravelling polar lipids dynamics during embryonic development of two sympatric brachyuran crabs (*Carcinus maenas* and *Necora puber*) using lipidomics. Sci. Rep., 5: 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep14549>

- Rivera-Pérez, C., Navarrete del Toro, M.A., and García-Carreño, F. L. 2010. Digestive lipase activity through development and after fasting and re-feeding in the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 300: 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.030>
- Rodríguez-Viera, L., Alpízar-Pedraza, D., Mancera, J. M., and Perera, E. 2021. Toward a more comprehensive view of α -amylase across decapods crustaceans. *Biology*, 10: 25. <https://doi.org/10.3390/biology10100947>
- Rodriguez, A., Le Vay, L., Mourente, G., and Jones, D.A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.*, 118: 45–51. <https://doi.org/10.1007/BF00699218>
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Cejas, J.R., Bolaños, A., and Lorenzo, A. 1996. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. *Aquaculture*, 147: 93–105. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01397-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01397-X)
- Rodríguez, J., Olsen, Y., and Rosenlund, G. 1989. The effect of enrichment diets on the fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 79: 157–161. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90456-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90456-0)
- Rojo-Arreola, L., García-Carreño, F., Romero, R., and Díaz, L. 2020. Proteolytic profile of larval developmental stages of *Penaeus vannamei*: An activity and mRNA expression approach. *Plos One*, 15: e0239413. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0239413>
- Rojo, L., Muhlia-Almazan, A., Saborowski, R., and García-Carreño, F. 2010. Aspartic Cathepsin D endopeptidase contributes to extracellular digestion in clawed lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. *Mar. Biotechnol.*, 12: 696–707. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9257-3>
- Romero-Romero, S., and Yúfera, M. 2012. Contribution of gut content to the nutritional value of *Brachionus plicatilis* used as prey in larviculture. *Aquaculture*, 364–365: 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.011>

- Rotllant, G., Guerao, G., Gras, N., and Estévez, A. 2014. Larval growth and biochemical composition of the protected Mediterranean spider crab *Maja squinado* (Brachyura, Majidae). *Aquat. Biol.*, 20: 13–21. <http://hdl.handle.net/10261/111832>
- Rotllant, G., Moyano, F.J., Andrés, M., Díaz, M., Estévez, A., and Gisbert, E. 2008. Evaluation of fluorogenic substrates in the assessment of digestive enzymes in a decapod crustacean *Maja brachydactyla* larvae. *Aquaculture*, 282: 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.004>
- Roustaian, P., Kamarudin, M.S., Omar, H.B., Saad, C.R., and Ahmad, M.H. 2000. Amino acid composition of developing larval freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. World Aquac. Soc.*, 31: 130–136. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2000.tb00708.x>
- Rueda, M., Bustos-Montes, D., Gómez-León, J., Vilorio, E., Santos-Acevedo, M., Girón, A., Viaña, J., Rodríguez, A., Castillo, H., Sierra, J., Romero, J.A., Chávez, S., Angulo, G., Vivas-Aguas, L.J., Garcés, O., Sánchez, D., Arbeláez-Merizalde, N.M., Arteaga, E., Licero-Villanueva, L.V., Rodríguez-Rodríguez, J.A. 2015. Capítulo III. Causas y tensiones del cambio en los ecosistemas marinos y costeros y sus servicios: Indicadores de presión. 70–116. En: INVEMAR (Ed.). Informe del Estado de los Ambientes y Recursos Marinos y Costeros en Colombia Año 2014. Serie de Publicaciones Periódicas No. 3. Ediprint Ltda., Santa Marta. 176 p. <http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/ier2014.pdf>
- Rueda, M., Escobar, F.D., Viaña, J., Navarro, H., and Romero, J. 2020. Causas y tensiones del cambio en los ecosistemas marinos y costeros y sus servicios: indicadores de presión. 76–94. En: INVEMAR (Ed.). Informe del estado de los ambientes y recursos marinos y costeros en Colombia, 2019. Serie de publicaciones periódicas No. 3. Marquillas, S.A., Santa Marta. 183 p.
- Ruscoe, I.M., Williams, G.R., and Shelley, C.C. 2004. Limiting the use of rotifers to the first zoeal stage in mud crab (*Scylla serrata* Forskål) larval rearing. *Aquaculture*, 231: 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.021>

- Rust, J.D., and Carlson, F. 1960. Some observations on rearing blue crab larvae. Chesap. Sci. 1: 196–197. <https://doi.org/10.2307/1350397>
- Saborowski, R. 2015. Nutrition and digestion. 285–319. In: Chang, E., and Thiel, M. (Eds). Physiology: the natural history of the crustacea, Oxford University Press, New York. 512 p.
- Saborowski, R., Thatje, S., Calcagno, J.A., Lovrich, G.A., and Anger, K. 2006. Digestive enzymes in the ontogenetic stages of the southern king crab, *Lithodes santolla*. Mar. Biol., 149: 865–873. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0240-x>
- Sainz, J.C., and Cordova, J.H. 2009. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 290: 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.034>
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Peregrino-Uriarte, A.B., Hernández-López, J., and Yepiz-Plascencia, G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. Insect Biochem. Mol. Biol., 36: 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.002>
- Santamaría, M.E., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Grbic, V., Grbic, M., Diaz, I., and Martinez, M. 2012. Cysteine peptidases and their inhibitors in *Tetranychus urticae*: A comparative genomic approach. BMC Genom., 13: 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-307>
- Schembri, P.J. 1982. Locomotion, feeding, grooming and the behavioural responses to gravity, light and hydrostatic pressure in the stage I zoea larvae of *Ebalia tuberosa* (Crustacea: Decapoda: Leucosiidae). Mar. Biol., 72: 125–134. <https://doi.org/10.1007/BF00396913> .
- Schmitz, G., Langmann, T., and Heimerl, S. 2001. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. J. Lipid Res., 42: 1513–1520. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32205-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32205-7)
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. 2006. The RIN: An

- RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.*, 7: 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Schubart, C.D., Deli, T., Mancinelli, G., Cilenti, L., Gil Fernández, A., Falco, S., and Berger, S. 2023. Phylogeography of the Atlantic Blue Crab *Callinectes sapidus* (Brachyura: Portunidae) in the Americas versus the Mediterranean Sea: Determining origins and genetic connectivity of a large-scale invasion. *Biology*, 12: 35. <https://doi.org/10.3390/biology12010035>
- Schulz, H. 1991. Beta oxidation of fatty acids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids BBA*, 1081: 109–120. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90015-A](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90015-A)
- Seary, R., Spencer, T., Bithell, M., and McOwen, C. 2021. Measuring mangrove-fishery benefits in the Peam Krasaop Fishing Community, Cambodia. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, 248: 106918. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106918>
- Seear, P.J., Tarling, G.A., Burns, G., Goodall-Copestake, W. P., Gaten, E., Özkaya, Ö., and Rosato, E. 2010. Differential gene expression during the moult cycle of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *BMC Genomics*, 11: 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-582>
- Serrano, A.E., Traifalgar, R.F., and Serrano, A.E. 2012. Ontogeny and induction of digestive enzymes in *Scylla serrata* larvae fed live or artificial feeds or their combination. *AACL Bioflux*, 5: 101–111. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=1835442bd0fb7ee545391871277cf6f2c13f19f0>
- Seychelles, L.H., Ayala-Aguilar, J.A., Estrada, N., López, M., Ayala-Perez, V.O., Ludwig, M., and Mercier, L. 2022. Zootechnical performance, biochemical composition and gene expression of digestive enzymes in *Litopenaeus vannamei* post-larvae fed the nematode *Panagrolaimus* sp. (NFS 24–5). *Aquac. Res.*, 53: 5325–5341. <https://doi.org/10.1111/are.16016>
- Shan, X., and Lin, M. 2014. Effects of algae and live food density on the feeding ability, growth and survival of miiuy croaker during early development.

