CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL REPRODUCTIVO DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* EN CONDICIONES DE DOMESTICACIÓN

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

p r e s e n t a

Bertha Patricia Ceballos Vázquez

La Paz, B. C. S., Diciembre 2003

Para mis queridos hijos
Erika y David

y para mi esposo
Marcial

SIEMPRE JUNTOS ...
LOS AMO

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos de investigación que brindaron el apoyo económico para la realización del presente trabajo: CIBNOR-PAC15, SIMAC 00BCS7501, SIMAC 00BCS7502, INFOTEC-CONACyT 100-2, CONACyT 28160B, IFS A/2711-2F y CGPI 2002037.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado (No. de registro 82642).

A la empresa Acuacultores de La Paz (APSA) quienes donaron las hembras para el primer experimento.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por la oportunidad de continuar con mi formación académica. Al grupo de posgrado: Dra. Telma Castellanos, Dr. Sergio Hernández Vázquez, Osvelia, Lety, Lupita, Bety, Horacio, Manuel. A Ira Fogel y Taylor H. Morey por su ayuda con el inglés. A todos gracias por su amabilidad y eficiencia.

A mi director de tesis Dr. Ilie Racotta Dimitrov por todas sus enseñanzas, exigencias y orientación que ayudaron enormemente a mi formación profesional. Pero sobre todo por brindarme su amistad y confianza.

A mi comité tutorial Dr. Ilie Racotta Dimitrov, Dra. Ana Maria Ibarra, Dra. Elena Palacios Metchetnov, Dr. Juan Elorduy Garay, Dr. Carlos Rosas Vázquez, gracias por su asesoría y comentarios críticos que ayudaron a enriquecer este trabajo. Gracias también por su amistad.

Este trabajo es el resultado del apoyo técnico de muchas personas. Agradezco al grupo de Genética Acuícola: Susana Avila, José Luis Ramírez, Macliz, Gabriel, Marcos F. Quiñónez, Basilio, Hilario. A Diana Carreño y Roberto Hernández Herrera del laboratorio de bioquímica fisiológica. A Carmen Rodríguez del laboratorio de histología. A Susy del centro de cómputo de CICIMAR. Mil gracias, sin su apoyo no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Al grupo del laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental de la Facultad de Ciencias (UNAM) por todo el apoyo recibido durante mi estancia en Cd. del Carmen en especial a Cristina Pascual quien además me sigue brindando su amistad a pesar de la distancia, gracias querida amiga.

A mis amigos Raúl, Lorena y Katia, gracias por su apoyo incondicional.

A mis padres Jaime Ceballos y Aída Vázquez por darme el impulso y la confianza necesarios para superarme, y porque me siguen brindado su apoyo.

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

La presente tesis fue dirigida por:

Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov	Fisiología Metabólica, CIBNOR

El comité tutorial y el comité revisor de tesis fue integrado por:

Dr. Juan Félix Elorduy Garay	Biología marina, CICIMAR IPN
Dra. Ana María Ibarra Humphries	Genética acuícola, CIBNOR
Dra. Elena Palacios Mechetnov	Metabolismo lipídico, CIBNOR
Dr. Carlos Rosas Vázquez	Ecología y Biología Marina Experimental, UNAM
Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov	Fisiología Metabólica, CIBNOR
Dr. Roberto Civera Cerecedo	Nutrición acuícola, CIBNOR

El comité sinodal fue integrado por:

Dr. Juan Félix Elorduy Garay	Biología marina, CICIMAR IPN
Dra. Ana María Ibarra Humphries	Genética acuícola, CIBNOR
Dra. Elena Palacios Mechetnov	Metabolismo lipídico, CIBNOR
Dr. Carlos Rosas Vázquez	Ecología y Biología Marina Experimental, UNAM
Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov	Fisiología Metabólica, CIBNOR
Dr. Roberto Civera Cerecedo	Nutrición acuícola, CIBNOR

RESUMEN

La expansión de la industria camaronícola depende de un adecuado conocimiento del proceso de reproducción que permita desarrollar programas de domesticación. El potencial reproductivo de los camarones domesticados al ser transferidos a condiciones de maduración depende, en buena parte, de la condición previa en la que se encuentran. Los indicadores más importantes relacionados con esta condición y que se analizan en el presente trabajo en relación a la edad y el tamaño de los camarones son: el grado de desarrollo ovárico y testicular, la calidad espermática y los niveles de reservas energéticas en *Litopenaeus vannamei*. Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de establecer criterios predictivos de un óptimo potencial reproductivo en machos.

En primer lugar, se analizó la organización longitudinal y transversal de los ovarios de *L. vannamei* durante la maduración en cinco zonas del ovario. Tanto el análisis cuantitativo como el cualitativo revelaron que únicamente la zona localizada sobre el primer segmento abdominal (PSA) fue claramente diferente de las otras zonas. Sin embargo, cuando se eliminó la zona PSA y se agruparon los datos en regiones cefalotorácica y abdominal, se encontraron varias diferencias que indicaron un desarrollo vitelogénico ligeramente más avanzado en la región cefalotorácica. Por lo tanto, el desarrollo homogéneo de los ovarios durante la maduración gonádica que generalmente se asume en camarones penéidos, podría tener algunas limitaciones si se requiere un análisis detallado del desarrollo de los ovocitos. Estos resultados condujeron a utilizar organismos distintos para el análisis de composición bioquímica y características histológicas del ovario en lugar de usar el mismo organismo dividiendo la gónada.

La siguiente etapa de la investigación se diseñó para examinar la influencia de la edad y el tamaño sobre el desarrollo gonádico y la condición fisiológica de hembras y machos mediante las comparaciones entre camarones de 6, 8, 10 y 12 meses de edad, y entre organismos de 12 meses de edad con tamaños significativamente diferentes, inducidos por diferentes condiciones de cultivo.

Las hembras de 12 meses de edad presentaron valores significativamente mayores de peso del ovario, índice gonadosomático y diámetro de ovocitos más desarrollados que las hembras de menor edad y fueron las únicas que presentaron ovocitos vitelogénicos. Por otro lado, hubo un aumento significativo tanto de proteínas como de lípidos en relación con la edad, lo cual se debe muy probablemente al grado de madurez. Al corregir por el peso del organismo mediante un ANCOVA, estos efectos fueron independientes del tamaño, excepto para el peso del ovario, por lo cual los resultados apuntan a que la maduración depende de la edad de la hembra más que del tamaño. Sin embargo, al comparar hembras de 12 meses pero de distinto tamaño, se observó que las más grandes presentaron un mayor desarrollo gonádico que las pequeñas, aunque esto se debió principalmente a las condiciones de cultivo diferenciales bajo las cuales estuvieron los organismos. Con lo anterior, se justifica la selección de hembras de un año para fines de reproducción, aunque es importante considerar las condiciones de cultivo bajo las cuales se obtengan los reproductores.

El potencial reproductivo de los machos, medido en términos del peso del testículo y del espermatóforo, así como de calidad espermática fue mayor para los camarones de 12 meses de edad en comparación con los más jóvenes. Al eliminar la influencia del peso del macho con el uso de ANCOVA, se siguió observando el mismo efecto, indicando que el efecto de la edad fue independiente del peso del camarón. Sin embargo, cuando las diferencias en tamaño fueron muy marcadas entre organismos de una misma edad, estas variables fueron diferentes entre organismos grandes y pequeños. En este caso, el uso de ANCOVA indicó que las diferencias se debieron, en la mayoría de los casos, al tamaño de los organismos y solo para la cuenta espermática hubo un efecto adicional de la condición de cultivo. Por lo tanto, se recomienda el uso de machos de 12 meses de edad para ayudar al mejoramiento de la producción de semilla, ya que se trata de machos totalmente maduros con una alta calidad espermática. Sin embargo, también es importante considerar las condiciones de cultivo bajo las cuales se obtengan los reproductores. Adicionalmente, se encontró una disminución en los niveles de carbohidratos en vaso deferente, ámpula terminal y espermatóforo en relación con la edad, que concuerda con la maduración del tracto reproductivo. Esto indica que el metabolismo anaerobio podría representar una importante fuente de energía para los espermatozoides, tal como se ha descrito para otras especies de crustáceos.

Un último aspecto de la presente investigación se enfocó en analizar la calidad espermática a través de regeneraciones consecutivas del espermatóforo. Para ello, se comparó la calidad espermática al inicio del experimento (valores iniciales) con las variaciones en la calidad espermática resultante de regeneraciones consecutivas del espermatóforo. Adicionalmente, se evaluaron posibles criterios predictivos de una calidad espermática óptima basados en criterios morfológicos. La calidad espermática inicial en términos de conteo de espermatozoides y porcentajes de espermatozoides normales y muertos fue menor que en los espermatóforos regenerados. Esto indica que no hay una disminución de la calidad espermática después de regeneraciones consecutivas y que el espermatóforo inicial de los machos debería ser extraído cuando se coloquen en estanques de maduración ya que esto incrementa la calidad espermática. La evaluación de la calidad espermática en estos espermatóforos iniciales permitiría, además, aplicar criterios predictivos de calidad espermática en regeneraciones posteriores, dado que se obtuvieron varias correlaciones significativas en la calidad espermática entre los espermatóforos iniciales y los regenerados.

ABSTRACT

Expansion of the shrimp culture industry depends on knowledge of the reproduction process, which helps in the development of domestication programs. The reproductive potential of domesticated shrimp transferred t maturation conditions depends, to a great extent, on their previous maturation development. In this work, indicators of this development were analyzed in relation to age and size including: degree of ovarian and testicular development, sperm quality, and levels of energetic reserves. Additionally, the possibility of establishing predictive criteria of the reproductive potential in males was evaluated.

First, longitudinal and transversal organization of ovaries of *L. vannamei* during maturation were analyzed in five zones along the length of the ovary. Quantitative and qualitative analyses revealed that only the zone located above the first abdominal segment (FAS) was significantly different from the other zones. However, when the FAS zone was eliminated and data grouped into cephalothoracic and abdominal regions, several differences were found that indicated a slightly more advanced vitellogenic development in the cephalothoracic region. Therefore, homogeneous development of ovaries during maturation generally assumed in penaeid shrimps may be biased in detailed analyses of oocyte development. In view of these results, it was concluded that different organisms should be used for biochemical and histological analyses of ovaries, instead of using the same female and dividing the gonad for each analysis.

Next, the influence of age and size on gonad development and physiological condition of females and males was analyzed in 6, 8, 10, and 12-month-old shrimp, and in 12-month-old shrimp of different sizes as a result of different culture conditions. The 12-month-old females had significantly bigger ovaries, higher gonadosomatic indexes and oocyte diameters than younger females, and were the only females with vitellogenic oocytes. Protein and lipid levels in the ovary were significantly affected by age. When using ANCOVA to eliminate the influence of total body weight, these effects were independent of size, except for ovary weight. These results indicate that the maturation process is determined by age more than female weight. However, when comparing 12-month-old females of different size, the larger females had a more advanced gonadic development than the smaller ones, but by correcting these results for female weight, it was determined that the gonadic development was a result of the different culture conditions under which they were grown. Selection of one-year-old females for reproductive purposes is thus justified; however it is important to consider the culture conditions under which spawners will be grown.

The male reproductive potential, measured in terms of testis and spermatophore weights and sperm quality, was higher for 12-month-old shrimp than in younger males. When the influence of male weight was eliminated by the use of ANCOVA, the same effect was still observed, indicating that the age effect was independent of shrimp weight. However, when size differences between males of the same age were achieved by different culture conditions, it was found that these variables were different between large and small specimens. In this case, the use of ANCOVA revealed that the differences were due, in the majority of the cases, to the size of the specimens. Only for sperm count, an additional effect of culture conditions was observed. Thus, the use of 12-month-old males is

recommended to improve seed production, because at this age, they are totally mature and have higher sperm quality. However, it is also important to consider the culture conditions under which the males will be grown because they can affect sperm count. Additionally, a decrease in carbohydrate levels in the vas deferens, terminal ampoules, and spermatophore, in relation to age was found, in parallel to the age-related maturation of the reproductive tract. This suggests that anaerobic metabolism may represent an important source of energy for spermatozoids, as had been described for other crustacean species.

A final aspect of the research focused on analyzing sperm quality through consecutive regenerations of the spermatophore. Sperm quality at the beginning of the experiment (initial values) was compared with the sperm quality obtained after consecutive spermatophore regenerations. Additionally, possible criteria of an optimal sperm quality, based on morphological criteria, were evaluated. The initial sperm quality, in terms of sperm count and percentages of normal and dead sperm, was lower than in the regenerated spermatophores. These results indicate that sperm quality did not decrease after consecutive regenerations and that the initial spermatophore should be expelled from males when stocking in maturation tanks to increase sperm quality. In addition, evaluation of sperm quality in the initial spermatophores is associated with sperm quality in posterior regenerations, as shown by several significant correlations in the sperm quality between initial and regenerated spermatophores. This provides a predictive criterion of sperm quality.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
CONFORMACIÓN DE COMITÉS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
CONTENIDO	viii
Lista de publicaciones	xi
Lista de figuras	xii
Lista de tablas	xiv
Lista de abreviaturas	xvi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
1. Aspectos de la biología reproductiva de *Litopenaeus vannamei*	6
1.1 Sistema reproductivo	6
1.2 Maduración gonádica	10
1.2.1 Gametogénesis	14
1.2.1.1 Ovogénesis	14
1.2.1.2 Espermatogénesis	17
1.2.2 Eventos bioquímicos	18
1.2.3 Control hormonal	21
1.3 Potencial reproductivo	24
2. Factores que afectan la maduración y el potencial reproductivo	27
2.1 Factores nutricionales	27
2.2 Factores ambientales	31
2.3 Edad/Tamaño	33
JUSTIFICACIÓN	36

OBJETIVOS 37

MATERIALES Y MÉTODOS 38

1. DISEÑOS EXPERIMENTALES 38

1.1 Primer experimento 38

1.2 Segundo experimento 41

1.3 Tercer experimento 45

2. CONDICIONES DE CULTIVO 46

2.1 Primer experimento 46
2.2 Segundo experimento 47
2.3 Tercer experimento 49

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO 50

3.1 Técnica histológica 50
3.2 Análisis de imágenes 52

4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS 52

4.1 Hemolinfa 52
4.2 Tejidos 53

5 CALIDAD ESPERMÁTICA 54

5.1 Conteo de espermatozoides 54
5.2 Examen morfológico general 54
5.2.1 Espermatozoides normales y anormales 54
5.2.2 Biotinción con trypan azul 55

RESULTADOS 56

1. Análisis del proceso de maduración regionalizada del ovario 56

2. Comparación del peso y de las variables de calidad espermática entre las mitades izquierda y derecha del espermatóforo 65
3. Análisis del desarrollo gonádico y condición fisiológica en relación con tamaño y edad 66
3. 1 Desarrollo gonádico en hembras de diferente edad 66
3.2 Desarrollo gonádico en hembras de la misma edad y diferente tamaño .. 69
3.3 Condición fisiológica en hembras de diferente edad 72

3.4 Condición fisiológica de hembras de la misma edad y distinto tamaño .. 76
3.5 Desarrollo gonádico en machos de diferente edad 79
3.6 Desarrollo gonádico en machos de la misma edad y diferente tamaño ... 81
3.7 Condición fisiológica en machos de diferente edad 83
3.8 Condición fisiológica en machos de la misma edad y distinto tamaño ... 91

4. Análisis de la calidad espermática en relación con tamaño y edad 98

4.1 Comparación entre machos de diferente edad 98
4.2 Comparación entre machos de la misma edad y distinto tamaño 103

5. Análisis de la calidad espermática en relación con regeneraciones consecutivas 105

DISCUSIÓN 112

1. Análisis del proceso de maduración regionalizada del ovario 112

2. Comparación del peso y de las variables de calidad espermática entre las mitades izquierda y derecha del espermatóforo 116

3. Análisis del desarrollo gonádico y condición fisiológica en relación con tamaño y edad 116

3.1 Hembras 116
3.2 Machos 124

4. Análisis de la calidad espermática en relación con tamaño y edad 127

5. Análisis de la calidad espermática en relación con regeneraciones consecutivas 131

CONCLUSIONES 139

PERSPECTIVAS 140

BIBLIOGRAFÍA 141

LISTA DE PUBLICACIONES

1. Ceballos-Vázquez B. P., I. Racotta D. & J.F. Elorduy-Garay. 2003. Qualitative and quantitative analysis of the ovarian maturation process of *Penaeus vannamei* after a production cycle. Invertebrate Reproduction & Development. 43(1): 9-18.

2. Ceballos-Vázquez B.P., C. Rosas & I.S. Racotta. 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 228: 141-151.

3. Ceballos-Vázquez B.P., B. Aparicio-Simón, E. Palacios & I.S. Racotta. Sperm quality over consecutive spermatophore regenerations in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. Aceptada con revisiones.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Sistema reproductivo femenino de camarones peneidos 7

Figura 2. Sistema reproductivo masculino de camarones peneidos 9

Figura 3. Micrografías de secciones transversales de ovarios en los estadios de desarrollo ovárico 12

Figura 4. (a) Localización anatómica de los centros endocrinos involucrados en la reproducción de crustáceos decápodos. **(b)** Vías propuestas en el control endócrino de su reproducción 23

Figura 5. Representación esquemática de un ovario de camarón mostrando las zonas donde se hicieron los cortes 39

Figura 6. Variación de temperatura y salinidad que se presentó en el estanque de mareas durante el periodo de estudio. Las flechas indican los meses en que se realizaron los muestreos 48

Figura 7. Micrografías de secciones transversales de ovarios 57

Figura 8. Estadio vitelogénico temprano: Área ocupada por tipos de ovocitos .. 59

Figura 9. Estadio vitelogénico tardío: Área ocupada por tipos de ovocitos 60

Figura 10. Estadio cortical: Área ocupada por tipos de ovocitos 61

Figura 11. Diámetro medio de los ovocitos más desarrollados por estadio de desarrollo 62

Figura 12. Porcentajes de machos con y sin espermatóforo y de espermatóforos sin espermatozoides para las distintas edades 98

Figura 13. Variables de calidad espermática correlacionadas con el peso del camarón 99

Figura 14. a) Correlación entre el conteo total de espermatozoides y el peso del espermatóforo, así como las variables correlacionadas con el conteo total de espermatozoides 100

Figura 15. Porcentajes de machos con y sin espermatóforo y de espermatóforos sin espermatozoides en machos de 12 meses y distinto tamaño 103

Figura 16. Comparación de la calidad espermática al inicio del experimento (valores iniciales) y después de regeneraciones consecutivas 106

Figura 17. Correlaciones entre los porcentajes de espermatozoides normales y muertos después de la primera regeneración con el conteo total inicial de espermatozoides 108

Figura 18. Correlaciones entre los porcentajes de espermatozoides normales y muertos, y el conteo total de espermatozoides después de la primera regeneración, y el porcentaje inicial de espermatozoides normales 108

Figura 19. Correlaciones entre los porcentajes de espermatozoides normales y muertos, y el conteo total de espermatozoides después de la primera regeneración, y el porcentaje inicial de espermatozoides muertos 109

Figura 20. Correlaciones entre las variables bioquímicas de la hemolinfa y las variables de calidad espermática inicial 110

Figura 21. Correlaciones entre las variables bioquímicas de la hemolinfa y las variables de calidad espermática después de la primera regeneración 111

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Comparación de las diferentes escalas descritas de los estadios de desarrollo ovárico 11

Tabla 2. Comparación de las diferentes escalas descritas de los estadios de desarrollo de los ovocitos 13

Tabla 3. Tiempos de inmersión para el procesamiento histológico 50

Tabla 4. Tiempos de inmersión para el proceso de tinción 51

Tabla 5. Variables morfométricas de camarones hembras separadas por el estadio ovárico 56

Tabla 6. Diámetros promedio (µm) de los ovocitos y áreas (%) ocupadas por los diferentes tipos de ovocitos en la región cefalotóracica y abdominal por estadio ovárico 63

Tabla 7. Comparación de la calidad espermática entre la mitad izquierda y derecha del espermatóforo 65

Tabla 8. Variables morfométricas de hembras de distintas edades 67

Tabla 9. Correlaciones significativas entre áreas ocupadas por diferentes tipos de ovocitos y el peso de hembras de distintas edades 67

Tabla 10. Área ocupada por los diferentes tipos de ovocitos en hembras de distintas edades 69

Tabla 11. Variables morfométricas de hembras de 12 meses de edad de distinto tamaño 70

Tabla 12. Correlaciones significativas entre áreas ocupadas por diferentes tipos de ovocitos y el peso de hembras de 12 meses de edad de distintos tamaños 71

Tabla 13. Área ocupada por los diferentes tipos de ovocitos en hembras de 12 meses de edad de distinto tamaño 71

Tabla 14. Variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de hembras de distintas edades 72

Tabla 15. Composición bioquímica de la hemolinfa en hembras de distintas edades 74

Tabla 16. Composición bioquímica de ovario, hepatopáncreas y músculo en hembras de distintas edades 75

Tabla 17. Variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de hembras de 12 meses de edad y distintos tamaños 77

Tabla 18. Composición bioquímica de la hemolinfa de hembras de 12 meses y distintos tamaños 77

Tabla 19. Composición bioquímica de ovario, hepatopáncreas y músculo de hembras de 12 meses y distinto tamaño 78

Tabla 20. Variables morfométricas de machos de distintas edades 80

Tabla 21. Área ocupada por los diferentes tipos celulares en los testículos de camarones de distintas edades 81

Tabla 22. Variables morfométricas de machos de 12 meses y distinto tamaño 82

Tabla 23. Área ocupada por los diferentes tipos celulares en los testículos en camarones de 12 meses y distinto tamaño 83

Tabla 24. Variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de machos de distintas edades 84

Tabla 25. Composición bioquímica de la hemolinfa de machos de diferente edad 85

Tabla 26. Composición bioquímica de testículo, hepatopáncreas y músculo de machos de distintas edades 87

Tabla 27. Composición bioquímica de espermatóforo, vaso deferente y ámpula terminal en machos de distintas edades 89

Tabla 28. Variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de machos de 12 meses de edad y distintos tamaños 91

Tabla 29. Composición bioquímica de la hemolinfa de machos de 12 meses y distinto tamaño 93

Tabla 30. Composición bioquímica de testículo, hepatopáncreas y músculo de machos de 12 meses y distintos tamaños 94

Tabla 31. Composición bioquímica de espermatóforo, vaso deferente y ámpula terminal de machos de 12 meses y distinto tamaño 96

Tabla 32. Calidad espermática (media ± error estándar) de machos de distintas edades. 101

Tabla 33. Calidad espermática (media ± error estándar) de machos de 12 meses de edad y distintos tamaños 104

Tabla 34. Composición bioquímica inicial de los espermatóforos y en cada regeneración 107

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Zona anterior del ovario
ABD	Región abdominal del ovario
AD	Zona abdominal del ovario de la parte distal
AM	Zona abdominal del ovario de la parte media
ANCOVA	Análisis de covariancia
ANDEVA	Análisis de variancia
CEF	Región cefalotorácica del ovario
E	Espermátidas
EG	Espermatogonias
EP	Espermatocitos primarios
ES	Espermatocitos secundarios
IGS	Índice gonadosomático
NS	No significativo
OC	Ovocitos corticales
OMD	Ovocitos más desarrollados
OPV	Ovocitos previtelogénicos
ovo	Ovocitos
OVt	Ovocitos vitelogénicos tempranos
OVT	Ovocitos vitelogénicos tardíos
PL	Poslarva
PSA	Zona del ovario sobre el primer segmento abdominal
T	Zona torácica del ovario

INTRODUCCIÓN

La gran demanda de camarón que existe y su alto precio han hecho que sea un producto importante en las pesquerías mundiales. La producción mundial de camarón, incluyendo todas las especies, se estima entre 1.2 x 10^9 y 1.5 x 10^9 millones de toneladas y los expertos aseguran que la producción seguirá creciendo y que la parte más importante de la producción que crecerá será la de acuicultura (Filose, 2003). Así, el cultivo de camarón es una parte cada vez más importante del negocio global de alimentos y es la única forma de unir la brecha entre el crecimiento masivo en demanda de alimentos marinos y la disminución a nivel mundial de las pesquerías (APFA, 2000).

El cultivo de camarones penéidos ha sido una actividad productiva alrededor del mundo, representando 25-30 % del camarón disponible en el mercado (Filose, 2003). La producción mundial de camarón cultivado durante el año 2000 alcanzó 1'087,111 toneladas, lo que representa el 26.1 % del total desembarcado; mientras que para el 2001 la producción mundial de camarón cultivado fue de 1'266,840 toneladas (Anónimo, 2003a). En el ámbito mundial ha habido un importante cambio en los patrones de cultivo hacia *Litopenaeus vannamei* y el precio de *L. vannamei* mexicano continúa siendo el líder en el mercado norteamericano (Filose, 2003). En diciembre del 2002 el gobierno de Estados Unidos (principal mercado mundial) publicó que el camarón ocupó el primer lugar en consumo *per cápita* como producto de pescados y mariscos (Filose, 2003). En México, el consumo de camarón creció en más del 80 % entre 1999 y 2002 (Anónimo 2003b), y el camarón de granja se está convirtiendo en el producto de mejor precio con abasto continuo

y calidad uniforme por lo que se ha empezado a consolidar un mercado específico para el camarón cultivado (Sánchez-García, 2003).

El cultivo de camarón desde poslarva (PL) hasta talla comercial se realiza en granjas de engorda. Tradicionalmente y aún en la actualidad, el abastecimiento de PL ha dependido de organismos silvestres ya sea por captura directa de PL, por captura de adultos maduros para ser desovados en laboratorios de producción o captura de adultos sometidos a una posterior maduración y desove en laboratorios de producción. Esto limita la producción de las granjas camaronícolas a la temporada cuando se encuentran en disponibilidad los recursos. La expansión de la industria camaronícola depende del adecuado conocimiento del proceso de reproducción que permita desarrollar programas de domesticación (cerrar el ciclo desde reproducción en cautiverio y crecimiento de larvas hasta reproductores) para lograr un adecuado abastecimiento de nauplios, el cual debe garantizar una tasa de producción de postlarvas que satisfaga la creciente demanda de las granjas de engorda. A su vez, la domesticación permitiría establecer programas de reproducción selectiva (Benzie, 1997), lo que ha incrementado el interés en la domesticación de penéidos en todo el mundo (Wouters *et al*., 2001).

La reproducción exitosa en cautiverio de varias especies de camarón se ha logrado desde hace más de veinte años (ver revisiones de Browdy, 1992; Bray y Lawrence, 1992; Benzie, 1997). Dicha actividad contribuye cada vez más al abastecimiento de PL para las granjas de engorda. Sin embargo, una buena parte de los reproductores que se utilizan actualmente provienen aún del medio silvestre (Browdy, 1996; Wyban *et al*., 2002). El uso de reproductores silvestres limita la reproducción selectiva y el control en la propagación de enfermedades (Crocos *et al*., 2000; Wyban *et al*., 2002). Además, los reproductores

silvestres tienen una disponibilidad limitada y fluctuante debido a periodos de veda, tamaño de las poblaciones naturales y a la sobre-explotación del recurso silvestre que ha sido reportada por lo menos para algunos países asiáticos (Browdy, 1996).

Así, el uso de organismos de ciclo cerrado representa una estrategia viable con la que se podrían evitar las anteriores desventajas, además de que se podría optimizar a través de la domesticación el proceso de reproducción en términos de mayor cantidad y calidad de larvas para cultivo y a largo plazo podría facilitar el desarrollo de sistemas de cultivo cerrados. A pesar de ello, a nivel mundial el uso de reproductores de cultivo no ha sustituido el uso de reproductores silvestres dado que en varios casos se ha visto una superioridad en el desempeño reproductivo de los organismos silvestres (Menasveta *et al.*, 1993; Cavalli *et al.*, 1997; Mendoza, 1997). Sin embargo, también se han reportado resultados similares con organismos domesticados (Simon, 1982; Browdy *et al.*, 1986; Menasveta *et al.*, 1994; Palacios *et al*., 1999a; Crocos *et al*., 2000; Palacios y Racotta, 2003; Peixoto *et al*., 2003) o incluso se ha encontrado un mejor desempeño de los reproductores de cultivo (Wyban *et al*., 2002).

En la actualidad, varios países dependen exclusivamente de reproductores de cultivo o bien han llevado a cabo programas de domesticación exitosos por varias generaciones. El primer país en iniciar un programa de domesticación fue Francia en Tahití y Nueva Caledonia (Aquacop, 1983; Ottogalli *et al.*, 1988; Bédier *et al.*, 1998) donde cuentan con más de 20 generaciones de *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *Fenneropenaeus indicus* (Browdy, 1998). En Venezuela se reportaron en 1999, 17 generaciones para *L. vannamei* y 22 para *L. stylirostris* (Jory *et al.*, 1999). En Estados Unidos se inició un programa de domesticación a principios de los 90 con el fin primordial de obtener una línea libre de patógenos o SPF

(Wyban *et al.*, 1992). En Australia recientemente se han establecido criterios de selección de reproductores (Crocos y Coman, 1997), la influencia de generaciones sucesivas (Crocos *et al.*, 2000), las ventajas económicas del uso de reproductores domesticados en comparación con reproductores silvestres (Preston *et al.*, 1999; Crocos *et al*., 2000), la prioridad de lograr la domesticación de las especies cultivadas (APFA, 2000) y recientes avances en la domesticación y reproducción selectiva (Crocos *et al*., 2000).

En el caso de México, para la década de los 80 ya existían algunas iniciativas sobre el uso de reproductores domesticados de camarón azul *L. stylirostris*, pero revelaron una desventaja de éstos en comparación con su contraparte silvestre (Mendoza, 1997). Sin embargo, en la actualidad hay un interés creciente en las granjas camaronícolas por el uso de reproductores de ciclo cerrado como una alternativa a los reproductores silvestres (Palacios *et al*., 2000), entre las cuales es digno de mencionar un programa conjunto de la empresa Acuacultores de La Paz (APSA) con el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en el que se ha logrado exitosamente la producción de varias generaciones (Ibarra *et al*., 1997). El desempeño reproductivo de las primeras generaciones de esta línea domesticada fue comparado con el de organismos silvestres, mostrando que la condición fisiológica de los reproductores, su desempeño reproductivo y algunos indicadores de la calidad larvaria son similares entre ambos orígenes (Ibarra *et al.*, 1997; Palacios y Racotta, 1999; Palacios *et al.*, 1999a; Hernández-Herrera *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2000; Palacios y Racotta, 2003).

Parece claro que la utilización de reproductores domesticados es una estrategia viable para el sector camaronícola en México, dado que no sólo permitirá romper con las desventajas de los reproductores silvestres, sino que permitirá la realización de programas

de mejoramiento genético. Sin embargo, para implementar un programa de esa magnitud, se requiere un óptimo desempeño reproductivo, por lo cual es necesario un análisis más profundo del desarrollo gonádico y potencial reproductivo en condiciones de cautiverio con relación a la edad y el tamaño de los reproductores, lo cual permitirá seleccionar los rangos más adecuados para obtener la mayor cantidad de larvas de buena calidad.

El tamaño representa probablemente el criterio más usado a nivel de producción para seleccionar a los reproductores que serán transferidos al área de maduración. El tamaño está muy relacionado con la edad de los camarones. En el caso particular de *L. vannamei* todavía no es claro si la maduración, tanto de hembras como de machos, depende del tamaño o de la edad del organismo (Ogle, 1992). Debido a lo anterior, el evaluar el efecto del tamaño y edad, así como el establecer valores óptimos de edad/tamaño en los que se aumente la probabilidad de un buen potencial reproductivo, sería de gran impacto en el sector productivo.

Es importante señalar que el potencial reproductivo de los organismos al ser transferidos a condiciones de maduración dependerá en buena parte de la condición previa en la que se encuentran. Los indicadores más importantes relacionados con esta condición y que podríamos considerar son el grado de desarrollo ovárico basal (i.e. antes de la ablación del tallo ocular), la calidad espermática y los niveles de reservas energéticas, aspectos que también se analizan en el presente trabajo.

ANTECEDENTES

1. ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Litopenaeus vannamei*

1.1 Sistema reproductivo

La descripción anatómica del sistema reproductor de camarones penéidos se ha realizado para numerosas especies y se ha visto que no difiere entre ellas. Así, el sistema reproductor de las hembras (Fig. 1) consiste de los ovarios y oviductos. Los ovarios son cuerpos simétricos pareados fusionados parcialmente de manera bilateral, presentan lobulaciones y se extienden desde la región cardíaca del estómago al telson (Browdy, 1992). Los lóbulos abdominales corren a lo largo del abdomen junto con el intestino. En la región cefalotorácica se extienden desde cada lado del ovario un lóbulo anterior y lóbulos laterales a manera de dedos (King, 1948). Los oviductos se originan en la punta del sexto o séptimo lóbulo lateral y descienden al aparato genital externo hasta la coxa del tercer par de pereiópodos (Cummings, 1961). El télico (Fig. 1b) está estructuralmente desarrollado en hembras de 34.5-42.0 mm de longitud y listo para recibir espermatóforos (Quinitio *et al.*, 1993).

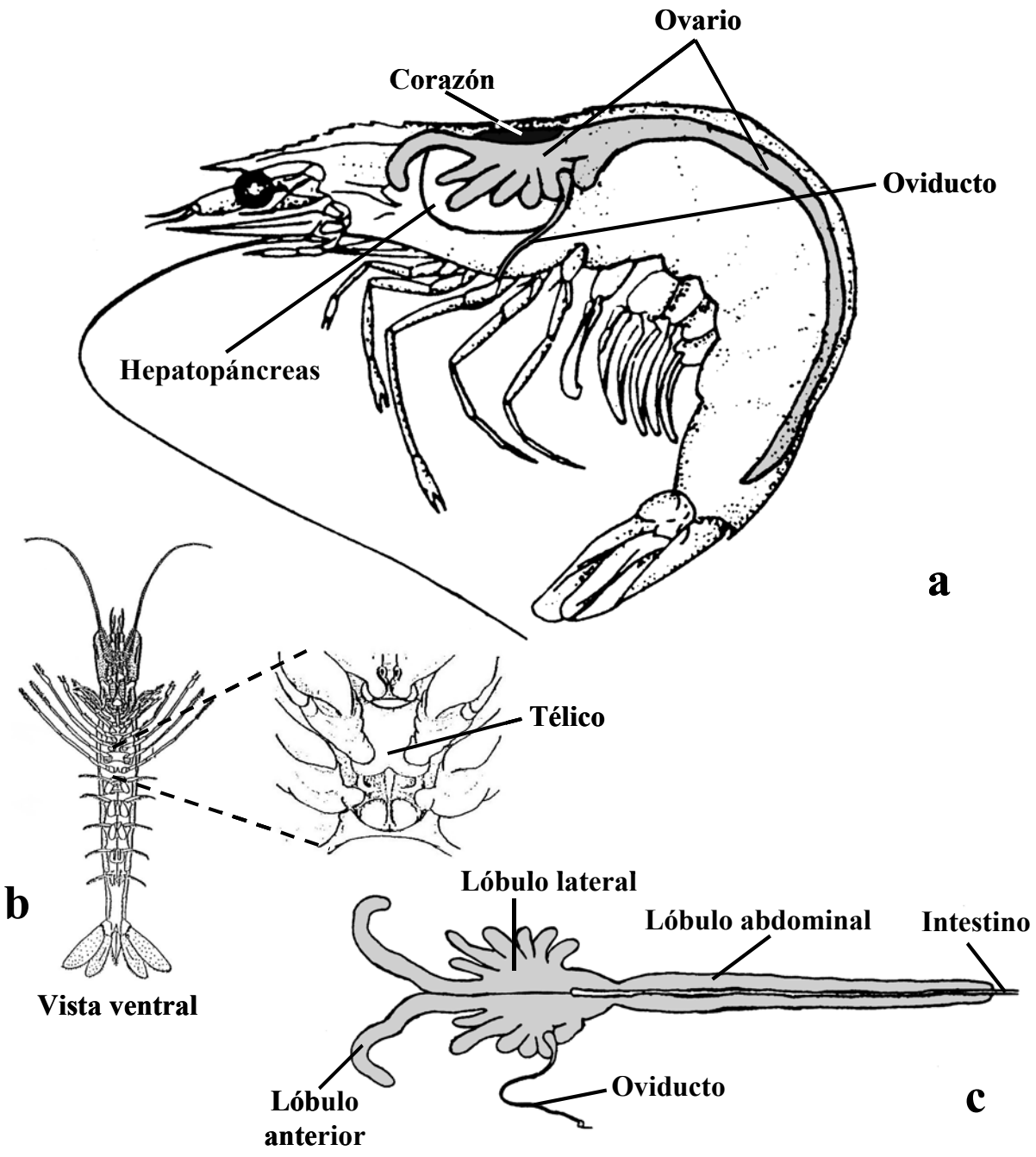

Fig. 1. Sistema reproductivo femenino de camarones penéidos. **a)** Localización anatómica, **b)** localización del télico, **c)** vista dorsal del sistema reproductivo aislado (modificado de Alfaro, 2001).

Por su parte, se han hecho varias descripciones del sistema reproductor masculino (Fig. 2) (King, 1948; Talbot *et al.*, 1989; Ro *et al.*, 1990; Bauer y Cash, 1991), el cual consiste de testículo y vaso deferente. Los testículos son pareados y están conformados por un lóbulo anterior y lóbulos laterales a manera de dedos que se extienden desde cada lado del testículo (Browdy, 1992). Cada uno tiene una conexión independiente con el vaso deferente vía los túbulos colectores (Chow *et al.*, 1991a). El vaso deferente pareado consiste de cuatro regiones distintas: proximal, media (ascendente y descendente), distal y una región muscular altamente dilatada llamada ámpula terminal dentro de la cual se termina de formar el espermatóforo (Browdy, 1992). Durante la cópula las dos mitades del espermatóforo son expulsadas de las ámpulas terminales a través del gonoporo y ambas mitades se ensamblan fuera del cuerpo para formar un espermatóforo completo que presenta estructuras que le facilitan el anclaje sobre la superficie del télico de la hembra (King, 1948; Ro *et al.*, 1990; Chow *et al.*, 1991b).

Además, el macho tiene una estructura especializada llamada petasma (Fig. 2b) que se forma a partir de estructuras membranosas que son resultado de modificaciones de endopoditos del primer par de pleópodos, las cuales se unen para formar este órgano copulatorio que sirve para la transferencia del espermatóforo al télico de la hembra (King, 1948). El petasma en juveniles está separado en dos partes y se une en una sola estructura en subadultos, por ejemplo a los 105-107 mm en *L. setiferus* (Bray y Lawrence, 1992). Los machos están funcionalmente maduros cuando el petasma está totalmente formado, por lo que la maduración sexual en machos se ha asociado con cambios en la estructura de los genitales externos (Tirmizi y Javed, 1976).

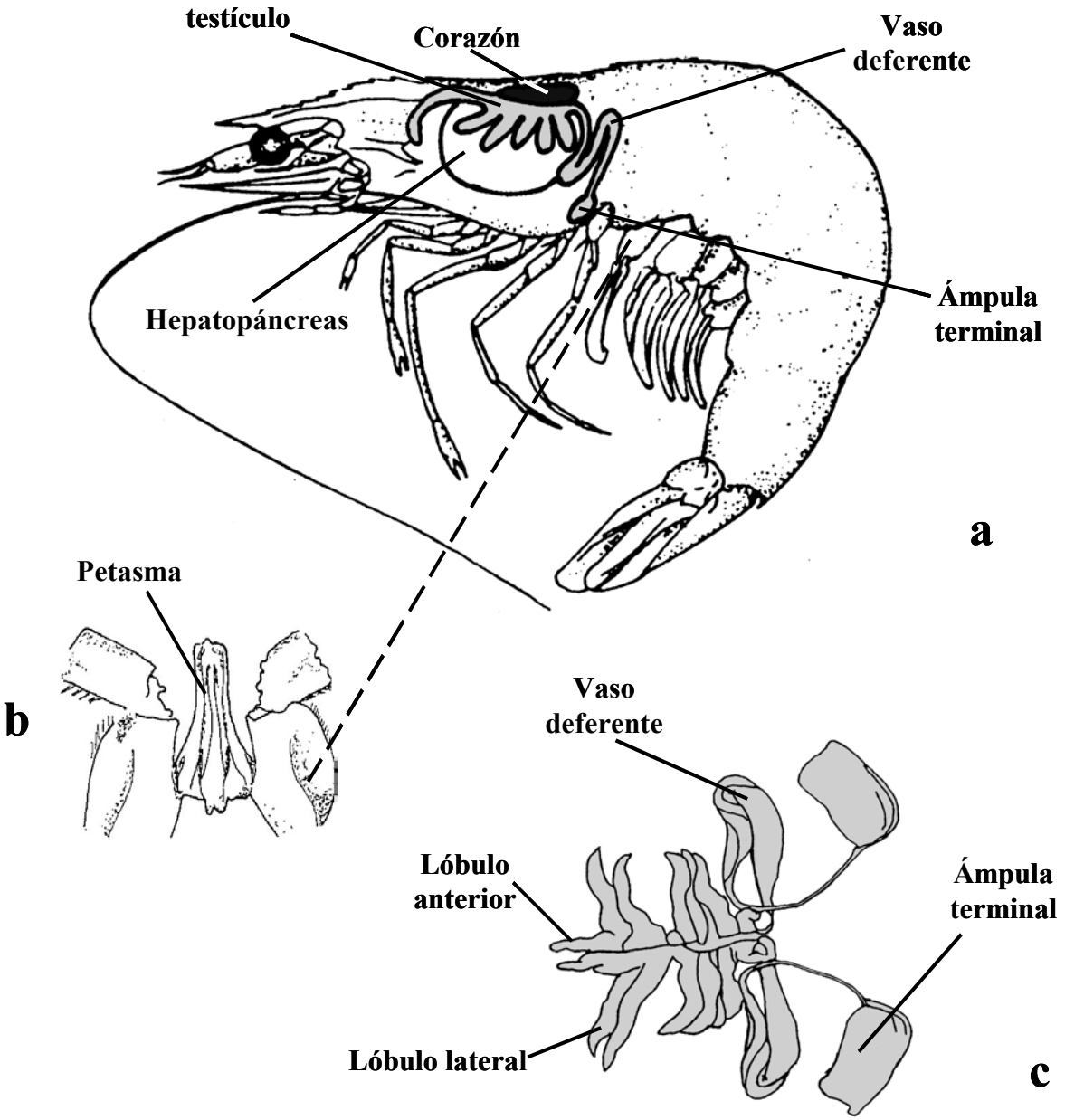

Fig. 2. Sistema reproductivo masculino de camarones penéidos. **a)** Localización anatómica, **b)** petasma, **c)** vista dorsal del sistema reproductivo aislado (modificado de Alfaro, 2001).

