

Programa de Estudios de Posgrado

**Determinación sexual medioambiental, diferenciación sexual
externa y estructura de la glándula androgénica en el camarón
blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Decapoda:
Penaeidae)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

Rodolfo Garza Torres.

La Paz, B.C.S. Diciembre 2006

Resumen

Se estudiaron efectos medioambientales sobre la determinación sexual en *Litopenaeus vannamei* criando postlarvas pL-1 en tres temperaturas, bajo tres fotoperiodos, en alta densidad y por inanición. Ninguna de estas condiciones medioambientales e cautiverio afectaron la determinación sexual o el desarrollo diferencial sexual en la especie. La revisión del desarrollo del endopodito del primer par de pleópodos reveló la primera diferenciación sexual externa a partir del día 50, mostrando una estructura triangular con tres setas en las hembras, mientras que en machos se mantuvo como una estructura tubular. Independientemente del tamaño de los individuos, la diferenciación sexual se presentó en juveniles desde el día 50 hasta el 90, siempre y cuando la postlarva haya alcanzado un desarrollo previo mínimo entre los 150 mg de peso corporal y 20 mm de longitud. La histología y microscopía de barrido en los vasos deferentes revelaron que la glándula androgénica (GA) es un cordón de 2 mm de largo, adherido a la región eyaculatoria subterminal del vaso deferente distal. La GA esta compuesta por células grandes y ovaladas que contienen citoplasma vacuolado, y cada célula tiene un núcleo prominente, de manera similar a las GA descritas en Malacostracos; por lo anterior se asume que debe tener la misma función en la diferenciación sexual. Se realizaron bioensayos de andrectomía en machos e implantación de GA en hembras, que después de seis meses de observación de estructuras sexuales externas y en gónada, no mostraron efecto aparente de reversión sexual. Por último, se obtuvo ARN total del vaso deferente-GA medio distal, proveniente de camarones machos ablacionados unilateralmente del pedúnculo ocular y no ablacionados, seguido de una transcripción en reversa para generar la primera síntesis de ADN complementario. La evaluación cualitativa de expresión de genes entre los dos grupos

de machos se llevó a cabo mediante la amplificación de ADNc-PCR, utilizando oligos arbitrarios de secuencia conocida y la exposición de bandeos diferencial en gel de agarosa, en donde no fue posible concluir que la glándula del seno controla la síntesis de ARN de la GA. Sin embargo, los productos de PCR se utilizarán para futuras investigaciones relacionadas con la función de la AG sobre la diferenciación sexual de esta especie.

Palabras clave: diferenciación sexual, vaso deferente, glándula androgénica

Dr. Rafael Campos Ramos

Director de tesis

Abstract

Environmental effects on sex determination in *Litopenaeus vannamei* were studied by rearing day one postlarvae at three temperatures, under three photoperiods, at high density, and by starving. None of the environmental conditions in captivity affected sex determination or differential development of gender in this species. From day 50, the development of the endopodite of the first pair of pleopods revealed the first external sexual differentiation, showing a triangular structure with three setae in females, whereas a tubular structure remained in males. Juvenile shrimp sex differentiation took place from days 50 to 90, independent of size, only if postlarvae reached a minimum development of 150 mg of body weight and 20 mm of body length previously. Histology and scanning electron microscopy of the vas deferens revealed that the androgenic gland (AG) is a single 2-mm long cord attached in the sub terminal ejaculatory region of the distal vas deferens. The AG is composed of large oval cells containing vacuolated cytoplasm, and each cell has a prominent rounded nucleus, similar to the AG descriptions in Malacostracans; so it is assumed that it should have the same function in sex differentiation. Bioassays of andrectomy on males and AG implantation on females were made, in which after six months of observation of external sexual structures and gonad, none of them showed an apparent sex reversal effect. Finally, total RNA was isolated from the distal region of the middle vas deferens-AG, from unilateral eyestalk-ablation and no-ablation males, followed by the first-strand complementary DNA synthesis by reverse transcription. Qualitative evaluation of gene expression between the two groups of males was made by cDNA-PCR amplification, using arbitrary primers of known sequence and differential banding display in agarose gel, in which it was not possible to conclude that the sinus gland controls the

RNA synthesis of AG. However, PCR-products will be used for further investigations related to the function of the AG on sex differentiation of this species.

Keywords: sex differentiation, vas deferens, androgenic gland

A
La Laguna

AGRADECIMIENTOS

A todos mis amigos y compañeros, a todos los maestros, a todos con los que conviví estos años de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada.

A mi director de tesis y asesores, Dr. Rafael Campos, al Dr. Alejandro Maeda, y al Dr. Gopal Murugan, por todo lo que han hecho por mi y por este trabajo.

A la M en C. Hortencia Obregón por haber colaborado en todo el estudio.

A la Dra. Danitzia Guerrero, por la ayuda en la localización histológica de la glándula androgénica.

A todos los que me ayudaron con el mantenimiento de los camarones, a Pablito Monsalvo, a Gilberto Colado, a Carlos Ceseña, a Armando Monge, a Sandra de la Paz, a Mayra Vargas.

Al laboratorio de Histología, a Carmen Rodríguez, a Tere y a Doña Eulalia, por ayudarme a sacar el sin fin de laminillas montadas.

Al laboratorio de Microscopía Electrónica de barrido por las fotos realizadas gracias al manejo de Ing. Ariel Cruz y bajo la técnica del Dr. Vladimir Lebsky.

Agradecer a la Dra. Ana María Ibarra y al Ing. José Luis Ramírez por proporcionarnos postlarvas para el estudio.

Al laboratorio de Genética Molecular, a la M en C. Delia Rojas, a Nacho, Arturo Sierra y a la Dra. Norma Hernández, por haber aprendido mas allí que en los salones.

A todo el personal de Centro de Investigaciones del Noroeste (CIBNOR), en especial al de Posgrado por su ayuda.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Mecanismos de determinación sexual	7
Cromosomas sexuales	7
Mecanismos de determinación sexual cromosómica en crustáceos	8
Manipulación cromosómica, hibridación y genética molecular, en relación a los mecanismos de determinación sexual en peneidos	9
Mecanismos de determinación sexual medioambiental en crustáceos	11
Mecanismos de determinación sexual medioambiental-parasítica en decápodos	11
Diferenciación sexual en los Malacostraca	12
La glándula androgénica en los Malacostraca	13
La hormona de la glándula androgénica	15
Aparato reproductor masculino	17
JUSTIFICACIÓN	19
ANTECEDENTES	20
HIPOTESIS DE TRABAJO	23
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Camarones experimentales	26
Condiciones generales de crianza y régimen alimenticio	26
Determinación sexual medioambiental	27
Efecto de la temperatura sobre la proporción de sexos	27
Efecto del fotoperíodo en la proporción de sexos	27
Efecto de alta densidad en la proporción de sexos	28
Efecto de la hambruna en la proporción de sexos	28
Sexado de camarón	29
Análisis estadístico	29
Evaluación de crecimiento en las tres temperaturas experimentales	29

Diferenciación sexual externa a tres temperaturas	29
Observación de gónadas	30
Morfología del endopodito	30
Descripción de la glándula androgénica en <i>L. vannamei</i> con base en histología y en microscopía electrónica de barrido	31
Efecto de la ablación de la glándula androgénica sobre la morfología sexual externa y en testículo	31
Efecto de la implantación muscular de un conducto deferente sobre la morfología sexual	32
Análisis cualitativo de la expresión de genes entre machos ablacionados y no ablacionados	33
Extracción y aislamiento de ARN proveniente de conductos deferentes-glándula androgénica	33
Cuantificación y análisis cualitativo de ARN total	34
Síntesis de ADN complementario (ADNc)	35
Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	37
Obtención de imágenes digitalizadas	43
RESULTADOS	44
Determinación sexual medioambiental	44
Diferenciación sexual	46
Diferenciación de las características sexuales externas en diferentes condiciones de temperatura	49
Descripción de la glándula androgénica a través de histología y microscopía electrónica de barrido	51
Expresión de genes entre camarones ablacionados y no ablacionados	56
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	70
LITERATURA CITADA	72

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema del control endócrino de la reproducción del macho en camarón	14
Figura 2. Aparato reproductor masculino	18
Figura 3. Aparato reproductor masculino	18
Figura 4. Electroforesis de ARN cualitativo en gel de agarosa al 1 %	35
Figura 5. Barridos de ADNc obtenidos en una electroforesis en gel de agarosa al 1% a partir de VD y AG	38
Figura 6. Comienzo de la diferenciación sexual externa en <i>L. vannamei</i> entre los días 24 y 34 como postlarva	47
Figura 7. Características sexuales externas e internas en <i>L. vannamei</i>	48
Figura 8. Crecimiento de <i>L. vannamei</i> a tres temperaturas distintas mostrando el tiempo en que se presenta la diferenciación sexual externa	50
Figura 9. Morfología histológica de la glándula androgénica (GA) en <i>L. vannamei</i>	52
Figura 10. Detalle de la masa celular compacta de la glándula androgénica (GA)	52
Figura 11. Detalle de células ovaladas en las cuales el citoplasma parece vacuolado y la presencia de un núcleo prominente y semi redondo	53
Figura 12. Conducto deferente de <i>L. vannamei</i> mostrando la glándula androgénica (GA) como un cordón adherido en la parte distal del bulbo eyaculador	54
Figura 13. Detalle de un “cordón” adherido al conducto deferente de <i>L. vannamei</i> mostrando la supuesta glándula androgénica (GA)	55
Figura 14. Detalle de la supuesta glándula androgénica (GA) adherida al conducto deferente de <i>L. vannamei</i> .	55
Figura 15. Amplificación del oligonucleótido A3 (10 pb).	58

Figura 16. Amplificación del oligonucleótido A4 (20 pb)	59
Figura 17. Amplificación del oligonucleótido A6 (9 pb)	60
Figura 18. Amplificación del oligonucleótido A15 (9 pb)	61
Figura 19. Amplificación del oligonucleótido A17 (10 pb)	62

Lista de tablas

Tabla I. Componentes para la reacción de síntesis de ADNc	36
Tabla II. Componentes para la reacción de reacción en cadena de polimerasa	39
Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de ADNc mediante la reacción en cadena de polimerasa	42
Tabla IV. Proporción sexual de <i>L. vannamei</i> sujeta a tres temperaturas	44

INTRODUCCIÓN

En la acuicultura, el crecimiento de las especies es la característica más importante para la rentabilidad de la industria. Sin embargo, para obtener esta rentabilidad, es necesario conocer de la zootecnia, la fisiología reproductiva, la resistencia a enfermedades, la nutrición y la genética de la especie de cultivo. Existen otros rasgos cualitativos como la presentación del producto (color, empaçado, conservado) que son importantes también (Greglutz, 2001).

La producción de camarón por cultivo ha alcanzado mayor importancia a nivel mundial. La oferta y la competencia en el mercado se han incrementado; es por eso que se necesitan avances científicos y tecnológicos que ayuden a optimizar el sistema productivo, desde la domesticación hasta la selección y el mejoramiento genético del organismo (Martínez, 2002).

Uno de los aspectos más importantes en la camaronicultura es la producción de postlarvas. Estas son necesarias para tener un control de calidad y tener una cantidad suficiente para poder abastecer la demanda del sector productivo. Actualmente casi la totalidad de las granjas del país obtienen las postlarvas de laboratorios nacionales. Para lograr producir exitosamente estas “semillas”, es fundamental el conocimiento de la fisiología reproductiva del camarón (Martínez, 2002). La reproducción en cautiverio de camarón comenzó desde hace más de cuatro décadas (Almada, 1989; Browdy, 1992; Bray y Lawrence, 1992; Benzie, 1997) y su actual tecnificación permite el abasto constante de postlarvas para las granjas de engorda.

Una vez que se logró tecnificar la reproducción de camarón en cautiverio y la metamorfosis larvaria, comenzaron a incrementarse los laboratorios de producción de postlarva. Sin embargo, dichos laboratorios dependían de capturar camarón silvestre para reemplazar sus reproductores dado que después de una “vida útil” los camarones presentaban un agotamiento natural, presentando desoves y larvas con baja viabilidad (Racotta *et al.*, 2003). En este sentido, la camaronicultura dependía de las poblaciones naturales para abastecerse de reproductores y es por ello que durante los 70’s y 80’s, muchos trabajos de investigación se orientaron a estimar la variabilidad genética de las poblaciones naturales de camarón. Se intentaba con estas investigaciones determinar la variación genética poblacional entre puntos distantes geográficamente, a través del uso de marcadores genéticos de isoenzimas (Proctor *et al.*, 1974; Marvin *et al.*, 1977; Lester, 1979; Mulley y Later, 1980). Sin embargo, Lester (1983) encontró en cuatro especies de camarón muy pocos polimorfismos utilizando isoenzimas. Es por eso que para monitorear niveles de variabilidad genética fue necesario utilizar técnicas genéticas moleculares como los marcadores RFLP’s (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) en genes mitocondriales, los RAPD’s (polimorfismos de DNA amplificados al azar) y el uso de microsatélites, que son a la fecha los más informativos. Con los microsatélites ha sido posible estimar la diversidad genética e identificar poblaciones de *Litopenaeus vannamei* Boone en el Pacífico nororiental y a su vez evaluar la heterogocidad en cultivo (Garcia *et al.*, 1996; Wolfus *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2004; Valles-Jiménez *et al.*, 2005). La dependencia de reproductores silvestres para la reproducción en cautiverio gradualmente se eliminó, cuando muchos productores evaluaron que el camarón cultivado era factible de engordarlo por más tiempo y de ahí seleccionarlo para utilizarlo como fuente de

reproductores. En México, en 1996, el grupo de camarón del CIBNOR llevó a cabo una preengorda intensiva en estanquería supralitoral, seguida de una engorda a baja densidad en estanquería de mareas, cuyos camarones fueron seleccionados por la empresa Acuacultores de la Península, en La Paz, B.C.S., dando la primera evidencia cuantificada de que era posible cerrar el ciclo de camarón blanco y dar el paso a la domesticación de esta especie en México. Cabe mencionar que la domesticación del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* Stimpson ya había sido lograda 10 años atrás por el entonces denominado CICTUS de la Universidad de Sonora (hoy DICTUS), sin embargo, esta especie fue eliminada de la industria, debido a la presencia de infecciones de tipo viral.

El conocimiento de la variabilidad genética y su relación con el desempeño productivo de los camarones, fue una característica que condujo al mejoramiento genético del cultivo de camarón (Martínez, 2002). El estudio de la herencia de caracteres cuantitativos fue importante para poder seleccionar las mejores características (p.e. crecimiento y sobrevivencia) formando familias puras cuidando y evaluando que la heterocigocidad no se viera disminuida en el proceso de la mejora genética. En 1997, el laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR comenzó el programa de mejora genética de camarón blanco, cuyos resultados se pueden consultar en Pérez-Rostro e Ibarra, (2003a,b), entre otros.

Por otro lado, durante la década de los 80's y 90's ya se tenía un conocimiento avanzado en moluscos y peces en cuanto a las manipulaciones cromosómicas y su beneficio en la acuicultura, con el enfoque de que los métodos de triploidización producen organismos estériles, lo cual podría mejorar el crecimiento, ya que la energía no se dirige a la reproducción, sino a crecimiento somático. Es durante la década de los 90's que se

presentan investigaciones de cariotipo y triploidización en camarón blanco *L. vannamei* (Campos-Ramos, 1997; Dumas y Campos-Ramos, 1999). El estudio de la inducción de triploidía, la cual era específicamente muy exitosa en moluscos en producir animales estériles con un mayor crecimiento y una mejor presentación del producto, se inició en camarón con un sentido de tipo ecológico, más que de uno aplicado en la camaronicultura. De esto se desprende que para 1991, *L. vannamei* ya se cultivaba en las costas de Carolina del Sur, E.U.A., cuyas posibles escapatorias accidentales de postlarvas de este camarón procedente del Pacífico, podrían permitir la colonización de las costas del Atlántico occidental dentro del marco de distribución nativa de *L. setiferus* L., provocando con esto competencia y exclusión ecológica (Stokes *et al.*, 1991, citado en Misamore y Browdy, 1997), lo cual, se evitaría al producir triploides estériles. Sin embargo, la inducción de poliploides en peneidos continua a nivel experimental, como ejemplo, la triploidía (Norris *et al.*, 2000) y tetraploidía (Morelli, 2003). Aún se desconoce si la inducción a la triploidía tendría como resultado un mejor crecimiento en camarón, partiendo de que este crustáceo madura mucho después de la talla de cosecha. Actualmente *L. vannamei* se ha introducido como exótico en la franja tropical de todo el mundo, por lo que el punto ecológico está fuera de contexto y habrá que determinar si las manipulaciones cromosómicas en esta especie tienen algún sentido para el beneficio de la camaronicultura.

Los cultivos monosexuales son una estrategia para incrementar la producción en acuicultura, partiendo de que la naturaleza consivió un mayor crecimiento a un sexo de una determinada especie. La reversión sexual es uno de los métodos que se aplican para poder obtener un monocultivo sexual y es ampliamente empleado en la piscicultura. En la producción intensiva de tilapias, con la adición de testosterona en la etapa de cría, se

reverten hembras a machos, que presentan un mayor crecimiento y conversión alimenticia (Penman y McAndrew, 2000). También en la producción de la trucha, donde debido a una importante diferencia en el momento de la maduración sexual es más adecuado el manejo de las hembras (Bye y Lincon, 1986). Otro ejemplo relevante es en la cría del salmón donde gracias a la utilización de poblaciones monosexuales se ha podido prescindir de la separación sexual manual (Hunter y Donalson, 1983; Rodríguez y Batista, 1999); por último se puede mencionar el cultivo de machos en langostinos comerciales como *Macrobrachium rosenbergii* de Mann (Sagi y Cohen, 1990), y en langostinos en donde se busca implementarse como en *Procambarus clarkii* Girard (Taketomi y Nishikawa, 1996) y en la langosta de agua dulce *Cherax destructor* Clark (Fowler y Leonard, 1999). Más adelante se comentará específicamente sobre la reversión sexual de estas especies de decápodos. Adicionalmente, la reversión sexual se ha utilizado para identificar el mecanismo de la determinación sexual genética en peces (Legrand *et al.* 1987; Devlin y Nagahama, 2000) y crustáceos, particularmente en *Macrobrachium rosenbergii* (Sagi y Cohen, 1990).

Como ya se ha comentado, el cultivo del camarón blanco del Pacífico está muy adelantado científica y tecnológicamente. En la actualidad, mucha de la investigación con esta especie esta dirigida hacia el control de enfermedades virales, la mejora genética, el control total de la reproducción en cautiverio y la intensificación del cultivo, que conlleva también la meta de evitar destruir zonas de manglares que son lugares de crianza de juveniles, temas que afectan directamente el desarrollo de la industria y el medio ambiente. Por otro lado, el grado de avance tecnológico conforma una plataforma ideal para investigaciones sobre fisiología y genética.

Una particularidad de los peneidos es que son gonocóricos con fertilización externa, lo que significa que tienen sexos separados, con petasma en machos y télico en hembras (Dall *et al.* 1990). Adicionalmente presentan dimorfismo sexual de talla y peso durante su desarrollo.