- Sheen, S.S. 2000. Dietary cholesterol requirement of juvenile mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture*, 189: 277–285. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00379-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00379-3)
- Shi, B., Jin, M., Jiao, L., Betancor, M. B., Tocher, D. R., and Zhou, Q. 2020. Effects of dietary zinc level on growth performance, lipolysis and expression of genes involved in the calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β /AMP-activated protein kinase pathway in juvenile Pacific white shrimp. *Br. J. Nutr.*, 124: 773–784. <https://doi.org/10.1017/S0007114520001725>
- Shi, C., Zeng, T., Li, R., Wang, C., Ye, Y., and Mu, C. 2019. Dynamic metabolite alterations of *Portunus trituberculatus* during larval development. *J. Ocean. Limnol.*, 37: 361–372. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7268-0>
- Shiau, S.Y., and Peng, C.Y. 1992. Utilization of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn, *Penaeus monodon*, reared in seawater. *Aquaculture*, 101: 241–250. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90028-J](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90028-J)
- Skinner, D.M., Kumari, S.S., and O'brien, J.J. 1992. Proteins of the crustacean exoskeleton. *American Zoologist*, 32: 470–484. <https://doi.org/10.1093/icb/32.3.470>
- Skottene, E., Tarrant, A.M., Olsen, A.J., Altin, D., Østensen, M.A., Hansen, B.H., Choquet, M., Jenssen, B.M., and Olsen, R.E. 2019. The β -oxidation pathway is downregulated during diapause termination in *Calanus* copepods. *Sci. Rep.*, 9: 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53032-5>
- Smith, W.A., Lamattina, A., and Collins, M.K. 2014. Insulin signaling pathways in lepidopteran ecdysone secretion. *Front. Physiol.*, 5: 63298. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00019>
- Smolenaars, M., Madsen, O., Rodenburg, K. W., and Van Der Horst, D.J. 2007. Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *J. Lipid Res.*, 48: 489–502. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600028-JLR200>

- Snyder, M.J., and Chang, E.S. 2016. Effects of eyestalk ablation on larval molting rates and morphological development of the american lobster, *Homarus americanus*. Biol. Bull., 170: 232–243. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.2307/1541805>
- Soh, W.T., Demir, F., Dall, E., Perrar, A., Dahms, S. O., Kuppusamy, M., Brandstetter, H., and Huesgen, P.F. 2020. ExtENDING proteome coverage with legumain as a highly specific digestion protease. Anal. Chem., 92: 2961–2971. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03604>
- Soyel, H., and Kumlu, M. 2003. The Effects of salinity on postlarval growth and survival of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). Turk. J. Zool., 27: 221–225. <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol27/iss3/7/>
- Spitznagel, M.I., Small, H.J., Lively, J.A., Shields, J.D., and Schott, E.J. 2019. Investigating risk factors for mortality and reovirus infection in aquaculture production of soft-shell blue crabs (*Callinectes sapidus*). Aquaculture, 502: 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.051>
- Spitzner, F., Meth, R., Krüger, C., Nischik, E., Eiler, S., Sombke, A., Torres, G., and Harzsch, S. 2018. An atlas of larval organogenesis in the European shore crab *Carcinus maenas* L. (Decapoda, Brachyura, Portunidae). Front. Zool., 15: 1–39. <https://doi.org/10.1186/s12983-018-0271-z>
- Srivastava, A., Stoss, J., and Hamre, K. 2011. A study on enrichment of the rotifer *Brachionus* “Cayman” with iodine and selected vitamins. Aquaculture, 319: 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.027>
- Staton, J.L., and Sulkin, S.D. 1991. Nutritional requirements and starvation resistance in larvae of the brachyuran crabs *Sesarma cinereum* (Bosc) and *S. reticulatum* (Say). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 152: 271–284. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90219-M](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90219-M)
- Stephens, A., Rojo, L., Araujo-Bernal, S., Garcia-Carreño, F., and Muhlia-Almazan, A. 2012. Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity.

Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol., 161: 32–40.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.09.004>

Stewart, J.M., Carlin, R.C., Macdonald, J.A., and Van Iderstine, S. 1994. Fatty acid binding proteins and fatty acid catabolism in marine invertebrates: Peroxisomal β -oxidation. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 25: 73–82.

<https://doi.org/10.1080/07924259.1994.9672370>

Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M.A., Breitenbach, M., Brindle, K.M., Rabinowitz, J.D., and Ralser, M. 2015. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol. Rev.*, 90: 927–963.

<https://doi.org/10.1111/brv.12140>

Štrus, J., Žnidaršič, N., Mrak, P., Bogataj, U., and Vogt, G. 2019. Structure, function and development of the digestive system in malacostracan crustaceans and adaptation to different lifestyles. *Cell Tissue Res.*, 377: 415–443.

<https://doi.org/10.1007/s00441-019-03056-0>

Stuck, K., Perry, H., Graham, D., and Heard, R.W. 2009. Morphological characteristics of early life history stages of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, from the Northern Gulf of Mexico with a comparison of studies from the Atlantic seaboard. *Gulf Caribb. Res.*, 21: 37–55.

<https://aquila.usm.edu/gcr/vol21/iss1/5/>

Subramoniam, T. 2010. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans.

Fish. Sci., 77 1–21. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0301-z>

Sugumar, V., Vijayalakshmi, G., and Saranya, K. 2013. Molt cycle related changes and effect of short term starvation on the biochemical constituents of the blue swimmer crab *Portunus pelagicus*. *Saudi J. Biol. Sci.*, 20: 93–103.

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.003>

Sui, L., Wille, M., Wu, X., Cheng, Y., and Sorgeloos, P. 2008. Effect of feeding scheme and prey density on survival and development of Chinese mitten