1.2 Maduración gonádica

La maduración del ovario es un proceso continuo; que sin embargo para su estudio se divide en varios estadios de desarrollo en base a características morfocromáticas o histológicas (Tabla 1). A nivel macroscópico, la maduración ovárica va acompañada de cambios de color y tamaño, cambios que son visibles a través del exoesqueleto de los camarones. Esto ha favorecido el desarrollo de diferentes escalas de maduración morfocromáticas con las que se puede asignar un estadio de madurez sin necesidad de un análisis microscópico (Tabla 1). Como consecuencia, son una herramienta útil en los laboratorios de maduración, pues se pueden asignar sin sacrificar a la hembra. Sin embargo, esta escala es subjetiva e inconsistente, dado que se ha determinado que las hembras silvestres son evaluadas más exitosamente que las hembras domesticadas, especialmente durante el estadio cortical debido principalmente a que los ovarios de las hembras silvestres son más brillantes en color (Palacios *et al.*, 2003).

Por su parte, la caracterización histológica de los diferentes estadios o fases de desarrollo ovárico ha sido ampliamente estudiada en varias especies de penéidos (Yano, 1983; Yano, 1988; Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Mohamed y Diwan, 1994; Medina, *et al.* 1996; Sandoval-Quintero y Gracia, 1998) y se han propuesto diferentes escalas (Tabla 1, Fig. 3). Existen escalas que dividen el proceso de gametogénesis tan detalladamente que hacen que las escalas sean poco prácticas. Actualmente la tendencia en este aspecto es hacer escalas sencillas y prácticas.

Tabla 1. Tabla comparativa de las diferentes escalas descritas de los estadios de desarrollo ovárico. En los casos donde se describen también escalas morfocromáticas, los estadios se presentan sombreados.

Yano, 1983 *M. japonicus*		Yano, 1988 *M. japonicus*	Tan-Fermin y Pudadera, 1989 *P. monodon*		Mohamed y Diwan, 1994 *F. indicus*		Sandoval-Quintero y Gracia, 1998 *F. brasiliensis*		Medina, *et al.* 1996 *P. kerathurus*
ESTADIO I Translúcidos y blancos	INMADURO Sinapsis Nucleolo cromatina Perinucleolo temprano 10-80 µm	MULTIPLICACIÓN Sinapsis 10 µm	ESTADIO 0 Sin color, blanco o color carne	PREVITELOGÉNICO Ovogonias ovocitos primarios 50-70 µm	ESTADIO I Translúcido	INMADURO Ovogonias primarias y secundarias Primarios 21-39 µm	ESTADIO I Translúcido	INMADURO ovogonias ovocitos basófilos 24-32 µm	PREVITELOGÉNICO Ovogonias y previtelogénicos 17-65 µm
ESTADIO II Naranja claro translúcido	INMADURO-EN DESARROLLO Perinucleolo tardío 68-88 µm	PREVITELOGÉNICO Nucleolo cromatina Perinucleolo temprano Perinucleolo tardío 16-88 µm					ESTADIO II Crema	EN DESARROLLO Basófilos con células foliculares 75-82 µm	
ESTADIO III verde claro opaco	EN DESARROLLO Glóbulo de aceite I Glóbulo de aceite II Sin vitelo Gránulos de vitelo primario y secundario 80-237 µm	VITELOGÉNESIS PRIMARIA Glóbulo de aceite I Glóbulo de aceite II Sin vitelo 80-146 µm	ESTADIOS I y II De gris verde a azul verde	VITELOGÉNICO ovocitos vitelogénicos 240-260 µm	ESTADIO II Crema pálido (ovario suave)	EN MADURACIÓN TEMPRANA 103-148 µm	ESTADIO III Verde claro	MADURO TEMPRANO Acidófilos 184-192 µm	VITELOGÉNICO TEMPRANO En vitelogénesis temprana 80-100 µm
		VITELOGÉNESIS SECUNDARIA Gránulos de vitelo Premaduro 128-264 µm			ESTADIO III Verde claro	EN MADURACIÓN TARDÍA 167-206 µm			VITELOGÉNICO TARDÍO Vitelogénicos 100-200 µm
ESTADIO IV Verde obscuro opcaco	MADURO Premaduro Maduro 200-288 µm	MADURACIÓN Maduro 224-288 µm	ESTADIOS III y IV De verde olivo a verde obscuro	BASTONES CORTICALES Ovocitos con bastones corticales 320-360 µm	ESTADIO IV Verde obscuro	MADURO 224-258 µm	ESTADIO IV Verde olivo	MADURO Acidófilos con cuerpos periféricos 227-235 µm	MADURO Corticales > 200 µm
	No se describe	No se describe	ESTADIO V Sin color o con parches blancos y/overdes	DESOVADO ovocitos residuales vitelogénicos y/o con bastones corticales 170 µm	ESTADIO V Crema pálido (ovario flácido)	DESOVADO/ DESOVADO EN RECUPERACIÓN 20-30 µm	ESTADIO V Blanquecino no translúcido	DESOVADO En reabsorción	DESOVADO O EN DEGENERACIÓN Atrésicos

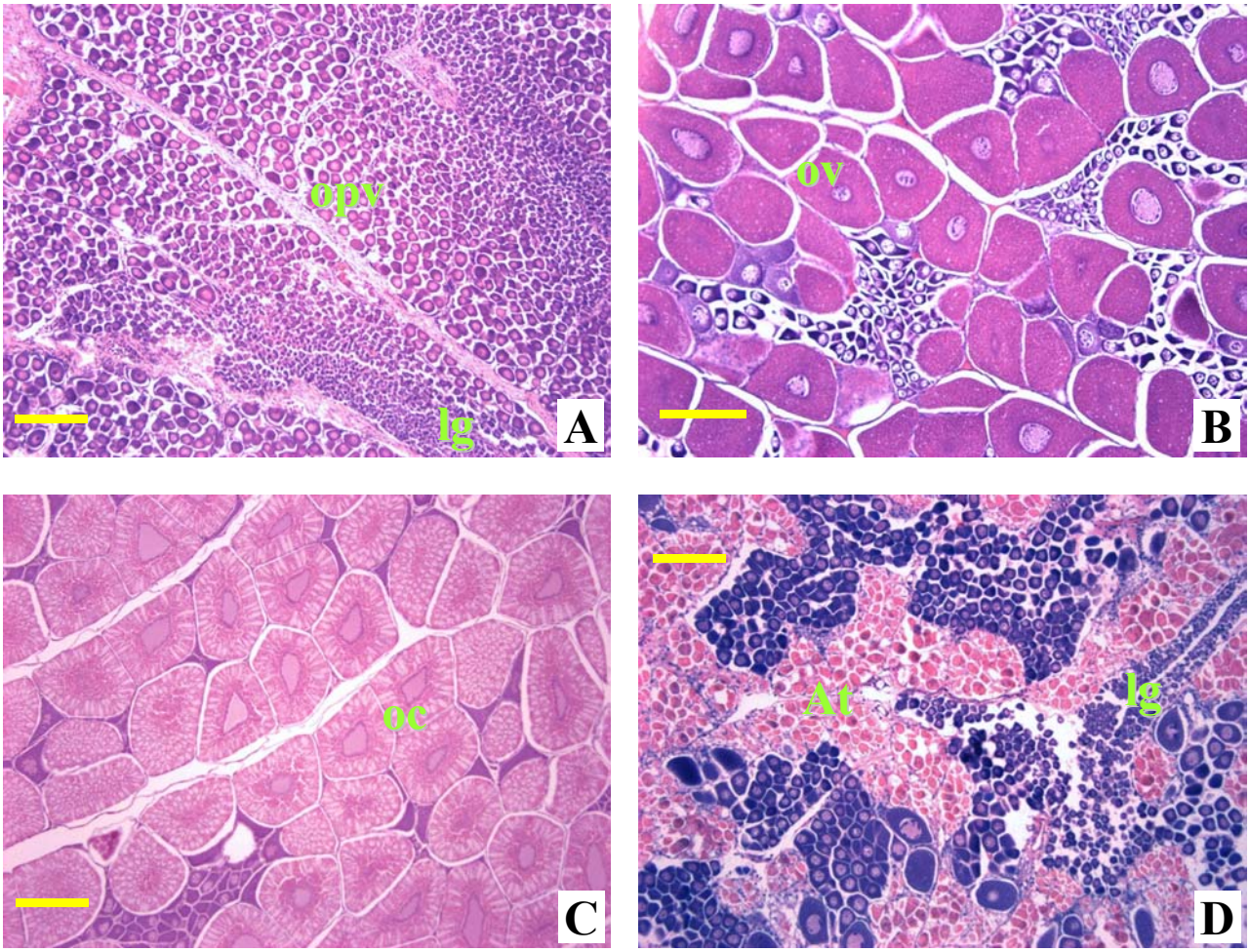

Figura 3. Micrografías de secciones transversales de ovarios en los estadios de desarrollo ovárico de acuerdo con Tan-Fermin y Pudadera (1989). A) previtelogénico, B) vitelogénico, C) bastones corticales y D) desovado. Barra de escala = 200 µm, excepto para B, donde barra de escala = 150 µm. Micrografías obtenidas en el presente estudio.

Abreviaturas: **At**, ovocitos corticales residuales atrésicos; **lg**, línea germinal; **oc**, ovocitos corticales; **opv**, ovocitos previtelogénicos; **ov**, ovocitos vitelogénicos.

Tabla 2. Tabla comparativa de las diferentes escalas descritas de los estadios de desarrollo de los ovocitos.

<table>
<tr><th>Yano, 1983
M. japonicus</th><th>Yano, 1988
M. japonicus</th><th>Tan-Fermin y Pudadera, 1989
P. monodon</th><th>Mohamed y Diwan, 1994
F. indicus</th></tr>
<tr><td>Ovogonias</td><td>Ovogonias</td><td rowspan="2">Ovogonias</td><td>Ovogonias primarias</td></tr>
<tr><td>Sinapsis</td><td>Sinapsis</td><td>Ovogonias secundarias</td></tr>
<tr><td>Nucléolo cromatina</td><td>Nucléolo cromatina</td><td rowspan="3">ovocitos primarios</td><td rowspan="2">Previtelogénicos</td></tr>
<tr><td>Perinucléolo temprano</td><td>Perinucléolo temprano</td></tr>
<tr><td>Perinucléolo tardío</td><td>Perinucléolo tardío</td><td rowspan="2">Vitelogénicos tempranos</td></tr>
<tr><td>Glóbulo de aceite I</td><td>Glóbulo de aceite I</td><td rowspan="5">ovocitos vitelogénicos</td></tr>
<tr><td>Glóbulo de aceite II</td><td>Glóbulo de aceite II</td><td rowspan="4">Vitelogénicos tardíos</td></tr>
<tr><td>Sin vitelo</td><td>Sin vitelo</td></tr>
<tr><td>Gránulos de vitelo primario</td><td rowspan="2">Gránulos de vitelo</td></tr>
<tr><td>Gránulos de vitelo secundario</td></tr>
<tr><td>Premaduro</td><td>Premaduro</td><td rowspan="2">Ovocitos con bastones corticales</td></tr>
<tr><td>Maduro</td><td>Maduro</td><td>Maduros</td></tr>
<tr><td>No se describe</td><td>No se describe</td><td>Ovocitos atrésicos (Características similares a ovocitos en fase de glóbulo de aceite I descrito por Yano 1988)</td><td>Vitelogénicos tempranos en reabsorción</td></tr>
</table>

En el caso de los machos, no se ha enfatizado en la valoración visual de los testículos ni en la asignación de estadios de desarrollo. Su maduración se ha asociado principalmente con cambios en la estructura de los genitales externos (petasma) (Tirmizi y Javed, 1976), y en cambios histológicos que ocurren en los testículos y ámpulas terminales

de los vasos deferentes (Ro *et al.*, 1990). En cambio, los estudios en machos se han enfocado, dada su importancia en la producción de larvas, a evaluar la calidad o viabilidad espermática o del espermatóforo (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987a; Alfaro, 1993; Gomes y Honculada-Primavera, 1993; Pratoomchat *et al*., 1993), el proceso de formación del espermatóforo (Chow *et al*., 1991b; Heitzman *et al.*, 1993), los factores que afectan la formación del espermatóforo (Alfaro y Lozano, 1993; Alfaro, 1996; Pascual *et al*., 1998) o bien para evaluar el efecto de enfermedades sobre la calidad espermática (Talbot *et al*., 1989).

De cualquier forma, la maduración gonádica implica una secuencia de eventos celulares (gametogénesis), bioquímicos (acumulación y transporte de nutrientes) y fisiológicos (control hormonal) concatenados para la producción de gametos, eventos que son más evidentes en el caso de las hembras aunque no necesariamente más importantes que en machos.

1.2.1 Gametogénesis

1.2.1.1 Ovogénesis

En el caso de las hembras se han hecho descripciones citológicas detalladas de los ovocitos durante la maduración ovárica y se han propuesto de 4 a 11 estadios diferentes para camarones penéidos (Tabla 2) (Yano, 1983; Yano, 1988; Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Mohamed y Diwan, 1994). En general, la ovogénesis es muy similar en diferentes especies de penéidos. Inicia con la entrada de ovogonias en meiosis y la proliferación de ovocitos. Las ovogonias están presentes en la zona germinal del ovario y están en proceso de división mitótica continua durante la vida de la hembra. La meiosis inicia y se detiene en

la etapa de profase I, punto en el cual las ovogonias salen de la zona germinal y pasan a ser ovocitos primarios o previtelogénicos, caracterizados porque no están rodeados por células foliculares. Durante esta fase se lleva a cabo un ligero crecimiento de los ovocitos, producto de la proliferación de ribosomas y el desarrollo de retículo endoplásmico rugoso (previtelogénesis), lo cual es importante para la activación del siguiente proceso: la vitelogénesis primaria (Alfaro, 1994). Durante la vitelogénesis primaria, también denominada temprana o endógena, los ovocitos incrementan su tamaño como resultado de la síntesis de proteínas endógenas, principalmente glicoproteínas (Charniaux-Cotton, 1985; Harrison, 1990). Al inicio de la vitelogénesis primaria, los ovocitos se encuentran libres en el lumen del ovario y sin células foliculares a su alrededor (Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Alfaro, 1994), pero conforme avanza el proceso de vitelogénesis primaria, las células foliculares van rodeando a cada ovocito. Según la nomenclatura de Yano (1988), el inicio de la vitelogénesis primaria corresponde al estadio de ovocitos en la fase I de glóbulo de aceite.

La vitelogénesis secundaria, también llamada, tardía o exógena, es el proceso durante el cual se sintetiza y acumula vitelo y se caracteriza por un rápido crecimiento sincrónico de un grupo de ovocitos en desarrollo. Durante la vitelogénesis secundaria, la acumulación de vitelo es exógena, y, es consecuencia de una transferencia de compuestos bioquímicos provenientes de la dieta o bien de reservas en órganos como el hepatopáncreas, el tejido adiposo subepidérmico y las células foliculares (Harrison, 1990; Browdy, 1992).

Al final de la vitelogénesis secundaria y previo al desove, se forman los bastones corticales en la periferia de los ovocitos (King, 1948; Cummings, 1961, Duronslet *et al.*, 1975; Clark *et al.*, 1980; Anderson *et al.*, 1984). Esta fase de especialización cortical es de

los últimos estadios postvitelogénicos de la ovogénesis e inicia aproximadamente 90 h antes del desove en *S. ingentis* (Anderson *et al.*, 1984; Clark y Pillai, 1991). En la fase de ovocitos corticales ocurre el rompimiento de la vesícula germinal, este es un proceso asincrónico que puede durar más de 24 horas pero que siempre se completa antes de la ovulación (Anderson *et al.*, 1984). En contraste, la ovulación ocurre en unas pocas horas y cuando los ovocitos se encuentran libres dentro del ovario el desove es inminente. El tiempo más largo reportado desde la ovulación hasta el desove es de 4 h para *S. ingentis* y se requiere menos de un minuto para completar la evacuación (Anderson *et al.*, 1984). En los ovocitos ovulados la meiosis está detenida (1ª metafase) hasta antes de entrar en contacto con el agua. Cuando los ovocitos entran en contacto con el agua, se libera el contenido de los bastones corticales en unos tres minutos (Clark y Pillai, 1991).En seguida, se forma la capa gelatinosa que rodea al ovocito y, al mismo tiempo se lleva a cabo la liberación del primer cuerpo polar; después se forma la envoltura extracelular de eclosión y enseguida se libera el segundo cuerpo polar con lo que finaliza la ovogénesis (Clark y Pillai, 1991). El tiempo que tardan en liberarse los corpúsculos polares depende de la temperatura y de la condición reproductiva previa de la hembra y puede variar entre especies. En *Fenneropenaeus chinensis* los cuerpos polares se liberan 25-35 minutos después del desove a una temperatura de 29-32 ºC (Li *et al*., 2003), mientras que en *L. vannamei* se liberan entre 8 y 15 minutos después del desove a una temperatura de 28 ºC (Dumas y Campos-Ramos, 1999).

1.2.1.2 Espermatogénesis

El proceso de espermatogénesis se ha estudiado ampliamente en *Sicyonia ingentis* (Shigekawa y Clark, 1986). La espermatogénesis puede ser sincrónica como en *L. stylirostris* y *Trachypenaeus byrdi* (Alfaro, 1994), o asincrónica como en *Sycyonia ingentis* (Shigekawa y Clark, 1986). Sin embargo, se ha confirmado que especies de *Litopenaeus* presentan un desarrollo asincrónico de las células espermatogénicas y que las condiciones de cautiverio pueden incrementar dicha asincronía (Talbot *et al.*, 1989; Chow *et al.*, 1991a).

De manera general, la espermatogénesis inicia con la proliferación de espermatogonias, las cuales entran en proceso de división mitótica continua a partir de la primera madurez y durante toda la vida del macho. Las espermatogonias presentan un ligero crecimiento y pasan a ser espermatocitos. Las divisiones meióticas de los espermatocitos, que se llevan a cabo en el testículo, producen las espermátidas. Posteriormente las espermátidas pasan por el proceso de espermiogénesis para alcanzar la madurez. Sin embargo, se ha observado que la maduración completa de las espermátidas sucede en diferentes momentos dependiendo del tipo de estrategia reproductiva de la especie. Así, en especies de télico abierto la maduración final sucede dentro del vaso deferente (Shigekawa y Clark, 1986; Alfaro, 1994), mientras que en especies de télico cerrado la maduración no parece completarse en el sistema reproductor masculino sino que se lleva a cabo en el télico de la hembra después de la cópula (Alfaro, 1994).

1.2.2 Eventos bioquímicos

Durante el proceso de maduración gonádica en hembras, el peso de los ovarios puede incrementarse de cuatro a nueve veces en aproximadamente una semana (Mourente y Rodríguez, 1991; Ravid *et al*., 1999; Wouters *et al*., 1999b). El incremento de peso se debe a la acumulación de nutrientes en el vitelo, los cuales deben sostener el desarrollo normal de los embriones y el periodo de pre-alimentación de las larvas (Wouters *et al*., 2001; Racotta *et al*., 2003). Como se mencionó anteriormente, dicha acumulación de vitelo se debe a la producción endógena de los ovocitos durante la maduración temprana y a la movilización y transporte de reservas desde otros tejidos hacia la gónada.

Aunado de la acumulación cuantitativa de vitelo, existen cambios en la composición bioquímica en el ovario de los crustáceos decápodos a lo largo del proceso de maduración (Castille y Lawrence, 1989; Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994). El cambio más aparente y mejor documentado es el incremento progresivo de lípidos conforme avanza la maduración (Gehring, 1974; Kulkarni y Nagabhushanam, 1979; Galois, 1984; Castille y Lawrence, 1989; Teshima *et al*., 1989; Millamena y Pascual, 1990; Mourente y Rodríguez, 1991; Millamena *et al*., 1993; Spaargaren y Haefner, 1994; Palacios *et al*., 2000). Sin embargo, también se ha reportado que al final de la maduración los lípidos ya no se incrementan e incluso disminuyen en el estadio de madurez (Gehring, 1974; Millamena y Pascual, 1990). Los acilglicéridos se han identificado como la clase de lípidos que se acumulan preferentemente durante la maduración del ovario (Galois, 1984; Teshima *et al*., 1989; Mourente y Rodríguez, 1991; Palacios *et al*., 2000). Para los fosfolípidos y el colesterol existen resultados contrastantes, ya que algunos reportan que aumentan en relación con el proceso de maduración (Galois, 1984; Mourente y Rodríguez, 1991;

Palacios *et al*., 2000), mientras que otros reportan que no hay una relación evidente (Teshima *et al*., 1989).

Las proteínas también presentan un patrón de acumulación similar al de los lípidos (Kulkarni y Nagabhushanam, 1979; Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994; Sarojini *et al*., 1995; Palacios *et al*., 2000). Por otro lado, el papel de los carbohidratos en el proceso de maduración es aún incierto ya que algunos trabajos (Castille y Lawrence, 1989; Kulkarni y Nagabhushanam, 1979) han reportado que existe un incremento en relación con el desarrollo gonádico, mientras que otros no reportan cambios (Mohamed y Diwan, 1992; Sarojini *et al*., 1995; Palacios *et al*., 2000).

Aunado a la acumulación cualitativa y cuantitativa de nutrientes en el ovario durante la maduración, se ha establecido que las reservas almacenadas en el hepatopáncreas se movilizan hacia el ovario, principalmente durante las últimas fases de madurez (Teshima *et al*., 1988; Castille y Lawrence, 1989; Teshima *et al*., 1989; Millamena y Pascual, 1990; Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994; García *et al*., 1995). Al parecer esta transferencia se lleva a cabo durante el proceso de vitelogénesis secundaria (Harrison, 1990), dado que la disminución de lípidos en el hepatopáncreas se presenta en estadios avanzados de maduración ovárica (Teshima *et al*., 1989; Millamena y Pascual, 1990; Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994). Sin embargo, en otros trabajos no se han reportado cambios en la concentración de lípidos en el hepatopáncreas durante la maduración ovárica (Mourente y Rodríguez, 1991; Millamena *et al*., 1993; Palacios *et al*., 2000). En estos casos es posible que el aporte de lípidos directo de la dieta haya sido suficiente para sostener el proceso de maduración ovárica o que existan diferentes estrategias de transferencia de lípidos a los ovarios entre especies.

La hemolinfa constituye la vía de transporte para que exista acumulación de nutrientes en el ovario, ya sea a partir de la dieta o de órganos de almacenamiento. En *F. indicus*, los niveles de vitelogenina en hemolinfa fueron bajos en hembras inmaduras, se incrementaron en hembras en maduración, fueron máximos en hembras completamente maduras y disminuyeron en hembras desovadas (Quinitio y Millamena, 1992). De manera similar, en *L. vannamei* se encontraron mayores niveles de vitelina en hembras que presentaron ovocitos vitelogénicos y corticales (Arcos *et al.*, 2003a). Sin embargo, aún cuando se ha reportado que los cambios en la composición de la hemolinfa reflejan parcialmente lo que ocurre en el ovario (Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994; Vázquez-Boucard, 1990; Arcos *et al*., 2003a), no se trata de una situación generalizada dado que en otros trabajos no se reportan cambios en los niveles de proteínas y lípidos totales en la hemolinfa en relación con el desarrollo gonádico (Galois, 1984; Palacios *et al*., 2000).

Dado el ciclo de acumulación y transferencia de nutrientes entre el hepatopáncreas y el ovario, los niveles de estos nutrientes en los distintos compartimentos tisulares involucrados pueden ser un reflejo de un adecuado proceso de maduración, o de la condición fisiológica asociada al proceso de maduración gonádica. Como ejemplo, las hembras que acumularon más acilglicéridos y proteínas en el hepatopáncreas presentaron la capacidad de remadurar varias veces, por lo que se ha sugerido la posibilidad de utilizar indicadores metabólicos de la capacidad de desoves múltiples (Palacios *et al*., 2000; Arcos *et al*., 2003b).

En el caso de los machos, no se observa un ciclo de desarrollo gonadal bien definido como en las hembras (Castille y Lawrence, 1989); como consecuencia, se ha reportado que

los cambios en la composición bioquímica de los testículos de algunos crustáceos decápodos son menos pronunciados que en los ovarios (Pillay y Nair 1971; Pillay y Nair 1973).

En *Farpantepenaeus aztecus* y *L. setiferus*, Castille y Lawrence (1989) determinaron que el componente más abundante en testículos y en la combinación de vasos deferentes-ámpulas terminales es la proteína, cuya concentración fue significativamente mayor en machos maduros en comparación con machos en desarrollo. En el mismo estudio se determinó que los lípidos no difirieron entre estadios de madurez en la combinación de vasos deferentes-ámpulas terminales ni en el hepatopáncreas entre los estadios de madurez en machos. Castille y Lawrence (1989) concluyeron que las diferencias reportadas son debidas a diferencias relacionadas con la talla y la edad de los camarones. Uno de los objetivos de la presente tesis es profundizar en este punto.

1.2.3 Control hormonal

En crustáceos decápodos existen seis centros endocrinos que se han propuesto como reguladores directos de la reproducción (Fig. 4a). El primero es el sistema neurosecretor órganoX-glándula sinusal, localizado en el ganglio óptico; los otros son el cerebro, el ganglio torácico, el órgano mandibular, la glándula androgénica (machos) y los ovarios (Fingerman, 1987; Huberman, 2000; Alfaro, 2001). El mecanismo propuesto para el control de la maduración gonadal es un modelo antagonista (Fig. 4b), el cual involucra la síntesis de una hormona inhibidora de la gónada que inhibe o compite con una probable hormona estimuladora de la gónada (Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Quackenbush, 1992; Browdy, 1992; Alfaro, 2001).

Adicionalmente, se ha encontrado que el farnesoato de metilo, secretado por el órgano mandibular, juega un papel importante en el proceso reproductivo (Homola *et al.*, 1991; Laufer *et al*., 1993; Sagi *et al*., 1994) y en la conducta de apareamiento (Sagi *et al*., 1994). La secreción de farnesoato de metilo por el órgano mandibular está regulada por la glándula del seno y recientemente se ha identificado parcialmente una hormona inhibidora del órgano mandibular en el órgano X (Huberman, 2000). Asimismo, se ha encontrado que la hormona concentradora de pigmentos rojos y la hormona dispersadora de pigmentos, además de controlar la síntesis de pigmentos en los cromatóforos estimulan (hormona concentradora de pigmentos rojos) o inhiben (hormona dispersadora de pigmentos) la síntesis de farnesoato de metilo (Landau *et al*., 1989). Por último, la 5-hidroxitriptamina y la dopamina al parecer también juegan un papel en el proceso reproductivo. La 5-hidroxitriptamina dispara la liberación de hormona estimuladora de la gónada tanto en machos como en hembras (Richardson *et al*., 1991), y la dopamina inhibe la maduración gonádica, también en machos y hembras, aparentemente por inhibición de la liberación de hormona estimuladora de la gónada y tal vez también por la estimulación de la liberación de hormona inhibidora de la gónada (Sarojini *et al*., 1996).

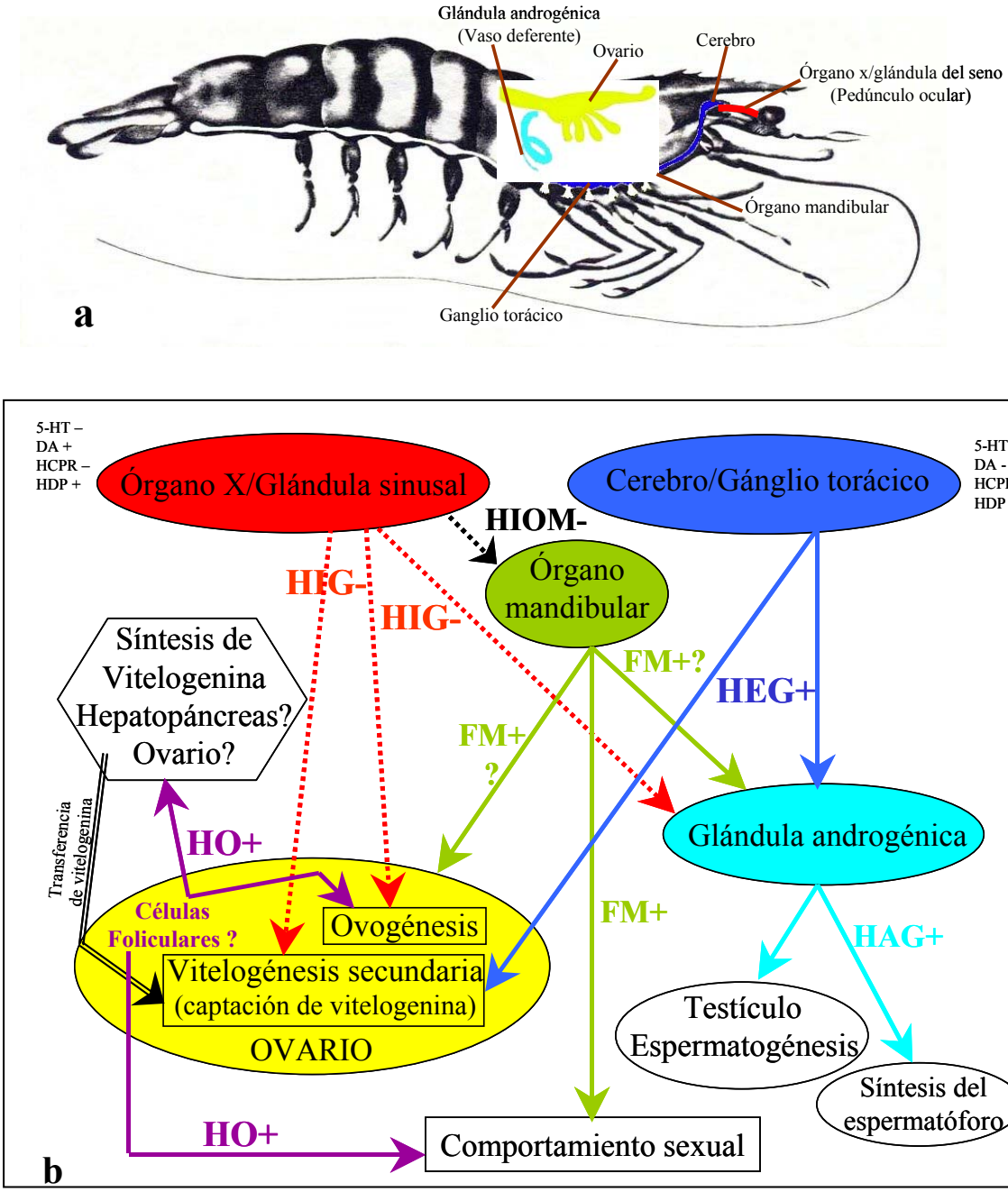

Figura 4. (a) Localización anatómica de los centros endocrinos involucrados en la reproducción de crustáceos decápodos (se representan ambos sexos en el esquema). **(b)** Vías propuestas en el control endócrino de su reproducción (modificado de Alfaro, 2001). Las líneas continuas indican un efecto estimulatorio (+). Las líneas punteadas indican un efecto inhibidor (-). Los signos de interrogación indican vías no confirmadas. 5-HT: serotonina, DA: dopamina, FM: farnesoato de metilo, HAG: hormona androgénica, HCPR: hormona concentradora de pigmento rojo, HEG: hormona estimuladora de la gónada, HIG: hormona inhibidora de la gónada, HIOM: hormona inhibidora del órgano mandibular, HO, hormona ovárica, ME: metionina.

1.3 Potencial reproductivo

El potencial reproductivo en hembras está asociado a la fecundidad, calidad de huevos y capacidad de remaduraciones sucesivas, que a su vez, dependen del desarrollo gonádico.La maduración gonádica finalmente determina el número de huevos que se van a producir (fecundidad). Sin embargo, la producción de postlarvas depende de una alta tasa de fertilización, por lo que también se debe asegurar un buen potencial reproductivo de los machos, el cual está asociado a una alta calidad espermática, a la capacidad de regeneraciones consecutivas del espermatóforo y a una alta producción de espermatozoides viables.

Una forma de evaluar el potencial reproductivo es medir el rendimiento en el desempeño reproductivo (i. e. número de desoves, tasas de fertilización y de eclosión, etc.) en condiciones de producción. Por ejemplo, se han hecho comparaciones del desempeño reproductivo de varias especies entre camarones silvestres y cultivados (Simon, 1982; Browdy *et al.*, 1986; Menasveta *et al.*, 1993; Menasveta *et al.*, 1994; Cavalli *et al.*, 1997; Mendoza, 1997; Palacios *et al.*, 1999b; Crocos *et al.*, 2000, Peixoto *et al*., 2003; Racotta *et al*., 2003).

A nivel de producción, se ha descrito que existe una gran variabilidad en el desempeño reproductivo tanto de las hembras como de los machos (Browdy *et al.*, 1986; Alfaro, 1993; Menasveta *et al.*, 1993; Pratoomchat *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1995; Crocos y Coman, 1997; Mendoza, 1997), y al menos para hembras se ha establecido que esta variación tiene un componente genético (Arcos *et al*., sometido). Se ha observado que los reproductores silvestres presentan una mejor tasa de fertilización, tasa de eclosión y un

mayor número de nauplios (Menasveta *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1995; Mendoza, 1997) por lo que se asume que presentan un mayor potencial reproductivo. Por otra parte, se ha estimado que una proporción relativamente baja de hembras que tienen un alto potencial reproductivo, puesto que presentan la capacidad de desoves múltiples, contribuyen a la mayor parte de la producción de nauplios (Bray *et al.*, 1990; Wyban y Sweneey, 1991; Palacios *et al.*, 1999a; Arcos *et al*., 2003b).

En el caso de los machos, aquellos con capacidad de regeneraciones consecutivas del espermatóforo y con una alta calidad espermática son los que tienen el mayor potencial reproductivo e impactan de forma importante la producción de poslarvas en cultivo (Díaz *et al.*, 2001). Se ha observado que a nivel de producción existe una relación directa entre el potencial reproductivo y el peso (Leung-Trujillo y Lawrence, 1991; Pratoomchat *et al.*, 1993) o la edad del reproductor (Pérez y Ceballos, 1995).

Sin embargo, existen varios factores que reducen el potencial reproductivo de los machos, tales como una mala adhesividad del espermatóforo, enfermedades en el tracto reproductivo, tiempo de confinamiento, temperatura y estimulación eléctrica aplicada para liberar el espermatóforo (Aquacop, 1983; Chamberlain *et al.*, 1983; Bray *et al.*, 1985; Leung-Trujillo y Lawrence, 1987; Alfaro *et al.*, 1993; Rosas *et al.*, 1993; Pascual *et al.*, 1998; Pascual *et al*., 2003). Estos factores contribuyen en parte a una producción inestable y por debajo del nivel óptimo en granjas a nivel mundial (Gomes y Honculada-Primavera, 1993).

El potencial reproductivo de machos puede ser evaluado mediante el análisis de la calidad espermática, el peso del espermatóforo, el conteo de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides vivos y anormales. Adicionalmente, el tiempo de

regeneración del espermatóforo (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987b) y el peso del espermatóforo (Pratoomchat, *et al.*, 1993) son factores que se han evaluado para determinar el potencial reproductivo de los machos. La calidad espermática fue evaluada por primera vez determinando el conteo total de espermatozoides y los porcentajes de espermatozoides vivos y anormales (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985, 1987a). Desde entonces, se ha evaluado la calidad espermática en relación con la talla de los machos, la ablación del pedúnculo ocular, el origen de los machos, la dieta las condiciones de cultivo, y la temperatura (Alfaro, 1993; Alfaro y Lozano, 1993; Gomes y Honculada-Primavera, 1993; Pratoomchat *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995; Pascual *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2001).

La calidad espermática en relación con regeneraciones consecutivas ha sido ampliamente estudiada, dado que es una característica deseable en los machos, pero los resultados que se han obtenido son contrastantes dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo. Algunos estudios han reportado una clara reducción en la calidad espermática y/o daño en el tracto reproductivo en relación con regeneraciones consecutivas (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987; Rosas *et al.*, 1993; Pascual *et al.*, 1998), mientras que en otros estudios no se ha observado ningún cambio en la calidad espermática (Díaz *et al.*, 2001), o bien un incremento en la calidad espermática a través de regeneraciones consecutivas del espermatóforo (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985; Alfaro, 1993).

2. FACTORES QUE AFECTAN LA MADURACIÓN Y EL POTENCIAL REPRODUCTIVO

2.1 Factores nutricionales

Los factores nutricionales tienen un papel crítico en la maduración y el apareamiento, en la fertilidad, la fecundidad, en la viabilidad y en la calidad de la descendencia (Harrison, 1990; Browdy, 1992). Varios autores han sugerido que una maduración exitosa depende de la dieta (Lawrence *et al.*, 1980; Cahu y Quazuguel, 1989). Un desbalance o una dieta incompleta pueden provocar un desempeño reproductivo pobre o incluso impedir la reproducción (Bray y Lawrence, 1992). Como consecuencia una dieta óptima, que eventualmente remplace el alimento fresco, se ha identificado como un factor crucial para la maduración sexual y la reproducción en camarones (Harrison, 1990; Wouters *et al*., 2001). Una de las dificultades para diseñar dietas de maduración para crustáceos ha sido que los requerimientos nutricionales son diferentes para cada especie. Analizando la respuesta reproductiva en relación al régimen alimenticio, se ha reportado que en *L. vannamei* se obtienen mejores resultados con una dieta natural combinada, mientras que en *L. stylirostris* los mejores resultados se obtienen con una dieta de peletizado (Galgani *et al.*, 1989). Asimismo, se ha encontrado que la proporción óptima de proteínas y lípidos empleada en la dieta y, en consecuencia, el aporte nutricional en cada caso, es diferente para cada especie (Rosas *et al.*, 1996).

Aún cuando es importante contar con una adecuada calidad reproductiva tanto de hembras como de machos para el éxito de la reproducción, se ha puesto mucha más atención a los requerimientos nutricionales para el desarrollo gonádico de las hembras que de los machos. Todo esto a pesar de que desde hace dos décadas existen evidencias de

diferencias en los requerimientos nutricionales de hembras y machos (Magarelli, 1981, citado en Pérez-Velázquez *et al*., 2003; Racotta *et al*., 2000). En este sentido, un estudio reciente demostró que una dieta típica de maduración de alimento fresco (60% calamar, 40% de poliqueto *Glycera dibranchiata*) provocó pérdida de peso en machos de *L. vannamei* y disminuyó el conteo total de espermatozoides, por lo que concluyen que la dieta de maduración no es nutricionalmente óptima para machos (Pérez-Velázquez *et al.*, 2003).

Las hembras tienen un requerimiento de lípidos pero no está relacionado con la cantidad de lípidos totales en la dieta (D'Abramo, 1989, citado en Wouters *et al*., 2001), sino que se deben satisfacer los requerimientos de nutrientes específicos tales como ácidos grasos, fosfolípidos y esteroles (Wouters *et al*., 2001). Sin embargo, un estudio reciente demostró que niveles totales de lípidos en la dieta superiores al 9 % retardan la maduración ovárica de *L. vannamei* (Wouters *et al.*, SENAIM-ESPOL Foundation, datos no publicados, citado en Wouters *et al.*, 2001).

En los camarones los ácidos grasos de cadena larga y altamente insaturados (HUFA) (Cahu *et al*., 1994; González-Félix y Pérez-Velázquez, 2003), los fosfolípidos (Mourente y Rodríguez, 1991; Cahu *et al*., 1994; Ravid *et al*., 1999; Wouters *et al*., 1999b; Wouters *et al*., 2001) y el colesterol (Kanazawa *et al*., 1988) son considerados como lípidos esenciales en la dieta para la maduración. El éxito de varios alimentos frescos como calamar y almeja, se atribuye a su contenido de HUFA y colesterol (Wouters *et al*., 2001). Los ácidos grasos son incorporados en acilglicéridos almacenados en huevos y constituyen la principal fuente de energía durante la lecitotrofia (Palacios *et al*., 1999d; Palacios *et al*., 2001; Wouters *et al*., 2001).