Algunos estudios sobre la camaronicultura enfatizan el dimorfismo sexual en la talla de las especies y las posibles ventajas para mejorar la producción. En el camarón blanco del Pacífico, el dimorfismo sexual comienza alrededor de los 10 g (Chow y Sandifer, 1991) y se vuelve significativo aproximadamente a los 17 g (Pérez-Rostro *et al.*, 1999), tamaño que usualmente se alcanza en los cultivos de camarón listos para cosechar. El ambiente parece afectar el dimorfismo sexual de la talla y del peso (Pérez-Rostro e Ibarra, 2003b). El cultivo de hembras se justifica aún más, con los resultados del programa de mejora genética, el cual ha conseguido que en un menor tiempo de cultivo se alcancen tallas típicas de cosecha, lo que deja una estrategia potencial de llegar a tallas más grandes. Cabe mencionar que el comercio de la cola de camarón se basa en la talla de la misma y que entre más talla tenga el producto su valor comercial se incrementa significativamente. En el caso del camarón café *Farfantepenaeus californiensis* Holmes, una de las especies más importantes en la pesquería del Pacífico, Campos-Ramos *et al.* (1994) mostraron que después de ocho meses de cultivo, comenzando a principios de julio para cosechar a comienzos de marzo, se obtuvieron hembras de 18 g contra machos de 14 g. Probablemente, la diferencia en el tamaño se debió tanto a la misma naturaleza de las hembras de crecer más rápido, como a un mejor crecimiento de las hembras durante las temperaturas invernales (16-20°C) en el noroeste de México. En el caso de *F. occidentalis* Streets, una especie que no se utiliza en la camaronicultura, las hembras crecen más rápido que los machos en su medio natural

(Villegas y Vargas-Barquero, 2000). Estudios sobre las características dimórficas sexuales como posibles ventajas en el cultivo de camarones incluyen también a especies asiáticas como *Penaeus marsupenaeus japonicus* Bate (Nakamura *et al.*, 1992; Anónimo 1999; Li *et al.*, 2003a), *P. monodon* Fabricius (Lumare *et al.*, 1998; Hansford y Hewitt, 1994), la especie hindú *P. indicus* H. Milne-Edwards (Mohan y Siddeek, 1995), y *Fenneropenaeus chinensis* Kishinouye (Yin *et al.*, 1986; Li y Xiang, 1997; Li *et al.*, 2003b).

Mecanismos de determinación sexual

Cromosomas sexuales

Los mecanismos de determinación sexual primaria controlan si un individuo se desarrolla en macho o en hembra, presentando testículos u ovarios respectivamente (Bull, 1983). Usualmente, la determinación sexual primaria en vertebrados se refiere a genes que se alojan en los cromosomas sexuales (Solari, 1994). En la región diferenciada del par gonosomal en el sexo heterogamético no se lleva a cabo la recombinación meiótica. Al mismo tiempo, en el sexo homogamético de la misma especie, no se restringe la recombinación. De esta manera, se establece una diferencia dicotómica entre el gonosoma que encuentra su pareja y es libre de recombinarse en el sexo homogamético (cromosoma X o Z) y del gonosoma que tiene una restricción de recombinación en el sexo heterogamético, y que se transmite exclusivamente a través de este sexo (cromosoma Y o W) (Solari, 1994).

Mecanismos de determinación sexual cromosómica en crustáceos

De acuerdo a Ginsburger-Vogel y Charniaux-Cotton (1982), la determinación sexual en crustáceos es un sistema genético responsable de la expresión de los genes que controlan la morfogénesis sexual que da lugar a un macho o una hembra. Legrand *et al.* (1987) comparten la idea de que la base de la determinación sexual es genética, sin embargo añaden que algunos factores epigenéticos (medioambientales y citoplasmáticos) pudieran influir fuertemente en el proceso.

Según Ohno (1979), en la revisión de Ginsburger-Vogel y Charniaux-Cotton (1982), los genes que determinan el sexo se localizan en un par de cromosomas sexuales que pudieran ser homomórficos o heteromórficos. Estos pares de cromosomas son XX en la hembra y XY en el macho cuando éste es el sexo heterogamético. Cuando la hembra es el sexo heterogamético, su par de cromosomas sexuales se le denomina ZW, y en macho ZZ. En la mayoría de los crustáceos se observa un sistema heterogamético XX/XY o WZ/ZZ, aunque en algunas otras especies parece existir un sistema poligenético.

Estudios de Niiyama (1959) sobre cariotipos en decápodos e isópodos, muestran que existen heterocromosomas en ocho especies de un total de veintiséis decápodos estudiados, y una de seis isópodos; en cambio de diez especies de decápodos estudiadas por Vishnoi (1972), en ninguna se presentaron heterocromosomas sexuales (Ginsburger-Vogel y Charniaux-Cotton 1982). En peneidos no se han reportado cromosomas sexuales.

Legrand *et al.* (1987) reportaron la cruce de dos subespecies de isópodos, una de las cuales tenía un mecanismo XX/XY y la otra WZ/ZZ. Ellos demostraron que algunos genes “mayores” están asociados a la determinación sexual (X/Y, W/Z), pero que estos efectos

fueron modificados por un número indeterminado de genes “menores” en otros cromosomas (autosomas). Los autores concluyen que en algunos crustáceos, los cromosomas sexuales son heterogaméticos, y constituyen la información genética de la determinación sexual primaria. Sin embargo, esto no excluye que existan otros genes en autosomas que influyan en el proceso.

Manipulación cromosómica, hibridación y genética molecular, en relación a los mecanismos de determinación sexual en peneidos

Las técnicas de manipulación cromosómica incluyen la inducción de triploidía después de la retención del segundo cuerpo polar, por medio de impactos (shocks) térmicos (fríos y calientes), presión, químicos, y la ginogénesis meiótica, la cual, es esencialmente el mismo proceso que la triploidia, pero desintegrando previamente el DNA del genoma, comúnmente con radiación UV (Purdom, 1983; Thorgaard y Allen, 1987; Felip *et al.*, 2001). La ginogénesis es una herramienta para clarificar el sistema de determinación sexual en especies gonocóricas y para producir una progenie monosexual. También es útil para obtener tasas de recombinación y determinar la posición de los genes sexuales en el cromosoma sexual (Peruzzi *et al.*, 2003; Campos-Ramos *et al.*, 2003).

El proceso de ginogénesis ha sido efectuado solamente en el camarón de télico cerrado *F. chinensis* (Dai *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 1995). Estos trabajos demuestran la factibilidad de realizar ginogénesis en camarones marinos. La progenie monosexual de hembras meioginogenéticas, sugiere que la hembra es heterogamética (XX) en *F. chinensis*. Ningún camarón de télico abierto ha sido sujeto experimental a este proceso.

Los fines de la inducción de triploidía en organismos acuáticos son el de crear esterilidad y obtener un mejor crecimiento de las especies en cultivo. La inducción de triploidía debe resultar en una proporción sexual de 1:1; es decir, XXX (hembra) y XXY (macho). En este sentido la triploidía no es un factor a evaluar para la determinación sexual de una especie. Sin embargo, existe un reporte en *F. chinensis* en donde la inducción de triploidía desvió la proporción sexual hacia hembras en 4 a 1 (Li *et al.*, 2003a), lo cual requiere de más investigación.

Benzie *et al.* (2001) produjeron experimentos híbridos con hembras de *Penaeus monodon* y machos de *P. esculentus* Haswell por medio de inseminación artificial, encontrando una proporción sexual desviada hacia los machos, lo que sugiere que las hembras son el sexo heterogamético (WZ) en estas especies.

Existen solo dos reportes en donde larvas zoeas y mysis y postlarvas (p11 a p170) de *P. penicillatus* Alcock (Zhongqing, 1990) y *L. vannamei* (González-Gómez, 2001) se sometieron a tratamientos hormonales orales y por inmersión con 17 beta estradiol, con la finalidad de revertir machos a hembras. Sin embargo esta hormona no desvió la proporción sexual en estas especies.

Por último, cabe mencionar la investigación de Li *et al.* (2003b), en donde utilizaron marcadores moleculares de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) para crear un mapa de ligamiento en *P. japonicus*, y encontraron genes ligados al sexo en el mapa materno, sugiriendo que la hembra es el sexo heterogamético (WZ) en esta especie de camarón.

Mecanismos de determinación sexual medioambiental en crustáceos

Después de la fertilización, se determina el sexo, y se considera que la expresión sexual pudiera tener un componente medioambiental que decide que genes activar para que el organismo sea hembra o macho (Korpelainen, 1990). Legrand *et al.* (1987) proponen que existen dos tipos de factores medioambientales, los bióticos y los abióticos. Dentro de los abióticos describe la influencia de la temperatura en algunas especies de copéodos. También menciona la influencia del fotoperiodo en el anfípodo *Gammarus duebeni* Liljeborg. Además en especies partenogenéticas influyen varios factores medioambientales al mismo tiempo, entre ellos, hambruna, baja concentración de oxígeno en el agua, la sobrepoblación (como un factor biótico) y bajas y altas temperaturas (Korpelainen, 1990).

Los efectos de los factores medioambientales, según Ginsburger-Vogel y Charniaux-Cotton (1982), se pueden visualizar por medio de desviaciones en el radio sexual en la progenie de hembras aisladas o en muestras tomadas de poblaciones naturales. Sin embargo, no se puede conocer si estos factores actúan a nivel de los genes que determina el sexo, o a nivel de mecanismos fisiológicos y genéticos que controlan la diferenciación sexual. A la fecha, no se ha reportado ninguna determinación sexual medioambiental en peneidos.

Mecanismos de determinación sexual medioambiental-parasítica en decápodos

El fenómeno conocido como castración parasítica involucra la capacidad de un parásito de castrar las gónadas de un decápodo ocasionando una reversión sexual “biótico-

medioambiental”, en el sentido de que depende de la presencia e invasión del parásito en el huésped. Según la revisión de Ginsburger-Vogel y Charniaux-Cotton (1982), Girad (1887, 1888) descubrió que las características sexuales secundarias de cangrejos machos parasitados por *Sacculina* spp., se aproximaban a las características de las hembras. Su punto de vista era que el parásito siempre atrofiaba las gónadas, y a consecuencia de estos, feminizaba al hospedero. Después, se realizaron un gran número de observaciones en la castración parasítica de decápodos parasitados por el cirrípedo *Rhizocephala* spp., y el isópodo *Epicaridea* spp., como los de Reinhard (1956) y Hortnoll (1967). Estos autores observaron que los testículos con cierto grado de atrófia contenían oocitos, como por ejemplo en el cangrejo *Pachygrapsus marmoratus* Fabricius, y en casos excepcionales, las gónadas del macho tenían una regresión a ovarios. Más información sobre este tipo de reversión sexual parasítica se puede consultar en Legrand *et al.* (1987).

Diferenciación sexual en los Malacostraca

La clase Malacostraca es el grupo más grande dentro de los crustáceos, contiene dos tercios de sus especies, dentro de las cuales están las cochinillas, camarones, langostas y cangrejos. La diferenciación sexual tanto interna como externa en un malacostraco juvenil, ocurre después de su vida larval, por un lado se presenta la diferenciación interna, independientemente de la diferenciación externa que ocurre a través de una fase de ciclos de muda. Externamente se observa que a medida que el organismo cruza esta fase de mudas continuas, se van definiendo en orden las características masculinas o femeninas (Ginsburger-Vogel y Charniaux-Cotton, 1982; Charniaux-Cotton y Payen, 1985). Por

ejemplo, en el caso de *P. japonicus*, el crustáceo se encuentra sin diferenciar internamente al menos hasta el sexto día como postlarva. Subsecuentemente, la diferenciación interna ocurre con la formación de los conductos deferentes del macho, mientras que la diferenciación externa ocurre a partir del día 55 como postlarva (Charniaux-Cotton y Payen, 1985; Nakamura *et al.*, 1992).

La glándula androgénica en los Malacostraca

Una característica que hace más complejo entender la determinación y diferenciación en malacostracos es la presencia de la glándula androgénica (GA). Los malacostracos son el grupo de invertebrados en el cual se demostró la existencia de un péptido sexual en el anfípodo *Orchestia gammarella* Pallas, en un trabajo de Charniaux-Cotton (1954), en el cual se realizó la ovariectomía de las hembras y la andrectomía en los machos en donde se descubrió la glándula androgénica. Esta glándula se localiza fuera de los testículos, la cual no solo induce las características sexuales secundarias sino también a la diferenciación testicular. La confirmación de la función de esta hormona fue la implantación de la glándula a hembras inmaduras, que se reverteron a machos (Charniaux-Cotton, 1953, 1954, y 1960; Charniaux-Cotton y Payen, 1957).

Existe una enorme polémica en cuanto a esta glándula. Se considera que la glándula androgénica es el mecanismo tanto de determinación como de diferenciación sexual en malacostracos. De acuerdo a Suzuki (1999), la glándula androgénica en el isópodo *Armadillium vulgare* Latreile, secreta una hormona la cual es factor de reversión sexual y no de determinación sexual.

Se ha utilizado la implantación de la glándula androgénica en hembras sexualmente indiferenciadas de *Macrobrachium* para masculinizarlas (neomachos) y que sean reproductivamente competentes (Nagamine *et al.* 1980a,b; Sagi y Cohen, 1990). También se han revertido machos a hembras a través de la extirpación de la glándula androgénica creando neohembras, para después cruzarlas con machos normales. La presencia de solo machos en la progenie de la cruce de neomachos con hembras normales sugiere que el sexo femenino es el heterogamético (WZ) en esta especie. Sin embargo, este resultado no puede ser extrapolado a todos los decápodos ya que los mecanismos de determinación sexual pueden variar considerablemente dentro de los diferentes grupos de crustáceos (Benzie, 1998).

Se encontró que los efectos de la andrectomía en *Macrobrachium rosenbergii* (Sagi y Cohen, 1990) son dependientes al tiempo en que se realiza la manipulación quirúrgica. Mientras que el langostino se vuelve más juvenil y más desarrollado, disminuyen los efectos de la andrectomía en el desarrollo de las características sexuales primarias y secundarias. En la mayoría de los casos, la andrectomía reduce el desarrollo de las tenazas y causa la desaparición de los apéndices del macho, la deterioración del sistema reproductor y la reducción de la tasa del crecimiento somático (Sagi y Cohen, 1990).

Entre otras especies estudiadas de decápodos se encuentran *Procambarus clarkii* (Taketomi y Nishikawa, 1996), *Cherax destructor* (Fowler y Leonard, 1999), y *Cherax quadricarinatus* von Martens (Khalaila *et al.*, 2001; Barki *et al.*, 2003).

La hormona de la glándula androgénica

Se ha podido purificar y secuenciar la hormona de la glándula androgénica de *Armadillium vulgare* y se determinó que es una proteína que contiene dos cadenas peptídicas. Cuando se inyecta a una hembra inmadura, la hormona revierte a la hembra a un macho funcional que desarrolla testículos con una neo-glándula androgénica (Martin *et al.*, 1999; Okuno *et al.*, 1999; Juchault, 1999). En la revisión de Sagi y Aflalo (2005), muestran que se han hecho trabajos en los que se inyectan extractos de glándula androgénica del cangrejo *Procambarus clarkii* las cuales modifican las características sexuales externas del macho (Taketomi *et al.*, 1996). También muestran que inyecciones de extracto de glándula androgénica a hembras juveniles *Cherax destructor* llegan a desarrollar las aberturas genitales del macho (Flower y Leonard, 1999).

En las especies de decápodos, no se ha purificado la hormona de la glándula androgénica, pero basados en características histológicas de la glándula en *Procambarus clarkii* pudiera ser una hormona peptídica. El retículo endoplásmico rugoso se desarrolla en el citoplasma de las células de la glándula androgénica cuando comienza la actividad reproductiva del macho (Taketomi, 1986; Taketomi *et al.*, 1996). Esta característica ultra estructural pudiera ser un marcador utilizable para la actividad secretora de la glándula androgénica de los decápodos (Okumura *et al.*, 2005).

Según Khalaila *et al.* (2001) y Okumura (2004) la ablación del tallo ocular causa hipertrofia en la glándula androgénica, indicando que una hormona producida por la glándula sinoideal que se encuentra en el tallo ocular, controla e inhibe a la secreción de la glándula. Esto se confirma en *Cherax quadricarinatus* ya que observaron un incremento en

la síntesis de ARN en la glándula androgénica, así como también en el tamaño y peso de la misma, después de haber ablacionado el tallo ocular (Figura 1).



Figura 1. Esquema del control endócrino de la reproducción del macho en camarón (Tomado de Okumura, 2004). HIOM: hormona inhibidora del órgano mandibular; HA: hormona de la glándula androgénica; MF: metil farnesoato.

Aparato reproductor masculino

De acuerdo a L. Chin *et al.*, 1982 (citado en: Charniaux-Cotton y Payen, 1985), Bell y Lighner (1988), Treece y Yates (1988), y a Dall *et al.*, (1990), el aparato reproductor masculino en peneidos consiste en un par de testículos, cada uno con seis lóbulos laterales localizados en la región cardiaca, dorsalmente al hepatopáncreas (Figura 2). Los vasos deferentes se prolongan dorsalmente desde el extremo de cada uno de los dos lóbulos testiculares y continúan lateralmente en una dirección dorso-ventral hasta llegar a las aberturas ventrales en el exterior (Treece y Yates 1988; Dall *et al.*, 1990). Cada vaso deferente presenta una porción proximal corta y estrecha, que empieza a ensancharse formando los vasos deferentes medios, los cuales se pliegan a la mitad de su longitud formando una “U” (Treece y Yates 1988), también llamado vaso deferente “herradura” (Charniaux-Cotton y Payen, 1985; Dall *et al.*, 1990). La parte distal del vaso deferente medio se estrecha nuevamente formando un tubo continuo y agudo llamado vaso deferente distal, el cual llega hasta el ámpula terminal (Treece y Yates 1988; Dall *et al.*, 1990). Como se muestra en la figura 3, según Charniaux-Cotton y Payen (1985), la glándula androgénica en decápodos se adhiere a la región sub-terminal eyaculatoria de los vasos deferentes. Esto quiere decir que la glándula androgénica en peneidos se encuentra en la parte distal de cada uno de los vasos deferentes medios eyaculatorios, en donde se empiezan a estrechar, antes de que comiencen los vasos deferentes distales.

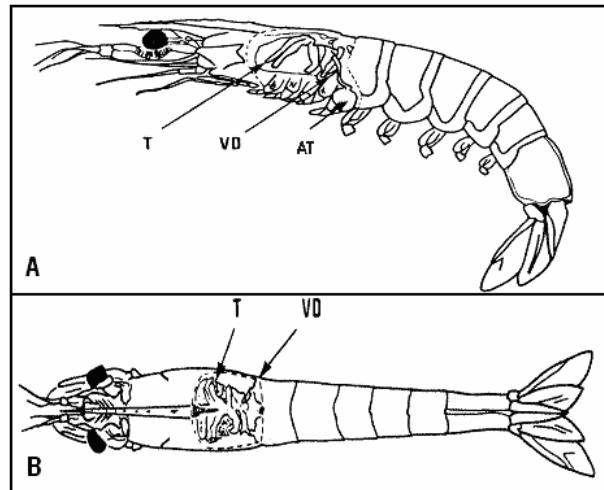


Figura 2. Aparato reproductor masculino: (T) Testículos; (VD) Vasos deferentes; (AT) Ámpula terminal (Tomado de Treece y Yates, 1988).

