



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DEL AGOTAMIENTO REPRODUCTIVO
Y OPTIMIZACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN DEL CAMARÓN BLANCO DEL
PACÍFICO *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) (DECAPODA: PENAEIDAE)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

p r e s e n t a

Elena Palacios Mechetnov

La Paz, B.C.S. Julio 1999.



**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE, S.C.**

Dirección de Estudios de Posgrado

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

El día 9 de junio de 1999 los miembros de la Comité Tutorial (Revisor de Tesis), examinaron la tesis de grado titulada: Caracterización Fisiológica del Agotamiento Reproductivo y Optimización de la Reproducción del Camarón Blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) presentada por: Elena Palacios Mechelnov aspirante al grado de Doctor en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales con orientación en: Acuacultura. Los miembros del Comité manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

COMITE TUTORIAL

Dr. Ilie Racotta
Director de Tesis

Dr. Roberto Civera
Co-Tutor

Dra. Ana María Ebarra
Co-Tutor

Dr. Horacio Heras
Co-Tutor

Dr. Alberto Huberman
Co-Tutor

Dr. Radu Racotta
Co-Tutor

Dr. Sergio Hernández Vázquez
Director de Estudios de Posgrado

PREFACIO

La presente tesis está basada en los siguientes artículos, manuscritos, ponencias e informes técnicos

Artículos:

- Palacios E., A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, G. Portillo and I.S. Racotta. 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, 1998.
- Palacios E., C. I. Pérez-Rostro, J.L. Ramírez, A.M. Ibarra, and I.S. Racotta Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. *Aquaculture* 171: 309-321, 1999.
- Palacios E., I.S. Racotta and APSA. 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, 1999.
- Palacios E., C. Rodríguez-Jaramillo and I.S. Racotta. Comparison of ovary histology between different-size wild and pond-reared shrimp *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*). *Invert. Reprod. Develop.* In press, 1999.
- Palacios E., D. Carreño, M.C. Rodríguez-Jaramillo, and I.S. Racotta. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance, and biochemistry of white Pacific shrimp, *Penaeus vannamei*, broodstock. *J. Appl. Aquacult.* In press, 1999.
- Palacios E., A.M. Ibarra and I.S. Racotta. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*. In press, 1999.

Manuscritos en preparación:

- Palacios E. and I.S. Racotta. Biochemical composition of eggs and nauplii in shrimp, *Penaeus vannamei*, in relation to number of spawns.
- Palacios E., H. Heras, B. Arredondo and I.S. Racotta. Relation between the lipid composition of eggs and larval survival in shrimp (*Penaeus vannamei*).

Informes técnicos a la empresa Acuacultores de la Paz, S.A. de C.V.:

- Relación entre el color del huevo y la concentración de carotenoides
- Presencia/ausencia del espermátforo en relación a la maduración ovárica

CONFORMACIÓN DE COMITES

La presente tesis fue dirigida por:

- Dr. Ilie S. Racotta Fisiología metabólica, CIBNOR

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

- Dr. Roberto Civera Nutrición acuícola, CIBNOR
- Dr. Horacio Heras Lípidos de organismos marinos, Universidad Nacional de la Plata
- Dr. Alberto Huberman Endocrinología de crustáceos, Instituto Nacional Nutrición
- Dra. Ana María Ibarra Genética acuícola, CIBNOR
- Dr. Ilie S. Racotta Fisiología metabólica, CIBNOR
- Dr. Radu G. Racotta Fisiología comparada, ENCB, IPN

El comité sinodal fue integrado por:

- Dr. Roberto Civera Nutrición acuícola, CIBNOR
- Dr. Horacio Heras Lípidos de organismos marinos, Universidad Nacional de la Plata
- Dr. Alberto Huberman Endocrinología de crustáceos, Instituto Nacional Nutrición
- Dra. Ana María Ibarra Genética acuícola, CIBNOR
- Dr. Ilie S. Racotta Fisiología metabólica, CIBNOR

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el proyecto International Foundation for Science No. A/2711-1, por el proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. J28160B y por proyectos institucionales ICM15, ICM16, ICM6 CM15 y ABM15.

La sustentante de esta tesis agradece el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT-83376).

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de Acuacultores de la Paz S.A., quienes donaron el material biológico para los diversos estudios presentados. Agradezco así mismo su apoyo durante los muestreos, la recolección de datos y por dejarnos invadir sus instalaciones. En particular, agradezco la colaboración de J. Malagamba, R. Dubost, F. Malagamba y R. Cervera por su interés y apoyo.

El trabajo de investigación fue posible gracias a la ayuda y apoyo de muchas personas. Agradezco al grupo de Genética Acuícola por el apoyo durante las “desveladas” de los muestreos y por facilitarme el uso de su equipo, material e instalaciones de acuicultura: Dra. A.M. Ibarra, S. Avila, S. Montes, F. Arcos, J.L. Ramírez, P. Cruz, C. Ruiz-Verdugo, G. Lucero, C.I. Pérez-Rostro, y en particular a J.L. Ramírez y C.I. Pérez-Rostro por enseñarme los “secretos” del cultivo larvario. Al laboratorio de aguas y sedimentos por dejarnos invadir su laboratorio, por el uso de su equipo y material durante mi primer año, y por su apoyo desde entonces: L. Méndez y B. Acosta. Al laboratorio de histología: C. Rodríguez-Jaramillo por el procesamiento histológico de todas las gónadas, por su apoyo durante las interpretaciones y por su ayuda durante los muestreos. Al grupo de fisiología metabólica por su ayuda en los análisis bioquímicos y durante los muestreos: D. Carreño y R. Hernandez-Herrera. A la Dr. E. Serviere por su asesoría y por dejarme usar su laboratorio y equipo de microscopía. A la M.C. Lilia Alcaráz por facilitarme el uso del homogenizador de tejidos. Al Dr. H. Heras por su valiosa asesoría en la separación y cuantificación de lípidos por TLC-FID. Al grupo de patología marina, y específicamente, a J. Hernández y A. Cruz por iniciarme en el uso del lector de microplacas y el Iatrosan y permitirme el libre acceso al equipo. A la Dra. B. Arredondo por su asesoría en la derivatización y medición de ácidos grasos y por el uso de equipo. A H. Sandoval y a C.A. Pacheco por su apoyo incondicional en el uso del laboratorio de cómputo. Al grupo de crustáceos: F. Magallón y G. Portillo por hacerme ver la importancia de esclarecer parte de la problemática asociada con la disponibilidad de reproductores para la camaricultura. A N. Doktor por la medición del diámetro de los ovocitos, y a Ellis Glazier por las correcciones del Inglés.

Agradezco el interés y el apoyo más allá de lo académico de mi comité tutorial: Dra. A.M. Ibarra, Dr. R. Civera, Dr. H. Heras, Dr. A. Huberman, Dr. I. Racotta, Dr. R. Racotta. A la Dra. A.M. Ibarra y al Dr. S. Hernández por su asesoría en estadística, al Dr. H. Villareal por sus comentarios críticos de los manuscritos, al M.C. M. Villalejo del Departamento de Morfofisiología del CICIMAR, I.P.N. por su asesoría y comentarios críticos, al Dr. R. Arzuffi del Departamento de CEPROBI, I.P.N. por sus comentarios críticos de la tesis.

LISTA DE ABREVIATURAS (por sus siglas en inglés)

A	Atresia
AG	Acilglicéridos
BW	Peso corporal
CE	Ésteres de colesterol
CHH	Hormona hiperglucemiante de crustáceos
CHO	Colesterol
DAG	Diacilglicéridos
DMax	Diámetro máximo de ovocitos
EVO	Ovocitos vitelogénicos tempranos
FA	Ácidos grasos
FFA	Ácidos grasos libres
FM	Farnesoato de metilo
G	Glucosa
GIH	Hormona inhibidora gonádica
GSH	Hormona estimuladora gonádica
GSI	Índice gonadosomático
HPI	Índice hepatosomático
LVO	Ovocitos vitelogénicos tardíos
M	Mysis
MIH	Hormona inhibidora de la muda
MO	Ovocitos vitelogénicos maduros
MOIH	Hormona inhibidora del órgano mandibular
N	Nauplio
NCI	Índice de condición de nauplios
PC	Fosfatidilcolina
PG	Peso de la gónada
PI	Fosfolípidos
PL	Postlarvas
POF	Foliculos postovulatorios
PR	Camarones de origen domesticado o cultivadas en estanques
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PVO	Ovocitos previtelogénicos
TL	Lípidos totales
VSOH	Hormona ovárica estimuladora de la vitelogenénesis
W	Camarones de origen silvestre
Z	Zoea

ÍNDICE GENERAL

Prefacio.....	i
Conformación de comités.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Lista de abreviaturas.....	iv
Resumen.....	1
Abstract.....	4
Introducción.....	6
Antecedentes.....	8
Ciclo reproductivo.....	8
Aspectos hormonales de la reproducción.....	12
Aspectos metabólicos en la reproducción.....	14
Aspectos ambientales de la reproducción.....	19
Agotamiento reproductivo e hipótesis de trabajo.....	21
Objetivos.....	39
Capítulo I: Composición bioquímica de huevos y nauplios del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> , en relación a la condición fisiológica de los reproductores en un laboratorio comercial.....	40
Capítulo II: Indicadores bioquímicos de la calidad larvaria	
Sección 1: Agotamiento reproductivo en el camarón <i>Penaeus vannamei</i> reflejado en la composición bioquímica, supervivencia y crecimiento de las larvas.....	51
Sección 2: Relación entre el color del huevo y la concentración de carotenoides.....	64
Sección 3: Relación entre la composición lipídica de huevos y la supervivencia larvaria en camarón <i>Penaeus vannamei</i>	70
Capítulo III: Análisis de la frecuencia de desoves en hembras silvestres y domesticadas de <i>Penaeus vannamei</i> en un laboratorio comercial.....	74
Capítulo IV: Análisis histológico de la gónada en relación al número de desoves	
Sección 1: Comparación de la histología del ovario entre hembras de <i>Penaeus vannamei</i> de diferente tamaño y origen.....	91
Sección 2: Presencia/ausencia de espermátforo en relación a la maduración ovárica.....	102
Capítulo V: Composición bioquímica de reproductores, huevos y nauplios en relación al número de desoves.	
Sección 1: Composición bioquímica de los tejidos en relación a desoves múltiples en hembras silvestres y domesticadas de <i>Penaeus vannamei</i>	111
Sección 2: Composición bioquímica de huevos y nauplios en camarones silvestres y domesticados de <i>Penaeus vannamei</i> en relación al número de desoves.....	130
Capítulo VI: Efecto de la ablación del tallo ocular en la calidad de larvas, maduración y bioquímica de hembras de <i>Penaeus vannamei</i>	137
Discusión General.....	159
Conclusiones.....	177
Perspectivas.....	178
Anexo metodológico: Comparación de diferentes escalas para determinar maduración ovárica.....	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Antecedentes.	
Fig. 1. Número de desoves y de nauplios producidos en una piscina por día en un laboratorio comercial durante un ciclo de producción.....	22
Capítulo II, Sección 1	
Fig. 1A Comparación de la supervivencia larvaria entre desoves muestreados en diferentes días en un ciclo de producción de nauplios.....	58
Fig. 1B Supervivencia de PL15 desde PL1, desde NIV, y en respuesta a una prueba de estrés de salinidad entre desoves muestreados en diferentes días en un ciclo de producción de nauplios.....	58
Capítulo II, Sección 2	
Fig. 1. Relación de desoves de diferente color muestreados en diferentes tiempos en producción.....	66
Capítulo III	
Fig. 1. Proporción de hembras silvestres y domesticadas sin apareamientos, con uno, dos y hasta diez apareamientos durante un ciclo de producción de nauplios.....	83
Fig. 2. Contribución a la producción de nauplios en relación al número de desoves consecutivos.....	84
Capítulo IV, Sección 1	
Fig. 1. Correlación entre diferentes tipos de ovocitos y el número de desoves por hembra.....	97
Capítulo V, Sección 1	
Fig. 1. Índices gonadosomático y hepatosomático en hembras silvestres y domesticadas en relación al número de desoves y estadio de maduración.....	117
Fig. 2. Concentración de acilglicéridos, colesterol, glucosa y proteínas en hemolinfa de hembras silvestres y domesticadas en relación al número de desoves y estadio de maduración.....	118
Fig. 3. Concentración de lípidos totales, acilglicéridos y relación de acilglicéridos/lípidos totales en hepatopáncreas de hembras silvestres y domesticadas en relación al número de desoves y estadio de maduración.....	120
Fig. 4. Concentración de glucosa, carbohidratos y proteínas en hepatopáncreas de hembras silvestres y domesticadas en relación al número de desoves y estadio de maduración.....	121
Fig. 5. Concentración de lípidos totales, acilglicéridos y relación de acilglicéridos/lípidos totales en ovario de hembras silvestres y domesticadas en relación al número de desoves y estadio de maduración.....	122
Fig. 6. Concentración de glucosa, carbohidratos y proteínas en ovario de hembras silvestres y domesticadas en relación al número de desoves y estadio de maduración.....	123
Capítulo VI	
Fig. 1. Comparación de la supervivencia larvaria entre desoves provenientes de hembras ablacionadas e intactas.....	150
Discusión General	
Fig. 1. Efecto de la ablación sobre la frecuencia de desoves y mudas.....	163
Fig. 2. Frecuencia de desoves en diferentes hembras.....	165
Anexo metodológico	
Fig. 1. Distribución de frecuencias de los diámetros por estadio de maduración "A" y en relación al origen.....	189
Fig. 2. Distribución de frecuencias de los diámetros por estadio de maduración "E" y en relación al origen.....	190
Fig. 3. Distribución de frecuencias de los diámetros por estadio histológico y en relación al origen.....	192

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción	
Tabla 1. Tendencia anual en la producción de camarón	6
Antecedentes	
Tabla 2. Estadios de maduración gonádica en Peneidos	8
Capítulo I	
Tabla 1. Diferencias en la fertilización y combustible metabólico en nauplios de <i>P. vannamei</i> en relación a la alta y baja supervivencia a zoea durante un ciclo de producción de nauplios.....	43
Tabla 2. Diferencias en la morfometría de hembras y en la producción de huevos y nauplios durante un ciclo de producción de nauplios.....	44
Tabla 3. Diferencias en la composición bioquímica de huevos durante un ciclo de producción de nauplios.....	45
Tabla 4. Diferencias en la composición bioquímica de nauplios durante un ciclo de producción de nauplios.....	45
Capítulo II, Sección 1	
Tabla 1. Tamaño de hembras y producción de huevos y nauplios durante un ciclo de producción de nauplios.....	55
Tabla 2. Morfometría y composición bioquímica de huevos muestreados a lo largo de un ciclo de producción de nauplios.....	55
Tabla 3. Morfometría y composición bioquímica de nauplios IV muestreados a lo largo de un ciclo de producción de nauplios.....	56
Tabla 4. Morfometría y composición bioquímica de postlarvas 15 muestreadas a lo largo de un ciclo de producción de nauplios.....	57
Capítulo II, Sección 2	
Tabla 1. Relación entre color y concentración de carotenoides en huevos muestreados a lo largo del ciclo de producción.....	67
Tabla 2. Efecto del color y tiempo en producción después de la ablación sobre algunas variables de producción y supervivencia larvaria.....	68
Tabla 3. Efecto del color y tiempo en producción después de la ablación sobre algunas variables bioquímicas en huevos y nauplios.....	68
Capítulo II, Sección 3	
Tabla 1. Comparación de variables de producción de desoves agrupados en relación a la supervivencia a zoea III.....	72
Tabla 2. Clases de lípidos en huevos agrupados en relación a la supervivencia a zoea III.....	72
Tabla 3. Porcentaje de ácidos grasos en huevos agrupados en relación a la supervivencia a zoea III.....	73
Capítulo III	
Tabla 1. Relación de siembra de hembras por tanque de maduración.....	79
Tabla 2. Comparación de variables de producción entre camarones silvestres y domesticados.....	80
Tabla 3. Efecto de desoves consecutivos sobre la producción en camarones silvestres y domesticados.....	81
Tabla 4. Variables de producción en relación a desoves consecutivos de camarones silvestres y domesticados.....	82
Capítulo IV, Sección 1	
Tabla 1. Comparación de variables morfométricas entre hembras silvestres y domesticadas al final de un ciclo de producción de nauplios.....	95
Tabla 2. Comparación del índice gonadosomático, diámetro medio y máximo de ovocitos entre hembras silvestres y domesticadas en cuatro estadios de maduración ovárica.....	96
Tabla 3. Proporción de tipos de ovocitos entre hembras silvestres y domesticadas en cuatro estadios de maduración ovárica.....	96

Capítulo IV, Sección 2

Tabla 1. Presencia del espermátforo en relación al grado de desarrollo gonádico en hembras silvestres y domesticadas de <i>P. vannamei</i> muestreadas en noviembre de 1996.....	105
Tabla 2. Comparación del tamaño de los ovocitos y del índice gonadosomático en hembras en estadio Cortical agrupadas en relación a la presencia del espermátforo.....	106
Tabla 3. Comparación de variables morfométricas y de producción agrupadas en relación a la presencia de espermátforo en hembras silvestres o domesticadas de <i>P. vannamei</i>	107

Capítulo V, Sección 1

Tabla 1. Diferencias en variables de producción en relación al orden de desove en hembras silvestres y domesticadas.....	115
Tabla 2. Diferencias en variables morfométricas en relación al orden de desove en hembras silvestres y domesticadas.....	116

Capítulo V, Sección 2

Tabla 1. Comparación de variables de producción en camarones de diferente origen y en relación al número de desoves.....	133
Tabla 2. Comparación de la composición bioquímica de huevos y nauplios provenientes de camarones de diferente origen y en relación al número de desoves.....	134
Tabla 2. Comparación de la composición bioquímica de postlarvas de camarones de diferente origen.....	135

Capítulo VI

Tabla 1. Porcentaje de hembras ablacionadas e intactas que sin desoves, con uno, dos, etc. desoves durante un ciclo de producción.....	142
Tabla 2. Producción mensual y variables morfométricas de hembras ablacionadas e intactas en relación al número de desoves por hembra.....	143
Tabla 3. Variables bioquímicas de huevos provenientes de hembras ablacionadas e intactas en relación al número de desoves por hembra.....	144
Tabla 4. Variables bioquímicas de nauplios provenientes de hembras ablacionadas e intactas en relación al número de desoves por hembra.....	145
Tabla 5. Variables bioquímicas en hemolinfa y músculo de hembras ablacionadas e intactas en relación al estadio de maduración ovárica.....	146
Tabla 6. Variables bioquímicas en ovario de hembras ablacionadas e intactas en relación al estadio de maduración ovárica.....	147
Tabla 7. Variables bioquímicas en hepatopáncreas de hembras ablacionadas e intactas en relación al estadio de maduración ovárica.....	148
Tabla 8. Comparación de la histología de la gónada en hembras ablacionadas e intactas en función del estadio de maduración ovárica.....	149

Discusión General

Tabla 1. Proporción (%) de hembras silvestres (W) y domesticadas (P) que se encuentran en el primer desove, segundo, o más allá del decimo en relación a las semanas transcurridas después de la ablación.....	168
--	-----

Anexo metodológico

Tabla 1. Relación entre el estadio morfocromático evaluado por personal de APSA versus el diámetro máximo, diámetro medio e índice gonadosomático en hembras silvestres y domesticadas	188
Tabla 2. Relación entre el estadio morfocromático evaluado sin el exosqueleto versus el diámetro máximo, diámetro medio e índice gonadosomático en hembras silvestres y domesticadas	190
Tabla 3. Relación entre el estadio histológico basado en el descrito por Tan-Fermin y Pudadera (1989) versus el diámetro máximo, diámetro medio e índice gonadosomático en hembras silvestres y domesticadas	191

RESUMEN

El agotamiento reproductivo del camarón es un fenómeno común en los laboratorios de producción de nauplios. Se caracteriza por una disminución en el número de desoves a lo largo del tiempo y por lo tanto, en la producción de nauplios. Una vez alcanzado dicho agotamiento, los reproductores son desechados, lo cual representa cierta ineficiencia en términos productivos. Si bien el fenómeno de agotamiento se conoce a nivel de producción en términos cuantitativos, existe poca información sobre la condición fisiológica de los reproductores o de la progenie resultante. En la presente tesis se analizan algunas características, consecuencias y posibles causas del agotamiento reproductivo en el Camarón Blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*.

Para conocer algunas consecuencias del agotamiento reproductivo, se evaluó la condición fisiológica o "calidad" de la progenie en función del tiempo que permanecían los reproductores en condiciones de producción después de la ablación unilateral del tallo ocular. Mientras mayor fue el tiempo en producción de los reproductores, los desoves resultantes presentaron mayor fecundidad pero menor porcentaje de fertilización. Algunos indicadores bioquímicos de la condición fisiológica de la progenie también se vieron afectados por el tiempo de producción en piscina. Este fue el caso para los niveles de acilglicéridos y glucosa en huevos así como para los niveles de glucosa en nauplios cuyos valores decrecieron a mayor tiempo en producción de los reproductores. Dicha influencia del tiempo en producción también se vio reflejado en menor longitud de nauplios, lo cual indicaría un menor grado de desarrollo. Para poder realizar la comparación de nauplios en diferente grado de desarrollo, se propuso un índice de condición de nauplios calculado a partir de los niveles de acilglicéridos, la longitud del nauplio y la proporción de nauplios viables por desove. Dicho índice presentó una relación inversa con el tiempo que llevaban los reproductores en producción: a mayor tiempo en piscina la condición del nauplio resultante fue menor.

De los resultados de este primer estudio surgían dos interrogantes adicionales:

i) ¿Los efectos observados a nivel de huevo y nauplio implican consecuencias en el desarrollo larvario posterior? Para analizar esta posibilidad sobre la condición o calidad larvaria posterior al estadio de nauplio se hizo un estudio con seguimiento del desarrollo larvario hasta postlarva de 15 días de edad. Se corroboró la influencia del tiempo en piscina sobre la fecundidad, el porcentaje de fertilización y algunos componentes bioquímicos a nivel de huevos y nauplios. Además se observó que los niveles de carotenoides fueron afectados dado que se obtuvieron menores niveles tanto en huevos como en nauplios mientras mayor fue el tiempo en piscina. Por otro lado, se observó que el agotamiento reproductivo en términos de tiempo en piscina de los reproductores tiene consecuencias negativas sobre la calidad de la postlarva resultante: las larvas provenientes de hembras con menos tiempo en producción tuvieron mayor supervivencia durante el cultivo larvario y presentaron mayor resistencia a una prueba de estrés de salinidad aplicada en postlarvas de 15 días de edad. Estos resultados sugieren que el agotamiento reproductivo podría estar asociado a insuficientes reservas bioquímicas en el reproductor o a una transferencia ineficiente al huevo que, a su vez, afectan la viabilidad de la larva. La relación entre reservas energéticas y componentes bioquímicos con funciones específicas del huevo y la subsecuente supervivencia larvaria fue analizada de manera más específica a nivel de composición lipídica de los huevos en relación a la supervivencia al estadio de zoea III. Los niveles de triglicéridos, carotenoides y

ácido linoléico (18:2n-6) fueron mayores en los huevos de desoves que presentaron mayor supervivencia a zoea. Estos resultados pueden ser importantes para considerar este tipo de componentes como posibles indicadores predictivos de supervivencia larvaria.

ii) ¿El efecto del tiempo de producción en piscina se debe a que los reproductores llevan un número cada vez mayor de desoves acumulados? Para esto se analizaron variables de producción en relación al número de desoves que había presentado el reproductor, referido como orden de desove. La calidad de los desoves (fertilización, eclosión, desoves viables, número de nauplios) no disminuyó significativamente en desoves consecutivos, lo cual sugiere la posibilidad de seleccionar y usar en producción solamente hembras que presenten la capacidad de tener desoves múltiples. Lo anterior se hizo de manera comparativa entre reproductores silvestres y domesticados dada la importancia que están cobrando estos últimos de manera reciente. Dado que el desempeño reproductivo de organismos domesticados fue comparable al de organismos silvestres, el uso de reproductores crecidos en granja se encuentra justificado por su mayor disponibilidad y posibilidad de realizar programas de selección genética.

La condición fisiológica de los reproductores fue evaluada, en primer lugar, en términos de características tisulares del ovario en relación al número de desoves que presentaron las hembras en determinado tiempo. No hubo relación entre el orden de desove y la frecuencia de ovocitos de un determinado estadio de maduración, lo cual indica que no se ve afectada la capacidad de remaduración. Sin embargo, la ocurrencia de atresias estuvieron negativamente correlacionadas con el número de desoves de cada hembra, mientras que los folículos postovulatorios y el índice gonadosomático presentaron una correlación positiva con el número de desoves. Por otro lado, los valores del índice gonadosomático, de la frecuencia y de los diámetros de los ovocitos fueron similares entre hembras silvestres y domesticadas indicando un proceso de maduración normal en estos últimos lo cual concuerda con su desempeño reproductivo aceptable.

La condición fisiológica de los reproductores en relación al orden de desove también fue evaluado a partir de la composición bioquímica del ovario, el hepatopáncreas y la hemolinfa. Se observó que las hembras con desoves múltiples presentaron mayores niveles de proteínas totales en el ovario y de acilglicéridos, proteínas y carbohidratos totales en el hepatopáncreas. Los niveles de lípidos del ovario se incrementaron en relación al estadio de maduración, pero no se encontró una relación con el orden de desove. Estos resultados permiten inferir que la capacidad de presentar desoves múltiples podría estar relacionada con el metabolismo de los compuestos lipídicos acumulados en el hepatopáncreas, que a su vez dependen del tamaño y origen (silvestre o domesticado) del reproductor.

La falta de relación entre la calidad de la progenie, la composición bioquímica y las características tisulares en relación al orden de desoves se encuentra apoyada por una composición bioquímica similar entre huevos y nauplios provenientes de reproductores con diferente número de desoves. El porcentaje de fertilización o la condición de la progenie evaluada a partir de indicadores bioquímicos no se vieron afectados por el orden de desove del reproductor. Estos resultados indican que el agotamiento reproductivo observado en términos de tiempo de producción en piscina no parece deberse a un desgaste individual del reproductor producido por desoves consecutivos.

Dado que en esta tesis se observó una influencia notoria del tiempo transcurrido después de la ablación del tallo ocular, era necesario evaluar si no hay un efecto de la propia ablación. Lo anterior no sólo tiene

implicaciones desde el punto de vista de las posibles causas del agotamiento reproductivo, sino que, a pesar de que la ablación del tallo ocular sea un procedimiento muy empleado a nivel de producción, las posibles consecuencias negativas son aún motivo de gran controversia. Se analizó el efecto a largo plazo de la ablación del tallo ocular sobre las características tisulares del ovario y la composición bioquímica en distintos tejidos. Las hembras ablacionadas presentaron mayor frecuencia de desoves y un mayor índice gonadosomático, pero menor ganancia de peso corporal, menores niveles de hemocianina en la hemolinfa y mayores niveles de carotenoides en el hepatopáncreas, en comparación con hembras intactas. No se observaron diferencias entre la calidad de la progenie obtenida a partir de reproductores intactos o ablacionados dado que se obtuvieron valores similares de composición bioquímica de huevos y nauplios, porcentaje de fertilización y eclosión y supervivencia a postlarva.

En conclusión, el tiempo que permanecen en producción los reproductores deteriora la calidad de la progenie. Sin embargo, varios estudios de la presente tesis en su conjunto indican que el orden de desove, es decir el número de desoves previos que ha presentado una hembra no parece afectar su condición fisiológica ni la calidad de la progenie resultante. Este último aspecto sólo fue analizado hasta el estadio de nauplio, por lo cual es necesario evaluar que ocurre a nivel de producto final (postlarva) para apoyar la estrategia de seleccionar reproductores con capacidad de múltiples desoves. En términos productivos, las hembras con la capacidad de presentar desoves múltiples pueden ser usadas para producción, pero es importante señalar que se requiere más información, por ejemplo, de indicadores metabólicos predictivos de esta capacidad, así como el establecer si los desoves de estas hembras no presentan una disminución de la calidad a lo largo del tiempo.

ABSTRACT

Shrimp reproductive exhaustion is a widely observed phenomenon in commercial hatcheries. The reproductive exhaustion is characterized by a diminished spawning frequency and nauplii production, and when this occurs the shrimp are usually discarded. Although the reproductive exhaustion is a well-known phenomenon in hatcheries, there are few scientific bases that have been associated with its causes. In the present thesis, some physiological bases for the reproductive exhaustion are advanced for the Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*.

The first approach used was the evaluation of the influence of the long-term effect of ablation of broodstock on the physiological condition or "quality" of the spawn. As the days after ablation passed, the spawns produced were bigger (fecundity) but the fertilization rate was lower. The reproductive exhaustion of spawners was also reflected in the energy reserves of the eggs and nauplii produced. The more recently ablated broodstock produced eggs with higher levels of acylglycerides and glucose. The nauplii of the recently ablated broodstock had higher levels of glucose and were larger, which could indicate a higher development rate. To compare nauplii with a different developing stage, a nauplii condition index was calculated using nauplii acylglycerides levels, percentage of viable nauplii, and nauplii length. A decline in this condition index was observed in spawns from females with increased days after ablation.

From these results, two questions arose:

i) Could the effects observed in eggs and nauplii as a consequence of a reproductive exhaustion of the broodstock affect the subsequent larval survival? This possibility was evaluated measuring the survival from nauplii to 15-day-old postlarvae (PL15). Once more the effect of time in production on the fecundity, fertilization rate, and biochemical composition of eggs and nauplii was observed. In addition, the levels of carotenoids in eggs and nauplii were significantly lower in spawns from broodstock with more days in production after ablation. Overall larval performance during culture and survival was considerably higher in spawns from recently ablated females and decreased in spawns sampled more days after ablation. At PL15, a test for larval resistance to a salinity stress was made that showed a decreased PL condition positively associated to reproductive exhaustion of spawners. The relation between lipid composition in eggs and larval survival till the zoea stage was analyzed, and the levels of triacylglycerides, carotenoids, and linoleic acid (18:2n-6) were higher in eggs that produced larvae with a higher survival rate. These results can be used as possible predictive indicators of larval survival. These studies demonstrated that reproductive exhaustion of shrimp spawners becomes evident and is reflected in the quality of the larvae produced as time in production increases in both wild and pond-reared shrimp.

ii) As a second approach, the possibility that time in production after ablation could be associated with number of spawns was evaluated. The spawn quality was evaluated in relation to the number of spawns each female had (spawning order). The fertilization rate and the biochemical composition was not significantly affected by the spawning order of the broodstock. These results suggest reproductive exhaustion is not a direct consequence of the number of spawns a shrimp has.

Reproductive exhaustion could be the result of insufficient biochemical reserves in spawners, which in turn, could affect the larval quality. The quality of the spawns (fertilization, hatching, viable spawns, number

of nauplii) did not decrease significantly. A comparison between pond-reared and wild broodstock was made for spawning frequency and several variables associated with reproductive performance. Pond-reared shrimp had a performance similar to that of wild broodstock.

The effect of the number of spawns a female has in relation to the ovarian maturation was evaluated next. No relation was found between spawning order and the frequency of oocytes in several stages of maturation. Occurrence of atresia was negatively correlated to the number of spawns of each female, whereas gonadosomatic index and postovulatory follicles had a positive correlation with the number of spawns. Successive spawnings did not seem to produce substantial alterations in the rematuration capacities of individual spawners. Although wild shrimp were bigger than pond-reared, no differences were detected in gonadosomatic indexes, either considered as a group or within stages of maturation. Pond-reared broodstock appeared to have a normal maturation compared to wild shrimp under our conditions.