Cahu *et al*. (1994) obtuvieron una disminución en la tasa de desove de reproductores de *L. vannamei* cuando su dieta estuvo privada de HUFA y fosfolípidos. De manera similar, Wouters *et al*. (1999a) reportaron para *L. vannamei* que cuando los reproductores se alimentaron con *Artemia* spp.enriquecida con aceite de coco (libre de HUFA y colesterol) se presentó una disminución en la tasa de fertilización de los huevos y fecundidad, aunque la frecuencia de maduración no fue afectada, mientras que en machos la regeneración del espermatóforo se vio afectada negativamente. En machos se encontró que el colesterol y los fosfolípidos tienen un efecto positivo sobre el conteo total de espermatozoides (Pérez-Velázquez *et al*., 2003). Bray *et al*. (1989) reportaron un incremento en la producción de nauplios, la tasa de eclosión y la espermatogénesis en reproductores de *L. stylirostris* con un suplemento del 1.5 % de lecitina de soya (i.e. fosfatidilcolina) en la dieta. Se ha reportado que los carotenoides incrementan la supervivencia de las larvas (Dall *et al*., 1995; Palacios *et al*., 1999d) y están asociados a la maduración de crustáceos (Mohamed y Diwan, 1992; Sagi *et al*., 1995; Wouters *et al*., 1999a). Estos efectos probablemente pueden ser atribuidos a las propiedades antioxidantes de los carotenoides (Wyban *et al*., 1997) y/o a su papel como precursores de vitamina A (Dall *et al*., 1995).

Los carbohidratos no son esenciales para los camarones reproductores, pero pueden ser útiles fuentes de energía que evitan el consumo de proteínas y lípidos para la obtención de energía (Wouters *et al*., 2001). Se ha reportado que tanto en hembras como en machos los niveles de carbohidratos disminuyen al ser transferidos a condiciones de maduración (Racotta *et al*., 2000). En relación con el desempeño reproductivo, se han relacionado los

niveles de glucosa en huevos con la calidad larvaria y la condición de los reproductores (Palacios *et al*., 1998; Palacios *et al*., 1999d).

Los requerimientos de vitaminas y minerales para reproductores de camarón todavía no se han definido por lo que las dietas artificiales generalmente son suplementadas con una mezcla completa de vitaminas (Wouters *et al*., 2001). Una dieta adecuada de vitamina E aumenta la tasa de maduración ovárica (Chamberlain, 1988, citado en Wouters *et al.*, 2001), y un alto porcentaje de eclosión se ha relacionado con altos niveles de vitamina C en los huevos de *F. indicus* (Cahu *et al*., 1995). Sin embargo, cuando las dietas son deficientes en cualquiera de las vitaminas E, A y C, la maduración ovárica se retrasa (Alava *et al*., 1993), y disminuye el porcentaje de eclosión (Cahu *et al*., 1991).

En machos se ha encontrado que una dieta sin suplemento de vitaminas produce una disminución significativa en el conteo total de espermatozoides (Pérez-Velázquez *et al.*, 2003). Se ha determinado que la vitamina E aumenta el porcentaje de espermatozoides normales (Chamberlain, 1988, citado en Wouters *et al.*, 2001). También en machos de *L. Vannamei* se ha evaluado el efecto de la vitamina C en términos de la tasa de apareamiento y la calidad espermática (Leung-Trujillo y Lawrence, 1988).

Por otro lado, de acuerdo a Harrison (1990) las deficiencias minerales pueden afectar negativamente la reproducción de crustáceos, alterando la composición y calidad de los huevos (Wouters *et al*., 2001).

La composición de nutrientes no siempre explica el efecto positivo de los alimentos "frescos" o congelados como promotores de la maduración. Como consecuencia, se ha propuesto que las hormonas reproductivas de estos organismos afectan el control neuroendocrino de los camarones, en particular en el caso de organismos que presentan

hormonas similares o compatibles a las de los camarones peneidos (D'Croz *et al*, 1988; Mendoza *et al*., 1997; Naessens *et al.*, 1997; Laufer *et al*., 1998; Wouters *et al*., 2001).

2.2 Factores ambientales

La reproducción en camarones está influenciada por factores ambientales (Bray y Lawrence, 1992; Ogle, 1992). En condiciones naturales, estos factores determinan la existencia de épocas de reproducción definidas. En este sentido, los valores absolutos así como la tasa de variación de varios factores ambientales se han correlacionado con la reproducción de camarones penéidos en su hábitat natural, donde cada uno de esos factores puede estimular o inhibir el proceso reproductivo de una especie en particular (Browdy, 1992). De hecho, la maduración gonádica está bajo control hormonal, el cual a su vez es controlado por factores ambientales (Ogle, 1992). De acuerdo a Ogle (1992) la optimización de los factores ambientales para la maduración y desove en cautiverio incluye la duplicación y, de ser posible, la amplificación de los factores que sean estimuladores naturales, mientras que los factores que puedan inhibir la reproducción deben ser eliminados o reducidos.

Las condiciones ambientales en mar abierto donde desovan naturalmente los camarones se caracterizan por su relativa estabilidad, por lo que es importante mantener estables los factores ambientales en un sistema de maduración. Por otro lado, es necesario reducir el estrés en el sistema dado que puede ser un factor inhibidor. De esta manera, se tiene que evitar el ruido (Lagardäre, 1982), las altas densidades, el movimiento innecesario alrededor de los tanques de maduración, el manejo excesivo de los reproductores y además hay que mantener regímenes de limpieza estrictos (Wyban y Sweeney, 1991).

El efecto de la temperatura y la iluminación, así como su interrelación, sobre la maduración han sido ampliamente estudiados (Chamberlain y Lawrence, 1981; Chamberlain y Gervais, 1984; Primavera, 1985). Se ha observado que estos factores son los más importantes en el control de la reproducción de crustáceos (Meusy y Payen, 1988) y en particular de penéidos (Chamberlain y Lawrence, 1981; Primavera, 1985; Castañón-Cervantes *et al.*, 1995). Sin embargo, los rangos de valores óptimos que se manejan son muy amplios, dada la especie, las condiciones ambientales en que estuvo el animal antes de entrar a maduración y el grado de maduración que presentaba (Meusy y Payen, 1988; Vázquez-Boucard *et al.*, 1989). Específicamente en *L. vannamei* se ha observado que la luz y el fotoperíodo inducen la maduración (Crocos y Kerr, 1986; Cripe, 1994; Castañón-Cervantes *et al.*, 1995).

Con respecto a la salinidad del medio, se recomiendan salinidades de 28-36 ‰ para la maduración de *L. vannamei*, pero se han reportado desoves a 20, 25 y 30 ‰ sin diferencias significativas (Ogle, 1992). Sin embargo, un estrés osmorregulatorio puede producir un desbalance mineral que a su vez, produciría la reabsorción de los ovocitos o reduciría la condición fisiológica y la adaptación reproductiva de los de reproductores (Wouters *et al*., 2001).

Los efectos de otras variables ambientales son poco conocidos. Aunque se recomienda un pH de 8-8.5 para la maduración de *L. vannamei*, la mayoría de los laboratorios trabajan a pH de 7.5-8 e incluso se han obtenido desoves a pH de 7.3 (Ogle, 1992). La concentración de oxígeno puede afectar indirectamente la maduración, pues el consumo de oxígeno varía en función de la temperatura (Villareal *et al.*, 1994), la salinidad, el tamaño y la actividad de los camarones (Bridges y Brand, 1980; Yagi *et al.*, 1990; Luis y

Ponte, 1993; Anderson *et al.*, 1994). Además, es necesario señalar que la ablación del tallo ocular aumenta el consumo de oxígeno (Rosas *et al.*, 1993) aumentando la susceptibilidad a las condiciones de hipoxia (Nan *et al.*, 1995). Los efectos de la concentración de amonio, nitritos y nitratos no se conocen adecuadamente, pero se ha reportado la maduración de camarones a niveles por arriba de los recomendados (0.17 ppm de amonio; 0.25 ppm de nitritos; 30.3 ppm de nitratos) (Ogle, 1992).

2.3 Edad/Tamaño

Independientemente de factores externos, tales como temperatura y nutrición, un individuo debe alcanzar un intervalo de tamaño o una edad particular antes de ser capaz de iniciar la maduración gonádica. En *L. vannamei* la primera madurez en organismos silvestres y/o en condiciones de cultivo generalmente ocurren entre los 8 y 10 meses, edad que corresponde a 40 g (Bray y Lawrence, 1992). Así, la edad puede ser uno de los factores determinantes cuando se consideran las posibilidades de un cultivo, debido a la estrecha relación que existe entre el tamaño, el peso y el crecimiento y por la importancia de estos sobre la primera madurez sexual (Sardá, 1987).

El tamaño, actualmente representa el criterio más usado a nivel de producción para seleccionar a los reproductores. En el caso de *L. vannamei*, Wyban *et al.* (1987) sugieren que se utilicen hembras mayores de 45 g y machos mayores de 40 g; mientras que Aquacop (1983) propone que el tamaño sea de 30 a 45 g, el cual corresponde a organismos de entre 12 y 18 meses de edad. Sin embargo, se ha propuesto que la talla por sí misma no es un buen predictor de la reproducción, debido a que la talla de un poiquilotermo a una edad determinada es dependiente de la temperatura de cultivo y de la nutrición (Bray y

Lawrence, 1992). Por ejemplo, se ha reportado que en diversas instalaciones de E. U. A., los reproductores de *L. vannamei* de 10 a 11 meses de edad varían en peso desde 36 g hasta 45 g (Ogle, 1992), mientras que en Cuba se han usado machos de *L. schmitti* de 7 y 10 meses de edad con pesos similares (35.5 g) (Pérez y Ceballos, 1995).

El peso de los camarones, además de afectar la primera maduración, afecta el número de desoves posteriores. En *L. vannamei* se ha reportado una correlación positiva entre el peso de los reproductores y el número de desoves obtenidos en un ciclo de producción (Palacios *et al.*, 1999a; Arcos *et al*. 2003b). Resultados similares se reportaron para *P. monodon* (Menasveta *et al.*, 1994). Por otro lado, la relación entre tamaño y fecundidad ha sido bien documentada para varios penéidos y esta relación se sigue observando para poblaciones en cautiverio (Cavalli *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 1999a). Sin embargo, el porcentaje de fertilización ha sido asociado de manera negativa con el tamaño (Menasveta *et al.*, 1994; Cavalli *et al.*, 1997; Rothlisberg, 1998), aunque se ha sugerido que esta relación se encuentra asociada a la edad y no a la talla de los organismos (Ottogalli *et al.*, 1988).

Con relación a la edad se ha logrado la reproducción de *L. vannamei* en organismos de 10 meses (hembras de 36 g) y de 11 meses (hembras de 45 g) (Ogle, 1992). No obstante, cuando hay problemas de crecimiento lento por condiciones en la granja, se ha observado que la mayoría de las hembras maduran por primera vez después de dos años de edad (Ogle, 1992).

Se ha sugerido que el mejor desempeño reproductivo de *L. vannamei* se alcanza con animales de un año de edad (i. e. animales con mayor potencial reproductivo) (Crocos y Coman, 1997). Sin embargo, Ogle (1992) menciona que se ha alcanzado una buena

producción con animales de dos años de edad (11% de desoves por noche con 50% de fertilización), e incluso describe el caso de una hembra de tres años y medio que produjo una gran cantidad de desoves viables. La edad es un factor que afecta al desempeño reproductivo y, y a pesar de su importancia, ha sido poco estudiado y sólo en relación con algunos parámetros de producción (Pérez y Ceballos, 1995; Crocos y Coman, 1997).

En general, aún no está claro el efecto del tamaño y de la edad sobre la maduración en sí, en hembras de *L. vannamei* (Ogle, 1992). Se ha reportado madurez en hembras ablacionadas de 20 a 25.2 g y en hembras intactas de 30 g (Aquacop, 1979; Ogle, 1992).

En el caso de los machos de *L. vannamei* tampoco se sabe si la maduración está relacionada con la edad o el tamaño. Se han encontrado machos de 6 meses y medio de edad y 12.5 g, con espermatóforos en desarrollo, aunque la mayoría maduraron a un tamaño promedio de 17 g (Ogle, 1992). Sin embargo, se ha observado una correlación positiva entre el peso del espermatóforo o la cantidad de espermatozoides producidos y el peso del reproductor (Alfaro, 1993; Pratoomchat *et al.*, 1993). Asimismo, se ha observado una relación del desempeño reproductivo con la edad de los machos: se encontró que machos de *L. schmitti* de 7 meses de edad presentaron un mayor desempeño reproductivo en comparación con machos de 10 meses de edad, a pesar de presentar tallas similares (35.5 g en promedio) y de haberse utilizado hembras de 10 meses de edad en ambos casos (Pérez y Ceballos, 1995). En contraste, en *P. semisulcatus* se reportó que el desempeño reproductivo se incrementó progresivamente entre los seis meses y un año de edad, seguido de un decremento en organismos de 14 meses (Crocos y Coman, 1997). Sin embrago, a la fecha no se ha reportado la relación entre la cantidad o calidad espermática y la edad y es por ello que en este trabajo se aborda este tópico.

JUSTIFICACIÓN

El uso de reproductores crecidos en granja o domesticados constituye un paso importante dentro de la actividad camaronícola por las ventajas sanitarias, económicas, y de disponibilidad del recurso, con lo que se aumentaría la rentabilidad de dicha actividad productiva. Sin embargo, es necesario aún contar con los criterios adecuados de selección de reproductores y entender más a fondo el proceso de desarrollo gonádico en condiciones de cautiverio. El tamaño representa probablemente el criterio más usado a nivel de producción para seleccionar a los reproductores que serán transferidos al área de maduración. El tamaño está muy relacionado con la edad de los camarones. En el caso particular de *L. vannamei* todavía no es claro si la maduración, tanto de hembras como de machos, depende del tamaño o de la edad del organismo (Ogle, 1992). Debido a lo anterior, el evaluar el efecto del tamaño y edad, así como el establecer valores óptimos de edad/tamaño en los que se aumente la probabilidad de un buen potencial reproductivo, sería de gran impacto en el sector productivo.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la relación entre el potencial reproductivo y la edad/tamaño en una población de *Litopenaeus vannamei* en proceso de domesticación.

Objetivos particulares

1. Establecer las características histológicas y la organización del ovario de reproductores de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en relación con el grado de madurez.
2. Establecer las posibles diferencias en peso y calidad espermática. entre las mitades izquierda y derecha del espermatóforo de organismos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.
3. Establecer la influencia de la edad y el tamaño sobre el desarrollo gonádico, la condición fisiológica y la calidad espermática de organismos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.
4. Establecer el efecto del tamaño sobre el desarrollo gonádico, la condición fisiológica y la calidad espermática de organismos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* de12 meses de edad.
5. Determinar la calidad espermática a través de regeneraciones consecutivas del espermatóforo en machos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio completo consistió de tres experimentos sucesivos, cuyos diseños experimentales se describen en primer lugar. En segundo término se describen las diferentes metodologías que se emplearon.

1. DISEÑOS EXPERIMENTALES

1.1 Primer experimento. Características histológicas y organización del ovario en relación con el grado de maduración.

Este experimento se planteó con el fin de determinar si el desarrollo del ovario es homogéneo y con ello establecer la estrategia de muestreo para el siguiente experimento. Adicionalmente, esta evaluación contribuye al conocimiento general sobre la maduración de camarones penéidos.

Después de un ciclo de producción en la granja de cultivo de camarón Acuacultores de La Paz, S. A. (APSA) se colectaron hembras (n = 5 de cada estadio) que presentaran ovarios en desarrollo (Estadios visuales II y III) y maduros (Estadio visual IV), de acuerdo a Tan-Fermin y Pudadera (1989). Los camarones fueron fijados completos inyectándoles solución de Davidson (ver técnica histológica). Se registraron los datos de peso total y longitud de cada camarón. Posteriormente se realizó la disección de los organismos para obtener el ovario entero y se registró el peso del mismo.

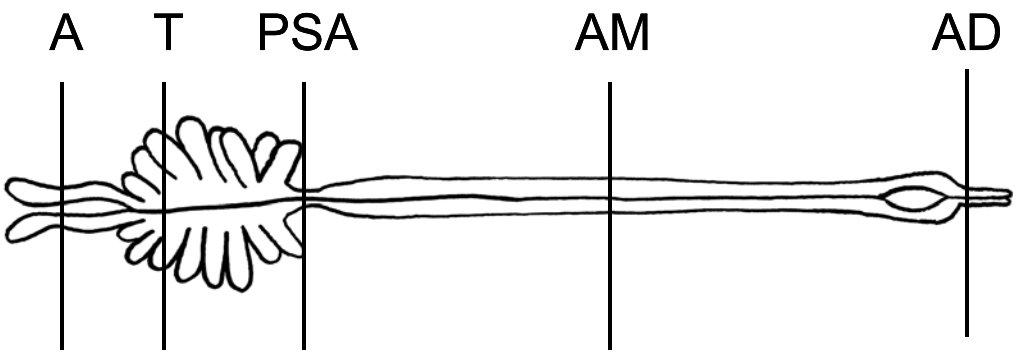

Fig. 5. Representación esquemática de un ovario de camarón mostrando las zonas donde se hicieron los cortes. A = anterior, T = torácica, PSA = primer segmento abdominal, AM = abdomen medio, AD = abdomen distal.

Los ovarios fueron procesados histológicamente (ver técnica histológica). Se obtuvieron cortes transversales de cinco zonas localizadas a lo largo del ovario: en el lóbulo anterior (A), en el lóbulo torácico (T), sobre el primer segmento abdominal (PSA), en la parte media del lóbulo abdominal (MA) y en la parte distal del lóbulo abdominal (DA) (Fig. 5). En este experimento se evaluaron las características ováricas de acuerdo al grado de maduración, por lo que solo se utilizaron los estadios de desarrollo ovárico (asignados histológicamente) que se encuentran en proceso de maduración: el vitelogénico (dividido en temprano y tardío) y bastones corticales (Tan-Fermin y Pudadera, 1989) y descartando los estadios previtelogénico (los cuales no han iniciado la maduración) y los desovados (los cuales ya finalizaron el proceso de maduración).

Los ovocitos se clasificaron tomando como referencia los estadios de desarrollo establecidos por Mohamed y Diwan (1994) para *F. indicus*: ovocitos previtelogénicos (OPV), vitelogénicos tempranos (OVT), vitelogénicos tardíos (OVT) y corticales (OC). Adicionalmente, se consideraron las células en proliferación que incluyen ovogonias y ovocitos en sinapsis.

En cada zona del ovario se realizó un análisis cualitativo para establecer la organización general de la gónada y un análisis cuantitativo (i.e. diámetro y área ocupada por cada tipo de ovocito) para establecer diferencias objetivas en el grado de desarrollo a lo largo del ovario. Los lóbulos derecho e izquierdo se analizaron por separado.

Se aplicaron análisis de variancia (ANDEVA) unifactoriales seguidos por una prueba de Newman-Keuls para comparar los datos morfométricos de las hembras en relación con el factor fijo: estadio de desarrollo ovárico (tres niveles: vitelogénico temprano, vitelogénico tardío y bastones corticales).

Para establecer diferencias cuantitativas entre las zonas (cinco niveles: A, T, PSA, AM, AD) y entre los lóbulos (dos niveles: izquierdo, derecho) de los ovarios, se aplicaron ANDEVA de dos vías seguidos por una prueba Newman-Keuls. Los datos fueron también agrupados en dos regiones principales: la región cefalotorácica (CEF), que incluye a las zonas A y T y la región abdominal (ABD) que incluye a las zonas AM y AD. En este caso se aplicaron ANDEVA de dos vías seguidos por una prueba Newman-Keuls para establecer si existen diferencias entre regiones (dos niveles: CEF y ABD) y entre estadios de desarrollo ovárico (tres niveles: vitelogénico temprano, vitelogénico tardío, bastones corticales).

Las variables calculadas en porcentaje fueron transformadas mediante $\text{ar cos eno}\sqrt{p}$, antes de aplicar los análisis estadísticos (Zar, 1996). Sin embargo se reportan únicamente los datos no trasformados con sus errores estándar. En todos los casos, el nivel de significancia ($\propto$) se fijó en 0.05.

1.2 Segundo experimento. Desarrollo gonádico, condición fisiológica y calidad espermática en función de la edad/tamaño.

Este experimento se planteó para evaluar el efecto de la edad/tamaño sobre el desarrollo gonádico, la condición fisiológica y la calidad espermática, así como para evaluar el efecto del tamaño independientemente de la edad. Sin embargo, se realizó una evaluación preliminar para establecer si existen diferencias en peso o calidad espermática entre las mitades izquierda y derecha del espermatóforo. Para ello, se extrajeron ambos lados del espermatóforo compuesto en 10 machos y se comparó el peso y la calidad espermática entre ambas mitades del espermatóforo. Se aplicaron pruebas de "t" de comparación pareada para comparar las variables de calidad espermática entre las mitades del espermatóforo. Como no se encontró diferencia significativa de la calidad espermática entre las mitades (ver sección de resultados), se procedió a utilizar una mitad del espermatóforo para análisis de calidad espermática y la otra mitad para análisis bioquímicos.

Una vez establecido lo anterior, y para contar con organismos de edad conocida y proceder con el segundo experimento, se sembraron camarones de un mes de edad (10 días de desarrollo larvario y 20 días de desarrollo PL) en un estanque de mareas (los

procedimientos de cultivo se describen más adelante). De dichos organismos, se recolectaron 50 machos y 50 hembras a los 6, 8, 10 y 12 meses de edad. Adicionalmente, se recolectaron 50 organismos de 12 meses de edad crecidos en condiciones diferentes con el objetivo de disminuir su tasa de crecimiento (ver procedimientos de cultivo). En cada ocasión los camarones fueron llevados al laboratorio de maduración y separados por sexo en dos estanques negros de 7 m^2, en tanto se realizaba el muestreo. Para el análisis histológico el muestreo se realizó el mismo día, mientras que para el análisis bioquímico se realizó después de un periodo de ayuno de 24 horas.

En todos los organismos se registró el peso y la longitud. Para el análisis histológico se tomaron 30 organismos de cada sexo. A las hembras se les cortó la parte abdominal y el cefalotórax fue fijado con inyecciones de solución de Davidson. En el caso de los machos, primero se extrajeron manualmente los dos lados del espermatóforo compuesto, de acuerdo con el procedimiento descrito por Alfaro (1993), en el cual cada lado del espermatóforo es primero parcialmente expulsado por presión suave y después es extraído completamente empleando unas pinzas finas. El espermatóforo fue pesado con precisión de 0.1 mg y usado para análisis de calidad espermática. Finalmente, el cefalotórax fue fijado igual que en el caso de las hembras. Los cefalotórax de ambos sexos fueron almacenados para la posterior disección de la gónada.

Para el análisis bioquímico se usaron 20 organismos de cada sexo que fueron mantenidos sin alimentar durante 24 horas previo al muestreo. Antes de ser pesados y medidos, se les extrajo una muestra de 400 µl de hemolinfa, con una jeringa hipodérmica de 3 ml y aguja de 21G x 32 mm, mediante punción en el seno ventro-lateral del abdomen. La jeringa fue previamente enjuagada con una solución fría de oxalato de sodio al 5 % en

solución salina isotónica (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.3) (Vargas-Albores *et al*., 1992) para evitar la coagulación de la hemolinfa al extraer la muestra. Las muestras de hemolinfa fueron conservadas en frío y centrifugadas a 2000 rpm durante 2 minutos, para separar el plasma de las células sanguíneas. La determinación de proteínas y oxihemocianina se hicieron el día del muestreo y el plasma restante se almacenó a –4 °C para su posterior análisis bioquímico. A los machos se les extrajeron los dos lados del espermatóforo, adicionalmente se extrajeron el vaso deferente y el ámpula terminal, estos últimos fueron congelados en nitrógeno líquido, junto con uno de los lados del espermatóforo, para su posterior análisis bioquímico. El otro lado del espermatóforo fue usado para análisis de calidad espermática. Los cefalotórax de ambos sexos fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente se disecaron las gónadas, hepatopáncreas y músculo del primer segmento abdominal para el análisis bioquímico.

Se midieron tres tipos de variables:

1) **Variables morfométricas:** que incluyen peso y longitud de cada organismo.
2) **Variables reproductivas: a)** *características morfo-histológicas de la gónada,* que incluyen estadio de desarrollo del testículo y del ovario, índice gonadosomático (IGS), diámetro de ovocitos y proporción de área ocupada por cada tipo celular del desarrollo ovárico de acuerdo a la escala de Yano (1988) y testicular de acuerdo a la escala de King (1948). **b)** *calidad espermática,* que incluye peso del espermatóforo, total de células por espermatóforo, porcentaje de espermatozoides normales, anormales y muertos.

3) **Variables metabólicas:** que incluyen la composición bioquímica en hemolinfa, hepatopáncreas, músculo, gónada (ovario y testículo), espermatóforo, vaso deferente y ámpula terminal.

Los resultados de estas variables se analizaron en función de la edad y el tamaño. Se aplicaron ANDEVA unifactoriales seguidos por una prueba Newman-Keuls para analizar las diferentes variables en relación con la edad (cuatro niveles: 6, 8, 10 y 12). Asimismo, se realizaron análisis de correlación entre el peso del camarón y las distintas variables. En los casos donde se encontró una correlación significativa, se aplicó un análisis de covariancia (ANCOVA) unifactorial, usando las edades como factor fijo y el peso del camarón como covariable.

De manera similar, se hicieron análisis unifactoriales de ANDEVA y ANCOVA para comparar las variables en camarones de 12 meses de edad ydistintos tamaños (dos niveles: grandes y pequeños).

Las variables medidas en porcentaje fueron transformadas por arcoseno ($\text{arcoseno}\sqrt{p}$) antes de aplicar los análisis estadísticos (Zar, 1996). En este caso se reportan tanto las medias de los datos no transformados como las medias de los datos retransformados, debido a que el ANCOVA incluye medias ajustadas por la covariable, calculadas a partir de los datos transformados. El nivel de significancia ($\propto$) se fijó en 0.05 para todos los análisis.

1.3 Tercer experimento. Calidad espermática en función de regeneraciones consecutivas del espermatóforo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento anterior, se observó que el potencial reproductivo de los machos (una vez que el tracto reproductivo está totalmente maduro) está dado principalmente por la calidad espermática y no por las características histológicas o bioquímicas. Es por ello que en este experimento se planteó analizar la calidad espermática en condiciones de maduración a través de regeneraciones consecutivas.

A partir de organismos producidos en el CIBNOR (ver procedimientos de cultivo) se obtuvieron machos de aproximadamente año y medio que fueron mantenidos durante un mes en condiciones de maduración sin la presencia de hembras.

Un total de 50 machos fueron marcados, colocando en la base del tallo ocular izquierdo un aro codificado por color y número. Al inicio del experimento se tomó una muestra de hemolinfa y se extrajeron las dos mitades del espermatóforo, siguiendo las mismas técnicas y procesamiento que en el experimento anterior. Se realizó el análisis bioquímico de la hemolinfa y de una mitad del espermatóforo; en la otra mitad del espermatóforo se determinó la calidad espermática. Los resultados de este muestreo fueron considerados como valores iniciales.

Posteriormente se extrajeron los espermatóforos a lo largo de tres regeneraciones consecutivas y se evaluaron nuevamente las variables de calidad espermática y la composición bioquímica del espermatóforo. Se midieron dos tipos de variables:

1) **Variables de calidad espermática:** que incluyen peso del espermatóforo, total de células por espermatóforo, porcentaje de espermatozoides normales, anormales y muertos.

2) **Variables metabólicas:** que incluyen la composición bioquímica (proteínas, lípidos totales y carbohidratos) en hemolinfa (solo valores iniciales) y espermatóforo.

Se aplicaron ANDEVA unifactoriales para analizar los resultados iniciales de calidad espermática en relación con el número de regeneraciones (tres niveles: primera, segunda y tercera regeneración). Adicionalmente, se realizaron distintos análisis de correlación entre las variables bioquímicas de la hemolinfa o las variables de calidad espermática iniciales y la calidad espermática en las consecutivas regeneraciones del espermatóforo.

Las variables representadas en porcentajes fueron transformadas por arcoseno ($\text{arcoseno}\sqrt{p}$) antes de aplicar los análisis estadísticos (Zar, 1996), pero únicamente se reportan medias calculadas con datos no trasformados.

2. CONDICIONES DE CULTIVO

2.1 Primer experimento

Las condiciones de cultivo que se manejan en la empresa Acuacultores de La Paz (APSA) de donde fueron obtenidas las hembras, se describen a continuación. Las hembras fueron ablacionadas unilateralmente mediante el corte de un pedúnculo ocular. Los organismos se colocan en tanques negros de maduración de 25 m^2 con una densidad de 6 camarones/m^2 y a una proporción sexual de 1 macho por 1 hembra. El intercambio diario de agua fue del 200 % y se mantuvo una temperatura de 28°C ± 1°C y una salinidad promedio de 36 ‰. La dieta estuvo compuesta de 40 % de calamar, 15 % de poliquetos, 40

% de almejas y 5 % de una dieta de maduración comercial (Rangen, Inc., Idaho, EU). La ración total diaria fue del 10 % de la biomasa, dividida en 5 raciones iguales.

2.2 Segundo experimento

Se acondicionaron camarones adultos de ciclo cerrado de *L. vannamei* para maduración en el laboratorio de reproducción del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), con el procedimiento descrito por Arcos *et al*. (2003b). Los camarones fueron colocados en tanques negros de maduración de 7 m^2 a una densidad de 7 camarones/m^2 y a una proporción sexual de 1 macho por 1 hembra. El intercambio diario de agua fue del 300 % y se mantuvo una temperatura de 28°C ± 1°C y una salinidad promedio de 37 ‰. La dieta estuvo compuesta de 22 % de calamar, 34 % de poliquetos, 22 % de almejas y 22 % de *Artemia* spp. La ración total diaria fue del 20 % de la biomasa, dividida en 4 raciones. Después de un periodo de aclimatación de una semana, durante el cual mudó el 50 % de los animales, las hembras fueron ablacionadas unilateralmente mediante el corte de un pedúnculo ocular.

Diariamente entre las 18:00 y 23:00 horas fue monitoreado el grado de madurez de las hembras, con ayuda de una lámpara para observar a través del exoesqueleto el tamaño y el color de la gónada. Las hembras más maduras se capturaron con una red de mano y se comprobó la presencia de espermatóforo. Las hembras "parchadas" (con espermatóforo adherido al télico) se colocaron en tanques de desove individuales de 200 L. En la mañana, una vez que se había llevado a cabo el desove, las hembras se regresaban al tanque de maduración. Los desoves viables, con una tasa de fertilización superior al 40 %, se

mantuvieron en esos tanques hasta el estadio de nauplio. De esta forma se obtuvieron desoves durante tres días, los nauplios de los tres días fueron mezclados.

Una vez alcanzado el estadio de PL de 10 días, éstas se trasladaron a "raceways" a una densidad de 500 camarones/m^2 durante 10 días. Una vez que se obtuvieron PL de 20 días, una parte se transfirió a un estanque de mareas en las instalaciones del CIBNOR a una densidad de 3-4 camarones/m^2. La variación de temperatura y salinidad durante el periodo de estudio se presenta en la figura 6. La dieta consistió de alimento peletizado (25 % de proteína, PIASA, La Paz, México), la ración total diaria fue del 5 % de la biomasa.

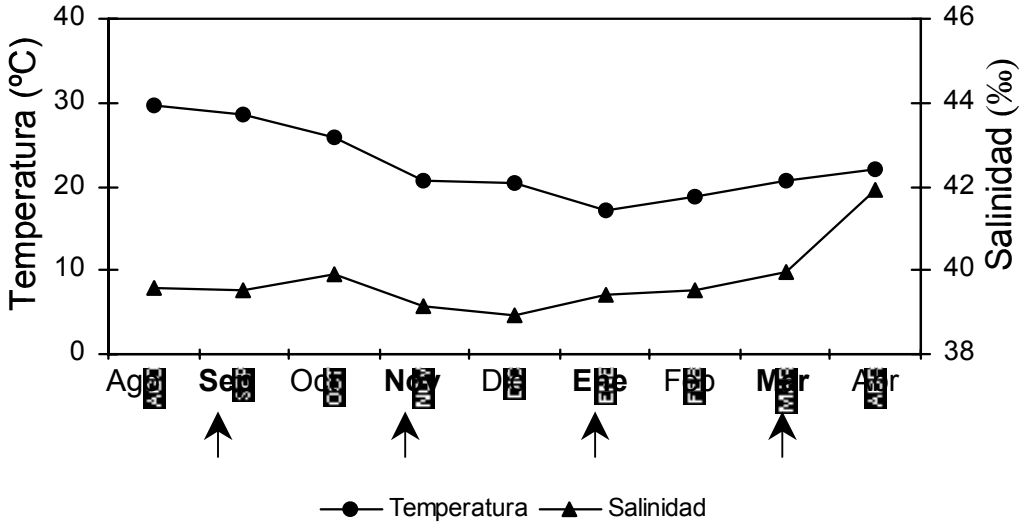

Fig. 6. Variación de temperatura y salinidad que se presentó en el estanque de mareas durante el periodo de estudio. Las flechas indican los meses en que se realizaron los muestreos.

Otra parte de las PL20 fueron cultivadas a altas densidades, en un intento por forzar un crecimiento lento y así incrementar las diferencias en el tamaño de camarones de la misma edad. Con ello se hizo posible evaluar el efecto del tamaño sobre el desarrollo gonádico, la condición fisiológica y la calidad espermática en organismos de 12 meses de edad y diferente peso. Inicialmente las PL20 fueron mantenidas en "raceways" a una densidad de 800 camarones/m^2 durante seis meses. Posteriormente se transfirieron a estanques supralitorales a una densidad de 6 camarones/m^2. La dieta en ambos casos consistió de alimento peletizado (25 % de proteína, PIASA, La Paz, México) y la ración total diaria fue del 5 % de la biomasa (Villalón, 1991).

2.3 Tercer experimento

Los machos utilizados para el tercer experimento se cultivaron en las condiciones descritas por Pérez-Rostro e Ibarra (2003) que a grandes rasgos consiste en aireación constante, un intercambio diario de agua del 100 % al 20 % (dependiendo del tamaño de los camarones y su densidad de siembra), una salinidad de 37-38 ppt y temperatura entre 25 °C y 30 °C (dependiendo de la época del año). La densidad de siembra se ajustó conforme crecieron desde 800 PL23/m^2 hasta 4.3 adultos/m^2. La alimentación consistió de alimento peletizado comercial con un 40 % de proteína (PIASA, La Paz, México) a libre demanda.

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

3.1 Técnica histológica

A cada organismo previamente fijado en solución de Davidson (composición por cada litro de solución: 330 ml de alcohol etílico al 95%,220 ml de formol, 115 ml de ácido acético glacial, 335 ml de agua de mar filtrada) se le extrajo la gónada ala que se les aplicó la técnica histológica convencional deshidratando con alcohol etílico, aclarando con Hemo-De e incluyendo con paraplast (Tabla 3). Los cortes se hicieron transversalmente a 4 μm de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina (Tabla 4).

Tabla 3. Tiempos de inmersión para el procesamiento histológico.

Tiempo de inmersión										
Deshidratación							Aclarado		Inclusión	
80	96 I	96 II	96 III	100 I	100 II	100 III	OH-HeDe	HeDe	P I	PII
1 h	1 h	1 h	1 h	1 h	1 h	1 h	15 min	15 min	1 h	2 h

Abreviaciones: 80, 96 y 100, concentraciones de alcohol (%), h, horas; min, minutos; OH-HeDe, mezcla 1:1 de alcohol-hemo De; HeDe, Hemo De 100%; P I, P II, pasos de parafina 100%.

Tabla 4. Tiempos de inmersión para el proceso de tinción.

Proceso	Solución	Tiempo de inmersión
Desparafinado	Hemo De	3 minutos
	Hemo De	3 minutos
	Hemo De	3 minutos
Hidratación	Alcohol 96 I	3 minutos
	Alcohol 96 II	3 minutos
	Alcohol 70 I	3 minutos
	Alcohol 70 II	3 minutos
	Agua	1 minuto
Tinción	Hematoxilina	8 minutos
	Agua corriente	1 minuto
	Alcohol ácido	1 segundo
	Agua corriente	5 segundos
	Agua Amoniacal	2 minutos
	Agua corriente	1 minuto
	Eosina Y	30 segundos
Deshidratación	Alcohol 96	4 minutos
	Alcohol 100	3 minutos
	Alcohol 100	4 minutos
	Hemo De	3 minutos
	Hemo De	3 minutos
	Hemo De	3 minutos

3.2 Análisis de imágenes

Las medidas de los diámetros y de las áreas ocupadas por cada tipo de ovocito fueron obtenidas usando el software SCAN PRO (versión 5.0) a partir de imágenes digitalizadas de los cortes de gónada. Sólo se midieron ovocitos en los cuales el núcleo fuera visible. Los ovocitos fueron trazados individualmente de manera manual y las longitudes de los ejes mayor y menor fueron medidas automáticamente por el software y se calculó el promedio de ambas dimensiones para obtener el diámetro del ovocito. Para la medición de las áreas ocupadas por cada tipo de ovocito se siguió el mismo procedimiento y el área ocupada por cada tipo de ovocito fue calculada automáticamente por el software. Las proporciones de área fueron calculadas en relación con el área total de cada zona.

4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

4.1 Hemolinfa

Para la determinación de oxihemocianina, las muestras de plasma se diluyeron 1:100 con una solución salina isotónica y se leyó la absorbancia a 335 nm. La concentración de oxihemocianina se calculó usando un coeficiente de extinción $E_{\%}$ de 2.83 (Hagerman, 1986; Racotta y Hernández-Herrera, 2000).

En la misma muestra de plasma diluido se cuantificaron las proteínas con una adaptación de la técnica de Bradford (1976), usando un reactivo comercial (Sigma) y suero de albúmina bovina (Sigma) como estándar. La absorbancia se midió a 595 nm en un espectrofotómetro Spectronic modelo Genesys II.

Se utilizaron kits comerciales para la determinación de glucosa (Glucosa oxidasa - Peroxidasa, Merck), lactato (Lactato oxidasa - Peroxidasa, Sigma), colesterol (Colesterol

oxidasa - Peroxidasa, Merck) y acilglicéridos (Lipasa - Glicerol oxidasa - Peroxidasa, Merck). Estos métodos fueron adaptados a un lector de microplacas usando 20 μL de plasma y 200 μL de solución reactiva (Racotta y Palacios, 1998). Las absorbancias fueron leídas a 490 nm para glucosa, colesterol y acilglicéridos y a 540 nm para lactato.

Los carbohidratos fueron determinados por el método de la antrona (Van Handel, 1965) y los lípidos totales por el método de la sulfofosfovainillina (Barnes y Blackstock, 1973), las absorbancias fueron leídas a 620 nm y 540 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro Spectronic modelo Genesys II.

Las concentraciones fueron calculadas a partir de curvas de calibración de los estándares respectivos.

4.2 Tejidos

Para determinar la composición bioquímica de los tejidos se utilizaron los mismos métodos bioquímicos usados para hemolinfa, previa homogenización. Las muestras de hepatopáncreas y gónada se homogenizaron en frío en solución salina isotónica (0.45 M de NaCl + 0.005 M de KCl por litro). Este homogenado se utilizó para todos los análisis bioquímicos. En músculo sólo se determinaron proteínas y carbohidratos debido a carencia de sensibilidad de los otros métodos en este tejido. Las muestras de músculo se procesaron, por su consistencia, de una manera diferente: para la determinación de proteínas se digirieron directamente 0.02 g de músculo aproximadamente en 2 ml de NaOH 0.5 N durante 24 horas y para la determinación de carbohidratos se homogenizaron aproximadamente 0.3 g de músculo en 2 ml de ácido tricloro acético 10 %. En ambos casos

las muestras tratadas se centrifugaron a 4000 rpm a 5°C durante 10 minutos antes de aplicar la técnica correspondiente (ver análisis en hemolinfa).

Para el análisis bioquímico del espermatóforo, vaso deferente y ámpula terminal el tejido fue liofilizado y pulverizado manualmente con una espátula de metal y después fue resuspendido en una solución salina isotónica y se homogenizó. Los lípidos no fueron analizados en el espermatóforo debido a la carencia de sensibilidad del método para este tejido.

5. CALIDAD ESPERMÁTICA

5.1 Conteo de espermatozoides

Para el conteo de espermatozoides, se homogenizó suavemente el espermatóforo en agua de mar artificial libre de Ca^{2+} (CaFASW) (Composición por un litro de solución: 21.63 g NaCl, 1.12 g KCl, 0.53 g H_3BO_3, 0.19 g NaOH, 4.93 g $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, y pH ajustado a 7.4 con HCl 1N) (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987a). Se estandarizó el procedimiento para asegurar que todas las suspensiones de espermatozoides se prepararan bajo las mismas condiciones. Los conteos de espermatozoides se hicieron usando un hematocitómetro y se expresaron como el número de espermatozoides totales en cada espermatóforo.