- crab *Eriocheir sinensis* zoea larvae. *Aquac. Res.*, 39: 568–576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01902.x>
- Sulkin, S.D., and Epifanio, C.E. 1975. Comparison of rotifers and other diets for rearing early larvae of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 3: 109-113. [https://doi.org/10.1016/0302-3524\(75\)90011-0](https://doi.org/10.1016/0302-3524(75)90011-0)
- Sulkin, S.D. 1975. The significance of diet in the growth and development of larvae of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, under laboratory conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 20: 119–135. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(75\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90019-2)
- Sulkin, S.D. 1978. Nutritional requirements during larval development of the portunid crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 34: 29–41. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(78\)90055-2](https://doi.org/10.1016/0022-0981(78)90055-2)
- Sulkin, S.D., Branscomb, E.S., and Miller, R.E. 1976. Induced winter spawning and culture of larvae of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Aquaculture*, 8: 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(76\)80067-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(76)80067-1)
- Sulkin, S. D., and Van Heukelem, W.F. 1986. Variability in the length of the megalopal stage and its consequence to dispersal and recruitment in the portunid crab *Callinectes sapius* Rathbun. *Bull. Mar. Sci.*, 39: 269–278. <https://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1986/00000039/00000002/art00011>
- Sun, L., Wang, J., Li, X., and Cao, C. 2019. Effects of phenol on glutathione S-transferase expression and enzyme activity in *Chironomus kiiensis* larvae. *Ecotoxicology*, 28: 754–762. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02071-9>
- Suprayudi, M., Takeuchi, T., and Hamasaki, K. 2012. Phospholipids effect on survival and molting synchronicity of larvae mud crab *Scylla serrata*. *Hayati*, 19: 163-168. <https://doi.org/10.4308/hjb.19.4.163>
- Suprayudi, M., Takeuchi, T., and Hamasaki, K. 2004. Essential fatty acids for larval mud crab *Scylla serrata*: Implications of lack of the ability to bioconvert C18 unsaturated fatty acids to highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 231: 403–416. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00542-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00542-8)

- Suprayudi, M.A., Takeuchi, T., Hamasaki, K., and Hirokawa, J. 2002. The effect of N-3 HUFA content in rotifers on the development and survival of mud crab, *Scylla serrata*, larvae. *Aquac. Sci.*, 50: 205–212. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.50.205>
- Syafaat, M.N., Azra, M. N., Waiho, K., Fazhan, H., Abol-Munafi, A. B., Ishak, S. D., Syahnnon, M., Ghazali, A., Ma, H., and Ikhwanuddin, M. 2021. A Review of the nursery culture of mud crabs, genus *Scylla*: Current progress and future directions. *animals* 11, 2034. <https://doi.org/10.3390/ani11072034>
- Takeuchi, T., Nakamoto, Y., Hamasaki, K., Sekiya, S., and Watanabe, T. 1999. Requirement of N-3 highly unsaturated fatty acids for larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Nippon Suisan Gakkai.*, 65: 797–803. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001416426>
- Taufik, M., Bachok, Z., Azra, M.N., and Ikhwanuddin, M. 2016. Effects of various microalgae on fatty acid composition and survival rate of the blue swimming crab *Portunus pelagicus* larvae. *IJMS*, 45: 1512–1521. <https://www.researchgate.net/publication/312059515>
- Terwilliger, N.B. 1999. Hemolymph proteins and molting in crustaceans and insects. *Integr. Comp. Biol.*, 39: 589–599. <https://doi.org/10.1093/icb/39.3.589>
- Teschke, M., and Saborowski, R. 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 316: 213–229. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.11.007>
- The Galaxy Community 2022. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research* 50, W345–W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Tian, H., Yang, C., Yu, Y., Yang, W., Lu, N., Wang, H., Liu, F., Wang, A., and Xu, X. 2020. Dietary cholesterol level affects growth, molting performance and ecdysteroid signal transduction in *Procambarus clarkii*. *Aquaculture*, 523: 735198. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735198>

- Tirumalai, R., and Subramoniam, T. 1992. Purification and characterization of vitellogenin and lipovitellins of the sand crab *Emerita asiatica*: Molecular aspects of crab yolk proteins. *Mol. Reprod. Dev.*, 33: 16–26. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080330104T>
- Tomkinson, B. 1999. Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem. Sci.*, 24: 355–359. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01435-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01435-8)
- Torres, G., and Giménez, L. 2020. Temperature modulates compensatory responses to food limitation at metamorphosis in a marine invertebrate. *Funct. Ecol.*, 34: 1564–1576. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13607>
- Torres, G., Spitzner, F., Harzsch, S., and Giménez, L. 2019. Ecological developmental biology and global ocean change: brachyuran crustacean larvae as models. 283–306. In: Minelli, A., and Fusco, G. (Eds.). *Perspectives on Evolutionary and Developmental Biology*. Padova University Press, Italia. 420 p. https://www.padovauniversitypress.it/system/files/attachments_field/9788869381409-0a.pdf
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.*, 28: 511–515. (2010). <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Truong, H.H., Moss, A.F., Bourne, N.A., and Simon, C.J. 2020. Determining the Importance of macro and trace dietary minerals on growth and nutrient retention in juvenile *Penaeus monodon*. *Animals*, 10: 2086. <https://doi.org/10.3390/ani10112086>
- Tucker, R.K., and Costlow, J.D. 1975. Free amino acid changes in normal and eyestalkless megalopa larvae of the blue crab, *Callinectes sapidus*, during the course of the molt cycle. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 51: 75–78. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(75\)90415-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(75)90415-6)

- Vega-Villasante, F., Fernández, I., Preciado, R., Oliva, M., Tovar, D., and Nolasco, H. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). Bull. Mar. Sci., 65: 1–9. <https://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1999/00000065/00000001/art00001>
- Voet, D., and Voet, J. 2004. Bioquímica. 3a edición. Editorial Médica Panamericana, Montevideo. 1680 p.
- Vogt, G. 2019. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. J. Morphol., 280: 1405–1444. <https://doi.org/10.1002/jmor.21040>
- Vogt, G. 2021. Synthesis of digestive enzymes, food processing, and nutrient absorption in decapod crustaceans: a comparison to the mammalian model of digestion. Zoology, 147: <https://doi.org/10.1016/j.zool.2021.125945>
- von Zastrow, M., and Sorkin, A. 2007. Signaling on the endocytic pathway. COCEBI, 19: 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.021>
- Waiho, K., Fazhan, H., Quintio, E.T., Baylon, J.C., Fujaya, Y., Azmie, G., Wu, Q., Shi, X., Ikhwanuddin, M., and Ma, H. 2018. Larval rearing of mud crab (*Scylla*): What lies ahead. Aquaculture, 493: 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.047>
- Wanders, R.J.A., Baes, M., Ribeiro, D., Ferdinandusse, S., and Waterham, H.R. 2023. The physiological functions of human peroxisomes. Physiol. Rev., 103: 957–1024. <https://doi.org/10.1152/physrev.00051.2021>
- Wang, J., Shu, X., and Wang, W.X. 2019. Micro-elemental retention in rotifers and their trophic transfer to marine fish larvae: Influences of green algae enrichment. Aquaculture, 499: 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.066>
- Wang, X., Jin, M., Cheng, X., Hu, X., Zhao, M., Yuan, Y., Sun, P., Jiao, L., Tocher, D.R., and Zhou, Q. 2022a. Hepatopancreas transcriptomic and lipidomic analyses reveal the molecular responses of mud crab (*Scylla paramamosain*) to dietary ratio of docosahexaenoic acid to