The effect of the number of spawns on several biochemical components of ovary, hepatopancreas, and hemolymph was also investigated. Females with multiple spawns had increased levels of protein in the ovary, and increased levels of acylglycerides, total protein, and carbohydrates in the hepatopancreas. The biochemical composition of the ovary only reflected the typical nutrient accumulation associated with maturation, but no relation was found with multiple spawning capacities of shrimp. The capacity to have multiple spawns could be related to metabolism of energetic lipids that are accumulated in the hepatopancreas, which in turns depends on spawner size and origin.

Because there was a significant difference of time after eyestalk ablation, a comparison of intact and females with unilateral eyestalk ablation was done. This was important both to evaluate if there was a relation of reproductive exhaustion to ablation, and because ablation is widely used in hatcheries, though its effect is still controversial. The influence of the long-term effect of ablation of broodstock on the physiological condition of broodstock was evaluated. Ablated females had more frequent spawns and a higher gonadosomatic index, but a lower weight gain than unablated controls. Ablated females had lower levels of hemocyanin in hemolymph and of glucose in hepatopancreas, but higher levels of total carotenoids in hepatopancreas. No differences in the biochemical composition of nauplii and in the larval survival during culture to postlarvae 1 were found between ablated and unablated females.

The present study indicates that selection of females with multiple spawning capabilities can be an important commercial strategy to improve nauplii production over the short term. However, more research is needed to address the possibility of specific metabolic indicators of a multiple-spawning capacity without a decline in spawn quality. It is necessary to define whether the capability to have multiple spawns is an inherited characteristic and has sufficient genetic variability so that it can be selected in an improvement program.

INTRODUCCIÓN

México ocupa el segundo lugar en el cultivo de camarón en el continente Americano (WSF, 1998). No obstante, la producción de camarón en México aún no satisface la demanda nacional por lo que tiene un alto potencial de crecimiento (Born et al., 1994). En la tabla 1 se observa que mientras la pesca de camarón ha permanecido relativamente constante, se ha incrementado la producción de camarón por acuicultura en los últimos diez años. Para poder incrementar la producción de camarón cultivado, es necesario resolver una serie de problemas asociados a la reproducción, a las enfermedades, a la obtención de "semilla" o postlarva de buena calidad, a las condiciones climáticas extremas y a los problemas burocráticos (Weidner y Rosenberry, 1992).

Tabla 1. Tendencia anual en la producción de camarón.

Producción (t)		1985 ¹	1989 ²	1993 ¹	1995 ¹	1996 ¹	1997 ¹
Mundo	total	2,000,000 ⁴	4,502,457 ⁴	2,826,000	2,902,000	2,773,000	3,010,000
	cultivado	200,000	611,869	609,000	712,000	693,000	660,200
	porcentaje	10.0	13.6	21.5	24.5	25.0	28.1
México	total	78,000	60,000 ³	71,000	60,000	67,000	70,000
	cultivado	35 ⁵	3,200 ^{3,5}	9,000	12,000	17,000	16,000
	porcentaje	0.3	5.3	12.7	20.0	17.9	22.6

¹WSF, 1997; ²WSF, 1996; ³WSF, 1995; ⁴Born et al., 1994; ⁵Weidner y Rosenberry, 1992; ⁶FAO, 1991; ⁷FAO-Aquila II, 1993.

El cultivo de camarón desde postlarva (PL) hasta adulto se realiza en granjas de engorda, de las cuales actualmente se encuentran registradas más de 200 en México. El abastecimiento de PL depende de camarones silvestres, y se realiza ya sea por captura directa de PL silvestres, o por captura de organismos adultos y posterior maduración y desove en laboratorios de producción. En México, actualmente se cuenta con más de 20 laboratorios de producción, donde además de realizar la maduración, se cultivan las larvas recién eclosionadas (nauplios) hasta postlarvas. El precio de la postlarva varía si ésta es silvestre o fue cultivada desde nauplio; en 1997 la silvestre se vendió a \$6.50 dólares por millar, mientras que la cultivada osciló entre \$2.10 y \$5.00 dólares por millar (WSF, 1997).

La captura de larvas silvestres, además de los problemas económicos y ambientales que representa, se encuentra sujeta a la disponibilidad, que varía en función de las condiciones ambientales (i.e. temperatura, precipitación pluvial, etc.). En general, en el Noroeste del país, la disponibilidad de PL silvestre es anual (Sáenz y Magallón, 1989), por lo que la siembra en estanques de engorda en forma continua (2 ó 3 ciclos) depende de la PL cultivada en los laboratorios de producción.

La producción de PL cultivada, que implica la reproducción de camarones en cautiverio, se puede realizar de tres maneras: 1) Capturar hembras silvestres apareadas (i.e. con el espermatóforo adherido); 2) Capturar hembras silvestres adultas y realizar la maduración, la cópula y el desove en el laboratorio; 3) Maduración de organismos cultivados en estanques. Si bien se requiere incrementar la producción de PL en cautiverio, es necesario enfocarse también a optimizar su calidad. De esta manera puede competir satisfactoriamente con la PL silvestres aún cuando esta última se encuentre en abundancia. Como ejemplo se puede citar el fenómeno

climático “El Niño” de 1997, donde se incrementó la producción de postlarvas silvestres, afectando el precio de PL cultivada en América.

A nivel mundial el principal problema al cual se enfrentan los laboratorios de producción es la disponibilidad de hembras maduras que generen larvas de calidad. En América Latina, el 80% de los laboratorios de producción dependen de reproductores silvestres para la obtención de nauplios (Wilkenfeld, 1992; Fegan, 1992). En algunos países, los precios de reproductores silvestres se pueden incrementar significativamente (\$50 dólares en 1996 por hembra madura de *P. vannamei* en Ecuador). Además, los costos son incrementados debido a la mortalidad durante el transporte y a las enfermedades portadas por camarones silvestres, las cuales generalmente se acentúan debido a la alta densidad en los tanques de maduración. También existen otros problemas no biológicos. En 1974 fue impuesta una veda para la pesca de camarón en el Pacífico, y en 1993 en el Golfo de México. Con estas regulaciones se busca no sobrepasar el nivel sustentable de captura y disminuir el impacto sobre otras especies silvestres afectadas por la pesca. Debido al impacto que tiene la pesca de camarón sobre la población de tortugas, en mayo de 1996, los Estados Unidos de América, el principal importador de camarón en este continente, impuso un embargo camaronero a 40 países de los cuales, a 36 se les permitió la exportación al adoptar el uso de excluidores de tortugas (México, Nicaragua, Venezuela y Costa Rica, etc.), o por pescar en aguas frías donde no habitan estos quelonios (Argentina, Canadá, Chile, etc.) (INP, 1996).

Parte de los problemas arriba mencionados serían solucionados si se usan como reproductores a organismos cultivados en granjas, pero esto no ha sido logrado de manera sistemática. De más de 100 especies de Peneidos con valor comercial que existen, aproximadamente la tercera parte ha sido cultivada en estanques de engorda, pero se ha cerrado el ciclo para menos de diez especies (Aquacop, 1979; Brown et al., 1984; Ramos et al., 1994). El cierre del ciclo y uso de camarones domesticados ha permitido la introducción de líneas que se comercializan como “libre de patógenos” en el caso de *P. vannamei*, o de “super shrimp”, en el caso de *P. stylirostris* (WSF, 1997; 1998).

En la mayoría de las especies, la maduración de hembras ya sean silvestres o cultivadas se logra por medio de la ablación del tallo ocular. Este procedimiento se basa en eliminar la hormona inhibidora de la gónada, localizada en el tallo ocular lo cual se traduce en una estimulación de la maduración y en un incremento en la frecuencia de desoves (Primavera, 1984; Bray y Lawrence, 1992). Sin embargo, después de 6 a 8 semanas de la ablación se observa un decremento en la fertilidad, la tasa de eclosión y la supervivencia de los nauplios (Simon, 1982). Este decremento en la producción se ha denominado agotamiento reproductivo. De manera general, en los laboratorios de producción el decaimiento progresivo en estos valores de producción resulta en el descarte de los reproductores después de un período variable, el cual depende de la especie y las condiciones de maduración, y varía de dos a ocho meses. Debido a los costos de los reproductores, así como a los problemas biológicos y regulatorios arriba mencionados, es necesario evaluar la posibilidad de retardar el agotamiento en sí o de optimizar el desempeño reproductivo antes de que ocurra agotamiento. Mientras que el agotamiento reproductivo es reconocido por los camaronicultores, las causas que inducen al mismo no han sido establecidas. En la presente tesis se intentaron establecer algunas de las causas y problemas asociados al agotamiento, tanto en organismos silvestres como cultivados y también en relación a la ablación. Ésto se realizó en los camarones de especie *P. vannamei* o camarón blanco del Pacífico, que es la especie más cultivada en el continente Americano.

ANTECEDENTES

CICLO REPRODUCTIVO.

1. Maduración ovárica.

La reproducción de camarones en cautiverio fue lograda por primera vez en 1934, cuando Fujinaga logró desovar en cautiverio hembras maduras de *Penaeus japonicus* y llevar a cabo el posterior desarrollo larvario hasta juveniles (Weidner y Rosenberry, 1992). Desde entonces, la reproducción de crustáceos, específicamente el desarrollo gonádico con la caracterización de los diferentes estadios de maduración (Tabla 2), ha sido ampliamente estudiado (Gehring, 1974; Primavera, 1985; Yano, 1988; Harrison, 1990; Van Herp, 1992). No obstante, la estimulación de la maduración en cautiverio de hembras de Peneidos sigue siendo uno de los principales problemas en los laboratorios de producción. El poco éxito obtenido ha sido atribuido a diferencias de las condiciones de laboratorio con respecto a las del medio silvestre, tales como variaciones en el ciclo circadiano, temperatura y alimentación (Crococ y Kerr, 1986).

Tabla 2. Estadios de maduración gonádica en Peneidos

Morfológico	Histológico (vitelogénesis) ¹	Morfocromático ^{1,2}	Proceso y tipo de células
Inmaduro	previtelogénico (estadio P)	estadio 0	ovogénesis (ovogonias) y previtelogénesis
Maduración temprana	vitelogénico temprano (estadio V)	estadio I	vitelogénesis temprana o endógena
Maduración tardía	vitelogénico tardío (estadio V)	estadio II	vitelogénesis tardía o exógena
Maduro	cortical (estadio C)	estadio III y IV	ovocitos con criptas corticales
Desovado	"spent" (estadio S)	estadio V	postdesove parcial (= estadio I) o total (= estadio 0), folículos postovulatorios

¹ Tan-Fermin y Pudadera, 1989; ² Bray y Lawrence, 1992

La forma más común y exitosa de lograr la maduración gonádica de Peneidos en cautiverio es por medio de la ablación o corte de uno de los tallos oculares de las hembras (i.e. ablación unilateral), práctica efectuada desde principios de la década de los 1970 (Caillouet, 1972). La ablación bilateral o de los dos tallos oculares fue desechada debido a la alta mortalidad que se registraba después de este procedimiento (Lawrence et al., 1980). Existen diferentes técnicas para realizar la ablación, que en general, se pueden agrupar en dos (Primavera, 1985; Makinouchi y Honculada-Primavera, 1987; Bray y Lawrence, 1992); 1) la eliminación total del tallo ocular (i.e. corte manual o con tijeras, cauterización o amarre); o 2) la eliminación parcial del ojo (i.e. incisión y extrusión, conocida como enucleación). En las hembras ablacionadas, se ha reportado que la maduración gonádica puede ocurrir entre los tres días después y los dos meses, dependiendo de la edad de la

hembra, el estadio de muda y la estación del año (Aquacop, 1983; Primavera, 1985). En los machos, las primeras pruebas de ablación se realizaron a principios de los 1980 por Chamberlain y Lawrence (1981), quienes observaron una maduración gonádica acelerada cuando ablacionaban. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la fertilización disminuía cuando se utilizaban machos ablacionados (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985). A la fecha, el uso de esta técnica en machos genera controversias (Gomes y Honculada-Primavera, 1993), mientras que la ablación en las hembras es ampliamente utilizada.

2. Vitelogénesis

A lo largo de la maduración ovárica, los ovocitos acumulan progresivamente lípidos y otros compuestos bioquímicos, proceso denominado vitelogénesis (Spaargaren y Haefner, 1994). La vitelogénesis se puede dividir en vitelogénesis endógena y vitelogénesis exógena. En la vitelogénesis endógena, los compuestos bioquímicos se sintetizan en los ovocitos. En la vitelogénesis exógena, los lípidos y otros compuestos bioquímicos provienen principalmente del hepatopáncreas y son transferidos a las gónadas por medio de una lipoproteína de alta densidad llamada vitelogenina. (Spaziani et al., 1986; Tom et al., 1987; Spaziani, 1988; Jugan y Van Herp, 1989; Quackenbush, 1989; Browdy et al., 1990; Lee et al., 1991; Khayat et al., 1994). La vitelogenina de crustáceos es una proteína de alto peso molecular (más de 300 kDa) asociada con grupos prostéticos lipídicos (35%), glucídicos (5%) y carotenoides (Bradfield et al., 1989; Chen y Chen, 1993). Los carotenoides son los responsables del color brillante de la gónada durante la vitelogénesis, lo cual permite la identificación de las hembras maduras, y es probable que realicen una función de protección de oxidación por luz (Meusy y Payen, 1988).

La vitelogenina proveniente de la vitelogénesis exógena es captada por endocitosis en los ovocitos. Existe controversia acerca del lugar de síntesis de esta vitelogenina; hasta la fecha se ha reportado transferencia de la vitelogenina desde células de reserva en el hepatopáncreas hacia el ovario (Kulkarni y Nagabhushanam, 1979; Teshima et al., 1988; Teshima et al., 1989; Quackenbush, 1989; Millamena y Pascual, 1990; Haefner y Spaargaren, 1993; García et al., 1995; Lubzens et al., 1995), síntesis de vitelogenina en el ovario a partir de lípidos provenientes de la dieta (Clarke, 1982; Galois, 1984; Fainzilber et al., 1992; Shenker et al., 1993; Lee y Walker, 1995; Vapopoulou y Steel, 1995), acumulación de lípidos y síntesis de vitelogenina en el tejido subepidermal (Vázquez-Boucard et al., 1986; Tom et al., 1987; Fainzilber et al., 1989; Vapopoulou y Steel, 1995). Además, se han reportado diferencias entre las especies de Peneidos de tético abierto o cerrado en cuanto a los niveles de lípidos del hepatopáncreas en relación al ciclo gonádico, sugiriendo que puede haber variaciones en el lugar de síntesis o transporte (Castille y Lawrence, 1989; Browdy et al., 1990). En general, el sitio de síntesis varía con la especie y no hay un patrón general para Decápodos.

3. Cópula

La cópula en *P. vannamei* tiene lugar en la intermuda, y consiste en los siguientes pasos: acercamiento, arrastre, persecución y cópula ventral (Yano et al., 1988a). La "persecución" durante la cópula consiste en la transferencia de los espermatozoides del macho hacia el tético de la hembra, donde se adhieren con una frecuencia de éxito de aproximadamente 20% para *P. vannamei* (Yano et al., 1988a). La persecución es probablemente estimulada por una o más feromonas liberadas por la hembra (Primavera, 1985; Yano et al.,

1988a; Meusy y Payen, 1988). La transferencia de los espermatozoides también se puede realizar de forma artificial, aunque la extracción de la ampulla del espermatozoides puede ser problemática y la adhesión al tégico puede ocasionar estrés a la hembra. Entre las técnicas descritas para extraer el espermatozoides se encuentra la presión manual del quinto par de pereopodos, la introducción de pinzas por los orificios genitales o el uso de descargas eléctricas (Primavera, 1985). La cópula culmina con la transferencia del espermatozoides (que contiene el esperma) del macho a la hembra (Lindsay y Clark, 1994). Los camarones de tégico abierto, como *P. vannamei*, realizan la copulación cuando la maduración gonádica se encuentra avanzada y las hembras están listas para desovar, al contrario de las especies de tégico cerrado donde la hembra está inmadura y en proceso de muda cuando se lleva a cabo la cópula.

4. Desove y fertilización

Si el fotoperíodo no es invertido en condiciones de laboratorio, las hembras desovan al anochecer. El número de huevos por desove se encuentra en función de la temperatura, la especie, el tamaño y el número previo de desoves, y varía entre 50,000 y 1,000,000 por desove. En los Peneidos de tégico cerrado, el esperma es activado por una “capacitación” que ocurre cuando el espermatozoides se encuentra pegado al tégico de la hembra; el esperma no presenta actividad acrosómica si antes no es capacitado. Aparentemente, en los Peneidos de tégico abierto no se requiere capacitación del esperma (Clark et al., 1994), lo cual implica que se puede realizar fertilización *in vitro*.

Los Peneidos tienen un sistema de activación del ovocito diferente al de otros organismos, debido a que los espermatozoides no son móviles y los ovocitos se activan al contacto con el agua independientemente de la presencia de esperma (Clark et al., 1994). El proceso de fertilización ha sido descrito para Peneidos de tégico cerrado por Clark y su grupo (ver Lynn et al., 1991; Clark y Griffin, 1993; Lindsay y Clark, 1994; Clark et al., 1994). Durante el proceso de fertilización, los espermatozoides presentes en el espermatozoides son puestos en contacto con el óvulo por el movimiento de las pereopodos de las hembras. La activación del ovocito empieza cuando este se expone al agua marina, en donde hay presencia de iones de Mg^{++} induce la liberación de Ca^{++} a partir de reservas intracelulares, lo cual produce una exocitosis del contenido de los bastones corticales, formando un aura gelatinosa. Únicamente el esperma que se encuentra en contacto con el contenido del aura gelatinosa presenta reacción acrosómica. Otras funciones que el grupo de Clark ha propuesto para el aura gelatinosa es la de agente bacteriostático y como una protección mecánica y bioquímica. Durante la activación del ovocito (cuyo proceso reduccional se encuentra detenido en meiosis I - metafase), además de la formación del aura gelatinosa ocurre la dispersión de la capa externa del ovocito (denominada membrana vitelina) en una capa fibrosa, y la terminación de la meiosis. Los espermatozoides se adhieren a la superficie de la membrana vitelina y pasan por una reacción acrosómica para poder penetrar el ovocito, lo cual ocurre aproximadamente 30-45 min después del desove. La adhesión del espermatozoides al ovocito se lleva a cabo por una púa (“spike”), la cual forma parte del sistema involucrado en la reacción acrosómica. Una vez que el espermatozoides penetra el ovocito, éste libera gránulos de glicoproteínas por exocitosis, formando lo que se conoce como doble membrana y que impide la entrada a otros espermatozoides. No obstante, la formación de la doble membrana (también conocida como membrana de fertilización o de eclosión) puede ocurrir aún en ausencia de esperma pero en presencia de Ca^{++} . Por lo tanto, para determinar si la fertilización fue exitosa, no

es suficiente con observar la presencia de doble membrana, sino que se debe de evaluar la simetría de la primera división mitótica; en ausencia de esperma, la primera división mitótica no es simétrica y no ocurren divisiones posteriores.

5. Estadios larvarios y cultivo

Los nauplios, que representan el primer estadio de desarrollo larvario, eclosionan a partir de los huevos 14-16 horas después de la fertilización. Los nauplios nadan intermitentemente, son atraídos a la luz (fototropismo positivo) y presentan cinco mudas o subestadios (aproximadamente cada siete horas). Durante su desarrollo, los nauplios se alimentan del saco vitelino hasta que presentan la metamorfosis para producir el primer estadio de zoea, lo cual ocurre aproximadamente a las 36 horas de haber eclosionado. Las zoeas nadan en forma continua y se alimentan de microalgas. La frecuencia de muda varía en función de las condiciones de cultivo; en condiciones óptimas mudan tres veces en aproximadamente cinco días, después de lo cual ocurre una metamorfosis para producir el primer estadio de mysis. Las mysis son el último estadio de desarrollo larvario y se alimentan de microalgas y zooplancton. Presentan tres mudas o subestadios y un fototropismo negativo. Después de alrededor de 72 horas, las mysis pasan al estadio de desarrollo de postlarvas, las cuales se alimentan de zooplancton y detritus. Las postlarvas se clasifican comúnmente en función de los días transcurridos desde la metamorfosis. Las postlarvas migran de altamar hacia zonas estuarinas, donde continúa su desarrollo hasta adulto. En el cultivo de camarón, las postlarvas son sembradas directamente en estanques de producción o con un paso intermedio, en tanques especializados de maternización (Treece y Fox, 1993).

Debido a que los nauplios no pueden aprovechar alimento exógeno, la acumulación de nutrientes en el saco vitelino se considera de suma importancia. Se ha propuesto que la eclosión del nauplio y su supervivencia se encuentran en función de la acumulación de nutrientes en el saco vitelino. A su vez, la acumulación de nutrientes se ha correlacionado con diferentes variables morfométricas y bioquímicas del huevo, tales como el diámetro (Clarke et al., 1990), los niveles de acilglicéridos (i.e condición fisiológica) (Fraser, 1989; Clarke et al., 1990; Ouellet et al., 1992; Lovrich y Ouellet, 1994; Wickins et al., 1995), la cantidad y calidad de ácidos grasos (Mourente et al., 1991; Navarro et al., 1993; Mourente et al., 1995; Wickins et al., 1995), la concentración de lipoproteínas (Lee et al., 1991), la proporción lípido/proteína (Chu y Ovseanico-Koulikowsky, 1994), la concentración de carotenoides (Petit et al., 1991; Sagi et al., 1995a; Mantiri et al., 1996) y los niveles de diferentes hormonas (i.e. ecdisteroides) (Wilder et al., 1995). La metamorfosis de nauplio a zoea involucra un gasto de energía considerable, debido a lo cual en este paso existen altos índices de mortalidad (Lovrich y Ouellet, 1994; Wickins et al., 1995). En estadios posteriores al de nauplio, las larvas son capaces de aprovechar nutrientes exógenos. Sin embargo, se ha reportado una disminución de lípidos a lo largo de su desarrollo hasta postlarva, que podría estar relacionada con el cambio de dieta o con el tipo de reservas acumuladas (Cahu et al., 1988; Mourente et al., 1995).

ASPECTOS HORMONALES DE LA REPRODUCCIÓN

1. Estimulación de la maduración y papel del tallo ocular

El fundamento de la ablación del tallo ocular para inducir la maduración es eliminar el sistema neuroendocrino denominado Órgano X/glándula sinusal. Este sistema es considerado como el centro regulador neuroendocrino más importante en los crustáceos. El Órgano X consiste en somas, donde son sintetizados los péptidos o prohormonas que dan lugar a las hormonas (Fingerman, 1987; Meusy y Payen, 1988; Keller et al., 1995), mientras que la glándula sinusal es un órgano neurohémico que consiste en terminales axónicas provenientes del Órgano X. Las hormonas sintetizadas en el Órgano X se almacenan en la glándula sinusal y son liberadas por exocitosis en respuesta a la acción de moduladores tales como la serotonina (Mattson y Spaziani, 1985; Richardson et al., 1991; Kulkarni y Fingerman, 1992; Fingerman et al., 1994; Sarojini et al., 1995). Entre las neurohormonas producidas por este complejo, se encuentra la hormona inhibidora de las gónadas (GIH), cuyos órganos blanco principales son el ovario o el testículo, y en los cuales una de sus acciones es la de inhibir la gametogénesis (Meusy y Payen, 1988) y vitelogénesis (Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Chang, 1993). La ablación unilateral del tallo ocular, al disminuir los niveles de GIH, permite una maduración acelerada y un incremento en la frecuencia de desoves. En condiciones naturales, es probable que el cambio de los factores ambientales durante la migración de los camarones a altamar resulta en una disminución en la secreción de esta hormona, y por ende, se estimule la maduración.

2. Otras hormonas del sistema Órgano X/glándula sinusal

La ablación del tallo ocular, además de estimular la maduración, también aumenta la frecuencia de la muda, disminuye la glicemia y aumenta la demanda de oxígeno. Esto se debe a que al ablacionar, además de eliminar la GIH, también se eliminan otras hormonas, entre las que se encuentran la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona hiperglucemiante de los crustáceos (CHH), la hormona neurodepresora (Aréchiga et al., 1985; Huberman, 1997), neurofactores reguladores de la concentración iónica (Mantel, 1985; Fingerman, 1987; Nan et al., 1993) y neurofactores reguladores de la migración de pigmentos (Fingerman, 1987). La eliminación de las hormonas arriba mencionadas es de alta relevancia, debido a que tienen un papel importante en el metabolismo. Un caso particularmente estudiado es la regulación de los ciclos de muda y de reproducción, que además de equilibrarse entre ellos dependen de factores ambientales. El ciclo de muda se encuentra estimulado cuando la reproducción está inhibida, es decir, las hormonas que controlan ambos ciclos (GIH y MIH) son antagónicas entre sí (Wilder et al., 1991; Browdy, 1992). Cuando se realiza la ablación, ocurre un desajuste hormonal y se promueve la muda o la maduración en función al estadio de muda en el cual se realiza la extirpación del tallo ocular (Gendrop-Fumes y Valenzuela-Espinoza, 1995). Cuando la ablación se realiza en estadio de premuda tardía o postmuda temprana existe mayor mortalidad (Aquacop, 1979; Browdy, 1992), debido posiblemente a un desgaste metabólico acelerado como consecuencia del aumento en la demanda energética tanto de la maduración como de la muda. Al respecto y como evidencia de la necesidad de combustibles, existen reportes de que en premuda o antes de la ecdisis aumentan significativamente los niveles de glucosa y proteínas en la hemolinfa (Telford, 1974; Chan et al., 1988; Mercado-Allen, 1991).

3. Hormonas de otros órganos involucradas en reproducción

Diversos sistemas hormonales que controlan una determinada función están íntimamente ligados entre sí, y la eliminación de uno de estos, como sucede con la ablación del tallo ocular, puede alterar significativamente la función de los restantes. Por ejemplo, aunque no se tengan bien comprendidas las relaciones entre las distintas hormonas, se ha observado en cangrejos que la ablación impide el desarrollo completo de los ovocitos, probablemente como consecuencia de la eliminación de alguna hormona estimuladora del tallo ocular (Anilkumar y Adiyodi, 1980; Quackenbush, 1992; Huberman, 1997). Adicionalmente a las complejas interacciones hormonales, puede existir daño al sistema nervioso durante la ablación (Chang y O'Connor, 1988). Con el fin de entender los mecanismos de acción de diferentes hormonas, éstas se ha intentado aislar para determinar su estructura y efectos *in vitro* e *in vivo* (Webster y Keller, 1986; Meusy et al., 1987; Aguilar et al., 1992; Laverdure et al., 1992; De Kleijn et al., 1992; Keller, 1992; De Kleijn y Van Herp, 1995). Entre las hormonas aisladas, por ejemplo, se ha descrito que la GIH inhibe la captación de vitelogenina por endocitosis en los ovocitos, así como la síntesis de vitelogenina en diferentes tejidos (i.e. ovocitos, hepatopáncreas, tejido adiposo) (Tom et al., 1987; Meusy y Payen, 1988; Quackenbush, 1989; Harrison, 1990).

Además de la GIH secretada por el tallo ocular, se sabe que existen otras hormonas y órganos implicados en el control hormonal de la maduración gonádica, así como en la captación, síntesis y transferencia de compuestos bioquímicos hacia el ovario, en la cópula y el desove, pero su mecanismo de acción e interacciones han sido menos estudiadas. Entre éstas se puede citar a una hormona estimuladora de la gónada (GSH). La GSH es secretada por el ganglio torácico y aparentemente actúa de manera antagónica a la GIH (Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Quackenbush, 1992). Por ejemplo, la implantación experimental de ganglio torácico de la langosta resulta en una mayor proporción de ovocitos en estadios avanzados de maduración en *P. vannamei* (Yano et al., 1988b) y en cangrejos ablacionados (Takanayagi et al., 1986). Como consecuencia, se ha sugerido que la GSH estimula la vitelogénesis (Meusy y Payen, 1988; Yano, 1992).

El órgano mandibular secreta hormonas de tipo terpenoidal como el farnesoato de metilo (FM). El FM parece tener un papel importante en el proceso reproductivo de decápodos (Homola et al., 1991; Laufer et al., 1993; Sagi et al., 1994). Se ha observado que ocurre un incremento en el diámetro de los ovocitos con la administración de éste terpenoide (Tsukimura y Kamemoto, 1991) o por implantación del órgano mandibular (Hinsch, 1980; Tsukimura y Kamemoto, 1991). Otra de las funciones del FM es la regulación del ciclo de muda (Chang, 1993) y en la conducta de apareamiento (Sagi et al., 1994). La secreción de FM por el órgano mandibular se encuentra regulada por la glándula sinusal, y se ha propuesto que se encuentra involucrada una hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) que podría ser equivalente a la CHH (Taggart et al., 1995; Liu et al., 1997).

El propio ovario (i.e. células foliculares del ovario) podría ser la fuente de una hormona esteroidea, denominada hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis (VSOH) (Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Meusy y Payen, 1988; Browdy, 1992). Es probable que la VSOH sea la responsable de la diferenciación sexual y de la gametogénesis (Meusy y Payen, 1988). El papel de los esteroides ha sido evidenciado por el efecto estimulante de la vitelogénesis cuando se administran estrógenos, así como por la inducción de la ovulación por administración de progesterona (Yano, 1985; Fairs et al., 1990; Ghosh y Ray, 1993a; Koskela et al., 1992;

Ghosh y Ray, 1993b; Qunitio et al., 1994; Summavielle et al., 1995, Mendoza et al., 1997).

El Órgano Y produce esteroides que en algunos crustáceos afecta la previtelogénesis o la formación de células foliculares, aunque el mecanismo aún no está claro (Suzuki, 1986; Meusy y Payen, 1988; Wilder et al., 1995). A su vez la secreción de ecdisteroides se encuentra regulada por la secreción de MIH, que inhibe la captación por endocitosis de colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad por el Órgano Y (Kang y Spaziani, 1995).

Recientemente se ha descrito un péptido denominado hormona estimuladora de la vitelogénesis que es secretado por el tallo ocular. Este péptido produce la incorporación de leucina en las proteínas del vitelo (Quackenbush, 1992), por lo que podría ser de gran utilidad para estimular la maduración (Huberman et al., 1995). Por otro lado, su acción parece ser estacional, ya que la implantación de extractos en hembras mostró que glándulas sinusales obtenidas en diferentes épocas del año, tienen diferente efecto sobre la maduración; los extractos provenientes de hembras ablacionadas en otoño promueven la maduración, mientras que los extractos obtenidos en primavera retardan la maduración, incluso en hembras no ablacionadas (Eastman-Reks y Fingerman, 1984).

Otra estrategia, además del aislamiento de hormonas o el implante de órganos, ha sido la de determinar la composición bioquímica del alimento que produce mejores resultados sobre la maduración, así como su influencia sobre los niveles hormonales. Por ejemplo, D'Croz et al. (1988) determinaron que la inducción del desove en hembras maduras por alimentación con poliquetos se debía a la alta concentración de prostaglandina en estos organismos, cuyo tienen un papel importante en la estimulación en ovocitos previtelogénicos (Sagi et al., 1995b; Mendoza et al., 1997). Las insuficiencias nutricionales por dietas inadecuadas cobra doble importancia dado que, además de compuestos de importancia estructural, la dieta puede contener hormonas o precursores de las mismas. Tal es el caso de la ecdisona secretada por el Órgano Y, que es sintetizada a partir del colesterol proveniente de la dieta (Lachaise et al., 1993).

ASPECTOS METABÓLICOS EN LA REPRODUCCIÓN

Los estudios enfocados a la nutrición generalmente consideran los requerimientos proteínicos o lipídicos de los reproductores en función de la composición de estos nutrientes en las gónadas de hembras maduras (Middledich et al., 1979; Harrison, 1990; Mohamed y Diwan, 1992; Millamena et al., 1993). De esta manera, se suministran con las dietas componentes que probablemente utilizan los organismos durante el proceso reproductivo.