5.2 Examen morfológico general

5.2.1 Espermatozoides normales y anormales

Se determinaron los porcentajes de espermatozoides morfológicamente normales y anormales. Se consideraron espermatozoides normales aquellos con un solo “spike” que se

proyecta de un cuerpo oval (Talbot *et al*., 1989) y como espermatozoides anormales aquellos que presentaron un cuerpo malformado, sin “spike” o con el “spike” doblado (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987a). Los conteos de espermatozoides se hicieron usando un hematocitómetro y se expresaron como el porcentaje de espermatozoides normales o anormales en todo el espermatóforo.

5.2.2 Biotinción con trypan azul para detectar espermatozoides muertos

Para evaluar el número de espermatozoides muertos, a 0.9 ml de suspensión de espermatozoides se le añadió un volumen de 0.1 ml de una solución de colorante al 0.4 % y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en tubos de ensayo, según la técnica descrita por Leung-Trujillo y Lawrence (1987a). Se contó (usando un hematocitómetro) el número de espermatozoides muertos (teñidos de azul) y el resultado se expresó como el porcentaje de espermatozoides muertos en todo el espermatóforo.

RESULTADOS

1. Análisis del proceso de maduración regionalizada del ovario

Las variables morfométricas de los camarones en distintos grados de desarrollo ovárico se presentan en la Tabla 5. Los camarones midieron entre 16.2 g y 19.6 cm (17.8 ± 0.06 coeficiente de variación) y pesaron entre 30.3 g y 56.9 g (41.9 ± 0.18 coeficiente de variación). No se obtuvieron diferencias significativas en la longitud o el peso entre organismos con diferente estadio de desarrollo ovárico. Los rangos de peso del ovario fueron de 0.6 g – 1 g para el estadio vitelogénico temprano; de 1 g – 1.5 g para el vitelogénico tardío; y de 1.3 g – 3 g para el estadio cortical. El peso del ovario fue significativamente mayor en animales en estadio cortical que en animales en estadios vitelogénicos temprano y tardío. Por su parte, los rangos en los valores del índice gonadosomático (IGS) para el estadio vitelogénico temprano fueron de 1.58 – 2.36; para el vitelogénico tardío de 2.52 – 3.69; y para el estadio cortical de 3.47 – 5.32. El IGS fue significativamente diferente entre todos los estadios.

Tabla 5. Variables morfométricas de camarones hembras (media ± error estándar) separadas por el estadio ovárico. N = 5 para cada estadio.

	Estadio vitelogénico temprano	Estadio vitelogénico tardío	Estadio Cortical	ANDEVA
Peso Total (g)	40.08 ± 5.47	38.7 ± 5.42	46.8 ± 8.51	NS
Longitud (cm)	17.56 ± 0.80	17.32 ± 0.67	18.56 ± 0.99	NS
Peso del ovario (g)	0.84 ± 0.16 a	1.24 ± 0.17 a	2.24 ± 0.59 b	$P < 0.001$
IGS (%)	2.09 ± 0.27 a	3.23 ± 0.38 b	4.73 ± 0.69 c	$P < 0.001$

IGS = Índice gonadosomático

Medias con letra diferente son significativamente diferentes ($P < 0.01$) por la prueba de Newman-Keuls.

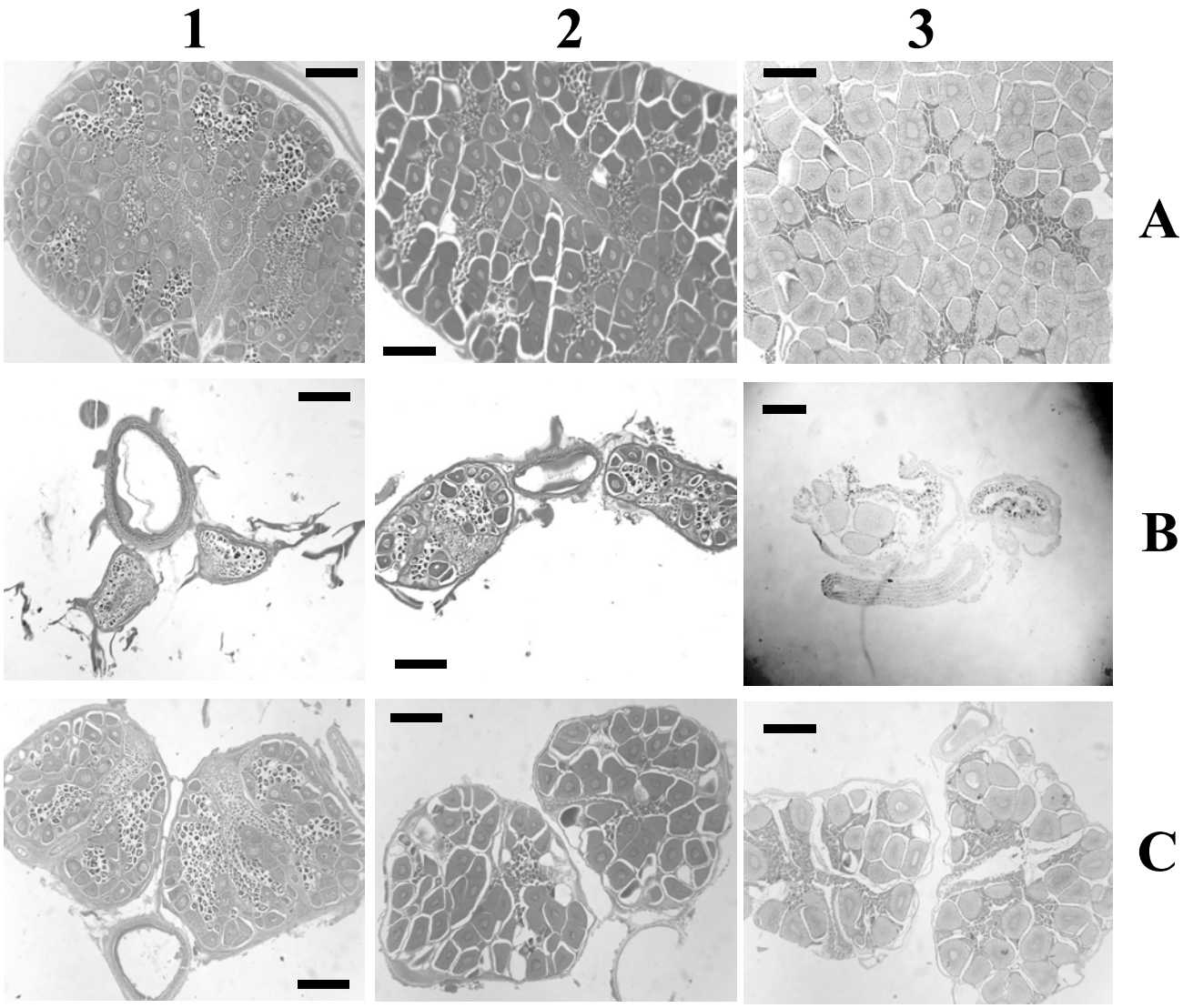

Fig. 7. Micrografías de secciones transversales de ovarios en 1) estadio de desarrollo vitelogénico primario, 2) estadio de desarrollo vitelogénico tardío y 3) estadio de desarrollo cortical en los cuales los cortes se hicieron en A) la región cefalotorácica, B) la zona PSA, y C) la región abdominal. Los símbolos de las zonas están definidos en la figura 5 (Ver métodos). Barra de escala = 330 µm, excepto para la Fig. 7(3b) para la cual la barra de escala = 200 µm.

En general los ovocitos presentaron, dentro del mismo estadio ovárico, una morfología y un grado de desarrollo similar (Fig. 7), con la excepción de la zona PSA. Esta zona, en los estadios vitelogénico temprano y cortical, estuvo compuesta principalmente de ovocitos en proliferación y ovocitos previtelogénicos (OPV) (Fig. 7, ver también Figs. 8 y 10).

Las áreas ocupadas por cada tipo de ovocito se presentan para los tres estadios ováricos en las figuras 8, 9 y 10. En ninguno de los estadios ováricos se encontraron efectos significativos entre el lado izquierdo y el derecho para el área ocupada por cada tipo de ovocito o para el diámetro de los ovocitos. En el estadio vitelogénico temprano (Fig. 8) se obtuvo un efecto significativo ($P < 0.01$) de la zona en lo que respecta al área ocupada por cada tipo de ovocito y al diámetro de los mismos (Fig. 11a). La prueba de Newman-Keuls reveló que la zona PSA fue significativamente diferente ($P < 0.01$) de las otras, excepto por las áreas ocupadas por OPV ya que en la zona AM se presentaron menos OPV que en las otras zonas. En el estadio vitelogénico tardío (Fig. 9) no se encontraron diferencias significativas en el área ocupada por OPV y ovocitos vitelogénicos tardíos (OVT) ni en los diámetros de los ovocitos a lo largo del ovario (Fig. 11b). Sin embargo, se obtuvo un efecto significativo de la zona para los ovocitos en proliferación ($P < 0.01$). En este caso, la prueba de Newman-Keuls reveló que la zona PSA presentó una mayor área cubierta por ovocitos en proliferación en comparación con las otras zonas ($P < 0.01$). En el estadio cortical (Fig. 10) se obtuvo un efecto significativo ($P < 0.01$) de la zona en el área ocupada por cada tipo de ovocito y el diámetro de los mismos (Fig. 11c). La prueba de Newman-Keuls reveló que el área ocupada por los ovocitos en todos los estadios fue

significativamente diferente ($P < 0.01$) en la zona PSA comparada con todas las otras zonas del ovario.

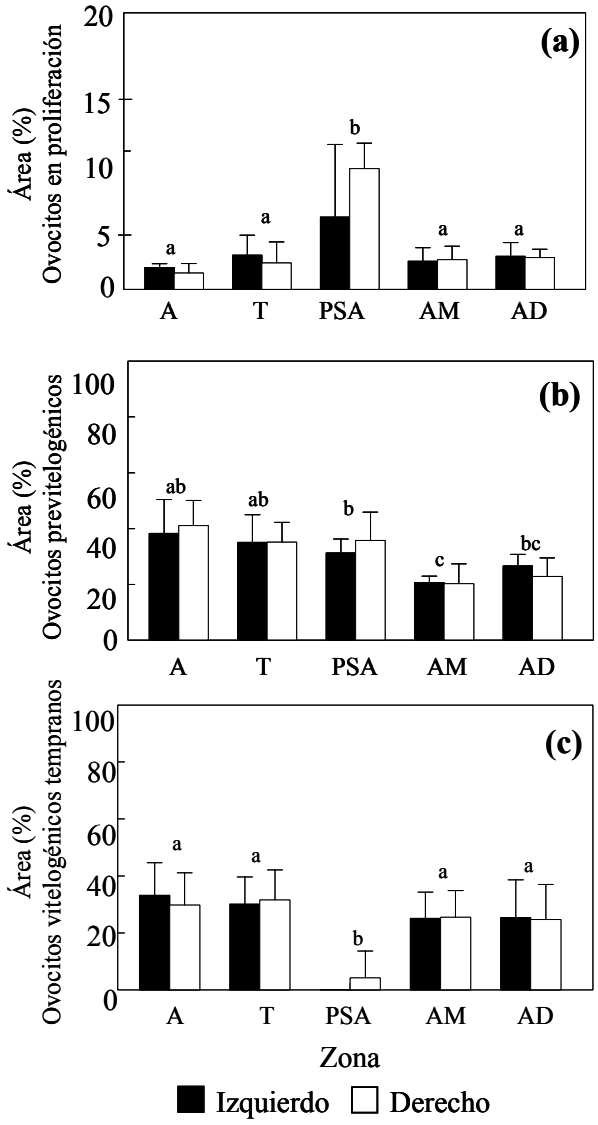

Fig. 8. Estadio vitelogénico temprano: Área ocupada por **a)** ovocitos en proliferación, **b)** ovocitos previtelogénicos y **c)** ovocitos vitelogénicos tempranos, en relación con la zona y lado del ovario. Barras sobre columnas de medias = errores estándar. Símbolos de zonas como en la figura 5 (Ver métodos). Las medias de las zonas con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.01$). N = 5 para cada estadio.

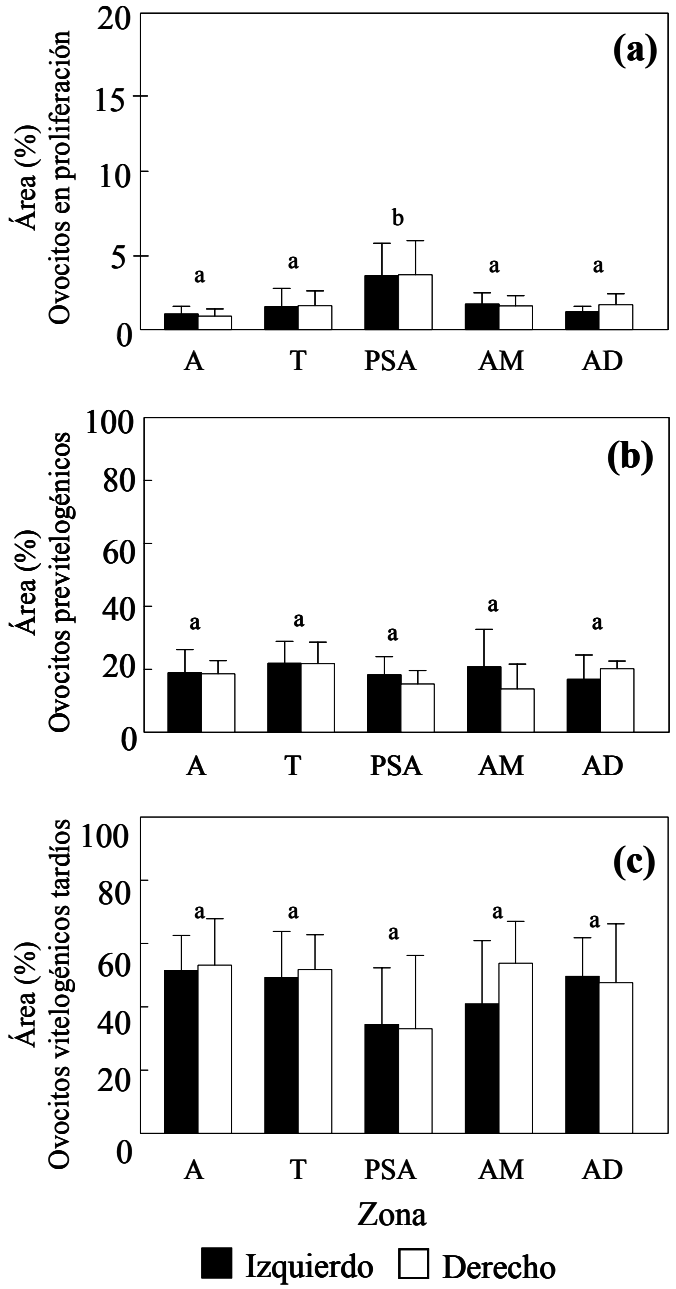

Fig. 9. Estadio vitelogénico tardío: Área ocupada por **a)** ovocitos en proliferación, **b)** ovocitos previtelogénicos y **c)** ovocitos vitelogénicos tardíos, en relación con la zona y lado del ovario. Barras sobre columnas de medias = errores estándar. Símbolos de zonas como en la figura 5 (Ver métodos). Las medias de las zonas con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.01$). N = 5 para cada estadio.

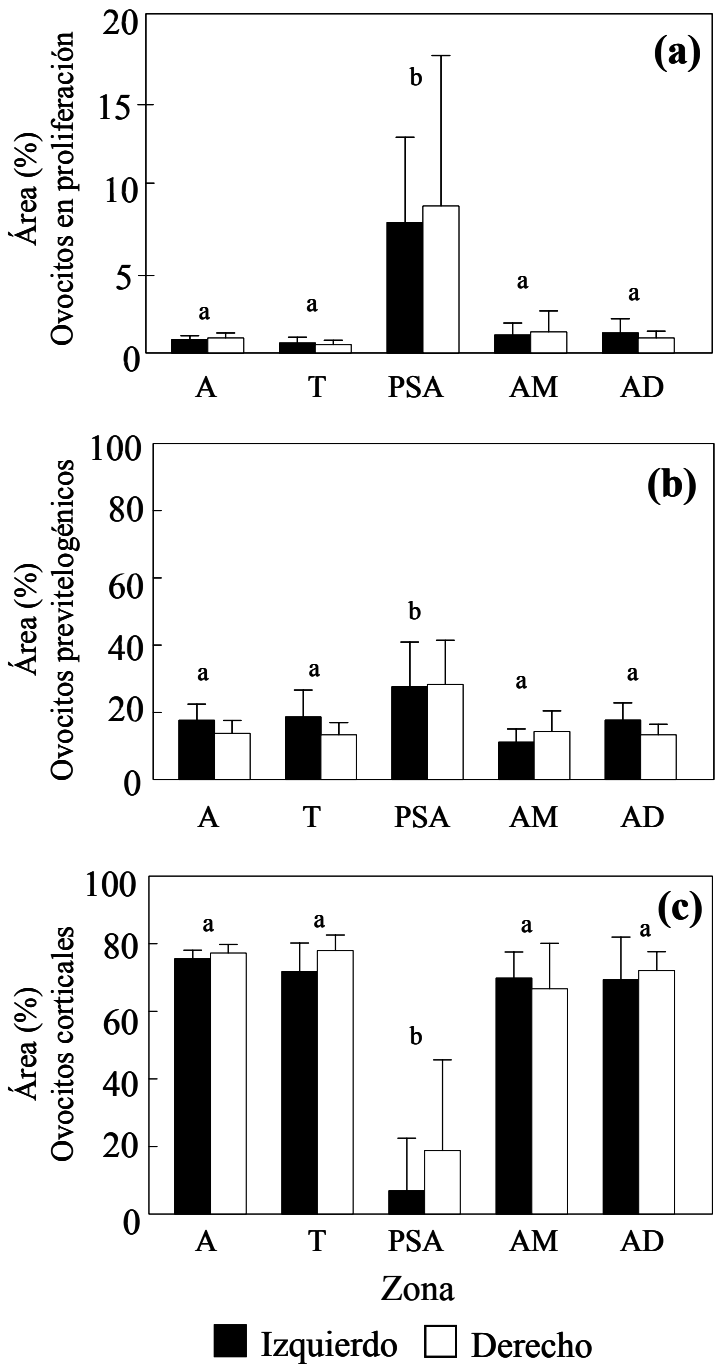

Fig. 10. Estadio cortical: Área ocupada por **a)** ovocitos en proliferación, **b)** ovocitos previtelogénicos y **c)** ovocitos corticales, en relación con la zona y lado del ovario. Barras sobre columnas de medias = errores estándar. Símbolos de zonas como en la figura 5 (Ver métodos). Las medias de las zonas con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.01$). N = 5 para cada estadio.

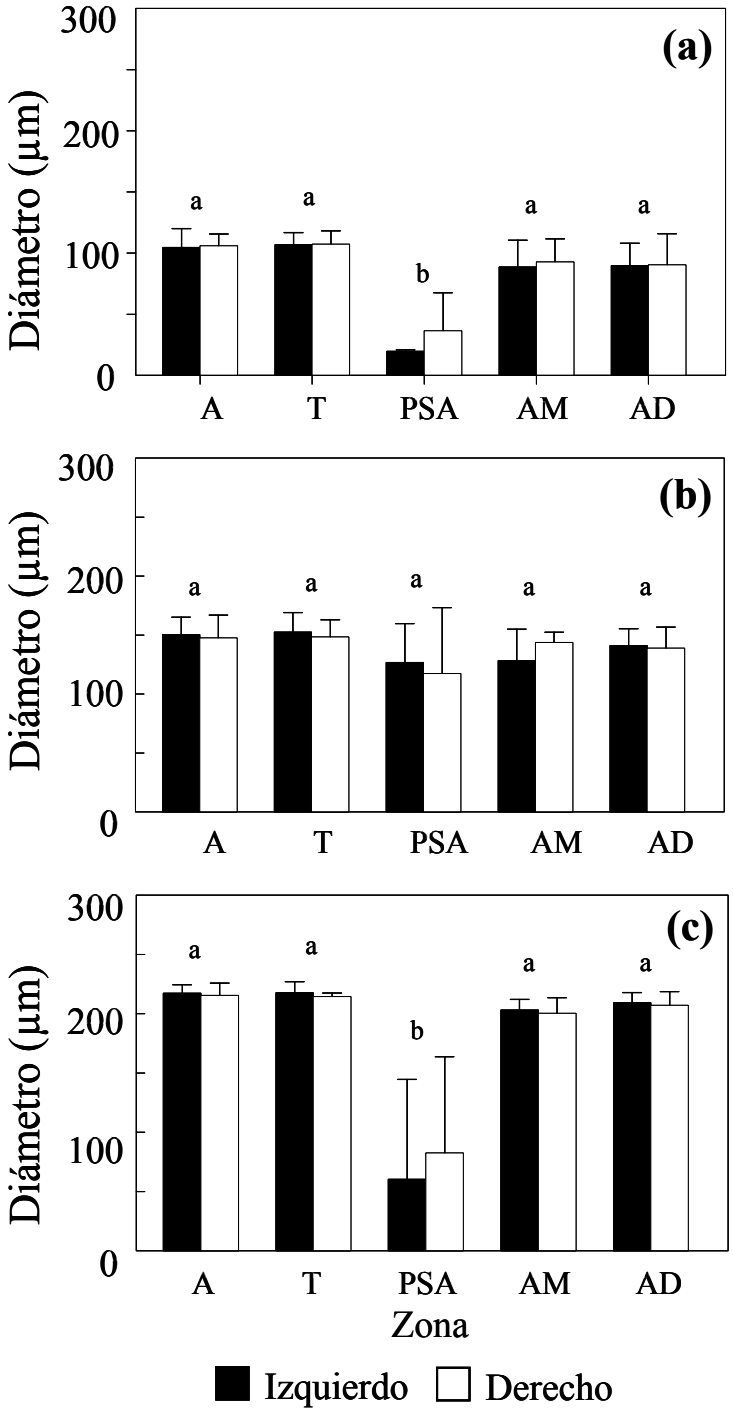

Fig. 11. Diámetro medio de los ovocitos más desarrollados en **a)** estadio vitelogénico temprano, **b)** estadio vitelogénico tardío y **c)** estadio cortical en relación con la zona y lado del ovario. Barras sobre columnas de medias = errores estándar. Símbolos de zonas como en la figura 5 (Ver métodos). Las medias de las zonas con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.01$). N = 5 para cada estadio.

Tabla 6. Diámetros promedio (µm) de los ovocitos y áreas (%) (media ± error estándar) ocupadas por los diferentes tipos de ovocitos en la región cefalotóracica y abdominal por estadio ovárico. N= 5 para cada estadio.

Estadio ovárico		Vitelogénico temprano		Vitelogénico tardío		Cortical		ANDEVA		
		CEF	ABD	CEF	ABD	CEF	ABD	R	EO	INT
Diámetro de OMD		106.1±10.8	90.3±19.6	149.7±15.3	138.0±17.7	216.1±7.5	204.9±10.5	*P*<0.01	*P*<0.001	NS
Ovocitos en proliferación		1.8±1.1	2.3±0.8	1.2±0.8	1.4±0.6	0.7±0.3	1.1±0.8	*P*<0.01	*P*<0.001	NS
OPV		37.4±9.3a	22.6±5.6[b]	20.3±6.1[bc]	17.9±8.0[cd]	15.8±5.5[cd]	14.1±4.9[d]	*P*<0.001	*P*<0.001	*P*<0.001
OMD	OVt	31.1±10.0	25.2±10.2	—	—	—	—	*P*<0.01	*P*<0.01	NS
	OVT	—	—	51.4±12.0	48.0±15.8	—	—			
	OC	—	—	—	—	75.6±5.3	69.5±9.7			

OC = Ovocitos corticales; OVt = Ovocitos vitelogénicos tempranos; OVT = Ovocitos vitelogénicos tardíos; OMD = Ovocitos más desarrollados; OPV = Ovocitos previtelogénicos.

Región cefalotóracica (CEF) representada por las zonas A y T. Región abdominal (ABD) representada por las zonas AM y AD.

Los resultados del ANDEVA bifactorial se muestran para cada variable: R, factor región; EO, factor estadio ovárico; INT, interacción entre factores. Para los ovocitos en previtelogénesis (interacción significativa), los valores que no muestran la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$) por la prueba de Newman-Keuls.

Los resultados de los análisis cuando los datos fueron agrupados en dos regiones (ABD y CEF) están representados en la Tabla 6. Los datos fueron analizados por ANDEVA de dos vías usados considerando a la región (dos niveles: ABD y CEF) y al estadio ovárico (tres niveles: vitelogénico temprano, vitelogénico tardío y bastones corticales) como los dos factores independientes. *A priori*, se esperaban diferencias significativas debidas al estadio ovárico ya que se asignó tomando como base el grado de desarrollo de los ovocitos. Por lo tanto, se hace necesario aclarar que este factor se incluyó en los ANDEVA para discriminar el efecto del estadio y poder probar los dos factores (región y estadio) por separado, así como la interacción entre ellos. De hecho, el efecto del estadio ovárico fue siempre significativo, y como se esperaba, se encontró (en los estadios más avanzados) un incremento en el diámetro de los ovocitos, una disminución en el área ocupada por ovocitos menos desarrollados (en proliferación y OPV), y un incremento en el área ocupada por ovocitos más desarrollados (OVt, OVT, OC). En relación con las diferencias encontradas al comparar las dos regiones, los ovocitos en la región ABD tuvieron un diámetro menor que en la región CEF en todos los estadios de desarrollo ovárico (media global por efecto de región analizado por ANDEVA: $P < 0.001$). La región ABD tuvo una mayor área ocupada por ovocitos en proliferación ($P < 0.01$) y una menor área ocupada por OPV (ANDEVA efecto de la región: $P < 0.001$) que la región CEF (Tabla 6). Sin embargo, el área ocupada por OPV se vio afectada de una forma diferente en relación a la región y estadio ovárico, como se aprecia por una interacción significativa entre los dos factores ($P < 0.001$). El análisis *post-hoc* reveló que la región ABD presentó una menor área ocupada por OPV pero sólo en el estadio vitelogénico temprano (Tabla 6). Por otra parte, la región ABD presentó

un área menor ocupada por los ovocitos más desarrollados (efecto global de región analizado por ANDEVA: $P < 0.01$).

2. Comparación del peso y de las variables de calidad espermática entre las mitades izquierda y derecha del espermatóforo

Al comparar la calidad espermática entre las mitades izquierda y derecha del espermatóforo por medio de pruebas de "t" de comparación pareada, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Tabla 7). Este resultado permitió utilizar una mitad para bioquímica y la otra para análisis de calidad espermática. Los pesos de ambas mitades de los espermatóforos regenerados sucesivamente y comparados por medio pruebas de "t" de comparación pareada no difirieron significativamente (Tabla 7). Por esta razón, el peso del espermatóforo se reportó como la suma de los pesos de ambas mitades.

Tabla 7. Comparación de la calidad espermática (media ± error estándar) entre la mitad izquierda y derecha del espermatóforo. Para los porcentajes se presentan solo las medias retransformadas. En ningún caso se encontraron diferencias significativas. N = 10.

Variable	Izquierdo	Derecho	ANDEVA
Peso espermatóforo (mg)	42.79 ± 3.5	40.97 ± 3.3	NS
Conteo Total (10^6)	25.89 ± 2.92	29.6 ± 2.92	NS
Normales (%)	46.34	44.39	NS
Anormales (%)	18.76	23.49	NS
Muertos (%)	34.88	32.11	NS

3. Análisis del desarrollo gonádico y condición fisiológica en relación con tamaño y edad

3.1 Desarrollo gonádico en hembras de diferente edad

Las variables morfométricas de las hembras analizadas por medio de un ANDEVA en relación con la edad (cuatro niveles: 6, 8, 10 y 12 meses) se presentan en la Tabla 8. En general, las hembras midieron entre 14.0 cm y 18.2 cm (15.9 ± 0.06 coeficiente de variación) y pesaron entre 20.3 g y 51.6 g (33.2 ± 0.22 coeficiente de variación). Las hembras de 6 y 8 meses de edad fueron significativamente más pequeñas en talla y peso que las de 10 y 12 meses de edad. Además, las hembras de 12 meses fueron significativamente más grandes que las de 10 meses. El peso del ovario (r = 0.69), el IGS (r = 0.66) y el diámetro de los ovocitos más desarrollados (r = 0.86) se correlacionaron significativamente con el peso de la hembra por lo que se hicieron los ANCOVA para eliminar el efecto del peso de la hembra. El rango de peso de los ovarios fue de 0.013 g – 0.86 g (0.16 ± 0.01 coeficiente de variación). Por su parte, los rangos en los valores del IGS fueron de 0.05 – 1.84 (0.45 ± 0.89 coeficiente de variación). Tanto el peso del ovario como el IGS fueron significativamente mayores en las hembras de 12 meses de edad. Sin embrago, al eliminar el efecto del peso de la hembra no persistieron las diferencias. Por su parte, el diámetro de los ovocitos más desarrollados incrementó significativamente con la edad, incluso al eliminar el efecto del peso de la hembra (Tabla 8).

Tabla 8. Variables morfométricas de hembras (media ± error estándar) de distintas edades. En los reglones, los valores que no muestran la misma letra son significativamente diferentes. Para el IGS se presentan las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. N = 50 para cada edad.

Edad Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
Longitud (cm)	15.2 ± 0.2 a	15.1 ± 0.1 a	16.1 ± 0.1 b	17.2 ± 0.1 c	$P < 0.0001$
Peso Total (g)	28.1 ± 0.4 a	27.0 ± 0.8 a	33.7 ± 0.8 b	42.5 ± 1.4 c	$P < 0.001$
Peso del ovario (g)	0.03 ± 0.004 a	0.06 ± 0.01 a	0.11 ± 0.01 a	0.42 ± 0.07 b	$P < 0.0001$
	(-0.02 ± 0.082)	(0.03 ± 0.09)	(0.13 ± 0.5)	(0.49 ± 0.13)	(NS)
IGS (%)	0.10 a	0.20 a	0.34 a	0.95 b	$P < 0.0001$
	(-0.01)	(0.16)	(0.40)	(1.14)	(NS)
Diámetro OMD	33.0 ± 1.9 a	55.9 ± 1.2 b	62.8 ± 0.9 b	96.0 ± 2.2 c	$P < 0.001$
	(27.6 ± 8.6 a)	(60.4 ± 9.1 b)	(57.3 ± 5.6 b)	(135.5 ± 14.1 c)	($P < 0.0001$)

IGS = Índice gonadosomático
OMD = Ovocitos más desarrollados

Como resultado del análisis histológico cuantitativo se encontraron correlaciones significativas de las áreas ocupadas por los diferentes tipos de ovocitos con el peso del camarón, a excepción del área ocupada por ovocitos en fase de glóbulo de aceite (Tabla 9).

Tabla 9. Correlaciones significativas entre áreas ocupadas por diferentes tipos de ovocitos y el peso de hembras de distintas edades.

Variable	*r*	*P*
ovogonias-ovo sinapsis	-0.78	0.000
ovo nucleolo cromatina	-0.56	0.005
ovo perinucleolo	-0.57	0.003
ovo sin vitelo	0.63	0.001
ovo gránulos de vitelo	0.59	0.002
otros tejidos *	-0.69	0.000

*i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas

Los porcentajes de áreas ocupadas por cada tipo de ovocito en relación con la edad se presentan en la tabla 10. Se encontró diferencia significativa entre edades en las áreas ocupadas por ovogonias-ovocitos en sinapsis y ovocitos en fase de nucleolo cromatina, donde ambos presentaron una tendencia a disminuir con la edad. Cuando se elimina el efecto del peso mediante el ANCOVA, persisten los mismos resultados para el área ocupada por ovocitos en fase de nucleolo cromatina pero se eliminan en el caso de las ovogonias-ovocitos en sinapsis. El área ocupada por ovocitos en fase de perinucleolo fue significativamente mayor a los 8 y 10 meses de edad y no hubo diferencia significativa entre los 6 y 12 meses de edad. Al eliminar el efecto del peso por ANCOVA, persisten las diferencias con los 6 meses pero ahora los 12 meses son similares a los 8 y 10 meses de edad. A los 6 y 8 meses de edad no se encontraron ovocitos en fase de glóbulo de aceite y la proporción de este tipo de ovocitos fue significativamente mayor a los 10 meses. Los ovocitos en fase sin vitelo y ovocitos en fase de gránulos de vitelo solo se presentaron a los 12 meses de edad y hubo diferencia significativa con respecto a las demás edades. Sin embargo, al eliminar el efecto del peso por ANCOVA ya no se encontró diferencia significativa. Finalmente, el área ocupada por otros tejidos (i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas) fue significativamente mayor a los 6-8 meses de edad en comparación con los 10-12 meses de edad, aún después de eliminar el efecto del peso.

Tabla 10. Área ocupada por los diferentes tipos de ovocitos (medias retransformadas) en hembras de distintas edades. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas retransformadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 9). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 6 para cada edad.

Edad Área ocupada por	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
ovogonias-ovo sinapsis	8.3 b	4.7 b	3.5 ab	0.4 a	$P < 0.01$
	(8.0)	(3.3)	(9.6)	(18.3)	(NS)
ovo nucleolo cromatina	23.1 b	9.7 ab	9.0 a	1.3 a	$P < 0.001$
	(33.7 c)	(23.3 b)	(12.9 b)	(-3.7 a)	($P < 0.01$)
ovo perinucleolo	47.2 a	67.0 b	67.3 b	31.3 a	$P < 0.0001$
	(39.7 a)	(50.9 b)	(56.1 b)	(41.2 ab)	($P < 0.01$)
ovo glóbulo de aceite	0 a	0 a	8.8 b	0.2 a	$P < 0.001$
ovo sin vitelo	0 a	0 a	0 a	16.0 b	$P < 0.05$
	(9.8)	(10.7)	(-1.1)	(-3.1)	(NS)
ovo gránulos de vitelo	0 a	0 a	0 a	43.4 b	$P < 0.001$
	(-12.6 a)	(-13.8 a)	(1.4 a)	(60.9 b)	($P < 0.01$)
otros tejidos *	21.4 b	18.6 b	11.4 a	7.4 a	$P < 0.0001$
	(30.2 c)	(28.6 c)	(19.2 b)	(10.0 a)	($P < 0.01$)

* i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas
ovo = ovocitos

3.2. Desarrollo gonádico en hembras de la misma edad y diferente tamaño

Las variables morfométricas de hembras de la misma edad y diferente tamaño, analizadas por ANDEVA unifactorial (dos niveles: hembras grandes y pequeñas) se presentan en la Tabla 11. Se encontró que las hembras provenientes del estanque supralitoral (hembras pequeñas) fueron significativamente menores en talla y peso que las

hembras provenientes del estanque de mareas (hembras grandes). Tanto el peso del ovario como el IGS y los diámetros de los ovocitos más desarrollados fueron significativamente mayores en las hembras grandes. Sin embargo, al aplicar los ANCOVA, solo se mantuvieron las diferencias en el diámetro de los ovocitos más desarrollados.

Tabla 11. Variables morfométricas (media ± error estándar) de hembras de 12 meses de edad de distinto tamaño. En los reglones, los valores que no muestran la misma letra son significativamente diferentes. Para el IGS se presentan solo las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. N = 50 para cada edad.

Variable	Hembras grandes	Hembras pequeñas	ANDEVA (ANCOVA)
Peso total (g)	42.5 ± 1.4 b	24.1 ± 1.0 a	$P < 0.0001$
Longitud (cm)	17.2 ± 0.1 b	14.4 ± 0.2 a	$P < 0.0001$
peso del ovario (g)	0.42 ± 0.07 b	0.1 ± 0.02 a	$P < 0.001$
	(0.52 ± 0.18)	(0.02 ± 0.18)	(NS)
IGS (%)	0.95 b	0.48 a	$P < 0.01$
	(1.22)	(0.24)	(NS)
Diámetro OMD (µm)	96.0 ± 2.2 b	37.5 ± 0.6 a	$P < 0.0001$
	(134.9 ± 18.5 b)	(51.6 ± 18.5 a)	($P < 0.05$)

IGS = Índice gonadosomático
OMD = Ovocitos más desarrollados

Como resultado del análisis histológico cuantitativo se encontraron correlaciones significativas de las áreas ocupadas por los diferentes tipos de ovocitos con el peso del camarón, a excepción de las áreas ocupadas por ovocitos en fase de glóbulo de aceite y por otros tejidos (i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas) (Tabla 12).

Tabla 12. Correlaciones significativas entre áreas ocupadas por diferentes tipos de ovocitos y el peso de hembras de 12 meses de edad de distintos tamaños.

Variable	*r*	*P*
ovogonias-ovo sinapsis	-0.88	0.000
ovo nucleolo cromatina	-0.69	0.014
ovo perinucleolo	-0.88	0.000
ovo sin vitelo	0.60	0.037
ovo gránulos de vitelo	0.58	0.050

Tabla 13. Área ocupada por los diferentes tipos de ovocitos (medias retransformadas) en hembras de 12 meses de edad de distinto tamaño. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas retransformadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 12). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 6 para cada edad.

Área ocupada por	Hembras grandes	Hembras pequeñas	ANDEVA (ANCOVA)
ovogonias-ovo sinapsis	0.4 a	3.6 b	$P < 0.001$
	(6.3)	(7.2)	(NS)
ovo nucleolo cromatina	1.3 a	7.3 b	$P < 0.001$
	(-0.04 a)	(21.8 b)	($P < 0.001$)
ovo perinucleolo	31.3 a	74.8 b	$P < 0.0001$
	(31.0 a)	(62.8 b)	($P < 0.01$)
ovo glóbulo de aceite	0.2 a	6.5 b	$P < 0.05$
ovo sin vitelo	16.0	0	NS
	(-2.4)	(18.6)	(NS)
ovo gránulos de vitelo	43.4 b	0 a	$P < 0.05$
	(59.9 b)	(-24.1 a)	($P < 0.05$)
otros tejidos *	7.4	7.7	NS

* i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas
ovo = ovocitos

Los porcentajes de áreas ocupadas por cada tipo de ovocito en hembras de la misma edad y diferente tamaño se presentan en la tabla 13. Las hembras pequeñas presentaron significativamente mayores áreas ocupadas por ovogonias-ovocitos en sinapsis, ovocitos en fase de nucleolo cromatina, de perinucleolo y de glóbulo de aceite que las hembras grandes. Sin embargo, al eliminar el efecto del peso de la hembra, solo persistieron las diferencias en las áreas ocupadas por ovocitos en fase de nucleolo cromatina y de perinucleolo. Las hembras grandes presentaron significativamente mayor área ocupada por ovocitos en fase de gránulos de vitelo, inclusive al eliminar el efecto del peso de la hembra. En el área ocupada por ovocitos sin vitelo y por otros tejidos (i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas) no hubo diferencia significativa.

3.3 Condición fisiológica en hembras de diferente edad

Las variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de hembras de distintas edades se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de hembras de distintas edades.

Tejido	Variable	*r*	*P*
Hemolinfa			
	Proteínas	0.55	0.000
	Carbohidratos	-0.35	0.005
	Lípidos	0.30	0.016
	Colesterol	0.37	0.003
Ovario			
	Proteínas	0.44	0.004
	Lípidos	0.40	0.005
Hepatopáncreas			
	Lípidos	0.40	0.006
Músculo			
	Carbohidratos	-0.41	0.005

La composición bioquímica de la hemolinfa en hembras de distinta edad (cuatro niveles: 6, 8, 10 y 12 meses) se presenta en la tabla 15. La concentración de proteínas a los 12 meses de edad fue significativamente mayor que en las otras edades. Al eliminar el efecto del peso de la hembra se detectó un efecto de la edad que fue independiente del peso del camarón. La concentración más alta de proteínas se presentó a los 8 y 12 meses de edad, mientras que la concentración más baja fue en camarones de 6 y 10 meses de edad. La concentración de carbohidratos fue significativamente mayor a los 6 meses y menor a los 10 meses, aún eliminando el efecto del peso de la hembra. La concentración de glucosa fue significativamente mayor en hembras de 6 meses de edad. La concentración de lípidos no fue significativamente diferente entre hembras de distintas edades. Sin embargo, al aplicar el ANCOVA se encontró que, independientemente del peso, la concentración de lípidos en hemolinfa disminuye con la edad. La concentración de acilglicéridos fue significativamente menor en hembras de 10 meses de edad. El colesterol fue significativamente menor a los 8 meses de edad pero al eliminar el efecto del peso con el uso del ANCOVA se encontró que el colesterol fue significativamente mayor a los 6 meses que a los 8, 10 y 12. En la concentración de lactato hubo diferencia significativa entre edades pero sin una tendencia clara; mientras que la concentración de hemocianina presentó una disminución con la edad, con valores significativamente más bajos a los 10-12 meses de edad.

Tabla 15. Composición bioquímica de la hemolinfa (media ± error estándar) en hembras de distintas edades. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 14). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes.