- eicosapentaenoic acid. *Aquaculture*, 551, 737903.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737903>
- Wang, X., Li, E., and Chen, L. 2016. A Review of carbohydrate nutrition and metabolism in crustaceans. *N. Am. J. Aquac.*, 78: 178–187.
<https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1141129>
- Wang, X., Wang, S., Li, C., Chen, K., Qin, J. G., Chen, L., and Li, E. 2015. Molecular pathway and gene responses of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to acute low salinity stress. *J. Shellfish Res.*, 34: 1037–1048.
<https://doi.org/10.2983/035.034.0330>
- Wang, Z., Zhang, Y., Yao, D., Zhao, Y., Tran, N. T., Li, S., Ma, H., and Aweya, J.J. 2022b. Metabolic reprogramming in crustaceans: A vital immune and environmental response strategy. *Rev. Aquac.*, 14: 1094–1119.
<https://doi.org/10.1111/raq.12640>
- Waqalevu, V., Honda, A., Dossou, S., Khoa, T.N.D., Matsui, H., Mzengereza, K., Liu, H., Ishikawa, M., Shiozaki, K. Kotani, T. 2019. Effect of oil enrichment on *Brachionus plicatilis* rotifer and first feeding red sea bream (*Pagrus major*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 510, 73–83.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.039>
- Waycott, B. 2019. Aquaculture North America. Research project showing potential for farming Blue crab. <https://www.aquaculturenorthamerica.com/research-project-showing-potential-for-farming-blue-crab-2383/>
- Webster, S.G., and Dircksen, H. 2016. Putative Molt-Inhibiting Hormone in larvae of the shore crab *Carcinus maenas* L.: An immunocytochemical approach. *Biol. Bull.*, 180: 65–71.
<https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.2307/1542429>
- Wei, J., Zhang, X., Yu, Y., Huang, H., Li, F., Xiang, J. 2014a. Comparative transcriptomic characterization of the early development in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Plos One*, 9: e106201.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106201>

- Wei, J., Zhang, X., Yu, Y., Li, F., and Xiang, J. 2014b. RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. - D: Genom. Proteom.*, 11: 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2014.07.001>
- Weissburg, M.J., and Zimmer-Faust, R.K. 1991. Ontogeny Versus Phylogeny in Determining Patterns of Chemoreception: Initial Studies with Fiddler Crabs. *Univ. Chicago Press. J.*, 181: 205–215. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.2307/1542091>
- Weissburg, M.J., and Zimmer-Faust, R.K. 1993. Life and death in moving fluids: hydrodynamic effects on chemosensory-mediated predation. *Ecology*, 74: 1428–1443. <https://doi.org/10.2307/1940072>
- Weissburg, M.J., and Zimmer-Faust, R.K. 1994. Odor plumes and how blue crabs use them in finding prey. *J. Exp. Biol.*, 197: 349–375. <https://doi.org/10.1242/jeb.197.1.349>
- Wheatly, M.G., Zanotto, F.P., and Hubbard, M.G. 2002. Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 132: 163–178. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00520-6](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00520-6)
- Williams, J.A., Chen, X., and Sabbatini, M.E. 2009. Small G proteins as key regulators of pancreatic digestive enzyme secretion. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, 296: 405–414. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90874.2008>
- Williams, K.C. 2007. Nutritional requirements and feeds development for post-larval spiny lobster: A review. *Aquaculture*, 263: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.019>
- Williams, M.J., and Primavera, J.H. 2001. Choosing tropical portunid species for culture, domestication and stock enhancement in the Indo-Pacific. *Asian Fish. Sci.*, 14: 121–142. <https://repository.seafdec.org.ph/handle/10862/1916>

- Winarni, E.T., and Kusbiyanto, A.N. 2021. Estimating crustacean species utilize Segara Anakan Estuary Cilacap, Indonesia as nursery ground through DNA Barcoding. J. Hunan Univ. Nat. Sci., 48: 275–282. <http://jonuns.com/index.php/journal/article/view/775>
- Windsor, A.M., Moore, M.K., Warner, K.A., Stadig, S.R., and Deeds, J.R. 2019. Evaluation of variation within the barcode region of Cytochrome C Oxidase I (COI) for the detection of commercial *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (blue crab) products of non-US origin. PeerJ, e7827. <https://doi.org/10.7717/peerj.7827>
- Wingett, S.W., and Andrews, S. 2018. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. F1000Res. 7: 1338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>
- Wolcott, D.L., and O'Connor, N.J. 1992. Herbivory in Crabs: Adaptations and Ecological Considerations 1. Amer. Zool., 32: 370–381. <https://academic.oup.com/icb/article/32/3/370/1992261>
- Winnebeck, E.C., Millar, C.D., and Warman, G.R. 2010. Why does insect RNA look degraded? J. Insect Sci., 10: 159. <https://doi.org/10.1673/031.010.14119>
- Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., and Sorgeloos, P. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. Aquaculture, 202: 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00570-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00570-1)
- Wu, X.G., Fu, R.B., Cheng, Y.X., Chrn, S.L., Yang, X.Z., Wang, C.L., Zhu, D.F., and Luo, H.Z. 2006. Effect of starvation on the survival and the mainly biochemical composition of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) freshly hatched larvae. Chinese J. Zool., 41: 7–13. <http://www.cqvip.com/qk/94741x/200606/23449245.html>
- Wu, X.G., Zeng, C.S., and Southgate, P.C. 2014. Ontogenetic patterns of growth and lipid composition changes of blue swimmer crab larvae: Insights into larval biology and lipid nutrition. Mar. Freshw. Res., 65: 228–243. <https://doi.org/10.1071/MF13078>

- Wu, X., Zeng, C., and Southgate, P.C. 2017. Effects of starvation on survival, biomass, and lipid composition of newly hatched larvae of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758). *Aquacult. Int.*, 25: 447–461. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0042-9>
- Xie, H., Li, B., Zhong, R., Qin, J., Zhu, Y., and Lin, B. 2008. Microfluidic device for integrated restriction digestion reaction and resulting DNA fragment analysis. *Electrophoresis*, 29: 4956–4963. <https://doi.org/10.1002/elps.200800490>
- Xu, C., Li, E., Liu, Y., Wang, X., Qin, J.G., and Chen, L. 2017a. Comparative proteome analysis of the hepatopancreas from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under long-term low salinity stress. *J. Proteomics*, 162: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.013>
- Xu, R., Zheng, R., Wang, Y., Ma, R., Tong, G., Wei, X., Feng, D., and Hu, K. 2021. Transcriptome analysis to elucidate the toxicity mechanisms of fenvalerate, sulfide gatifloxacin, and ridomil on the hepatopancreas of *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.*, 116: 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.004>
- Xu, Y., Li, X., Deng, Y., Lu, Q., Yang, Y., Pan, J., Ge, J., and Xu, Z. 2017b. Comparative transcriptome sequencing of the hepatopancreas reveals differentially expressed genes in the precocious juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Aquac. Res.*, 48: 3645–3656. <https://doi.org/10.1111/are.13189>
- Yamauchi, M.M., Miya, M.U., and Nishida, M. 2003. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Gene*, 311: 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00582-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00582-1)
- Yang, Y., Jin, F., Liu, W., Huo, G., Zhou, F., Yan, J., Zhou, K., and Li, P. 2023. Comparative transcriptome, digital gene expression and proteome profiling analyses provide insights into the brachyurization from the megalopa to the first juvenile in *Eriocheir sinensis*. *Heliyon*, 9: e12736. [https://www.cell.com/heliyon/pdf/S2405-8440\(22\)04024-5.pdf](https://www.cell.com/heliyon/pdf/S2405-8440(22)04024-5.pdf)