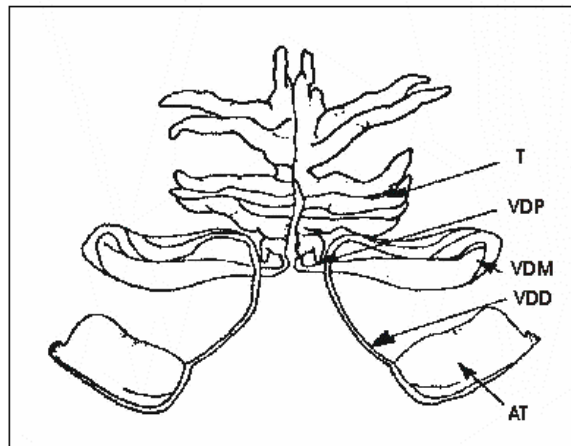


Figura 3. Aparato reproductor masculino: (T) Testículos; (VDP) Vasos deferentes posteriores; (VDM) Vasos deferentes medios; (VDD) Vasos deferentes distales; (AT) Ámpula terminal (Modificada de Treece y Yates, 1988).

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la determinación y diferenciación del sexo en peneidos es prácticamente inexistente. Su implicación tanto en investigación básica así como su aplicación en el caso de camarones cultivados (cultivo monosexual) ha sido mencionado en Congresos Internacionales y foros, sin embargo, muy poco se ha investigado en este campo. En 1989, Malecha y Hedgecock enfatizaron en que las hembras crecen más rápido que los machos en los langostinos de agua dulce y camarones marinos comerciales, y también en la potencialidad de la fertilización externa para manipulación cromosómica, domesticación y crianza del camarón marino.

El cultivo de camarón blanco tiende a intensificarse y a obtener mejores tallas de cosecha a través de programas de mejora genética, lo que implicaría que el cultivo monosexual de hembras podría ser una estrategia para obtener una mayor calidad del producto. Sin embargo, la determinación del sexo y la reversión sexual en peneidos se ha estudiado en muy pocas especies y con poca profundidad en la investigación.

ANTECEDENTES

Como ya se ha presentado en la introducción, existe una gran complejidad en cuanto a la determinación y diferenciación sexual en malacostracos. Por un lado, existe una determinación sexual primaria cromosómica, con especies que presentan tanto sistemas XX/XY y WZ/ZZ, aunado a la posible presencia genes en autosomas que pueden influir en la determinación del sexo. Dentro de esta determinación sexual, muchas especies presentan también determinación sexual medioambiental, la cual puede anular la deteminación sexual primaria. En este punto, se encontró como antecedente único que Pérez Farfante y Robertson (1992) encontraron dos hermafroditas de *L. vannamei* dentro de la cuarta generación de un cultivo de camarón en una granja camaronera en Venezuela, sugiriendo que el hermafroditismo observado se debió posiblemente a las condiciones del cultivo en cautiverio.

Es bien sabido que la temperatura modula el crecimiento en los camarones. Para trabajos futuros en determinación y diferenciación sexual de camarón, se necesitará determinar el sexo en etapas juveniles tempranas. Las características sexuales secundarias en los camarones juveniles se van adquiriendo a través de las mudas, hasta que se forman los caracteres sexuales externos y la diferenciación de la gónada en ovario o testículo. La forma más fácil para definir el sexo de un camarón es determinando la presencia o ausencia de la modificación del endopodito, el petasma masculino, en el primer par de pleópodos que se desarrolla desde las primeras etapas juveniles (postlarva). Sin embargo, para poder observar esto, el camarón debe ser sexado después de por lo menos cuatro meses (Pérez-

Rostro & Ibarra 2003a). Se desconoce si la diferenciación sexual en camarón es dependiente del tamaño o de la edad.

No existe información de cuando (tamaño o edad) y de cómo sexar poslarvas juveniles de *L. vannamei*. El único antecedente al respecto es el reportado por Charniaux-Cotton y Payen (1985), en donde mencionan un dimorfismo en el protopodito del primer par de pleópodos, y el de Nakamura *et al.* (1992) en donde menciona que la diferenciación externa ocurre a partir del día 55 como postlarva, bajo la observación de un dimorfismo en tamaño del endopodito del primer par de pleópodos, ambos trabajos realizados en *P. japonicus*.

Posiblemente la complejidad en la determinación sexual y diferenciación sexual en crustáceos y en particular en los malacostracos (isópodos, anfípodos y decápodos) en donde se presenta la glándula androgénica, la cual define el sexo de los individuos a macho, ha dado pauta a tan pocos estudios en peneidos. Payen (citado en Charniaux-Cotton y Payen, 1985) mostró las primeras imágenes de la glándula androgénica en un peneido marino *Penaeus kerathurus* Forskäl. Siete años después, Nakamura *et al.* (1992) estudiaron la organogénesis de las gónadas y de la glándula androgénica en el camarón kuruma *P. japonicus*. Estos autores describieron a la glándula androgénica como una masa celular en la superficie distal de la pared del bulbo eyaculador. Los trabajos de Payen y Nakamura, coinciden en la localización de la glándula androgénica en peneidos. Estas observaciones coinciden también con la localización de la glándula androgénica en *F. chinensis* encontrada por Li y Li (1993), y subsecuentemente por Li y Xiang (1997). También existe un reporte en *L. vannamei* y *L. stylirostris*, en donde se menciona que la glándula androgénica se encuentra en la parte proximal del ápplula terminal y se continúa al vaso

deferente distal (Alfaro, 1994), descripción que no coincide con las anteriores. Desde entonces, no hay más reportes de la presencia de la glándula androgénica en alguna otra especie de peneido. Es decir, solamente en cinco especies de camarones comerciales se ha observado esta glándula.

En la introducción ya se describieron los efectos de reversión sexual en la andrectomía en machos y de la implantación de la glándula androgénica en hembras en anfípodos, isópodos y decápodos de agua dulce. Sobre este tema sólo existe un ensayo preliminar de andrectomía en *F chinensis* (Li y Xiang, 1997), en donde sólo fue posible observar una falta de desarrollo estructural en el petasma.

Solamente se encuentran tres secuencias nucleótidas de la hormona peptídica de la glándula androgénica en tres especies de isópodos y una reciente en una langosta de agua dulce (Gene Bank). La secuencia comparada entre dos de los isópodos más estudiados, no está conservada ya que difieren en cerca de un 30 % y dichas secuencias son completamente distintas a la del decápodo. Es de esperarse que las secuencias de la GA haya evolucionado y transformado distintamente en los diferentes taxones de malacostracos y que las secuencias sean muy distintas entre sí. La única secuencia en la langosta de agua dulce posiblemente esté muy lejana a la de los peneidos, en donde no existe nada publicado. Es decir, no hay trabajos en que hayan intentado caracterizar esta hormona en algún otro malacostraco, a partir del análisis de ARN, o del perfil de aminoácidos de dicha glándula. Como ya se ha mencionado anteriormente, la ablación del tallo ocular en langostinos causa hipertrofia en la glándula androgénica, indicando que la glándula sinoideal controla e inhibe la secreción de la glándula. No existe ningún antecedente sobre esto en peneidos.

HIPOTESIS DE TRABAJO

- 1) “Los factores medioambientales comúnmente utilizados durante la pre-engorda no afectan la proporción de sexos en camarón blanco”.
- 2) “La diferenciación externa del camarón blanco es dependiente del tamaño del individuo y no de la edad (días como postlarva) del mismo”
- 3) “La diferenciación sexual externa en camarón blanco debe de ocurrir durante el segundo mes como postlarva, sobre la base del dimorfismo sexual de estructuras reproductivas de la especie”
- 4) “La glándula androgénica se debe de encontrar en la parte distal de los vasos deferentes medios eyaculadores de machos de camarón blanco”
- 5) “La glándula androgénica no tiene un efecto de reversión sexual en camarón blanco pre-adulto, ya sea por andrectomía en machos o implantación muscular de una glándula androgénica en hembras”.
- 6) “La expresión de genes en el tejido correspondiente al vaso deferente-glándula androgénica es diferente entre machos ablacionados y no ablacionados, por lo que la glándula del seno debe de ejercer un control sobre la expresión de la glándula androgénica”.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar estudios de determinación medioambiental en cautiverio y diferenciación sexual en el camarón blanco del Pacífico *L.vannamei* e identificar y analizar el papel de la glándula androgénica en la diferenciación sexual de esta especie.

Objetivos particulares:

- 1) Evaluar la temperatura, fotoperíodo, alta densidad e inanición como factores medioambientales en cautiverio que influyan en la determinación sexual del camarón blanco.
- 2) Describir el proceso morfológico de la diferenciación sexual externa a través de la identificación y desarrollo de las estructuras reproductivas, utilizando tres temperaturas.
- 3) Determinar si la diferenciación sexual en camarón es dependiente del tamaño o de la edad del individuo.
- 4) Determinar cuándo y cómo es posible sexar una postlarva de camarón blanco.

- 5) Localizar e identificar la glándula androgénica en esta especie por técnicas de histología y por microscopía electrónica de barrido.

- 6) Analizar el efecto de la andrectomía en machos sobre las estructuras reproductivas externas y el testículo.

- 7) Analizar el efecto de la implantación muscular de un conducto deferente en hembras sobre las estructuras reproductivas externas y el ovario.

- 8) Analizar cualitativamente la expresión de genes provenientes del conducto deferente-glándula androgénica entre machos ablacionados y no ablacionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Camarones experimentales

La postlarva 1 (pl-1) fue donada por el laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR. Los camarones de tamaño de cosecha (peso corporal: 15-18g), se obtuvieron de los estanques de mareas en las instalaciones del CIBNOR.

Condiciones generales de crianza y régimen alimenticio

Los camarones fueron criados en agua de mar filtrada con una salinidad de entre 34-38 ups, manteniendo la temperatura del agua entre 27 y 28°C con calentadores sumergibles de 300W dentro de tanques rectangulares de 300L y ovalados de 1000L, provistos con aeración, y con un recambio de agua del 50%, hecho tres veces por semana.

A excepción del ensayo de inanición, la alimentación de las postlarvas, de pl-1 hasta pl-20 consistió de nauplios de *Artemia franciscana* Kellogg y microencapsulado comercial (250-500µm), después se fue sustituyendo por artemia adulta, viva o congelada, y el microencapsulado se cambió por hojuelas de artemia y por alimento peletizado comercial triturado.

Determinación sexual medioambiental

Efecto de la temperatura sobre la proporción de sexos

El ensayo se llevó a cabo con tres repeticiones por cada temperatura, desde pl-1 hasta pl-90 (90 días). Se utilizaron dos temperaturas: $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (control) y $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$, las cuales se mantuvieron utilizando calentadores sumergibles de 300W. Las postlarvas se aclimataron a la temperatura alta durante dos días. Se utilizaron tinas rectangulares de 300L con una densidad de 250 postlarvas en cada unidad experimental. También se evaluó una tercera temperatura de $18 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, la cual se realizó en un cuarto cerrado con temperatura controlada por aire acondicionado automático. En este caso, alrededor de 1200 postlarvas se aclimataron a la temperatura baja durante dos días y se criaron por 60 días en una tina ovalada de 1000L de capacidad. Dado que los camarones no crecieron y que la supervivencia fue del 25%, después de 60 días, los camarones que sobrevivieron se separaron al azar en tres tinas rectangulares y la temperatura se incrementó a $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en el transcurso de una semana hasta observar el proceso de la diferenciación sexual.

Efecto del fotoperíodo en la proporción de sexos

Los efectos de luz continua, sombreado y oscuridad sobre la proporción de sexos se evaluaron después de criar postlarva por triplicado durante dos meses a una temperatura de $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Tres tinas rectangulares de 300L se acondicionaron con dos lámparas fluorescentes de 40W en la parte superior de las mismas, para proveer a los camarones de

luz artificial continua (considerado como control). Tres tinas cubiertas con doble malla mosquitera proveyeron a los camarones un sombreado continuo, y tres tinas adentro de un cuarto oscuro o cubiertas con un plástico negro, proveyeron a los camarones de oscuridad continua. Se mantuvo una densidad de alrededor de 70 camarones por cada repetición.

Efecto de alta densidad en la proporción de sexos

Se criaron alrededor de 3000 pl-1 en un tanque de concreto de 500L por dos meses a una temperatura de $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. En este ensayo no se utilizaron repeticiones. La temperatura de $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ mencionado en el primer ensayo medioambiental de temperatura, se utilizó como el control experimental ya que los camarones provinieron de la misma muestra.

Efecto de la hambruna en la proporción de sexos

Aproximadamente 2000 pl-1 se dejaron de alimentar por 7 días en un tanque de 1000L a una temperatura de $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. El efecto se evaluó después de criar a los camarones que sobrevivieron durante dos meses. En este ensayo no se utilizaron repeticiones. La temperatura de $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ mencionado en el primer ensayo medioambiental de temperatura, se utilizó como el control experimental ya que los camarones provinieron de la misma muestra.

Sexado de camarón

El sexo de los camarones después de los tratamientos de fotoperiodo, alta densidad y hambruna se determinó utilizando el método encontrado durante la diferenciación sexual de temperatura (ver Resultados).

Análisis estadístico

La proporción de sexos de cada ensayo se evaluó utilizando la prueba Chi-cuadrada. Para justificar los datos entre las repeticiones de cada tratamiento medioambiental, se utilizó una prueba de Chi-cuadrada total (heterogeneidad) (Zar, 1996).

Evaluación de crecimiento en las tres temperaturas experimentales

Los pesos y longitudes individuales de los camarones de cada repetición ($n = 30$) de las tres temperaturas probadas se registraron cada 15 días utilizando una balanza digital y una regla en milímetros respectivamente.

Diferenciación sexual externa a tres temperaturas

A partir de pl-10, tres camarones al azar se sacrificaron cada día, de cada repetición, provenientes de cada tratamiento de temperatura. Cada camarón fue analizado individualmente para observar las siguientes estructuras sexuales: a) el desarrollo del

endopodito mediante el corte del primer par de pleópodos, b) el desarrollo del apéndice masculino mediante el corte del segundo par de pleópodos, c) el desarrollo de las aberturas genitales del macho localizadas en la región media de la coxa del quinto par de pereiópodos, y d) el par de cuñas filosas y oblicuas que se encuentran en la parte anterior del esternito XIV en el tético de la hembra. Estas estructuras se pueden consultar en Pérez Farfante (1988), Treece y Yates (1988), y Dall *et al.* (1990).

Observación de gónadas

Para confirmar que la identificación morfológica temprana del sexo debe de concordar con la diferenciación sexual de la gónada, se seleccionaron 6 hembras y 6 machos al azar de cada temperatura, que fueron previamente sexados al día 60. Se separaron por sexo y se criaron por 4 meses mas a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los camarones se fijaron en solución de Davidson por 24 horas, para después colocarlos en etanol al 70% hasta procesarlos a través de la técnica histológica de hematoxilina y eosina (Bell y Lightner, 1988).

Morfología del endopodito

Adicionalmente, se comparó el endopodito sexual del primer par de pleópodos en hembra y macho de camarones sexados al día 55, con la morfología del endopodito de 100 camarones pre-adultos entre 15 y 18 g de peso.

Descripción de la glándula androgénica en *L. vannamei* con base en histología y en microscopía electrónica de barrido

Se disectaron ambos vasos deferentes de 6 machos pre-adultos (15-18 g) en donde en cada vaso está adherida la glándula androgénica. Este procedimiento fue hecho inicialmente presionando suavemente con el dedo la coxa del primer periópodo hasta que salió el espermátóforo del gonoporo del macho. Posteriormente, se tomó el ámpula terminal con unas pinzas de disección y se jaló cuidadosamente para sacar el vaso deferente distal y la mitad del vaso deferente medio (la mitad de la estructura “herradura”). Se fijaron 6 vasos deferentes en formalina al 4% para después procesarlos en la técnica histológica de hematoxilina y eosina (Bell y Lightner, 1988). Los otros 6 vasos deferentes se utilizaron para microscopía electrónica de barrido los cuales fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% en buffer cacoldilato de sodio pH 7.0 por 24 horas a 4°C, seguido de dos lavados con el buffer de cacoldilato de sodio por 30 minutos cada uno, para después deshidratarlos con etanol.

Efecto de la ablación de la glándula androgénica sobre la morfología sexual externa y en testículo

Se andrectomizaron bilateralmente 12 machos (15-18g) y se colocaron en tanques rectangulares de 40L, llenados con agua marina filtrada y aireada, a una temperatura de 24-25°C. A lo largo de 6 meses, los individuos se observaron cada mes con el objeto de observar modificaciones de las estructuras reproductoras externas: petasma, apéndice

masculino y gonoporos, así como definir alguna presencia de télico de hembra. Al término de este tiempo, 6 camarones al azar se procesaron histológicamente para la observación de gónadas.

Efecto de la implantación muscular de un conducto deferente sobre la morfología sexual externa y en ovario

Se implantaron individualmente 12 hembras (15-18g), cada una con un conducto deferente conteniendo la glándula androgénica y manteniéndolas de forma similar que los machos. A cada hembra, se le hizo una incisión en un lado del primer segmento abdominal, con una longitud aproximada de 5mm y con 5mm de profundidad. Se les insertó un vaso deferente fresco (sin la ámpula terminal) en la incisión abdominal, e inmediatamente se les colocó un pedazo de papel mojado con pegamento comercial de cianocrilato. Se reintegraron las hembras a los tanques, y el papel se despegó dos días después, permitiéndole la cicatrización de la herida. Después de varios días se pudo observar el conducto deferente dentro del segmento abdominal, colocando la hembra en contra de la luz. A lo largo de 6 meses, los individuos se observaron cada mes con el objeto de observar modificaciones de las estructuras reproductoras externas: endopodito y télico, así como definir alguna presencia de petasma, apéndice masculino y gonoporos de macho. Al término de este tiempo, 6 camarones al azar se procesaron histológicamente para la observación de gónadas.

Análisis cualitativo de la expresión de genes entre machos ablacionados y no ablacionados

Extracción y aislamiento de ARN proveniente de conductos deferentes-glándula androgénica

Después de 30 días subsecuentes a la ablación de camarones, se sacrificaron dos camarones ablacionados y dos no ablacionados y en cada uno se disectaron ambos conductos deferentes. También se disectó tejido de testículo y hepatopáncreas de uno de los camarones no ablacionados. Para ambos conductos deferentes de cada camarón, se hizo un corte entre la región subterminal del bulbo eyaculador y el primer tercio del conducto deferente distal, que es donde la GA se encuentra adherida. El segundo corte se realizó en la parte media de los conductos deferentes, en donde no se observó la GA por histología y microscopía de barrido. Cada tejido se introdujo en un tubo Eppendorf de 1.5ml e inmediatamente se añadieron 0.8ml de la solución TriPure (Roche) y 0.5 μ l de glicógeno y se homogenizaron mecánicamente. Las muestras se incubaron por 5 minutos a una temperatura ambiente para disociar los complejos núcleo-protéicos. Posteriormente se añadieron 160 μ l de cloroformo, se agitaron por 15 segundos y se volvieron a incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12,000g por 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron tres fases: una acuosa incolora, la cual contenía el ARN, una interfase blanca con ADN y por último una fase orgánica roja con proteínas.