Una de las dificultades a las cuales se han enfrentado los nutriólogos de crustáceos y que ha limitado el tener resultados concluyentes, es la variación interespecies: los efectos de las dietas sobre la maduración pueden variar en los diferentes crustáceos e, incluso, entre diferentes especies de Peneidos. Por ejemplo, se ha reportado que las mismas dietas administradas a *P. vannamei* y *P. stylirostris* producen efectos diferentes, con mejores resultados en el desove por hembra para *P. vannamei* con una dieta natural combinada, mientras que para *P. stylirostris* se han obtenido mejores resultados con una dieta artificial (Galgani et al., 1989). La proporción de proteínas y lípidos empleada en la dieta y, por ende el aporte nutricional respectivo, también varía con cada especie (Rosas et al., 1996).

1. Lípidos

1.1 Acilglicéridos

Se sabe que el almacenamiento de lípidos juega un papel crucial en la biología reproductiva del camarón dado que, a lo largo del ciclo de maduración, el ovario tiende a incrementar los niveles de estos mientras que en el hepatopáncreas disminuyen, lo cual sugiere una transferencia de lípidos de este órgano hacia la gónada (Castille y Lawrence, 1989; Millamena y Pascual, 1990). Estudios en organismos ablacionados han mostrado también estos cambios recíprocos de concentraciones de lípidos en los tejidos arriba mencionados (Teshima et al., 1988; Millamena et al., 1993). En forma general, en hembras ablacionadas, los niveles lipídicos son mayores tanto en hepatopáncreas como en ovario, en comparación con hembras intactas en el mismo estadio de desarrollo gonádico (Millamena y Pascual, 1990; Millamena et al., 1993). Esto concuerda con una maduración gonádica acelerada por la ablación. El adecuado suministro en la dieta de lípidos neutros como los acilglicéridos es indispensable para proveer de energía al organismo, ya sea que esta energía se canalice a reproducción o crecimiento. Las reservas en forma de acilglicéridos son indispensables para el desarrollo embrionario y el estadio de nauplio (Fraser, 1989; Wickins, et al., 1995).

1.2 Ácidos grasos

La composición de ácidos grasos en la gónada varía durante la maduración del camarón. En particular, se ha observado que aumenta la concentración de los ácidos araquidónico 20:4n-6, eicosapentaenoico 20:5n-3 y docosahexaenoico 22:6n-3 en gónadas maduras (Millamena y Pascual, 1990; Millamena et al., 1993). Estos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son importantes en ectotermos de medios salinos por aumentar la fluidez de la membrana celular y de los orgánulos. El ácido araquidónico, por otra parte, actúa como precursor de las prostaglandinas aparentemente involucradas en el desove. La administración de PUFA en la dieta es importante en los crustáceos marinos debido a que presentan una baja tasa de conversión y elongación de 18:3n-3 a 20:5n-3 y 22:6n-3 (Kanazawa, 1995). De hecho, se ha demostrado que las dietas altas en PUFAs promueven el desarrollo gonádico, la eclosión y la supervivencia de nauplios a zoea (Alava et al., 1993; Cahu et al., 1994; Xu et al., 1994; Cahu et al., 1995). Se sabe también que los poliquetos y los moluscos producen un buen rendimiento reproductivo al ser administrados en la dieta del camarón, por tener altos niveles de los PUFA mencionados (Middleditch et al., 1979; Primavera, 1985; Lytle y Lytle, 1990; Bray y Lawrence, 1992; Luis y Ponte, 1993; Xu et al., 1994). Sin embargo, no solamente es necesario suministrar los nutrientes adecuados, sino que también es necesario balancear estos en determinadas proporciones. En acuerdo a lo anterior, existen reportes de que la suplementación de PUFAs en proporciones inadecuadas (e.g. relación n-3/n-6 menor a 1.8) puede frenar el crecimiento en juveniles, debido a inhibiciones de la elongación de los ácidos grasos de las dos familias de forma recíproca (Fenucci et al., 1981; Romdhane et al., 1995). A nivel de reproducción también se ha sugerido una influencia importante de valores altos de la relación n-3/n-6 (Lytle et al., 1990). No obstante, las dietas con mayor rendimiento productivo no necesariamente tienen los valores más altos de esta relación (Luis y Ponte, 1993; Marsden et al., 1997). Independientemente de sus concentraciones relativas, la importancia de los PUFA se ha puesto de manifiesto por su impacto sobre la eclosión y supervivencia de los nauplios, aunque aparentemente no tenga efecto sobre la composición de lípidos en el ovario (Cahu et al., 1994; Cahu et al., 1995). Además de la calidad y cantidad de lípidos suministrados en la dieta, hay que tener en

cuenta los efectos de la ablación, debido a que se ha descrito que la eliminación del tallo ocular puede disminuir la actividad de la lipasa del tracto digestivo (Koshio et al., 1992). Es posible que en el caso de organismos ablacionados, la digestión de lípidos sea más efectiva si se realiza en parte por enzimas exógenas.

Se considera que el mayor éxito de supervivencia larvaria está en función de los niveles de PUFA, debido a la alta proporción de PUFA en larvas provenientes de hembras maduradas en condiciones silvestres, que en términos generales se consideran superiores (O'Leary y Matthews, 1990; Jiménez et al., 1995; Montaña y Navarro, 1996). No obstante, es posible que los PUFA sean indicativos de los parámetros fisicoquímicos prevalecientes en condiciones naturales, más que de la calidad de la larva. Se ha reportado que las algas, algunos crustáceos y los peces incrementa la proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga cuando la temperatura disminuye, promoviendo una mayor fluidez de las membranas celulares (Farkas, 1979; Castell, 1983; Wickins et al., 1995; Cuculescu et al., 1995; Montaña y Navarro, 1996). Asimismo, incrementos en la salinidad del agua incrementan la proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Mantel, 1985). En condiciones de laboratorio, con temperaturas superiores a los 25°C, difícilmente las altas concentraciones de PUFA serían las óptimas para lograr una fluidez adecuada de las membranas. Por ende, la inversión de los laboratorios de producción en la compra de quistes de *Artemia* con una alta proporción de PUFA podría ser un desperdicio (Navarro et al., 1993; Rees et al., 1994). Por el contrario, a altas temperaturas el colesterol podría ser importante para aumentar la rigidez de las membranas celulares.

1.3 Colesterol

El suministro de colesterol en la dieta es necesario debido a que los camarones no tienen la maquinaria enzimática para la síntesis de este esteroide (Teshima, 1982). Tanto el colesterol como los fosfolípidos están implicados en la estructura de membranas celulares, en el transporte de lípidos por medio de lipoproteínas y, en el caso del colesterol, como precursor de la vitamina D y de hormonas esteroideas, éstas últimas necesarias en el proceso reproductivo (Teshima, 1982; Cahu y Quazuguel, 1989). La eliminación de colesterol de la dieta o su inadecuada absorción (i.e. por falta de fosfolípidos), puede producir una disminución en el crecimiento (Chen y Jenn, 1991; Chen, 1993) o un incremento en la mortalidad en juveniles debido a la incapacidad para completar la ecdisis (Baum et al., 1990). El calamar es un alimento que por excelencia se administra al camarón como fuente de colesterol debido a que tiene la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar colesterol a partir de acetato (Teshima, 1982). De hecho, la administración de calamar a hembras de *P. vannamei* no ablacionadas puede inducir la síntesis de vitelogenina (Mendoza et al., 1997). Sin embargo, se ha comprobado que no solo la falta sino también el exceso de la administración de colesterol en la dieta puede inhibir el crecimiento e incluso promover la mortalidad de los camarones (Chen, 1993).

1.4 Carotenoides

La mayoría de los crustáceos contienen pigmentos carotenoides en exosqueleto, hipodermis, ojos, hemolinfa, hepatopáncreas y ovario. La mayoría de estos son depositados en los tejidos en forma de ésteres de astaxantina (Meyers y Latscha, 1997). Los carotenoides generalmente se encuentran asociados a los lípidos o formando complejos con proteínas de forma no covalente (Zagalsky, 1990). Hasta la fecha se han identificado más de 500 diferentes carotenoides, los cuales difieren en el grado de saturación, ciclización, oxidación y

número de carbonos. El espectro de absorción es característico para cada tipo de carotenoide y, en general se desplaza a longitudes mayores (rojas) cuando aumenta la insaturación de la molécula (Salares et al., 1979; Craik, 1985; Simpson et al., 1987).

La habilidad para sintetizar carotenoides se encuentra limitada a plantas y protistas (Craik, 1985; Simpson et al., 1987). Los animales solamente pueden hacer modificaciones enzimáticas de los carotenoides (Simpson et al., 1987; Meyers y Latscha, 1997). La falta de carotenoides podría ser la causa del color azul que presentan algunos camarones de *P. monodon* cuando son cultivados en estanques (Meyers y Latscha, 1997). Se ha propuesto que los carotenoides participan en múltiples funciones, tales como protección solar, pigmentación de la cutícula del embrión (Craik, 1985; Sagi et al., 1995a), atrayente de esperma, reservas intracelulares de O₂ (como parece ser el caso en moluscos), resistencia a altas temperaturas y al amonio y resistencia inmunológica (Torrissen y Christiansen, 1995; Meyers y Latscha, 1997). En el caso particular de los huevos de crustáceos, los niveles de carotenoides han cobrado importancia debido a su relación con la producción de vitamina A y a su papel en la protección contra la oxidación de lípidos insaturados (Harrison, 1990; Sagi et al., 1995; Torrissen y Christiansen, 1995; Mantiri et al., 1996; Wyban et al., 1997). Algunos autores han reportado una asociación entre los niveles de carotenoides y la calidad del huevo, la supervivencia de las larvas en salmones (Craik, 1985) y, recientemente, la supervivencia en crustáceos (Wyban et al., 1997).

2. Carbohidratos

La ablación unilateral produce un incremento en la demanda energética y en el consumo de oxígeno (Koshio et al., 1992; Rosas et al., 1993; Nan et al., 1995; Rosas et al., 1995). Los crustáceos ablacionados digieren con mayor eficiencia las proteínas, pero dependen en mayor grado de sustratos no proteínicos para satisfacer el aumento de su demanda energética (Koshio et al., 1990; Koshio et al., 1992; Nan et al., 1995). Algunos estudios han reportado que las demandas energéticas en crustáceos pueden ser cubiertas de manera adecuada por un aumento en la proporción de carbohidratos (Capuzzo, 1982; Koshio et al., 1990; Cruz-Suárez et al., 1994). De hecho, un aumento de los carbohidratos estimula el tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo y el crecimiento de la flora intestinal, que a su vez puede ser usada como fuente de proteínas y vitaminas (Capuzzo, 1982). Lo anterior indica que es factible sustituir cierta proporción de proteínas por carbohidratos, lo cual tendría alta relevancia desde el punto de vista económico, debido al costo involucrado en la alimentación con proteínas (Cruz-Suárez et al., 1994), como al ambiental, ya que el aumento en la ingestión de proteínas incrementa la producción de amonio y otros productos del metabolismo que, en altas concentraciones, constituyen uno de los problemas de contaminación ambiental por la acuicultura (Velasco et al., 1996). No obstante, los estudios anteriormente citados se han desarrollado en camarones en crecimiento y engorda, y prácticamente no hay resultados que comprueben la importancia de los carbohidratos en la maduración de hembras ablacionadas. Debido a que los organismos en crecimiento requieren de altas proporciones de proteínas, el requerimiento proteínico de las hembras durante la reproducción es probablemente menor para dietas de maduración. Se ha sugerido que en hembras ablacionadas la proporción de proteínas en la dieta sea disminuida de un 40-50% a un 25-30% (Capuzzo, 1982), mientras que la de lípidos aumente a un 11% (Bray et al., 1990), siendo lo demás complementado por carbohidratos. Un aumento de carbohidratos en la dieta podría contrarrestar la deficiencia de la CHH como consecuencia de la ablación y de sus efectos sobre

la movilización de glucosa. No obstante, es necesario tener en cuenta que, además de un incremento en la demanda energética, la ablación puede acarrear una disminución en la actividad de la amilasa, por lo que es posible que el camarón no sea capaz de digerir gran parte de los carbohidratos suministrados en la dieta (Koshio et al., 1992). Si esto es cierto, es probable que en organismos ablacionados parte de los carbohidratos tengan que ser suministrados directamente en forma de monosacáridos o ser pretratados enzimáticamente, tanto los carbohidratos como otros componentes de la dieta, para aumentar su absorción (Cruz-Rique et al., 1989; Coutteau et al., 1990). La ablación del tallo ocular también aumenta la frecuencia de muda, proceso en el que se requiere gran cantidad de carbohidratos para la síntesis de quitina. En estudios realizados en camarones en condiciones de maduración (variando dieta, temperatura, etc.) se ha observado que disminuyen las reservas de carbohidratos en el hepatopáncreas, tanto en hembras ablacionadas como en machos intactos (Racotta, comunicación personal). Por ende, es posible que la disminución de estas reservas se deba más bien al tipo de dieta u otras condiciones de maduración, que al proceso de ablación en sí.

3. Proteínas

Los crustáceos, así como otros organismos, requieren de aminoácidos esenciales para su crecimiento, reproducción y mantenimiento general (Guillaume, 1997). Mientras que algunos autores proponen que el requerimiento de proteínas durante la maduración no es tan alto como sucede durante el crecimiento (Deshimaru, 1982; Gallardo et al., 1989; Harrison, 1990; Fox et al., 1995; Gallardo et al., 1995; Kanazawa, 1995;), otros sugieren que el requerimiento es incluso más alto que durante la engorda (Marsden et al., 1992; Harrison, 1997). Es probable que parte de la confusión derive de que los organismos pueden compensar una dieta baja en proteínas con un mayor consumo de alimento, por lo cual es difícil determinar el nivel óptimo de proteínas en la dieta (Guillaume, 1997). Cualquiera que sea la cantidad requerida, es claro que su administración es necesaria para la reproducción y el adecuado desarrollo larvario (Kanazawa, 1995; Deshimaru, 1982; Gallardo et al., 1989; Fox et al., 1995; Gallardo et al., 1995; Guillaume, 1997; Harrison, 1997).

4. Vitaminas y minerales

Las vitaminas y algunos minerales son necesarios para el adecuado desarrollo gonádico, para la muda y como antioxidantes de lípidos. La importancia de las vitaminas ha sido abordada ampliamente (He et al., 1992; Civera, 1993; Dall, 1995; Conklin, 1997; Davis y Lawrence, 1997). No obstante, debido a la dificultad que presenta la medición durante la ingestión de vitaminas y minerales por producción secundaria en un estanque o microflora del propio camarón (Hunter et al., 1987; Brown et al., 1990; Tidwell et al., 1995), el efecto sobre la supervivencia y reproducción aún no está claro para cada tipo de vitamina. Dada esta falta de conocimiento, es probable que la mayoría de las dietas suministren en exceso todas o la mayoría de las vitaminas, lo cual podría no tener ningún valor nutricional y además, representa un aumento en el costo del alimento de hasta el 15% (Triño y Sarroza, 1995). Sin embargo, debido a la destrucción, lixiviación o factores antinutricionales presentes durante la preparación, ingestión y catabolismo del alimento, generalmente se considera necesario suplementar con vitaminas en altas concentraciones (Cuzon et al., 1994; Gadiet y Schai, 1994; Guillou et al., 1995). Debido a lo anterior, se han iniciado estudios que buscan desarrollar sistemas

alternativos para la administración de vitaminas, tales como los microencapsulados (Pasquet et al., 1994). No obstante, estos métodos resultan aún más costosos que la administración excesiva de vitaminas en los alimentos artificiales.

Debido a que los niveles de los macroelementos son altos en el agua marina y a la capacidad que presentan los crustáceos de absorberlos directamente a partir del agua, las necesidades particulares de estos iones no se encuentran establecidas (Harrison, 1990; Davis y Lawrence, 1997). Se ha puesto más énfasis en los microelementos; sin embargo, se encuentran más establecidos los niveles tóxicos de estos que los requerimientos nutricionales. Esto se debe a que la mayoría de los alimentos contienen niveles significativos de minerales, por lo que su eliminación ha sido problemática. Se ha sugerido que los moluscos promueven la maduración de crustáceos debido a que presentan altas concentraciones de microelementos, tales como zinc, cobre y manganeso (Boyden y Phillips, 1981), necesarios para la activación de múltiples enzimas (Civera, 1993). A medida que la maduración gonádica en crustáceos avanza, las concentraciones de zinc en este tejido aumentan, mientras que las de cobre y cadmio disminuyen (Jeckel et al., 1996). El zinc podría jugar un papel importante en la embriogénesis por su importancia como componente de las metaloenzimas y como estabilizador de las proteínas (Jeckel et al., 1996). En camarones Peneidos, también se ha visto que la concentración de zinc en el ovario aumenta con el desarrollo gonádico (Méndez, 1999). Lo anterior podría explicar la disminución de este elemento en el hepatopáncreas de hembras después de cierto tiempo de reproducción intensiva y sugeriría la necesidad de suplementación de zinc en las dietas de maduración (Méndez et al., 1998).

Es necesario considerar que el tipo de dieta suministrado no solamente es necesario para la adecuada maduración, sino que también es importante durante el desove, la eclosión del nauplio y hasta su metamorfosis en zoea, debido a que durante estos estadios, la larva depende exclusivamente de aportes endógenos transferidos por la hembra al huevo (Middleditch et al., 1980b; Cahu et al., 1995; Dall, 1995).

ASPECTOS AMBIENTALES DE LA REPRODUCCIÓN

1. *Ciclo de vida*

El ciclo de vida de la mayoría de los Peneidos consiste en una fase estuarina en la etapa de juveniles y una fase marina con migración a mar abierto como preadultos. Los camarones maduran y desovan en altamar. La maduración es probablemente inducida por variaciones de diversos factores ambientales a través de mecanismos nerviosos y endocrinos. Como ya se mencionó, la GIH inhibe la acumulación de lípidos en el vitelo, por lo que su disminución permite la maduración gonádica. Las variaciones de factores fisicoquímicos también afectan el crecimiento y la frecuencia de muda, por influencias en la secreción de otras hormonas (i.e. MIH) (Castañón-Cervantes et al., 1995; Chen et al., 1995). La regulación de los niveles de GIH por factores fisicoquímicos probablemente está sincronizada con la disponibilidad de alimento en zonas específicas (Middleditch et al., 1980a; Sudha y Anilkumar, 1996; Alekseev y Starobogatov, 1996). Como consecuencia de la regulación de GIH por factores ambientales, la maduración en cautiverio de Peneidos puede acelerarse con variaciones de temperatura, luz y salinidad (Harrison, 1990). No obstante, aunque la maduración involucra un proceso de acumulación de nutrientes en la gónada, de manera general no se considera que el alimento por sí mismo sea un inductor de la maduración (Jeckel et al., 1991; Fernández et al., 1994; Adare y Lasenby, 1994;

Teichert-Coddington y Rodriguez, 1995).

2. Estimulación de maduración

Los factores fisicoquímicos que se deben controlar para lograr la maduración gonádica en las hembras y que, en teoría, deberían simular los parámetros constantes de altamar, son los siguientes (Primavera, 1985; Crocos y Kerr, 1986; Robertson et al., 1993; Treece y Fox, 1993):

- 1) Temperatura óptima entre 27 y 30°C
- 2) Salinidad de 32 y 35 ppt
- 3) pH entre 8.0 y 8.2
- 4) Luz al 10-60% de la natural; tonalidades verde-azules (i.e. 0.1 hasta 4.4 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{seg}$ en el caso de *P. vannamei*); con ciclos de luz:oscuridad de 13:11.
- 5) Niveles de amonio inferiores a 0.02 mg-N (NH_4)/L, nitritos por debajo de 0.01-0.04 mg-N (NO_2)/L y nitratos inferiores a 0.1 mg-N (NO_3)/L

2.1 Temperatura y luz

Entre los factores fisicoquímicos más estudiados en relación a la maduración se encuentran las variaciones de temperatura y la incidencia de luz, así como su interrelación (Chamberlain y Lawrence, 1981; Chamberlain y Gervais, 1984; Primavera, 1985). La inducción de la maduración en reproductores no ablacionados, por aumentos de temperatura y cambios en el fotoperíodo, ha sido demostrada para algunas especies (e.g. *Penaeus chinensis*), aunque los valores óptimos reportados presentan una variación amplia en función de cada autor (Chamberlain y Lawrence, 1981; Primavera, 1985; Castañón-Cervantes et al., 1995). Las variaciones observadas podrían deberse a que el efecto de los factores mencionados sobre la maduración depende de cada especie o población y del estadio de maduración del ovario (Meusy y Payen, 1988; Sáenz y Magallón, 1989; Vázquez-Boucard et al., 1989). A nivel de producción comercial de Peneidos, específicamente de *P. vannamei*, la maduración inducida solamente por variaciones en los factores fisicoquímicos no se considera exitosa, ya que la frecuencia de desoves ha sido baja (Crocos y Kerr, 1986). No obstante, se ha reportado que las hembras maduras por medio de variaciones fisicoquímicas desovan por períodos más amplios, presentan mayor fecundidad y la probabilidad de supervivencia de las larvas es mayor (Cripe, 1994; Castañón-Cervantes et al., 1995).

2.2 Oxígeno

El adecuado control de los factores fisicoquímicos no solamente afecta la maduración de Peneidos, también es esencial para incrementar las probabilidades de supervivencia de reproductores y larvas, por lo que es necesario considerar los efectos de la ablación sobre la tolerancia a variables ambientales. Se ha demostrado que la ablación aumenta el consumo de oxígeno y la ingestión de alimento (Rosas et al., 1993), lo cual implica que la susceptibilidad a la hipoxia es mayor en hembras ablacionadas (Nan et al., 1995). La adecuada aireación incrementa la fertilización ya que incrementa la dispersión de los huevos, evitando que estos se aglutinen y no puedan ser fertilizados (Emmerson, 1980). Finalmente, es necesario tener en cuenta que los factores fisicoquímicos se encuentran interrelacionados; por ejemplo, el punto crítico de consumo de oxígeno

varía en función de la temperatura (Villarreal 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).

2.3 Salinidad y concentración iónica

La mayoría de los organismos marinos son isosmóticos o ligeramente hiposmóticos y tienen la capacidad de regular hasta cierto grado su concentración iónica en respuesta a la del medio y a la temperatura (Mantel, 1985; Newsom y Davis, 1994). Las larvas (nauplios, zoeas, mysis) son completamente osmoconformadores, mientras que las postlarvas y camarones adultos presentan regulación osmótica, en particular en las branquias (Bouaricha et al., 1991). Esto habilita a los camarones a tolerar rangos amplios de salinidad y pH, a los cuales van a estar sujetos en su migración entre altamar y los estuarios. Es posible que la salinidad afecte la reproducción de manera semejante a la temperatura y el fotoperíodo. Durante la muda, la regulación iónica de crustáceos es afectada significativamente (Mercado-Allen, 1991). Las variaciones de salinidad en el medio durante la ecdisis, pueden disminuir el crecimiento y aumentar la mortalidad (Koshio et al., 1989; Wheatly y Heart, 1995). De manera general, es considerado que la salinidad óptima para *P. vannamei* se encuentra entre 15 y 25 ppt, según su distribución geográfica (Boyd, 1990). Sin embargo, estudios recientes realizados demuestran que los juveniles de *P. vannamei* crecen mejor a salinidades bajas de entre 5-15 ppt (Bray et al., 1994), mientras que la salinidad óptima para reproductores es mayor a 30 ppt. Por otro lado, la ablación puede alterar la tolerancia a la salinidad, ya que en el tallo ocular se sintetiza un neurofactor regulador de la concentración iónica (Mantel, 1985). En crustáceos ablacionados, los valores de magnesio durante la muda se encuentran altos, mientras que los de calcio están disminuidos (Mercado-Allen, 1991). Otro de los factores de importancia en la regulación iónica es la repercusión sobre la fertilización de los ovocitos, debido al papel de los iones calcio y magnesio en su activación (Lindsay y Clark, 1994; Clark et al., 1994).

AGOTAMIENTO REPRODUCTIVO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si bien la ablación del tallo ocular estimula el desove, existen una serie de desventajas asociadas con la ablación que se acentúan con el tiempo en producción (después de la ablación, que es considerada como el día cero) y, que en general, se agrupan y describen bajo el nombre de "agotamiento reproductivo". Dicho fenómeno se caracteriza por una disminución progresiva en la frecuencia de los desoves, el porcentaje de fertilización, la tasa de eclosión y la supervivencia de los nauplios a partir de cierto tiempo en producción después de transcurrida la ablación y con respecto a los valores iniciales (Simon, 1982). En la Fig. 1 se observa una típica curva de producción de nauplios de *P. vannamei* en un laboratorio de producción comercial, donde se puede apreciar un decaimiento gradual a partir de los 3 meses. De manera general, en los laboratorios de producción el decaimiento progresivo en estos valores de producción resulta en el descarte de hembras reproductoras después de un período variable, el cual depende de la especie y las condiciones de maduración, y que se ha reportado desde dos hasta ocho meses (Aquacop, 1979; Simon, 1982; Chamberlain y Gervais, 1984; Browdy y Samocha, 1985; Primavera, 1985; Bueno, 1990; Treece y Fox, 1993; Hansford y Marsden, 1995). El agotamiento reproductivo es reconocido por los camaronicultores, pero las causas que inducen al mismo no han sido establecidas con claridad a la fecha. En la presente tesis, se plantearon diferentes hipótesis en un intento por descubrir las causas del agotamiento reproductivo en el camarón.

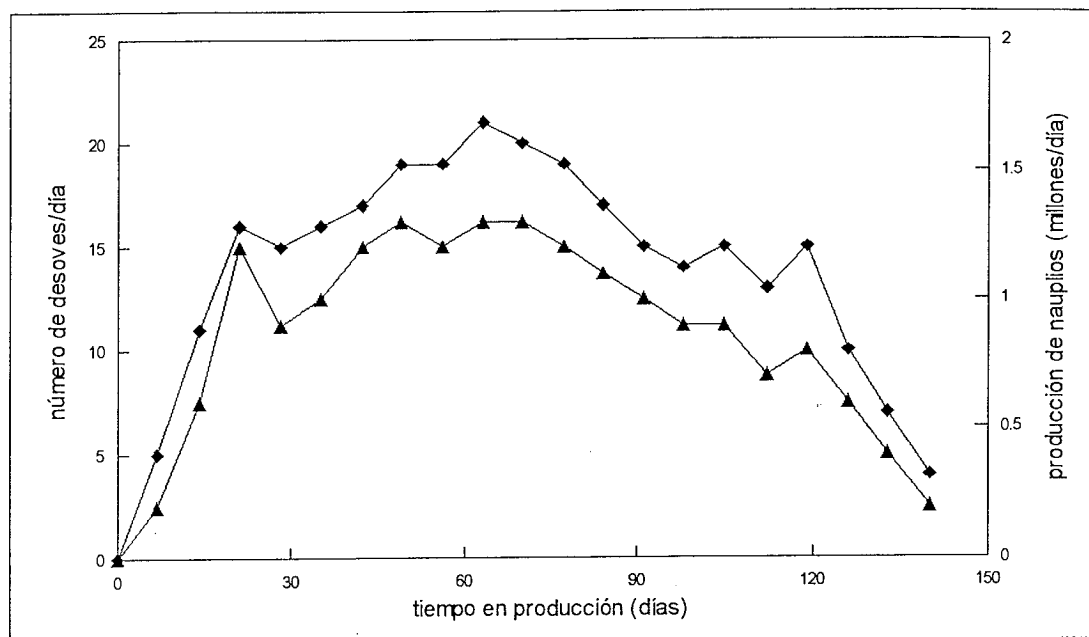


Fig. 1. Número de desoves (rectángulos) y de nauplios (triángulos) producidos en una piscina por día en el laboratorio comercial Acuacultores de la Paz durante un ciclo de producción.

Agotamiento reproductivo como consecuencia de un desbalance hormonal

El agotamiento reproductivo podría ser el resultado de un desbalance hormonal producido por la ablación, ya que este proceso disminuye la concentración de varias hormonas y puede afectar varios centros neurosecretorios. Como consecuencia de la ablación, se puede esperar una disminución en los niveles GIH y de otras hormonas, tal como la CHH. Esta hormona está involucrada en la regulación de la glicogenolisis, la actividad de la amilasa en el hepatopáncreas y del metabolismo de lípidos (Keller y Sedlmeier, 1988; Santos et al., 1997). La disminución de los niveles de esta hormona resultaría en una condición de hipoglicemia. Sin embargo, dicha influencia no está clara, ya que se ha observado que en organismos bilateralmente ablacionados los niveles de glucosa no siguen un patrón definido, ya que puede disminuir (Telford, 1975; Santos et al., 1988; Diaz-Iglesia et al., 1987), mantenerse (Kuo et al., 1995) o inclusive incrementarse (Lüschen et al., 1993). También se ha reportado en respuesta a la ablación un incremento del consumo de oxígeno (Nan et al., 1993; Rosas et al., 1993) que es compensado por un incremento en la ingestión de alimento y la eficiencia energética (Rosas et al., 1993). Otra de las hormonas cuyos niveles se verían afectados por la ablación es la MIH, cuya disminución, además de incrementar la frecuencia de mudas, podría afectar la síntesis de lípidos y proteínas. La ablación también podría estar afectando la vitelogénesis exógena debido a la disminución de los niveles de GSH.

A su vez, la ablación podría afectar la síntesis y secreción hormonal de otros órganos. Por ejemplo, la secreción de FM en el órgano mandibular se encuentra regulada por la glándula sinusal (probablemente por la CHH). Se ha observado que como consecuencia de la ablación, el órgano mandibular se hipertrofia y estimula en forma directa la síntesis exógena de vitelogenina (Laufer et al., 1993). Asimismo, la secreción de ecdisteroides a partir del Órgano Y se encuentra regulada por la secreción de MIH (Kang y Spaziani, 1995).

Agotamiento como consecuencia de un desbalance en el almacenamiento y transporte de compuestos bioquímicos

Por otro lado, es posible que el agotamiento reproductivo sea consecuencia de un desbalance entre el almacenamiento de los compuestos bioquímicos requeridos por la gónada y el aporte de estos a partir de la dieta, así como su posterior transferencia al ovario desde el hepatopáncreas. Es posible que la ablación afecte la capacidad de digestión, absorción, acumulación y movilización de combustibles. En este sentido, hay evidencia circunstancial que muchos problemas de la reproducción en cultivo pueden deberse a que las dietas no proveen al organismo de los nutrientes requeridos para un desarrollo gonádico adecuado, sobre todo si éste es acelerado por la ablación del tallo ocular (Emmerson; 1980; Harrison, 1990; Marsden et al., 1997). De hecho, se han reportado alteraciones en la digestibilidad aparente de lípidos, así como de la actividad de la lipasa (Koshio et al., 1992; Rao y Surendranath, 1992) y de la capacidad de movilización de lípidos desde el hepatopáncreas hacia el ovario en hembras ablacionadas (Millamena et al., 1993; Vázquez-Boucard, 1990). Partiendo de la hipótesis de un aporte insuficiente de compuestos bioquímicos durante la maduración, es necesario evaluar en qué medida ocurre lo anterior en relación al agotamiento reproductivo. El enfoque experimental empleado fue el análisis bioquímico en varios tejidos de hembras en relación al agotamiento reproductivo. Las hembras fueron evaluadas en diferentes estadios de maduración, con el objeto de determinar si la acumulación y transporte de compuestos bioquímicos de un tejido a otro durante la maduración variaba en relación al agotamiento.