Edad (meses) Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
Proteínas (mg/ml)	108.6 ± 8.5 a (117.7 ± 9.0 ac)	127.0 ± 5.7 a (138.7 ± 8.3 b)	106.7 ± 5.6 a (104.8 ± 6.0 a)	166.6 ± 7.8 b (147.6 ± 10.5 bc)	$P < 0.001$ ($P < 0.0001$)
Carbohidratos (mg/ml)	1.0 ± 0.05 c (1.0 ± 0.07 c)	0.6 ± 0.07 b (0.5 ± 0.07 b)	0.3 ± 0.02 a (0.3 ± 0.05 a)	0.4 ± 0.05 ab (0.4 ± 0.08 ab)	$P < 0.001$ ($P < 0.0001$)
Glucosa (mg/ml)	0.32 ± 0.01 c	0.25 ± 0.03 bc	0.13 ± 0.02 a	0.18 ± 0.03 ab	$P < 0.001$
Lípidos (mg/ml)	1.3 ± 0.1 (1.6 ± 0.2 b)	1.1 ± 0.1 (1.4 ± 0.2 b)	0.9 ± 0.1 (0.9 ± 0.1 a)	1.44 ± 0.2 (0.9 ± 0.2 a)	NS ($P < 0.05$)
Acilglicéridos (mg/ml)	0.67 ± 0.02 b	0.53 ± 0.04 ab	0.35 ± 0.05 a	0.51 ± 0.08 ab	$P < 0.01$
Colesterol (mg/ml)	0.28 ± 0.02 b (0.32 ± 0.03 b)	0.18 ± 0.1 a (0.23 ± 0.03 a)	0.19 ± 0.02 ab (0.18 ± 0.02 a)	0.27 ± 0.02 b (0.19 ± 0.03 a)	$P < 0.01$ ($P < 0.01$)
Lactato (mg/ml)	0.35 ± 0.05 ab	0.63 ± 0.04 c	0.19 ± 0.02 a	0.54 ± 0.08 bc	$P < 0.001$
Hemocianina (mg/ml)	120.4 ± 4.2 b	107.9 ± 5.8 b	84.0 ± 6.8 a	100.8 ± 6.6 ab	$P < 0.01$

La composición bioquímica de los tejidos en relación con las hembras de distintas edades se presenta en la tabla 16. No se encontraron diferencias significativas del porcentaje de agua, ni en las concentraciones de carbohidratos y acilglicéridos en los ovarios. Sin embargo, la concentración de proteínas en ovario fue significativamente mayor a los 12 meses de edad y al eliminar el efecto del peso mediante ANCOVA se obtuvo el mismo resultado. En el caso de los lípidos en ovario, a los 10 meses de edad la concentración fue significativamente menor que en las otras edades, mientras que no hubo

diferencia significativa entre los 8 y 12 meses y al eliminar el efecto del peso mediante ANCOVA se obtuvo el mismo resultado.

Tabla 16. Composición bioquímica de ovario, hepatopáncreas y músculo (media ± error estándar) en hembras de distintas edades. En el caso del agua solo se presenta la media retransformada. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 14). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

	Edad (meses) / Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
Ovario	Agua (%)		79.6	79.4	79.9	NS
	Proteínas (mg/g)		429.1 ± 30.4 a (427.1 ± 40.6 a)	449.0 ± 20.6 a (448.6 ± 30.2a)	603.1 ± 37.1 b (605.5 ± 41.8 b)	$P < 0.001$ ($P < 0.05$)
	Carbohidratos (mg/g)		21.5 ± 3.2	17.8 ± 2.8	16.8 ± 2.7	NS
	Lípidos (mg/g)		34.2 ± 1.6 ab (46.2 ± 8.1 b)	20.1 ± 1.7 a (22.2 ± 5.9 a)	52.9 ± 11.6 b (38.8 ± 8.7 ab)	$P < 0.01$ ($P < 0.05$)
	Acilglicéridos (mg/g)		8.1 ± 1.2	5.7 ± 1.1	14.9 ± 5.0	NS
Hepatopáncreas	Agua (%)	70.2	71.2	72.0	68.7	NS
	Proteínas (mg/g)	134.9 ± 6.3 b	78.1 ± 4.5 a	119.1 ± 25.4 ab	81.4 ± 6.0 ab	$P < 0.05$
	Carbohidratos (mg/g)	90.7 ± 4.7	78.0 ± 5.5	88.9 ± 10.6	65.7 ± 4.0	NS
	Lípidos (mg/g)	116.8 ± 10.0 ab (128.3 ± 32.1ab)	146.7 ± 34.9 ab (160.9 ± 31.2 ab)	80.1 ± 17.1 a (79.0 ± 25.7 a)	212.0 ± 31.4 b (187.4 ± 40.7 b)	$P < 0.01$ ($P < 0.05$)
	Acilglicéridos (mg/g)	87.0 ± 9.4 b	58.8 ± 9.6 ab	26.6 ± 8.2 a	79.6 ± 12.7 b	$P < 0.001$
Músculo	Agua (%)	75.7	76.3	75.3	75.5	NS
	Proteínas (mg/g)	714.2 ± 11.9 c	661.9 ± 14.4 b	618.5 ± 12.4 ab	611.9 ± 12.4 a	$P < 0.0001$
	Carbohidratos (mg/g)	11.9 ± 1.0 b (12.7 ± 1.1 b)	9.2 ± 0.9 b (10.2 ± 1.1 b)	3.8 ± 0.9 a (3.8 ± 0.9 a)	3.4 ± 0.3 a (1.7 ± 1.5 a)	$P < 0.0001$ ($P < 0.0001$)

En el caso de la composición bioquímica del hepatopáncreas de hembras de distintas edades (Tabla 16), no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de agua en el tejido, ni en la concentración de carbohidratos. En la concentración de proteínas se encontró una ligera tendencia a que éstas disminuyeran con la edad, aunque el valor significativamente más bajo se obtuvo a los 8 meses. La concentración de lípidos en el hepatopáncreas fue significativamente menor a los 10 meses de edad y cuando se aplicó el ANCOVA, se encontró el mismo resultado. La concentración de acilglicéridos en hepatopáncreas fue significativamente mayor a los 6 y 12 meses de edad.

Cuando se analizó la composición bioquímica del músculo en relación con la edad de las hembras (Tabla 16), se encontró que el porcentaje de agua en el tejido no difirió significativamente entre edades. Las concentraciones de proteínas y carbohidratos disminuyeron con la edad; las de proteínas fueron significativamente menores a los 12 meses, mientras que las de carbohidratos fueron significativamente menores a partir de los 10 meses. Al aplicar el ANCOVA en el caso de los carbohidratos, se obtuvo el mismo resultado.

3.4 Condición fisiológica de hembras de la misma edad y distinto tamaño

Las variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de hembras de 12 meses y distintos tamaños se presentan en la tabla 17.

Tabla 17. Variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de hembras de 12 meses de edad y distintos tamaños.

Tejido	Variable	*r*	*P*
Hepatopáncreas			
	Proteínas	-0.6	0.001
	Carbohidratos	-0.45	0.016
Músculo			
	Proteínas	-0.8	0.000
	Carbohidratos	-0.6	0.001

La composición bioquímica de la hemolinfa en hembras de 12 meses y distintos tamaños (dos niveles: grandes y pequeñas) se presenta en la tabla 18. En ningún caso se encontró una correlación con el peso de la hembra por lo que no se hicieron ANCOVA. Solo se encontró diferencia significativa en las concentraciones de lípidos, las cuales fueron mayores en las hembras grandes.

Tabla 18. Composición bioquímica de la hemolinfa (media ± error estándar) de hembras de 12 meses y distintos tamaños. En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

Variable	Hembras grandes	Hembras pequeñas	ANDEVA
Proteínas (mg/ml)	166.6 ± 7.8	175.8 ± 4.3	NS
Carbohidratos (mg/ml)	0.4 ± 0.05	0.3 ± 0.02	NS
Glucosa (mg/ml)	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.01	NS
Lípidos (mg/ml)	1.44 ± 0.2 a	2.18 ± 0.1 b	$P < 0.01$
Acilglicéridos (mg/ml)	0.51 ± 0.08	0.65 ± 0.02	NS
Colesterol (mg/ml)	0.27 ± 0.02	0.31 ± 0.01	NS
Lactato (mg/ml)	0.54 ± 0.08	0.46 ± 0.05	NS
Hemocianina (mg/ml)	100.8 ± 6.6	96.0 ± 3.2	NS

Al analizar la composición bioquímica del ovario en hembras de 12 meses y distinto tamaño (Tabla 19), no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables; asimismo, en este caso no se obtuvo ninguna correlación significativa entre las variables y el peso de las hembras.

Tabla 19. Composición bioquímica de ovario, hepatopáncreas y músculo (media ± error estándar) de hembras de 12 meses y distinto tamaño. En el caso del agua solo se presentan las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 17). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

	Variable / Edad (meses)	Hembras grandes	Hembras pequeñas	ANDEVA (ANCOVA)
Ovario	Agua (%)	79.9	78.8	NS
	Proteínas (mg/g)	603.1 ± 37.1	567.7 ± 27.9	NS
	Carbohidratos (mg/g)	16.8 ± 2.7	19.6 ± 2.4	NS
	Lípidos (mg/g)	52.9 ± 11.6	60.1 ± 5.2	NS
	Acilglicéridos (mg/g)	14.9 ± 5.0	10.2 ± 2.0	NS
Hepatopáncreas	Agua (%)	68.7	67.8	NS
	Proteínas (mg/g)	81.4 ± 6.0 a (79.1 ± 10.1 a)	136.7 ± 6.1 b (139.0 ± 9.8 b)	$P < 0.0001$ ($P < 0.01$)
	Carbohidratos (mg/g)	65.7 ± 4.0 a (67.4 ± 8.8)	87.3 ± 5.9 b (85.6 ± 8.5)	$P < 0.01$ (NS)
	Lípidos (mg/g)	212.0 ± 31.4 a	299.0 ± 17.1 b	$P < 0.05$
	Acilglicéridos (mg/g)	79.6 ± 12.7	79.7 ± 8.6	NS
Músculo	Agua (%)	75.5	74.2	NS
	Proteínas (mg/g)	611.9 ± 12.4 (599.1 ± 18.1)	589.4 ± 9.9 (602.2 ± 17.4)	NS (NS)
	Carbohidratos (mg/g)	3.4 ± 0.3 (3.9 ± 1.0)	5.1 ± 0.7 (4.6 ± 0.9)	NS (NS)

En el caso de la composición bioquímica del hepatopáncreas de hembras de 12 meses y distinto tamaño (Tabla 19), no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de agua en el tejido, ni para la concentración de acilglicéridos. La concentración de proteínas fue significativamente más baja en las hembras grandes aún después de eliminar el efecto del peso de la hembra. La concentración de carbohidratos en el hepatopáncreas fue significativamente menor en las hembras grandes y al aplicar el ANCOVA ya no se encontró diferencia significativa. Por su parte, la concentración de lípidos en hepatopáncreas fue significativamente mayor en las hembras pequeñas.

En la composición bioquímica del músculo de hembras de 12 meses y distinto tamaño (Tabla 19), no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables, incluso después de aplicar los ANCOVA.

3.5 Desarrollo gonádico en machos de diferente edad

Las variables morfométricas de los machos de distintas edades, analizados por medio de un ANDEVA unifactorial (cuatro niveles: 6, 8, 10 y 12) se presentan en la tabla 20. En general, los machos midieron entre 13.5 cm y 17.4 cm (15.4 ± 0.06 coeficiente de variación) y pesaron entre 20.1 g y 42.5 g (29.1 ± 0.22 coeficiente de variación). Los machos de 6 y 8 meses de edad fueron significativamente más pequeños en talla y peso que los de 10 y 12 meses de edad, mientras que los de 12 meses fueron significativamente más grandes que los de 10 meses. El peso del testículo ($r = 0.93$) y el IGS ($r = 0.92$) se correlacionaron significativamente con el peso del macho por lo que se hicieron los ANCOVA para eliminar el efecto del peso del macho. El rango de peso del testículo fue de 0.015 a 0.23 g (media 0.09 ± 0.07 DS). Por su parte, el rango de los valores del IGS fue de

0.06 a 0.6 (media 0.28 ± 0.16 DS). Tanto el peso del testículo como el IGS fueron significativamente mayores en los machos de 10 y 12 meses de edad.

Tabla 20. Variables morfométricas de machos de distintas edades (media ± error estándar). En los renglones los valores que no muestran la misma letra son significativamente diferentes. Para el IGS se presentan solo las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. N = 50 para cada edad.

Edad Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
Longitud (cm)	14.6 ± 0.06 a	14.7 ± 0.07 a	15.6 ± 0.07 b	16.6 ± 0.05 c	$P < 0.001$
Peso total (g)	24.9 ± 0.3 a	24.7 ± 0.4 a	30.3 ± 0.5 b	38.0 ± 0.4 c	$P < 0.001$
Peso del testículo (g)	0.03 ± 0.003 a (0.05 ± 0.010 a)	0.05 ± 0.004 a (0.06 ± 0.009 a)	0.10 ± 0.010 b (0.10 ± 0.007 b)	0.18 ± 0.008 c (0.17 ± 0.14 c)	$P < 0.001$ ($P < 0.001$)
IGS (%)	0.13 a (0.19 a)	0.21 a (0.25 a)	0.33 b (0.33 b)	0.48 c (0.42 c)	$P < 0.0001$ ($P < 0.01$)

IGS = Índice gonadosomático

Las áreas ocupadas por cada tipo celular en los testículos de camarones de distinta edad se presentan en la tabla 21. Solo el área ocupada por espermatogonias se correlacionó con el peso del macho (r = -0.68, $P < 0.000$); ésta fue significativamente menor a los 12 meses de edad, pero al eliminar el efecto del peso por ANCOVA no persistió dicha diferencia. A pesar de que no hubo diferencia significativa en las áreas ocupadas por espermatocitos primarios, secundarios y espermátidas entre edades, se puede apreciar una tendencia de éstas a aumentar con la edad. En el caso del área ocupada por otros tejidos (i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas) no hay diferencia significativa entre machos de distintas edades.

Tabla 21. Área ocupada por los diferentes tipos celulares en los testículos de camarones de distintas edades (medias retransformadas). Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas retransformadas. Solo se hizo ANCOVA en el caso donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón. En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 6 para cada edad.

Edad Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
Área ocupada por EG	39.5 bc (37.2)	42.1 c (406)	23.3 ab (23.4)	16.6 a (20.2)	$P < 0.001$ (NS)
Área ocupada por EP	16.9	15.3	19.1	20.3	NS
Área ocupada por ES	10.0	11.4	19.7	20.7	NS
Área ocupada por E	20.4	18.1	24.1	29.5	NS
Otros tejidos*	13.1	13.1	13.7	12.8	NS

* i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas
EG espermatogonias; EP espermatocitos primarios; ES espermatocitos secundarios; E espermátidas

3.6 Desarrollo gonádico en machos de la misma edad y diferente tamaño

Las variables morfométricas de los machos de 12 meses y distinto tamaño analizadas por ANDEVA unifactorial (dos niveles: machos grandes y pequeños) se presentan en la Tabla 22. Se observó que los machos provenientes del estanque de mareas (machos grandes) fueron significativamente más grandes en talla y peso que los machos del estanque supralitoral (machos pequeños). Los machos grandes presentaron valores de peso de testículo y de IGS significativamente mayores que los machos pequeños, sin embargo al eliminar el efecto del peso del macho ya no persisten las diferencias.

Tabla 22. Variables morfométricas de machos de 12 meses y distinto tamaño (media ± error estándar). En los renglones los valores que no muestran la misma letra son significativamente diferentes. Para el IGS se presentan solo las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. N = 50 para cada edad.

Variable	Machos grandes	Machos pequeños	ANDEVA (ANCOVA)
Peso total (g)	38.0 ± 0.4 b	21.6 ± 0.3 a	$P < 0.001$
Longitud (cm)	16.6 ± 0.05 b	14.0 ± 0.07 a	$P < 0.001$
Peso del testículo (g)	0.18 ± 0.01 b	0.08 ± 0.01 a	$P < 0.0001$
	(0.13 ± 0.02)	(0.13 ± 0.02)	(NS)
IGS (%)	0.48 b	0.36 a	$P < 0.05$
	(0.43 ± 0.08)	(0.42 ± 0.08)	(NS)

IGS = Índice gonadosomático

Las áreas ocupadas por cada tipo celular en los testículos de camarones de 12 meses y distinto tamaño se presentan en la Tabla 23. No se encontraron diferencias significativas en ninguna variable entre los machos grandes y pequeños. Sin embargo, cabe resaltar que el área ocupada por espermátidas fue casi el doble en los machos grandes. El área ocupada por espermatocitos secundarios fue la única variable correlacionada con el peso del macho ($r = -0.60$, $P < 0.039$), y al eliminar el efecto del peso mediante el uso de ANCOVA, se detectó diferencia significativa.

Tabla 23. Área ocupada por los diferentes tipos celulares en los testículos en camarones de 12 meses y distinto tamaño (medias retransformadas). Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas retransformadas. Solo se hizo ANCOVA en el caso donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón. En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 6 para cada edad.

Variable	Machos grandes	Machos pequeños	ANDEVA (ANCOVA)
Área ocupada por EG	16.6	17.3	NS
Área ocupada por EP	20.3	23.8	NS
Área ocupada por ES	20.7	30.3	NS
	(61.2)	(-10.2)	($P < 0.05$)
Área ocupada por E	29.5	17.7	NS
Otros tejidos *	12.8	12.9	NS

*i. e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas
EG espermatogonias; EP espermatocitos primarios; ES espermatocitos secundarios; E espermátidas

3.7 Condición fisiológica en machos de diferente edad

Las variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso del macho de distintas edades se presentan en la tabla 24.

Tabla 24. Variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de machos de distintas edades.

Tejido	Variable	*r*	*P*
Hemolinfa			
	Proteínas	0.75	0.000
	Carbohidratos	-0.38	0.001
	Lactato	0.70	0.000
	hemocianina	0.34	0.003
Testículo			
	Lípidos	-0.35	0.028
Hepatopáncreas			
	Carbohidratos	-0.33	0.016
Músculo			
	Proteínas	-0.49	0.000
Espermatóforo			
	Lactato	-0.04	0.002
Vaso deferente			
	Proteínas	-0.54	0.000
	Carbohidratos	-0.26	0.043
	Lactato	-0.36	0.004
	Lípidos	-0.48	0.000
Ámpula terminal			
	Proteínas	0.43	0.001

La composición bioquímica de la hemolinfa de machos de diferente edad (cuatro niveles: 6, 8, 10 y 12 meses) se presenta en la tabla 25. La concentración de proteínas en hemolinfa fue significativamente mayor en machos de 12 meses de edad en comparación con machos de otras edades. Sin embargo, al aplicar un ANCOVA usando el peso del camarón como covariable se encontró que la concentración de proteínas fue significativamente menor a los 10 meses de edad. La concentración de carbohidratos fue significativamente mayor a los 6 meses, incluso después de eliminar el efecto del peso del camarón mediante un ANCOVA. A los 8 y 10 meses de edad se encontraron los valores significativamente menores de glucosa, lípidos, acilglicéridos y colesterol.

Tabla 25. Composición bioquímica de la hemolinfa de machos de diferente edad (media ± error estándar). Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas retransformadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 24). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

Edad (meses) Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
Proteínas (mg/ml)	112.7 ± 1.8 ab (134.1 ± 5.6 b)	123.6 ± 5.5 b (141.1 ± 5.0 b)	102.9 ± 3.4 a (100.5 ± 3.8 a)	175.2 ± 5.6 c (138.7 ± 7.6 b)	$P < 0.001$ ($P < 0.0001$)
Carbohidratos (mg/ml)	1.16 ± 0.08 b (1.20 ± 0.08 c)	0.60 ± 0.06 a (0.63 ± 0.07 b)	0.39 ± 0.04 a (0.39 ± 0.06 a)	0.51 ± 0.04 a (0.45 ± 0.11 ab)	$P < 0.0001$ ($P < 0.0001$)
Glucosa (mg/ml)	0.30 ± 0.01 b	0.17 ± 0.03 a	0.15 ± 0.03 a	0.25 ± 0.02 b	$P < 0.0001$
Lípidos (mg/ml)	1.3 ± 0.08 b	1.1 ± 0.2 ab	0.7 ± 0.2 a	1.3 ± 0.1 b	$P < 0.05$
Acilglicéridos (mg/ml)	0.5 ± 0.03 b	0.36 ± 0.05 a	0.28 ± 0.06 a	0.43 ± 0.03 ab	$P < 0.01$
Colesterol (mg/ml)	0.31 ± 0.02 c	0.14 ± 0.02 a	0.13 ± 0.02 a	0.24 ± 0.01 b	$P < 0.0001$
Lactato (mg/ml)	0.2 ± 0.04 a (0.5 ± 0.11 b)	0.6 ± 0.03 b (0.8 ± 0.10 c)	0.3 ± 0.06 ab (0.2 ± 0.08 a)	1.3 ± 0.1 c (0.8 ± 0.16 bc)	$P < 0.0001$ ($P < 0.0001$)
Hemocianina (mg/ml)	113.2 ± 5.8 ab (138.0 ± 10.1 c)	97.4 ± 8.6 ab (117.6 ± 9.1 b)	88.5 ± 7.7 a (85.7 ± 7.0 a)	124.2 ± 7.1 b (81.9 ± 13.9 a)	$P < 0.01$ ($P < 0.01$)

La concentración de lactato no presentó un patrón regular con la edad, pero el valor significativamente más alto fue a los 12 meses, al eliminar el efecto del peso con el uso del ANCOVA se encontró que el lactato fue significativamente mayor a los 8 y 12 meses. La concentración de hemocianina fue significativamente menor a los 10 meses de edad, cuando se aplicó un ANCOVA usando el peso del camarón como covariable se detectó un efecto de la edad independiente del peso del camarón, con una disminución en relación con la edad.

Por otra parte, al analizar la composición bioquímica del testículo en camarones de distintas edades (Tabla 26), no se encontraron diferencias significativas, con la excepción de la concentración de lípidos que disminuyó significativamente en machos de mayor edad y presentó valores más altos a los 8 meses. Sin embargo, al eliminar el efecto del peso mediante ANCOVA no se obtuvo diferencia significativa de la concentración de lípidos entre edades.

En el caso de la composición bioquímica del hepatopáncreas en machos de distintas edades (Tabla 26), no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de agua en el tejido, ni en la concentración de lípidos. La concentración de proteínas en el hepatopáncreas fue significativamente mayor a los 6 y 10 meses, mientras que la concentración de carbohidratos disminuyó significativamente con la edad, incluso al eliminar el efecto del peso del macho. La concentración de acilglicéridos fue significativamente mayor a los 6 meses de edad y entre las demás edades no hubo diferencia significativa.

Tabla 26. Composición bioquímica de testículo, hepatopáncreas y músculo de machos de distintas edades (media ± error estándar). En el caso del agua solo se presentan las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 24). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

	Edad (meses) / Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
Testículo	Agua (%)		82.2	81.0	83.3	NS
	Proteínas (mg/g)		510.2 ± 22.9	448.7 ± 51.8	529.8 ± 15.4	NS
	Carbohidratos (mg/g)		27.2 ± 5.2	28.4 ± 5.1	22.0 ± 1.4	NS
	Lípidos (mg/g)		58.4 ± 5.5 b (51.2 ± 7.4)	43.3 ± 4.7 a (42.0 ± 5.0)	44.7 ± 3.3 a (53.2 ± 8.1)	$P < 0.05$ (NS)
	Acilglicéridos (mg/g)		12.9 ± 1.2	9.2 ± 1.8	10.3 ± 4.0	NS
Hepatopáncreas	Agua (%)	74.0	78.6	78.1	73.7	NS
	Proteínas (mg/g)	187.4 ± 5.8 b	126.4 ± 6.1 a	176.8 ± 20.6 b	131.0 ± 9.0 a	$P < 0.0001$
	Carbohidratos (mg/g)	154.6 ± 9.8 b (162.4 ± 15.6 b)	123.6 ± 10.6 ab (129.5 ± 13.7 a)	104.6 ± 13.0 a (103.5 ± 11.6 a)	105.0 ± 8.2 a (92.5 ± 21.9 a)	$P < 0.01$ ($P < 0.05$)
	Lípidos (mg/g)	154.3 ± 14.4	191.5 ± 49.7	212.0 ± 59.7	194.5 ± 22.4	NS
	Acilglicéridos (mg/g)	131.2 ± 13.5 b	60.1 ± 12.7 a	66.1 ± 23.4 a	67.5 ± 8.5 a	$P < 0.01$
Músculo	Agua (%)	75.6	78.1	76.7	75.4	NS
	Proteínas (mg/g)	683.7 ± 15.3 b (704.5 ± 19.9 bc)	706.5 ± 15.4 b (722.2 ± 17.5 c)	660.3 ± 14.4 ab (657.3 ± 14.9 b)	614.8 ± 6.1 a (581.2 ± 27.9 a)	$P < 0.0001$ ($P < 0.001$)
	Carbohidratos (mg/g)	10.0 ± 0.7 ab	14.0 ± 2.9 b	4.8 ± 0.8 a	7.1 ± 0.7 a	$P < 0.01$

En la composición bioquímica del músculo de machos de distintas edades (Tabla 26), el porcentaje de agua en el tejido no difirió significativamente entre edades. La concentración de proteínas disminuyó con la edad, con valores significativamente menores a los 12 meses y al aplicar el ANCOVA se obtuvo el mismo resultado. Los carbohidratos fueron significativamente menores a los 6, 10 y12 meses de edad.

Las composiciones bioquímicas de: espermatóforo, vaso deferente y ámpula terminal en machos de distintas edades se presentan en la tabla 27. El porcentaje de agua en el espermatóforo fue significativamente mayor a los 12 meses de edad. No hubo diferencia significativa en la concentración de proteínas ni de carbohidratos entre edades. Sin embargo en la concentración de lactato si hubo diferencia significativa, con una disminución en machos de mayor edad, al eliminar el efecto del peso del macho mediante un ANCOVA se encontró el mismo resultado con la concentración de lactato significativamente mayor a los 6 meses.

Tabla 27. Composición bioquímica de espermatóforo, vaso deferente y ámpula terminal en machos de distintas edades (media ± error estándar). En el caso del agua solo se presentan las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 24). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

	Edad (meses) Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA
Espermatóforo	Agua (%)	51.2 a	51.2 a	51.2 a	64.2 b	$P < 0.001$
	Proteínas (mg/g)	165.4 ± 17	163.0 ± 15.8	148.0 ± 12.3	123.7 ± 13.2	NS
	Carbohidratos (mg/g)	31.9 ± 8.5	20.6 ± 5.3	19.9 ± 5.1	17.9 ± 4.6	NS
	Lactato(mg/g)	4.7 ± 1.3 b (4.3 ± 0.8 b)	2.5 ± 0.4 ab (2.0 ± 0.9 a)	1.1 ± 0.2 a (1.1 ± 0.7 a)	0.5 ± 0.06 a (1.4 ± 1.2 a)	$P < 0.001$ ($P < 0.05$)
Vaso deferente	Agua (%)	62.8	63.3	64.0	63.3	NS
	Proteínas (mg/g)	413.8 ± 23.7 b (409.9 ± 21.9)	404.9 ± 16.3 b (400.1 ± 23.4)	383.3 ± 16.2 b (383.8 ± 18.1)	283.7 ± 13.8 a (291.9 ± 31.4)	$P < 0.0001$ (NS)
	Carbohidratos (mg/g)	21.8 ± 1.4 b (21.7 ± 1.1)	18.8 ± 0.9 ab (18.7 ± 1.2)	20.2 ± 0.6 ab (20.2 ± 0.9)	17.4 ± 0.5 a (17.6 ± 1.6)	$P < 0.01$ (NS)
	Lactato (mg/g)	3.7 ± 0.9 b (3.7 ± 0.6 b)	2.3 ± 0.2 ab (2.4 ± 0.6 ab)	1.4 ± 0.1 a (1.4 ± 0.5 a)	0.8 ± 0.06 a (0.8 ± 0.18 a)	$P < 0.001$ ($P < 0.05$)
	Lípidos (mg/g)	22.5 ± 2.3 b (21.5 ± 1.6 c)	17.8 ± 1 b (16.6 ± 1.8 ab)	19.8 ± 1 b (19.9 ± 1.4 bc)	12.1 ± 0.5 a (14.2 ± 2.4 a)	$P < 0.0001$ ($P < 0.05$)
Ámpula terminal	Agua (%)	74.6	74.5	74.7	74.1	NS
	Proteínas (mg/g)	632.4 ± 40.6 ab (680.7 ± 50.0)	579.7 ± 23.8 a (638.0 ± 53.5)	683.2 ± 62.2 ab (677.1 ± 41.4)	761.2 ± 30.6 b (660.7 ± 71.9)	$P < 0.05$ (NS)
	Carbohidratos (mg/g)	14.7 ± 0.8 c	6.8 ± 0.5 a	9.7 ± 0.9 b	8.8 ± 0.3 ab	$P < 0.001$
	Lactato (mg/g)	5.4 ± 0.5 b	3.3 ± 0.3 a	3.3 ± 0.4 a	2.7 ± 0.2 a	$P < 0.001$
	Lípidos (mg/g)	37.5 ± 2.8 b	26.9 ± 1.7 a	28.3 ± 2.1 a	33.9 ± 0.7 ab	$P < 0.01$

Cuando se analizó la composición bioquímica del vaso deferente de machos de distintas edades (Tabla 27) no se encontraron diferencias significativas del porcentaje de agua entre edades. En el caso de las proteínas se encontró una disminución con la edad, presentando el valor significativamente menor a los 12 meses, sin embargo al eliminar el efecto del peso mediante el ANCOVA ya no se encontró diferencia significativa. En el caso de los carbohidratos, el valor significativamente más alto fue a los 6 meses pero no difirió significativamente de los 8 y 10 meses sin embargo, la diferencia significativa entre estos grupos ya no se encontró al eliminar el efecto del peso mediante ANCOVA. Por su parte, en las concentraciones de lactato y lípidos a los 6 meses de edad se presentaron los valores significativamente más altos con una tendencia a disminuir con la edad; al aplicar el ANCOVA se obtuvieron los mismos resultados, aunque para los lípidos la tendencia se perdió.

En la composición bioquímica del ámpula terminal analizada en machos de distintas edades (Tabla 27) no hubo diferencia significativa del porcentaje de agua entre edades. La concentración de proteínas a los 12 meses resultó significativamente mayor, sin embargo al eliminar el efecto del peso del macho mediante el ANCOVA ya no se encontró diferencia significativa entre edades. En el caso de los carbohidratos, del lactato y de los lípidos la concentración fue significativamente mayor a los 6 meses de edad, aunque para lípidos no difirió de esa a los 12 meses de edad.

3.8 Condición fisiológica en machos de la misma edad y distinto tamaño

Las variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de machos de 12 meses y distintos tamaños se presentan en la tabla 28.

Tabla 28. Variables bioquímicas correlacionadas significativamente con el peso de machos de 12 meses de edad y distintos tamaños.

Tejido	Variable	*r*	*P*
Hemolinfa			
	Carbohidratos	0.47	0.003
	Lípidos	-0.45	0.005
	Acilglicéridos	-0.52	0.001
	Lactato	0.53	0.001
	hemocianina	0.56	0.000
Testículo			
	Carbohidratos	-0.40	0.031
	Lípidos	-0.73	0.000
Hepatopáncreas			
	Proteínas	-0.46	0.011
	Carbohidratos	-0.41	0.023
	Lípidos	-0.46	0.010
Músculo			
	Proteínas	-0.93	0.000
	Carbohidratos	-0.76	0.000
Espermatóforo			
	Proteínas	-0.49	0.005
	Lactato	-0.64	0.000
Vaso deferente			
	Proteínas	-0.63	0.000
	Lactato	-0.76	0.000
	Lípidos	-0.71	0.000
Ámpula terminal			
	Proteínas	0.53	0.002
	Carbohidratos	0.38	0.037
	Lactato	-0.54	0.002

La composición bioquímica de la hemolinfa de machos de 12 meses y distintos tamaños (dos niveles: grandes y pequeños) se presenta en la tabla 29. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de proteínas, carbohidratos y glucosa entre machos grandes y pequeños de 12 meses de edad. En el caso de la concentración de carbohidratos al eliminar el efecto del peso del macho mediante un ANCOVA tampoco se encontraron diferencias significativas entre machos grandes y pequeños. La concentración de lípidos fue significativamente mayor en los machos pequeños, diferencia que se acentuó al eliminar el efecto del peso del organismo mediante un ANCOVA. Por su parte, se encontró que la concentración de acilglicéridos fue mayor en los machos pequeños incluso al eliminar el efecto del peso del organismo. La concentración de colesterol fue significativamente mayor, mientras que la concentración de lactato fue significativamente menor en los machos pequeños. Al corregir por peso la concentración de lactato ya no presentó diferencia significativa entre machos grandes y pequeños. Finalmente la hemocianina fue mayor en los machos grandes y al aplicar el ANCOVA dicha diferencia no se mantuvo.

Tabla 29. Composición bioquímica de la hemolinfa de machos de 12 meses y distinto tamaño (media ± error estándar). Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 28). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

Variable	Machos grandes	Machos pequeños	ANDEVA (ANCOVA)
Proteínas (mg/ml)	175.2 ± 5.6	170.4 ± 3.9	NS
Carbohidratos (mg/ml)	0.51 ± 0.04 b	0.39 ± 0.02 a	$P < 0.01$
	(0.41 ± 0.08)	(0.49 ± 0.08)	(NS)
Glucosa (mg/ml)	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.02	NS
Lípidos (mg/ml)	1.3 ± 0.1 a	2.0 ± 0.06 b	$P < 0.001$
	(0.45 ± 0.19 a)	(2.84 ± 0.19 b)	($P < 0.0001$)
Acilglicéridos (mg/ml)	0.43 ± 0.03 a	0.62 ± 0.01 b	$P < 0.0001$
	(0.22 ± 0.04 a)	(0.83 ± 0.04 b)	($P < 0.0001$)
Colesterol (mg/ml)	0.24 ± 0.01 a	0.28 ± 0.01 b	$P < 0.01$
Lactato (mg/ml)	1.3 ± 0.1 b	0.82 ± 0.05 a	$P < 0.01$
	(0.61 ± 0.24)	(1.5 ± 0.24)	(NS)
Hemocianina (mg/ml)	124.2 ± 7.1 b	98.5 ± 2.4 a	$P < 0.01$
	(95.2 ± 12.6)	(127.5 ± 12.6)	(NS)

Cuando se analizó la composición bioquímica del testículo de machos de 12 meses y distinto tamaño (Tabla 30) no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de agua en el tejido, ni en las concentraciones de proteínas y acilglicéridos. La concentración de carbohidratos fue significativamente mayor en los machos pequeños sin embargo, al aplicar el ANCOVA ya no se mantuvo la diferencia. La concentración de lípidos en testículo fue significativamente mayor en los machos pequeños, pero al aplicar el

ANCOVA no se encontraron diferencias significativas entre los machos grandes y pequeños.

Tabla 30. Composición bioquímica de testículo, hepatopáncreas y músculo de machos de 12 meses y distintos tamaños (media ± error estándar). En el caso del agua solo se presentan las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 28). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

	Variable	Machos grandes	Machos pequeños	ANDEVA (ANCOVA)
Testículo	Agua (%)	83.3	80.6	NS
	Proteínas (mg/g)	529.8 ± 15.4	488.1 ± 24.2	NS
	Carbohidratos	22.0 ± 1.4 a (25.4 ± 6.0)	29.1 ± 3.0 b (25.6 ± 6.0)	$P < 0.05$ (NS)
	Lípidos (mg/g)	44.7 ± 3.3 a (53.1 ± 9.0)	72.2 ± 3.7 b (63.7 ± 9.0)	$P < 0.0001$ (NS)
	Acilglicéridos (mg/g)	10.3 ± 4.0	10.9 ± 1.9	NS
Hepatopáncreas	Agua (%)	73.7	72.0	NS
	Proteínas (mg/g)	131.0 ± 9.0 a (149.2 ± 21.5)	161.1 ± 7.7 b (142.8 ± 21.5)	$P < 0.05$ (NS)
	Carbohidratos (mg/g)	105.0 ± 8.2 a (119.0 ± 27.9)	140.4 ± 12.8 b (126.4 ± 27.9)	$P < 0.05$ (NS)
	Lípidos (mg/g)	194.5 ± 22.4 a (66.8 ± 55.5 a)	322.4 ± 24.7 b (450.1 ± 55.5 b)	$P < 0.001$ ($P < 0.01$)
	Acilglicéridos (mg/g)	67.5 ± 8.5	85.5 ± 9.2	NS
Músculo	Agua (%)	75.4	75.1	NS
	Proteínas (mg/g)	614.8 ± 6.1 (613.4 ± 23.3)	625.6 ± 11.0 (627.0 ± 23.3)	NS (NS)
	Carbohidratos (mg/g)	7.1 ± 0.7 a (5.9 ± 3.7)	17.9 ± 1.9 b (19.1 ± 3.7)	$P < 0.0001$ (NS)

En el caso de la composición bioquímica del hepatopáncreas de machos de 12 meses y distintos tamaños (Tabla 30), no se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de agua en el tejido, ni para la concentración de acilglicéridos entre machos grandes y pequeños. Las concentraciones de proteínas y carbohidratos en hepatopáncreas fueron significativamente menores en los machos grandes pero al aplicar el ANCOVA ya no se mantuvieron las diferencias. Por su parte, la concentración de lípidos en hepatopáncreas fue significativamente menor en los machos grandes incluso cuando se eliminó el efecto del peso del organismo mediante un ANCOVA.

En la composición bioquímica del músculo de machos de 12 meses y distintos tamaños (Tabla 30), no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de agua en el tejido, ni en la concentración de proteínas entre machos grandes y pequeños. Al eliminar el efecto del peso del organismo mediante un ANCOVA tampoco se encontró diferencia significativa en la concentración de proteínas. Por su parte, la concentración de carbohidratos en el músculo fue significativamente menor en los machos grandes y al aplicar el ANCOVA ya no se mantuvo la diferencia.

Tabla 31. Composición bioquímica de espermatóforo, vaso deferente y ámpula terminal de machos de 12 meses y distinto tamaño (media ± error estándar). En el caso del agua solo se presentan las medias retransformadas. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Solo se hizo ANCOVA en los casos donde hubo correlación de la variable con el peso del camarón (ver tabla 28). En los renglones, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes. N = 20 para cada edad.

	Variable	Machos grandes	Machos pequeños	ANDEVA (ANCOVA)
Espermatóforo	Agua (%)	64.2 b	58.0 a	$P < 0.001$
	Proteínas (mg/g)	123.7 ± 13.2 a (168.0 ± 42.6)	200.7 ± 25.1 b (156.5 ± 42.6)	$P < 0.05$ (NS)
	Carbohidratos (mg/g)	17.9 ± 1.0	18.6 ± 1.7	NS
	Lactato(mg/g)	0.5 ± 0.06 a (0.8 ± 0.17)	1.0 ± 0.1 b (0.7 ± 0.17)	$P < 0.001$ (NS)
Vaso deferente	Agua (%)	63.3 a	65.1 b	$P < 0.05$
	Proteínas (mg/g)	283.7 ± 13.8 a (275.9 ± 27.7 a)	376.0 ±11.5 b (383.8 ± 27.7 b)	$P < 0.0001$ ($P < 0.05$)
	Carbohidratos (mg/g)	17.4 ± 0.5	18.4 ± 0.9	NS
	Lactato (mg/g)	0.8 ± 0.06 a (1.2 ± 0.2)	1.7 ± 0.1 b (1.3 ± 0.2)	$P < 0.0001$ (NS)
	Lípidos (mg/g)	12.1 ± 0.5 a (16.2 ± 1.8)	17.7 ± 1.2 b (13.7 ± 1.8)	$P < 0.001$ (NS)
Ámpula terminal	Agua (%)	74.1 a	74.9 b	$P < 0.05$
	Proteínas (mg/g)	761.2 ± 30.6 b (768.9 ± 59.6)	615.7 ± 23.8 a (608.0 ± 59.6)	$P < 0.001$ (NS)
	Carbohidratos (mg/g)	8.8 ± 0.3 b (8.9 ± 0.8)	7.6 ± 0.4 a (7.6 ± 0.8)	$P < 0.05$ (NS)
	Lactato (mg/g)	2.7 ± 0.2 a (2.7 ± 0.6)	4.1 ± 0.3 b (4.1 ± 0.6)	$P < 0.001$ (NS)
	Lípidos (mg/g)	33.9 ± 0.7 a	37.2 ± 1.2 b	$P < 0.05$

Por otra parte, las composiciones bioquímicas del espermatóforo, vaso deferente y ámpula terminal de machos de 12 meses y distintos tamaños se presentan en la tabla 31. El porcentaje de agua en el espermatóforo fue significativamente mayor en los machos

grandes. La concentración de proteínas en el espermatóforo fue significativamente menor en los machos grandes, sin embargo al corregir por peso mediante un ANCOVA no se mantuvo la diferencia. Por su parte, no hubo diferencia significativa en la concentración de carbohidratos entre machos grandes y pequeños. La concentración de lactato fue significativamente mayor en los machos pequeños sin embargo, al aplicar el ANCOVA no se mantuvo la diferencia.