La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con 0.8 μ l de etanol absoluto, se mezcló por inmersión y se incubaron por 20min a -20°C. Posteriormente se

centrifugó a 12,000g por 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. El botón de centrifugación se limpió con 800µl de EtOH al 75%. Se centrifugó a 7,500g por 5 minutos a 4°C y se volvió a desechar el sobrenadante. El botón se lavó nuevamente con 800µl de EtOH al 75% y se centrifugó otra vez a 7,500g por 5 minutos a 4°C volviendo a desechar el sobrenadante. El botón se dejó secar y se resuspendió con agua libre de ARNsas, con 50µl para la muestra de vaso deferente (VD) y con 20µl para la muestra de GA. Se incubaron las muestras por 10 minutos a 60°C y se almacenaron a -70°C.

De esta manera se obtuvieron un total de 8 muestras de ARN: 4 muestras de camarones ablacionados, de las cuales 2 fueron de VD (dos camarones) y 2 de GA (dos camarones). De igual forma para las otras 4 muestras, con la diferencia que provienen de camarones no ablacionados.

Cuantificación y análisis cualitativo de ARN total

El ARN total de cada muestra se cuantificó en un espectrofotómetro (Smart Spek 3000 BIORAD) y se realizó un análisis cualitativo de ARN a través de una electroforesis con TBE- cualitativo (Figura 4). Se mezclaron 4.5µl de ARN (3µg), 2µl de RB 5X(26g de MOPS, 16.6ml de acetato de amonio 3M, 783.3ml de agua DPC, pH 7.0 ajustado con NaOH 2N y se agregó 10ml de EDTA 0.5 M pH 8.0), 3.5µl de formaldehído, 4µl de LBARN (1mM ETA pH 8.0, glicerol 50%, 0.25% xilene cianol, 0.25% azul de bromofenol) y 10µl de formamida. Después se calentó por 10min a 95°C y se enfrió en

hielo, para después adicionarle 1µl de EtBr 10mM, dándole un pulso en la microcentrífuga, para después cargar las muestras en el gel de agarosa al 1 %.

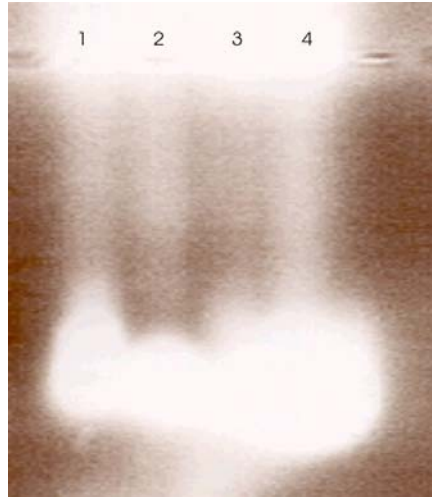


Figura 4. Electroforesis de ARN evaluado cualitativamente en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: conducto deferente; Carril 2: Testículo; Carril 3: Conducto deferente-Glándula androgénica y Carril 4: hepatopáncreas.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

A partir de las muestras de ARN aislado se sintetizó ADNc siguiendo el protocolo del Sistema de Transcripción Reversa (Promega). Con previa dilución de la concentración de ARN obtenido anteriormente, se colocó una alícuota de 1µl de ARN total (equivalente a aproximadamente 5µg), en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml y se incubó a 70°C por 10 minutos. Se le dió un pulso en la centrífuga y se dejó en hielo. Se preparó una reacción de 20 µl con los siguientes componentes mostrados en la Tabla I.

Tabla I. Componentes para la reacción de síntesis de ADNc.

Componentes	Cantidad
MgCl ₂ , 25mM	4μl
10X Buffer de Transcripción en Reversa	2μl
Mezcla de dNTP, 10mM	2μl
Inhibidor de Ribonucleasa Recombinante RNasin®	0.5μl
Transcriptasa Reversa AMV (Alta Conc.)	1μl (equivalente a 15u)
Hexámeros al azar <u>Q</u> Primer Oligo(dT) ₁₅	1μ (equivalente al 0.5μg)
ARN total <u>Q</u> Control positivo ARN 1.2kb Kanamycina.	1μl (5μg ARN Total, o control positivo)
Agua libre de Nucleasa a un volumen final	20μl

La reacción con hexámeros al azar se incubó a temperatura ambiente por 10min y posteriormente se incubó a 42°C por una hora, mientras que la reacción con el oligonucleótido (dT)₁₅, se incubó directamente a 42°C por una hora. Posteriormente las muestras se calentaron a 95°C por 5min para desactivar la enzima y se incubaron en hielo por 5min. De esta manera, se obtuvieron un total de 16 muestras; 8 provenientes de dos camarones ablacionados (VD-hexámeros = 2; VD-dT15 = 2; y AG-hexámeros = 2; AG-dT15 = 2) y las otras 8 iguales pero provenientes de dos camarones no ablacionados. Las muestras de ADNc de GA y VD, y el control de kanamicina se corrieron en un gel al 1 % de agarosa. Se obtuvieron mayoritariamente barridos de ADNc entre 500 y 1000 pares de bases aproximadamente (Figura 5).

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La amplificación de ADNc-PCR se llevó al cabo en un termociclador Techne Genius para obtener la exposición de bandeo diferencial en gel de agarosa bajo distintos procedimientos de PCR publicados y propuestos. Se diluyó el ADNc obtenido con buffer TE para obtener una concentración aproximada de 50 ng/μl por reacción. Se preparó una mezcla de 25μl por reacción para la amplificación de PCR con los siguientes componentes mostrados en la Tabla II.

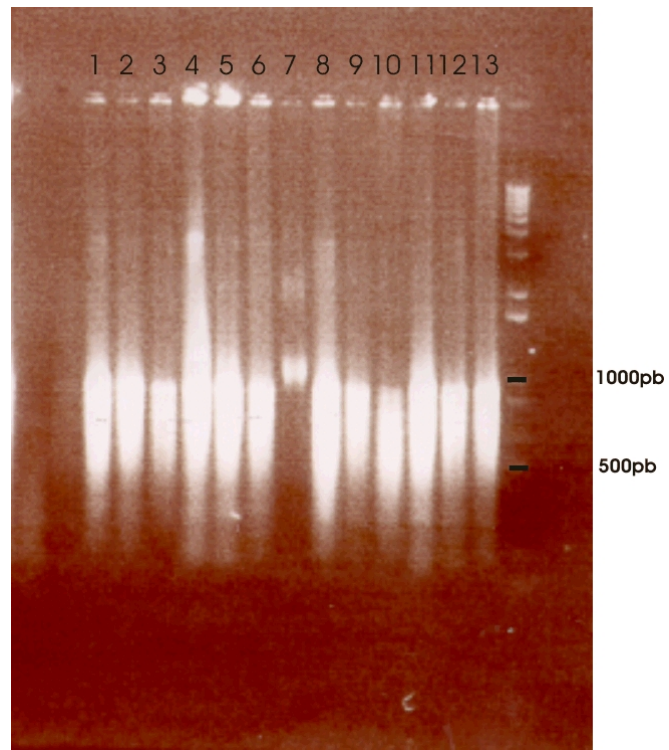


Figura 5. Barridos de ADNc obtenidos en una electroforesis en gel de agarosa al 1% a partir de VD y AG. Carriles 1-3: ADNc conteniendo la GA sintetizado con hexámeros al azar; Carriles 4-6: VD con hexámeros al azar; Carril 7: control de Kanamicina; Carriles 8-10: GA con el oligonucleótido $(dT)_{15}$; y Carriles 11-13: VD con el oligonucleótido $(dT)_{15}$.

Tabla II. Componentes para la reacción de reacción en cadena de polimerasa.

Componentes	Cantidad
ADNc	1 μ l
Mezcla de dNTP, 10mM	0.45 μ l
MgCl ₂ , 25mM	1.87 μ l
10X Buffer de Transcripción en Reversa	2.45 μ l
Oligo decámero 100 pmol	1 μ l
TaqDNA Polimerasa(c)	0.2 μ l
Agua libre de Nucleasa a un volumen final	25μl

De esta manera la concentración final de los componentes de la reacción quedaron con 2ng/ μ l de templado, 200 μ M dNTPs y 1.5mM de MgCl₂, salvo el programa 4 que utilizó el doble de dNTPs. Los productos se analizaron en gel de agarosa al 1%.

Inicialmente, el ADNc y la mezcla de PCR, se corroboró con oligonucleótidos que amplifican un segmento de la región control mitocondrial (COI) del crustáceo *Triops* (Notostraca) (Murugan *et al.*, 2002) y del gen mitocondrial 16S universal (Tabla III). Posteriormente, un total de 16 decámeros de secuencia conocida, mas tres oligonucleótidos

de 20 bases, mas uno de 9 bases, (OPERON) (Tabla III), fueron probados en la amplificación de ADNc-PCR bajo los siguientes programas enunciados. Cada programa se representa con la temperatura y el tiempo de desnaturalización inicial, el número de ciclos incluyendo las temperaturas de desnaturalización, alineamiento y de extensión, con sus respectivos tiempos, y la temperatura y tiempo de extensión final del programa.

Programa COI *Triops*:

95°C-5 min / (94°C-60 seg, 45°C-90 seg, 72°C-90 seg) X 5 / (94°C-30 seg, 50°C-45 seg, 72°C-75 seg) X 35 / 72°C-10 min. (Murugan *et al.*, 2002; Tizol-Correa, 2006).

Programa 16S:

95°C-5 min / (94°C-30 seg, 50°C-30 seg, 72°C-60 seg) X 40 / 72°C-10 min.

Programa 1:

94°C-4 min / (94°C-60 seg, 36°C-60 seg, 72°C-60 seg) X 40 / 72°C-5 min.

Programa 2:

94°C-4 min / (94°C-60 seg, 40°C-60 seg, 72°C-60 seg) X 40 / 72°C-5 min.

Los programas 1 y 2 son similares a los utilizados en el Laboratorio de Genética Molecular del CIBNOR, en la amplificación de ADN por medio de RAPDS en camarones.

Programa 3:

94°C-5 min / (94°C-30 seg, 42°C-60 seg, 72°C-30 seg) X 40 / 72°C-5 min. Este programa se basó en Liang y Pardee (1992), en donde conjuntamente con el decámero, se incluyó un oligonucleótido de anclaje VN(dT)₂₀, en donde N es dA, dC, dG, o dT y V es dA, dC, o dG, con la finalidad de que el iniciador se ancle al extremo 3' de la cola poli-A del ARN mensajero.

Programa 4:

94°C-5 min / (94°C-120 seg, 38°C-60 seg, 72°C-75 seg) X 40 / 72°C-5 min. Este programa se basó en Pienta y Schwab (2000), que es una modificación a Liang y Pardee (1992). Utiliza el doble de concentración de dNTPs.

Programa 5:

94°C-5 min / (94°C-120 seg, 36°C-60 seg, 72°C-90 seg) X 45 / 72°C-5 min.

Programa 6:

94°C-5 min / (94°C-120 seg, 30°C-60 seg, 72°C-90 seg) X 45 / 72°C-5 min.

Los programas 5 y 6 son modificaciones al propuesto por Pienta y Schwab (2000), sin el doble de dNTPs.

Programa 7:

94°C-4 min / (94°C-60 seg, 40 °C-60 seg, 72°C-60 seg) X 15; (94°C-60 seg, 55°C-60 seg, 72°C-60 seg) X 25 / 72°C-5 min. Este programa es una modificación al propuesto en el protocolo de “Delta differential display kit user manual” de CLONTECH, sin iniciador de anclaje.

Programa 8:

94°C-4 min / (94°C-60 seg, 30 °C-60 seg, 72°C-60 seg) X 8; (94°C-60 seg, 40 °C-60 seg, 72°C-60 seg) X 15; (94°C-60 seg, 55°C-60 seg, 72°C-60 seg) X 25 / 72°C-5 min. Este programa fue propuesto en este trabajo.

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de ADNc mediante la reacción en cadena de polimerasa

CLAVE	NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
22F	Avance	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO	Reversa	TGATTTTTTTGGTCACCCTGAGTTTA
16Sar	Avance	CGCCTGTTTATCAAAAACAT
16Sbr	Reversa	ACGTGATCTGAGTTCAGACCGG
A1	SV-19	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA
A2	SV-25	AAACGTCGGG
A3	SV-28	CGCGAAGGAT
A4	SV-20	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
A5	SV-22	TACCGGTGCA
A6	SV-23	GTCGCCGCA
A7	SV-24	GTAGACGAGC
A8	SV-26	ACTGACTGCC
A9	SV-27	GACTTTCGCA
A10	SV-29	CCGAAAACGC
A11	SV-30	CGACCAGAGC
A12	SV-31	ATCTGGCAGC
A13	SV-32	AGGGTTCTTG
A14	SV-33	ATGGACACCA
A15	SV-19	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA
A16	XL-1	GGGTAACGCC
A17	XL-2	GTGATCGCAG
A18	XL-3	GTTGCGATCC
A19	XL-4	GTAGACCCGT
A20	XL-5	TCCGCTCTGG
A21	XL-6	GGACCCTTAC

Obtención de imágenes digitalizadas

Se utilizó un microscopio compuesto (Olympus, BX-41) y uno de disección (Olympus, SZ-11), ambos con trinocular para integrar una cámara digital (Hitachi, KP-D50), para monitorear el desarrollo progresivo de la morfología externa sexual dependiente de la temperatura, así como del examen histológico de gónadas y glándula androgénica. Las imágenes digitalizadas se obtuvieron a través del programa Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics).

Las imágenes digitalizadas de microscopía electrónica y las medidas de las glándulas androgénicas se obtuvieron con un microscopio Hitachi S-3000N SEM, después de que las muestras se secaron a punto crítico y se cubrieron con paladio.

Las imágenes de la amplificación ADNc-PCR, se documentaron en una cámara integrada al visualizador de geles con luz ultravioleta y se digitalizaron por medio del programa UVI.

RESULTADOS

Determinación sexual medioambiental

Los ratios sexuales de los juveniles de *L. vannamei* criados bajo las diferentes condiciones medioambientales (Tabla IV), no mostraron diferencias significativas a la proporción de 1:1, macho:hembra ($P > 0.05$), inclusive cuando la baja temperatura, alta densidad y hambruna tuvieron una baja supervivencia al día 60 del 25%, 3% y 3% respectivamente.

Tabla IV. Proporción sexual de *L. vannamei* sujeta a tres temperaturas.

TEMPERATURAS	N	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS %	X ²
27 ± 1°C	80	36	44	45.0	0.80
	88	42	46	47.7	0.18
	99	47	52	47.5	0.25
Promedio	267	125	142	46.8	1.08
32 ± 1°C	75	36	39	48.0	0.12
	88	46	42	52.3	0.18
	81	38	43	46.9	0.31
Promedio	244	120	124	49.2	0.07
18 ± 0.5°C	79	36	43	45.6	0.62
	84	44	40	52.4	0.19
	67	33	34	49.3	0.01
Promedio	230	113	117	49.1	0.07

Tabla IV (continuación). Proporción sexual de *L. vannamei* sujeta a tres fotoperiodos, hambruna y alta densidad.

TEMPERATURAS	N	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS %	X²
FOTOPERIODO					
LUZ	58	28	30	48.3	0.07
	55	30	25	54.5	0.45
	61	32	29	52.5	0.15
Promedio	174	90	84	51.7	0.21
SOMBRA	60	36	24	60.0	2.40
	53	28	25	52.8	0.17
	60	26	34	43.3	1.07
Promedio	173	90	83	52.0	0.28
OSCURIDAD	58	29	29	50.0	0.00
	52	23	29	44.2	0.69
	62	32	30	51.6	0.06
Promedio	172	84	88	48.8	0.09
HAMBRUNA	59	27	32	45.8	0.42
ALTA DENSIDAD	85	49	36	57.6	1.99

Diferenciación sexual

El desarrollo del endopodito del primer par de pleópodos en los camarones de temperaturas altas y de control, empezó entre los días 24 y 28 con la aparición de una o dos setas apicales, seguido del surgimiento de una pequeña protuberancia indiferenciada (Figura 6A). Entre los días 30 y 34, apareció una estructura larga, tubular e indiferenciada, con dos setas apicales antes observadas (Figura 6B). En algunos individuos, para el día 40, esta estructura comenzó a ensancharse de un lado en la región media y proximal, tomando una forma semitriangular, parecida a una lanza; posteriormente, en los días 50-53, 3 o 4 setas aparecieron en la cresta en la región mas amplia de la estructura (Figura 7A). En el día 58, los individuos que tenían este tipo de estructura con tres setas, desarrollaron un par de cuñas filosas y oblicuas que se encuentran en la parte anterior del esternito XIV, las cuales caracterizan el télico femenino de *L. vannamei* (Figura 7B). En cambio, aquellos individuos con el apéndice tubular (Figura 7E), desarrollaron los gonoporos masculinos localizados en la coxa del quinto periópodo (Figura 7F), y el apéndice masculino en el segundo par de pleópodos (Figura 7G). Para el día 70, en el petasma o endopodito masculino se desarrolló una estructura más densa y redonda en su región distal, que originará la parte distal del lóbulo (Figura 7E). Ambos endopoditos del primer par de pleópodos fueron de una longitud similar. Alrededor de los 6 meses de edad, se realizó la histología de las gónadas revelando que aquellos individuos que tenían una estructura semitriangular con setas, al final del segundo mes como postlarva mostraban un ovario (Figura 7D). En cambio, aquellos que tuvieron un apéndice tubular, mostraron testículo (Figura 7H).