Agotamiento reproductivo y vida reproductiva útil

Otra posibilidad es de que exista un número limitado de ovocitos viables por hembra de camarón que sean capaces de producir, es decir, una limitada "vida reproductiva útil" (Galgani et al., 1989). El agotamiento podría no ser efecto de un desbalance hormonal o nutricional, sino una aceleración de la frecuencia de desoves que podría agotar el número de ovocitos que cada hembra es capaz de producir. Esta hipótesis puede abordarse mediante el análisis histológico de las gónadas para determinar si existen diferencias entre las gónadas de hembras en relación al agotamiento reproductivo.

Efecto de la ablación y su relación con el agotamiento reproductivo

El efecto de la ablación en relación a diferentes parámetros de producción y su variación en el tiempo no está del todo claro. En general, las hembras ablacionadas producen mayor número de huevos y desovan con mayor frecuencia. Esto se traduce a nivel de producción en un mayor rendimiento y en tener cierta predicción de la producción (Primavera, 1985; Bray y Lawrence, 1992). No obstante, la calidad de huevos y larvas que se obtienen a partir de hembras ablacionadas parece estar afectada. Diversos autores han reportado que

mientras el número de huevos por desove o el número de desoves aumenta cuando se usa la ablación, la supervivencia de las larvas disminuye (Emmerson, 1980; Makinouchi y Honculada-Primavera, 1987; Choy, 1987). Otros reportes contradicen lo anterior, ya que observan que el número y calidad de los huevos de hembras ablacionadas no varía con respecto a no ablacionadas (Lumare, 1979; Lawrence et al., 1980; Browdy y Samocha, 1985; Browdy et al., 1986).

La relación entre agotamiento reproductivo y ablación no está clara, debido a que la maduración es difícil de lograr sin ablación en la mayoría de las especies de Peneidos. Es necesario estudiar de manera conjunta ambos efectos analizando una serie de variables relacionadas tanto con la condición del reproductor como con la calidad de la progenie, para esclarecer si existe una relación entre el agotamiento reproductivo y la ablación.

Efecto del agotamiento sobre la progenie

En la presente tesis no fue posible determinar niveles hormonales o actividad enzimática. No obstante, si existe una alteración del sistema endocrino, es probable que ésta se encuentre reflejada en la transferencia de compuestos bioquímicos desde el hepatopáncreas hacia la gónada durante la maduración, y de ésta hacia los huevos. Como consecuencia, se planteó como objetivo el determinar la composición bioquímica de los huevos a lo largo de un ciclo de producción, para determinar si existen variaciones a nivel bioquímico en la progenie, que concuerden con el decaimiento productivo descrito para el agotamiento reproductivo. El interés en medir la composición bioquímica de los huevos se debió a que refleja en forma directa la transferencia de reservas desde la gónada, lo cual podría dar indicios de la condición de la hembra.

Por otro lado, el desarrollo embrionario y eclosión requieren de energía que es obtenida a partir de reservas (Fraser, 1989; Wickins et al., 1995). Los compuestos bioquímicos de los nauplios fueron evaluados debido a que en este estadio larvario no existe ingestión de alimento, por lo que la metamorfosis y supervivencia a zoea se encuentran determinadas, entre otros factores, por la obtención de energía a partir de combustibles endógenos (Wickins et al., 1995). Partiendo de la hipótesis de que las reservas del huevo y la supervivencia durante estadios larvarios puede ser afectada por la condición de la hembra, el enfoque experimental empleado fue el analizar las reservas bioquímicas presentes en el huevo y nauplio en relación al agotamiento reproductivo.

Alternativas para retardar el agotamiento reproductivo

El estudio de las causas fisiológicas del agotamiento reproductivo puede proveer de suficiente información para proponer alternativas. Analizando la literatura, es posible proponer algunas alternativas *a priori*, que se listan a continuación:

- Utilizar organismos no ablacionados, alterando las condiciones de maduración (e.g. dietas, fotoperíodo, temperatura, época del año, etc.)
- Retardar el agotamiento por medio de manipulaciones hormonales alternativas o complementarias a la ablación. Algunas sustancias con las cuales se han obtenido resultados son la serotonina, un neurotransmisor que estimula la secreción de MIH, CHH y probablemente GSH. Una hormona que ha sido probada como complementaria a la ablación es el FM, que tiene un papel en la estimulación de la vitelogénesis.

- Retardar o recuperar organismos agotados con una dieta compensadora. Es posible que los requerimientos nutricionales varíen a lo largo del ciclo de producción de una hembra. Es decir, que a medida que transcurren los días desde la ablación, los reproductores requieran de proporciones de nutrientes diferentes a los de camarones recién ablacionados o en diferente presentación. Una consecuencia de las variaciones en los requerimientos nutricionales podría ser el agotamiento reportado después de cierto período de producción.
- Recuperar a los reproductores que van a ser desechados al término del ciclo de producción invirtiendo las condiciones que inducen la maduración (e.g. bajar temperatura y cambio de dieta), permitiendo al organismo una recuperación parcial para luego ser reutilizado.
- Dependencia de reproductores domesticados, que tienen la ventaja de disponibilidad continua y posibilidad de selección. Sin embargo, el desempeño reproductivo de organismos domesticados reportado se encuentra generalmente muy por debajo del que presentan los camarones silvestres. Es necesario evaluar la factibilidad de la sustitución parcial o total.

BIBLIOGRAFÍA

- Adare, K.I. and F.C. Lasenby.** Seasonal changes in the total lipid content of the opossum shrimp, *Mysis relicta* (Malacostraca: Mysidacea). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 1935-1941, 1994.
- Aguilar, M.B., L.S. Quackenbush, D.T. Hunt, J. Shabanowitz and A. Huberman.** Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortman). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 491-498, 1992.
- Alava, R. V., A. Kanazawa, S.-I. Teshima and S. Koshio.** Effect of dietary phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of Kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 59: 345-351, 1993.
- Alekseev, V.R. and Y.I. Starobogatov.** Types of diapause in Crustacea; definitions, distribution, evolution. *Hydrobiologia* 320: 15-26, 1996.
- Anderson, S.J., A.C. Taylor and R.J. Atkinson.** Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassinidea). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A: 515-522, 1994.
- Anilkumar, G. and K.G. Adiyodi.** Ovarian growth, induced by eyestalk ablation during the prebreeding season, is not normal in the crab *Paratelpusa hydrodromus* (Herbst). *Int. J. Invert. Reprod.* 2: 95-105, 1980.
- Aquacop.** Penaeid reared brood stock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 445-452, 1979.
- Aquacop.** Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps in the Centre Oceanologique du Pacifique. In: *CRC Handbook of mariculture, Crustacean Aquaculture*, edited by J.P. McVey. CRC Press, Florida. p 105-122, 1983
- Aréchiga, H., J. Flores and U. Garcia.** Biosynthesis and release of the crustacean neurodepressing hormone. In: *Current trends in comparative endocrinology*, edited by B. Lofts and N. Holmes, Hong Kong, University press. p. 787-791, 1985.
- Baum, N.A, D.E. Conklin and E.S. Chang.** Effect of dietary lecithin in combination with casein or crab protein on cholesterol uptake and transport in the lobster *Homarus americanus*. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 277-287, 1990.
- Born, A.F., M.C.J. Verdegem and E.A. Huisman.** Macro-economic factors influencing world aquaculture production. *Aquacult. Fish. Manag.* 25: 519-536, 1994.
- Bouaricha, N., P. Thuet, G. Charmantier-Daurest and J.P. Trilles.** Na⁺-K⁺ ATPase and carbonic anhydrase activities in larvae, postlarvae and adults of the shrimp *Penaeus japonicus* (Decapoda, Penaeidea). *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: 433-437, 1991.
- Boyd, C.E.** *Water quality in ponds for aquaculture.* Alabama agricultural experiment station, Auburn University, Alabama p. 481, 1990.
- Boyd, C.R. and D.J.H. Phillips.** Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oyster and their implication for indicator studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 29-40, 1981.
- Bradfield, J.Y., R.L. Berlin, S.M. Rankin and L.L. Keeley.** Cloned cDNA and antibody for an ovarian cortical granule polypeptide of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Biol. Bull.* 177: 344-349, 1989.
- Bray, W.A. and A.L. Lawrence.** Reproduction of *Penaeus sp* in captivity. In: *Marine shrimp culture: Principles and practices*, edited by A.W. Fast and L.J. Lester, Elsevier Science Publisher, St Louis. p. 93-170, 1992.
- Bray, W.A., A.L. Lawrence and L.J. Lester.** Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. *J. World. Aquacult. Soc.* 21: 41-52, 1990.
- Bray, W.A., A.L. Lawrence and J.R. Leung-Trujillo.** The effect salinity on growth and survival of *Penaeus*

- vannamei*, with observations on the interaction of IHVN virus and salinity. *Aquaculture* 122: 133-146, 1994.
- Bridges, C.R. and A.R. Brand.** Oxygen consumption and oxygen-independence in marine crustaceans. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 133-141, 1980.
- Browdy, C.** A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspective on controlled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 22-51, 1992
- Browdy, C.L. and T.M. Samocha.** Maturation and spawning of ablated and nonablated *Penaeus semisulcatus* De Haan (1844). *J. World Maricult. Soc.* 16: 236-249, 1985.
- Browdy, C.L., A. Hadani, T.M. Samocha and Y. Loya.** The reproductive performance of wild and pond-reared *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Aquaculture* 59: 251-258, 1986.
- Browdy, C.L., M. Fainzilber, M. Tom, Y. Loya and E. Lubzens.** Vitellin synthesis in relation to oogenesis in *in vitro* incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) *J. Exp. Zool.* 255: 205-215, 1990.
- Brown, A. Jr., D. Tave, T.D. Williams and M.J. Duronslet.** Reproduction of second generation penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris*, from Mexico. *Aquaculture* 41: 81-84, 1984.
- Brown, P.B., P. Tazik, M.L. Hooe and W.G. Blythe.** Consumption and apparent dry matter digestibility of aquatic macrophytes by male and females crayfish (*Orconectes virilis*). *Aquaculture* 89: 55-64, 1990.
- Bueno, S.L.d.L.** Maturation and spawning of the white shrimp *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936, under large scale rearing conditions. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 170-179, 1990.
- Cahu, C., A. Severe and P. Quazuguel.** The variation of lipid content in *Penaeus indicus* during larval development. ICES, Mariculture Comité F22: 11, 1988.
- Cahu, C. and P. Quazuguel.** Lipid metabolism of *Penaeus vannamei* broodstock: influence of dietary lipids. *Aquaculture Europe*, 10: 45-46, 1989.
- Cahu, C., J.C. Guillaume, G. Stephan and L. Chim.** Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. *Aquaculture* 126: 159-170, 1994.
- Cahu, C.L., G. Cuzon and P. Quazuguel.** Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A: 417-424, 1995.
- Caillouet, A.C. Jr.** Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in the pink shrimp *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Proc. World Maricult. Soc.* 3: 205-225, 1972.
- Capuzzo, J.M.** Crustacean bioenergetics: the role of environmental variables and dietary levels of macronutrients on energetic efficiencies. In: *Proceedings of the 2nd. International Conference on Aquaculture Nutrition*, edited by G.D. Pruder, C.J. Langdon and D.E. Conklin. p. 71-86, 1982.
- Castañón-Cervantes, O., C. Lugo, M. Aguilar, G. González-Moran and M.L. Fanjul-Moles.** Photoperiodic induction on the growth rate and gonads maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A: 139-146, 1995.
- Castell J.D.** Fatty acid metabolism in crustaceans. In: *Proceedings of the 2nd International Conference on Aquaculture Nutrition*, edited by G.D. Pruder, C.J. Langdon and D.E. Conklin. p. 124-145, 1983.
- Castille, F.L. and L.A. Lawrence.** 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, 1989.
- Chamberlain, G.W. and A.L. Lawrence.** Effect of light intensity and male and female eyestalk ablation on reproduction of *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *J. World Maricult. Soc.* 12: 357-372, 1981.
- Chamberlain, G.W. and N.F. Gervais.** Comparison of unilateral eyestalk ablation with environmental control

for ovarian maturation of *Penaeus stylirostris*. *J. World Maricult. Soc.* 15: 29-30, 1984.

- Chan, S.-M., S.M. Rankin and L.L. Keeley.** Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biol. Bull.* 175: 185-192, 1988.
- Chang, E.S. and J.D. O'Connor.** Crustacea: Molting. In: *Endocrinology of selected invertebrate types*, edited by H. Laufer and R.G.H. Downer. N.Y., USA: Alan R. Liss, Inc., p. 259-278, 1988.
- Chang, E.S.** Comparative endocrinology of molting and reproduction: Insects and Crustacea. *Annu.Rev.Entomol.* 38: 161-180, 1993.
- Charniux-Cotton, H. and G. Payen.** Crustacean reproduction. In: *Invertebrate endocrinology*, edited by R.G.H Downer and H. Laufer. Alan R. Liss, Inc., N.Y., p. 279-304, 1988.
- Chen, C.C. and S.N. Chen.** Isolation and partial characterization of vitellin from the egg of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 141-146, 1993.
- Chen, H.-Y.** Requirements of marine shrimp *Penaeus monodon*, juveniles for phosphatidylcholine and cholesterol. *Aquaculture* 109: 165-176, 1993.
- Chen, H.-Y. and J.-S. Jenn.** Combined effects of dietary phosphatidylcholine and cholesterol on the growth, survival and body lipid composition of marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 96: 167-178, 1991.
- Chen, S.L., J.W. Wu, J.V. Huner and R.F. Malone.** Effects of temperature upon ablation-to-molt interval and mortality of red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*) subjected to bilateral eyestalk ablation. *Aquaculture* 138: 191-204, 1995.
- Choy, S.C.** Growth and reproduction of eyestalk ablated *Penaeus canaliculatus* (Olivier, 1811) Crustacea: enacidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 112: 93-107, 1987.
- Chu, K.H. and N.N. Ovsianico-Koulikowsky.** Ontogenic changes in metabolic activity and biochemical composition in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 183: 11-26, 1994.
- Civera, R.** Requerimientos minerales de los crustáceos. In: *Memorias del primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura*, edited by E.L. Cruz-Suárez, D. Rique and R. Mendoza. U.A.N.L. México, p. 107-121, 1993.
- Clark, W.H.J. and F.J. Griffin.** Acquisition and manipulation of Penaeoidean gametes. In: *CRC Handbook of Mariculture*, edited by J.P. McVey. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, p. 133-151., 1993
- Clark, W.H., Jr. F.J. Griffin and A.H. Wikramanayake.** Pre-fusion events of sperm-oocyte interaction in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Develop. Biology.* 5: 25-231, 1994.
- Clarke, A.** Lipid synthesis and reproduction in the polar shrimp *Chorismus antarticus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9: 81-90, 1982.
- Clarke, A, J.H. Brown and L.J. Holmes.** The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B: 505-511, 1990.
- Conklin, D.E.** Vitamins. In: *Crustacean Nutrition*, edited by L.R. D'Abramo, D.E. Conklin, and D.M. Akiyama. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, p. 123-149., 1997
- Coutteau, P., P. Lavens and P. Sorgeloos.** Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: Artemia as a case study. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 1-9, 1990.
- Craik, J.C.A.** Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture* 47: 61-88, 1985.
- Cripe, G.M.** Induction of maturation and spawning of pink shrimp, *Penaeus duorarum*, by changing water temperature, and survival and growth of young. *Aquaculture* 128: 255-260, 1994.
- Crococ, P.J. and J.D. Kerr.** Factors affecting induction of maturation and spawning of the tiger prawn, *Penaeus esculentus* (Haswell), under laboratory conditions. *Aquaculture* 58: 203-214, 1986.
- Cruz-Ricque, L.E., J.Guillaume and A.V. Wormhoudt.** Effect of squid extracts on time course appearance of glucose and free amino acids in haemolymph in *Penaeus japonicus* after feeding: preliminary results.

Aquaculture 76: 57-65, 1989.

- Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, J.D. Pinal-Mansilla and P. Wesche-Ebelling.** Effect of different carbohydrate sources on the growth of *Penaeus vannamei*: economical impact. *Aquaculture* 123: 349-360, 1994.
- Cuculescu M., D. Hyde and K. Bowler.** Temperature acclimation of marine crabs: changes in plasma membrane fluidity and lipid composition. *J. Therm. Biol.* 20: 207-222, 1995.
- Cuzon, G., G. Guillaume and C. Cahu.** Composition, preparation and utilization of feeds for Crustacea. *Aquaculture* 124: 253-267, 1994.
- D'Croz, L., L. V. Wong, G. Justine and M. Gupta.** Prostaglandins and related compounds from the polychaete worm *Americanuphis reesei* Fauchald (Onuphidae) as possible inducers of gonad maturation in Penaeid shrimps. *Rev. Biol. Trop.* 36: 331-332, 1988.
- Dall, W.** Carotenoids versus retinoids (vitamins A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). *Marine Biol.* 124: 209-213, 1995.
- Davis, D.A. and A.L. Lawrence.** Minerals. In: *Crustacean Nutrition*, edited by L.R. D'Abramo, D.E. Conklin, and D.M. Akiyama. Baton Rouge, Louisiana, World Aquaculture Society, p. 150-163, 1997.
- De Kleijn, D.P.V, T. Coenen, A.M. Laverdure, C.P. Tensen and F. Van Herp.** Localization of mRNA's encoding crustacean hyperglycemic hormone and gonad inhibiting hormone in the X-organ sinus gland complex of the lobster *Homarus americanus*. *Neuroscience.* 51: 121-128, 1992.
- De Kleijn, D.P.V and F. Van Herp.** Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 4: 573-579, 1995.
- Deshimaru, O.** Protein and amino acid nutrition of the prawn *Penaeus japonicus*. In: *Proceedings of the 2nd International Conference on Aquaculture Nutrition*, edited by G.D. Prudner, C.J. Langdon and D.E. Conklin. p. 106-123, 1982.
- Díaz Iglesia, E., R. Brito and I. Hernández.** Efectos de la ablación del complejo neurosecretor peduncular en juveniles de langosta, *Panulirus argus*. II Algunos aspectos metabólicos. *Rev.Inv.Mar.* 8: 81-93, 1987.
- Eastman-Reks, S. and M. Fingerman.** Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A: 679-684, 1984.
- Emmerson, W.D.** Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Fainzilber, M., M. Tom, S. Shafir, S.W. Applebaum and E. Lubzens.** Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp? *Biol. Bull.* 183: 233-241, 1992.
- Fainzilber, M., C.L. Browdy, M. Tom, E. Lubzens and S.W. Applebaum.** Protein synthesis *in vitro* in cultures of the subepidermal adipose tissue and the ovary of the shrimp *Penaeus semisulcatus* *Tissue Cell* 21: 911-916, 1989.
- Fairs, N.J., P.T. Quinlan and L.J. Goad.** Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titers during vitellogenesis in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 89: 83-99, 1990.
- Farkas, T.** Adaptation of fatty acid compositions to temperature - a study on planktonic crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B: 71-76, 1979.
- Fegan, F.D.** Recent developments and issues in the penaeid shrimp hatchery industry. In: *Proceedings of the special session on shrimp farming*, edited by J. Wyban. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. p. 55-64, 1992.
- Fenucci, J.L., A.L. Lawrence and Z.P. Zein-Eldin.** The effects of fatty acid and shrimp meal composition of prepared diets on growth of juvenile shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. World Maricult. Soc.* 12: 315-324, 1981.
- Fernandes, M.A.S., M.I.R. Mendonça, J.C. Marques and V.M.C. Madeira.** Seasonal changes in the biochemical composition and energy content of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) in

- the lower Mondego River Valley, Portugal. *J. Crust. Biol.* 14: 736-743, 1994.
- Fingerman, M. The endocrine mechanisms of crustaceans. *J. Crust. Biol.* 7: 1-24, 1987.
- Fingerman, M., R. Nagabhushanam, R. Sarojini and P. Reddy. Bioogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *J. Crust. Biol.* 14: 413-437, 1994.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations. Fishery statistics: Catches and landings. Vol. 72, 1991.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations-Aquila II. Diagnóstico sobre el estado de la acuicultura en America Latina y el Caribe. Documento de campo No. 11, 1993.
- Fox, J.M., A.L. Lawrence and E.Li-Chan. Dietary requirements for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture* 131: 279-290, 1995.
- Fraser, A.J. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1868-1873, 1989.
- Gadient, M. and E. Schai. Leaching of various vitamins from shrimp feed. *Aquaculture* 124: 201-205, 1994.
- Galgani, M.-L., G. Cuzon, F. Galgani and J. Goguenheim. Influence du régime alimentaire sur la reproduction en captivité de *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 81: 337-350, 1989.
- Gallardo, N., R. Gonzalez R., O. Carillo, O. Valdes and A. Forrellat. Una aproximación de los requerimientos de aminoácidos esenciales de *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 10: 259-267, 1989.
- Gallardo, P.P., E. Alfonso, G. Gaxiola, L.A. Soto and C. Rosas. Feeding schedule for *Penaeus setiferus* larvae based on diatoms (*Chaetoceros ceratosporum*), flagellates (*Tetraselmis chuii*) and *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 131: 239-252, 1995.
- Galois, R.G. Changes in tissue lipid composition during vitellogenesis in the prawn *Penaeus indicus*. *J. Exp. Mar. Biol.* 84: 155-156, 1984.
- García, E., M.A. Jiménez and M. Oliva. Cambios en el metabolismo lipídico durante la maduración ovárica en *Penaeus notialis*. *Rev. Invest. Mar.* 16: 165-169, 1995.
- Gehring, W.R. Maturational changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp, *Penaeus duorarum* duorarum Burkenroad. *Comp. Biochem. Physiol.* 49A: 511-524, 1974.
- Gendrop-Fumes, V. and E. Valenzuela-Espinoza. Unilateral ablation of *Penaeus stylirostris* (Stimpson). *Ciencias Marinas* 21: 401-413, 1995.
- Ghosh, D. and A.K. Ray. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity of ovary and hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: relation to ovarian condition and estrogen treatment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 248-254, 1993a.
- Ghosh, D. and A.K. Ray. Subcellular action of estradiol-17 β in a freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 90: 274-281, 1993b.
- Gomes, A.O.L. and J. Honculada-Primavera. Reproductive quality of male *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 112: 157-164, 1993.
- Guillaume, J.C. Protein and amino acids. In: *Crustacean Nutrition*, edited by L.R. D'Abramo, D.E. Conklin, and D.M. Akiyama. Baton Rouge, Louisiana, World Aquaculture Society, p. 26-50, 1997.
- Guillou, A., M. Khalil and L. Adambounou. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture* 130: 351-360, 1995.
- Haefner, P.A. Jr and D.H. Spaargaren. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). I. Weight and volume relationship. *J. Crustacean Biol.* 13: 523-531, 1993.
- Hansford, S.W. and G.E. Marsden. Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J. World Aquacul. Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Harrison, E.K. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod

crustaceans: A review. *J. Shellfish Res.* 9: 1-28, 1990.

- Harrison, K.** Broodstock nutrition and maturation diets. In: *Crustacean Nutrition*, edited by L.R. D'Abramo, D.E. Conklin, and D.M. Akiyama. Baton Rouge, Louisiana, World Aquaculture Society, p. 390-410, 1997.
- He, H., A.L. Lawrence and R. Liu.** Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 103: 177-185, 1992.
- Hinsch, G.W.** Effect of mandibular organ implants upon the spider crab ovary. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 99: 317-322, 1980.
- Homola, E., A. Sagi and H. Laufer.** Relationship of claw form and exoskeleton condition to reproductive system size and methylfarnoseate in the male spider crab, *Libinia emarginata*. *Invert. Reprod. Develop.* 20: 219-225, 1991.
- Huberman, A.** Neurodepressing hormone (NDH): fact or fiction? *Crustaceana* 69: 1-18, 1997.
- Huberman, A., M.B. Aguilar and L.S. Quackenbush.** A neuropeptide family from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Aquaculture* 135: 149-160, 1995.
- Hunter, B., G. Pruder and J. Wyban.** Biochemical composition of pond biota, shrimp ingesta, and relative growth of *Penaeus vannamei* in earthen ponds. *J. World Aquacul. Soc.* 18: 162-174, 1987.
- Instituto Nacional de Pesca.** Boletín cuatrimestral de la REDIMAR, vol.1, México, Agosto 1996.
- Jeckel, W. H., J.E. Aizpun de Moreno and V.J. Moreno.** Seasonal variations in the biochemical composition and lipids of the digestive gland in the shrimp *Pleoticus muelleri* bate. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 253-260, 1991.
- Jeckel, W. H., R.R. Roth and L. Ricci.** Patterns of trace-metal distribution in tissues of *Pleoticus muelleri* (Crustacea: Decapoda: Solenoceridae). *Marine Biology.* 125: 297-306, 1996.
- Jiménez M.A., E. García, G. Gandonou and M. Oliva.** Metabolismo lipídico del hepatopáncreas de *Penaeus schmitti* en cultivo y del medio natural. *Rev. Invest. Mar.* 16: 157-164, 1995.
- Jugan, P. and F. Van Herp.** Introductory study of an oocyte membrane protein that specifically binds vitellogenin in the crayfish *Orconectes limosus*. *Invert. Reprod. Develop.* 16: 149-154, 1989.
- Kanazawa, A.** Penaeid nutrition. In: *Proceedings of the 2nd. International Conference on Aquaculture Nutrition*, edited by G.D. Pruder, C.J. Langdon and D.E. Conklin. p. 87-105, 1995.
- Kang, B.K. and E. Spaziani.** Uptake of high-density lipoprotein by Y-organ of the crab, *Cancer antennarius*. I. Characterization *in vitro* and effects of stimulators and inhibitors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 30: 61-75, 1995.
- Keller, R.** Crustacean neuropeptides: structure, functions and comparative aspects. *Experientia.* 48: 439-448, 1992.
- Keller, R. and D. Sedlmeier.** A metabolic hormone in crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In: *Endocrinology of selected invertebrate types*, edited by H. Laufer and R.G.H. Downer. p. 315-326, 1988.
- Keller, R., S. Grau and I.M. Cooke.** Quantitation of peptide hormone in single cultured secretory neurons of the crab, *Cardisoma carnifex*. *Cell Tissue Res.* 281: 525-532, 1995.
- Khayat, M., O. Shenker, B. Funkenstein, M. Tom, E. Lubzens and A. Tietz.** Fat transport in the Penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Isr. J. Aquacult. Bamigdes* 46: 22-32, 1994.
- Koshio, S., L. E. Haley and J.D. Castell.** The effect of two temperatures and salinities on growth and survival of bilaterally eyestalk ablated and intact juvenile American lobsters, *Homarus americanus*, fed brine shrimp. *Aquaculture* 76: 373-382, 1989.
- Koshio, S., R.K. O'Dor and J.D. Castell.** The effect of different dietary energy levels on growth and survival of eyestalk ablated and intact juvenile lobsters *Homarus americanus*. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 160-169, 1990.

- Koshio, S., R.K. O'Dor and J.D. Castell. The effect of different dietary energy levels in crab-protein-based diets on digestibility, oxygen consumption, and ammonia excretion of bilaterally eyestalk-ablated and intact juvenile lobsters, *Homarus americanus*. *Aquaculture* 108: 282-297, 1992.
- Koskela, R.W., J.G. Greenwood and P.C. Rothlisberg. The influence of prostaglandin E2 and the steroid hormones, 17 α -hydroxyprogesterone and 17 β -estradiol on moulting and ovarian development in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell, 1879 (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 101A: 295-299, 1992.
- Kulkarni, K.G. and R. Nagabhushanam. Mobilization of organic reserves during ovarian development in a marine Penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture* 18: 373-377, 1979.
- Kulkarni, K.G. and M. Fingerman. Effects of 5-hydroxytryptamine agonist on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C: 419-423, 1992.
- Kuo, C.-M., C.-R. Hsu and C.-Y. Lin. Hyperglycaemic effects of dopamine in tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 135: 161-172, 1995.
- Lachaise, F., A. Le Roux, M. Hubert and R. Lafont. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (A Review). *J. Crust. Biology.* 13: 198-234, 1993.
- Laufer, H., J.S.B. Ahl and A. Sagi. The role of juvenile hormone in crustacean reproduction. *Amer. Zool.* 33: 365-374, 1993.
- Laverdure, A.M., M. Breuzet, D. Soyez and J. Becker. Detection of the mRNA encoding vitellogenesis inhibiting hormone in neurosecretory cells of the X-Organ in *Homarus americanus* by *in situ* hybridization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 443-450, 1992.
- Lawrence, A.L., Y. Akamine, B.S. Middleditch, G. Chamberlain and D. Hutchins. Maturation and reproduction of *Penaeus setiferus* in captivity. *Proc. World Maricult. Soc.* 11: 481-487, 1980.
- Lee, R.F., L. Kelsey and H. Gulick. Changes in the concentration of female specific high density lipoproteins in the hepatopancreas, ovaries and oocytes of different stages of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Am. Zool.* 31: 115, 1991.
- Lee, R.F. and A. Walker. Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 271: 401-412, 1995.
- Leung-Trujillo, J.R. and A.L. Lawrence. The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. *J. World Maricult. Soc.* 16: 258-266, 1985.
- Lindsay, L.L. and W.H. Clark Jr. Signal transduction during shrimp oocyte activation by extracellular Mg roles of inositol 1,4,5-trisphosphate, tyrosine kinases and G-proteins. *Development.* 120: 3463-3472, 1994.
- Liu, L., H. Laufer, Y. Wang and T. Hayes. A neurohormone regulating both methyl farnesoate synthesis and glucose metabolism in a Crustacean. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 237: 694-701, 1997.
- Lovrich, G.A. and P. Ouellet. Patterns of growth and triacylglycerol content in snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) zoeal stages reared in the laboratory. *Marine Biology.* 120: 585-591, 1994.
- Lubzens, E., M. Khayat, T. Ravid, B. Funkernstein and A. Tietz. Lipoproteins and lipid accumulation within the ovaries of penaeid shrimp. *Isr. J. Aquacult. Bamigdesh.* 47: 185-195, 1995.
- Luis, O.J. and A.C. Ponte. Control of reproduction of the shrimp *Penaeus kerathurus* held in captivity. *J. World Aquacul. Soc.* 24: 31-39, 1993.
- Lumare, F. Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture* 18: 203-214, 1979.
- Lüschen, W., A. Willig and P.P. Jaros. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the Decapod Crustacean, *Carcinus maenas* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C: 291-296, 1993.
- Lynn, J., M.C. Pillai, P.S. Glas and J.D. Green. Comparative morphology and physiology of egg activation in selected Penaeoidea. In: *Frontiers of shrimp research*, edited by P.F. DeLoach, W.J. Dougherty, and