Cuando se analizó la composición bioquímica del vaso deferente de machos de 12 meses y distinto tamaño (Tabla 31) se encontró que el porcentaje de agua fue significativamente mayor en los machos pequeños. La concentración de proteínas fue significativamente menor en los machos grandes, incluso después de eliminar el efecto del peso del organismo. En el vaso deferente no hubo diferencia significativa en la concentración de carbohidratos entre machos grandes y pequeños. Las concentraciones de lactato y lípidos fueron significativamente mayores en los machos pequeños y al aplicar el ANCOVA no se mantuvo la diferencia.

En el ámpula terminal (Tabla 31) el porcentaje de agua fue significativamente mayor en los machos pequeños. Mientras que las concentraciones de proteínas y carbohidratos fueron significativamente mayores en los machos grandes, pero al aplicar el ANCOVA ya no se mantuvo la diferencia. Por su parte, la concentración de lactato fue significativamente mayor en los machos pequeños, al aplicar el ANCOVA ya no se detectó diferencia. La concentración de lípidos fue significativamente mayor en los machos pequeños.

4. Análisis de la calidad espermática en relación con tamaño y edad

4.1 Comparación entre machos de diferente edad

Los mayores porcentajes de machos sin espermatóforo se observaron a la edad de 6 meses (23.9%), mientras que los mayores porcentajes de espermatóforos sin esperma se observaron a la edad de 8 meses (7.7%) (Fig. 12).

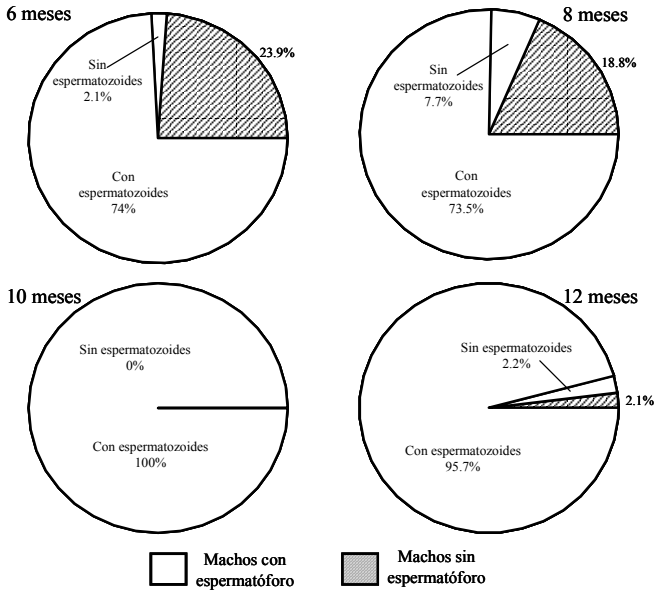

Fig. 12. Porcentajes de machos con y sin espermatóforo y de espermatóforos sin espermatozoides para las distintas edades.

Tanto el peso del espermatóforo (Fig. 13a) como el conteo total de espermatozoides (Fig. 13b) se correlacionaron linealmente con el peso del camarón ($P < 0.001$). El porcentaje de espermatozoides normales también se correlacionó positivamente con el peso del camarón ($P < 0.001$), pero mediante una relación matemática logística (Fig. 13c). El porcentaje de espermatozoides anormales y muertos estuvieron negativamente correlacionados con el peso del camarón ($P < 0.001$), mediante una relación potencial (Fig. 13d, e).

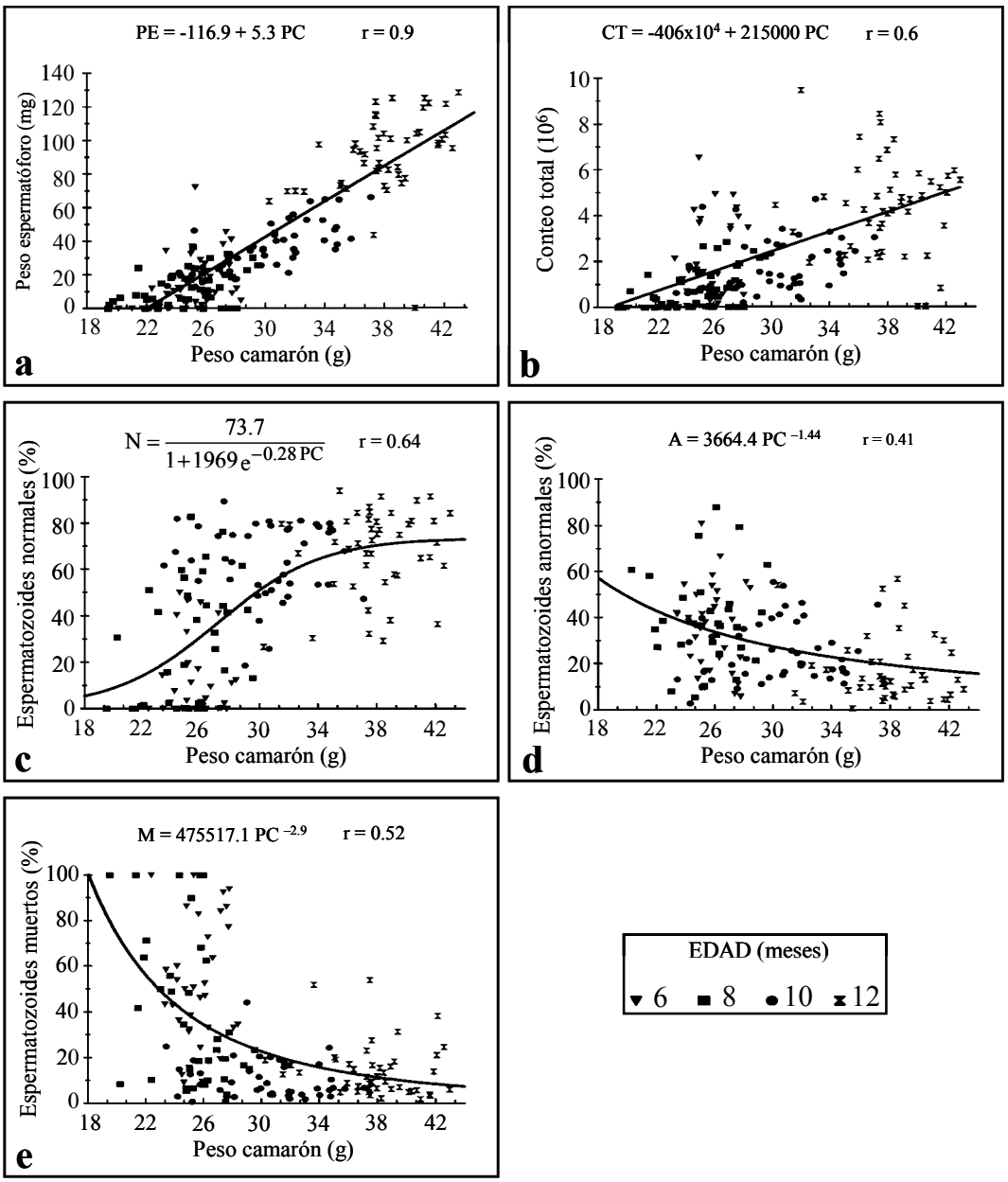

Fig. 13. Variables de calidad espermática correlacionadas con el peso del camarón (PC): a) peso del espermatóforo (PE), b) conteo total de espermatozoides (CT), c) porcentaje de espermatozoides normales (N), d) porcentaje de espermatozoides anormales (A), y e) porcentaje de espermatozoides muertos (M). Todas las correlaciones fueron significativas a $P < 0.001$.

Se observó una correlación lineal significativa ($P < 0.001$) entre el conteo total de espermatozoides y el peso del espermatóforo (Fig. 14a). Asimismo, se presentó una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de espermatozoides normales y el conteo total de espermatozoides ($P < 0.001$), mediante una relación logística (Fig. 14b). Por su parte, el porcentaje de espermatozoides anormales (Fig. 14c) y muertos (Fig. 14d) estuvieron correlacionados negativamente ($P < 0.01$) con el conteo total de espermatozoides, en ambos casos mediante una relación potencial.

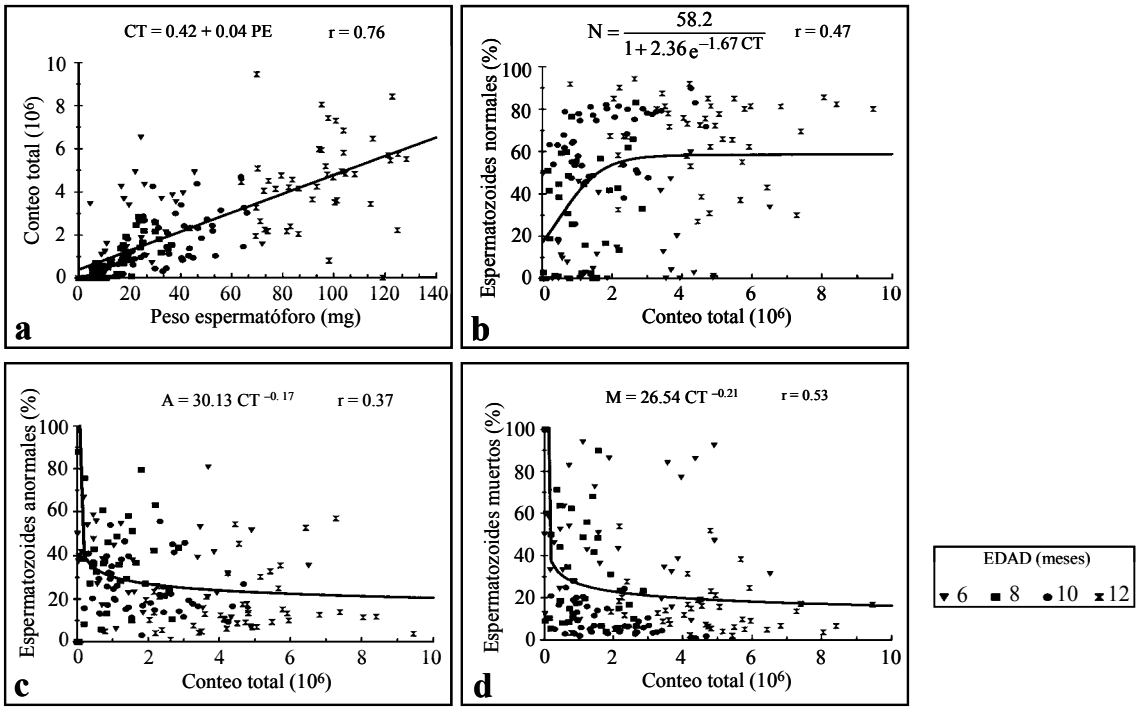

Fig. 14. a) Correlación entre el conteo total de espermatozoides y el peso del espermatóforo, así como las variables correlacionadas con el conteo total de espermatozoides: b) porcentaje de espermatozoides normales, c) porcentaje de espermatozoides anormales, y d) porcentaje de espermatozoides muertos. Todas las correlaciones fueron significativas a $P < 0.001$, excepto para c) la cual fue significativa a $P < 0.01$.

Tabla 32. Calidad espermática (media ± error estándar) de machos de distintas edades. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas. Dentro de los renglones, los valores que no presentan la misma letra son significativamente diferentes. Para los valores en porcentaje, el primer renglón corresponde a valores no transformados, el segundo a valores retransformados y el tercero a medias ajustadas retransformadas. N = 50 para cada edad.

Edad (meses) Variable	6	8	10	12	ANDEVA (ANCOVA)
Peso espermatóforo(mg)	19.1 ± 2.5 a (32.8 ± 2.7 a)	15.8 ± 1.5 a (31.7 ± 2.8 a)	36.5 ± 2.2 b (36.0 ± 1.9 a)	93.3 ± 2.8 c (69.8 ± 3.4 b)	$P < 0.001$ ($P < 0.001$)
Conteo total (10^6)	1.96 ± 0.3 a (2.42 ± 0.3 b)	1.04 ± 0.1 a (1.54 ± 0.3 a)	1.80 ± 0.2 a (1.79 ± 0.2 ab)	4.57 ± 0.3 b (3.82 ± 0.4 c)	$P < 0.001$ ($P < 0.001$)
Normales (%)	12.8 ± 3.1 15.1 a (18.1 a)	27.2 ± 4.3 26.5 b (29.8 b)	64.1 ± 2.4 53.5 c (53.1 c)	68.2 ± 2.7 56.4 c (50.5 c)	$P < 0.01$ ($P < 0.0001$)
Anormales (%)	35.0 ± 3.3 34.8 b (36.2 c)	33.2 ± 3.9 32.6 b (34.2 ab)	25.6 ± 1.9 29.7 ab (29.5 b)	17.4 ± 2.1 23.3 a (20. 4 a)	$P < 0.001$ ($P < 0.05$)
Muertos (%)	52.2 ± 4.7 47.3 b (43.4 c)	39.6 ± 5.5 39.7 b (35.3 b)	10.3 ± 1.3 17.4 a (18.0 a)	14.4 ± 1.7 21.0 b (28.8 b)	$P < 0.0001$ ($P < 0.0001$)

En la tabla 32 se resumen los resultados del análisis de cantidad y calidad espermática de los machos de 6, 8, 10 y 12 meses de edad. El peso del espermatóforo fue significativamente mayor en machos de 10 y 12 meses de edad (medias de 36.5 mg y 93.3 mg, respectivamente) en comparación con machos de 6 y 8 meses de edad (medias de 19.1 mg y 15.8 mg, respectivamente). Se aplicó un ANCOVA para corregir por peso del camarón y se detectó un efecto de la edad independiente del peso del camarón, por lo que la media ajustada del peso del espermatóforo para 12 meses de edad fue significativamente mayor que en el resto de las edades.

Por su parte, el conteo total de espermatozoides fue significativamente mayor en machos de 12 meses de edad (media 4.57 x 10^6 espermatozoides) comparados con machos más jóvenes; se obtuvo el mismo resultado con el ANCOVA usando el peso del camarón como covariable (Tabla 32). El porcentaje de espermatozoides normales fue significativamente mayor en machos de 10 y 12 meses de edad y sin una diferencia significativa entre ellos. Al aplicar un ANCOVA con el peso como covariable se obtuvo el mismo resultado (Tabla 32).

Se pudo apreciar una disminución en el porcentaje de espermatozoides anormales y muertos con la edad. El porcentaje de espermatozoides anormales fue significativamente menor en machos de 12 meses de edad comparados con machos de 6 y 8 meses. Estas diferencias se hicieron más aparentes al aplicar el ANCOVA para corregir por peso; así, las diferencias permanecieron entre los machos de 12 meses de edad y los de las otras edades, pero los machos de 10 meses de edad resultaron significativamente diferentes de los de 6 meses de edad. El porcentaje de los espermatozoides muertos fue significativamente menor en machos de 10 y 12 meses de edad (medias de 10.3 y 14.4 %, respectivamente) en comparación con machos de 6 y 8 meses (medias de 52.2 y 39.6 %, respectivamente). El uso del ANCOVA y la comparación de medias ajustadas posteriormente reveló que los menores porcentajes de espermatozoides muertos se obtuvieron en camarones de 10 meses de edad, mientras que los más altos se presentaron en machos de 6 meses de edad.

4. 2 Comparación entre machos de la misma edad y distinto tamaño

Las proporciones de machos sin espermatóforo y de espermatóforos sin espermatozoides fueron pequeñas tanto para los machos grandes como para los pequeños (Fig. 15). Sin embargo, la proporción de espermatóforos sin espermatozoides fue mayor para los machos pequeños.

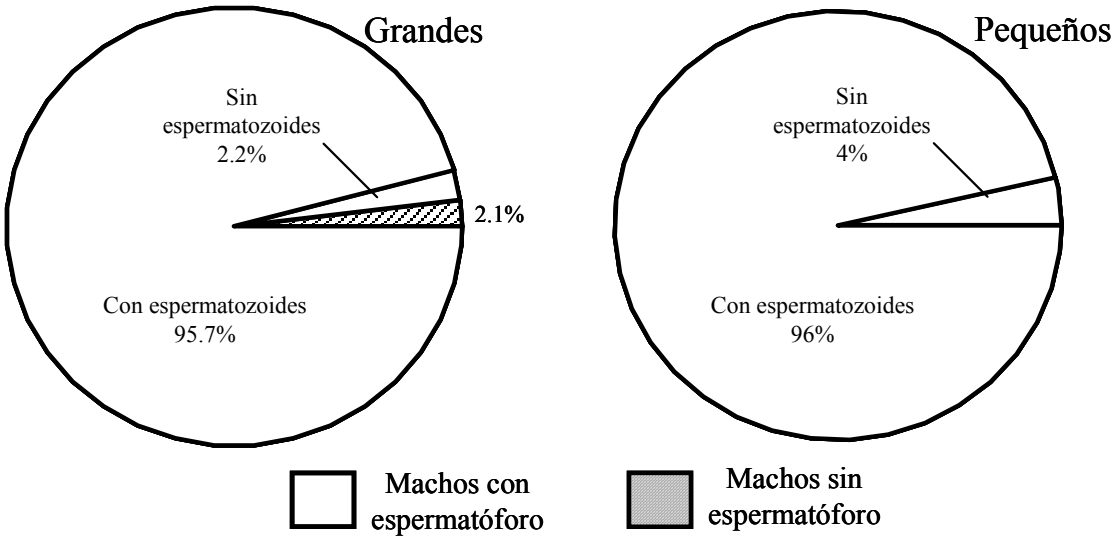

Fig. 15. Porcentajes de machos con y sin espermatóforo y de espermatóforos sin espermatozoides en machos de 12 meses y distinto tamaño.

En la tabla 33 se resumen los resultados del análisis de cantidad y calidad espermática de machos de 12 meses de edad y distinto tamaño. El peso del espermatóforo, el conteo total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales fueron significativamente mayores en los machos grandes, pero cuando se corrigió por peso mediante un ANCOVA, solo el conteo total de espermatozoides fue significativamente mayor en los machos grandes.

Por otra parte, los porcentajes de espermatozoides anormales y muertos fueron significativamente menores en machos grandes comparados con los machos pequeños. Sin embargo, estas diferencias no se mantuvieron cuando se aplicó el ANCOVA, usando el peso del camarón como la covariable (Tabla 33).

Tabla 33. Calidad espermática (media ± error estándar) de machos de 12 meses de edad y distintos tamaños. Los valores entre paréntesis corresponden a las medias ajustadas transformadas. Dentro de los renglones, los valores que no presentan la misma letra son significativamente diferentes. Para los valores en porcentaje, el primer renglón corresponde a valores no transformados, el segundo a valores retransformados y el tercero a medias ajustadas retransformadas. N = 50 para cada edad.

Variable	Machos grandes	Machos pequeños	ANDEVA (ANCOVA)
Peso del espermatóforo (mg)	93.3 ± 2.8 b	19.9 ± 1.7 a	$P < 0.001$
	(62.4 ± 4.6)	(50.7 ± 4.5)	(NS)
Conteo Total (10^6)	4.566 ± 0.3 b	0.688 ± 0.118 a	$P < 0.001$
	(4.247 ± 0.5) b	(1.007 ± 0.5) a	($P < 0.01$)
Normales (%)	68.2 ± 2.7	41.3 ± 2.5	
	56.4 ± 2.0 b	38.8 ± 1.9 a	$P < 0.001$
	(49.7 ± 4.4)	(45.5 ± 4.4)	(NS)
Anormales (%)	17.4 ± 2.1	26.8 ± 2.3	
	23.3 ± 1.7 a	29.4 ± 1.8 b	$P < 0.01$
	(26.6 ± 4.1)	(26.1 ± 4.1)	(NS)
Muertos (%)	14.4 ± 1.7	31.8 ± 2.5	
	21.0 ± 1.5 a	33.5 ± 1.6 b	$P < 0.01$
	(23.8 ± 3.7)	(30.7 ± 3.6)	(NS)

5. Análisis de la calidad espermática en relación con regeneraciones consecutivas.

El peso del espermatóforo no se vio afectado por las regeneraciones consecutivas, analizadas por medio de un ANOVA unifactorial (cuatro niveles: iniciales, primera, segunda y tercera regeneración) (Fig. 16). Se encontró un incremento ($P < 0.001$) en el conteo total de espermatozoides y en el porcentaje de espermatozoides normales en los espermatóforos regenerados en comparación con los valores iniciales (Figs. 16b, 16c), mientras que el porcentaje de espermatozoides muertos disminuyó significativamente con las regeneraciones consecutivas del espermatóforo (Fig. 16d). Por su parte, el porcentaje de espermatozoides anormales no cambio significativamente con las regeneraciones consecutivas del espermatóforo (Fig. 16e).

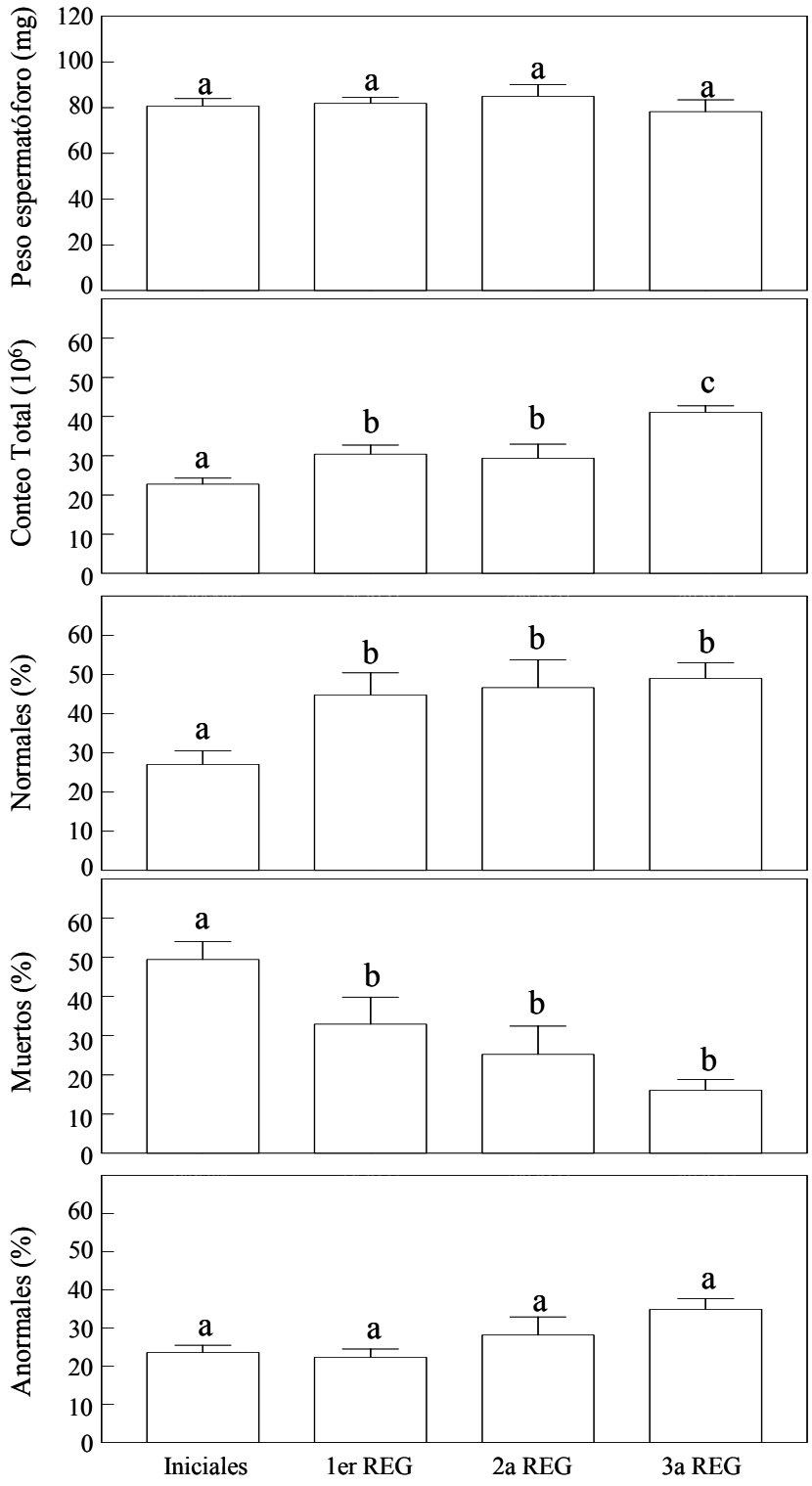

Figura 16. Comparación de la calidad espermática al inicio del experimento (valores iniciales) y después de regeneraciones consecutivas (REG). Las medias con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.01$). Las barras sobre las columnas de medias = errores estándar.

La composición bioquímica del espermatóforo no se vio afectada significativamente por las regeneraciones consecutivas (Tabla 34). Las proteínas fueron por mucho el componente más abundante del espermatóforo.

Tabla 34. Composición bioquímica inicial de los espermatóforos y en cada regeneración (media ± error estándar). N = 50.

Variable	Inicial	1ª regeneración	2ª regeneración	3ª regeneración	ANDEVA
Proteínas (mg/ml)	106.4 ± 12.9	110.0 ± 12.1	92.3 ± 10.8	92.0 ± 19.2	NS
Carbohidratos (mg/ml)	14.0 ± 2.0	13.2 ± 2.0	11.1 ± 1.9	7.9 ± 0.5	NS
Lactato (mg/ml)	0.21 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.15 ± 0.04	NS

El porcentaje de espermatozoides normales y muertos de la primera regeneración estuvieron correlacionados significativamente con el conteo total inicial de espermatozoides (Fig. 17). De la misma forma, el conteo total de espermatozoides, y los porcentajes de espermatozoides normales y muertos medidos después de la primera regeneración, se correlacionaron significativamente con el porcentaje inicial de espermatozoides normales (Fig. 18) o con el porcentaje inicial de espermatozoides muertos (Fig. 19). Todas las demás correlaciones no fueron significativas.

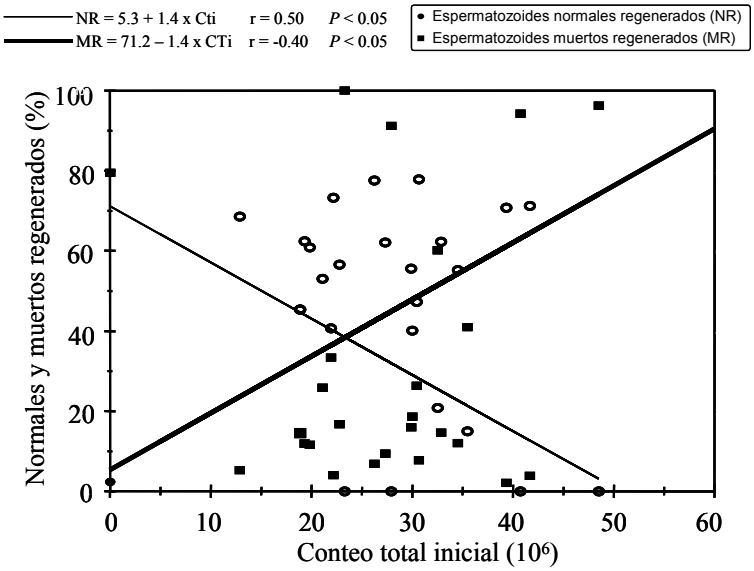

Figura 17. Correlaciones entre los porcentajes de espermatozoides normales y muertos después de la primera regeneración con el conteo total inicial de espermatozoides.

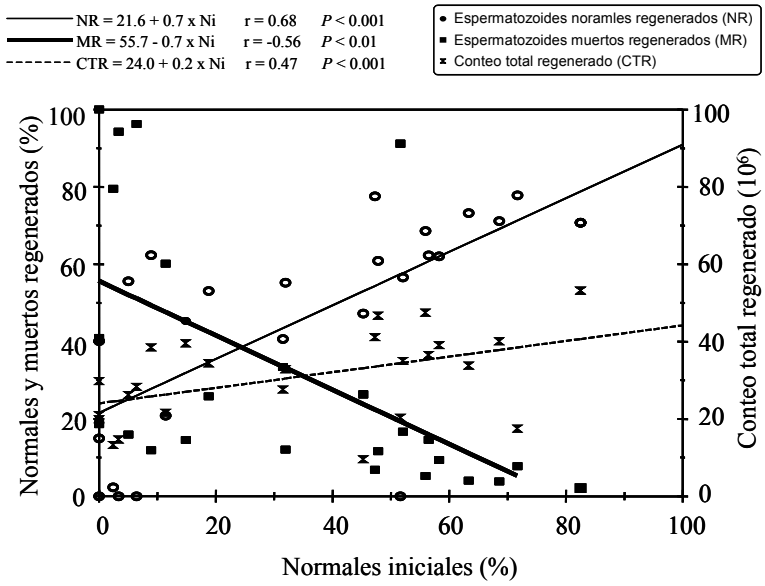

Figura 18. Correlaciones entre el conteo total de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides normales y el porcentaje de espermatozoides muertos, después de la primera regeneración, con el porcentaje inicial de espermatozoides normales.

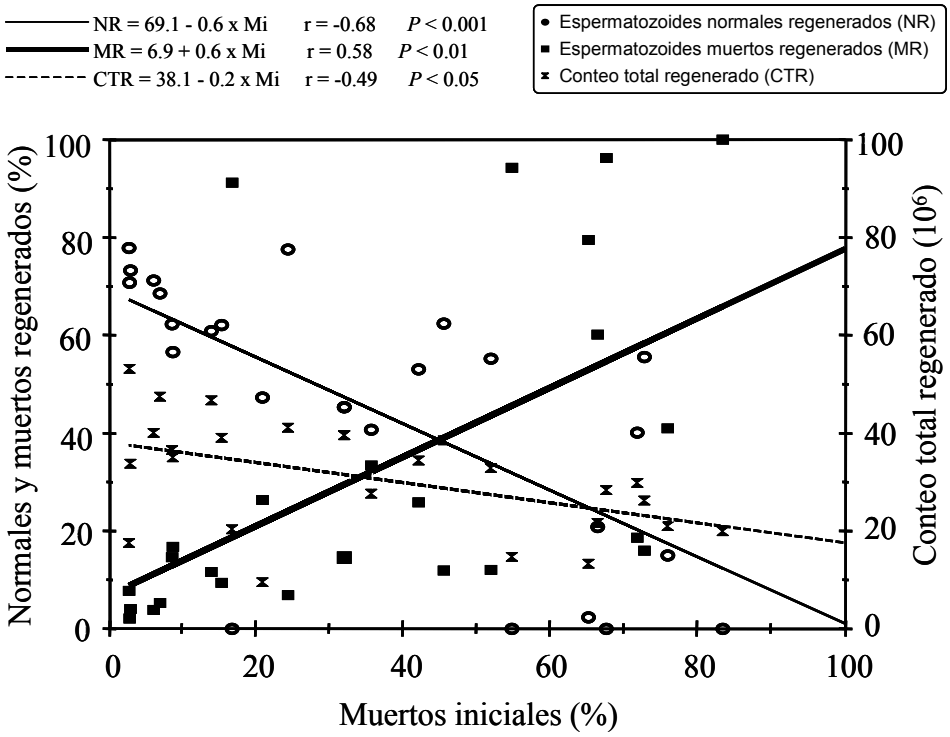

Figura 19. Correlaciones entre el conteo total de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides normales y el porcentaje de espermatozoides muertos, después de la primera regeneración, con el porcentaje inicial de espermatozoides muertos.

Cuando se analizó la composición bioquímica de la hemolinfa en relación con la calidad espermática inicial, se encontró una correlación positiva entre el conteo total de espermatozoides y la concentración de glucosa (Fig. 20a). El peso de la mitad izquierda del espermatóforo se correlacionó negativamente con las concentraciones de lípidos totales (Fig. 20b) y de acilglicéridos (Fig. 20c).

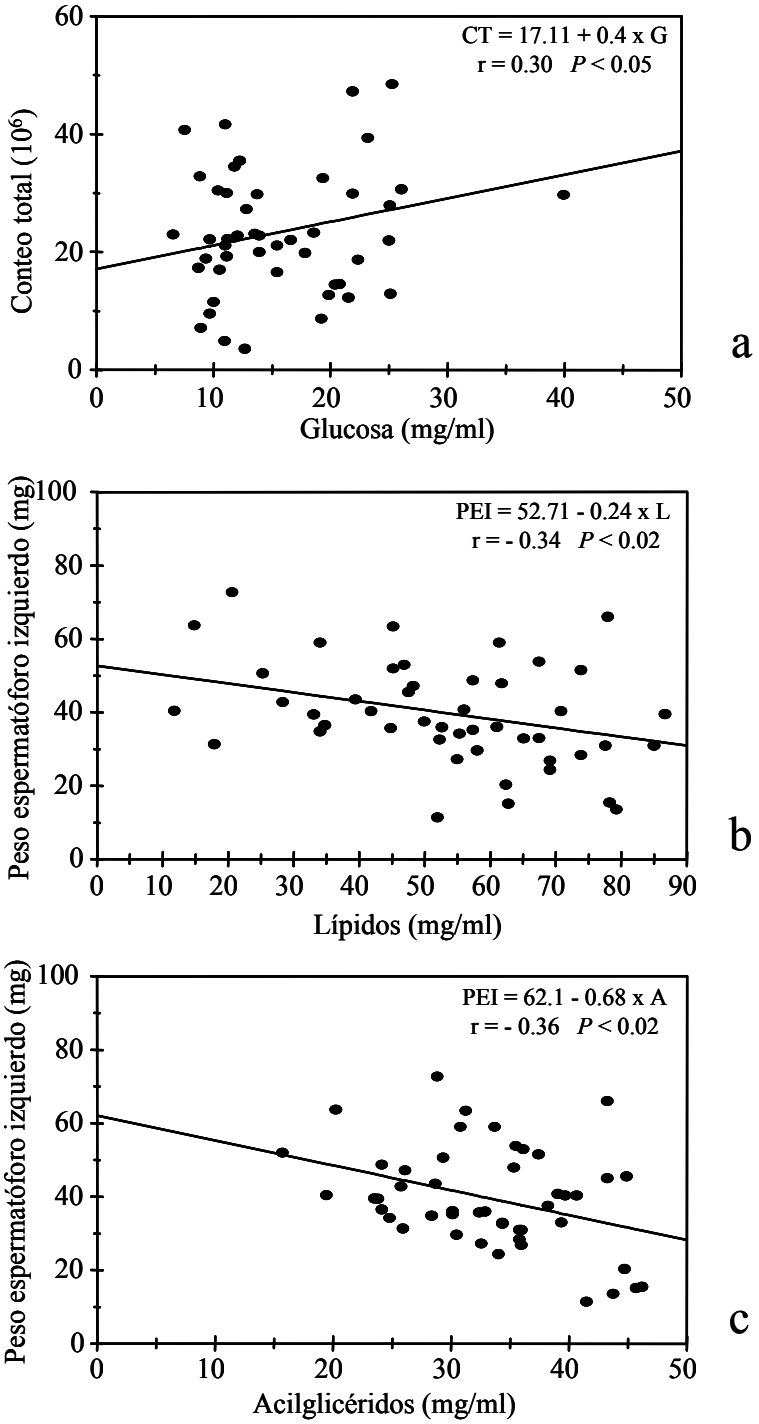

Figura 20. Correlaciones entre las variables bioquímicas de la hemolinfa y las variables de calidad espermática inicial: a) conteo total de espermatozoides vs. concentración de glucosa, b) peso del espermatóforo izquierdo vs. concentración de lípidos totales, y c) peso del espermatóforo izquierdo vs. concentración de acilglicéridos.

Por otra parte, cuando se analizó la composición bioquímica de la hemolinfa en relación con la calidad espermática después de la primera regeneración, se encontró una correlación negativa entre el peso total del espermatóforo y la concentración de lípidos (Fig. 21a). También se encontró una correlación negativa entre el porcentaje de espermatozoides normales y el colesterol (Fig. 21b), y una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides muertos y el colesterol (Fig. 21c).

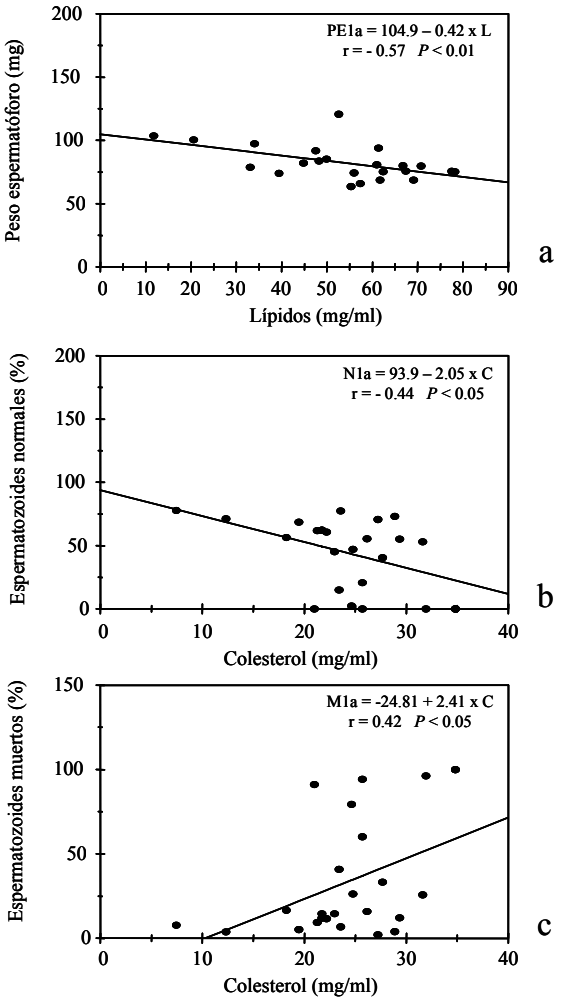

Figura 21. Correlaciones entre las variables bioquímicas de la hemolinfa y las variables de calidad espermática después de la primera regeneración: a) peso del espermatóforo vs. concentración de lípidos totales, b) porcentaje de espermatozoides normales vs. concentración de colesterol, y c) porcentaje de espermatozoides muertos vs. concentración de colesterol.

DISCUSIÓN

1. Análisis del proceso de maduración regionalizada del ovario

Antes de describir la maduración regionalizada del ovario, se hace necesario justificar la metodología empleada para la evaluación de la madurez. Los estadios de madurez ovárica en camarones son tradicionalmente asignados de una manera subjetiva, basándose en el tipo de ovocito más avanzado presente en el ovario (Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Bray y Lawrence, 1992; Quinitio y Millamena, 1992; Quinitio *et al*., 1993; Mohamed y Diwan, 1994; Medina *et al*., 1996; Palacios *et al*., 1999b; Palacios *et al*., 1999c). Para asignar los estadios de madurez ovárica de una manera cuantitativa, y por lo tanto, más objetiva se han usado las frecuencias de talla de los ovocitos o las frecuencias de cada tipo de ovocito (Ramos y Torras, 1986; Tan-Fermin, 1991; Palacios *et al*., 1999b; Palacios *et al*., 1999c). Sin embargo, los análisis de frecuencias tienen la desventaja de que en cualquier estadio de madurez existe un gran número de ovocitos previtelogénicos (OPV) y una baja proporción de ovocitos en estadios vitelogénicos, los cuales incrementan en estadios avanzados de madurez (Ramos y Torras, 1986; Tan-Fermin, 1991; Palacios *et al*., 1999b; Palacios *et al*., 1999c). Como consecuencia, tanto el análisis de frecuencias como la descripción de estadios pueden ser influenciados en relación a la persona que haga las observaciones (Palacios *et al*., 2003). Por otro lado, el índice gonádico, aún siendo mas objetivo, no puede discriminar entre estadios de madurez. En contraste, se ha reportado que para algunos moluscos el análisis del área ocupada por ovocitos tiene una mayor sensibilidad para describir el proceso de gametogénesis en comparación con el análisis de frecuencias de ovocitos o el índice gonádico (Heffernan *et al*., 1989). El análisis del área

ocupada por ovocitos es un método que se basa en la histología, pero que tiene la ventaja de ser cuantitativo lo que permite hacer análisis estadísticos. Considerando lo anteriormente expuesto, en el primer experimento de la presente tesis, se usaron las áreas ocupadas por cada tipo de ovocito y se encontró que dicho análisis permitió una mejor representación del proceso vitelogénico en *L. vannamei* (Figs. 8, 9, 10 y Tabla 6). Las áreas ocupadas por las células en proliferación y por OPV disminuyeron, mientras que las áreas ocupadas por los ovocitos más desarrollados se incrementaron en los estadios avanzados de maduración.

Adicionalmente, se midió el diámetro de los ovocitos más desarrollados presentes en cada estadio de madurez (Fig. 11 y Tabla 6), pues el diámetro del ovocito es considerado como un indicador confiable del grado de madurez ovárica (Grant y Tyler, 1983; West, 1990) y complementa y confirma la validez del análisis de áreas. En este sentido se encontró que el diámetro de los ovocitos más desarrollados reflejó directamente el estadio de madurez de los camarones, tal como ha sido reportado en estudios previos (Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Sandoval-Quintero y Gracia, 1998; Palacios *et al*., 1999b; Palacios *et al*., 2003) y por ello representa una variable sensible para detectar diferencias entre las diferentes regiones, tal como se discute más adelante.