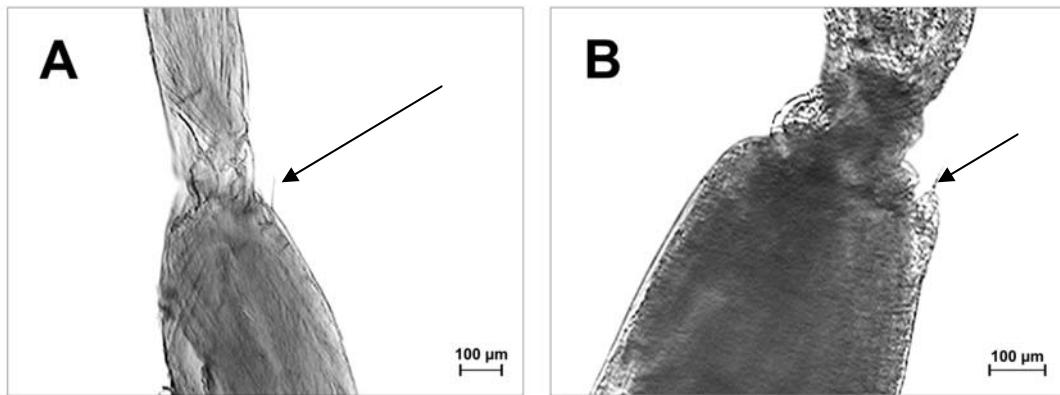
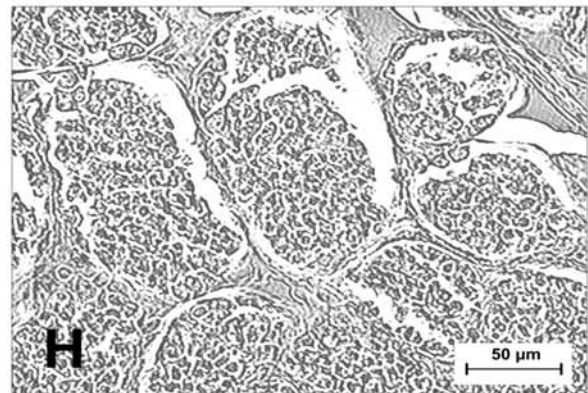
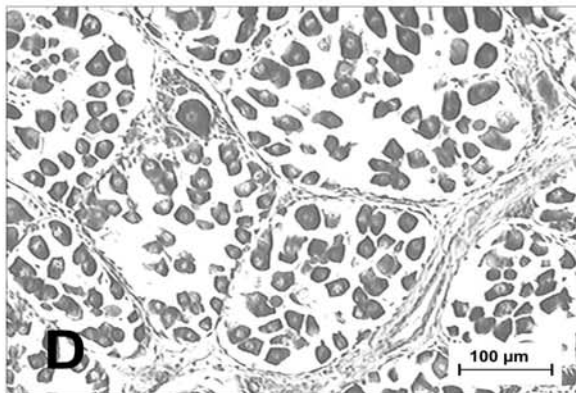
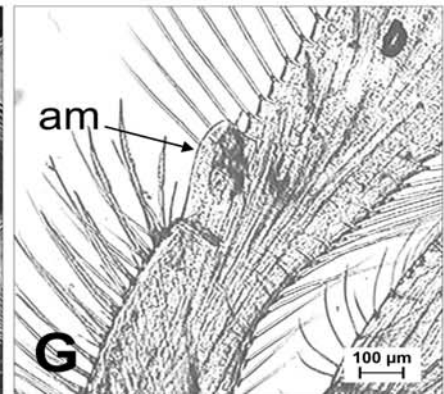
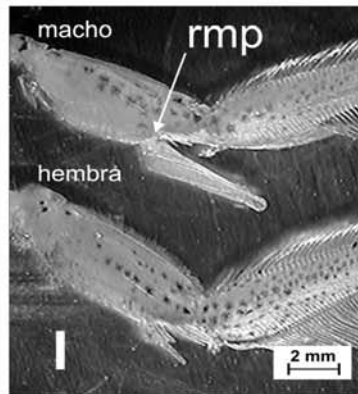
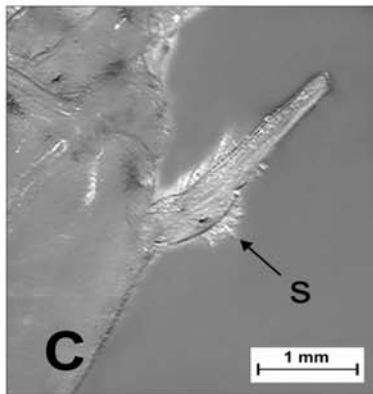
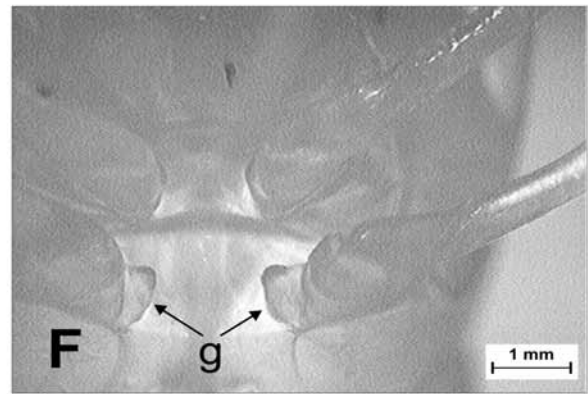
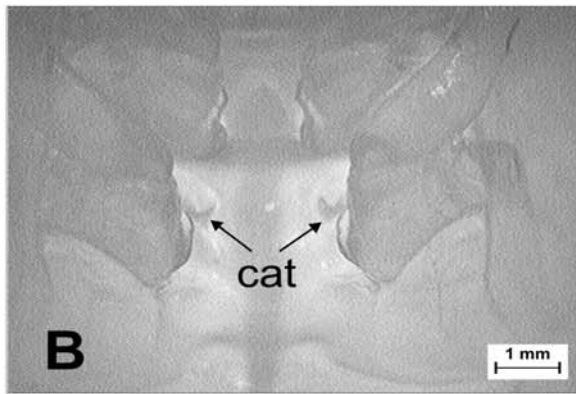
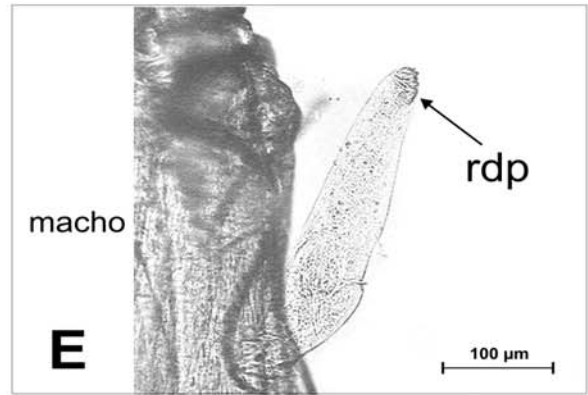
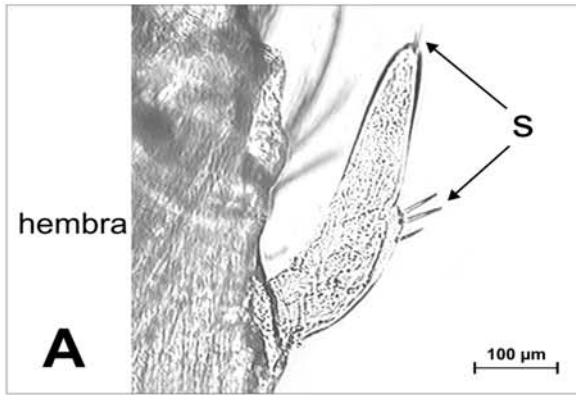


Figura 6. Inicio de la diferenciación sexual externa en *L. vannamei* entre los días 24 y 34 como postlarva. A; aparición de una o dos setas apicales (flecha). B; surgimiento de una pequeña protuberancia indiferenciada (flecha).

Figura 7. (siguiente página) Características sexuales externas e internas en *L. vannamei*. A-D, hembras; E-H, machos; I, protopodito masculino y femenino. (s) setas; (rdp) región densa del petasma; (cat) crestas afiladas del télico; (g) gonoporos; (rmp) región de la muesca del petasma; (am) apéndice masculino.



El endopódito femenino recién diferenciado tuvo una morfología similar al de las hembras preadultas (Figura 7C), mientras que el endopodito masculino recién diferenciado continuó desarrollándose durante su etapa juvenil hasta convertirse en el petasma. En ambos especímenes, preadultos y de 90 días de edad, el protopodito masculino del primer par de pleópodos presentó una articulación rectangular cortada en la región distal, la cual caracteriza el sexo masculino, ausente en las hembras (Figura 7I).

Diferenciación de las características sexuales externas en diferentes condiciones de temperatura

El crecimiento de los camarones tuvo una diferencia notable entre los controles (8.6mg/día) y los de alta temperatura (17mg/día). Sin embargo, la diferenciación de las características sexuales externas tuvo lugar durante un periodo similar, de pl-25 a pl-60, después de que el juvenil alcanzó un peso corporal de 150-200mg con una longitud de 20-25mm, como se esquematiza en la Figura 8. En los camarones tratados con una baja temperatura (18°C), se inhibió el crecimiento postlarval, retrasando la diferenciación sexual en la edad. No obstante, después de que se incrementó la temperatura a 27°C, a partir del día 61, aparecieron las estructuras de diferenciación sexual, en el orden que se describió anteriormente.

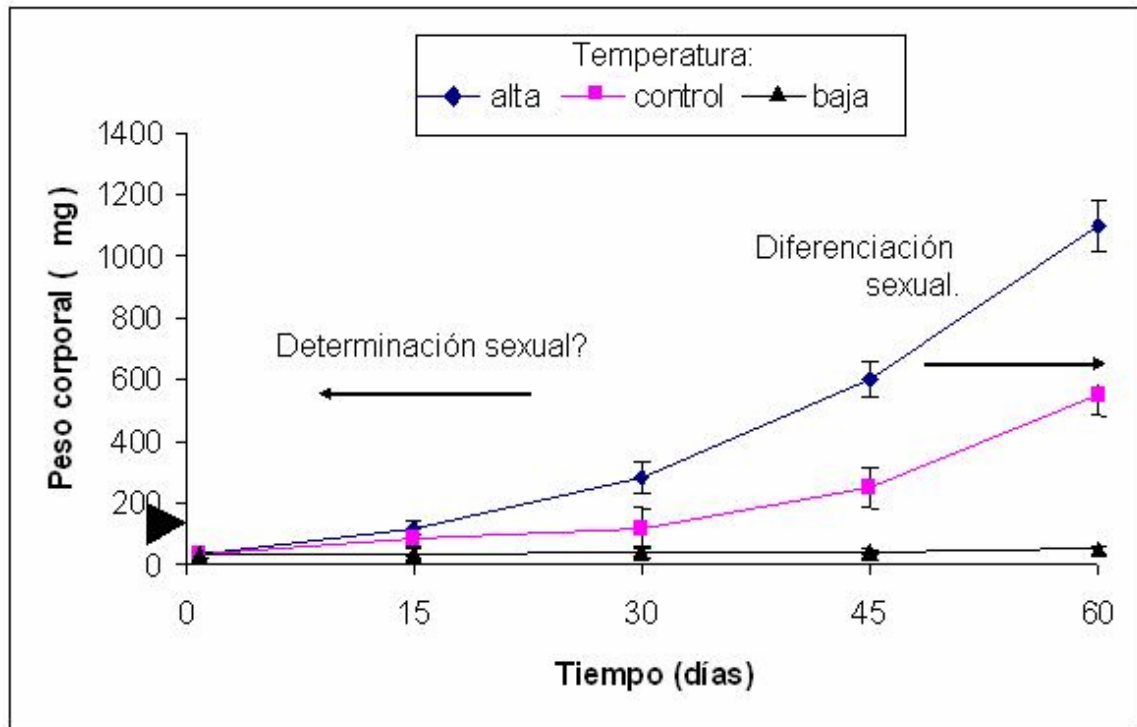


Figura 8. Crecimiento de *L. vannamei* a tres temperaturas distintas mostrando el tiempo en que se presenta la diferenciación sexual externa. La flecha en la parte inferior izquierda indica un peso mínimo aproximado para que prosiga la diferenciación sexual, de otra manera ésta no se presenta.

Descripción de la glándula androgénica a través de histología y microscopía electrónica de barrido

La histología de los vasos deferentes reveló que la glándula androgénica de *L vannamei* se encuentra pegada en la parte distal de los vasos deferentes medios (la región eyaculatoria subterminal), antes de que se adelgacen y lleguen a los vasos deferentes distales. La glándula androgénica tiene una forma tubular con una longitud aproximada de 2.5mm y alrededor de 100µm de grosor (Figura 9). Es una masa celular compacta paralela a los vasos deferentes y conectada al tejido muscular a través de una capa epitelial (Figura 10). Esta masas celular claramente distinguible, esta compuesta por grandes células ovaladas en las cuales el citoplasma parece vacuolado, y en cada célula existe un núcleo prominente y semi-redondo (Figura 11).

Las imágenes con el microscopio electrónico en los conductos deferentes de *L. vannamei*, mostraron que la glándula androgénica es una estructura parecida a un cordón que se encuentra pegado en la parte distal del bulbo eyaculador, en el cual se ramifica en sus extremos como pequeños cordones (Figura 12, 13 y 14).

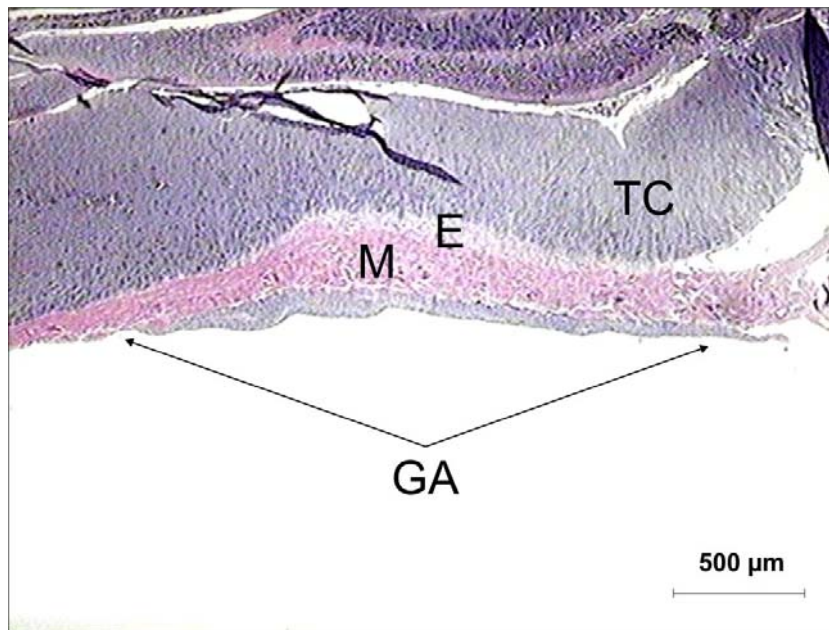


Figura 9. Morfología histológica de la glándula androgénica (GA) en *L. vannamei*. M; músculo, E; epitelio, TC; tejido conectivo.

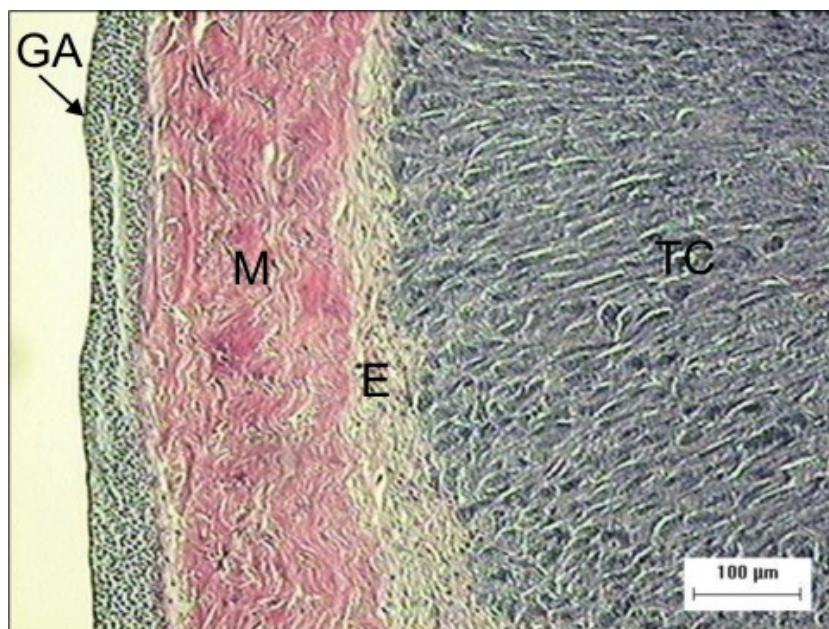


Figura 10. Detalle de la masa celular compacta de la glándula androgénica (GA) paralela a los vasos deferentes y conectada al tejido muscular (M) a través de una capa epitelial (E).

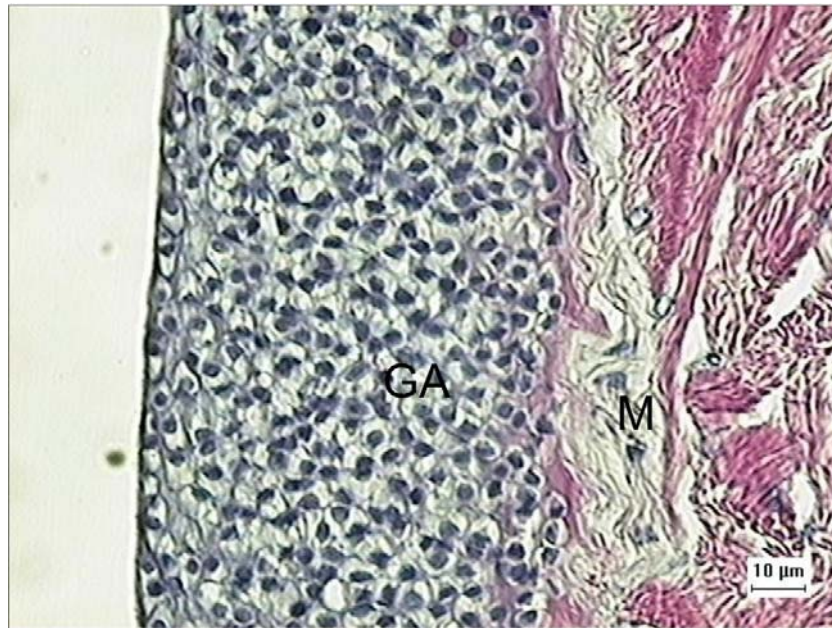


Figura 11. Detalle de células ovaladas en las cuales el citoplasma parece vacuolado y la presencia de un núcleo prominente y semi-redondo

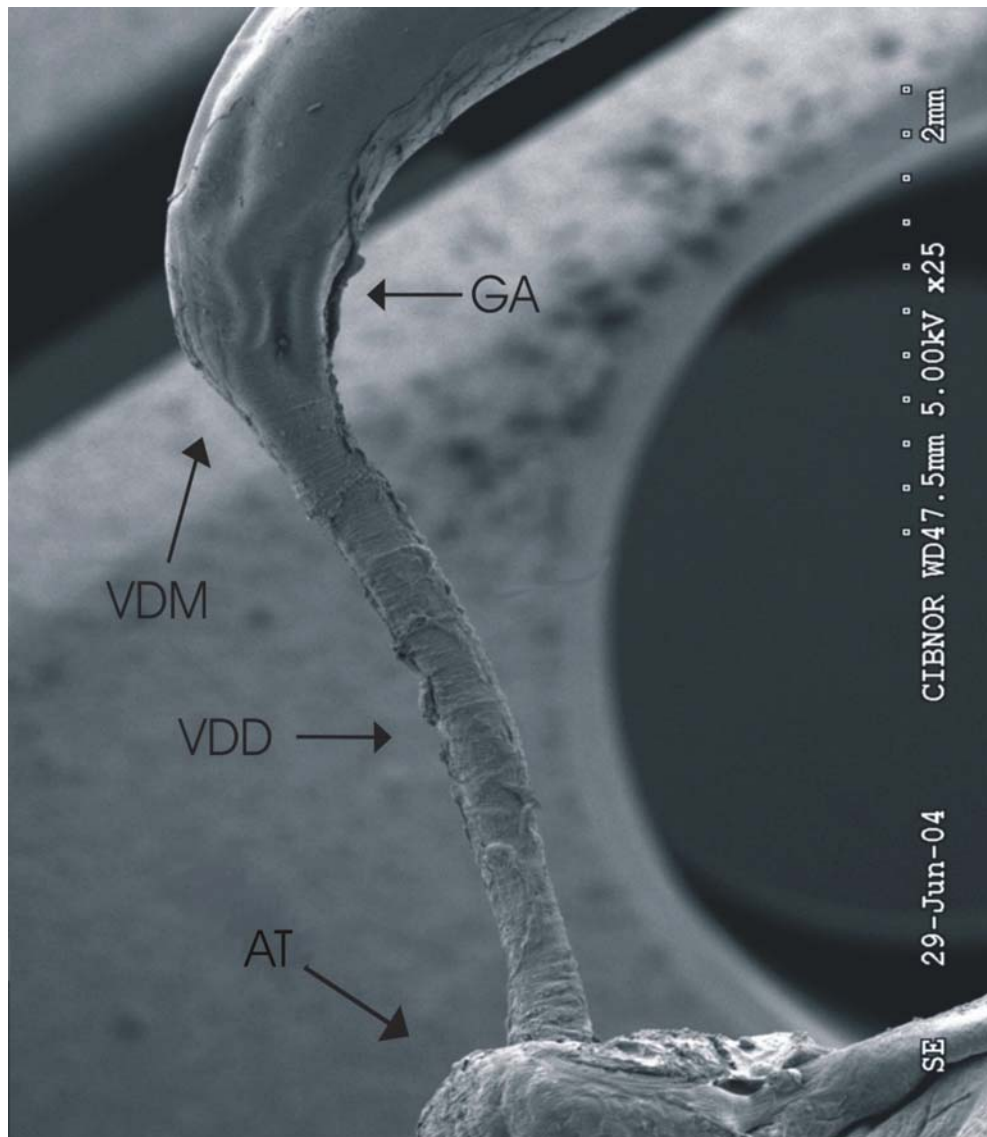


Figura 12. Conducto deferente de *L. vannamei* mostrando la glándula androgénica (GA) como un cordón adherido en la parte distal del bulbo eyaculador. VDM; vaso deferente medio, VDD; vaso deferente distal, AT; ámpula terminal.