- M.A. Davidson. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publisher, p. 47-64, 1991.
- Lytle, J.S. and T.F. Lytle. Fatty acid composition and variations in individual bloodworms. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 315-318, 1990.
- Lytle, J.S., T.F. Lytle and J.T. Ogle. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 89: 287-299, 1990.
- Makinouchi, S. and J. Honculda-Primavera. Maturation and spawning of *Penaeus indicus* using different ablation methods. *Aquaculture* 62: 73-81, 1987.
- Mantel, L.H. Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *Amer. Zool.* 25: 253-263, 1985.
- Mantiri, D.M.H., G. Negre-Sadargues, G. Charmantier, J.-P. Trilles, J.C.G. Milicua and R. Castillo. Nature and metabolism of carotenoid pigments during the embryogenesis of the European lobster *Homarus gammarus*. (Linné, 1758). *Comp. Biochem. Physiol.* 115A: 237-241, 1996.
- Marsden, G. E., J. McGuren, H.Z. Sarac, A.R. Neill, I.J. Brock and C.L. Palmer. Nutritional composition of some natural marine feeds used in prawn maturation. In: *Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop*, edited by G.L. Allan, and W. Dall. Salamander Bay, Australia. p. 82-86, 1992.
- Marsden, G.E., J. McGuren, S.W. Hansford and M.J. Burke. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145-156, 1997.
- Mattson, P.M. and E. Spaziani. 5-Hydroxytryptamine mediates release of molt-inhibiting hormone activity from isolated crab eyestalk ganglia. *Biol. Bull.* 169: 246-255, 1985.
- Méndez, L. Importancia de los minerales durante el crecimiento y reproducción de camarones del género *Penaeus*. 113 p. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, 1999.
- Méndez, L. B. Acosta y I. Racotta. Mineral concentrations in muscle and hepatopancreas of newly caught wild and hatchery-exhausted spawners of Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*) *J. Appl. Aquacult.* 8: 17-26, 1998.
- Mendoza, R. A. Revol, C. Fauvel, J. Patrois and J.-C. Guillaume. Influence of squid extracts on the triggering of secondary vitellogenesis in *Penaeus vannamei*. *Aquacult. Nutrition.* 3: 55-63, 1997.
- Mercado-Allen, R. Changes in the blood chemistry of the american lobster, *Homarus americanus*, H. Milne Edwards, 1837, over the molt cycle. *J. Shellfish Res.* 10: 147-156, 1991.
- Meusy, J.J. GM, D. Soyez, J.E. Van Deijnen and J.M. Gallo. Immunochemical and immunocytochemical studies of the crustacean vitellogenesis inhibiting hormone (VIH). *Gen. Comp. Endocrinol.* 67: 333-341, 1987.
- Meusy, J.J. and G.P. Payen. Female reproduction in Malacostracan Crustacea. *Zool. Sci.* 5: 217-265, 1988.
- Meyers, S.P. and T. Latscha. Carotenoids. In: *Crustacean Nutrition*, edited by L.R. D'Abramo, D.E. Conklin, and D.M. Akiyama. Baton Rouge, Louisiana, World Aquaculture Society, p. 164-193, 1997.
- Middleditch, B.S., S.R. Missler, D.G. Ward, J.B. McVey, A. Brown and A.L. Lawrence. Maturation of Penaeid shrimp: dietary fatty acids. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 472-476, 1979.
- Middleditch, B.S., S.R. Missler, H.B. Hines, E.S. Chang, J.B. McVey, A. Brown and A.L. Lawrence. Maturation of penaeid shrimp: lipids in the marine food web. *Proc. World Maricult. Soc.* 11: 463-470, 1980a.
- Middleditch, B.S., S.R. Missler and H.B. Hines. Metabolic profiles of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation. *J. Chromatography.* 195: 359-368, 1980b.
- Millamena, O.M. and F.P. Pascual. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* Fabricius broodstock from the wild. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 116-121, 1990.
- Millamena, O.M., R. Pudadera and M.R. Catacutan. Tissue lipid content and fatty acid composition during ovarian maturation of ablated *Penaeus monodon*. *Isr. J. Aquacult. Bamigdes.* 45: 120-125, 1993.
- Mohamed, K. S. and A.D. Diwan. Biochemical changes in different tissues during yolk synthesis in marine

- prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian J. Marine Sci.* 21: 30-34, 1992.
- Montaño M. and J.C. Navarro. Fatty acid of wild and cultured *Penaeus vannamei* larvae from Ecuador. *Aquaculture* 142: 259-268, 1996.
- Mourente, G., A. Medina, S. Gonzalez and A. Rodriguez. Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Marine Biol.* 110: 21-28, 1991.
- Mourente, G., A. Medina, S. Gonzalez and A. Rodriguez. Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture* 130: 187-199, 1995.
- Nan, F.H., S.S. Sheen, P.C. Liu and S.N. Chen. The effect of eyestalk ablation on growth, haemolymph composition and gill Na⁺, K⁺ - ATPase activity of *Penaeus monodon* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 621-626, 1993.
- Nan, F.-H., S.-S. Sheen, Y.-T. Cheng and S.-Nan Chen. The effects of eyestalk ablation on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile shrimp *Penaeus monodon*. *Zoological Studies.* 34: 265-269, 1995.
- Navarro, J.C., F. Amat and S. Sargent. The lipids of the cysts of freshwater- and marine- type *Artemia*. *Aquaculture* 109: 327-336, 1993.
- Newsom J.E. and K.B. Davis. Osmotic responses of haemolymph in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. zonangulus*) to changes in temperature and salinity. *Aquaculture* 126: 373-381, 1994.
- O'Leary C.D. and A.D. Matthews. Lipid class distribution and fatty acid composition of wild and farmed prawn, *Penaeus monodon* (Fabricus). *Aquaculture* 89: 65-81, 1990.
- Ouellet, P., C.T. Taggart and K.T. Frank. Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 368-378, 1992.
- Pasquet, H., J. Gabaudan and G. Cuzon. Biological efficacy of ascorbate polyphosphate in shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 124: 220-221, 1994.
- Petit, H., S. Sance, G. Negre-Sadargues, R. Castillo and J.P. Trilles. Ontogeny of carotenoid metabolism in the prawn *Penaeus japonicus* Bate (1888) (Crustacea: Penaeidea). A qualitative approach. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B: 667-671, 1991.
- Primavera, J. H. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In: *Proceedings of the First International Conference on the culture of Penaeid Prawn/Shrimp*, edited by Y. Taki, J.H. Primavera, J.A. Llobrera. Iloilo City, Philippines, p. 47-64, 1985.
- Quackenbush, L.S. Yolk protein production in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Crust. Biol.* 9: 509-516, 1989.
- Quackenbush, L.S. Yolk synthesis in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.* 3A: 711-714, 1992.
- Quinitio, E.T., A. Hara, K. Yamauchi and S. Nakao. Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C: 21-26, 1994.
- Ramos, L., J.M. Molina, L. Pérez and B. Torres. Producción de nauplios de *Penaeus schmitti* en instalaciones comerciales de maduración en Cuba. *Rev. Inv. Biol.* 15: 28-38, 1994.
- Rao, K.V.R. and P. Surendranath. Neuroendocrine regulation of lipid metabolism in the juvenile marine crab, *Scylla serrata* (Forsk.) *Natl. Acad. Sci. Lett.* 15: 373-376, 1992.
- Rees J.F., K. Cure, S. Piyatitivorakul, P. Sorgeloos and P. Menasveta. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture* 122: 193-207, 1994.
- Richardson, G.H., M. Decaraman and M. Fingerma. The effect of biogenic amines on ovarian

- development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C: 53-56, 1991.
- Robertson, L., W.A. Bray, T.M. Samocha and A.L. Lawrence. Reproduction of Penaeid shrimp: an operation guide. In: *CRC Handbook of Mariculture*, edited by J.P. McVey. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, p. 107-132, 1993.
- Romdhane M.S., B. Devresse, Ph. Leger and P. Sogeloos. Effect of feeding (w-3) HUFA-enriched *Artemia* during progressively increasing period on the larviculture of freshwater prawn. *Aquacul. Int.* 3: 236-242, 1995.
- Rosas, C., I. Fernandez, R. Brito and E. Díaz-Iglesia. The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the pink shrimp, *Penaeus notialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A: 183-187, 1993.
- Rosas, C., A. Sanchez, P. Gallardo, J. Quiroz, G. Gaxiola, L.A. Soto and E. Díaz-Iglesia. Oxygen consumption and ingestion rate of *Penaeus setiferus* larvae fed *Chaetoceros ceratosporum*, *Tetraselmis chunii* and *Artemia* nauplii. *Aquacult. Nutrition.* 1: 13-20, 1995.
- Rosas, C., A. Sanchez, E. Díaz, L.A. Soto, G. Gaxiola, R. Brito. Effect of dietary protein level on apparent heat increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. shmitti*, *P. duorarum*, and *P. notialis* postlarvae. *J. World Aquacult. Soc.* 27: 92-102, 1996.
- Sáenz, P.G. and F.J. Magallón. *Análisis de las posibilidades del cultivo del camarón Pacífico Mexicano*. Instituto Nacional de la Pesca. 7: 1-29, 1989.
- Sagi, A., J.S.B. Ahl, H. Danaee and H. Laufer. Methyl farneosate levels in male spider crabs exhibiting active reproductive behavior. *Horm. Behav.* 28: 261-272, 1994.
- Sagi, A., M. Rise, K. Isam and S. Arad. Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 309-313, 1995a.
- Sagi, A., J. Silkovsky, S. Fleisher-Berkovich, A. Danon and R. Chayoth. Prostaglandin E2 in previtellogenesis ovaries of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Synthesis and effect on the level of cAMP. *General Comp. Endocrin.* 100: 308-313, 1995b.
- Salares, V.R., N.M. Young, H.J. Bernstein and P.R. Carey. Mechanisms of spectral shifts in lobster carotenoproteins: The resonance raman spectra of ovoverdin and the crustacyanins. *Biochem. Biophys. Acta* 576: 176-191, 1979.
- Santos, E.A., L.E.M. Nery and G.C. Manzoni. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda: Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 89A: 329-332, 1988.
- Santos, E.A., L.E.M. Nery, R. Keller and A.A. Goncalves. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiol. Zool.* 70: 415-420, 1997.
- Sarajini, R., R. Nagabhushanam and M. Fingerman. *In vivo* inhibition by dopamine of 5-hydroxytryptamine-stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Experientia.* 51: 156-158, 1995.
- Shenker, O., A. Tietz, M. Ovadia and M. Tom. Lipid synthesis from acetate by the *in vitro* incubated ovaries of the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Marine Biol.* 117: 583-589, 1993.
- Simon, C.M. Large-scale commercial application Penaeid shrimp maturation technology. *J. World Maricult. Soc.* 13: 301-312, 1982.
- Simpson, K.L., S.T.C. Tsou and C.O. Chichester. *Biochemical Methodology for the assessment of carotens*. Washington: IVACG, 46 p. 1987.
- Spaargaren, D.H. and P.A. Haefner Jr. Interaction of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II. Biochemical relationships. *J. Crust. Biol.* 14: 6-19, 1994.
- Spaziani, E., R.J. Havel, R.L. Havel, L. Hamilton, D.A. Hardman, J.B. Stoudemire and R.D. Watson. Properties of serum high-density lipoproteins in the crab, *Cancer antennarius* Stimpson. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 307-314, 1986.

- Spaziani, E. Serum high-density lipoprotein in the crab, *Cancer antennarius* Stimpson: II. Annual cycles. *J. Exper. Zool.* 246: 315-318, 1988.
- Sudha, K. and G. Anilkumar. Seasonal growth and reproduction in a highly fecund brachyuran crab, *Metapograpus messor* (Forsk.) (Grapsidae). *Hydrobiologia* 319: 15-21, 1996.
- Surendranath P., K. Ramanaiah and K.V. Ramana-Rao. Effect of eyestalk extract and kelthane on Penaeid prawn *Metapenaeus monoceros* (Fabricius). *Indian J. Exper. Biol.* 30: 676-679, 1992.
- Suzuki, S. Effect of Y-organ ablation on oocyte growth in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *Biol. Bull.* 170: 350-355, 1986.
- Taggart, P, T. LaMazza and M. Landau. Effect of solubilization on the binding activity of a G-protein from the mandibular organ of the lobster *Homarus americanus* (Nephropidae, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 112B: 205-208, 1995.
- Takanayagi, H., Y. Yamamoto and N. Takeda. An ovary-stimulating factor in the shrimp, *Paratyca compressa*. *J. Exp. Zool.* 240: 203-209, 1986.
- Tan-Fermin, J.D. and R.A. Pudadera. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 77: 229-242, 1989.
- Teichert-Coddington, D.R. and R. Rodriguez. Semi-intensive commercial grow-out of *Penaeus vannamei* fed diets containing differing levels of crude protein during wet and dry season in Honduras. *J. World Aquacult. Soc.* 26: 72-79, 1995.
- Telford, M. Blood glucose in crayfish-I. Variations associated with molting. *Comp. Biochem. Physiol.* 47A: 461-468, 1974.
- Telford, M. Blood glucose in crayfish-III. The source of glucose and role of the eyestalk factor in hyperglycemia of *Cambarus robustus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 51B: 69-73, 1975.
- Teshima, S. Sterol metabolism. In: *Proceedings of the 2nd. International Conference on Aquaculture Nutrition*, edited by G.D. Pruder, C.J. Langdon and D.E. Conklin. Louisiana State Univ, Baton Rouge. p. 205-216, 1982.
- Teshima, S., A. Kanzawa, K. Horinouchi and S. Koshio. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus japonicus*: induced maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 54: 1123-1129, 1988.
- Teshima, S.-I., A. Kanazawa, S. Koshio and K. Horinouchi. Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 45-49, 1989.
- Tidwell, J.H., C.D. Webster, J.D. Sedlacek, P.A. Weston, W.L. Knight, S.J. Hill Jr, L.R. D'Abramo, W.H. Daniels, M.J. Fuller and J. Labrenty-Montañez. Effects of complete and supplemental diets and organic pond fertilization on production of *Macrobrachium rosenbergii* and associated benthic macroinvertebrate populations. *Aquaculture* 138: 169-180, 1995.
- Tom, M., M. Goren and M. Ovadia. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 12: 1-12, 1987.
- Torrison, O.J. and R. Christiansen. Requirements for carotenoids in fish diets. *J. Appl. Ichtyol.* 11: 225-230, 1995.
- Treece, G.D. and J.M. Fox. *Design, operation and training manual for an intensive culture shrimp hatchery*. Texas A&M University Sea Grant College Program, Texas. p. 183, 1993.
- Triño, A.T. and J.C. Sarroza. Effect of a diet lacking in vitamin and mineral supplements on growth and survival of *Penaeus monodon* juveniles in a modified extensive culture system. *Aquaculture* 136: 323-330, 1995.
- Tsukimura, B. and F.I. Kamemoto. *In vitro* stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ

- secretions in the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 92: 59-66, 1991.
- Van Herp, F.** Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in Crustacea. *Invert. Reprod. Develop.* 22: 21-30, 1992.
- Vapopoulou, X. and C.G.H. Steel.** Vitellogenesis in the terrestrial isopod, *Oniscus asellus* (L.): characterization of vitellins and vitellogenins and changes in their synthesis throughout the intermolt cycle. *Invert. Reprod. Develop.* 28: 87-95, 1995.
- Vázquez-Boucard, C.** Etude de la reproduction chez les crevettes peneides; nature et devenir de la masse vitelline: aspects fondamentaux et appliqués. Thèse de Doctorat, Centre d'Océanologie de Marseille, France. 171 p. 1990.
- Vázquez-Boucard, C., H.J. Ceccaldi, Y. Benyamin and C. Roustan.** Identification, purification, et caractérisation de la lipovitelline chez un Crustacé Natantia *Penaeus japonicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 97: 37-50, 1986.
- Vázquez-Boucard, C., R. Galois and H.J. Ceccaldi.** Variations circadiennes des lipides et lipoprotéines de l'hémolymphe, et des lipides de l'hépatopancréas, chez la crevette *Penaeus japonicus*. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 97: 87-93, 1989.
- Velasco, M., A.L. Lawrence and W.H. Neil.** Effects of dietary protein and phosphorus on aquacultural water quality. In: *Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. U.A.N.L., México, 1996
- Villarreal, H., P. Hinojosa and J. Naranjo.** Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A: 331-336, 1994.
- Webster, S.G. and R. Keller.** Purification, characterisation and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J. Comp. Physiol.* 156B: 617-624, 1986.
- Weidner D. and R. Rosenberry.** World shrimp farming. In: *Proceedings of the special session on shrimp farming*, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. p. 1-21, 1992.
- Wheatly, M.G. and M.K. Heart.** Hemolymph ecdysone and electrolytes during the molting cycle of crayfish: a comparison of natural molts with those induced by eyestalk removal or multiple limb autotomy. *Physiol. Zool.* 68: 583-607, 1995.
- Wickins, J.F., T.W. Beard and A.R. Child.** Maximizing lobster, *Homarus gammarus* (L.), egg and larval viability. *Aquacult. Res.* 26: 379-392, 1995.
- Wilder, M.N., S. Okada, N. Fusetani and K. Aida.** Hemolymph profiles of juvenoids substances in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in relation to reproduction and molting. *Fish Sci.* 61: 175-176, 1995.
- Wilder, N.M., T. Okumura and K. Aida.** Accumulation of ovarian ecdysteroids in synchronization with gonadal development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zool. Sci.* 8: 919-927, 1991.
- Wilkenfeld, S.J.** Commercial hatchery status report: an industry panel viewpoint. In: *Proceedings of the special session on shrimp farming*, edited by J. Wyban. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA p. 71-83, 1992.
- World Shrimp Farming.** (ed. R. Rosenberry), Annual report shrimp news international, San Diego, CA, 1995.
- World Shrimp Farming.** (ed. R. Rosenberry), Annual report shrimp news international, San Diego, CA, 1996.
- World Shrimp Farming.** (ed. R. Rosenberry), Annual report shrimp news international, San Diego, CA, 1997.
- Wyban, J., G. Martinez and J.N. Sweeney.** Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquacult.* 28: 59-62, 1997.

- Xu, X.L., W.J. Ji, J.D. Castell and R.K. O'Dor. Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*. *Aquaculture* 127: 29-40, 1994.
- Yagi, H., H.J. Ceccaldi and R. Gaudy. 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, 1990.
- Yano, I. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone. *Aquaculture* 47: 223-229, 1985.
- Yano, I. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.* 99: 547-553, 1988.
- Yano, I. Effect of thoracic ganglion on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquacult.* 21: 9-14, 1992.
- Yano, I., R.A. Kanna, R.N. Oyama and J.A. Wyban. Mating behaviour in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.* 97: 171-175, 1988a.
- Yano I., B. Tsukimura, J.N. Sweeney and J.A. Wyban. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. *J. World Aquacul. Soc.* 19: 204-209, 1988b.
- Zagalsky, P.F., E.E. Eliopoulos and J.B.C. Findlay. The architecture of invertebrate carotenoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 97: 1-18, 1990.

OBJETIVOS

GENERALES

- Analizar las causas fisiológicas del agotamiento reproductivo, y su influencia sobre la calidad larvaria y la condición general del reproductor en camarones de la especie *Penaeus vannamei* bajo condiciones de cultivo comercial.
- Proponer alternativas al agotamiento reproductivo en camarones de la especie *Penaeus vannamei* bajo condiciones de cultivo comercial.

PARTICULARES

- Establecer los parámetros bioquímicos que se encuentren correlacionados con la fertilización y supervivencia de larvas a lo largo de un ciclo reproductivo en un laboratorio de producción comercial.
- Determinar si el agotamiento reproductivo se refleja en estadios larvarios avanzados.
- Analizar funcionalmente los parámetros relacionados con la acumulación de reservas energéticas de los reproductores.
- Caracterizar la maduración ovárica por medio del análisis histológico y establecer el efecto del agotamiento reproductivo en el reclutamiento y maduración de ovocitos.
- Caracterizar los cambios en la composición bioquímica de los distintos estadios reproductivos y cómo se modifican éstos a lo largo del período útil de producción.
- Comparar el desempeño reproductivo de hembras ablacionadas con el de intactas.
- Evaluar el uso de reproductores domesticados en términos de producción, condición del reproductor y calidad larvaria.

CAPÍTULO I

**COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE HUEVOS Y NAUPLIOS DEL
CAMARÓN BLANCO *Penaeus vannamei*,
EN RELACIÓN A LA CONDICIÓN FISIOLÓGICA
DE LOS REPRODUCTORES EN UN LABORATORIO COMERCIAL**

ARTICULO (Publicado):

Palacios, E., A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, G. Portillo and I.S. Racotta. 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, 1998.

ABSTRACT

In this study, acylglycerides (AG), cholesterol, and glucose were measured in nauplii of *Penaeus vannamei* to explain high and low survival rates from nauplii to zoea in a commercial hatchery. AG and glucose levels were significantly higher in nauplii that had increased survival rates to zoea. No significant differences were found in nauplii size or cholesterol levels. The influence of the long-term effect of ablation of broodstock on the biochemical composition of egg and nauplii was also determined. As the days after ablation increased, glucose and AG level in eggs, and glucose levels in nauplii decreased. The broodstock, 96 days after ablation had higher fecundity and body length, but the more recently ablated broodstock (18 days) produced the largest nauplii, which could indicate a higher development rate. A nauplii condition index was calculated from nauplii AG levels, percentage of viable nauplii, and nauplii length. A decline in this condition index was observed with increased days after ablation. The biochemical composition of egg and nauplii can be associated with the physiological status of the broodstock. In turn, the hatching success and survival to zoea are affected by the fuel levels. The differences in egg and nauplii fuels from broodstock with different time in production after ablation suggests that reproductive exhaustion of the broodstock is also related to insufficient metabolic fuel that, in turn, has an effect on larval viability.

INTRODUCTION

Larval rearing and survival is one of the critical steps of shrimp farming. A simple method to determine the probability of survival from nauplii to postlarvae is desirable. In an effort to assess survival, several methods have been proposed to determine the condition of larvae of different species used in aquaculture. These methods can be classified as histological and biochemical, or a combination of both. During the nauplii stage, larvae do not feed, therefore they depend on the fuel present in the yolk sac to meet metabolic and energy requirements. Metamorphosis requires a large amount of energy, so nauplii that have more available metabolic fuel have a greater probability of surviving to zoea stages (Lavens et al., 1991; Lovrich and Ouellet, 1994). Likewise, fuel content in the egg can be related to the hatching success of nauplii.

Among the most common fuels used by animal cells are the fatty acids, which are stored in the form of acylglycerides (AG), and glucose (G) stored as glycogen. The advantage of storing AG is that it produces more energy per unit weight, can be stored in a more compact way than glycogen, and has a role in larval buoyancy. Glucose, though, can be mobilized more rapidly from glycogen, and glucose can be used under anaerobic conditions. For crustacean larvae, AG content has gained popularity as a measure of nutritional status, and therefore as a predictor of survival potential among populations (Fraser, 1989; Ouellet et al., 1992; Mourente et al., 1995). AG content can be expressed in relation to larval body weight or to sterol content (AG/sterol). Because the amount of sterol per cell is fairly constant, it can be used as a good predictor of the body mass (Fraser, 1989). Sterols (principally cholesterol) serve as precursors of hormones and as components in cell membranes, and are correlated to the wet weight of shrimp larvae (Fraser, 1989). AG is transferred from the ovary to the eggs, therefore, the AG contents in the eggs can be used to infer the physiological status of the female spawner. Indeed, lipid levels in eggs have been used as nutritional indicators of spawners (Cahu and Quazuguel, 1989; Lavens and Sorgeloos, 1991; Cahu et al., 1995).

In this study, AG, cholesterol (CHO), and G were measured, at a commercial hatchery, in eggs and

nauplii using enzymatic-colorimetric kits in two different experiments. In the first experiment, biochemical variables of nauplii were compared between periods of high and low survival rates from nauplii to zoea. In the second experiment, egg and nauplii biochemical and productive variables were evaluated at different periods of the hatchery cycle, i.e., 18, 34, 76, and 96 days after ablation of broodstock, referred to as time in production.

MATERIAL AND METHODS

Penaeus vannamei (Boone) shrimp were ablated and brought to maturation in the commercial hatchery Acuacultores de la Paz (APSA). Shrimp were stocked under the following conditions: 25 m² black fiberglass maturation tanks, six animals/m², 1:1 male to female ratio, 200% daily water exchange, 28°C and 36‰ (average temperature and salinity). After a one-week acclimation period during which 80% of the animals molted, females were subjected to unilateral eyestalk ablation by cutting and pinching. The diet was composed of 40% squid, 15% polychaetes, 40% clams, and 5% of a commercial maturation diet (Rangen Inc., Idaho, USA) divided into five daily rations accounting for a total daily supply of 10% of biomass, except when indicated (see Experiment I).

Experiment I

Biochemical variables were analyzed in nauplii samples obtained from APSA during three different periods: 6 August, when the survival in APSA from nauplii to zoea was high (80%); 23 September, when the survival from nauplii to zoea decreased to 20%, and 4 November, when the survival to zoea recovered to 75%. The difference in survival was attributed to an absence of polychaete (bloodworms) in the maturation diet from 21 August and until 27 September. The 15% of polychaete in the diet was replaced by an equal proportion of clams. A minimum of 15 viable spawns were assessed for each group. A nauplii sample (30 larvae) from each spawn was used to determine nauplii size (rostrocaudal length) using light microscopy and a micrometer. Another sample was collected for biochemical analysis. The percentage of viable nauplii was estimated by stirring the tanks and counting four subsamples after positive phototropism and negative geotaxis selection. Nauplii were reared to the zoea stage and an estimation of the percentage of survival to zoea was made.

Experiment II

Spawns from four maturation tanks with broodstock at each of four different days of the hatchery cycle were used (18, 34, 76, and 96 days after ablation). Gonad development was monitored daily, and mature females with an attached spermatophore were placed in individual 160-L spawning tanks in the evening. After spawning, each female was measured (total length and first abdominal segment width), weighed, and returned to the maturation tank. Number of eggs (fecundity) and nauplii per spawn were estimated by stirring the tanks and counting four subsamples. Egg and nauplii samples were collected for biochemical and morphometric analysis. The diameter and percentage of fertilization were evaluated in egg samples, and larval size and percentage of viable nauplii were estimated as in experiment I.

Biochemical Analysis

For the biochemical analysis, each egg and nauplii sample was concentrated using a 75 μm mesh and filtration under a vacuum. The egg and nauplii mass was collected from a Millipore filter, weighed, resuspended in 1.5 mL isotonic saline solution, homogenized with a Polytron, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Enzymatic-colorimetric analyzes for glucose (GOD-PAP, Merck), AG (GPO-PAP, Merck), and cholesterol (Chod-PAP, Merck) were made on the supernatant fluid, with an adaptation for small samples using ELISA-microplates.

Statistical Analysis

One-way analysis of variance followed by Newman-Keuls post-hoc mean comparisons were made to assess significant differences by effect of survival to zoea or by days after ablation. The percentage of fertilization and survival values were transformed to an arcsine for the analysis. Regression analysis was used to determine the relationship between the independent variables, spawner weight and length, and the dependent variables, fecundity, hatching rate, nauplii size, and biochemical values. The percentage of viable nauplii was estimated as the number of viable nauplii relative to the number of eggs spawned by a female. The nauplii condition index (NCI) was estimated from the following equation:

$$\text{NCI} = (\text{nauplii AG}) \times (\% \text{ viable nauplii}) \times (\text{nauplii length})/100$$

Data are reported as mean \pm standard error. The level of significance was accepted at $P < 0.05$.

RESULTS

Experiment I

Table 1. Differences in egg fertilization and metabolic fuels (means \pm SE) in *P. vannamei* nauplii during high and low survival to zoea in a commercial hatchery.

	High (80%)	Low (20%)	Recovered (75%)	ANOVA
% Egg fertilization (arcsin)	36.01 (0.43 \pm 0.06 ^a)	75.38 (0.85 \pm 0.04 ^b)	41.2 (0.47 \pm 0.05 ^a)	$P < 0.05$
Nauplii G (mg/g)	1.74 \pm 0.14 ^a	1.12 \pm 0.07 ^b	2.11 \pm 0.12 ^c	$P < 0.001$
Nauplii AG (mg/g)	10.84 \pm 0.45 ^a	9.38 \pm 0.34 ^b	10.58 \pm 0.73 ^a	$P < 0.05$
Nauplii CHO (mg/g)	2.90 \pm 0.27	2.36 \pm 0.07	2.44 \pm 0.20	N.S.
AG/CHO ratio	3.95 \pm 1.55	4.03 \pm 0.80	4.35 \pm 1.81	N.S.
G/CHO ratio	0.81 \pm 0.18 ^a	0.48 \pm 0.17 ^b	0.64 \pm 0.29 ^c	$P < 0.001$
Nauplii size (μm)	375.2 \pm 2.9	373.0 \pm 4.7	372.0 \pm 1.3	N.S.

N.S.: Not significantly different. Values with a different superscript in the same row are significantly different.

AG = acylglycerides; G = glucose; CHO = cholesterol.

The biochemical composition and size of the nauplii with different survival to zoea are given in Table 1. Spawns with a high survival to zoea had increased nauplii levels of AG ($P < 0.05$), glucose ($P < 0.001$) and G/CHO ratios ($P < 0.001$). Egg fertilization was higher in spawns with a lower survival to zoea ($P < 0.05$). When survival from nauplii to zoea recovered (75%), the levels of AG and glucose also returned to initial or even higher values. There were no significant differences in nauplii size and cholesterol levels among the three groups.

Experiment II

The morphometric characteristics of female spawners, fecundity and nauplii number from the four maturation tanks with different times in production after ablation are shown in Table 2. Significant lower body weight and length were observed for the females 18 days postablation, compared to the other three groups. The fecundity was also affected by days after ablation with a minimum value for the 34 day group and a maximum for the 96 day group ($P < 0.05$). There was a significant effect among the four groups on egg fertilization, with higher values for the more recently ablated spawners ($P < 0.05$). Although the number of nauplii that survived from each spawn was not significantly different among the four groups, the relation between the number of eggs and number of nauplii, expressed as a percentage of viable nauplii, was higher for the recently ablated broodstock (30.8%, 25.6%, 23.5%, and 24.5% for 18, 34, 76, and 96 days after ablation).

Table 2. Differences in *P. vannamei* broodstock, egg and nauplii production/spawn (means \pm SE) during a commercial hatchery cycle.

	18 days	34 days	76 days	96 days	ANOVA
Female body weight (g)	43.6 \pm 2.2 ^a	49.7 \pm 1.9 ^b	55.8 \pm 1.8 ^b	51.2 \pm 2.2 ^b	$P < 0.05$
Female length (cm)	17.2 \pm 0.3 ^a	18.0 \pm 0.2 ^b	18.3 \pm 0.2 ^b	18.3 \pm 0.4 ^b	$P < 0.01$
Female width (cm)	1.77 \pm 0.04	1.87 \pm 0.05	1.89 \pm 0.03	1.89 \pm 0.03	N.S.
No. eggs $\times 10^3$	185.6 \pm 13.3 ^{ab}	149.4 \pm 19.4 ^a	188.2 \pm 11.8 ^{ab}	217.7 \pm 12.9 ^b	$P < 0.05$
% fertilization (arcsin)	54.9 (0.73 \pm 0.13 ^a)	39 (0.43 \pm 0.16 ^{ab})	27.8 (0.30 \pm 0.09 ^b)	33.1 (30.37 \pm 0.10 ^b)	$P < 0.05$
No. nauplii $\times 10^3$	57.2 \pm 8.8	38.3 \pm 8.2	44.2 \pm 5.2	53.3 \pm 6.5	N.S.

N.S.: not significantly different. Values with a different superscript in the same row are significantly different.

The biochemical composition and size of eggs from broodstock from different days in production are given in Table 3. There was a significant decrease of glucose in the eggs as days after ablation increased ($P < 0.05$). AG levels were the lowest in the eggs of broodstock 96 days after ablation, and highest for eggs from females 34 and 76 days after ablation ($P < 0.01$). No significant differences were found for cholesterol, egg size, and the AG/CHO and G/CHO ratios.

The biochemical composition and size of nauplii from broodstock of different ages are presented in Table 4. There was a significant decrease in the glucose levels of nauplii as days from ablation increased ($P < 0.05$). No significant differences were found for AG levels and AG/CHO and G/CHO ratios in relation to time in production. Nauplii from spawners 18 days after ablation were the largest ($P < 0.05$). The condition index (see methods), calculated from the AG levels in nauplii, nauplii length, and percentage of viable nauplii, significantly decreased as days in production after ablation increased ($P < 0.05$), as can be observed in Table 4.

Table 3. Differences in biochemical variables of *P. vannamei* eggs (means \pm SE) during a commercial hatchery cycle.