Antes de analizar la distribución diferencial de los ovocitos en las distintas regiones del ovario es necesario mencionar que todos los especimenes usados para este estudio estuvieron en condiciones de reproducción comercial y por lo tanto, el efecto de la ablación del tallo ocular está implícito. Se ha observado que la ablación del tallo ocular provoca en *P. monodon* un desarrollo irregular en diferentes regiones del ovario (comunicación personal Primavera citada en Tan-Fermin, 1991) o en el lóbulo izquierdo o derecho (Primavera, 1985). En ejemplares ablacionados de *P. kerathurus* solo los lóbulos anterior y

medio del ovario presentaron gametos después de desoves consecutivos, y frecuentemente se atrofió el lóbulo abdominal (Lumare, 1979). Sin embargo, en hembras ablacionadas de *L. vannamei* en condiciones de reproducción comercial se presentó un desarrollo normal del lóbulo abdominal, a pesar de que algunas de ellas desovaron más de 15 veces (Palacios *et al*. 1999a; Palacios *et al*. 1999b).

En este estudio, el análisis histológico reveló que la morfología y el grado de desarrollo de los ovocitos son similares entre los lóbulos izquierdo y derecho del ovario (Figs. 8, 9, 10, 11), así como también son similares en las diferentes zonas del ovario dentro del mismo estadio de madurez, excepto para la zona PSA (Fig. 7). Como se mencionó en la sección de metodología, la zona PSA se seleccionó porque durante la disección y en todas las hembras usadas en los experimentos 1 y 2 se observó una constricción evidente en el ovario localizada sobre el primer segmento abdominal (Fig. 5). Esta constricción podría ser equivalente a una constricción previamente descrita por Aquacop (1979), los cuales relacionaron su presencia con un desove próximo. Sin embargo, se necesitan más estudios para establecer la función de la misma.

Cuando las cinco zonas del ovario se analizaron juntas, sólo la zona PSA fue claramente diferente de las otras zonas. Sin embargo, una comparación más detallada entre las regiones cefalotorácica (CEF) y abdominal (ABD), sin considerar la zona PSA (Tabla 6) reveló varias diferencias entre las dos regiones. En la región CEF se observó un mayor diámetro de ovocitos, una menor área de células en proliferación y mayores áreas de OPV y ovocitos más desarrollados (OMD), indicando un desarrollo vitelogénico más avanzado que en la región ABD. Así, el desarrollo homogéneo de los ovarios que generalmente se asume en camarones penéidos (King, 1948; Ramos y Torras, 1986; Tan-Fermin y Pudadera, 1989;

Palacios *et al*., 2000) puede no ser adecuado en caso de que se realice un análisis detallado del desarrollo de los ovocitos. Sin embargo, debe puntualizarse que la heterogeneidad entre las regiones CEF y ABD no es indicativa de que exista una completa asincronía en el desarrollo. La región ABD parece estar ligeramente menos desarrollada, pero todavía necesitan establecerse las bases fisiológicas para este aparente retraso en el reclutamiento y desarrollo de los ovocitos en dicha región.

Es interesante el hecho de que se hayan encontrado diferencias significativas en el diámetro de los OMD entre las dos regiones (Tabla 6). De manera similar se han encontrado diferencias en el diámetro de los ovocitos a lo largo del ovario en peces que presentan desoves parciales (Ciechomski, 1967; Finucane *et al*., 1986; Lo *et al*., 1986; ver también la revisión de West, 1990). En estos casos las diferencias fueron atribuidas a un desarrollo diferencial de los ovocitos. Sin embargo, no es posible determinar, a partir de los resultados de este estudio, si la diferencia en diámetro de los ovocitos torácicos y abdominales es una consecuencia de la ablación del tallo ocular, de los desoves consecutivos que cada hembra pudo haber tenido durante el ciclo de producción antes de ser tomada la muestra, o bien si es una característica de la especie. En este sentido solo se ha reportado un menor desarrollo de los ovarios (determinado de manera visual) en la región abdominal como resultado de desoves consecutivos (Lumare, 1979), por lo tanto se hacen necesarios más estudios para clarificar este punto. Finalmente, la heterogeneidad entre las regiones CEF y ABD debe ser considerada desde el punto de vista metodológico al realizar análisis histológicos de los ovarios. Estos resultados condujeron a utilizar organismos distintos para el análisis de composición bioquímica y características histológicas del ovario en lugar de usar el mismo organismo dividiendo la gónada.

2. Comparación del peso y de las variables de calidad espermática entre las mitades izquierda y derecha del espermatóforo

En el caso de los machos también se hizo necesario justificar la metodología empleada para la evaluación de la calidad espermática antes de realizar los experimentos formales. Así, en el análisis preliminar, no se encontraron diferencias en tamaño o en calidad espermática entre las mitades izquierda y derecha de los espermatóforos (Tabla 7), lo cual concuerda con un estudio previo (Wang *et al*., 1995). Esto permitió que se usara una mitad del espermatóforo para el análisis de calidad espermática y el otro para análisis bioquímico.

3. Análisis del desarrollo gonádico y condición fisiológica en relación con tamaño y edad

Una vez establecidas las diferencias en la maduración ovárica y las similitudes en calidad espermática entre mitades izquierda y derecha del espermatóforo, y tomando en cuenta estos factores para los siguiente estudios, se procedió a evaluar la influencia de la edad y el tamaño sobre el desarrollo gonádico y la condición fisiológica de los camarones.

3.1 Hembras

La selección de hembras reproductoras en los laboratorios de producción de postlarvas se hace tomando como base el peso de la hembra (Aquacop, 1983; Wyban *et al*., 1987). Aunque el peso de los camarones está implícitamente asociado con la edad, no se ha establecido si la maduración gonádica depende en mayor grado del tamaño o de la edad (Ogle, 1992). En la presente tesis se obtuvo un mayor desarrollo gonádico en hembras de

mayor edad (Tabla 10). Las características evaluadas como son diámetros de ovocitos, menores áreas ocupadas por otros tejidos (i.e. tejido conjuntivo, tejido y células sanguíneas) y por ovocitos previtelogénicos y la presencia de ovocitos vitelogénicos, son indicadores directos del grado de madurez del ovario (Ramos y Torras, 1986; Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Tan-Fermin, 1991; Bray y Lawrence, 1992; Quinitio y Millamena, 1992; Quinitio *et al*., 1993; Mohamed y Diwan, 1994; Medina *et al*., 1996; Palacios *et al*., 1999b; Palacios *et al*., 1999c). A pesar que estas variables estuvieron correlacionadas con el peso de la hembra, se encontró que existe un efecto de la edad sobre la maduración del ovario que es independiente del peso de la hembra. Estos resultados apuntan a que, por lo menos la gametogénesis y la vitelogénesis endógena, dependen de la edad de la hembra independientemente de su peso.

Por otro lado, en este trabajo se encontró que las hembras de 12 meses presentaron un peso de ovarios significativamente mayor. En este caso y de acuerdo con los resultados del análisis de ANCOVA (Tabla 8) se puede concluir que el peso del ovario depende del peso de la hembra paralelamente al efecto de la edad. En este sentido se ha reportado que existe una correlación positiva entre el peso de los reproductores y el número de desoves por hembra (Menasveta *et al.*, 1994; Palacios *et al.*, 1999a), y que existe una relación entre tamaño corporal (tamaño del ovario) y fecundidad (Cavalli *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 1999a).

Al comparar hembras de la misma edad con una diferencia significativa en el tamaño en peso (≈ 43 %) y en talla (≈ 16 %) (Tabla 11), se encontró que las hembras más grandes presentaron un mayor grado de desarrollo gonádico a partir de los indicadores

histológicos, y mayor peso del ovario, IGS y diámetro de OMD. Cuando los resultados fueron analizados por medio de un ANCOVA para eliminar el efecto del peso de las hembras, se encontró que persisten las diferencias en el caso de la mayoría de los indicadores histológicos y del diámetro de los OMD. Sin embargo al eliminar el efecto del peso con el ANCOVA, ya no hay diferencias en el peso del ovario y el IGS que por lo tanto, dependen del peso de la hembra, lo cual concuerda con los datos obtenidos para diferentes edades. Por lo tanto, las hembras grandes presentaron un mayor desarrollo gonádico que las pequeñas, sin embargo, esto se debió principalmente a las condiciones de cultivo diferenciales bajo las cuales estuvieron los organismos.

Con lo anterior, se justifica la selección de hembras de mayor edad en términos de potencial reproductivo. Por otro lado, los resultados del presente trabajo sugieren que la selección de hembras más grandes para una determinada edad, también sería recomendable. De hecho, el desempeño reproductivo en términos de fecundidad y número de desoves es mejor para hembras más grandes (Palacios *et al*., 1999a), aunque resultados recientes indican que se deben de tomar en cuenta otras variables asociadas con el nivel de reservas disponibles tanto de las hembras (Arcos *et al*., 2003a) como de los huevos producidos en los primeros desoves (Arcos *et al.*, 2003b). Una de las preguntas que originó el presente trabajo fue si era factible utilizar hembras menores de un año para fines de reproducción. Dicha pregunta surgió por el hecho de que en la mayoría de los casos, la edad mínima para obtener reproductores en el caso de las hembras de *L. vannamei* está entre los 10 y12 meses de edad (Aquacop, 1983; Wyban *et al*., 1987; Ogle, 1992). En este trabajo se observó que las hembras de menos de un año de edad no presentan ovocitos vitelogénicos (Tabla 10), lo que en primera instancia descarta la posibilidad de utilizar hembras menores de un año con

fines de reproducción. Sin embargo, existe la posibilidad de que si las hembras de 10 meses de edad, muestreadas en enero con una temperatura promedio del agua de 17.2ºC en comparación con las hembras de 12 meses de edad (marzo, 20.5ºC), hubieran estado en condiciones de temperatura mayores a las que se registraron en el presente estudio, posiblemente hubieran presentado un mayor grado de madurez ovárica. Esto tiene implicaciones importantes y se requiere investigar el efecto de las condiciones ambientales (época del año) más a fondo. Específicamente en decápodos, se ha observado que temperaturas entre 24-26ºC estimulan la reproducción o aceleran la maduración de los ovocitos y la acumulación de vitelo (Meusy y Payen, 1988).

Por otro lado, es necesario evaluar el efecto de la ablación en hembras de distintas edades. En los trabajos antes mencionados de edad mínima para el uso de reproductores, se usaron hembras ablacionadas. Es necesario especificar que en el presente trabajo se utilizaron las hembras sin ablacionar, por lo que es probable que las hembras que presentaron inicio de vitelogénesis (a partir de los 10 meses de edad) hubiesen podido madurar una vez ablacionadas. Sin embargo, si se realiza la ablación del tallo ocular en hembras que solo presentan ovocitos previtelogénicos, es posible que ésta no resulte en una maduración adecuada, o bien resulte en desoves de deficiente calidad. En este sentido Arcos *et al*. (2003a), al medir los niveles de vitelogenina en hemolinfa como un indicador del grado de madurez previo a la ablación del tallo ocular, observaron que las hembras con mayores niveles de vitelogenina en hemolinfa tuvieron al cabo de ocho días de la ablación del tallo ocular un desarrollo gonádico más avanzado que las hembras con menores niveles de vitelogenina. En la presente tesis, se observó que las hembras de 10 meses ya presentaban ovocitos con glóbulos de aceite. Dado que el glóbulo de aceite indica la

acumulación de vitelo, es posible estas hembras tengan mayores niveles de vitelogenina en la hemolinfa y, como consecuencia, sean capaces de madurar satisfactoriamente una vez ablacionadas, aunque sería necesario correlacionar los niveles de vitelogenina con el grado de madurez de los ovocitos en hembras no ablacionadas.

La maduración ovárica va acompañada de una acumulación de nutrientes que pasan a formar parte del vitelo (Castille y Lawrence, 1989; Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994). En este sentido, se ha documentado que los compuestos bioquímicos que se acumulan en el ovario durante la maduración son las proteínas y los lípidos (Gehring, 1974; Kulkarni y Nagabhushanam, 1979; Galois, 1984; Castille y Lawrence, 1989; Teshima *et al*., 1989; Millamena y Pascual, 1990; Mourente y Rodríguez, 1991; Mohamed y Diwan, 1992; Millamena *et al*., 1993; Spaargaren y Haefner, 1994; Sarojini *et al*., 1995; Palacios *et al*., 2000). Los resultados del análisis bioquímico del ovario (Tabla 16) concuerdan con lo anterior, ya que hubo un aumento significativo tanto de proteínas como de lípidos en hembras de mayor edad, las cuales presentaron un mayor grado de madurez. Para discernir si la acumulación de reservas bioquímicas en el ovario era efecto de la edad o del tamaño de las hembras, se analizaron los datos por medio de un ANCOVA usando el peso como covariable. Con dicho análisis, se obtuvo un efecto significativo de la edad de las hembras sobre las variables bioquímicas del ovario, pero que fue independiente del tamaño. La edad de las hembras como factor que determina la acumulación de reservas bioquímicas es reforzado al analizar los datos de hembras de la misma edad y distinto tamaño (Tabla 19), donde no se observan diferencias significativas en la composición bioquímica del ovario, aun cuando las hembras grandes presentaron un mayor grado de madurez.

Sin embargo, es importante señalar que las hembras pequeñas presentaron mayores niveles de lípidos y hemocianina en hemolinfa (Tabla 18), así como mayores niveles de lípidos, proteínas y carbohidratos en hepatopáncreas (Tabla 19). En este sentido, también se han observado diferencias entre reproductores silvestres y de cultivo en cuanto a mayores niveles de lípidos en el hepatopáncreas de organismos cultivados debido a la dieta que se les suministra (O'Leary y Matthews, 1990; Jiménez *et al*., 1995; Racotta *et al*., 2000). Hay que recordar que las hembras grandes provienen de un estanque de mareas, donde existe una mayor disponibilidad de alimento natural mientras que el aporte de alimento de las hembras pequeñas consistió únicamente del peletizado. Como consecuencia, las diferencias producidas por las condiciones de cultivo pueden enmascarar el efecto que tendría el grado de madurez sobre la acumulación de reservas en el ovario.

Por otra parte, ha sido ampliamente documentado que existe una transferencia de compuestos bioquímicos desde el hepatopáncreas hacia la gónada (Teshima *et al*., 1988; Castille y Lawrence, 1989; Teshima *et al*., 1989; Millamena y Pascual, 1990; Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994; García *et al*., 1995). En los resultados de la presente tesis, aun cuando hay un efecto de la edad sobre las concentraciones de proteínas, lípidos y acilglicéridos en hepatopáncreas (Tabla 16) y que se determinó que la madurez gonádica aumentó con la edad, no fue posible apreciar claramente una tendencia a la disminución de esos compuestos bioquímicos con la edad y con el grado de madurez ovárica. Esto podría explicarse por el hecho de que los camarones de entre 6 y 10 meses no han iniciado la vitelogénesis exógena ya que los ovocitos predominantes a esas edades son los previtelogénicos, y se puede suponer que las reservas están siendo canalizando hacia otros procesos metabólicos (i. e. crecimiento). Por su parte, la fase de desarrollo ovárico de

las hembras de 12 meses de edad (maduración temprana, con ovocitos en fase de glóbulo de aceite) corresponde aún al proceso de vitelogénesis endógena (Mohamed y Diwan, 1994), en el cual la síntesis de diversos componentes del vitelo se realiza en el ovario. De esta manera, el incremento de proteínas y lípidos mencionado anteriormente correspondería a una síntesis endógena y eventualmente obtención de nutrientes directamente desde el alimento, sin necesidad de movilización importante de reservas del hepatopancreas. Por lo anterior, con el objeto de establecer si existe un efecto de la edad sobre la movilización de reservas asociada a la madurez gonádica en condiciones de cultivo en estanques, se requiere hacer trabajos futuros donde se comparen hembras de diferente edad a partir de los 12 meses.

En camarones no se ha establecido que exista transferencia de reservas del músculo hacia la gónada tal como se ha reportado para otros grupos taxonómicos como bivalvos (Epp *et al*., 1988; Martínez, 1991; Racotta *et al*., 1998; Racotta *et al*., 2003) y peces (Encina y Granado-Lorencio, 1997; Henderson *et al*., 2000). En este estudio se encontró que las concentraciones de proteínas y carbohidratos en el músculo, claramente tienden a disminuir con la edad (Tabla 16), lo cual indica la existencia de una posible nueva ruta de movilización de reservas no descrita para crustáceos, y que podría tener implicaciones importantes sobre el crecimiento. Sin embargo, como no se encontraron diferencias en las reservas bioquímicas del músculo al comparar las hembras de 12 meses de distintos tamaños (Tabla 19), es posible que la disminución de proteínas y carbohidratos en músculo en relación a la edad pueda deberse a otro proceso metabólico asociado al cultivo mismo. Por ejemplo, el incremento en la temperatura registrado en el estanque de mareas entre enero (camarones de 10 meses de edad) y marzo (camarones de 12 meses de edad) (Fig. 4)

podría implicar una movilización de reservas musculares para satisfacer el incremento del metabolismo ocasionado por una mayor temperatura (Schmidt-Nielsen, 1997). O bien, el incremento en salinidad registrado en marzo (Fig. 4) podría ocasionar la movilización de reservas musculares para compensar el gasto energético asociado a la osmoregulación (Prosser, 1991).

La hemolinfa constituye la vía de transporte de nutrientes hacia el ovario ya sea a partir de la dieta o de tejidos de almacenamiento. Así, se ha reportado que los cambios en la composición bioquímica de la hemolinfa reflejan parcialmente lo que ocurre en el ovario (Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994; Vázquez-Boucard, 1990). En este estudio se observó un efecto significativo de la edad sobre la composición bioquímica de la hemolinfa el cual fue independiente del peso de la hembra (Tabla 15). Sin embargo, no se observó una tendencia clara que pudiera estar relacionada con el grado de madurez, lo cual nuevamente puede deberse a otra variable relacionada con el cultivo, como lo es la temperatura. Asimismo, al comparar la composición bioquímica de la hemolinfa de las hembras de la misma edad y distintos tamaños (Tabla 18) y con diferente grados de madurez, prácticamente no se observa ninguna diferencia. De manera similar, Galois (1984) y Palacios *et al*. (2000) no observaron cambios en la composición bioquímica de la hemolinfa en relación con el desarrollo gonádico. En conclusión, se confirma la importancia de la acumulación de proteínas y lípidos en el proceso de maduración ovárica de hembras. Sin embargo, el grado de madurez del ovario en términos de la acumulación de reservas bioquímicas en el ovario dependen de la edad de la hembra independientemente de su peso.

3.2 Machos

Todas las variables morfométricas fueron mayores en los machos de 12 meses de edad de mayor tamaño en comparación con los machos pequeños (Tabla 22). El potencial reproductivo en machos podría ser inferido a partir del peso del testículo, dado que se esperaría que los testículos más grandes produzcan mayor número de gametos (conteo total de espermatozoides). En hembras desde hace mucho tiempo se ha reportado que el peso de la gónada y el IGS aumentan en función del grado de madurez y del tamaño de la hembra (King, 1948, ver sección anterior). Sin embargo, en machos la maduración sólo se ha correlacionado con cambios en la estructura de los genitales externos (petasma) (Tirmizi y Javed, 1976), y con cambios histológicos que ocurren en los testículos y ámpulas terminales (Ro *et al.*, 1990). En el presente trabajo se encontró que el peso del testículo depende tanto de la edad (Tabla 20) como del peso del macho (Tabla 22).

En el análisis histológico del testículo no se encontraron diferencias significativas en las áreas ocupadas por los diferentes tipos celulares entre edades (Tabla 21), ni entre organismos grandes y pequeños (Tabla 23). Con esto se pudo determinar que los testículos presentan actividad espermatogénica desde los 6 meses de edad, y se espera que desde esta edad esta actividad sea constante durante toda la vida del camarón, de manera similar a lo que sucede en peces (Ceballos-Vázquez y Elorduy-Garay, 1998). Por lo anterior, en machos la asignación de estadios de madurez a partir de la organización citológica de la gónada tal como se aplica para las hembras, no es factible para determinar diferencias en ciertas condiciones o bajo ciertos tratamientos.

Como consecuencia, en machos de camarones penéidos no se ha podido establecer un ciclo de transferencia de nutrientes desde otros tejidos hacia el testículo. Lo anterior no

implica que no existe aporte de nutrientes desde fuera del testículo, sino que no existe un período de producción gamética definido (i. e. la producción de espermatozoides es constante) en el que se aprecie un intercambio de componentes bioquímicos desde un tejido de reserva hacia la gónada, además de que la acumulación de reservas no es tan importante como en hembras. Si el aporte de nutrientes es constante, se espera que la composición bioquímica del testículo no presente variaciones significativas (Tablas 26 y 30) o con una variación menos marcada que en el caso de las hembras. La ausencia de variación en la bioquímica del testículo ha sido reportada para varias especies de decápodos (Pillay y Nair 1971; Pillay y Nair 1973).

No existen reportes sobre la composición bioquímica del espermatóforo, así como tampoco por separado del vaso deferente (Vd) y ámpula terminal (At), para poder realizar una comparación con los presentes resultados. La única referencia que se tiene es la de Castille y Lawrence (1989), quienes reportan que en *F. aztecus* y *L. setiferus* el contenido de proteínas y carbohidratos en el conjunto de Vd-At se incrementa durante la maduración, y está relacionado con la talla y la edad de los camarones. En el presente estudio, al comparar entre edades solo se encontró un incremento en el contenido de agua en el espermatóforo (Tabla 27), la cual es paralela a un mayor peso del espermatóforo y mayor conteo de espermatozoides (Tabla 32). Un efecto similar se observó al comparar los machos de 12 meses de edad y distintos tamaños, en donde se obtuvo un mayor contenido de agua en el espermatóforo y mayor conteo total de espermatozoides en organismos grandes (Tabla 31 y 33). Es posible proponer entonces que el agua sea un importante constituyente del material aglutinante de la masa espermática. La concentración de proteínas en espermatóforos no difiere entre edades, por lo que se podría considerar que

estas son componentes estructurales. Sin embargo, dado que en el vaso deferente las proteínas disminuyeron con la edad, mientras que en el ámpula terminal se incrementaron, es posible proponer que existe una transferencia de proteínas desde el vaso deferente hacia el ámpula terminal. Este resultado denota la importancia de realizar los análisis de manera separada en ambos tejidos.

Para interpretar los resultados sobre niveles de carbohidratos y lactato hay que señalar que se ha sugerido que en el tracto reproductivo de los crustáceos braquiuros, los espermatozoides dependen de un metabolismo anaeróbico (Jeyalectumie y Subramoniam, 1987; Jeyalectumie y Subramoniam, 1991). Además, se ha determinado que cuando la espermateca se fija a la hembra, los espermatozoides dependen igualmente de un metabolismo anaeróbico, concretamente glucólisis, con formación de lactato (Jeyalectumie y Subramoniam, 1987; Jeyalectumie y Subramoniam, 1991; Anilkumar *et al*., 1996). La disminución significativa de carbohidratos en el vaso deferente y el ámpula terminal, así como la misma tendencia en espermatóforo (Tabla 27) concuerdan con una utilización anaeróbica de este componente en camarones penéidos. Sin embargo, dicha disminución de carbohidratos esta acompañada por una disminución de la concentración de lactato en machos de mayor edad que no concuerda con una activación de glucólisis anaerobia. Es posible que los niveles mismos de lactato no sean un buen indicador, ya que su acumulación puede realizarse en momentos específicos, como se mencionó antes, y su eliminación o “recirculación” puede realizarse por vía gluconeogénica en esos tejidos o en otro tejido como el hepatopáncreas. En este sentido se sugiere realizar mayor investigación utilizando indicadores más precisos de la activación de glucólisis anaerobia, como sería la actividad de lactato deshidrogenasa (Jeyalectumie y Subramoniam, 1987; Jeyalectumie y

Subramoniam, 1991). Además, es necesario tomar en cuenta que la determinación se hizo en el tejido completo y al menos en el caso del espermatóforo, sería importante discriminar entre lo que ocurre a nivel de masa espermática y del tejido estructural.

Adicionalmente, hay una disminución de lípidos en relación con la edad, lo cual también puede implicar su utilización como una fuente de energía para los espermatozoides, al igual que en vertebrados (Guraya, 1987 citado por Anilkumar *et al*., 1996), considerando que los espermatozoides de camarón presentan mitocondrias (Alfaro, 1994). Sin embargo, es necesario realizar estudios específicos de metabolismo oxidativo en esperma de crustáceos para evaluar lo anterior.

4. Análisis de la calidad espermática en relación con tamaño y edad

Los machos más grandes produjeron espermatóforos significativamente más grandes y mayores cantidades de espermatozoides que los machos pequeños (Fig. 13a y b). Estos mismos resultados fueron reportados para *P. monodon* (Pratoomchat *et al*., 1993) e incluso para la misma especie del presente estudio, *L. vannamei* (Wang *et al*., 1995). La relación logística entre el porcentaje de espermatozoides normales y el peso del camarón (Fig. 13c) muestra que el máximo porcentaje de espermatozoides normales tiende a ser 73.7 % (valor asintótico) en machos mayores de 38 g y 12 meses de edad. De manera similar, una relación logística entre el conteo total de espermatozoides normales y el peso del camarón para una población natural de *L. setiferus* tuvo un valor máximo de 45 millones de espermatozoides normales/espermatóforo (valor asintótico) para machos mayores de 36 g (Rosas *et al*., 1993). Por otra parte, los ajustes potenciales entre el porcentaje de espermatozoides anormales (Fig. 13d) o de espermatozoides muertos (Fig. 13e) y el peso

del camarón muestran que hay una tendencia a alcanzar un valor mínimo de éstos en machos de 42 g y 12 meses de edad. Cabe resaltar que un mayor conteo total de espermatozoides corresponde con una mayor proporción de espermatozoides normales y con menores proporciones de espermatozoides anormales y muertos. De manera similar, Alfaro (1993) reportó una correlación negativa entre el porcentaje de espermatozoides anormales y el conteo de espermatozoides para *L. stylirostris*. Para el caso particular de machos de *L. vannamei*, mantenidos bajo nuestras condiciones, los machos de mayor edad (12 meses) pueden presentar una mejor calidad espermática que los machos más pequeños.

Al parecer, un conteo creciente de espermatozoides y una reducción en las anormalidades en relación con el peso del camarón parecen ser características del proceso de maduración en los machos penéidos (Alfaro, 1993; Pratoomchat *et al*., 1993). Sin embargo, no hay estudios previos que analicen su relación con la edad. En el presente estudio, los machos de 10 meses y, especialmente los de 12 meses de edad, presentaron una calidad espermática superior a la de los machos más jóvenes (Tabla 32), basándose en que presentaron mayores pesos del espermatóforo, conteo de espermatozoides y porcentajes de espermatozoides normales. Al eliminar el efecto del peso del camarón mediante el uso del ANCOVA, se mantuvo la misma tendencia, indicando que la influencia de la edad fue independiente del peso del camarón. Sin embargo, el efecto del peso del camarón si tuvo un efecto más claro cuando se compararon las variables de calidad espermática de machos de 12 meses de edad de distintos tamaños (Tabla 33).

Se observaron diferencias significativas en la cantidad y calidad espermática entre los machos grandes y pequeños (Tabla 33), las cuales podrían ser consecuencia del peso del camarón. La ausencia de diferencias significativas para la mayoría de las variables, cuando

se incluyó el peso del camarón como covariable en los ANCOVA, indican que las diferencias entre los machos grandes y pequeños están relacionadas con el peso del camarón. Por otro lado, sí se presentó una diferencia significativa del conteo de espermatozoides entre los machos grandes y pequeños después de corregir por peso (Tabla 33), indicando que este puede ser dependiente de las condiciones de cultivo por sí mismas e independiente del peso del camarón. Otro ejemplo de la influencia de las condiciones de cultivo sobre la calidad espermática fue observado por Alfaro y Lozano (1993), quienes encontraron que machos de 24 g mantenidos en estanques supralitorales incrementaron su conteo de espermatozoides de 1.5-1.9 millones hasta 15-20 millones al ser transferidos a condiciones de laboratorio de producción. Alfaro y Lozano (1993) concluyen que dicho efecto se debe a. un factor nutricional. Esto podría explicar los valores relativamente bajos de conteo de espermatozoides obtenidos en el presente trabajo en comparación con los obtenidos en estudios previos en *L. vannamei* mantenidos en condiciones de laboratorio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985; Alfaro y Lozano, 1993; Wang *et al*., 1995; Bray y Lawrence, 1998; Pérez-Velázquez *et al*., 2001).

Por otra parte, los porcentajes mayores de espermatozoides normales en relación al peso y a la edad del camarón están relacionadas con el proceso de maduración del vaso deferente, el cual no está maduro al mismo tiempo en que empieza la producción de espermatozoides (Alfaro, 1993). El vaso deferente es el lugar donde se lleva a cabo la maduración final del espermatozoide al completarse la formación del subacrosoma y del "spike" (Shigekawa y Clark, 1986). Se han reportado tres tipos de anormalidades morfológicas en espermatozoides: cuerpo deformado, "spike" doblado y ausencia de este (Wang *et al*., 1995). Adicionalmente, en este trabajo se observaron espermatozoides

anormalmente pequeños o grandes en camarones de 6 y 8 meses de edad, lo cual sugiere que una división irregular de las células espermáticas puede ser resultado de un testículo inmaduro. En machos juveniles de *L. vannamei*, se ha determinado que la mayor parte de los espermatozoides anormales son los que carecen de "spike" (Wang *et al*., 1995). Los resultados de este trabajo confirman que los machos de 6 y 8 meses de edad usualmente presentan un alto porcentaje de espermatozoides sin "spike", así como también sugieren que la disminución en los porcentajes de espermatozoides anormales con la edad estuvo relacionada con el proceso de maduración del vaso deferente. Sin embargo, la carencia de diferencias entre los machos grandes y pequeños de 12 meses, en cuanto a los porcentajes de espermatozoides normales, anormales y muertos cuando se hicieron los ANCOVA con el peso del camarón como covariable, indican que los machos de 12 meses de edad presentan un vaso deferente totalmente maduro, y que esto es independiente del peso del camarón.

En la presente tesis, se encontraron rutinariamente machos aparentemente maduros, dada la presencia de espermatóforos visibles (como los observados a los 6 y 8 meses de edad). Sin embargo, a partir de estos resultados, es claro que la presencia de espermatóforos no es un buen criterio para seleccionar machos con propósitos reproductivos. Un mejor criterio para seleccionar machos reproductores es la calidad espermática, la cual está relacionada con la edad. El uso de machos de 10, o aún mejor, de 12 meses de edad, permitiría mejorar la producción de nauplios, ya que se trata en principio de machos maduros con una alta calidad espermática. Aunque también es importante considerar las condiciones de cultivo bajo las cuales los reproductores domesticados serán obtenidos debido a que las condiciones de cultivo afectan el conteo de espermatozoides, y esto es

independiente de la edad y el peso del camarón. Por ello, es importante también que se realicen estudios tendientes a analizar el efecto de las condiciones de cultivo sobre el conteo total de espermatozoides y la calidad espermática ya que ahí estan involucradas una gran cantidad de variables (i. e. densidad de siembra, alimentación, stress, factores ambientales, etc.)

Es importante señalar que en el presente estudio no se evaluó el desempeño reproductivo de machos en condiciones de producción, lo cual podría afectar algunas de las variables evaluadas. Sin embargo, en un estudio donde se compara el desempeño reproductivo en condiciones de producción de machos *L. schmitti* de 7 y 10 meses de edad con un peso promedio de 35.5 g, se encontró que se obtuvo un mayor número de nauplios por desove con los machos de 7 meses de edad (Pérez y Ceballos, 1995), sin embargo, no se reportan las condiciones de cultivo mediante las cuales se crecieron los reproductores y éstas (por ejemplo la temperatura que puede acelerar el metabolismo) pudieron influenciar el proceso de maduración del tracto reproductivo de los machos.

5. Análisis de la calidad espermática en relación con regeneraciones consecutivas.

Los valores absolutos del conteo de espermatozoides obtenidos en el experimento donde se analiza la influencia de regeneraciones consecutivas del espermatóforo sobre la calidad espermática se encuentran dentro del rango reportado para *L. vannamei* previos (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985; Wang *et al*., 1995). Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides muertos que se observó (hasta 50 %) fue mayor que en los estudios previos, en los cuales los valores fueron del 1 al 14 % (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985; Wang *et al*., 1995). En este sentido, una explicación para el mayor porcentaje de

espermatozoides muertos puede ser la temperatura (28°C) a la cual se mantuvieron los machos en el presente estudio. Los estudios previos usaron temperaturas menores: 24.4°C (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985) y 26°C (Wang *et al*., 1995). Cabe aclarar que la temperatura de 28°C se eligió para este trabajo debido a que se ha probado que es la mejor para inducir la maduración de las hembras de *L. vannamei* (Robertson *et al*., 1993) y, por lo tanto, es la que se utiliza rutinariamente en los laboratorios comerciales, donde los machos y hembras son mantenidos en el mismo estanque. Sin embargo, se ha documentado que altas temperaturas degradan la calidad espermática (Bray *et al*., 1985; Pascual *et al*., 1998; Pérez-Velázquez *et al*., 2001; Pascual *et al*., 2003). Basándose en esta influencia negativa, se ha sugerido que los machos y las hembras deben ser mantenidos en estanques separados con diferentes temperaturas. Sin embargo, Browdy *et al*. (1996) obtuvieron apareamientos naturales con reproductores mantenidos en estanques separados, transfiriendo hembras maduras a los estanques de los machos, no encontrando diferencias significativas en las variables de producción en comparación con las obtenidas en estanques convencionales con hembras y machos mantenidos juntos.

Además de posibles requerimientos diferentes de temperatura, los requerimientos nutricionales de machos y hembras pueden ser diferentes. La mayoría de los estudios sobre requerimientos nutricionales de los reproductores han sido enfocados a hembras, en las que se ha visto claramente que la dieta afecta al desempeño reproductivo (para revisiones, ver Harrison, 1990; Wouters *et al*., 2001; Racotta *et al*., 2003). En contraste, pocos estudios han analizado la influencia de la dieta sobre el desempeño reproductivo de los machos o sobre su calidad espermática. Comparaciones previas de los efectos de diferentes dietas frescas (e. g. calamar, *Artemia* spp., poliquetos) sobre el desempeño reproductivo de

machos, no han encontrado ninguna influencia sobre la frecuencia de apareamiento y porcentaje de fertilización (Naessens *et al*., 1997), o sobre la calidad espermática (Wang *et al*., 1995; Wouters *et al*., 1999a). Sin embargo, sí se han encontrado conteos de espermatozoides bajos en machos alimentados con *Artemia* spp enriquecida con excesivos niveles de vitaminas (Wouters *et al*., 1999a), así como en machos sujetos a inanición (Wang *et al*., 1995). Contrastando los dos sexos, se ha observado que las hembras presentan mayores concentraciones de acilglicéridos y colesterol en hepatopáncreas que los machos (Racotta *et al*., 2000), aunque, se observaron bajas concentraciones de carbohidratos y actividad de amilasa tanto en machos como en hembras alimentados con una dieta de alimento fresco y se concluyó que los requerimientos nutricionales específicos para cada sexo durante la reproducción deberían ser examinados más detalladamente (Racotta *et al*., 2000).

El presente estudio provee los primeros resultados que indican que los lípidos totales o específicos (i. e. acilglicéridos, colesterol) en la hemolinfa están negativamente correlacionados con la calidad espermática (Fig. 20b,c y 21a,b), mientras que la concentración de glucosa esta positivamente correlacionada (Fig. 20a). En la sección anterior se menciona que los lípidos en testículo (Tabla 26) y vaso deferente disminuyen significativamente con la edad (Tabla 27). Dada la mayor calidad espermática en machos de mayor edad (Tabla 32), estos resultados nuevamente establecen una relación negativa entre lípidos y calidad espermática. Alternativamente, los lípidos tisulares y de la hemolinfa podrían estar siendo utilizados para el proceso de espermatogénesis. De esta manera, niveles menores de lípidos podrían indicar una mayor utilización, que a su vez, se relacionaría con una mayor calidad espermática. Por otra parte, se ha sugerido que la

glucosa en hemolinfa es transferida hacia el tracto reproductivo para soportar el metabolismo anaeróbico de los espermatozoides (Jeyalectumie y Subramoniam, 1987; Jeyalectumie y Subramoniam, 1991), como se discutió anteriormente. Sin embargo, se necesitan estudios nutricionales específicos para analizar la influencia de los lípidos vs. los carbohidratos sobre el desarrollo y la calidad de los espermatozoides. La dieta usada rutinariamente para maduración en laboratorios tiene relativamente concentraciones altas de lípidos y bajas de carbohidratos (Bray *et al*., 1990; Harrison, 1990; Wouters *et al*., 2001). El hecho que los machos y las hembras puedan tener diferentes requerimientos de lípidos y carbohidratos refuerzan la idea previamente sugerida de colocar a machos y hembras en estanques separados para regular las diferentes temperaturas y ofrecer diferentes dietas de acuerdo con el sexo.

El potencial reproductivo (cantidad y calidad de los gametos) es de principal interés en los laboratorios comerciales, y por lo que conocer estrategias para elegir machos que presenten un desempeño óptimo es importante. Sin embargo, dependiendo de la especie y condiciones experimentales, se han reportado variaciones contrastantes de calidad espermática a través de regeneraciones consecutivas del espermatóforo. Por ejemplo, en machos intactos (35.4 g) de *L. vannamei* se observó que la calidad espermática fue superior después de 104 días de cultivo (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985). Asimismo, el conteo de espermatozoides de *L. stylirostris* en regeneraciones consecutivas fue mayor que, o al menos cercana, al conteo obtenido en la regeneración previa, además de que la proporción de espermatozoides normales de cada macho mejoró para la cuarta o quinta regeneración (Alfaro, 1993). En *P. monodon* no se encontró diferencia entre los valores inicial y final (después de seis semanas) del conteo de espermatozoides o del porcentaje de

espermatozoides anormales (Gomes y Honculada-Primavera, 1993). En *Pleoticus muelleri* no se encontraron diferencias significativas entre los valores iniciales y los valores de espermatóforos regenerados en relación al peso del espermatóforo o a la calidad espermática (Díaz *et al*., 2001). En *L. setiferus* se observó una reducción sistemática en la cantidad y calidad espermática en regeneraciones consecutivas (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987a; Rosas *et al*., 1993; Pascual *et al*., 1998).

En el presente trabajo, la comparación de la calidad espermática durante regeneraciones consecutivas del espermatóforo reveló que la calidad espermática basal fue significativamente menor que la calidad espermática de los espermatóforos regenerados. Esto puede ser explicado por el hecho de los machos se mantuvieron durante dos meses sin hembras y se ha reportado que los espermatóforos que no son transferidos a las hembras, o bien que no son extraídos, eventualmente se degeneran como parte de un proceso natural (Alfaro y Lozano, 1993). Tomando como base la observación de claros signos de melanización del espermatóforo, algunos laboratorios camaronícolas recurren a la extracción manual del espermatóforo antes de transferir al macho al tanque de maduración, especialmente cuando se usan reproductores de ciclo cerrado que son expuestos a mayores temperaturas durante el cultivo que los camarones silvestres de mar abierto (R. Dubost Acuacultores de La Paz, comunicación personal). Heitzmann *et al*. (1993) también sugirieron que la melanización se puede evitar extrayendo los espermatóforos en cada ciclo de muda. A pesar de que en este trabajo no se observaron signos de melanización, sí se pudo observar un incremento de la calidad espermática después de la regeneración, lo cual justifica que se realice la extracción manual del espermatóforo antes de transferir al macho

al tanque de maduración. Adicionalmente, este espermatóforo “inicial” podría utilizarse para otros propósitos que se discuten más adelante.

En este estudio se encontraron varias correlaciones significativas que podrían ser usadas para definir criterios predictivos de alta calidad espermática. Por ejemplo, si se extraen los espermatóforos iniciales y se determina su calidad espermática, esta información puede ser usada como un indicador predictivo de la calidad espermática en las posteriores regeneraciones del espermatóforo (Figs. 17, 18, 19). Sin embargo, es importante señalar que este indicador no podría ser usado si el espermatóforo inicial presenta signos de melanización. Si este fuera el caso, todavía faltaría por establecer la calidad espermática obtenida en espermatóforos regenerados a partir de espermatóforos con signos ligeros o avanzados de melanización.

De la misma forma, y aunque requiere de mayor trabajo y es dañino para el camarón, la composición bioquímica de la hemolinfa es otro predictor potencial de la calidad espermática, o al menos podría ser usada para reformular la dieta de machos reproductores como se discutió anteriormente. Los indicadores bioquímicos de la hemolinfa pueden ser usados para predecir la calidad espermática de los espermatóforos tomados al mismo tiempo que la muestra de hemolinfa, usando la correlación con la calidad espermática basal, o bien para predecir la calidad espermática de los espermatóforos regenerados usando la correlación con la calidad espermática obtenida en el primer espermatóforo regenerado. El uso de criterios predictivos de desempeño reproductivo han sido más ampliamente desarrollados en hembras. Aquacop (1983) sugirió el uso de indicadores bioquímicos para evaluar el desempeño reproductivo de hembras, basándose en los niveles de proteína en la hemolinfa, y recientemente Arcos *et al*. (2003a) propusieron el

uso de varios indicadores bioquímicos en hemolinfa (niveles de proteína y vitelogenina) como predictores de la calidad de las hembras. Con este estudio, la propuesta de predecir la capacidad reproductiva se extiende a machos, que presentan la ventaja de que su estatus o calidad reproductiva puede ser inferida directamente de la calidad espermática.