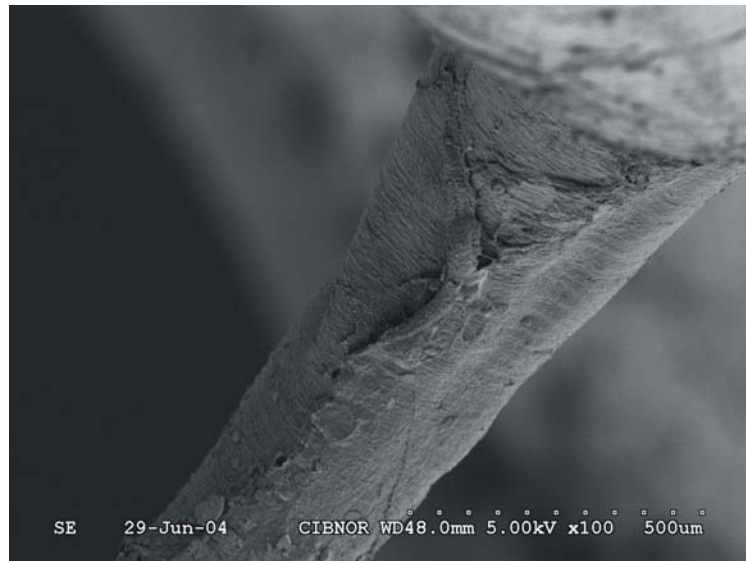


Figura 13. Detalle del “cordón” adherido al conducto deferente de *L. vannamei* mostrando la supuesta glándula androgénica (GA).

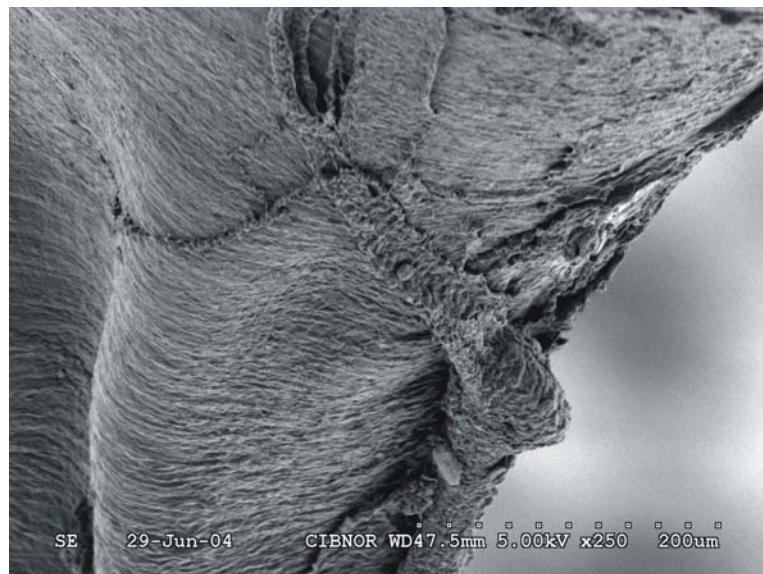


Figura 14. Detalle de la supuesta glándula androgénica (GA) adherida al conducto deferente de *L. vannamei* en donde se observa la ramificación en sus extremos en cordones pequeños.

Expresión de genes entre camarones ablacionados y no ablacionados

De los 21 oligonucleótidos utilizados se lograron 5 amplificaciones pertenecientes a los iniciadores A3, A4, A6, A15 y A17, los cuales fueron amplificados utilizando los programas 6, 8, 4, 8 y 8 respectivamente. En cada una de las figuras que se presentan a continuación, la parte superior correspondió a camarones ablacionados, mientras que la inferior a camarones no ablacionados. Dentro de cada una de éstas, se observan 8 carriles, los dos primeros corresponden a vaso deferente (VD), cuya síntesis de ADNc fue con hexámeros y se abrevian como HVD (carriles 1 y 2), en donde el carril 1 corresponde a un camarón y el carril 2 a otro camarón (2 repeticiones); Vaso deferente-Glándula androgénica (GA) con hexámeros (carriles 3 y 4), que se abrevian HGA; VD, cuya síntesis fue con el oligonucleótido dT₁₅ (carriles 5 y 6), que se abrevian dTVD; y GA con dT₁₅ (carriles 7 y 8), que se abrevian dTGA.

En teoría, se espera que partiéndose de la síntesis de ADNc mediante hexámeros al azar, los oligonucleótidos utilizados amplifiquen regiones más cercanas al extremo 5' del ADNc, mientras aquellas sintetizadas mediante el dT₁₅, amplifiquen regiones más cercanas al extremo 3' del ADNc. De esta manera, los resultados no se comparan entre hexámeros y dT₁₅, dentro de cada uno de los dos tipos de camarones, sino que las comparaciones se hacen entre VD y GA (dentro de cada tipo de camarón) y en VD y GA, entre los dos tipos de camarones.

Con lo anterior, en la Figura 15 se observa la amplificación del oligonucleótido A3 (10 pares de bases (pb)), en donde se aprecian dos productos ausentes en camarones ablacionados (dTVD), mientras que en ambos tipos de camarones se presentan las bandas

en al menos una de las repeticiones, por lo que no se pudo discernir alguna diferencia entre los dos tipos de camarones. En la Figura 16 se observa la amplificación del oligonucleótido A4 (20 pb), en donde se observan barridos con alguna definición de productos en donde no se pudo diferenciar entre los dos tipos de camarones. En la Figura 17 se observa la amplificación del oligonucleótido A6 (9 pb), en donde se presenta un producto cercano a las 600 pb presente en 5 carriles de los camarones ablacionados que incluyen tanto a VD como la GA y que en los camarones no ablacionados, se presenta en HGA y dTVA, lo cual permite diferenciar los dos tipos de camarones y adicionalmente sugiere que dichos productos provienen del tejido de VD y del tejido VD, en donde la AG está adherida. En la Figura 18 se observa la amplificación del oligonucleótido A15 (20 pb), en donde se observó claramente una diferencia entre los dos tipos de camarones, la escasez de productos en los camarones ablacionados en comparación con los no ablacionados. Más interesante, se observa que los productos en los camarones ablacionados provienen del VD. Sin embargo, productos al parecer específicos de la GA, provenientes de camarones normales, se presentan en HGA (en las dos repeticiones) y posiblemente en dTGA. En HGA, se identifican dos productos que no se comparten con aquellos visualizados por VD. Los dos productos son diferentes entre sí, uno fue de 800 pb aproximadamente, mientras que el segundo y de gran intensidad fue de 1300 pb aproximadamente. En la Figura 19 se observa la amplificación del oligonucleótido A17 (10 pb), en donde se observan de 2 a 4 productos entre los dos tipos de camarones, de los cuales, un producto entre 500 y 600 pb, se hace muy notorio en una sola repetición en los camarones ablacionados amplificados por HVD y dTVD, y un producto en camarones normales de aproximadamente 700 pb, en una sola

repetición de dTVD, lo que sugiere que dichos productos provienen del VD y no de la GA, por lo que no se pudo discernir alguna diferencia entre los dos tipos de camarones.

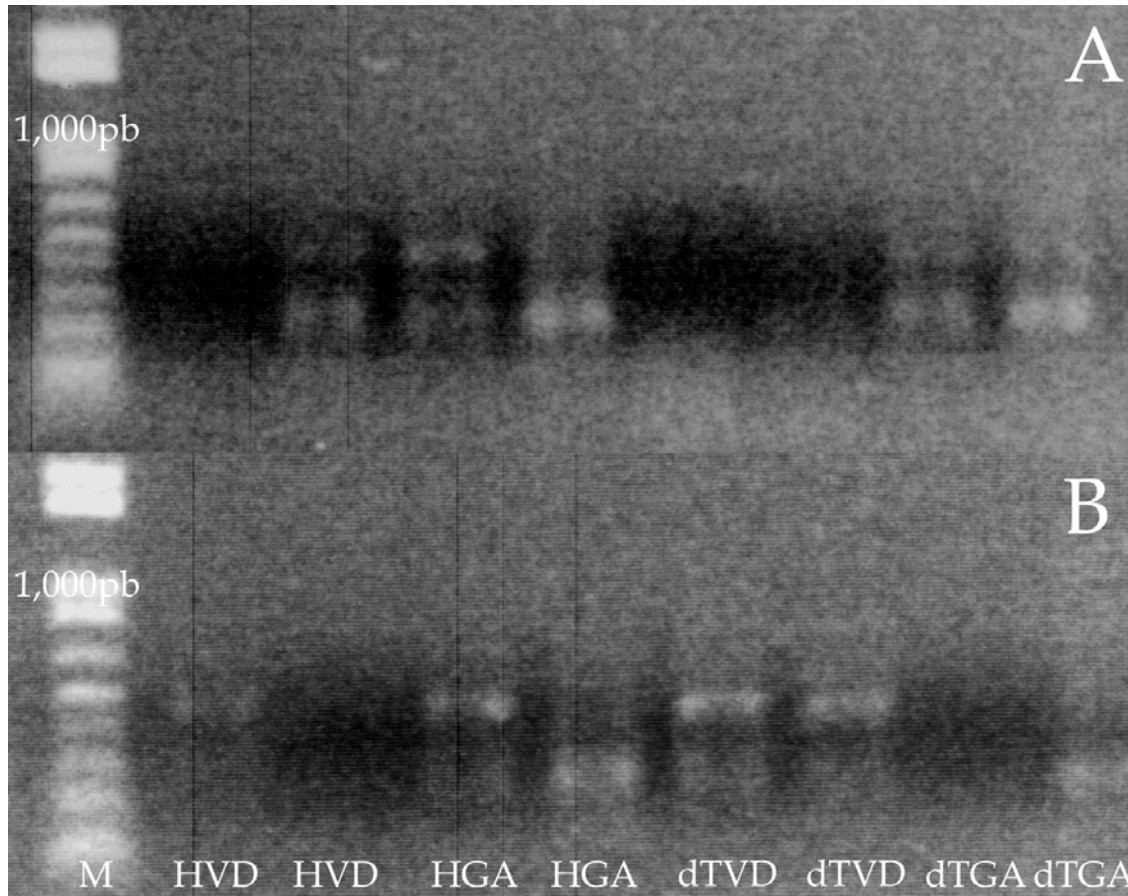


Figura 15. Amplificación del oligonucleótido A3 (10 pb). A: camarones ablacionados. B: camarones normales. H: hexámeros. dT: oligo dT₁₅. VD: vaso deferente. GA: glándula androgénica.

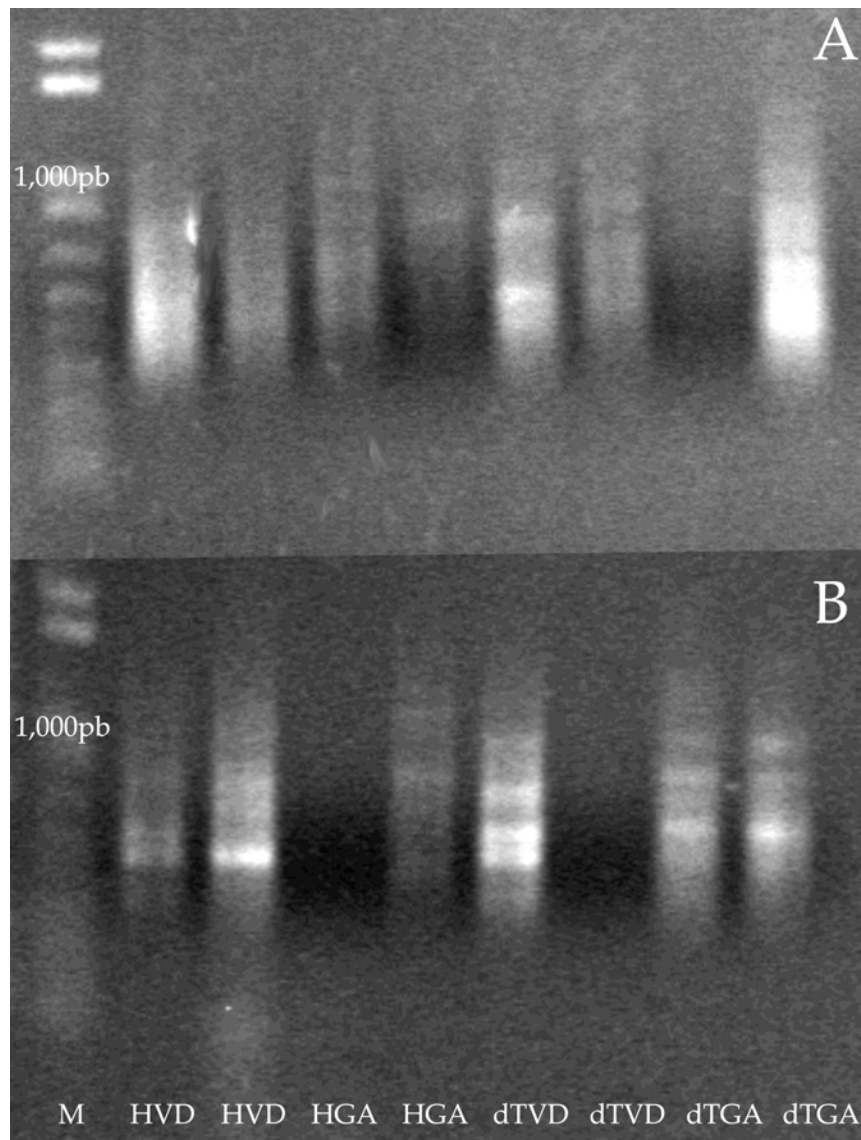


Figura 16. Amplificación del oligonucleótido A4 (20 pb). A: camarones ablacionados. B: camarones normales. H: hexámeros. dT: oligo dT₁₅. VD: vaso deferente. GA: glándula androgénica.

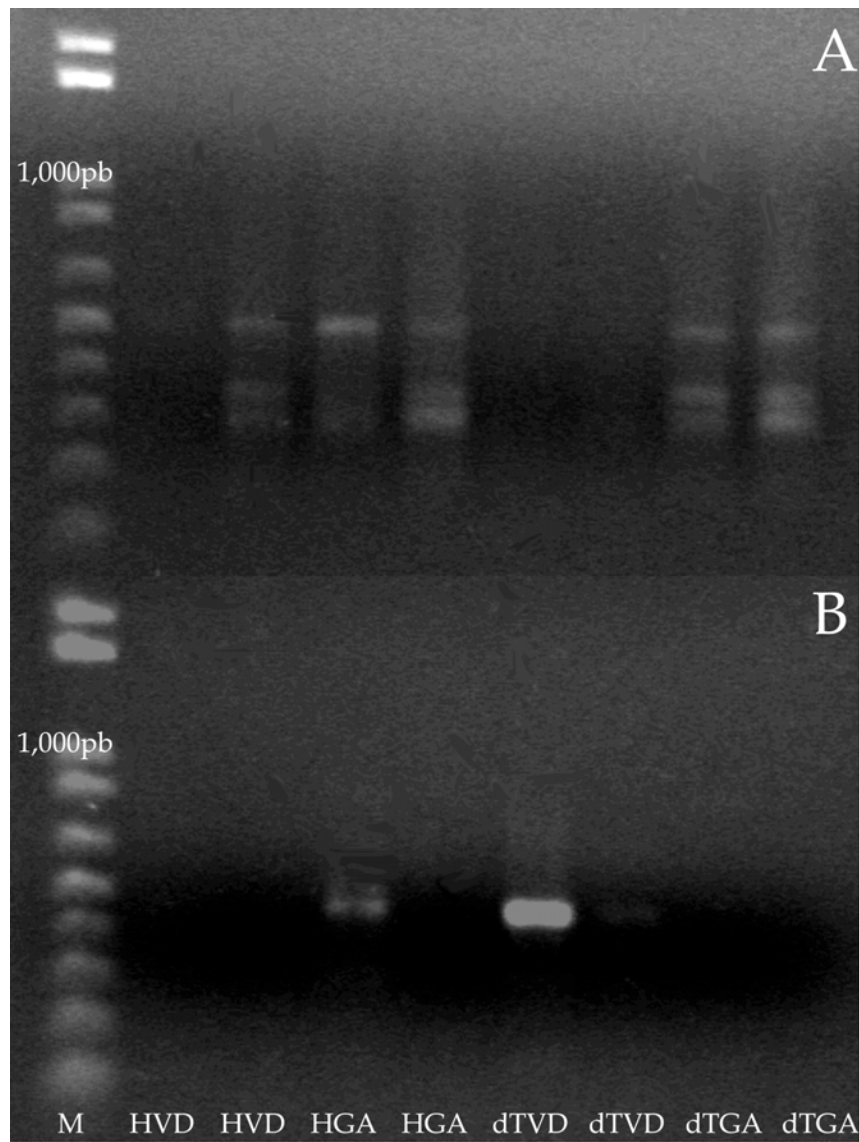


Figura 17. Amplificación del oligonucleótido A6 (9 pb). A: camarones ablacionados. B: camarones normales. H: hexámeros. dT: oligo dT₁₅. VD: vaso deferente. GA: glándula androgénica.