	18 days	34 days	76 days	96 days	ANOVA
Glucose (mg/g)	6.35 \pm 0.48 ^a	6.08 \pm 0.40 ^{ab}	5.54 \pm 0.20 ^{ab}	5.34 \pm 0.22 ^b	$P < 0.05$
AG (mg/g)	19.79 \pm 1.53 ^{ab}	20.34 \pm 1.24 ^a	20.28 \pm 0.84 ^a	17.32 \pm 0.67 ^b	$P < 0.01$
Cholesterol (mg/g)	4.31 \pm 0.48	4.73 \pm 0.47	4.07 \pm 0.18	4.37 \pm 0.35	N.S.
Egg size (μ m)	255.9 \pm 7.1	253.6 \pm 5.3	253.2 \pm 5.5	254.4 \pm 6.1	N.S.
AG/CHO ratio	6.77 \pm 1.85	4.48 \pm 0.56	5.18 \pm 0.23	3.50 \pm 0.34	N.S.
G/CHO ratio	1.51 \pm 0.14	1.33 \pm 0.12	1.38 \pm 0.08	1.15 \pm 0.16	N.S.

N.S.: not significantly different. Values with a different superscript in the same row are significantly different. AG = acylglycerides; G = glucose; CHO = cholesterol

Table 4. Differences in biochemical variables of *P. vannamei* nauplii (means \pm SE) during a commercial hatchery cycle.

Postablation	18 days	34 days	76 days	96 days	ANOVA
Glucose (mg/g)	2.08 \pm 0.26 ^a	2.08 \pm 0.13 ^a	1.82 \pm 0.11 ^{ab}	1.36 \pm 0.08 ^b	$P < 0.05$
AG (mg/g)	11.04 \pm 0.84	12.5 \pm 0.23	10.34 \pm 0.71	9.8 \pm 0.56	N.S.
Cholesterol (mg/g)	3.49 \pm 0.71	2.44 \pm 0.26	3.39 \pm 0.39	2.26 \pm 0.23	N.S.
Nauplii length (μ mm)	406.6 \pm 7.2 ^a	375.1 \pm 2.7 ^b	393.1 \pm 2.7 ^{ab}	383.5 \pm 2.6 ^b	$P < 0.05$
AG/CHO ratio	4.04 \pm 0.46	5.37 \pm 0.47	3.61 \pm 0.17	5.51 \pm 0.80	N.S.
G/CHO ratio	0.69 \pm 0.07	0.88 \pm 0.09	0.58 \pm 0.06	0.67 \pm 0.07	N.S.
NCI	1.377 ^a	1.201 ^{ab}	1.061 ^{ab}	0.919 ^b	$P < 0.05$

N.S.: not significantly different. Values with a different superscript in the same row are significantly different. AG = acylglycerides; G = glucose; CHO = cholesterol; NCI = Nauplii condition index.

DISCUSSION

Survival to zoea

In the first experiment, a relation between nauplii AG levels and their survival to zoea can be observed (Table 1). A lower survival from nauplii to zoea in September (i.e. 20%) could be an effect of the elimination of bloodworms from the diet. Bloodworms have been used as a maturation diet because of their high level of polyunsaturated fatty acids (Middledich et al., 1979; Lytle et al., 1990; Luis and Ponte, 1993; Xu et al., 1994). These increase cell membrane fluidity and are precursors to prostaglandins used during spawning and previtellogenesis (D'Croz et al., 1988, Sagi et al., 1995). The fatty acid composition of the diet has been previously reported to have an effect on the hatching success of *Penaeus monodon* (Millamena, 1989). An increase in survival to zoea (i.e. 75%) recorded in November, when bloodworms were again present in the diet, correspond to higher AG and G in nauplii. This indicates that if the broodstock is not adequately fed, has a disease, or is stressed, the transference of AG to the eggs can be affected. Decreased AG levels from egg to zoea and all through nauplii development has been repeatedly reported (Cahu et al., 1988; Chu and Ovsianico-Koulikowsky, 1994; Mourente et al., 1995), because AG reserves must satisfy all the energetic demands of egg and nauplii, including metamorphoses to zoea. Therefore, the levels of AG reserves can be used to infer the probability for survival of nauplii to zoea, or as an estimator of nauplii quality.

Glucose levels were similarly related to the nauplii survival to zoea (Table 1), and can also be used to predict the probability of larval survival, even if it is not generally considered in this context. Glucose can be more rapidly mobilized and metabolized than AG, and a large quantity of glucose is needed before each molt to produce the exoskeleton. The source of glucose in the egg and nauplii remains to be established, but could originate from carbohydrate reserves or be synthesized from glycerol, a product of AG lipolysis.

Reproductive exhaustion by ablation

In the second experiment, reduced levels of glucose and a trend of AG to diminish in nauplii from broodstock with different days of postablation could indicate a potential lower larval quality. A similar but more pronounced change of fuel levels in the eggs to that seen for nauplii from broodstock of different time in production after ablation can be observed (Table 3). As in nauplii, the quantity of fuel present in the egg can determine the developmental rate of subsequent embryonic stages, the rate of hatching success, and survival up to nauplii. Indeed, hatching success or viable nauplii decreased as the time in production of the broodstock increased.

Considering that nauplii increase in length as they reach more advanced stages (Treece and Fox, 1993) and that AG reserves decrease as nauplii develop (Fraser, 1989), the product of these two variables could be an indicator of nauplii condition at their different stages. The percentage of viable nauplii considers hatchability, which is an estimator of the offspring quality (Emmerson, 1980; Xu et al., 1994; Cahu et al., 1995; Hansford and Marsden, 1995). The nauplii condition index is higher for the recently ablated group (i.e. 18 days) and decreases significantly as time in production increases to 96 days, reinforcing the interpretation stated above on larval quality based on AG and glucose levels in eggs and nauplii. Fraser (1989) also proposed that AG content cannot be directly correlated to larval condition because of its dependency on larval size, unless expressed as a AG/sterol ratio, or in relation to larval weight, as it was in our case (i.e. mg/g of wet

weight).

Increased postablation days partially correspond to increased fecundity (i.e. number of eggs/spawn), which is correlated to broodstock body length ($r = 0.57$; $P < 0.001$), a condition previously reported in *P. indicus* by Emmerson (1980) and in *P. monodon* by Hansford and Marsden (1995). In contrast, negative correlations were found between body length of the spawners, and several biochemical variables related to nauplii quality, such as egg glucose ($r = -0.55$; $P < 0.01$), nauplii glucose ($r = -0.40$; $P < 0.05$), and nauplii AG ($r = -0.54$; $P < 0.01$). In accordance, a relation between reduced hatchability with increased spawner size was previously suggested by Hansford and Marsden (1995). According to these results, it is proposed that as time in production after ablation increases, broodstock produce nauplii of lower quality. In fact, it has been reported, that after a few months in a hatchery cycle, ablated females "burn out" and there is a trend to produce lower quality eggs and larvae per spawn (Simon, 1982; Treece and Fox 1993), leading to replacement of broodstock. In the commercial hatchery from which samples were obtained, the useful production period is around three months, after which the spawners are discarded. Ablation produces a hormone imbalance, which promotes gonad maturation, fuel transfer to the eggs, increased spawning, and moulting. All these require mobilization of fuel reserves to meet the energy requirements of the spawners. In accordance, ablated shrimp have been reported to increase their oxygen consumption (Rosas, Fernandez, Brito and Diaz-Iglesia 1993; Nan et al., 1995). Although ablated shrimp usually have increased food intakes that could account for part of the energy expenditure (Rosas et al., 1993), increased energy demand sustained for a long period of time (i.e. several months) may lead to exhaustion of the spawners.

A final point to be discussed is the influence of the two conditions tested on egg fertilization, which is affected by external physicochemical variables, such as ion concentration in the water (Clark et al., 1994; Lindsay and Clark, 1994). Paradoxically, an increased fertilization rate was observed in September (Table 1), when survival to zoea was low in spite of the nutritional status of the spawner. A possible explanation can be the water quality during this month, in which the hatchery started diluting the marine water with fresh water and using EDTA in the spawning tanks, which apparently had a positive effect on fertilization success. The second experiment was done during a period of the hatchery when these treatments were not yet applied. As a result, an effect of the time in production on fertilization rates can be observed (Table 2) without the influence of water ion concentration.

In summary, fuel levels (i.e. AG and glucose) of eggs and nauplii can help to predict larval condition or survival probability that in turn is affected by the physiological and nutritional status of the female broodstock. In addition, a nauplii condition index which incorporates several nauplii characteristics such as AG levels, length, and hatching rates is proposed as an indicator of this early larval stage quality. Our current results show this index to be related to the reproductive exhaustion of broodstock occurring after sustained spawning under commercial hatchery conditions.

REFERENCES

- Cahu, C. and P. Quazuguel. Lipid metabolism of *Penaeus vannamei* broodstock: influence of dietary lipids. *Aquaculture Europe*, 10: 45-46, 1989.
- Cahu, C., A. Severe and P. Quazuguel. The variation of lipid content in *Penaeus indicus* during larval

- development. ICES, Mariculture Comittee F22: 11, 1988.
- Cahu, C.L., G. Cuzon and P. Quazuguel.** Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A: 417-424, 1995.
- Chu, K.H. and N.N. Ovsianico-Koulikowsky.** Ontogenic changes in metabolic activity and biochemical composition in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 183: 11-26, 1994.
- Clark, W.H., Jr. F.J. Griffin and A.H. Wikramanayake.** Pre-fusion events of sperm-oocyte interaction in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Develop. Biology.* 5: 25-231, 1994.
- D'Croz, L., L. V. Wong, G. Justine and M. Gupta.** 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, 1988.
- Emmerson, W.D.** Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Fraser, A.J.** Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1868-1873, 1989.
- Hansford, S.W. and G.E. Marsden.** Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J. World Aquacul. Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Lavens, P. and P. Sorgeloos.** Variation in egg and larval quality in various fish and crustacean species. In: *Larvii '91* (ed by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier), pp.221-222 European Aquaculture Society, Belgium, 1991.
- Lavens, P., S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta and P. Sorgeloos.** HUFA levels in eggs of wild and cultured broodstock of *Macrobrachium rosenbergii*. In: *Larvii '91* (ed by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier), pp.260-263 European Aquaculture Society, Belgium, 1991.
- Lindsay, L.L. and W.H. Clark Jr.** Signal transduction during shrimp oocyte activation by extracellular Mg roles of inositol 1,4,5-trisphosphate, tyrosine kinases and G-proteins. *Development.* 120: 3463-3472, 1994.
- Lovrich, G.A. and P. Ouellet.** Patterns of growth and triacylglycerol content in snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) zoeal stages reared in the laboratory. *Marine Biology.* 120: 585-591, 1994.
- Luis, O.J. and A.C. Ponte.** Control of reproduction of the shrimp *Penaeus kerathurus* held in captivity. *J. World Aquacul. Soc.* 24: 31-39, 1993.
- Lytle, J.S., T.F. Lytle and J.T. Ogle.** Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 89: 287-299, 1990.
- Middleditch, B.S., S.R. Missler, D.G. Ward, J.B. McVey, A. Brown and A.L. Lawrence.** Maturation of penaeid shrimp: dietary fatty acids. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 472-476, 1979.
- Millamena, O.M.** Effect of fatty acid composition of broodstock diet on tissue fatty acid patterns and egg fertilization and hatching in pond-reared *Penaeus monodon*. *Asian Fish. Sc.* 2: 127-134, 1989.
- Mourente, G., A. Medina, S. Gonzalez and A. Rodriguez.** Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Marine Biol.* 110: 21-28, 1991.
- Nan, F.-H., S.-S. Sheen, Y.-T. Cheng and S.-Nan Chen.** The effects of eyestalk ablation on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile shrimp *Penaeus monodon*. *Zoological Studies.* 34: 265-269, 1995.
- Ouellet, P., C.T. Taggart and K.T. Frank.** Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 368-378, 1992.
- Rosas, C., I. Fernandez, R. Brito and E. Díaz-Iglesia.** The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the pink shrimp, *Penaeus notialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A: 183-187, 1993.

- Sagi, A., J. Silkovsky, S. Fleisher-Berkovich, A. Danon and R Chayoth.** Prostaglandin E2 in previtellogenis ovaries of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Synthesis and effect on the level of cAMP. *General Comp. Endocrin.* 100: 308-313, 1995.
- Simon, C.M.** Large-scale commercial application penaeid shrimp maturation technology. *J. World Maricult. Soc.* 13: 301-312, 1982.
- Treece, G.D. and J.M. Fox.** *Design, operation and training manual for an intensive culture shrimp hatchery.* Texas A&M University Sea Grant College Program, Texas. 1993, p. 183.
- Xu, X.L., J.D. Castell and R.K. O'Dor.** Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture* 119: 359-370, 1994.

CAPÍTULO II

INDICADORES BIOQUÍMICOS DE LA CALIDAD LARVARIA

AGOTAMIENTO REPRODUCTIVO EN EL CAMARÓN

Penaeus vannamei REFLEJADO EN LA COMPOSICIÓN

BIOQUÍMICA, SUPERVIVENCIA

Y CRECIMIENTO DE LAS LARVAS

ARTICULO (Publicado):

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

ABSTRACT

Penaeus vannamei larval quality in terms of biochemical composition and survival was studied throughout a production period. Spawns from broodstock at three different times during a commercial production period were sampled (15, 45, and 75 days after ablation). Biochemical composition of eggs, nauplii, 15 day old postlarvae (PL15), and growth and survival during culture were determined. As the days after ablation increased, a reproductive exhaustion of spawners was reflected in the energy reserves of the eggs produced. Overall larval performance during culture and survival was considerably higher in recently ablated spawners (15 days) and decreased in spawners 45 and 75 days after ablation. At PL15, a test for larval resistance to a salinity stress was applied that showed a decreased PL condition related to reproductive exhaustion of spawners: Survival to stress decreased from 89% in recently ablated to 68% in larvae produced 45 days after ablation, and to 39% in larvae produced to the end of the spawning period. Nauplii condition index (NCI), calculated from nauplii acylglycerides levels, percentage of viable nauplii, and nauplii length declined in nauplii produced with spawners sampled 45 and 75 days after ablation. This study demonstrated that reproductive exhaustion of shrimp spawners occurs and it becomes largely evident as time in production and after ablation increases: Spawner exhaustion is reflected in the quality of the larvae produced.

INTRODUCTION

The spawning or production period of ablated shrimp in commercial hatcheries begins when females are ablated and ends when shrimp in a maturation tank are replaced. Its duration varies with the species and conditions (Aquacop, 1979; Simon, 1982; Primavera, 1985; Wyban et al., 1987), and spawners are discarded because of a decline in production variables (i.e. spawning frequency, total nauplii production, and survival to zoea). A decrease in hatching rates has been reported in consecutive spawns in the same intermoult period and in subsequent intermoult periods for *P. monodon* (Beard and Wickins, 1980; Hansford and Marsden, 1995), *P. indicus* (Emmerson, 1980), and *P. stylirostris* (Mendoza, 1997). In addition, metamorphosis to zoea I in *P. monodon* has been reported to decrease after 6 to 8 weeks of ablation from 81% to 40% (Simon, 1982), and as a result of successive spawnings (Hansford and Marsden, 1995; Marsden et al., 1997). The decline in production over time has been identified as one of the drawbacks of captive reproduction, and it has been suggested that more biochemical bases are needed to understand the possible causes (see revision by Bray and Lawrence, 1992).

Hatching, nauplii development through a nonfeeding period, and metamorphosis to zoea require large amounts of energy. Eggs with more metabolic reserves and a higher ability to transform this to energy have a greater probability of producing nauplii that will survive to zoea stages (Lavens et al., 1991; Ouellet et al., 1992; Lovrich and Ouellet 1994). The most important biochemical compound for storing energy are acylglycerides (AG), which is transferred to the egg from the spawner. Because of this, lipid levels in the eggs have been used as nutritional indicators of spawners (Cahu and Quazuguel, 1989; Lavens and Sorgeloos, 1991; Cahu et al., 1995). In a previous paper (Palacios et al., 1998), we reported a decreased egg quality in spawners from the end of a spawning period, evaluated by the biochemical composition of eggs. However, the postlarval performance and its association with egg and nauplii quality has not been reported throughout the spawning period. For this purpose, the present study analyzes egg and nauplii biochemical and biometrical variables,

larval performance (growth and survival), and the biochemical composition and resistance to a salinity stress test of postlarvae (PL15) sampled at 15, 45, and 75 days after broodstock ablation.

MATERIALS AND METHODS

Maturation

Third generation domesticated adult white shrimp, *Penaeus vannamei*, were brought to maturation at the commercial hatchery Acuacultores de la Paz, S.A. (APSA). Shrimp were stocked under the following conditions: 25 m² black fiberglass maturation tanks, six animals/m², 1.5:1 male to female ratio, 200% daily water exchange, 28°C and 36‰ (average temperature and salinity). After a one-week acclimation period during which 80% of the animals molted, females were subjected to unilateral eyestalk ablation by cutting. The diet was composed of 40% squid, 15% polychaetes, 40% clams, and 5% of a commercial maturation diet (Rangen Inc., Idaho, USA) divided into five daily rations accounting for a total daily supply of 10% of biomass.

Sampling

Spawns from the same three maturation tanks were used at each of three different sampling periods of a spawning period 15, 45, and 75 days after ablation. Gonad development was monitored daily, and mature females with an attached spermatophore were placed in individual 160 L spawning tanks in the evening. After spawning, each female was measured (total length and first abdominal segment width), weighed, and returned to the maturation tank. All spawns were hatched individually. Number of eggs per spawn (fecundity) was estimated by stirring the spawning tanks and counting three subsamples of 5 ml each. The number of viable nauplii per spawn was estimated in a similar way after positive phototropism selection. For morphometric analysis, 30 eggs at first/second cleavage and 30 nauplii at stage IV were collected per spawn and preserved in 4 % formaldehyde. Egg diameter and nauplii rostrocaudal length was estimated with a light microscope and micrometer. For biochemical analyses, approximately 100 mg of egg and nauplii samples from each spawn were concentrated using a 75 µm mesh, filtered under vacuum, collected in a 5 µm Millipore filter and frozen at -70 °C until further analysis.

Larval culture

A minimum of 29 spawns for each period after ablation (15, 45, and 75 days after ablation) were collected 36 hours after spawning, and nauplii IV were reared till postlarvae 15 stage. Larvae of each spawn were stocked individually under the following conditions: 80 L conical fiberglass tanks, 100 nauplii per L, 28 °C and 36‰ (average temperature and salinity). During larval culture, estimations of survival percentage at each larval substage (zoea I, mysis I, and postlarvae 1) were made. The diet was composed of *Artemia sp.* (from zoea III) and an algae mixture (from nauplii V) of *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, and *Thalassiosira pseudonana*. The algae mixture from nauplii V to zoea III was administered with a continuous feeding system combined with a daily water exchange of 30%. The amount of food and proportion of *Artemia sp.*/algae added was adjusted for each larval stage. At day 1 postlarvae (PL1), the shrimp from spawns that survived to this stage were transferred to 0.3 m² tanks and stocked at a density of 30/L. Feeding at this stage, consisted of *Artemia sp.* (50 to 100 *Artemia*/ PL, depending on the age of the PL)

and dry pellets to satiation with 60% proteins from PL8 on. At PL15, survival from PL1 was determined, total weight, rostrocaudal and abdominal length were recorded ($n=20$ /spawn), a sample for biochemical and morphometric analysis was taken, and a stress test was applied. The stress test consisted of abruptly transferring the PL15 to tap water for 30 minutes, then back again to sea water ($\pm 36\%$) for another 30 minutes, and assessing the percentage of survival in three replicates averaging 50 individuals each.

Biochemical Analysis

The egg, nauplii, and PL15 filtered mass were resuspended in 1.2 ml isotonic saline solution, and homogenized with a Polytron. Enzymatic-colorimetric analyzes for glucose (GOD-PAP, Merck), acylglycerides (GPO-PAP, Merck), and cholesterol (Chod-PAP, Merck) were made with an adaptation for small samples using ELISA-microplates for the supernatant fluid after centrifugation at 3000 rpm for 10 min (Palacios et al., 1998). Proteins (Bradford, 1976) were determined in the crude homogenate after digestion with 0.1 N NaOH. Total carotenoids (Strickland and Parsons, 1972) were extracted from the crude homogenate with acetone:methanol (2:1) and measured by spectrophotometry at 495 nm.

Statistical Analysis

One-way analyses of variance followed by a Tukey test for unequal n *post-hoc* mean comparisons (Statistica Version 4.3) were done to assess significant differences in biochemical composition and morphometric measures between sampling periods. Previous exploratory analysis did not show any differences between the three maturation tanks used during sampling times, so this was not considered as an additional factor to evaluate. Percent fertilization and survival were transformed to arcsine for the analysis (Sokal and Rohlf, 1981). The percentage of viable nauplii was estimated as the number of nauplii obtained after positive phototropism selection, in relation to the number of eggs spawned by the female. A nauplii condition index (NCI) was estimated from the following equation:

$$\text{NCI} = (\text{nauplii AG}) \times (\% \text{ viable nauplii}) \times (\text{nauplii length}) / (100)$$

The NCI was previously reported and justified on the basis of the relationship between AG levels and nauplii development (Palacios et al, 1998). Data are reported as mean \pm standard error. The level of significance was preset at $P < 0.05$.

RESULTS

The morphometric characteristics of female spawners and production per female (fecundity, fertilization, and nauplii number) sampled 15, 45, and 75 days after ablation are shown in Table 1. Significant lower body weight, length, and first abdominal segment width were observed for the females 15 days postablation, compared to the other two sampling periods. The number of eggs and nauplii per spawn were significantly lower when the sampling was done 15 days after ablation than at 45 days. The number of spawns per day was lower when sampling was done 75 days after ablation. There was a significant decrease in the percent of fertilization as the days after ablation increased, although no significant differences were observed for the percent of viable nauplii between the three sampling periods.

Table 1. Broodstock size and egg/nauplii production (means \pm SE) during a commercial spawning period.

	15 days (n=34)	45 days (n=34)	75 days (n=29)	ANOVA
Body weight (g)	33.2 \pm 0.9 ^a	35.9 \pm 0.8 ^b	36.5 \pm 0.9 ^b	$P < 0.05$
Body length (mm)	142.5 \pm 1.7 ^a	148.5 \pm 1.3 ^b	147.4 \pm 1.2 ^b	$P < 0.01$
First Abd. Width (mm)	15.3 \pm 0.2 ^a	16.4 \pm 0.2 ^b	15.9 \pm 0.2 ^b	$P < 0.01$
Total Spawns/day	20 \pm 2 ^a	24 \pm 2 ^a	11 \pm 1 ^b	$P < 0.01$
Eggs/spawn ($\times 10^3$)	178 \pm 9 ^a	237 \pm 15 ^b	224 \pm 20 ^b	$P < 0.01$
% Fertilization/spawn (arcsin)	80.7 (0.94 \pm 0.07 ^a)	71.6 (0.80 \pm 0.06 ^{ab})	61.7 (0.67 \pm 0.06 ^b)	$P < 0.05$
Nauplii/spawn ($\times 10^3$)	86 \pm 8 ^a	116 \pm 11 ^b	101 \pm 7 ^{ab}	$P < 0.05$
Nauplii/day ($\times 10^3$)	697 \pm 116	702 \pm 146	460 \pm 98	N.S.
% Viable Nauplii (arcsin)	59.4 (0.64 \pm 0.07)	45.8 (0.47 \pm 0.06)	52.4 (0.55 \pm 0.09)	N.S.

N.S.: Not significantly different. Values with a different superscript in the same row are significantly different.

Biochemical composition and diameter of eggs from broodstock from different periods of the spawning period are presented in Table 2. Glucose, cholesterol, and total carotenoids in eggs from females at the beginning of the spawning period (15 days) was higher than at the middle of the spawning period (45 days). Glucose and total carotenoids did not decrease significantly in eggs from the middle to the end of the spawning period (75 days), and cholesterol increased from the middle to the end of the spawning period. AG progressively decreased towards the end of the spawning period. There were no significant differences for egg size and proteins between the three sampling periods.

Table 2. Egg morphometric and biochemical variables (means \pm SE) during a commercial spawning period.

	15 days	45 days	75 days	ANOVA
Egg size (μm)	271 \pm 1	270 \pm 1	271 \pm 1	N.S.
Glucose (mg/g)	5.53 \pm 0.32 ^a	4.16 \pm 0.14 ^b	4.41 \pm 0.11 ^b	$P < 0.01$
Acylglycerides (mg/g)	23.19 \pm 0.95 ^a	21.80 \pm 0.77 ^{ab}	20.22 \pm 0.47 ^b	$P < 0.05$
Cholesterol (mg/g)	7.32 \pm 0.19 ^a	5.12 \pm 0.14 ^c	6.81 \pm 0.19 ^b	$P < 0.01$
Proteins (mg/g)	149.31 \pm 6.32	135.26 \pm 5.66	141.90 \pm 5.38	N.S.
Carotenoids ($\mu\text{g/g}$)	7.39 \pm 0.25 ^a	4.81 \pm 0.19 ^b	4.64 \pm 0.21 ^b	$P < 0.01$

N.S.: Not significantly different. Values with a different superscript in the same row are significantly different.

Table 3 contains the results for the analyses of biochemical composition and size of nauplii. There was a significant decrease in nauplii condition index (NCI) towards the end of the spawning period. From the beginning (15 days) to the end of the spawning period (75 days), all biochemical variables decreased, although AG levels were higher in nauplii sampled 45 days after ablation. A significant decrease in morphometric traits was also present, as evidenced by a significantly smaller nauplii as days after ablation increased.

Table 3. Nauplii IV morphometric and biochemical variables (means \pm SE) during a commercial spawning period.

	15 days	45 days	75 days	ANOVA
Length (μm)	371 \pm 2 ^a	350 \pm 5 ^b	332 \pm 3 ^c	$P < 0.01$
Glucose (mg/g)	3.33 \pm 0.10 ^a	3.59 \pm 0.13 ^a	1.14 \pm 0.05 ^b	$P < 0.01$
Acyglycerides (mg/g)	11.70 \pm 0.33 ^a	13.15 \pm 0.40 ^b	6.21 \pm 0.36 ^c	$P < 0.01$
Cholesterol (mg/g)	4.13 \pm 0.12 ^a	3.97 \pm 0.14 ^a	1.50 \pm 0.09 ^b	$P < 0.01$
Proteins (mg/g)	89.98 \pm 2.61 ^a	78.85 \pm 2.75 ^b	65.68 \pm 2.45 ^c	$P < 0.01$
Carotenoids (μg/g)	5.70 \pm 0.25 ^a	4.38 \pm 0.25 ^b	2.40 \pm 0.12 ^c	$P < 0.01$
Condition index (NCI)	2.76 \pm 0.08 ^a	2.38 \pm 0.07 ^b	1.10 \pm 0.06 ^c	$P < 0.01$

Values with a different superscript in the same row are significantly different.

Survival during larval culture is depicted in Fig. 1A. Survival through the zoeal stages was higher for the eggs sampled 45 days after ablation. When the larvae reached the mysis stage, larval survival from the beginning (15 days) and middle (45 days) of the spawning period was similar and almost twice as high than that from larvae sampled to the end of the spawning period (75 days postablation). The survival to PL1 in each spawn significantly decreased for larvae produced from spawners late in the spawning period. Of the individual spawns cultured from nauplii V in each group, 27 of 34 survived when sampling was done 15 days after ablation, 13 of 34 spawns survived to PL1 from the spawns sampled 45 days after ablation, and when sampling was done at the end of the spawning period, only 10 of 29 spawns survived to PL1. Survival to PL15 was divided in two components: The accumulated survival from nauplii IV which includes “zero” values of all spawns that did not reach the PL1 stage (NIV to PL15), and specific survival from PL1 to PL15, where only the values of the spawns that were reared from PL1 to PL15 were considered (PL1 to PL15). Accumulated survival from nauplii IV to PL15 was higher for the larvae sampled 15 days after ablation (Fig. 1B). Survival from PL1 to PL15 was similar for larvae that were sampled 15 and 45 days after ablation, but a further decrease of survival was observed for spawns sampled 75 days after ablation (Fig. 1B). PL15 survival after a salinity stress test decreased significantly, and is shown in Fig. 1B. Similarly, a decrease in relation to postablation days was observed for PL15 length, as can be seen in Table 4. PL15 levels of AG, glucose, and cholesterol were significantly higher when sampling was done at the beginning than at the middle and end of the spawning period (Table 4), and there were no significant differences in PL15 protein and total carotenoids between the three periods of sampling.

Table 4. Postlarvae 15 morphometric and biochemical variables (means \pm SE) during a commercial spawning period.

	15 days (n=27)	45 days (n=13)	75 days (n=10)	ANOVA
Length (mm)	8.1 \pm 0.2 ^a	7.3 \pm 0.2 ^b	6.7 \pm 0.2 ^b	P<0.01
Weight (mg)	2.9 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3	2.5 \pm 0.4	N.S.
% Stress survival (arcsin)	89.2 (1.10 \pm 0.11 ^a)	68.3 (0.75 \pm 0.13 ^{ab})	38.7 (0.40 \pm 0.07 ^b)	P<0.01
Glucose (mg/g)	3.10 \pm 0.32 ^a	1.42 \pm 0.16 ^b	1.47 \pm 0.15 ^b	P<0.01
Acylglycerides (mg/g)	7.85 \pm 0.67 ^a	3.43 \pm 0.42 ^b	4.50 \pm 0.45 ^b	P<0.01
Cholesterol (mg/g)	2.85 \pm 0.67 ^a	1.72 \pm 0.28 ^b	1.78 \pm 0.22 ^b	P<0.01
Proteins (mg/g)	84.62 \pm 3.85	78.48 \pm 4.56	86.21 \pm 6.81	N.S.
Carotenoids (μ g/g)	1.41 \pm 0.18	0.94 \pm 0.11	1.63 \pm 0.11	N.S.

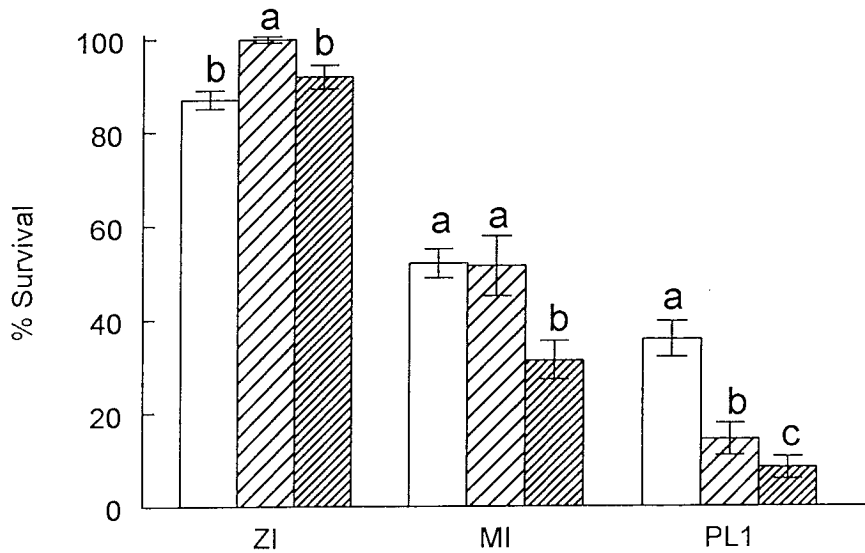
N.S.: Not significantly different. Values with a different superscript in the same row are significantly different.