Finalmente, se observa claramente que todos los valores de las variables bioquímicas del espermatóforo disminuyen como resultado de las regeneraciones consecutivas (Tabla 34). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre regeneraciones aún cuando se encontró una disminución de casi el 50% en el caso de los carbohidratos. Es posible que estas diferencias simplemente no fueran detectadas, dada la disminución en el tamaño de la muestra de machos que presentaron regeneraciones (de 25 a 7) o bien, por la alta variabilidad observada (error estándar). De cualquier forma, la disminución en las variables bioquímicas del espermatóforo a través de las regeneraciones consecutivas parecen estar asociadas con un incremento en el conteo total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales así como con una disminución en el porcentaje de espermatozoides muertos, características que determinan en parte un incremento en la calidad espermática como resultado de las regeneraciones consecutivas. Para apoyar lo anterior, en el segundo experimento se detectó una disminución significativa en la concentración de lactato en el espermatóforo con la edad (Tabla 27), y una tendencia a la disminución de la concentración de proteínas y carbohidratos con la edad. Dado que la calidad espermática incrementa en machos de mayor edad, podemos suponer que la disminución en las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lactato en el espermatóforo no deben ser consideradas como un reflejo del deterioro o agotamiento en la calidad del espermatóforo, ya que la calidad espermática se

incrementó como resultado de las regeneraciones y la edad. Sin embargo, se debe ser cauteloso con estos resultados ya que como se dijo anteriormente el espermatóforo se analizó completo y no se puede discriminar entre lo sucedido en los componentes externos y la masa espermática.

CONCLUSIONES

- La morfología y el grado de desarrollo de los ovocitos es similar entre los lóbulos izquierdo y derecho del ovario. A lo largo del ovario, la zona localizada sobre el primer segmento abdominal es claramente diferente de las otras zonas. Además se observó que la región cefalotorácica tiene un desarrollo vitelogénico ligeramente más avanzado que la región abdominal.

- El potencial reproductivo de las hembras, en términos del peso del ovario depende del tamaño de la hembra. Sin embargo, el grado de madurez del ovario en términos de desarrollo y diámetro de los ovocitos y de la acumulación de reservas bioquímicas en el ovario dependen de la edad de la hembra independientemente de su peso. Con lo anterior, se justifica la selección de hembras de un año para fines de reproducción, dado que presentan una vitelogénesis endógena más avanzada.

- El potencial reproductivo de hembras grandes de 12 meses de edad fue mayor que en hembras pequeñas de la misma edad. Sin embargo, esta diferencia se debió principalmente a las condiciones de cultivo.

- El potencial reproductivo de los machos, medido en términos del peso del testículo y del espermatóforo dependen del tamaño del camarón. Sin embargo, la maduración tanto del testículo como del vaso deferente en términos de porcentajes de espermatozoides normales, dependen de la edad independientemente del peso del camarón.

- La calidad espermática de machos grandes de 12 meses de edad fue mayor que en machos pequeños de la misma edad, lo cual, y a diferencia de hembras, se debió principalmente al tamaño de los organismos. La influencia de las condiciones de cultivo se restringió al conteo espermático.

- Por lo anterior, se recomienda el uso de machos y de hembras de 12 meses de edad para ayudar a aumentar la producción de semilla. Sin embargo, para mejorar la productividad, también es importante considerar las condiciones de cultivo bajo las cuales se obtengan los reproductores.

- Se confirma la importancia de la acumulación de proteínas y lípidos en el proceso de maduración ovárica de hembras. En el caso de los machos, aunque no hay un ciclo definido de acumulación de reservas, los resultados sugieren una utilización de carbohidratos y lípidos durente la espermatogénesis y para el metabolismo de los espermatozoides.

- La calidad espermática se incrementa significativamente con la regeneración del espermatóforo. Las variables de calidad espermática inicial pueden ser usados como criterios predictivos de una calidad espermática óptima para seleccionar reproductores. La presencia de espermatóforos por sí sola no es un buen criterio para seleccionar machos con propósitos reproductivos.

PERSPECTIVAS

- Es necesario establecer el efecto de otras variables sobre el potencial reproductivo, por ejemplo la época del año, la alimentación, la temperatura y otras condiciones de cultivo y de preferencia por separado.

- Se debe de evaluar el efecto de la ablación del tallo ocular en hembras de distintos estadios de maduración ya que es probable que en hembras que solo presentan ovocitos previtelogénicos no resulte en una maduración adecuada o bien produzcan desoves de deficiente calidad.

- Evaluar el efecto de la dieta, particularmente la cantidad y calidad de lípidos y carbohidratos en la dieta sobre la calidad espermática de los camarones.

- Para establecer si existe un efecto de la edad sobre la movilización de reservas asociada a madurez gonádica en condiciones de cultivo en estanques, es necesario realizar estudios donde se comparen machos y hembras de edades mayores de 12 meses.

- Debe evaluarse el uso de condiciones diferentes de maduración (temperatura y alimentación) para machos y hembras en tinas separadas para cada sexo sobre el desempeño reproductivo.

- Tomando como base los resultados de este trabajo, es necesario establecer una relación costo/beneficio entre la edad o el tamaño más adecuados para considerarse como reproductores y el desempeño reproductivo resultante, evaluado a través de la producción de nauplios.

BIBLIOGRAFÍA

Alava V.R., A. Kanazawa, S. Teshima y S. Koshio. 1993. Effect of dietary vitamins A, E, and C on the ovarian development of *Penaeus japonicus*. Nippon Suisan Gakkaishi 59(7): 345-351.

Alfaro J. 1993. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from grow-out pond. J. World Aquacult. Soc. 24(1): 6-11.

Alfaro J. 1994. Ultraestructura de la glándula androgénica, espermatogénesis y oogénesis de camarones marinos (Decapoda:Penaeidae). Rev. Biol. Trop.42: 121-129.

Alfaro J. 1996. Effect of 17∝-Methyltestosterona and 17∝-Hydroxyprogesterona on the quality of white shrimp *Penaeus vannamei* spermatophores. J. World Aquacult. Soc. 27(4): 487-492.

Alfaro J. 2001. Controlled reproduction of penaeid shrimp: a contribution to its improvement. Texas A & M University. Tesis doctoral 149 pp.

Alfaro J. & X. Lozano. 1993. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 24(4): 522-529.

Alfaro J., A.L. Lawrence & D. Lewis. 1993. Interaction of bacteria and male reproductive system blackening disease of captive *Penaeus setiferus.* Aquaculture 117:1-8

Anderson S.L., E.S. Chang & W.H. Clark. 1984. Timing of postvitellogenic ovarian changes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* (Penaeidae) determined by ovarian biopsy. Aquaculture 42: 257-271.

Anderson S.J., A.C. Taylor & R.J. Atkinson. 1994. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thlassinidea). Comp. Biochem. Physiol. 108A: 515-522.

Anilkumar G., K. Sudha, E. Anitha & T. Subramoniam. 1996. Aspects of sperm metabolism in the spermatheca of the brachyuran crab *Metopograpsus messor* (Forskål). J. Crustacean Biol. 16: 310-314.

Anónimo. 2003a. Análisis del mercado mexicano de camarón. Panorama Acuícola Magazine 8(3): 68-69.

Anónimo. 2003b. Tendencias mundiales en la comercialización de camarón. Panorama Acuícola Magazine 8(2): 34- 35.

APFA. 2000. Australian Prawn Farmer's Association Research & Development Plan. 18 p.

AQUACOP. 1979. Penaeid reared broodstock: Closing the cycle on *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proc. World Maricult. Soc. 10: 445-452.

AQUACOP. 1983. Constitution of brood stock, maturation, spawning and hatching system for penaeid shrimps in the Centre Océanologique du Pacifique. 105-121p. In: Handbook of Mariculture. Vol. I, Crustacean Aquaculture. McVey, J.P. (Ed.). C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Fla. U.S.A.

Arcos F. G., A.M. Ibarra, C. Vázquez-Boucard, E. Palacios, and I.S. Racotta. 2003a. Hemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. J. Aquaculture Res.34: 749-755.

Arcos F. G., A.M. Ibarra, E. Palacios, C. Vázquez-Boucard & I.S. Racotta. 2003b. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. Aquaculture 228: 335-349.

Arcos F.G., I.S. Racotta & A.M. Ibarra. Genetics of predictive criteria for high reproductive performance in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Sometido Aquaculture.

Barnes, H. & J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. Journal of Exp. Mar. Biol. Ecol. 12:103-118.

Bauer R.T. & C.E. Cash. 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. Trans. Am. Microsc. Soc. 110: 144-162.

Bédier E., J.C. Cochard, G. Le Moullauc, J. Patrois & Aquacop. 1998. Selective breeding and pathology in penaeid shrimp culture: the genetic approach to pathogen resistance. World Aquac. 29(2): 46-52.

Benzie J.A.H. 1997. A review of the effect of genetics and environment on maturation and larval quality of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Aquaculture 155: 69-85.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Bioch.72:248-253.

Bray W.A. & A.L. Lawrence. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. 93-173 In: Fast A. W. & Lester L. J. (Eds). Marine shrimp culture: Principles and practices. Elsevier Science Publishers. Saint Louis

Bray W.A. & A.L. Lawrence. 1998. Male viability determinations in *Penaeus vannamei*: evaluation of short-term storage of spermatophores up to 36 h and comparison of Ca-free saline and seawater as sperm homogenate media. Aquaculture 160, 63-67.

Bray W.A., J.R. Leung-Trujillo, A.L. Lawrence & S.M. Robertson. 1985. Preliminary investigation of the effects of temperature, bacterial inoculation and EDTA on sperm quality in captive *Penaeus setiferus*. J. World Aquacult. Soc. 16:250-257.

Bray W.A., A.L. Lawrence & J.R. Leung-Trujillo. 1989. Reproductive performance of ablated *Penaeus stylirostris* fed a soy lecithin supplement. J. World Aquacult. Soc. 20: 19A.

Bray W.A., A.L. Lawrence & L.J. Lester. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. J. World Aquacult. Soc. 21: 41-52.

Bridges C.R. & A.R. Brand. 1980. Oxygen consumption and oxygen-independence in marine crustaceans. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2: 133-141.

Browdy C.L. 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: Perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. Pp. 22-51. En: Wyban J. (Ed.) Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Soc., Baton Rouge, LA Estados Unidos.

Browdy C.L. 1996. Development of captive breeding programs for penaeid shrimp. Asian Shrimp News. 1st Quarter 1996. 2-3 p.

Browdy C. L. 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. Aquaculture 164: 3-21.

Browdy C.L., A. Hadani, T.M. Samocha & Y. Loya. 1986. The reproductive performance of wild and pond-reared *Penaeus semisulcatus* De Haan. Aquaculture 59: 251-258.

Browdy C.L., K. McGovern-Hopkins, A.D. Stokes, J.S. Hopkins & P.A. Sandifer. 1996. Factors affecting the reproductive performance of the Atlantic white shrimp, *Penaeus setiferus*, in conventional and unisex tank systems. J. Appl. Aquacult. 6(1): 11-25.

Cahu C. & P. Quazuguel. 1989. Lipid metabolism of *Penaeus vannamei* broodstock : influence of dietary lipids. Aquaculture Europe 10: 45-46.

Cahu C., M. Fakhfakh & P. Quazuguel. 1991. Effect of dietary ∝-tocopherol level on reproduction of *Penaeus indicus*. 242-244. En: Lavens P., P. Sorgeloos, E. Jaspers & F. Ollevier (Eds.) LARVI' 91 — Fish and Crustacean Larviculture Symposium, Publicación Especial 15. European Aquaculture Society, Gent, Bélgica.

Cahu C.L., J.C. Guillaume, G. Stéphan & L. Chim. 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. Aquaculture 126: 159-170.

Cahu C.L., G. Cuzan & P. Quazuguel. 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. Comp. Bioch. Physiol. 112 (3-4): 417-424.

Castallón-Cervantes O., C. Lugo, M. Aguilar, G. González-Moran & M.L. Fanjul-Moles. 1995. Photoperiodic induction on the growth rate and gonads maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny. Comp. Biochem. Physiol. 110ª: 139-146.

Castille F.L. & A.I. Lawrence. 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* (Ives) and *P. setiferus* (L.). J. Crust. Biol. 9: 202-211.

Cavalli R.O., M.P. Scardua & W. Wasielesky, Jr. 1997. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. J. World Aquacult. Soc. 28(3) : 260-267.

Ceballos-Vázquez B.P. & J.F. Elorduy-Garay. 1998. Gonadal development and spawning of the golden-eyed tilefish *Caulolatilus affinis* (Pisces: Branchiostegidae) in the Gulf of California, México. Bull. Mar. Sci. 63(3): 469-479.

Chamberlain G.W. & A. Lawrence. 1981. Maturation, reproduction and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. J. Wold Maricult. Soc. 12(1): 209-224.

Chamberlain G.W. & N.F. Gervais. 1984. Comparison of unilateral eyestalk ablation with environmental control for ovarian maturation of *Penaeus stylirostris*. J. Wold Maricult. Soc. 15: 29-30.

Chamberlain G.W., G. Sterling, K. Johnson & D.H. Lewis. 1983. Swelling and melanization of the male reproductive system of captive adult penaeid shrimp. J. World Maricult. Soc. 14:135-136.

Charniaux-Cotton H. 1985. Vitelogenesis and its control in Malacostracan crustacea. Am. Zool. 25: 197-206.

Charniaux-Cotton H. & G. Payen. 1988. Crustacean reproduction. 279-304 p. En: Downer, R.G.H. & H. Laufer (Eds.) Invertebrate endocrinology. Alan R. Liss, Inc. N.Y.

Chow S., W.J. Dougherty & P.A. Sandifer. 1991a. Unusual testicular lobe system in the white shrimps, *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1761) and *P. vannamei* Boone, 1931 (Decapoda: Penaeidae); a new character for dendrobranchiata?. Crustaceana 60(3): 44-58.

Chow S., M.M. Dougherty, W.J. Dougherty & P.A. Sandifer. 1991b. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. J. Crustac. Biol. 11(2): 201-216.

Ciechomski J.D. 1967. Carácter del desove y fecundidad de la merluza argentina, *Merluccius merluccius hubbsi*, del sector bonaerense. Boletín No. 13 del Instituto de Biología Marina Buenos Aires. 30 pp.

Clark W.H. & M.C. Pillai. 1991. Egg production, release and activation in the shrimp *Sicyonia ingentis*. En: Wenner A. M. & A. Kuris (Eds) Crustacean Issues. Balkema Press Rotterdam.

Clark W.H., J.W. Lynn, A.I. Yudin & H. Persyn. 1980. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. Biol. Bull. 158: 175-186.

Cripe G.M. 1994. Induction of maturation and spawning of pink shrimp, *Penaeus duorarum*, by changing water temperature, and survival and growth of young. Aquaculture 128: 255-260.

Crocos P.J. & J.D. Kerr. 1986. Factors affecting induction of maturation and spawning of the tiger prawn, *Penaeus esculentus* (Haswell), under laboratory conditions. Aquaculture 58: 203-214.

Crocos P.J. & G.J. Coman. 1997. Seasonal and age variability in the reproductive performance of *Penaeus semisulcatus* broodstock: optimizing broodstock selection. Aquaculture 155: 55-67.

Crocos P.J., N. Preston & S. Keys. 2000. Comparative reproductive performance of wild domesticated broodstock of farmed shrimp *Penaeus japonicus* and *P. monodon*, in Australia. 157 p. In: Book of abstracts Aqua 2000. Nice France. European Aquaculture Society Special Publication 28.

Cummings W.C. 1961. Maturation and spawning of the pink shrimp *Penaeus duorarum* Burkenroad. Trans. Am. Fisher. Soc. 90(4): 462-468.

D'Croz L., L.V. Wong, G. Justine & M. Gupta. 1988. Prostaglandins and related compounds from the polychaete worm *Americonuphis reesei* Fauchald (Onuphidae) as possible inducers of gonad maturation in penaeid shrimps. Rev. Biol. Trop. 36: 331-332.

Dall W., D.M. Smith & L.E. Moore. 1995. Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation. Mar. Biol. 123 (3): 435-441.

Díaz A.C., A.V. Fernández, N.S. Harán & J.L. Fenucci. 2001. Reproductive performance of male argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Panaeoidea) in culture conditions. J. World Aquacult. Soc. 32:236-242.

Dumas S. & R. Campos-Ramos. 1999. Triploidy induction in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquacult. Res. 30: 621-624.

Duronslet M.J., A.I. Yudin, R.S. Wheeler & W.H. Clark. 1975. Light and fine structural studies of natural and artificially induced egg growth of penaeid shrimp. Proc. World Maricult. Soc., 6 105-122.

Encina L. & C. Granado-Lorencio. 1997. Seasonal variations in the physiological status and energy content of somatic and reproductive tissues of chub. J. Fish Biol. 50: 511-522.

Epp J., V.M. Bricelj & R.E. Malouf. 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age class of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (L.) J. Exp. Mar. Biol. 121:113-136.

Filose J. 2003. Mercado mundial de camarón: estado actual y predicciones. Panorama Acuícola 8 (5): 34-37.

Fingerman M. 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. J. Crustacean Biol. 7: 1-24.

Fingerman M. 1997. Crustacean endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis. Physiol. Zool. 70(3) : 257-269.

Finucane J.H., L.A. Collins, H.A. Brusher & C.H. Saloman. 1986. Reproductive biology of king mackerel, Scomberomorus cavalla, from the southeastern United States. Fish. Bull. 84 : 841-850.

Galgani M.L., G. Cuzon, F. Galgani & J. Goguenheim. 1989. Influence du régime alimentaire sur la reproduction en captivite de *Penaeus indicus*. Aquaculture 81: 337-350.

Galois R. G. 1984. Variations de la composition lipidique tissulaire au cours de la vitellogènese chez la crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards. J. Exp. Biol. Ecol. 84: 155-156.

García E., M.A. Jiménez & M. Oliva. 1995. Cambios en el metabolismo lipídico durante la maduración ovárica en *Penaeus notialis*. Rev. Inv. Mar. 16(1-3): 165-169.

Gehring W.R. 1974. Maturational changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp, *Penaeus duorarum duorarum* Burkenroad. Comp. Bioch. Physiol. 49A: 511-524.

Gomes L.A.O. & J. Honculada-Primavera. 1993. Reproductive quality of male *Penaeus monodon*. Aquaculture 112: 157-164.

González-Félix M.L. & M. Pérez-Velázquez. 2003. El valor nutricional de los ácidos grasos y su efecto en el crecimiento y sobrevivencia de *Litopenaeus vannamei*. Panorama Acuícola Magazine 8(3): 10-11.

Grant A. & P.A. Tyler. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. Int. J. Invert. Reprod. 6 : 259-269.

Hagerman L. 1986. Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia. Comp. Bioch. Physiol. 85A:721-724.

Harrison K. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. Proc. J. Shellfish Res. 9(1) B: 1-28.

Heffernan P.B., R.L. Walker & J.L. Carr. 1989. Gametogenic cycles of three bivalves in Wassaw Sound, Georgia: I. *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). J. Shellfish Res., 8 51-60.

Heitzmann J.C., A. Diter & AQUACOP. 1993. Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931: dependence on the intermoult cycle. Aquaculture 116: 91-98.

Henderson B.A., T. Trivedi & N. Collins. 2000. Annual cycle of energy allocation to growth and reproduction of yellow perch. J. Fish Biol. 57: 122-133.

Hernández-Herrera R., J.L. Ramírez, P. Lavens & I.S. Racotta. 1999. Supervivencia a altas concentraciones de amonio como indicador de la calidad larvaria en *Litopeneus vannamei*. 268-274 p. En: Cabrera, T., D. Jory & M. Silva (Eds.) Acuicultura 99. Memorias. Venezuela.

Homola E., A. Sagi, & H. Laufer. 1991. Relationship of claw form and exoskeleton condition to reproductive system size and methylfarnoseate in the male spider crab, *Libinia emarginata.* Inv. Reprod. Dev. 20: 219-225.

Huberman A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. Aquaculture 191: 191-208.

Ibarra A.M., J.L. Ramírez, I.S. Racotta, E. Palacios & F. Magallon. 1997. Performance comparison of eggs and nauplii for spawners from a second generation domesticated and wild shrimp of *Penaeus vannamei*. 159-160 pp. En: Alston D.E., B.W. Green & H.C. Clifford (Eds). IV Symposium on Aquaculture in Central America, Tegucigalpa, Honduras, WAS-ANDAH, 22-24 April 1997.

Jeyalectumie C. & T. Subramoniam. 1987. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the field crab, *Partelphusa hydrodromous* (Herbst). Exp. Biol. 46: 231-236.

Jeyalectumie C. & T. Subramoniam. 1991. Biochemistry of seminal secretions of the crab *Scylla serrata* with reference to sperm metabolism and storage in the female. Molec. Reprod. Develop. 30: 44-55.

Jiménez M.A., E. García, G. Gandonou & M. Oliva. 1995. Metabolismo lipídico del hepatopáncreas de *Penaeus schmitti* en cultivo y del medio natural. Rev. Invest. Mar. 16: 157-164.

Jory D., T. Cabrera, B. Polanco, J. Millán, J. Rosas, E. García, R. Sánchez, M. Useche, R. Agudo, & C. Alceste. 1999. Aquaculture in Venezuela: Current status and perspectives. World Aquacult. 30(3): 20-31.

Kanazawa A., L. Chim & L. Laubier. 1988. Tissue uptake of radiactive cholesterol in the prawn *Penaeus japonicus* Bate during ovarian maturation. Aquatic Living Res. 1: 85-91.

King J.E. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Biol. Bull. 94(3): 244-262.

Kulkarni G.K. & R. Nagabhushanam. 1979. Movilization of organic reserves during ovarian development in the marine prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture 18: 373-377.

Lagardäre J.P. 1982. Effects of noise on growth and reproduction of *Crangon crangon* in rearing tanks. Mar. Biol. 71: 177-185.

Landau M., H. Laufer & E. Homola. 1989. Control of methyl farnesoate synthesis in the mandibular organ of the crayfish *Procambarus clarkii*: evidence for peptide neurohormones with dual functions. Invert. Reprod. Develop.16: 165-168.

Laufer H., J.S.B. Ahl & A. Sagi. 1993. The role of juvenile hormone in crustacean reproduction. Amer. Zool. 33: 365-374.

Laufer H., W.J. Biggers & J.S.B. Ahl. 1998. Stimulation of ovarian maturation in the cray fish *Procambarus clarki* by methyl farnesoate. Gen Comp. Endocrinol. 111: 113-118.

Lawrence A.L., Y. Akamine, B.S. Middleditch, G. Chamberlain & D. Hutchins. 1980. Maturation and reproduction of *Penaeus setiferus* in captivity. Proc. World Maricult. Soc. 11: 481-487.

Leung-Trujillo J.R. & A.L. Lawrence. 1985. The effect of eyestalk ablation on spermatofore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. J. World Maricult. Soc. 16: 258-266.

Leung-Trujillo J.R. & A.L. Lawrence. 1987a. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. Aquaculture 65: 363-370

Leung-Trujillo J.R. & A.L. Lawrence. 1987b. Spermatophore regeneration times for three commercially important penaeid species: *Penaeus stylirostris*, *Penaeus vannamei* and *Penaeus setiferus*. J. World Aquacult. Soc. 18(1): 32A (Abstract 127).

Leung-Trujillo J.R. & A.L. Lawrence. 1988. The effect of ascorbic acid on sperm and spermatophore quality in *Penaeus vannamei* males fed prepared diets. J. World Aquacult. Soc. 19: 46A.

Leung-Trujillo J.R. & A.L. Lawrence. 1991. Spermatophore generation times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei* and *P. stylirostris*. J. World Aquacult. Soc. 22: 244-251.

Li F., J. Xiang, L. Zhou, C. Wu & X. Zhang. 2003. Optimization of triploid induction by heat shock in chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture 219: 221-231.

Lo N.C.M., J. Alheit, & B. Alegre. 1986. Fecundidad parcial de la sardina peruana (*Sardinops sagax*). Bol. Inst. Mar del Perú, 10: 48-60.

Luis O. J. & A. C. Ponte. 1993. Control of reproduction of the shrimp *Penaeus kerathurus* held in captivity. J. World Aquacult. Soc. 24: 31-39.

Lumare F. 1979. Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. Aquaculture 18: 203-214.

Martínez G. 1991. Seasonal variations in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. Veliger 34:335-343.

Medina A., Y. Vila, G. Mourente & A. Rodríguez. 1996. A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp *Penaeus keraturus* (Forskål, 1775). Aquaculture 148: 63-75.

Menasveta P., S. Piyatiratitivorakul, S. Rungsupa, N. Moree & A. W. Fast. 1993. Gonadal maduration and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman Sea and pond-reared sources in Thailand. Aquaculture 116 : 191-198.

Menasveta P., S. Sangpradub, S. Piyatiratitivorakul & A.W. Fast. 1994. Effects of broodstock size and source on ovarian maturation and spawning of *Penaeus monodon* Fabricius from the Gulf of Thailand. J. World Aquacult. Soc. 25(1): 41-49.

Mendoza R. 1997. Nauplii production from wild, cultivated and mixed populations of blue shrimp *Penaeus stylirostris*. J. Appl. Aquacult. 7: 41-50.

Mendoza R., A. Revol, C. Fauvel, J. Patrois & J.C. Guillaume. 1997. Influence of squid extracts on the triggering of secondary vitellogenesis in *Penaeus vannamei.* Aquacult. Nutrit. 3: 55-63.

Meusy J.J. & G.G. Payen. 1988. Female reproduction in malacostracan crustacea. Zool. Sci. 5: 217-265.

Millamena O.M. & F.P. Pascual. 1990. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* Fabricius broodstock from the wild. J. World Aquacult. Soc. 21: 116-121.

Millamena O.M., R. Pudadera & M.R. Catacutan. 1993. Tissue lipid content and fatty acid composition during ovarian maturation of ablated *Penaeus monodon*. Isr. J. Aquacult. Bamigdesh 45: 120-125.

Mohamed K.S. & A.D. Diwan. 1992. Biochemical changes in different tissues during yolk synthesis in marine prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. Indian J. Marine Sci. 21: 30-34.

Mohamed K.S. & A.D. Diwan. 1994. Vitellogenesis in the indian white prawn *Penaeus indicus* (Crustacea:Decapoda:Penaeide). J. Aquacult. Trop. 9:157-172.

Mourente G. & A. Rodríguez. 1991. Variation in the lipid content of wild-caught females of the marien shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. Mar. Biol. 110: 21-28.

Naessens E., P. Lavens, L. Gomez, C.L. Browdy, K. McGovern-Hopkins, A.W. Spencer, D. Kawahigashi & P. Sorgeloos. 1997. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations. Aquaculture 155:87-101.

Nan F.H., S.S. Sheen, Y.T. Cheng & S. Nan Chen. 1995. The effects of eyestalk ablation on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile shrimp *Penaeus monodon*. Zool. Stud. 34: 265-269.

O'Leary, C.D. & A.D. Matthews. 1990. Lipid class distribution and fatty acid composition of wild and farmed prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture 89: 65-81.

Ogle J.T. 1992. A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum Penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. Invert. Reprod. Develop. 22(1-3): 267-274.

Ottogalli L., C. Galinie & D. Goxe. 1988. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* over ten generations in New Caledonia. J. Aquacult. Trop. 3: 111-125.

Palacios E. & I.S. Racotta. 1999. Relación entre desoves consecutivos de *Litopenaeus vannamei* y la condición fisiológica de los reproductores y de la progenie. Aquaculture Venezuela '99. 376-385.

Palacios E. & I.S. Racotta. 2003. Effect of number of spawns on the resulting spawn quality of 1-year-old pond-reared *Penaeus vannamei* (Boone) broodstock. Aquaculture Res. 34: 427-435.

Palacios E., A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, G. Portillo & I.S. Racotta. 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in white pacific shrimp, *Penaeus vannamei*

(Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. Aquacult. Res. 29: 183-189.

Palacios E., I.S. Racotta & APSA. 1999a. Spawning frequency analysis of wild and pond-reared pacific white shrimp *Penaeus vannamei* broodstock under large-scale hatchery conditions. J. World Aquacult. Soc. 30: 180-191.

Palacios E., C. Rodríguez-Jaramillo & I.S. Racotta. 1999b. Comparison of ovary histology between different-sized wild and pond reared shrimp *Litopenaeus vannamei* (=*Penaeus vannamei*). Invert. Reprod. Develop. 35(3): 251-259.

Palacios E., D. Carreño, C. Rodríguez-Jaramillo & I.S. Racotta. 1999c. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance, and biochemistry of white pacific shrimp, *Penaeus vannamei*, Broodstock. J. Appl. Aquacult. 9(3): 1-23.

Palacios E., C.I. Pérez-Rostro, J.L. Ramírez, A.M. Ibarra & I.S. Racotta. 1999d. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. Aquaculture 171(3/4): 309-321.

Palacios E., A.M. Ibarra & I.S. Racotta. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* Broodstock. Aquaculture 185: 353-371.

Palacios E., I.S. Racotta, H. Heras, Y. Marty, J. Moal & J.F. Samain. 2001. The relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). Aquaculture International 9: 531-543.

Palacios E., I.S. Racotta & M. Villalejo. 2003. Assessment of ovarian development and its relation to mating in wild and pond-reared *Litopenaeus vannamei* shrimp in a commercial hatchery. J. World Aquacult. Soc. En prensa.

Pascual C., E. Valera, C. Re-Regis, G. Gaxiola, A. Sánchez, L. Ramos, L.A. Soto & C. Rosas. 1998. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. J. World Aquacult. Soc. 29:447-484.

Pascual C., A. Sánchez, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. LeMoullac & C. Rosas. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus*

setiferus adult males: the effect of an extreme temperature. Aquaculture 218: 637-650.

Peixoto S., W. Wasielesky jr., F. D'Incao & R.O. Cavalli. 2003. Comparison of the reproductive performance of similarly-sized wild and captive *Farfantepenaeus paulensis*. J. World Aquacult. Soc. 34(1): 50-56.

Pérez L. & B.J. Ceballos. 1995. Respuesta reproductiva de progenitores al utilizar machos de diferentes edades de cultivo. Rev. Invest. Mar. 16(1-3): 69-73.

Pérez-Rostro C.I. & A.M. Ibarra. 2003. Heritabilities and genetic correlations of size traits at harvest size in sexually dimorphic pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown in two environments. Aquacult. Res. 34: 1-7.

Pérez-Velázquez M., M.L. González-Félix, A.L. Lawrence, W.A. Bray & D.M. Gatlin III. 2001. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. J. World Aquacult. Soc. 34(1): 92-98.

Pérez-Velázquez M., M.L. González-Félix, A.L. Lawrence, W.A. Bray & D.M. Gatlin III. 2003. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. J. World Aquacult. Soc. 34(1): 92-98.

Pillay K.K. & N.B. Nair. 1971. The annual reproductive cycles of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus*, and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) from the southern coast of India. Mar. Biol. 11: 152-166.

Pillay K.K. & N.B. Nair. 1973. Observations on the biochemical changes in the gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus*, and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. Mar. Biol. 18: 167-198.

Pratoomchat B., S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta & A.W. Fast. 1993. Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. J. World Aquacult. Soc. 24(4): 530-540.

Preston N.P., D.C. Brenan & P.J. Crocos. 1999. Comparative costs of postlarval production from wild or domesticated kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), broodstock. Aquacult. Res. 30: 191-197.

Primavera J.H. 1985. A review of maturation and reproduction in closed thelicum penaeids. In: Proc. of the First Intl. Conf. on the Culture of Penaeid

Prawns/Shrimps. Taki, Y.P. et al. (Eds). Aquaculture Department SEAFDEC. Iloilo, Philippines. 47-64.

Prosser C.L. 1991. Environmental and metabolic animal physiology. Comparative animal physiology. 4a edición. Wiley & sons, New York. 578 pp.

Quackenbush L.S. 1989. Yolk protein production in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. 109C: 21-26.

Quackenbush L.S. 1992. Yolk synthesis in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. 3A: 711-714.

Quinitio E.T. & O.M. Millamena. 1992. Ovarian changes and female-specific protein levels during sexual maturation of the white shrimp *Penaeus indicus*. Israeli J. Aquacult.-Bamidgeh 44(1): 7-12.

Quinitio E.T., R.M. Caballero & L. Gustilo. 1993. Ovarian development in relation to changes in the external genitalia in captive *Penaeus monodon*. Aquaculture 114: 71-81.

Racotta I.S. & E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 29: 351-356.

Racotta I.S. & R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comp. Biochem. Physiol. 125A: 437-443.

Racotta I.S., J.L. Ramírez, S. Avila & A.M. Ibarra. 1998. Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. Aquaculture 163: 111-122.

Racotta I.S., D. Carreño, R. Hernández-Herrera & R. Dubost. 2000. Sex and stocking conditions differences in biochemical composition of *Litopenaeus vannamei* broodstock. Aqua 2000. Nice, France, 582 p.

Racotta I.S., E. Palacios & A.M. Ibarra. 2003. Shrimp larval quality as a function of broodstock condition. Aquaculture 227: 107-130.

Ramos L. & Torras E. 1986. Histología del ovario maduro del camarón rosado *Penaeus notalis* con ablación de los pedúnculos oculares. Rev. Invest. Mar. VII: 53-61.

Ramos L., M. Espejo, S. Samada & L. Pérez. 1995. Maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus schmitti*. J. World Aquacult. Soc. 26: 183-187.

Ravid T., A. Tietz, M. Khayat, E. Boehm, R. Michelis & E. Lubzens. 1999. Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (De Haan). J. Exp. Biol. 202 (13): 1819-1829.

Richardson G.H., M. Deecaraman & M. Fingerman. 1991. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator.* Comp. Biochem. Physiol. 99C: 53-56.

Ro S., P. Talbot, J. Leung-Trujillo & A.L. Lawrence. 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1-3. J. Crust. Biol. 10(3): 455-468.

Robertson L., W.A. Bray, T.M. Samocha & A.L. Lawrence. 1993. Reproduction of Penaeid shrimp: an operation guide. 107-132 pp En: McVey J.P. (Ed.). CRC Handbook of Mariculture: Crustacean aquaculture. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Rosas C., I. Fernández, R. Brito & E. Díaz-Iglesia. 1993. The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the pink shrimp, *Penaeus notialis*. Comp. Biochem. Physiol. 104A: 183-187.

Rosas C., A. Sánchez, E. Díaz-Iglesia, L.A. Soto, G. Gaxiola & R. Brito-Pérez. 1996. Effect of dietary protein level on apparent heat increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae. J. World. Aquacult. Soc. 27: 92-102.

Rothlisberg P.C. 1998. Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. Aquaculture 164: 49-65.

Sagi A., J.S.B. Ahl, H. Danaee & H. Laufer. 1994. Methyl farneosate levels in male spider crabs exhibiting active reproductive behavior. Horm. Behav. 28: 261-272.

Sagi A., J. Silkovsky, S. Fleisher-Berkovich, A. Danon & R. Chayoth. 1995. Prostaglandin E_2 in previtellogenic ovaries of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Synthesis and effect on the level of cAMP. Gen. Comp. Endocrinol. 100: 308-313.

Sánchez-García F.E. 2003. Comercialización de camarón en el mercado La Nueva Viga, México, D.F. Panorama Acuícola Magazine 8(4) : 26-29.

Sandoval-Quintero M.E. & A. Gracia. 1998. Stages of gonadal development in the spotted pink shrimp *Penaeus brasiliensis.* J. Crustacean Biol.. 18: 680-685.

Sardá F. 1987. La reproducción de los crustáceos. Fisiología: factores de regulación de la reproducción. Potencial reproductivo. 251-295 p. En: Espinosa J. & U. Labarta (Eds.) Reproducción en acuicultura. CAICYT. Madrid.

Sarojini R., R. Nagabhushanam & M. Fingerman. 1995. *In vivo* inhibition by dopamine of 5-hydroxytryptamine-stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Experientia 51: 156-158.

Sarojini R., R. Nagabhushanam & M. Fingerman. 1996. In vitro inhibition by dopamine of 5-hydroxytryptamine-stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Experientia 52: 707-709.

Schmidt-Nielsen K. 1997. Animal physiology: Adaptation and environment. 5a edición. Cambridge University Press. 612 pp.

Shigekawa K. & W.H. Clark Jr. 1986. Spermiogenesis in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. Develop. Growth Different. 28(2): 95-112.

Simon C.M. 1982. Large scale commercial application of penaeid shrimp maturation technology. J. World Maricult. Soc. 13: 301-312.

Spaargaren D.H. & P.A. Haefner Jr. 1994. Interaction of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.): II. Biochemical relationships. J. Crust. Biol. 14: 6-19.

Talbot P., D. Howard, J. Leung-Trujillo, T.W. Lee, W-Y. Li, H. Ro & A.L. Lawrence. 1989. Characterization of male reproductive tract degenerative syndrome in captive shrimp (*Penaeus setiferus*). Aquaculture 78: 365-377.

Tan-Fermin J.D. 1991. Effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. Aquaculture 93: 77-86.

Tan-Fermin J.D. & R.A. Pudadera. 1989. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture 77: 229-242.

Teshima S., A. Kanazawa, K. Horinouchi & S. Koshio. 1988. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus japonicus*: Induced maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. Nippon Suisan Gakkaishi 54 (7): 1123-1129.

Teshima S., A. Kanazawa, S. Koshio & K. Horinouchi. 1989. Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: Variation in lipid profiles of the ovary and the hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol. 92B: 45-49.

Tirmizi N.M. & W. Javed. 1976. Study of juveniles of *Metapenaeus stebbingi* Nobili (Decapoda, Penaeidae) with particular reference to the structure and development of the genitalia. Crustaceana 30: 55-67.

Van Handel E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. Analyt. Biochem. 11: 256-265.

Vargas-Albores F., M.A. Guzmán-Murillo & J.L. Ochoa. 1992. Size-dependent haemaglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* (Stimpson). Comp. Biochem. Physiol. 103A: 487-491.

Vázquez-Boucard C. 1990. Etude de la reproduction chez les crevettes peneides ; Nature et devenir de la masse vitelline : Aspects fondamentaux et appliqués. Centre d'Océanologie de Marseille, France. Tesis Doctoral, 171 pp.

Vázquez-Boucard C., R. Galois & H.J. Ceccaldi. 1989. Variations circadiennes des lipides et lipoprotéines de l'hémolymphe, et des lipides de l'hepatopancréas, chez la crevette *Penaeus japonicus*. Arch. Int. Physiol. Biochem. 97: 87-93.

Villalón J.R. 1991. Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp, Texas A&M University, Sea Grant Program, Galveston, TX, 103 pp.

Villareal H., P. Hinojosa & J. Naranjo. 1994. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* post larvae. Comp. Biochem. Physiol. 108A: 331-336.

Wang Q., M. Misamore, C.Q. Jiang & C.L. Browdy. 1995. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: Dietary effects on sperm quality. J. World Aquacult. Soc. 26: 261-271.

West G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 41: 199-222.

Wouters R., L. Gómez, P. Lavens & J. Calderón. 1999a. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. J. Shellfish Res. 18 (2): 651-656.

Wouters R., C. Molina, P. Lavens & J. Calderón. 1999b. Contenido de lípidos y vitaminas en reproductores silvestres durante la maduración ovárica y en nauplios de *Penaeus vannamei*. Proceedings of the fifth Ecuatorian aquaculture Conference, Guayaquil, Ecuador, Fundación CENAIM-ESPOL.

Wouters R., P. Lavens, J. Nieto & P. Sorgeloos. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. Aquaculture 202: 1-21.

Wyban J.A. & J.N. Sweneey. 1991. Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual. The Oceanic Institute, Hawaii, 198 p.

Wyban J.A., C.S. Lee, J.N. Sweneey & Jr. W.K. Richards. 1987. Observations of development of a maturation system for *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 18: 198-200.

Wyban J., J.S. Swingle, J.N. Sweeney & G.D. Pruder. 1992. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. 254-259 p. In: Wyban, J. (Ed.) Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Baton Rouge, LA, USA. World Aquacult. Soc.

Wyban J. A., G. Martínez & J. N. Sweneey. 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. World Aquacult. 28: 59-62.

Wyban J., D. Garriques & W. Lim. 2002. Hatchery and growout performance of high health, SPF *P. monodon* in Indonesia. 833 p. En: Book of abstracts World Aquaculture 2002 Abril 23-27, 2002.Beijing, China.

Yagi H., H.J. Ceccaldi & R. Gaudy. 1990. Combined influence of temperature and salinity on oxygen consumption of the larvae of the pink shrimp, *Palaemon serratus* (Pennant) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). Aquaculture 86: 77-92.

Yano I. 1983. Maturation of kuruma prawns *Penaeus japonicus* cultured in earthern ponds. Proceedings of the twelfth U.S.-Japan meeting on aquaculture, Baton, Rouge, Louisiana. NOAA Tech. Rep. NMFS 47: 3-7.

Yano I. 1988. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Mar. Biol. 99: 549-553.

Zar J.H. 1996. Biostatistical analysis. Third edition. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, USA.