- Yang, Y., Xu, W., Jiang, Q., Ye, Y., Tian, J., Huang, Y., Du, X., Li, Y., Zhao, Y., and Liu, Z. 2022. Effects of low temperature on antioxidant and heat shock protein expression profiles and transcriptomic responses in crayfish (*Cherax destructor*). *Antioxidants*, 11: 1779. <https://doi.org/10.3390/antiox11091779>
- Yednock, B.K., Sullivan, T.J., and Neigel, J.E. 2015. De novo assembly of a transcriptome from juvenile blue crabs (*Callinectes sapidus*) following exposure to surrogate Macondo crude oil. *BMC Genom.*, 16: 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1739-2>
- Ye, J., Zhang, Y., Cui, H., Liu, J., Wu, Y., Cheng, Y., Xu, H., Huang, X., Li, S., Zhou, A., Zhang, X., Bolund, L., Chen, Q., Wang, J., Yang, H., Fang, L., and Shi, C. 2018. WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic Acids Res.*, 46: <https://doi.org/10.1093/nar/gky400>
- Yuan, Y., Xu, F., Jin, M., Wang, X., Hu, X., Zhao, M., Cheng, X., Luo, J., Jiao, L., Betancor, M.B., Tocher, D.R., and Zhou, Q. 2021. Untargeted lipidomics reveals metabolic responses to different dietary n-3 PUFA in juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Food Chem.*, 354: 129570 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129570>
- Yúfera, M., Moyano, F.J., and Martínez-Rodríguez, G. 2018. The digestive function in developing fish larvae and fry. From molecular gene expression to enzymatic activity. 51–86. In: Yúfera, M. (Ed.). *Emerging Issues in Fish Larvae Research*. Springer International Publishing, Cadiz. 296 p.
- Zambonino-Infante, J., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutierrez, J., and Cahu, C. L. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. 277–344. In: Cyrino, J.E.P., Bureau, D.P., and Kapoor, B.G. (Eds.). *Feeding and Digestive Functions in Fishes*. Science Publishers, Boca Ratón. 589 p.
- Zanotto, F.P., and Wheatly, M.G. 2002. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects of physiological regulation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr.*, 133: 645–660. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00202-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00202-7)

- Zar, J.H. 2010. Bioestatistical analysis, 5th edition. Prentice Hall, New Jersey. 255 p.
- Zeng, X., Wan, H., Zhong, J., Feng, Y., Zhang, Z., and Wang, Y. 2021. Large lipid transfer proteins in hepatopancreas of the mud crab *Scylla paramamosain*. Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics, 38: 100801. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2021.100801>
- Zhang, X., Huang, C., Guo, C., Xie, S., Luo, J., Zhu, T., Ye, Y., Jin, M., and Zhou, Q. 2021. Effect of dietary carbohydrate sources on the growth, glucose metabolism and insulin pathway for swimming crab, *Portunus trituberculatus*. Aquac. Rep., 21: 100967. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100967>
- Zhang, X., Jin, M., Luo, J., Xie, S., Guo, C., Zhu, T., Hu, X., Yuan, Y., and Zhou, Q. 2022. Effects of dietary carbohydrate levels on the growth and glucose metabolism of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. Aquac. Nutr., 2022: 1–15. <https://doi.org/10.1155/2022/7110052>
- Zhang, X., Zhang, X., Yuan, J., Du, J., Li, F., and Xiang, J. 2018. Actin genes and their expression in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Mol. Genet. Genom., 293: 479–493. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1397-y>
- Zhang, Z., and Hu, J. 2007. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by Quantitative Real-Time RT-PCR. Toxicol. Sci., 95: 356–368. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl161>
- Zheng, D., Pan, L., and Fang, B. 2011. Effects of different dietary lipid contents on growth and lipase activity of *Eriocheir sinensis* larvae. J. Ocean Univ. China, 10: 55–60. <https://doi.org/10.1007/s11802-011-1695-7>
- Zhou, J., He, W. Y., Wang, W. N., Yang, C. W., Wang, L., Xin, Y., Wu, J., Cai, D., Liu, Y., and Wang, A.L. 2009. Molecular cloning and characterization of an ATP-binding cassette (ABC) transmembrane transporter from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 150: 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.06.012>

- Zhou, Z.K., Gu, W.B., Wang, C., Zhou, Y.L., Tu, D.D., Liu, Z.P., Zhu, Q.H., and Shu, M.A. 2018. Seven transcripts from the chitinase gene family of the mud crab *Scylla paramamosain*: Their expression profiles during development and moulting and under environmental stresses. *Aquac. Res.*, 49: 3296–3308. <https://doi.org/10.1111/are.13793>
- Zhu, B., Tang, L., Yu, Y., Yu, H., Wang, L., Qian, C., Wei, G., and Liu, C. 2017. Identification of ecdysteroid receptor-mediated signaling pathways in the hepatopancreas of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 246: 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.01.013>
- Zmora, O., Findiesen, A., Stubblefield, J., Frenkel, V., and Zohar, Y. 2005. Large-scale juvenile production of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Aquaculture*, 244: 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.012>
- Zohar, Y., Hines, A.H., Zmora, O., Johnson, E.G., Lipcius, R.N., Seitz, R. D., Eggleston, D.B., Place, A.R., Schott, E.J., Stubblefield, J.D., and Chung, J.S. 2008. The Chesapeake Bay blue crab (*Callinectes sapidus*): A multidisciplinary approach to responsible stock replenishment. *Rev. Fish. Sci.*, 16: 24–34. <https://doi.org/10.1080/10641260701681623>

A. Anexo: Identificación de larvas de jaiba azul *Callinectes sapidus* mediante taxonomía molecular

Se realizó la extracción de material genético de aproximadamente 0,5 g de larvas recién eclosionadas, de cada uno de los lotes trabajados en los ensayos de nutrición (capítulo 1), y de los lotes usados para análisis transcriptómicos (capítulo 2). Cada muestra fue enjuagada con abundante agua estéril y almacenada a -80 °C para su posterior análisis (Tabla 1).

Tabla 1. Códigos de muestra asignados a las larvas recién nacidas de *Callinectes sapidus* (nacimientos) recolectadas para el desarrollo de los ensayos de nutrición y transcriptómica.

Tipo de ensayo	Nacimientos*	Código de muestra
Nutrición	N1	NN1
	N2	NN2
	N3	NN3
	N4	NN4
Transcriptómica	N1	NT1
	N2	NT2
	N3	NT3

*Cada nacimiento corresponde a una hembra diferente. Las hembras fueron capturadas en la Ciénaga Grande de Santa Marta en diferentes momentos.

Las muestras de los nacimientos fueron procesadas para extracción de DNA genómico (DNAg) usando el kit PureLink genomic DNA mini kit (Invitrogen®) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Al finalizar el proceso de extracción, se realizó la cuantificación del DNAg por el método de absorción de luz a 260 nm (Nanodrop 2000c) (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de ADN a 260 nm de los lotes de larvas recién nacidos usados en los experimentos de nutrición y transcriptómica.

Tipo de ensayo	Muestra	Concentración a 260 nm (ng μL^{-1})
Nutrición	NN1	237
	NN2	94
	NN3	68
	NN4	179
Transcriptómica	NT1	248
	NT2	70
	NT3	169

La identificación molecular se realizó mediante la amplificación, secuenciamiento y análisis filogenético del marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI). Para amplificar el marcador COI por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron los oligonucleótidos COI_CallinecFW: 5'-cacatcttcagacttgcaatctaag-3' y COI_CallinecRv: 5'-gtgtctacgtctataccaacagtaaa-3' (Keskin y Atar, 2013), los cuales permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 1000 pb. El tamaño y calidad de los fragmentos amplificados fue monitoreado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 1).