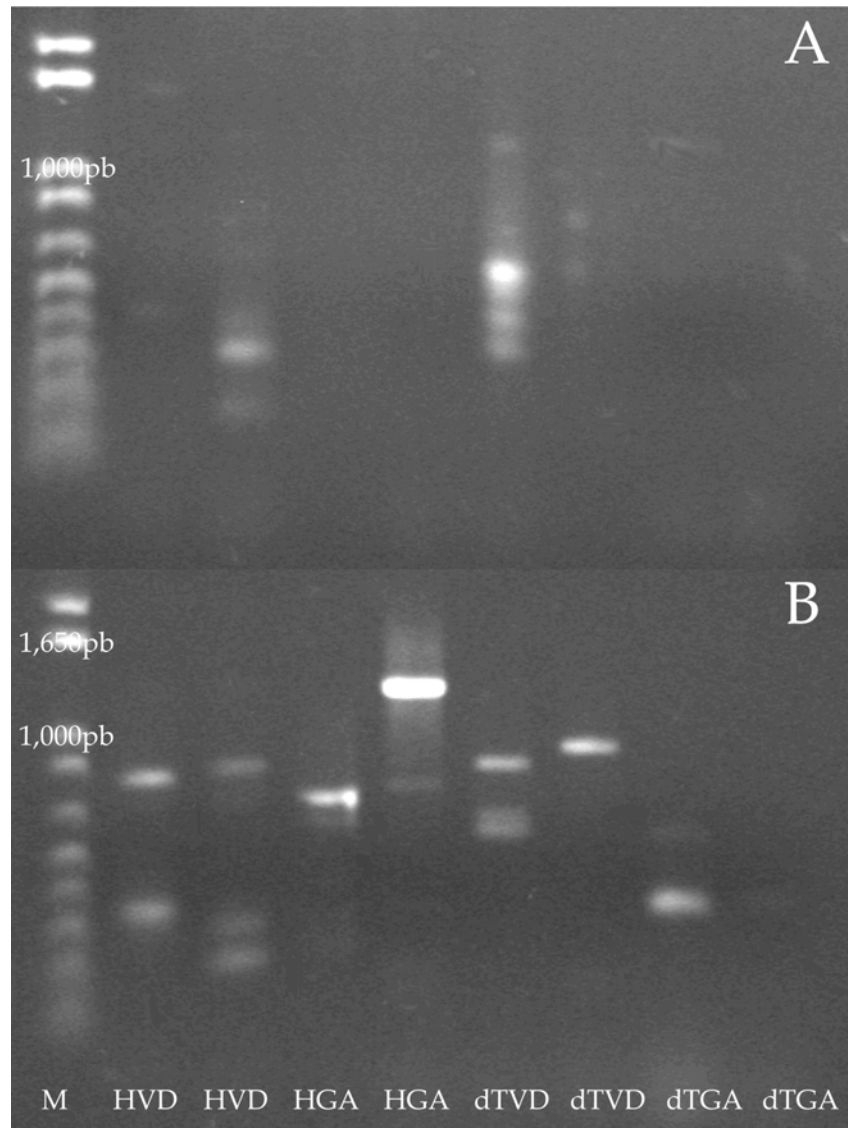


Figura 18. Amplificación del oligonucleótido A15 (20 pb). A: camarones ablacionados. B: camarones normales. H: hexámeros. dT: oligo dT₁₅. VD: vaso deferente. GA: glándula androgénica.

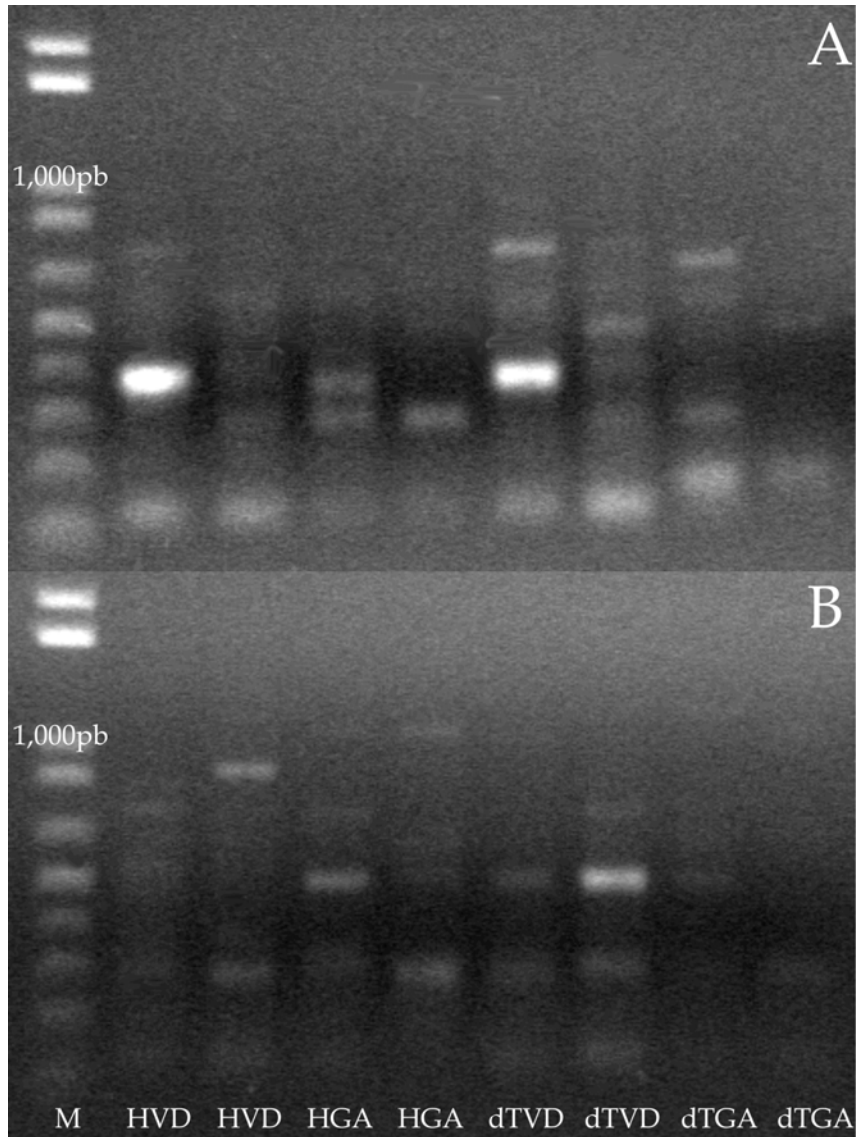


Figura 19. Amplificación del oligonucleótido A17 (10 pb). A: camarones ablacionados. B: camarones normales. H: hexámeros. dT: oligo dT₁₅. VD: vaso deferente. GA: glándula androgénica.

DISCUSIÓN

Las condiciones medioambientales probadas en cautiverio no mostraron un efecto en la determinación del sexo, ni el desarrollo de las estructuras reproductivas externas de la hembra y el macho de *L. vannamei*. Se pudiera considerar que los peneidos presentan un sistema de determinación sexual genética no vulnerable a efectos medioambientales, por lo que la primera hipótesis planteada se acepta. Se puede sugerir que los dos hermafroditas reportados por Pérez Farfante y Robertson (1992) pudieran estar asociados a un efecto de cuello de botella o a endogamia entre camarones parientes y no a las condiciones medioambientales en que se lleva a cabo la pre-engorda de camarón.

Según Nakamura *et al.* (1992), el petasma en *P. japonicus* surge a partir de pl-50 como un lóbulo largo y triangular, mientras que en las hembras, el endopodito permanece como un lóbulo pequeño y delgado. Las observaciones en *L. vannamei* indicaron que la longitud del endopodito es similar en ambos sexos en los primeros 3 meses después de que el endopodito surgió del protopodito. También indicaron que la estructura semitriangular con 3 setas identifica a la hembra. De acuerdo con Charniaux-Cotton y Payen (1985), la muesca en la cara interna del protopodito masculino se forma antes de la diferenciación del apéndice masculino y el petasma en *P. japonicus*. Esta estructura también se forma en el macho de *L. vannamei*. Sin embargo, en este estudio no se logró diferenciar el sexo con esta estructura hasta pl 90, cuando todas las estructuras sexuales externas ya estaban desarrolladas.

Las características sexuales del camarón juvenil se van formando progresivamente conforme muda el organismo. Se esperaba que los camarones que crecieron más rápido en

la temperatura más alta se diferenciaran sexualmente más rápido que los camarones criados en la temperatura control. Sin embargo, la diferenciación sexual ocurrió en un mismo intervalo de edad, independientemente del tamaño. Por lo tanto, es posible que exista una ventana de diferenciación sexual en la edad bajo condiciones normales de crianza, después de que la postlarva haya alcanzado un tamaño mínimo durante su desarrollo. No obstante, esta ventana puede ser alterada bajo condiciones medioambientales desfavorables y prolongadas como bajas temperaturas o alta densidad durante el cultivo de postlarva. Con estos resultados, se rechaza la segunda hipótesis planteada en este trabajo: “La diferenciación externa de camarón blanco es dependiente del tamaño del individuo y no de la edad (días como postlarva) del mismo”. Alternativamente se plantea que la diferenciación sexual externa depende de la edad, siempre y cuando la postlarva alcance una talla mínima de desarrollo.

De acuerdo con Yin *et al.* (1986) y Li y Xiang (2002) en *F. chinensis*, Charniaux-Cotton y Payen (1985) y Nakamura *et al.* (1992) en *P. japonicus*, la diferenciación externa de la hembra y el macho, se lleva a cabo durante el segundo mes después de la metamorfosis larvaria, lo cual concuerda con los resultados en *L. vannamei*, de tal manera que la tercera hipótesis planteada se acepta.

Resumiendo, las observaciones en *L. vannamei* indican que la formación de las estructuras de diferenciación sexual externas en el macho comienzan con el endopodito alrededor de pl-50, lo cual concuerda con Nakamura *et al.* (1992), seguido de los gonoporos masculinos y el apéndice masculino en el segundo par de pleópodos para el día 58, y finalmente, con la depresión del protopodito masculino en su lado interno para el día 90.

La descripción histológica de la glándula androgénica en camarón blanco es similar con prácticamente todas aquellas descritas en la literatura de otros Malacostracos como anfípodos, isópodos y decápodos. El tejido de la glándula androgénica es único, e inevitablemente, es fácil de identificar. Particularmente en los peneidos estudiados, la glándula androgénica se localiza en la parte distal del bulbo eyaculador, por lo que la cuarta hipótesis planteada se acepta como tal.

Cabe mencionar que la principal diferencia entre *L. vannamei* y los camarones de agua dulce es que la glándula androgénica se adhiere a los vasos deferentes como un cordón principal en el primero, mientras que son cordones o segmentos adyacentes en los segundos (por ejemplo: Nagamine *et al.* 1980a; Fowler & Leonard 1999). En los machos de *M. rosenbergii*, se sabe que las características secundarias sexuales no se desarrollan en ausencia de los vasos deferentes con la glándula androgénica (Nagamine *et al.* 1980a). A diferencia de los camarones marinos, los langostinos tienen la ventaja de que en los machos existen diferentes fenotipos relacionados con el color de las tenazas. Estos fenotipos permiten la cuantificación de las etapas de desarrollo de los machos, dando una indicación externa de que tanto, completa o parcialmente, están respondiendo los machos andrectomizados y las hembras implantadas a la reversión sexual.

Una reversión sexual exitosa de machos del langostino de Malasia (*M. rosenbergii*) a hembras, se logró si se andrectomizan antes de que los gonoporos sean evidentes en los individuos de un gramo de peso corporal, cuando las gónadas no están diferenciadas totalmente (Nagamine *et al.* 1980a; Sagi y Cohen, 1990). El mismo proceso se ha intentado en langostinos pre-adultos sin ningún éxito en la reversión sexual (Nagamine *et al.* 1980a,b; Sagi y Cohen, 1990) y en *P. indicus* (Mohamed y Diwan, 1991). Es decir, la andrectomía o

implantación se debe de llevar a cabo, al menos antes de la diferenciación sexual externa. El bioensayo de andrectomía e implantación de camarones en este estudio se llevó a cabo en especímenes pre-adultos, lo cual sugiere que en esta etapa de desarrollo no existe ningún efecto de reversión, por lo que se acepta la quinta hipótesis planteada. Esto indica que futuras andrectomías o bien implantaciones en camarón tendrán que realizarse mediante un novedoso procedimiento de microcirugía en los juveniles.

De acuerdo con Charniaux-Cotton y Payen (1985), la fase indiferenciada del aparato genital en *P. japonicus* continúa a través de las etapas de mysis larval y se extiende hasta por lo menos pl-6 antes de que se formen los conductos deferentes del macho. Nakamura *et al.* (1992) observó que para el día 20, los vasos deferentes ya estaban formados. En el presente trabajo, se asume que los vasos deferentes en *L. vannamei* deben también aparecer antes de la diferenciación del endopodito.

La evidencia mas contundente para peneidos muestra que durante la organogénesis del macho de *P. japonicus*, la glándula androgénica aparece adherida a los conductos deferentes para el día 55, justo antes de la diferenciación de la gónada a testículos en el día 60 (Charniaux-Cotton y Payen, 1985; Nakamura *et al.* 1992). Asumimos que la glándula androgénica y los testículos de *L. vannamei* se están diferenciando cuando los gonoporos y el apéndice masculino se están desarrollando externamente.

El tejido único de la glándula androgénica entre los malacostracos nos muestran que su función de diferenciación sexual debe ser la misma en todas las especies. Sin embargo, las evidencias en peneidos muestran hasta ahora que la glándula androgénica no esta involucrada en el proceso de diferenciación, dado que los conductos deferentes masculinos ya están presentes mucho antes de que aparezca la glándula androgénica (Charniaux-Cotton

y Payen, 1985; Nakamura *et al.* 1992). Cabe mencionar que aunque la reversión sexual en langostinos ya se ha obtenido, no se ha demostrado que la glándula androgénica ya este presente en los conductos deferentes en el momento en que se realiza la andrectomía. Por ejemplo, no se ha realizado un estudio a nivel histológico o bien de microscopía de transmisión electrónica que muestre claramente la presencia de la glándula en el momento que se realiza el proceso de andrectomía. En síntesis la función de la GA en peneidos se liga al proceso de espermatogénesis (Charniaux-Cotton y Payen, 1985, Mohamed y Diwan, 1991) y desarrollo del petasma (Li y Xiang, 1997) únicamente, lo cual hace evidente más investigación.

Con los resultados de que las condiciones ambientales parecen no afectar la determinación del sexo, y de que la glándula androgénica está presente en el camarón blanco del Pacífico, permitirá seguir con futuros ensayos experimentales. Además, podemos con seguridad determinar el sexo de *L. vannamei* a los 60 días, para futuras prácticas experimentales de un cultivo monosexual de hembras.

Distintos procedimientos están publicados para la amplificación de ADNc-PCR. Cuando se propone el identificar genes que se están expresando en un mismo tejido, sometido a distintos tratamientos, la técnica se refiere como bandeo diferencial, en Inglés; differential display. Esta técnica permite identificar bandas únicas provenientes de la expresión de genes (ARN) de un tejido sometido a algún tratamiento, que no fueron expresados en el mismo tejido bajo condiciones normales. La GA no es posible de aislar mediante una disección del conducto deferente. Es por ésto, que los ADNc obtenidos provinieron de una región media del VD, en donde no se aprecia dicha glándula y por otra parte, ADNc provenientes del VD, en donde la GA está adherida. De esta forma, se planteó

el utilizar el bandeo diferencial, e identificar aquellos productos obtenidos no comunes al VD y que en teoría, pertenecerían a productos de la glándula androgénica. En general, se apreciaron amplificaciones comunes entre el VD y la GA debido posiblemente a la presencia de tejido de vaso deferente en la sección diseccionada que incluye la glándula. Sin embargo, las observaciones de microscopía de barrido de la GA indican que el cordón principal de la glándula se bifurca en pequeños cordones hacia ambos extremos del conducto, es decir, hacia el bulbo eyaculador y el conducto distal. Alfaro (1994) observó que en camarón adulto blanco y azul (de talla grande), la GA recubre parte del bulbo eyaculador, es decir, no solo la parte distal del mismo y se continúa hacia el conducto distal. Dicha observación también la reporta Li y Xiang (1997) en el camarón oriental. En este sentido, cabe la posibilidad de que algunos de los productos amplificados que se consideran que provengan de la VD, en realidad provengan de la GA. De todas las amplificaciones logradas, únicamente los oligonucleótidos A6 (9pb) y el A15 (20 pb) mostraron una diferencia notable entre los camarones ablacionados y no ablacionados. Al utilizar como iniciador el A6, pareciera que la expresión fue menor en los camarones normales comparados con los ablacionados. En contraste, al utilizar el iniciador A15, pareciera que la expresión fue menor por efectos de la ablación, lo cual sugiere que la ablación unilateral en el camarón blanco deteriora la condición del animal. Según Khalaila *et al.* (2001) y Okumura (2004) la ablación del tallo ocular causa hipertrofia en la glándula androgénica, indicando que una hormona producida por la glándula sinoideal que se encuentra en el tallo ocular, controla la secreción de la glándula. Era de esperarse que en los camarones ablacionados se hubiera presentado una mayor síntesis de ARN proveniente de la GA, y por ende, se hubieran encontrado productos de amplificación de la GA en

camarones ablacionados. Sin embargo, sobre la base de la amplificación del iniciador A15, la síntesis de ARN proveniente de la GA se vió deteriorada, dado que la misma amplificación en camarones normales mostró productos al parecer específicos de la GA. Evidentemente que esta es una observación preliminar, dado que nada mas se probaron 21 oligonucleótidos y la comparación es cualitativa. Posiblemete el probar mas iniciadores del orden de 40 u 80 como lo reporta alguna literatura, pudieran haber proporcionado más información. La hipótesis de que la glándula del seno está involucrada en la regulación de la GA quedó inconclusa. De todas maneras los dos productos del A15 son candidatos a reamplificarse, a ser marcados con fluorescencia para la realización de hibridación *in situ*, con la finalidad de corroborar que dichas bandas provienen de la GA. Adicionalmente, los productos son susceptibles a clonarse y secuenciarse para un análisis de secuencia entre lo poco reportado para Malacostraca.

Finalmente, se hace énfasis en tres rutas de investigación a seguir. La primera está relacionada a la diferenciación sexual interna para ser contrastada con la información de diferenciación sexual externa presentada en este trabajo. La segunda es continuar a un nivel molecular con la identificación de la secuencia de la GA y por último, los ensayos de andrectomía e implantación de GA en camarones indiferenciados.

CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados no se encontró una determinación sexual medioambiental en camarón blanco, por lo que en futuros ensayos de reversión sexual no se tendrá que considerar las condiciones medioambientales en las que el camarón se desarrolló.
- Se pudiera considerar que los peneidos presentan un sistema de determinación sexual genética no vulnerable a efectos medioambientales.
- La diferenciación sexual externa depende de la edad y no del tamaño.
- Las hembras se identifican por tener un endopodito en forma semitriangular con presencia de setas, mientras que en machos esta estructura se convierte en el petasma.
- Con la documentación de la diferenciación sexual externa es posible sexar a los camarones *L. vannamei* a partir de pl-50, mediante la extirpación del endopodito y a partir de pl-60, mediante la observación de gonoporos en el macho y el télico en la hembra.