DISCUSSION

Changes of egg and nauplii biochemical components toward the end the spawning period confirm previous results obtained for wild spawners matured in captivity (Palacios et al., 1998). Acylglycerides (AG) are known to be the most important energy reserve for embryogenesis and early larval development, and its amount is closely associated with quality of eggs and nonfeeding nauplii (Fraser, 1989; Lavens and Sorgeloos 1991; Ouellet et al., 1992; Wickins et al., 1995). A diminished transfer of this component to eggs laid by females towards the end of the spawning period, as shown by lower levels of AG in the 75 day group, could indicate an associated lower larval quality. Similarly, in other studies such as comparison of different maturation diets (Cahu and Quazuguel, 1989; Lavens and Sorgeloos, 1991; Cahu et al., 1995) or the use of eyestalk ablation (Rothlisberg et al., 1991), the quality of the spawn has been correlated to biochemical composition, particularly lipids. In the present work, the nauplii condition index (NCI) was calculated (see methods) on the basis of a comparison of AG levels between nauplii of different size, which are negatively correlated (Fraser, 1989). This implies that both variables must be considered together for comparison between nauplii of different size as occurs between nauplii of different spawns, and the resulting product, together with a productive variable such as percent of viable nauplii, would reflect an overall condition of nauplii performance per spawn, which is decreased throughout the spawning period (Palacios et al., 1998).

A decreased spawn quality towards the end of the spawning period, measured in terms of biochemical composition, can be a reflection of a diminished transfer of nutrients from the females to their eggs, and points to a reproductive exhaustion of the spawners. Lumare (1979) observed that consecutive spawns resulted in a lesser degree of enlargement of the ovaries (lower gonadosomatic index) and occasionally in death of females, and proposed this to be a sort of physiological exhaustion. In agreement, it has been proposed that the deterioration in quality of successive spawnings caused by ablation could be a result of accelerated maturation. A continuous forced reproduction can produce an exhaustion of reserves, and time between spawnings may not be sufficient for accumulation of more nutrients (Aquacop, 1977; Lumare, 1979; Beard and Wickins, 1980; Primavera, 1985; Harrison, 1990; Browdy, 1992).

A



B

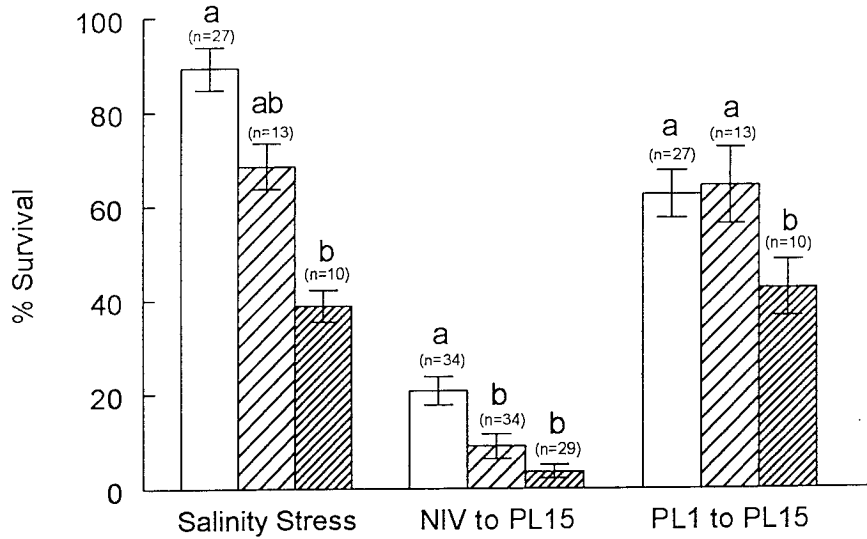


Fig. 1A. Larvae survival in spawns sampled at different days in a production period. Solid bars: 15 days after ablation ($n = 34$); single line bars: 45 days after ablation ($n = 34$); double line bars: 75 days after ablation ($n = 29$). **1B** PL15 survival from PL1, from NIV, and to a salinity stress test in spawns sampled at different days in a production period. n = spawns considered. Means sharing a common letter are not significantly different (mean \pm SE).

As in lipids, the transference of carotenoid from the ovary to the eggs has been documented for several crustaceans (Mantiri et al., 1995). In eggs, carotenoid importance is probably related to vitamin A production and protection of unsaturated lipids against oxidation (Harrison, 1990). In the present work, *P. vannamei* nauplii had decreased levels of total carotenoids compared to eggs, in agreement with Petit et al. (1991) in *P. japonicus*, and Mantiri et al. (1996) in lobster. Carotenoids and vitamins E and C give protection against unsaturated fatty acid peroxidation, and high levels of these vitamins increase hatching success (Cahu et al., 1995). Correlations between certain unsaturated fatty acids and hatching success have been reported in *P. monodon* (Millamena, 1989) and *P. chinensis* (Xu et al., 1994). A role played by carotenoids in increasing nauplii quality, estimated by survival to zoea II, has also been demonstrated with addition of paprika to the maturation diet (Wyban et al., 1997). Under our experimental conditions, both eggs and nauplii had a progressive decrease in total carotenoid levels towards the end of the spawning period. This would imply that the reproductive exhaustion reached is associated with diminished transfer of carotenoids to eggs, resulting in the partial loss of the physiological benefits provided by these compounds. In agreement, Wyban et al. (1997) proposed that the decline in larval quality under sustained reproduction in hatcheries is caused by reduced pigment levels in the embryo yolk. The importance of carotenoids in nauplii development is suggested by the positive correlation found between nauplii size and egg carotenoid levels ($r = 0.36$; $P < 0.01$). The levels of total carotenoids in eggs were also correlated to nauplii protein levels ($r = 0.33$; $P < 0.01$), in agreement to the proposed role of carotenoids in protein stability (Olson, 1993). An interesting qualitative observation was that eggs from recently ablated females were dark-green compared to the eggs of exhausted spawners, which were light yellow. This variation in color could be a result of decreased carotenoid levels (green eggs = $6.72 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$ and yellow eggs = $3.91 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$; $P < 0.001$) or changes in esterification capabilities of the carotenoid complexes in the yolk (Mantiri et al., 1996) associated with reproductive exhaustion.

A reduced spawning frequency towards the end of the spawning period was observed in this work, in agreement with previous studies reporting a decreased spawning frequency over time (Nascimento et al., 1991) or with consecutive spawns (Lumare, 1979; Emmerson, 1980; Menasveta et al., 1993; Gendrop-Funes and Valenzuela-Espinosa, 1995; Mendoza, 1997). However, as the spawning frequency decreased, the number of eggs per spawn increased (Table 1). Increased fecundity with consecutive spawns has been reported in open-thelycum species (Mendoza, 1997; Palacios et al., 1998). Higher fecundity can be associated with the weight increase of spawners, supported by a positive correlation between the number of eggs/spawn and broodstock body weight ($r = 0.38$; $P < 0.01$) and length ($r = 0.31$; $P < 0.01$). This relationship has been documented for closed- (Aquacop, 1977; Emmerson, 1980; Hansford and Marsden, 1995) and open-thelycum species (Palacios et al., 1998).

Fertilization rate has generally been reported to decrease in Penaeid species during the spawning period (Simon, 1982; Menasveta et al., 1993; Palacios et al., 1998), a decrease that could be attributed to a decline in sperm quality. However, in contrast to *P. setiferus* (Leung-Trujillo and Lawrence, 1987), *P. vannamei* sperm quality remains optimal for more than a 100 days under laboratory conditions (Leung-Trujillo and Lawrence, 1985). The use of pond-reared males in the present study could also suggest a low sperm quality shown when compared to wild-caught as demonstrated for *P. monodon* and *P. schmitti* (Menasveta et al., 1993; Ramos et al., 1995). However and in agreement with studies on *P. paulensis* (Cavalli et al., 1997), *P.*

vannamei spawns obtained with pond-reared males had even higher fertilization rates than those obtained with wild-caught males (Ibarra et al., 1997). Egg quality, in terms of biochemical composition, could also partially influence fertilization rate since both were negatively affected by the spawning period. However, no correlations were found between any of the biochemical components measured and fertilization, making it difficult to establish a cause-effect relation between these variables. No differences in percent of viable nauplii, which in part reflect hatchability, were obtained in this work during the spawning period. Previous studies have reported decreased hatching rate with consecutive spawnings (Emmerson, 1980; Beard and Wickins, 1980; Hansford and Marsden, 1995; Mendoza, 1997) or after two months in a spawning period (Simon, 1982). However, this trend does not seem to be a general feature (Browdy and Samocha, 1985).

In contrast to previous studies reporting decreased survival to zoea with successive spawnings (Simon, 1982; Hansford and Marsden, 1995; Marsden et al., 1997), we failed to find such effect at zoea stages. Also, Browdy and Samocha (1985) did not observe significant differences in metamorphoses to zoea between consecutive spawns in closed-thelycum species. However, in later larval stages, we observed lower survival that was associated with the reproductive exhaustion reached towards the end of the spawning period. Indeed, by mysis, the lowest survival was for the 75 day group, and by PL1, a progressive decline in survival was observed from the beginning to the end of the spawning period.

Survival of PL15 after the salinity stress test (Fig. 1B) was more than twice for postlarvae produced at the beginning of the spawning period compared to the ones produced at the end. A salinity stress test with different modifications is routinely applied by hatcheries to test the resistance of PL (De la Cruz, 1992; Bray and Lawrence, 1992; Rees et al., 1994): If the survival to the test is high (i.e. above 60%, from 36 ppm to 24 ppm for 1 hour without returning to normal salinity), the larvae can be stocked in ponds, but if it is low, the larvae are kept in tanks for a few more days (De la Cruz, 1992). Survival to a salinity stress test depends principally on the osmoregulation capabilities of the larvae, and this in turn is associated with the development of postlarvae (Charmantier et al., 1988). In our experiment, the salinity stress test was applied at the same age (PL15) for the three groups, so the higher survival of the 15 day group is probably an effect of increased development and associated osmoregulation capabilities compared to PL from exhausted females. Indeed, a high positive correlation ($r = 0.81$; $P < 0.01$) was found between the stress survival and PL15 length. Increased energy substrates, particularly of glucose which is quickly mobilized under stress conditions (Telford, 1974), can increase the survival of PL15 under stress. In agreement, a positive correlation between survival to stress and PL15 AG ($r = 0.56$; $P < 0.01$) and glucose ($r = 0.56$; $P < 0.01$) levels was found. Overall survival to PL15 stages, resistance to the salinity stress test, and length of PL15 showed a progressive decline throughout the spawning period, indicating that general performance of commercial-size postlarvae is related to maternal reproductive exhaustion. To our knowledge, this is the first report relating the influence of successive spawnings on quality of larval stages further than zoea, and confirms the statements made by Bray and Lawrence (1992) about the influence of captive reproduction not only on early larvae but also on performance of the resulting postlarvae.

A decrease in AG levels from mysis to PL has been reported, suggesting that previously accumulated AG and even proteins from nutrition during zoeal stages must partially satisfy the energetic needs of mysis and PL, which can be regarded as starving stages caused by changes in feeding habits (Mourente et al., 1995). The

larval and postlarval fitness may be associated not only with adequate nutrition and storage of the zoea, but also with the biochemical composition of the eggs and nauplii. In agreement, several correlations suggesting an association between PL15 fitness and nauplii quality were found in our study. The survival to a stress test in PL15 was positively correlated to nauplii length ($r = 0.34$; $P < 0.05$), and nauplii biochemical composition: glucose ($r = 0.44$; $P < 0.01$), AG ($r = 0.37$; $P < 0.05$), cholesterol ($r = 0.59$; $P < 0.01$), and total carotenoids ($r = 0.38$; $P < 0.05$). In addition to biochemical components, a significant correlation between NCI and stress survival ($r = 0.45$; $P < 0.01$) was also obtained, reinforcing the possible association between nauplii quality and further larval development.

CONCLUSIONS

There is a deterioration of the physiological condition of broodstock as a result of intensive continuous reproduction, which gives rise to reproductive exhaustion. As a consequence, transfer of several biochemical components could be decreased, as shown by their lower levels in eggs and nauplii toward the end of the spawning period. Insufficient levels in egg, and probably insufficient availability of some of these components, such as acyglycerides and carotenoids, resulted in a general lower larval performance estimated by survival during larval culture and survival to a salinity stress test in PL15. A reduced larval fitness caused by reproductive exhaustion could have important production implications in commercial hatcheries.

REFERENCES

- Aquacop.** Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon*, Fabricius in Polynesia. *Proc. World Maricult. Soc.* 8: 927-945, 1977.
- Aquacop.** Penaeid reared brood stock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 445-452, 1979.
- Beard, T.W. and J.F. Wickins.** Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture* 20: 79-89, 1980.
- Bradford, M.M.** A refined method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-253, 1976.
- Bray, W.A. and A.L. Lawrence.** Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: *Marine shrimp culture: Principles and practices*, edited by A.W. Fast and J.L. Lester. St Louis, USA: Elsevier Science, p. 93-170, 1992.
- Browdy, C.L. and T.M. Samocha.** Maturation and spawning of ablated and nonablated *Penaeus semisulcatus* De Haan (1844). *J. World Maricult. Soc.* 16: 236-249, 1985.
- Browdy, C. L.** A review of the reproductive biology of penaeus species: perspective on controlled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 22-51, 1992.
- Cahu, C. L. and P. Quazuguel.** Lipid metabolism of *Penaeus vannamei* broodstock: influence of dietary lipids. Billard, R. and DePauw, N. *Aquaculture Europe '89*. Special Publication No. 10, 45-46. Bredene, Belgium, European Aquaculture Society, 1989.
- Cahu, C.L., G. Cuzon and P. Quazuguel.** Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 417-424, 1995.
- Cavalli, R.O., M.P. Scardua and W. Wasielesky Jr.** Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 260-267, 1997.

- Charmantier, G., G. Charmantier-Daurest, N. Bouaricha, P. Thuet, D.E. Aiken and J.P. Trilles. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two Decapod Crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two Decapod Crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *Biol.Bull.* 175: 102-110, 1988.
- De la Cruz, A.S. Prueba de resistencia a baja salinidad de las postlarvas de *Penaeus schmitti*. *Rev.Inv.Mar.* 13: 152-158, 1992.
- Emmerson, W.D. Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Fraser, A.J. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 46: 1868-1873, 1989.
- Gendrop-Funes, V. and E. Valenzuela-Espinoza. Unilateral ablation of *Penaeus stylirostris* (Stimpson). *Ciencias Marinas* 21: 401-413, 1995.
- Hansford, S.W. and E. Marsden. Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J.World Aquacult.Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Harrison, K. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: A review. *J.Shellfish Res.* 9: 1-28, 1990.
- Ibarra, A. M., Ramirez, J. L., Racotta, I. S., Palacios, E. and Magallon, F. Performance comparison of eggs and nauplii for spawners from a second generation domesticated and wild shrimp of *Penaeus vannamei*. Alston, D. E., Green, B. W., and Clifford, H. C. 159-160. Tegucigalpa, Honduras, WAS-ANDAH. IV Symposium on Aquaculture in Central America, 1997.
- Lavens, P. and P. Sorgeloos. Variation in egg and larval quality in various fish and crustacean species. In: *Larvii '91* (ed by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier), pp.221-222 European Aquaculture Society, Belgium, 1991.
- Lavens, P., S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta and P. Sorgeloos. HUFA levels in eggs of wild and cultured broodstock of *Macrobrachium rosenbergii*. In: *Larvii '91* (ed by P.Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier), pp.260-263 European Aquaculture Society, Belgium, 1991.
- Leung-Trujillo, J.R. and A.L. Lawrence. The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. *J.World Maricult.Soc.* 16: 258-266, 1985.
- Leung-Trujillo, J.R. and A.L. Lawrence. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 65: 363-370, 1987.
- Lovrich, G.A. and P. Ouellet. Patterns of growth and triacylglycerol content in snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) zoeal stages reared in the laboratory. *Mar.Biol.* 120: 585-591, 1994.
- Lumare, F. Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture* 18: 203-214, 1979.
- Mantiri, D.M.H., G. NegreSadargues, R. Castillo and Trilles.J.P. Evolution of carotenoid metabolic capabilities during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Linné, 1758). *Comp.Biochem.Physiol.* 111B: 553-558, 1995.
- Mantiri, D.M.H., G. NegreSadargues, G. Charmantier, Trilles.J.P., J.C.G. Milicua and R. Castillo. Nature and metabolism of carotenoid pigments during the embryogenesis of the European lobster *Homarus gammarus* (Linné, 1758). *Comp.Biochem.Physiol.* 115: 237-241, 1996.
- Marsden, G.E., J. McGuren, S.W. Hansford and M.J. Burke. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145-156, 1997.
- Menasveta, P., S. Piyatiratitivorakul, S. Rungsupha, N. Moree and A.W. Fast. Gonadal maturation and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman sea and pond-reared sources in Thailand. *Aquaculture* 116: 191-198, 1993.
- Mendoza, R. Nauplii production from wild, cultivated and mixed populations of Blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J.Applied Aquacult.* 7: 41-50, 1997.

- Millamena, O.M.** Effect of fatty acid composition of broodstock diet on tissue fatty acid patterns and egg fertilization and hatching in pond-reared *Penaeus monodon*. *Asian Fish.Sc* 2: 127-134, 1989.
- Mourente, G., A. Medina, S. Gonzalez and A. Rodriguez.** Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture* 130: 187-199, 1995.
- Nascimento, I.A., W.A. Bray, J.R. Leung-Trujillo and A.L. Lawrence.** Reproduction of ablated and unablated *Penaeus schmitti* in captivity using diets consisting of freshfrozen natural and dried formulated feeds. *Aquaculture* 99: 387-398, 1991.
- Olson, J.A.** Molecular actions of carotenoids. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 691: 156-166, 1993.
- Ouellet, P., C.T. Taggart and K.T. Frank.** Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 40: 368-378, 1992.
- Palacios, E., A.M. Ibarra, J.L. Ramirez, G. Portillo and I.S. Racotta.** Biochemical composition of egg and nauplii in White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquacult.Res.* 29: 183-189, 1998.
- Petit, H., S. Sance, G. NegreSadargues, R. Castillo and Trilles.J.P.** Ontogeny of carotenoid metabolism in the prawn *Penaeus japonicus* Bate (1888) (Crustacea Penaeidea). A qualitative approach. *Comp.Biochem.Physiol.* 99: 667-671, 1991.
- Primavera, J. H.** A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In: *Proceedings of the First International Conference on the culture of Penaeid Prawn/Shrimp*, edited by Y. Taki, J.H. Primavera, J.A. Llobrera. Iloilo City, Philippines, p. 47-64, 1985.
- Ramos, L., M. Espejo, S. Samada and L. Pérez.** Maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus schmitti*. *J.World Aquacult.Soc.* 26: 183-187, 1995.
- Rees, J.F., K. Cure, S. Piyatiratitivorakul, P. Sorgeloos and P. Menasveta.** Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture* 122: 193-207, 1994.
- Rothlisberg, P. C., Crocos, P. J. and Smith, D. M.** The effect of diet and eyestalk ablation on maturation, spawning, hatching, and larval fitness of *Penaeus esculentus*. In: *Larvii '91* (ed by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier), pp. 247-250 European Aquaculture Society, Belgium, 1991.
- Simon, C.M.** Large-scale commercial application penaeid shrimp maturation technology. *J.World Maricult.Soc.* 13: 301-312, 1982.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf.** *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. N.Y.: W.H. Freeman and Company, 859 p. 1981
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parson.** *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, 310 p. 1972
- Telford, M.** Blood glucose in crayfish - I. Variations associated with molting. *Comp.Biochem.Physiol.* 47A: 461-468, 1974.
- Wickins, J.F., T.W. Beard and A.R. Child.** Maximizing lobster, *Homarus gammarus* (L.), egg and larval viability. *Aquacult.Res.* 26: 379-392, 1995.
- Wyban, J., C.S. Lee, J.N. Sweeney and W.K.J. Richards.** Observations on development of a maturation system for *Penaeus vannamei*. *J.World Aquacult.Soc.* 18: 198-200, 1987.
- Wyban, J., G. Martinez and J.N. Sweeney.** Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquacult.* 28: 59-62, 1997.
- Xu, X.L., J.D. Castell and R.K. O'Dor.** Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture* 119: 359-370, 1994.

**RELACIÓN ENTRE EL COLOR DEL HUEVO
Y LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES**

INFORME TÉCNICO A APSA

INTRODUCCIÓN

Durante la maduración gonádica los carotenoides que están depositados en músculo y otros tejidos son movilizados y depositados en los ovarios (Craik, 1985; Sagi et al., 1995; Harrison, 1997). Los carotenoides son transferidos desde el ovario hacia el citoplasma del ovocito en complejos lipoproteicos (Gilchrist y Zagalsky, 1983; Craik, 1985; Sagi et al., 1995; Mantiri et al., 1995) durante la vitelogénesis exógena. El cambio de color del ovario durante la maduración debida a la acumulación de carotenoides se usa para determinar el estadio de maduración gonádico morfo cromático (Harrison, 1997). El mayor componente bioquímico del vitelo, conocido como vitelina, es de hecho una lipogluocarotenoproteína (Sagi et al., 1995). A su vez, la coloración café-verdosa de los huevos de crustáceos se debe a un complejo carotenoide-proteína, denominado ovooverdina (Mantiri et al., 1995), y que corresponde a la vitelina.

Una concentración menor de carotenoides en los huevos puede estar asociada a una disminución de la calidad larvaria (Wyban et al., 1997). En uno de los trabajos de ésta tesis (Capítulo II, Sección 1), se reportó una disminución en la cantidad total de carotenoides a lo largo del ciclo de producción. Se tienen evidencias de una relación entre la suplementación de carotenoides y la supervivencia a zoea (Wyban et al., 1997). Desde el punto de vista teórico, todo lo anterior apoya la utilización de carotenoides para inferir la probabilidad de eclosión del embrión y la calidad larvaria temprana, pero desde el punto de vista práctico su uso estaría restringido por que su aplicación requiere de equipo y personal especializado. El objetivo del presente estudio fue el de determinar si la cantidad de carotenoides totales contenidos en el huevo se encuentra asociada al color que éstos presentan. Si existe alguna relación, el color del huevo podría ser un criterio práctico para evaluar la calidad temprana (huevo) que se encuentra correlacionado con una variable (carotenoides) que determina la calidad larvaria posterior.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las condiciones experimentales y el protocolo de muestreo usados para los datos que se presentan a continuación se desglozan en el capítulo 2 (Capítulo II, Sección 1). Los muestreos se efectuaron 15, 45 y 75 días después de la ablación del tallo ocular de los reproductores. En la colecta del huevo, el color fue asignado en base a una escala subjetiva a cada desove muestreado. La concentración de carotenoides totales fue determinada por el método de Strickland y Parson (1972), que se basa en la extracción de los carotenoides totales en una mezcla de acetona:metanol 2:1 y su posterior cuantificación por lectura de absorbancia a 495 nm. En el capítulo II, se compararon los valores de carotenoides en función del tiempo en producción, mientras que aquí se incluye el color del huevo como factor adicional. De esta manera, se aplicó un ANOVA bifactorial para evaluar los efectos globales o interactivos del tiempo en producción (15, 45 y 75 días) y del color del huevo (verde, café, amarillo) sobre la concentración de carotenoides totales en el huevo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 1 se encuentra representado el número de desoves de cada color clasificados por muestreo a diferentes tiempos en producción. Se observa que la proporción de desoves con huevos de color verde disminuyen de forma importante a lo largo de los muestreos, mientras que los desoves con huevos de color amarillo aumentan. La concentración de carotenoides totales en huevos, así como el desempeño larvario durante el cultivo fue significativamente mayor para los desoves muestreados 15 días después de la ablación (Capítulo

II, sección 1). Como primera aproximación, se podría asociar la disminución de los niveles de carotenoides a lo largo del ciclo de producción con el cambio en proporción del color de los desoves. De hecho, en la industria del salmón los huevos de coloración intensa son preferidos a aquellos que son pálidos, aunque esta preferencia aún es empírica y no se han realizado estudios concluyentes en relación al color y la viabilidad (Craik, 1985).

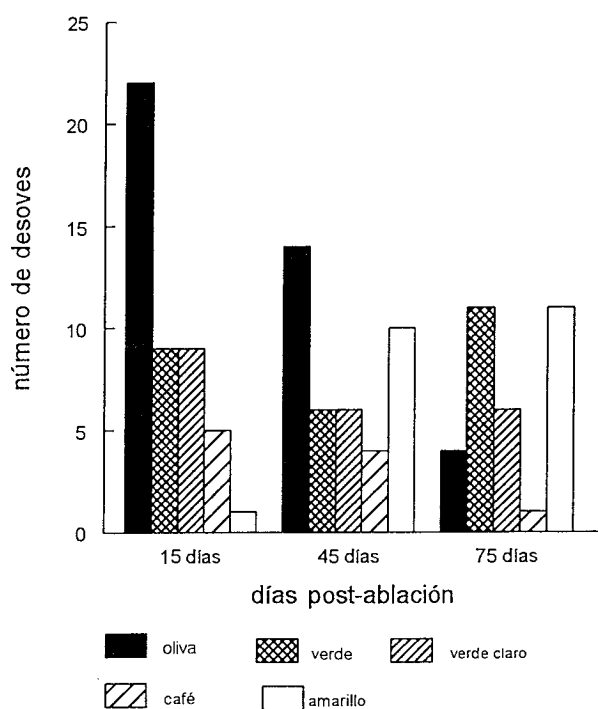


Fig. 1. Relación de desoves de diferente color muestreados en diferentes tiempos después de la ablación (15, 45 y 75 días).

Al analizar la concentración de carotenoides totales en los huevos de diferente color (Tabla 1), se observa que ésta varía tanto por influencia del tiempo en producción ($P < 0.001$), como en relación al color del huevo ($P < 0.05$). No obstante, la concentración de carotenoides disminuye en los huevos del mismo color a lo largo del ciclo de producción. Aparentemente, el color del huevo no se encuentra determinado solamente por la concentración de carotenoides totales. Esto concuerda con los resultados de Hatlen et al. (1998) quienes concluyen que las diferencias en color están mediadas por diferencias en otras propiedades químicas. Entre los factores químicos que pueden afectar el color se encuentran la diferente proporción de carotenoides, la abundancia relativa de constituyentes celulares que interactúan con los carotenoides, la presencia de otros compuestos que enmascaran el color y la interacción con las proteínas que puede afectar el corrimiento en el espectro de absorción de los carotenoides (Hatlen et al., 1998).

Tabla 1. Relación entre color ($P < 0.05$) y concentración de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) en huevos muestreados a lo largo del ciclo ($P < 0.001$) de producción (media \pm SE). La interacción no fue significativa ($P = 0.20$). Las diferentes tonalidades de verde (verde oliva, verde, verde claro) fueron considerados como un solo grupo.

	15 días ($n = 43$)	45 días ($n = 40$)	75 días ($n = 33$)
Verde	7.45 \pm 0.31	5.76 \pm 0.19	4.99 \pm 0.38
Café	7.34 \pm 0.43	4.39 \pm 0.19	4.70 \pm 0.35
Amarillo	6.45	3.62 \pm 0.15	4.20 \pm 0.39

En la langosta, que tiene un desarrollo lecitotrófico más largo que el camarón, se ha descrito que el color del huevo pasa de verde intenso a un café claro (Mantiri et al., 1996). Estos autores concluyen que la variación en el color de los huevos de langosta no es consecuencia de la disminución de los niveles de carotenoides, sino de cambios en la esterificaciones de los complejos carotenoides en el huevo a medida que son transferidos desde el vitelo al embrión. En otro modelo biológico, el salmón, Hatlen et al. (1998) no encontraron una relación lineal entre el color de los filetes y la concentración de carotenoides totales.

En nuestro caso, las diferencias de coloración pueden deberse tanto a la esterificación como a la concentración de carotenoides totales, que sí varía a lo largo del ciclo de producción. La relación entre concentración de carotenoides totales y calidad de los desoves muestreados es discutida en el capítulo II, sección I y existe una extensa revisión por Craik (1985). De hecho, Craik (1985) propuso que la relación entre porcentaje de eclosión y niveles de carotenoides en huevo se puede encontrar determinada por un umbral o nivel crítico; los huevos que se encuentran por debajo de este nivel crítico no eclosionan y los que se encuentran por arriba tienen altas probabilidades de ser viables. En cualquier caso, el color del huevo podría estar asociado a variables que determinen su viabilidad, tales como la concentración de carotenoides totales o específicos y lipoproteínas, pero ésta no es una relación lineal.

Cuando las variables de producción y supervivencia fueron agrupadas por el color (Tabla 2), se observó que los desoves que presentaban un color verde estaban constituidos por menor número de huevos y nauplios que los desoves de color amarillo o café. No hubo diferencia de porcentaje de fertilización o eclosión. Los nauplios provenientes de desoves verdes eran significativamente más grandes que aquellos provenientes de desoves amarillo o café. La diferencia en tamaño podría indicar un desarrollo más rápido en los desoves oscuros. El índice de condición de nauplios no fue significativamente mayor en desoves verdes que en amarillos. Una tendencia semejante se observó para los acilglicéridos y proteínas en los nauplios en función del color de los desoves (Tabla 3). Esto podría ser indicativo de que los desoves de color verde son mejores que los desoves de color más claro. No obstante, la supervivencia a zoea I fue significativamente mayor para los desoves de color amarillo.

Los datos presentados aquí únicamente indican que la coloración de los desoves de toda población sólo dan una idea general de la calidad de los mismos. Sin embargo, a nivel de desoves individuales no se encontró alguna relación clara en cuanto a valores superiores de porcentaje de eclosión o supervivencia larvaria asociados con cierta coloración del huevo de un desove en particular.