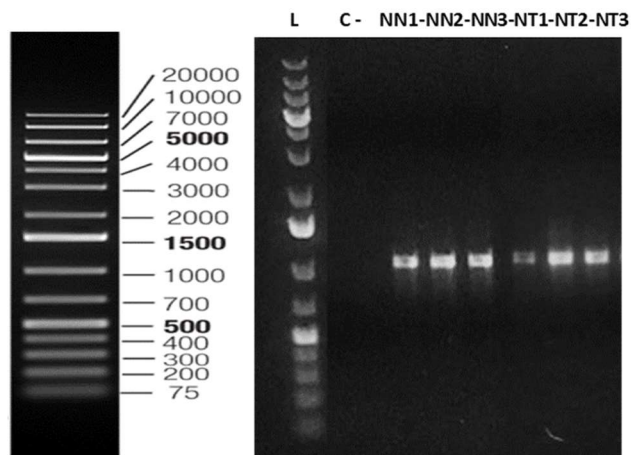


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con amplificación del marcador mitocondrial COI por PCR. Carril L: marcador de peso molecular de DNA 1kb; Carril C-: control negativo PCR; Carriles NN: fragmentos COI amplificados de las muestras de ensayos de nutrición (1000pb aproximadamente); carriles NT: fragmentos COI amplificados de las muestras de ensayos de transcriptómica (1000 pb aproximadamente).

Los fragmentos del COI amplificados por PCR fueron sometidos a secuenciación capilar (tipo Sanger), leyendo ambas cadenas para asegurar la fiabilidad de la secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron depuradas por calidad de las bases y ensambladas hasta contigs (secuencia final de la región codificante del COI) mediante los programas Cap3 y eBioX versión 1.5.1. (Huang y Madan, 1999; Martínez-Barrio *et al.*, 2009) (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de la región codificante de COI de los lotes de larvas recién nacidas usados en los experimentos de nutrición y transcriptómica ensambladas hasta contigs.

Tipo de ensayo	Muestra	Contig COI ensamblado
Nutrición	NN1	<p>TACTATAGAACCTAATAAGAAAGTCTTAACTTGTTTTAGATTACAATCTAACGCCTGT AACCTCAGCCATCTTATTATGCAACGATGATTCTTTTCTACAAATCATAAAGACATTGGT ACATTATATTTTCATTTTTGGAGCATGATCTGGGATAGTAGGTACATCACTTAGTTAATC ATTGAGCTGAACTAGGACAACCTGGAACCCCTTATTGGAAACGACCAGATTTATAACGTT GTAGTTACAGCTCACGCCCTTTGTTATAATTTTCTTCATAGTTATACCTATCATAATTGGA GGATTTGGTAACTGATTAGTTCCCTCTTATACTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTCCACGA ATGAATAACATAAGATTCTGACTCCTACCTCCATCACTAACTCTATTACTAATAAGAGGT ATAGTCGAAAGTGGAGTTGGTACAGGATGAACCGTTTACCCTCCCCTTGCTGCCGCTATT GCTCACGCAGGGGCCTCAGTTGATCTTGGTATTTTCTCTCTCCACTTAGCAGGTGTATCC TCAATTCTAGGGGCTGTTAACTTTATAACTACCGTTATTAATATACGCTCATTCCGGTATA AGAATAGACCAAATACCTTTATTCGCTGATCTGTATTTATTACCGCTATTCTTCTACTT CTTTCTCTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACTATACTCCTCACTGATCGAAACTTAAAT ACCTCATTCTTCGACCCAGCTGGAGGAGGTGACCCCGTCTCTACCAACATCTATTCTGA TTTTTCGGGCATCCTGAAGTTTATATTCTTATTTTACCTGCCTTTGGTATAATTTCTCAC ATTGTAAGACAAGAATCAGGTAAAAAGAATCCTTCGGAACATTAGGCATAATCTACGCT ATAATGGCTATTGGTATTTTAGGATTCATTGTATGAGCCCACCATATGT</p>
Nutrición	NN2	<p>ATTTTACTATAGAACCTAATAAGAAAGTCTTAACTTGTTTTAGATTACAATCTAACGC CTGTAACCTCAGCCATCTTATTATGCAACGATGATTCTTTTCTACAAATCATAAAGACAT TGGTACATTATATTTTCATTTTTGGAGCATGATCTGGGATAGTAGGTACATCACTTAGTTT AATCATTTCGAGCTGAACTAGGACAACCTGGAACCCCTTATTGGAAACGACCAGATTTATAA CGTTGTAGTTACAGCTCACGCCCTTTGTTATAATTTTCTTCATAGTTATACCTATCATAAT TGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCCTCTTATACTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTCC ACGAATGAATAACATAAGATTCTGACTCCTACCTCCATCACTAACTCTATTACTAATAAG AGGTATAGTCGAAAGTGGAGTTGGTACAGGATGAACCGTTTACCCTCCCCTTGCTGCCGC TATTGCTCACGCAGGGGCCTCAGTTGATCTTGGTATTTTCTCTCTCCACTTAGCAGGTGT ATCCTCAATTCTAGGGGCTGTTAACTTTATAACTACCGTTATTAATATACGCTCATTCCG TATAAGAATAGACCAAATACCTTTATTCGCTGATCTGTATTTATTACCGCTATTCTTCT ACTTCTTTCTCTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACTATACTCCTCACTGATCGAAACTT AAATACCTCATTCTTCGACCCAGCTGGAGGAGGTGACCCCGTCTCTACCAACATCTATT CTGATTTTTCGGGCATCCTGAAGTTTATATTCTTATTTTACCTGCCTTTGGTATAATTT TCACATTGTAAGACAAGAATCAGGTAAAAAGAATCCTTCGGAACATTAGGCATAATCTA CGCTATAATGGCTATTGGTATTTTAGGATTCATTGTATGAGCCC</p>