- El tejido de la GA presenta células grandes y ovaladas, característico en todas las especies de malacostracos actualmente estudiadas.
- La GA se encuentra en la parte distal de los vasos deferentes medios eyaculadores de machos de camarón blanco, lo cual coincide con las otras 4 especies de penaeidos estudiadas.
- Los bioensayos de andrectomía e implantación de GA no mostraron un efecto aparente de reversión sexual en los camarones preadultos.
- No se pudo concluir que la glándula del seno está involucrada en la regulación de expresión de la glándula androgénica.

LITERATURA CITADA

- Alfaro, J. (1994). Ultraestructure of the androgenic gland, spermatogenesis and oogenesis in marine shrimps (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Tropical* 42 (2), 121-129.
- Almada, R.A. (Ed.) (1989). Breve historia del cultivo de camarón. En: *El cultivo de camarón azul Penaeus stylirostris Stimpson*, CICTUS, Universidad de Sonora, México. 126p.
- Anónimo. (1999). Srimp gene difficulties. *Fish Farming International* 27 (8), 5.
- Barki, A., I. Karplus, I. Khalaila, R. Manor and Sagi A. (2003). Male-like behavioral patterns and physiological alterations induced by androgenic gland implantation in female crayfish. *Journal of Experimental Biology* 206, 1791-1797.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner. (1988). *A handbook of normal penaeid shrimp histology*. Allen Press, Kansas, USA.
- Benzie, J.A.H. (1997). A review on the effect of the genetics and environment on the maturation and larval quality of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 155, 69-85.
- Benzie, J.A.H. (1998). Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture* 164, 23-47.
- Benzie, J.A.H, M. Kenway and E. Ballment. (2001). Growth of *Penaeus monodon* X *Penaeus esculentus* tiger prawns hybrids relative to parental species. *Aquaculture* 193, 227-237.

- Bray, W.A. and A. L. Lawrence. (1992). Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: Fast, A.W. and Lester, J.L., (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, Amsterdam, pp. 93-170.
- Browdy, C.L. (1992). A review of the reproductive biology of *Penaeus* species, perspective on controled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: Wyban, J., (Ed.), *Proceedings of Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp 22-51.
- Bull, J.J. (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin-Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California. USA. 315 pp.
- Bye, V.J. and R.F. Lincon. (1986). Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 57, 299-309.
- Cai, N., F. Lin, Y. Ke and C. Bennan. (1995). Artificial induction of gynogenesis in Chinese shrimp *P. chinensis* 1. induced in four steps. *Marine Sciences/Haiyang Kexue. Qingdao* 3, 35-41.
- Campos-Ramos, R. (1997). Chromosome studies on the marine shrimps *Penaeus vannamei* and *P. californiensis* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 17(4), 666-673.
- Campos-Ramos, R., F.J. Magallón-Barajas, G. Portillo-Clark, M. Porchas-Cornejo, and J. Naranjo-Páramo (1994). Crecimiento y sobrevivencia de machos y hembras de camarón café *Penaeus californiensis* con macroalgas de *Caulerpa sertularioides*. In: *X Simposium Internacional de Biología Marina, Ensenada B.C. 13-17 de Junio de 1994*. Universidad Autónoma de Baja California, México. 132pp.

- Campos-Ramos, R., S.C. Harvey, B.J. McAndrew and D.J. Penman. (2003). An investigation of sex determination in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, using synaptonemal complex analysis, FISH, sex reversal and gynogenesis. *Aquaculture* 221 (1-4), 125 - 140.
- Charniaux-Cotton, H. (1953). Étude du déterminisme des caractères sexuels secondaires par castration chirurgicale et implantation d'ovaire chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*). *Comptes Rendus Hebdomadaire des Seances de l'Academie des Sciences, Paris* 236, 141-143.
- Charniaux-Cotton, H. (1954). Discovery in an amphipod crustacean (*Orchestia gammarella*) of an endocrine gland responsible for the differentiation of primary and secondary male sex characteristics. *Comptes Rendus Hebdomadaire des Seances de l'Academie des Sciences, Paris*. 239(13), 780-2.
- Charniaux-Cotton, H. (1960). Sex determination. In: *The Physiology of Crustacea, Vol. I, Metabolism and Growth* (ed. by H.W. Talbot), pp. 441- 447. Academic Press, New York.
- Charniaux-Cotton, H. and G. Payen. (1957). Croissance, reneretion et determinisme endocrinien des caracteres sexuels d' *Orchestia gammarella*. *Annales des Sciencies Naturelles* 19, 411-559.
- Charniaux-Cotton, H. and G. Payen. (1985). Sex differentiation. In: *The Biology of Crustacea. Vol. 9. Integuments, Pigments and Hormonal Processes*. pp. 217-299. Academic Press, New York, USA.

- Chow, S. and P.A. Sandifer. (1991). Differences in growth, morphometric traits and male sexual maturity among Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, from different commercial hatcheries. *Aquaculture* 92, 165-178.
- Cruz, P., A.M. Ibarra, H. Mejia-Ruiz, P.M. Gaffney and R. Pérez-Enríquez. (2004). Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology* 6, 157-164.
- Dai, J., B. Zhenmin, Q. Zhang and J. Liu. (1993). An observation of gynogenesis induced by super (60) Co gamma rays in Chinese prawn *P. chinensis*. *Journal of Ocean University of Qingdao/ Quindao Haiyang Daxue Xuebao, Quindao* 23, 151-155.
- Dall, W., B.J Hill, P.C. Rothlisberg, and D.J. Sharples. (1990). *The Biology of the Penaeidae. Advances in Marine Biology, Vol. 27.* 487p. Academic Press, London.
- Devlin, R.H. and Y. Nagahama. (2000). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191-364.
- Dumas, S. and R. Campos-Ramos. (1999). Triploidy induction in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 30, 621-624.
- Felip, A., S. Zanuy, M. Carrillo and F. Piferrer. (2001). Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111 (1-3), 175-195.
- Fowler, R.J. and B.V. Leonard. (1999). The structure and function of the androgenic gland in *Cherax destructor*. *Aquaculture* 171, 135-148.

- Garcia, D.K., A.K. Dhar and A. Alcívar-Warren. (1996). Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5(1), 71-83.
- Ginsburger-Vogel, T. and H. Charniaux-Cotton. (1982). *Sex determination. The Biology of Crustacea. Vol 2.* Academic Press Inc., New York, USA.
- Girard, A. (1887). La castration parasitaire et son influences sur le caracteres extérieurs du sex male chez le crustaces decapods. *Bulletin Scientifique France Belgique* 18, 1-28.
- Girard, A. (1888). La castration parasitaire. Nouvelles Recherches. *Bulletin Scientifique France Belgique* 19, 12-45.
- González-Gómez, G. (2001). *Evaluación del efecto de la hormona esteroideal 17 β -oestradiol en el sexo del camarón blanco, Litopenaeus (Penaeus) vannamei, y la artemia, Artemia sp.* Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., La Paz, Baja California Sur, México.
- Greglutz, C. (2001). *Practical genetics for aquaculture.* Fishing New Books, Blackwell Sciences. 235p. Oxford, U.K.
- Hansford, S.W. and D.R. Hewitt (1994). Growth and nutrient digestibility by male and female *Penaeus monodon*: evidence of sexual dimorphism. *Aquaculture* 125, 147-154.
- Hartnoll, R.G. (1967). The effects of sacculinid parasites on two Jamaican crabs. *Journal of the Linnaeus Society of London, Zoology* 46, 275-295.

- Hunter, G.A. and E.M. Donalson. (1983). Hormonal sex control and its application to fish culture. pp. 223-303. En: *Fish Physiology, Vol. IX. Reproduction, Behaviour and Fertility Control*. Hoar, W.S., D.J. Randall, E.M. Donalson. (Eds.) Academic Press, N.Y., U.S.A.
- Juchault, P. (1999). Hermaphroditism and gonochorism. A new hypothesis on the evolution of sexuality in Crustacea. *Academy of Sciences and Life Sciences* 322, 423-427.
- Khalaila, I., T. Katz, U. Abdu, G. Yehezkel and A. Sagi. (2001). Effects of implantation of hypertrophied androgenic glands on sexual characters and physiology of the reproductive system in the female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology* 121, 242-249.
- Korpelainen, H. (1990). Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biological Review* 65, 147-184.
- Legrand, J.J., E. Legrand-Hamelin and P. Juchault. (1987). Sex determination in crustacean. *Biological Review* 62, 439-470.
- Lester, L.J. (1979). Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *Journal of Heredity* 70, 175-180.
- Lester, L.J. (1983). Developing a selective breeding program from penaeid shrimp mariculture. *Aquaculture* 33, 41-50.
- Liang, P. and A.B. Pardee. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.

- Li, F., J. Xiang, X. Zhang, L. Zhou, Ch. Zhang and Ch. Wu. (2003a). Gonad development characteristics and sex ratio in triploid Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Marine Biotechnology* 5, 528-535.
- Li, F. and J. Xiang. (1997). Preliminary studies on form, structure and function of androgenic gland in *Penaeus chinensis*. *Chinese Science Bulletin* 42, 499-503.
- Li, F. and J. Xiang. (2002). Study on early sex differentiation of *Penaeus chinensis*. *Studia Marina Sinica/Haiyang Kexue Jikan* 44, 101-105.
- Li, Y., K. Byrne, E. Miggiano, V. Whan, S. Moore, S. Keys, P. Crocos, N. Preston and S. Lehnert. (2003b). Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture* 219, 143-156.
- Li, X. and J. Li. (1993). An androgenic gland of *Penaeus chinensis*: A new discovery. *Journal of Dalian Fisheries College/Dalian Shuichan Xueyuan Xuebao* 8, 17-21.
- Lumare, F., G. Scordella and V. Zonno. (1998). Morphometric study of *P. monodon* Fabricius, 1798, farmed in a fishery Valle of the Po River Delta (north east cost of Italy). *Oebalia Taranto* 24, 131-143.
- Malecha, S.R. and D. Hedgecock. (1989). *Prospects for the domestication and breeding of marine shrimp*. Sea Grant Technical Report UNIH-SEAGRANT-TR-89-01. 40 pp. University of Hawaii Sea Grant College Program, Honolulu, USA.

- Martin, G., O. Sorokine, M. Moniatte, P. Bullet, C. Hetru and A. VanDorsseaer. (1999). The structure of glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillium vulgare*. *European Journal of Biochemistry* 262, 727-736.
- Martinez, C.L.R. (2002). *Camaronicultura: Avances y tendencias*. A.G.T. Editor, S.A., México.
- Marvin, K.T., R.C. Benton, L.M. Lansford and C.W. Caillouet. (1977). Polymorphism in phosphohexose isomerase in white shrimp, *Penaeus setiferus* and pink shrimp *P. duorarum*. *Comparative Biochemistry & Physiology B* 57B, 95-97.
- Misamore, M. and C.L. Browdy. (1997). Evaluating hybridization potential between *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* through natural mating, artificial insemination and in vitro fertilization. *Aquaculture* 150, 1-10.
- Mohamed, K.S. and A.D. Diwan (1991). Effect of androgenic gland ablation on sexual characters on the male Indian white prawn *Penaeus indicus* Edwards H. Milne. *Indian Journal of Experimental Biology* 29, 478-480.
- Mohan, R. and M.S.M. Siddeek (1995). Biology of the Indian white shrimp, *P. indicus* H. Milne Edwards (Decapoda, Penaeidae) in the Gulf of Masira, Sultanate of Oman. *Archive fur Hydrobiologie* 135 (2), 259-270.
- Morelli, M. (2003). Effects of heat-shock on cell division and microtubule organization in zygotes of the shrimp *Penaeus indicus* (Crustacea, Decapoda) observed with confocal microscopy. *Aquaculture* 216(1),39-46.

- Mulley, J.C. and B.D.H. Later. (1980). Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns. *Evolution* 34, 904-916.
- Murugan, G., A.M. Maeda-Martínez, H. Obregón-Barboza and N.Y. Hernández-Saavedra. (2002). Molecular characterization of the tadpole shrimp *Triops* (Branchiopoda: Notostraca) from Baja California Peninsula, Mexico: New insights on species diversity and phylogeny of the genus. *Hydrobiologia* 486, 101-113.
- Nagamine, C., A.W. Knight, A. Maggenti and G. Paxman. (1980a). Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. *General and Comparative Endocrinology* 41, 423-441.
- Nagamine, C., A.W. Knight, A. Maggenti and G. Paxman (1980b). Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), by androgenic gland implantation. *General and Comparative Endocrinology* 41, 442-457.
- Nakamura, K., N. Matsuzaki and K. Yonekura. (1992). Organogenesis of genital organs and androgenic gland in kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 2261-2267.

- Niiyama, H. (1959). A comparative study of the chromosomes in Decapods, Isopods and Amphipods, with some remarks on cytotaxonomy and sex-determination in the Crustacea. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*. 7, 1-60.
- Norris, A.T., D.G. Bradley and E.P. Cunningham. (2000). Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182 73-83.
- Ohno. (1979). *Major sex-determining genes*. Springer-Verlag, Berlin and New York.
- Okumura, T. (2004). Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *Japan Agriculture Research* 38 (1) 49-54.
- Okumura, T., H. Nikaido, K. Yoshida, M. Kotaniguchi, Y. Tutsuno, Y. Seto and T. Watanabe. (2005). Changes in gonadal development, androgenic gland cell structure, and hemolymph vitellogenin levels during male phase and sex change in laboratory-maintained protandric shrimp, *Pandalus hypsinotus* (Crustacea: Caridea:Pandalidae). *Marine Biology* 148 (2): 347-361.
- Okuno, A., Y. Hasegawa, Y. Katakura and H. Nagasawa. (1999). Characterization and cDNA cloning of androgenic gland hormone of the terrestrial isopod *Armadillium vulgare*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 419-423.

- Penman, D. and B.S. McAndrew. (2000). Genetic for the management and improvement of cultured tilapias. pp. 227-266. En: *Tilapias: Biology and Exploitation*. Beveridge M.C.M., McAndrew, B.J. (Eds) *Fish and Fisheries Series*, Vol 25. 505p. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Pérez Farfante, I. and L. Robertson. (1992). Hermaphroditism in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Aquaculture* 103, 367-376.
- Pérez Farfante, I. (1988). Illustrated key to penaeoid shrimps of commerce in the Americas. *NOAA Technical Report NMFS 64*. 500 pp.
- Pérez-Rostro, C.I. and A.M. Ibarra. (2003a). Quantitative genetic parameter estimates for size and growth rate traits in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone 1931) when reared indoors. *Aquaculture Research* 34, 543-553.
- Pérez-Rostro, C.I. and A.M. Ibarra. (2003b). Heritabilities and genetic correlations of size traits at harvest size in sexually dimorphic Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown in two environments. *Aquaculture Research* 34, 1079-1085.
- Pérez-Rostro, C.I., J.L. Ramírez and A.M. Ibarra (1999). Maternal and cage effects on genetic parameter estimation for Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* 30, 681-693.
- Peruzzi, S., B. Chatain, E. Saillant, P. Haffray, B. Menu and J.C. Falguiere. (2003). Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 230 (1-4), 41-64.
- Pienta, K.J. and E.D. Schwab. (2000). Modified differential display technique that eliminates radioactivity and decreases screening time. *Biotechniques* 28, 272-276.

- Proctor, R.R., K.T. Marvin, L.M. Lansford and R.C. Bento. (1974). Phosphoglucosmutase polymorphism in brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 31, 1405-1407.
- Purdom, C.E. (1983). Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* 33 (1-4), 287-300.
- Racotta, I.S., E. Palacios and A.M. Ibarra. (2003). Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227, 107-130.
- Reinhard, E.G. (1956). Parasitic castration of Crustacea. *Ex Parasitol* 5, 79-107.
- Rodríguez, M.G., N. Bautista. (1999). La manipulación cromosómica y su aplicación en piscicultura. *Oceanologia* 4(12), 59-75.
- Sagi, A. and E. Aflalo. (2005). The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergi*: a biotechnological perspective. *Aquaculture Research* 36, 213-237.
- Sagi, A. and D. Cohen. (1990). Growth, maturation and progeny of sex reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. *World Aquaculture* 21, 87-90.
- Solari, A.J. (1994). *Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 307 pp.
- Suzuki, S. (1999). Androgenic gland hormone is a sex-reversing factor but cannot be a sex-determining factor in the female crustacean isopods *Armadillidium vulgare*. *General and Comparative Endocrinology* 115, 370-378.

- Taketomi, Y. (1986). Ultrastructure of the androgenic gland of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Cell Biology International* 10 (2): 131-136.
- Taketomi, Y. and S. Nishikawa. (1996). Implantation of androgenic glands into immature female crayfish, *Procambarus clarkii*, with masculinization of sexual characteristics. *Journal of Crustacean Biology* 16(2), 232-239.
- Taketomi, Y., M. Murata and K. Imakado. (1996). On the androgenic gland of the crayfish *Procambarus clarkii*: I. Seasonal changes in the cell structure of the androgenic gland of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Memoirs of the Faculty of Genetic Education, Kumamoto University. Natural Sciences* 31, 65-72.
- Thorgaard, G.H. and S.K. Allen Jr. (1987). Chromosome manipulation and markers in fishery management pp. 319–331. In: N. Ryman and F.M. Utter, Editors, *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle.
- Tizol-Correa, R.A. (2006). *Contribución a la caracterización molecular, citogenética, morfométrica y bioquímica del camarón salmuera Artemia de Cuba y sur de México*. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., La Paz, Baja California Sur, México.
- Treece, G.D. and M.E. Yates. (1998). *Laboratory manual for the culture of penaeid shrimp larvae*. Marine Advisory Service, Sea Grant College Program, Texas A & M University. 75pp.

- Valles-Jiménez, R., P. Cruz and R. Pérez-Enriquez. (2005). Population Genetic Structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA Variation. *Marine Biotechnology* 6, 475–484.
- Villegas, J. and M. Vargas-Barquero (2000). Length at first maturity, reproductive cycle and growth of the white shrimp *P. occidentalis*, (Decapoda, Penaeidae) in the inner part of the Nicoya Gulf, Costa Rica. *UNICIENCIA, Heredia* 17(1-2), 13-19.
- Vishnoi, D.N. (1972). Studies on chromosomes of some Indian Crustacea. *Cytologia* 37, 43-51.
- Wolfus, G.M., D.K. García and A. Alcivar-Warren. (1997). Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152, 35-47.
- Yin, Z.F., W.B. Song, L. Ma and J.P. Yu (1986). Studies on the development and differentiation of external genital organs of *P. orientalis*. *Transactions of Oceanology and Limnology/Haiyang Huzhao Tongbao, Qingdao* 4, 56-61.
- Zar, J.H. (1996). *Biostatistical analysis*. 3rd edition, Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Zhongqing, W. (1990). The sexual propotion of *P. penicillatus* under the treatment of 17 beta estradiol. *Marine Sciences/ Haiyang Kexue. Qingdao* (2), 53-56.