Tipo de ensayo	Muestra	Contig COI ensamblado
Nutrición	NN3	<p>TTTACTATAGAACCTAATAAGAAAAGTCTTAACCTGTTTTTAGATTTACAATCTAACGCCT GTAACCTCAGCCATCTTATTATCGCAACGATGATTCTTTCTACAAATCATAAAGACATT GGTACATTATATTTTCATTTTTGGAGCATGATCTGGGATAGTAGGTACATCACTTAGTTTA ATCATTGAGCTGAACTAGGACAACCTGGAACCCCTATTGAAACGACCAGATTTATAAC GTTGTAGTTACAGCTCACGCCTTTGTTATAATTTCTTCATAGTTATACCTATCATAATT GGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCTCTTATACTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTCCCA CGAATGAATAACATAAGATTCTGACTCCTACCTCCATCACTAACTCTATTAATAAAGA GGTATAGTCGAAAGTGGAGTTGGTACAGGATGAACCGTTTACCCTCCCCTTGCTGCCGCT ATTGCTCACGCAGGGGCTCAGTTGATCTTGGTATTTCTCTCCTCCTTAGCAGGTGTA TCCTCAATTCTAGGGGCTGTTAACTTTATAACTACCCTTATTAATATACGCTCATTTCGGT ATAAGAATAGACCAAATACCTTTTTCGTCTGATCTGTATTTATTACCCTATTCTTCTA CTTCTTTCTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACTATACTCCTCACTGATCGAAACTTA AATACCTCATTCTTCGACCCAGCTGGAGGAGGTGACCCCGTCTCTACCAACATCTATT TGATTTTTCGGGCATCCTGAAGTTTATATTCTTATTTTACCTGCCTTTGGTATAATTTCT CACATTGTAAGACAAGAATCAGGTAAGAAAGAAATCCTTCGGAACATTAGGCATAATCTAC GCTATAATGGCTATTGGTATTTTAGGATTCATTGTATGAGC</p>
Nutrición	NN4	<p>GGTCATACAATGAATCCTAAAATACCAATAGCCATTATAGCATAGATCATGCCTAATGT TCCGAAGGATTCTTTTTACCTGATTCTTGCTCACAATGTGAGAAATTAACCGAAGGC AGGTAATAAAGAATATAAACTTCAGGATGTCCGAAAAATCAGAATAGATGTTGGTAGAG AACAGGGTCGCCTCCTCCAGCTGGGTGGAAGAATGAGGTATTTAAGTTTCGATCAGTGAG AAGTATAGTAATAGCACCTGCTAATACAGGTAGAGAAAGAAGTAGAAGAATAGCGGTAA AAATACAGATCAAACGAATAAAGGTATTTGGTCTATTCTTATACCAAATGAGCGTATATT AATAACGGTAGTTATAAAGTTAACAGCCCCTAGAATTGAGGATACACCAGCTAAGTGGAG AGAGAAAAACCAAGATCAACTGAGGCCCTGCGTGAGCAATAGCGGCAGCAAGGGGAGG GTAACAGTTCATCCTGTACCAACTCCACTTTCGACTATACCTCTTATTAGTAATAGAGT TAGTGATGGGGGTAGGAGTCAGAATCTTATGTTATTCATTCTGGGAAGGCTATATCAGG AGCTCCTAGTATAAGAGGAACTAATCAATTACCAAATCCTCCAATTATAATAGGTATAAC CATGAAGAAAATTATAACAAAGGCGTGAGCTGTAACATAACCGTTATAAAATCTGGTCGT TCCAATAAGGGTTCAGGTTGCTAGTTCAGCTCGAATGATTAACCTAAGTATGATGACC TACTATCCAGATCATGCTCCAAAAATGAAATATAATGTACCAATGTCTTTATGATTTGT AGAAAAGAATCATCGTTGCATAATAAGATGGCTGAGGTTATAGGCGTTAGATTGTAATC TAAAAACAAGTTAAGACTTTCTTATTAGGTCTATAGTAAA</p>
Transcriptómica	NT1	<p>TGGGCTCATAACAATGAATCCTAAAATACCAATAGCCATTATAGCGTAGATTATGCCTAAT GTTCCGAAGGATTCTTTTTACCTGATTCTTGCTTACAATGTGAGAAATTAACCAAAG GCAGGTAATAAAGAATATAAACTTCAGGATGCCGAAAAATCAGAATAGATGTTGGTAG AGGACGGGGTCACCTCCTCCAGCTGGGTGGAAGAATGAGGTATTTAAGTTTCGATCAGTG AGGAGTATAGTAATAGCACCTGCTAATACAGGTAGAGAAAGAAGTAGAAGAATAGCGGT AATAAATACAGATCAGACGAATAAAGGTATTTGGTCTATTCTTATACCGAATGAGCGTAT ATTAATAACGGTAGTTATAAAGTTAACAGCCCCTAGAATTGAGGATACACCTGCTAAGTG GAGAGAGAAAAATACCAAGATCAACTGAGGCCCTGCGTGAGCAATAGCGGCAGCAAGGGG AGGGTAAACGGTTCATCCTGTACCAACTCCACTTTCGACTATACCTCTTATTAGTAATAG AGTTAGTGATGGGGGTAGGAGTCAGAATCTTATGTTATTCATTCTGGGAAAGCTATATC AGGAGCTCCTAGTATAAGAGGAACTAATCAGTTACCAAATCCTCCAATTATGATAGGTAT AACTATGAAGAAAATTATAACAAAGGCGTGAGCTGTAACATAACCGTTATAAAATCTGGTC GTTTCCAATAAGGGTTCAGGTTGCTAGTTCAGCTCGAATGATTAACCTAAGTATGATG ACCTACTATCCAGATCATGCTCCAAAAATGAAATATAATGTACCAATGTCTTTATGATT TGTAAGAAAAGAATCATCGTTGCATAATAAGATGGCTGAGGTTATAGGCGTTAGATTGTAA ATCTAAAAACAAGTTAAGACTTTCT</p>

Tipo de ensayo	Muestra	Contig COI ensamblado
Transcriptómica	NT2	GGGCTCATACAATGAATCCTAAAATACCAATAGCCATTATAGCGTAGATCATGCCTAATG TTCCGAAGGATTCCTTTTTACCTGATTCCTTGTCTACAATGTGAGAAATTATACCAAAGG CAGGTAATAAAGAATATAAACTTCAGGATGCCCGAAAAATCAGAATAGATGTTGGTAGA GGACGGGGTACCTCCTCCAGCTGGGTGGAAGAATGAGGTATTTAAGTTTCGATCAGTGA GAAGTATAGTAATAGCACCTGCTAATACAGGTAGAGAAAAGAAGTAGAAGAATAGCGGTAA TAAATACAGATCAGACGAATAAAGGTATTTGGTCTATTCCTTATACCGAATGAGCGTATAT TAATAACGGTAGTTATAAAGTTAACAGCCCCCTAGAATTGAGGATACACCAGCTAAGTGGA GAGAGAAAATACCAAGATCAACTGAGGCCCTGCGTGAGCAATAGCGGCAGCAAGGGGAG GGTAAACGGTTCATCCTGTACCAACTCCACTTTCGACTATACCTCTTATTAGTAATAGAG TTAGTGATGGGGGTAGGAGTCAGAATCTTATGTTATTCATTTCGTGGGAAAGCTATATCAG GAGTCCTAGTATAAGAGGAACTAATCAGTTACCAAATCCTCAATTATGATAGGTATAA CTATGAAGAAAATTATAACAAAGGCGTGAGCTGTAACACAGTTATAAATCTGGTCGT TTCCAATAAGGGTTCCAGGTTGCTCCTAGTTCAGCTCGAATGATTAACCTAAGTATGATGAC CTACTATCCAGATCATGCTCCAAAAATGAAATATAATGTACCAATGCTTTTATGATTTG TAGAAAAGAATCATCGTTGCATAATAAGATGGCTGAGGTTATAGGCGTTAGATTGTAAT CTAAAAACAAGTTAAGACTTTCTTATTAGGTCTATAGTA
Transcriptómica	NT3	TTATATTTTCATTTTTGGAGCATGATCTGGGATAGTAGGTACATCACTTAGTTTAAATCATT CGAGCTGAAGTACAGCAACCTGGAACCCCTTATTGGAAACGACCAGATTTATAACGTTGTA GTTACAGCTCACGCCCTTTGTTATAATTTTCTTCATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGGTAACTGATTAGTTCTCTTATACTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTCCACGAATG AATAACATAAGATTCTGACTCCTACCCCATCACTAATCTATTACTAATAAGAGGTATA GTCGAAAGTGGAGTTGGTACAGGATGAACCGTTTACCCTCCCTTGTGCGCGCTATTGCT CACGCAGGGGCTCAGTTGATCTTGGTATTTTCTCTCCTCACTTAGCAGGTGATCCTCA ATTCTAGGGGCTGTTAACTTTATAACTACCGTTATTAATATACGCTCATTCCGGTATAAGA ATAGACCAAATACCTTTATTCGTCTGATCTGTATTTATTACCGCTATTCTTCTACTTCTT TCTCTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACTATACTCCTCACTGATCGAAACTTAAATACC TCATTCTTCGACCCAGCTGGAGGAGGTGACCCCGTCTCTACCAACATCTATTC

Utilizando los contigs ensamblados para cada muestra, se llevó a cabo un análisis filogenético que permitiera clasificar las muestras de interés al grupo taxonómico al que pertenecen, utilizando el programa IQ-TREE Versión 1.6.12 (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), con el cual se calculó la matriz de distancias y se construyó un árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud (Maximun Likelihood-ML), usando el método de “bootstrap” con 1000 réplicas. Las secuencias usadas para la reconstrucción filogenética, pertenecían a secuencias de referencia de los géneros *Callinectes* sp., *Portunus* sp., *Necora* sp., *Cancer* sp y *Carcinus* sp (Yamauchi *et al.*, 2003; Keskin y Atar, 2013; Brandão *et al.*, 2016; Windsor *et al.*, 2019; Winarni y Kusbiyanto, 2021; Frolova *et al.*, 2022; Schubart *et al.*, 2023). El árbol filogenético consenso fue visualizado y editado gráficamente utilizando el programa FigTree v1.4.4 (Rambaut *et al.*, 2016) (Figura 2).

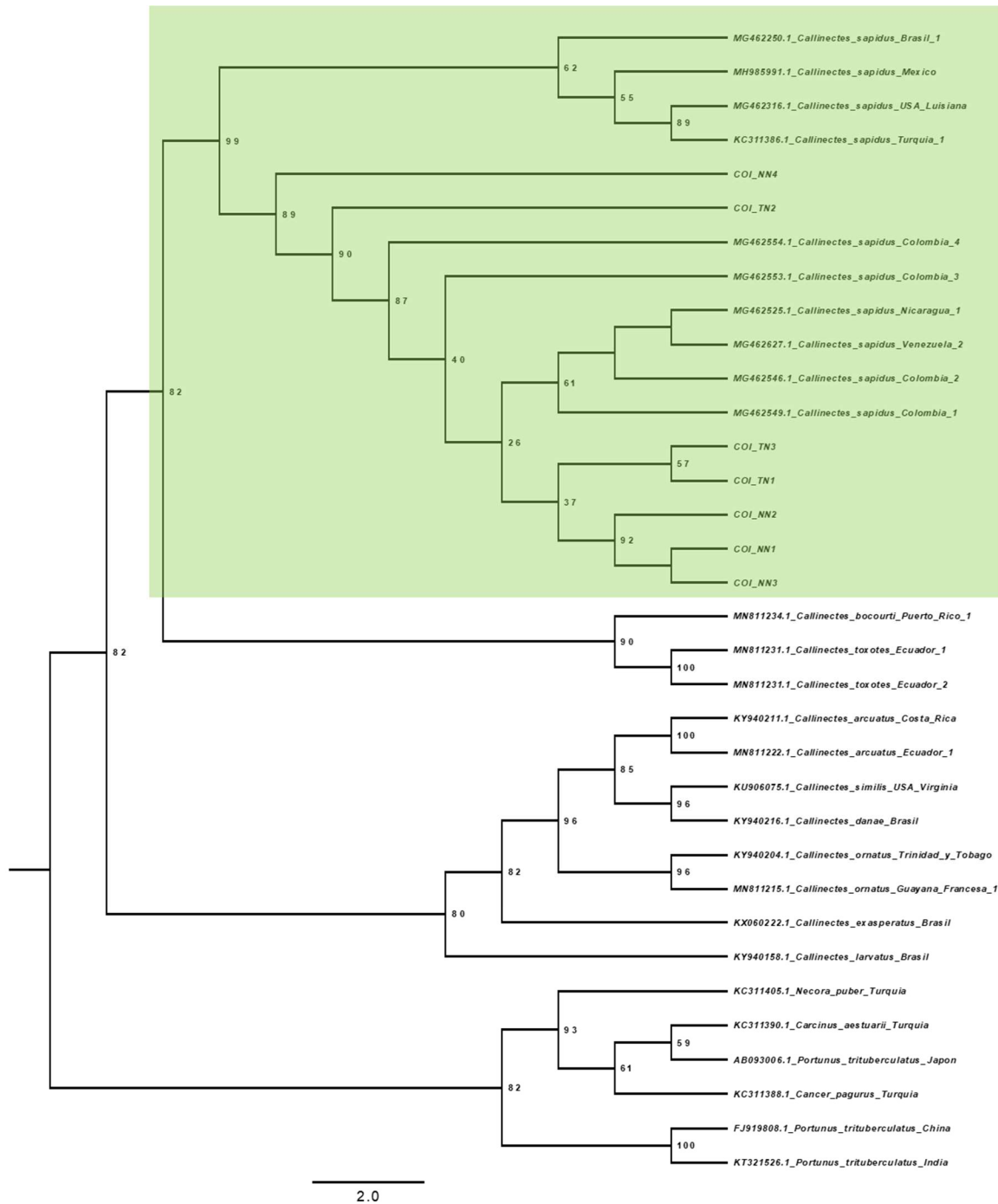


Figura 2. Árbol filogenético consenso construido a partir de alineamiento de secuencias de nucleótidos del marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI). La filogenia fue construida empleando el método de máxima verosimilitud (Maximun likelihood), el modelo de General Time reversible (GTR) + distribución Gamma de 4 categorías (G4) y el método estadístico de Bootstrap con 1.000 réplicas (GTR+G4). El mejor modelo de sustitución fue definido mediante el BIC score (Bayesian information Criterion) y el árbol filogenético fue visualizado con el programa FigTree v1.4.4.

Resultados de la taxonomía molecular:

- Se logró extraer exitosamente el DNA genómico de las muestras de los nacimientos procesadas. Usando el DNAG se logró amplificar exitosamente el marcador molecular mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) de todas las muestras.
- De acuerdo con la matriz de distancias calculada y el árbol filogenético reconstruido, se logró determinar que las muestras evaluadas son taxonómicamente cercanas a las secuencias de referencia de *Callinectes sapidus* con distancia entre 0.00 y 0.04 (Para las secuencias evaluadas). Esto fue corroborado en el árbol filogenético realizado por el método de máxima verosimilitud, en el cual se observan las secuencias en estudio, formando un grupo taxonómico hermano con secuencias de referencia de *Callinectes sapidus* con un bootstrap de 99 (Figura 2: secuencias agrupadas en color verde).
- Los resultados obtenidos indican que los individuos derivados de los nacimientos usados en este trabajo para los ensayos de nutrición y transcriptómica, se puede clasificar a nivel de especie como *Callinectes sapidus*.