Tabla 2. Efecto del color y tiempo en producción después de la ablación sobre algunas variables de producción y supervivencia larvaria (media \pm SE).

	verde (n = 63)	café (n = 36)	amarillo (n = 21)	ANOVA
No. Huevos (x 1000)	196.4 \pm 10.5	231.7 \pm 15.3	243.8 \pm 22.8	$P < 0.05$
Fertilización (%) (arcosen)	75.1 0.92 \pm 0.05	83.6 1.04 \pm 0.05	76.7 0.91 \pm 0.06	$P = 0.17$
No. Nauplios (x 1000)	88.8 \pm 6.5	116.7 \pm 6.1	107.4 \pm 18.9	$P < 0.05$
Eclosión (%) (arcosen)	54.0 0.62 \pm 0.06	60.2 0.75 \pm 0.07	52.5 0.61 \pm 0.12	$P = 0.38$
Longitud Nauplios (μ m)	360 \pm 3.5	347 \pm 4.3	340 \pm 5.1	$P < 0.01$
AG Nauplios (mg/g)	11.28 \pm 0.50	10.60 \pm 0.57	8.99 \pm 0.97	$P = 0.07$
NCI	2.34 \pm 0.11	2.14 \pm 0.14	1.46 \pm 0.18	$P < 0.01$
Supervivencia Z1 (%) (arcosen)	89.6 1.25 \pm 0.05	88.0 1.18 \pm 0.06	96.1 1.42 \pm 0.06	$P < 0.05$
Supervivencia M1 (%) (arcosen)	45.7 0.50 \pm 0.05	41.6 0.47 \pm 0.07	41.0 0.48 \pm 0.11	$P = 0.91$
Supervivencia PL1 (%) (arcosen)	23.0 0.24 \pm 0.04	21.2 0.22 \pm 0.05	10.3 0.11 \pm 0.04	$P = 0.12$
Supervivencia a estrés de salinidad (%)	65.0 0.85 \pm 0.11	74.1 1.02 \pm 0.15	52.2 0.58 \pm 0.14	$P = 0.23$

Tabla 3. Efecto del color y tiempo en producción después de la ablación sobre algunas variables bioquímicas en huevos y nauplios (media \pm SE).

		verde	café	amarillo	ANOVA
Huevos	Acilglicéridos (mg/g)	22.56 \pm 0.75	22.36 \pm 0.62	19.98 \pm 0.80	$P = 0.12$
	Glucosa (mg/g)	4.88 \pm 0.23	4.940 \pm 0.24	4.27 \pm 0.14	$P = 0.23$
	Colesterol (mg/g)	6.69 \pm 0.33	7.13 \pm 0.35	6.22 \pm 0.40	$P = 0.37$
	Proteína (mg/g)	140.0 \pm 4.8	151.7 \pm 6.6	135.4 \pm 7.6	$P = 0.21$
Nauplios	Acilglicéridos (mg/g)	11.28 \pm 0.50	10.60 \pm 0.57	8.99 \pm 0.97	$P = 0.07$
	Glucosa (mg/g)	3.10 \pm 0.17	2.72 \pm 0.20	2.05 \pm 0.28	$P = 0.07$
	Colesterol (mg/g)	3.67 \pm 0.18	3.22 \pm 0.23	2.41 \pm 0.34	$P < 0.05$
	Proteína (mg/g)	104.5 \pm 5.5	98.2 \pm 6.6	68.2 \pm 3.1	$P < 0.01$
	Carotenoides (μ g/g)	4.86 \pm 0.28	4.13 \pm 0.33	2.97 \pm 0.25	$P < 0.001$

BIBLIOGRAFÍA

- Craik, J.C.A.** Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture* 47: 61-88, 1985.
- Gilchrist, B.M. and P.F. Zagalsky.** Isolation of a blue canthaxanthinprotein from connective tissue storage cells in *Branchinecta packardi* Pearse (Crustacea: Anostroca) and its possible role in vitellogenesis. *Comp.Biochem.Physiol.* 76: 885-893, 1983.
- Harrison, K.** Broodstock nutrition and maturation diets. In: *Crustacean Nutrition*, edited by L.R. D'Abramo, D.E. Conklin, and D.M. Akiyama. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, p. 390-410, 1997.
- Hatlen, B., M. Jobling and B. Bjerkeng.** Relationship between carotenoid concentration and colour of fillets of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), fed astaxanthin. *Aquacult. Res.* 29: 191-202, 1998.
- Mantiri, D.M.H., G. Negre-Sadargues, G. Charmantier, J.P. Trilles, J.C.G. Milicua and R. Castillo.** Nature and metabolism of carotenoid pigments during the embryogenesis of the European lobster *Homarus gammarus* (Linné, 1758). *Comp.Biochem.Physiol.* 115: 237-241, 1996.
- Sagi, A., M. Rise, K. Isam and S. Arad.** Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp.Biochem.Physiol.* 112: 309-313, 1995.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons.** *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Bulletin 167, p. 310, 1972.
- Wyban, J., G. Martinez and J.N. Sweeney.** Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquacult.* 28: 59-62, 1997.

**RELACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA
Y LA SUPERVIVENCIA LARVARIA
EN CAMARÓN *Penaeus vannamei***

MANUSCRITO (en preparación):

Palacios E., H. Heras, B. Arredondo and I.S. Racotta. Relation between the lipid composition of the eggs and larval survival in shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931).

ABSTRACT

In the present study, lipid classes and fatty acid composition were determined in eggs of *P. vannamei* in relation to the survival to zoea III. Higher levels of triglycerides, carotenoids, and linoleic acid in eggs are associated with improved survival to zoea III. These results could be considered in experimental and production purposes for the assessment of predictive indicators of larval quality.

RESUMÉ

La composition lipidique et d'acides gras des oeufs de *P. vannamei* a été déterminé en relation avec le taux de survivance au stade de zoé III. Les niveaux de triglycérides, caroténoïdes et acide linoléique furent plus élevés dans les oeufs montrant une meilleure survivance au stade de zoé III. Ces résultats peuvent être d'importance pour l'établissement d'indicateurs prédictifs de la qualité larvaire.

INTRODUCTION

Eggs with more metabolic reserves and a greater ability to transform these to energy have a greater probability of producing nauplii that will survive to zoea stages (Ouellet et al., 1992). We had previously found that as the days after ablation increased, the reproductive exhaustion of the spawners was reflected in the energy reserves of the eggs produced, and the resulting survival and quality of larvae (Palacios et al., 1999). From these results, it seems likely that prediction of larval performance can be inferred from the levels of specific biochemical components of eggs, a possibility with important applications to shrimp larvae production. The most important biochemical compound for storing energy are acylglycerides (AG). However, in addition to energy stores, the performance of the larvae may depend on other lipid compounds. Highly unsaturated fatty acids have been shown to be related to fecundity and hatching (Xu et al., 1994). The objective of the present study was to measure the general lipid profile and fatty acid composition in eggs that produced larvae that had high or low survival to zoea.

MATERIAL AND METHODS

Spawns were obtained from a commercial hatchery and the biochemical composition of eggs was determined for each spawn. The hatching and survival during larval culture was monitored to zoea III stage. Lipids were extracted with chloroform:methanol (2:1), and lipid composition was measured by the Iatroscan-FID technique. The mobil phases used were hexane: ethyl acetate: diethyl ether: formic acid (90:7:3:1) for 35 min and chloroform: methanol: water (70:30:3) for 50 min. The Chromarod S-III rods were scanned at 30 sec/scan in a Iatroscan MK-5 analyzer with an hydrogen flow rate of 160 mL/min and an air flow of 2000 mL/min.

The fatty acid methyl esters were analyzed by gas chromatography using a Hewlett-Packard GCD G1800B system equipped with flame ionization detector and using a Omegawax TM250 fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm). The injector temperature was 230°C and the flow rate was 0.8 mL/min. Total protein was determined, after digestion of the crude homogenate with NaOH 0.1 N, by the Bradford method (Bradford, 1976), and total carotenoids were extracted with acetone:methanol (2:1) and measured by spectrophotometry at 495 nm (Strickland & Parsons 1972).

RESULTS

No differences were observed in the spawner weight or other production variables when these were grouped according to the survival to zoea III of each spawn. The final differences in survival to zoea III was a result of accumulated mortality during the zoea stages (Table 1).

Table 1. Comparison of production variables (means \pm SE) of individual spawns of *P. vannamei* grouped according to their survival during culture to zoea III.

	High survival	Low survival	
No. Eggs ($\times 10^3$)	213.3 \pm 56.95	217.6 \pm 27.73	N.S.
Fertilization (%)	78.95 \pm 7.60	71.75 \pm 6.46	N.S.
No. Nauplii ($\times 10^3$)	105.0 \pm 22.20	118.0 \pm 13.19	N.S.
Hatching rate (%)	56.87 \pm 16.23	58.20 \pm 11.99	N.S.
Nauplii length (μ m)	363.8 \pm 10.5	341.8 \pm 10.3	N.S.
Survival Zoea III (%)	85.00 \pm 5.00	38.00 \pm 13.07	$P < 0.05$

There were significantly higher levels of triglycerides and total carotenoids in eggs that produced larvae with a better survival. A similar tendency was observed for phospholipids, although it was not significant. However, the free fatty acids were lower in eggs that had higher survival to zoea III (Table 2).

Table 2. Comparison of lipid composition (means \pm SE) of individual spawns of *P. vannamei* grouped according to their survival during culture to zoea III.

	High survival	Low survival	
CE (mg/g)	1.23 \pm 0.08	2.08 \pm 0.50	N.S.
TG (mg/g)	29.51 \pm 1.39	23.27 \pm 1.76	$P < 0.05$
Cholesterol (mg/g)	0.86 \pm 0.21	0.67 \pm 0.13	N.S.
FFA (mg/g)	0.44 \pm 0.10	1.04 \pm 0.11	$P < 0.05$
DAG (mg/g)	0.22 \pm 0.15	0.26 \pm 0.21	N.S.
PC (mg/g)	7.13 \pm 1.66	6.32 \pm 1.18	N.S.
Other PL (mg/g)	14.60 \pm 0.72	12.41 \pm 0.86	$P = 0.09$
Total lipids (mg/g)	53.95 \pm 1.80	46.13 \pm 3.76	$P = 0.12$
Total carotenoids (μ g/g)	6.15 \pm 0.67	4.06 \pm 0.44	$P < 0.05$
Total proteins (mg/g)	152.91 \pm 19.07	136.72 \pm 7.28	N.S.

Abbreviation: CE = cholesterol esters; TG = triglycerides; FFA = free fatty acids; DAG = diacylglycerol; PL = phospholipids; PC = phosphatidylcholine.

Short-chain fatty acids were higher in eggs with low survival to zoea III and were also correlated negatively with hatching (14:0 $r = -0.76$; $P < 0.05$; 16:0 $r = -0.58$; $P = 0.07$; 16:1 $r = -0.64$; $P < 0.05$). For unsaturated fatty acids, 18:2n-6 acid was higher in eggs with high survival to zoea III, and was positively correlated with hatching (18:2n-6 $r = 0.64$; $P < 0.05$). A similar tendency in relation to survival was observed for 18:3n-3 (Table 3).

Table 3. Proportion (%) of main fatty acids (means \pm SE) of eggs from individual spawns of *P. vannamei* grouped according to their survival during culture to zoea III.

	High survival	Low survival	
14:0	2.06 \pm 0.14	2.38 \pm 0.08	N.S.
16:0	33.27 \pm 0.92	37.00 \pm 1.21	$P = 0.06$
16:1n-7	5.80 \pm 0.21	6.61 \pm 0.28	$P = 0.07$
18:0	9.35 \pm 0.40	8.57 \pm 0.38	N.S.
18:1n-9	22.78 \pm 0.51	21.23 \pm 1.26	N.S.
18:1n-7	7.01 \pm 1.20	5.87 \pm 0.86	N.S.
18:2n-6	4.65 \pm 0.40	2.68 \pm 0.20	$P < 0.01$
18:3n-3	0.57 \pm 0.10	0.41 \pm 0.12	$P = 0.06$
20:1n-9	1.41 \pm 0.11	1.80 \pm 0.27	N.S.
20:4n-6	1.16 \pm 0.14	1.17 \pm 0.13	N.S.
20:5n-3	6.10 \pm 1.17	5.33 \pm 0.78	N.S.
20:6n-3	5.84 \pm 0.72	6.97 \pm 1.08	N.S.

Only principal fatty acids were considered for the analysis.

DISCUSSION

It is generally accepted that egg lipids in general are associated with larval quality (Ouellet et al. 1992; Xu et al., 1994). The present study indicates that this association for certain lipid classes (e.g. triglycerides) or fatty acids (e.g. linoleic acid) could be valid with survival to more advanced stages such as zoea III. These components could be used as predictive indicators of larval quality for experimental and production purposes. Even if highly unsaturated fatty acids are generally related with optimal characteristics during embryogenesis and early larval development (Xu et al. 1994), their levels in eggs do not seem to influence further development to stages such as zoea III. Their role seems to be more important in earlier developmental stages, as shown by other studies (Xu et al., 1994).

REFERENCES

- Bradford, M.M. A refined method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-253, 1976.
- Ouellet, P., C.T. Taggart and K.T. Frank. Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 368-378, 1992.
- Palacios, E., C.I. Pérez-Rostro, J.L. Ramírez, A.M. Ibarra and I.S. Racotta. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. *Aquaculture* 171: 209-221, 1999.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parson. *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, 310 p. 1972.
- Xu, X.L., J.D. Castell and R.K. O'Dor. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture* 119: 359-370, 1994.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE DESOVES

EN HEMBRAS SILVESTRES Y DOMESTICADAS

DE *Penaeus vannamei* EN UN LABORATORIO COMERCIAL

ARTÍCULO (Publicado):

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

ABSTRACT

Second generation *Penaeus vannamei* broodstock pond-reared and wild populations were compared for spawning frequency and several variables associated with reproductive performance. For this purpose, 470 pond-reared and 237 wild-caught individually tagged females were stocked with males of the same origin in nine maturation tanks in a commercial hatchery, and several productivity variables were recorded over time. Results of the analysis indicate that wild shrimp had higher mating and spawning frequencies compared to pond-reared broodstock. The number of nauplii per spawn was higher for wild shrimp, but fertilization and hatching rates were higher for pond-reared spawners. A larger proportion of nonmating females were found in pond-reared shrimp, whereas wild females had a higher potential for multiple matings. The spawn quality (fertilization and hatching rates, % of viable spawns, and number of nauplii) in consecutive matings did not decline substantially. The present study indicates that selection of females with multiple spawning capabilities could be an important commercial strategy to improve nauplii production over the short term. Pond-reared broodstock could be an adequate source for applying this strategy because of their year-round availability and an overall acceptable reproductive performance.

INTRODUCTION

Successful reproduction in captivity was demonstrated twenty years ago for several Penaeid shrimp species (Aquacop, 1977; Aquacop, 1983; Beard and Wickins, 1980; Simon, 1982). A large body of research, both under laboratory conditions and at a commercial scale, has stressed the optimal environmental and nutritional conditions for maturation, mating, spawning, and hatching (for reviews see Bray and Lawrence, 1992; Browdy, 1992; Benzie, 1997). Particularly, emphasis has been placed on two major points for optimization of reproduction in commercial hatcheries; individual analysis of female reproductive performance, and reducing the use of wild broodstock.

The proportion of females participating in production of the majority of nauplii has been shown to be small, suggesting that selective replacement of nonproductive females in a production period (McGovern, 1988; Bray et al., 1990; Cavalli et al., 1997) and selection of high-performance spawners (Wyban and Sweeney, 1991) could represent important strategies to improve nauplii production. The low proportion of females (25%) responsible for 70% or more of the overall nauplii production (Bray et al., 1990; Wyban and Sweeney, 1991) suggests that females have different reproductive potential. Those females with frequent spawning characteristics would be more desirable, provided offspring quality is not affected. The quality of the offspring can be evaluated by such criteria as fertilization and hatching rate, number of nauplii per spawn, egg and nauplii biochemical composition, survival to further larval stages, etc. A diminished offspring quality has been reported in relation to consecutive spawns (Bray et al., 1990; Hansford and Marsden, 1995) or by time in production after eyestalk ablation (Simon, 1982; Bray et al., 1990; Palacios et al., 1999). Thus, the relationship between quantity variables (number of spawns and nauplii) and offspring quality (one or several of the above variables) must be addressed together on a large-scale commercial level.

The second point addressed here is the use of pond-reared broodstock. This has been successfully achieved over several generations in some regions lacking natural shrimp populations, such as Tahiti, New Caledonia, Venezuela, and Hawaii (Aquacop, 1983; Ottogalli et al., 1988; Wyban et al., 1992; Lucien-Brun, 1997). However, this practice is still limited, and in most countries, hatcheries rely on wild-caught shrimp for larvae

production. Several studies have compared reproductive performance of wild and pond-reared animals of different Penaeid species, and have obtained variable results. In general, there are reports of a greater advantage of wild stocks (Menasveta et al., 1993; Cavalli et al., 1997; Mendoza, 1997), or practically no difference between stocks (Simon, 1982; Browdy et al., 1986; Menasveta et al., 1994; Ibarra et al., 1997). Though some of these studies have been done tracing individual female histories (Menasveta et al., 1993; Menasveta et al., 1994; Cavalli et al., 1997; Mendoza, 1997), a comparison for the number of females that participate in nauplii production between wild and pond-reared populations is still lacking.

MATERIALS AND METHODS

Origin

a) *Pond-reared broodstock*: During initial growout in 1995, G1 juveniles (first generation of captive shrimp produced from wild spawners "G0") were subjected to an accidental oxygen depletion in the growout ponds of Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste (CIBNOR), which caused massive mortalities among smaller shrimp (< 4 g) leaving mostly large shrimp (\geq 4 g) alive (F. Magallón, personal communication). Survivors were raised to sexual maturity in tidal ponds of CIBNOR, at a density of 1/m², and used as spawners by a private company (Acuacultores de La Paz, S.A. "APSA") during early 1996. A second generation (G2) of domesticated shrimp was produced from those spawners (G1). After growout to approximately 11.5 g, selection for weight was made on the G2s, selecting 1,000 individuals from the top 20 % (average weight of selected individuals was 16.5 g) to be grown to spawner size (age 10 to 12 months, see Ibarra et al. 1997).

b) *Wild-caught broodstock*: Wild shrimp were captured on the coast of Sinaloa-Nayarit (México) and matured at the commercial facility of APSA using their standard techniques.

Maturation and spawning

Shrimp from the two different origins were stocked under normal production conditions of the hatchery in different maturation tanks (5 tanks for pond-reared and 4 tanks for wild) at different dates (Table 1). The conditions were: 25 m² black fiberglass maturation tanks, six to eight animals/m², 1:1 male to female ratio, 12:12 photoperiod, 200% daily water exchange at 28 °C and 36‰. The diet was composed of 40% squid, 40% clams, 15% polychaetes, and 5% of a commercial maturation diet (Rangen Inc., Idaho, USA) divided into five daily rations accounting for a total daily supply of 10% of biomass.

After a one-week acclimation period during which 80% of the animals molted, females were subjected to unilateral eyestalk ablation (by cutting), and individual tagging with a color and number coded ring placed around the remaining eyestalk (i.e. $n = 470$ pond-reared and $n = 237$ wild-caught). Gonad development was assessed daily with a lamp, from 1800 to 2300, by observing the size and color of the gonad through the exoskeleton. The female mating condition was checked after catching the shrimp with a hand net and inspection for the presence of a spermatophore. Mature females with an attached spermatophore were placed in individual 160 L spawning tanks. Females with a mature gonad, but which had not mated were returned to the maturation tank. Using the above protocol, only the number of matings per female are recorded, and it is assumed that the number of mature females was greater. Females that matured but did not mate might have spawned directly in the maturation tank. Maturation tanks were not checked for fertile eggs, so these spawns were not accounted for. In the morning, after recording the code, the females were returned to the maturation tank whether they had

spawned or not. For those which spawned, three 5 mL samples of each spawn were assessed for average fertilization rate, and viable spawns were transferred to 70 L fiberglass tanks for hatching. On the next day, nauplii were collected by positive phototropism and transferred to a bucket, where they were counted in three samples of 5 mL each. Excess feed, shed exoskeletons, and dead shrimp were removed from the maturation tank and recorded every morning. In November 1996, broodstock of all tanks were discarded and evaluation of final survival and body weight was made.

Variables recorded and calculations

a) *Days in production*: Days in production per tank are the average days for each female (Table 1), and were calculated as the time elapsed from day 1 (ablation day) to individual death or to the end of the production cycle when all tanks were discarded. The number of females per maturation tank (Table 1) refers to the females with an individual tagging code only. The stocking density per maturation tank was adjusted with untagged females, which were not taken into account for data processing.

b) *Days between matings*: The days between matings were estimated for each female from ablation to first mating and between consecutive matings.

c) *Matings*: Considers females with an attached spermatophore even if spawning does not occur or was deficient (nonviable spawn: see below).

Mating frequency per tank was expressed as number of matings per female per month (Table 2), which was calculated taking into account the days in production for each female.

Percentage of mated females was also calculated as the number of females which never mated or mated once, twice, etc., in relation to the total number of tagged females per maturation tank (Fig. 1 and Table 3).

d) *Viable spawns*: A spawn was considered viable when the fertilization rate was above 40 %. Nonviable spawns thus include unfertilized and deficient spawns (fertilization rate < 40 %).

Viable spawns frequency per tank was expressed and calculated in the same way than for mating frequency (Table 2).

Number of spawns: Number of spawns/total tagged females (Table 3). The number of total tagged females decreases as the number is adjusted considering dead tagged females. Before the first spawn, 39 pond and 13 wild shrimp died. Some females never spawned although they were left in the tank till the end of the production cycle.

Percent viables spawns/total females: was calculated for each mating order (females that were mated once, twice, etc.) as the proportion of females which produced viables spawn in relation to total tagged females (Table 3) or to mated females in the tank (Table 3).

Percent viables spawns/mated females: was calculated for each mating order (females that were mated once, twice, etc.) as the proportion of females which produced viables spawn in relation to mated and tagged females in the tank (Table 3).

e) *Fertilization rate*: Fertilization rate per spawn was calculated considering only viable spawns (fertilization rate > 40%).

f) *Cumulative fertilization*: Cumulative fertilization for each individual female was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ fertilization (first mating)} + \% \text{ fertilization (second mating)} + \dots + \% \text{ fertilization (n mating)}$$

g) *Nauplii*: Generally, the eggs of several viable spawns were mixed in a single hatching tank, so the *nauplii per spawn* reported for each maturation tank were the average of the total nauplii produced daily per tank as a fraction of the number of viable spawns (Table 2).

In order to estimate *the contribution of each female to the nauplii production* in relation to the order of matings (i.e. first, second, etc...), we applied the following formula:

$$\text{Nauplii produced by female} = (\text{average nauplii/spawn of each origin}) \times (\text{number of viable spawns})$$

This was done for each female and grouped according to the mating order (which is higher or equal to the number of viable spawns). Average nauplii/spawn were obtained from data calculated in Table 2. Because of significant differences between wild and pond-reared shrimp, different values were used for the calculation for each origin. From these calculation of contribution of nauplii production for each female, two sets of data were generated: the sum of nauplii production with only one mating, two mating, etc. (Fig. 2A) and the average nauplii production per female with only one mating, two matings, etc. (Fig. 2B), by multiplying the number of viable spawns per female by the average nauplii per spawn. Number of eggs and nauplii per spawn were recorded per female occasionally during the entire production period allowing us to report *nauplii per spawn* and *hatching rate* in relation to mating order (Table 4).

Statistical Analysis

Four different ANOVA models were used depending on the variable reported and on the way it was obtained. In general, the factors considered were origin (pond-reared *versus* wild shrimp) and the order of mating of individual females. All the analyses in which order of mating was used as a variable only considered the first 10 matings.

a) A two factor nested ANOVA was used to compare the variables obtained per female during the production period between origins. These variables are reported in table 2 per tank, which was nested in the factor origin for the analysis.

b) A two-way repeated measures ANOVA was used with order of matings (within) and origin (between) as factors and comparing variables per tank. These variables were calculated for each tank and are reported in table 3.

c) A two-way repeated measures ANOVA was applied with order of matings (within) and origin (between) as factors, with tank nested in origin, and comparing variables recorded per female. These variables (i.e. days between matings and % fertilization) are reported in table 4.

d) The number of nauplii and hatching rate in relation to mating order was analyzed by an ANCOVA because of the missing data, and considering origin as a fixed factor and order of mating as the covariate for which significant influence was inferred from the resulting correlation coefficient (Table 4).

All data expressed as percent (fertilization, hatch, viable spawns, mated females) were transformed to

arcsine for the analysis (Sokal and Rohlf, 1981), but only untransformed values are presented. All analysis were followed by a Tukey test for unequal n post-hoc mean comparisons (Statistica Version 4.3). Data are reported as mean \pm standard deviation. The level of significance was preset at $P < 0.05$.

RESULTS

Overall survival of wild and pond-reared females was similar (Table 1). Average female weight recorded at the end of the production period, was significantly higher for wild-caught compared to pond-reared shrimp ($P < 0.05$; Table 1). Only the wild females from tank W4 had a similar weight when compared to the pond-reared shrimp.

Table 1. General *P. vannamei* stocking data for each maturation tank. Pooled values for each origin are in the bottom row. Data are reported as mean \pm SD.

Tank	Days in production ^a	Origin	No. of females	Final survival (%)	Female final weight (g)
W1	71 \pm 12	Wild	64	68.7	62.9 \pm 9.7
W2	73 \pm 28	Wild	40	55	49.3 \pm 7.9
W3	86 \pm 27	Wild	75	61.3	53.6 \pm 8.0
W4	82 \pm 29	Wild	58	75.9	39.0 \pm 8.3
P1	73 \pm 23	Pond reared	87	70.1	39.4 \pm 4.2
P2	79 \pm 20	Pond reared	95	76.8	37.3 \pm 4.0
P3	69 \pm 24	Pond reared	80	65	37.5 \pm 3.6
P4	84 \pm 24	Pond reared	100	76	40.9 \pm 4.5
P5	80 \pm 26	Pond reared	108	66.7	40.1 \pm 6.7
Wild	78 \pm 26		237	65.2	53.1 \pm 9.1
Pond	77 \pm 25		470	70.9	38.8 \pm 4.8

^a Data were calculated for each female, considering ablation = day 1.

The number of matings per female per month was 28% higher for wild compared to pond-reared shrimp (Table 2). Similarly, more viable spawns per female per month (38%) were obtained for wild compared to pond-reared females. When the number of viable spawns expressed as percentage of total matings were compared (% viable spawns), no differences were observed between wild and pond-reared shrimp. Fertilization rate per spawn was slightly but significantly higher for pond-reared shrimp, but the calculated cumulative fertilization, which besides fertilization rate depends on the number of viable spawns, is higher (41%) for wild shrimp. The number of nauplii produced per spawn was significantly higher in spawns of wild females (17%).

Table 2. Comparison of production variables between wild and pond-reared shrimp. Variables were recorded for each female and averaged per maturation tank. Pooled values for each origin are presented at the bottom with respective significance. Data are reported as mean \pm *SD*.

Tank	Matings/ female/ month	Viable spawns/ female/month ^a	Viable spawns ^a (%)	Fertilization /spawn (%)	Cumulative fertilization ^b	Nauplii/spawn ^c
W1	1.9 \pm 1.5	0.7 \pm 0.7	57.2 \pm 34.0	86.2 \pm 17.6	339.0 \pm 277.2	100,700 \pm 40,900
W2	2.1 \pm 1.5	1.6 \pm 0.9	79.6 \pm 28.0	84.2 \pm 16.1	186.5 \pm 160.2	66,400 \pm 36,900
W3	2.0 \pm 1.2	1.2 \pm 1.1	65.0 \pm 34.2	80.7 \pm 19.0	276.6 \pm 281.4	75,900 \pm 40,200
W4	1.8 \pm 1.3	1.4 \pm 1.1	76.8 \pm 26.1	81.8 \pm 17.4	324.2 \pm 265.6	69,800 \pm 29,800
P1	1.3 \pm 1.0	0.7 \pm 0.9	66.1 \pm 36.9	88.2 \pm 16.2	136.3 \pm 191.0	62,800 \pm 29,500
P2	1.2 \pm 0.8	0.6 \pm 0.9	71.3 \pm 34.9	84.9 \pm 17.4	136.2 \pm 167.5	63,700 \pm 25,100
P3	1.9 \pm 1.7	0.7 \pm 0.9	61.6 \pm 34.0	86.7 \pm 17.2	106.4 \pm 141.0	73,900 \pm 27,300
P4	1.9 \pm 1.4	1.1 \pm 1.0	67.6 \pm 30.8	84.4 \pm 17.8	229.3 \pm 228.1	66,200 \pm 32,100
P5	1.8 \pm 2.5	0.9 \pm 1.0	72.4 \pm 29.3	82.5 \pm 17.7	184.9 \pm 225.9	62,000 \pm 25,900
Wild	1.8 \pm 1.4	1.2 \pm 1.1	68.0 \pm 32.3	83.6 \pm 17.8	274.4 \pm 259.9	78,600 \pm 39,000
Pond	1.3 \pm 3.1	0.8 \pm 0.9	68.3 \pm 33.1	85.1 \pm 17.2	162.1 \pm 200.4	65,100 \pm 28,400
	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> = 0.94	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01

^a For viable spawns the nonfertilized spawns or spawns with less than 40% fertilization were excluded.

^b The cumulative fertilization was estimated from the sum of fertilization rate of the total spawns of each female.

^c The nauplii per spawn are the average of the total nauplii produced daily per tank in relation to the number of viable spawns.

Order of matings

Both the origin and the mating order had an effect on the number of spawns from each mating (Table 3). The origin and order of matings had a direct effect on the percent of matings: Of the total number of females, 88% of wild and 74% of pond-reared shrimp mated at least once, 76% of wild and 54% of pond-reared mated more than once, and 11% of wild and 4% of pond-reared mated more than 10 times. The % of viable spawns decreased more in pond-reared shrimp as an effect of the mating order, and was higher for wild compared to pond-reared shrimp in all the matings. However, when the % of viable spawns was calculated considering only those females that had mated, no differences were observed as an effect of origin or mating order.

Table 3. Successive matings effect on production variables of wild and pond-reared shrimp. Variables estimated per tank and averaged for consecutive matings (mating order). The results for the two-way analysis of variance are in the bottom rows. The data were estimated per tank and are reported as mean \pm *SD*.

Mating order	Total spawns ^a	Mated females (%)	Viable spawns (%)	
			Total females ^b	Mated females ^c
1 st Wild	206/224	87.7 \pm 04.4	61.8 \pm 07.3	70.5 \pm 07.1
Pond	342/431	74.3 \pm 09.0	47.4 \pm 07.5	65.4 \pm 07.2
2 nd Wild	174/212	75.5 \pm 05.5	53.0 \pm 06.4	71.3 \pm 07.0
Pond	257/393	54.2 \pm 09.0	40.0 \pm 08.2	73.6 \pm 05.6
3 rd Wild	155/202	66.3 \pm 05.0	56.3 \pm 08.5	85.0 \pm 08.6
Pond	186/368	39.4 \pm 10.1	28.6 \pm 07.4	74.0 \pm 04.4
4 th Wild	132/189	56.5 \pm 02.4	40.5 \pm 10.4	72.0 \pm 16.8
Pond	143/356	30.0 \pm 09.1	23.0 \pm 08.0	76.6 \pm 10.5
5 th Wild	111/182	47.0 \pm 08.5	33.5 \pm 10.7	70.5 \pm 16.9
Pond	111/347	23.0 \pm 10.6	16.2 \pm 08.1	69.8 \pm 10.5
6 th Wild	93/180	39.8 \pm 07.9	27.8 \pm 09.0	68.8 \pm 10.6
Pond	78/342	16.2 \pm 09.4	9.2 \pm 04.1	61.0 \pm 08.5
7 th Wild	75/179	32.0 \pm 04.7	22.8 \pm 09.2	70.8 \pm 21.5
Pond	54/335	11.2 \pm 08.0	8.8 \pm 05.8	80.8 \pm 11.3
8 th Wild	59/179	25.5 \pm 05.8	16.3 \pm 09.5	61.0 \pm 35.7
Pond	43/331	8.6 \pm 06.5	6.2 \pm 03.9	76.0 \pm 14.4
9 th Wild	50/177	21.5 \pm 04.5	12.8 \pm 06.6	61.0 \pm 31.4
Pond	31/331	6.2 \pm 05.7	4.0 \pm 04.0	67.4 \pm 40.9
10 th Wild	40/176	17.0 \pm 02.2	12.0 \pm 04.1	68.5 \pm 16.8
Pond	25/331	5.2 \pm 05.3	3.6 \pm 04.8	67.2 \pm 24.1
>10 Wild	66/175	11.3 \pm 04.3	20.8 \pm 17.6	66.0 \pm 08.5
Pond	46/331	3.7 \pm 02.8	7.2 \pm 07.1	68.6 \pm 34.7
Order		<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> = 0.85
Origin		<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> = 0.72
Interaction		<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> = 0.07	<i>P</i> = 0.96

^a Number of spawns/total tagged females: total number subtracting dead tagged females.

^b % Viable spawns was estimated considering the total number of tagged females.

^c % Viable spawns was estimated taking into account only the females that mated in that particular mating order.

Time elapsed between ablation and first mating was on average close to a month, with a minimum of 1 to 2 days, and was similar for wild and pond-reared shrimp (Table 4). Subsequent spawnings were more frequent, with decreasing days between spawnings, although there were no significant difference after the first spawn.

The days between matings decreased between successive spawns, regardless of origin (Table 4). The fertilization rate was not significantly affected by the mating order. Occasional counts of eggs and nauplii allowed us to report number of nauplii per spawn and the associated hatching rate in relation to mating order,

although some data are not available. By ANCOVA, the number of nauplii are not affected by origin, but a positive correlation was observed in relation to the covariate mating order ($r = 0.37$, $P < 0.001$). Hatching was significantly higher for pond-reared spawns ($P < 0.01$), but no correlation was obtained with the covariate mating order ($r = 0.19$, $P = 0.09$).

Table 4. Successive matings effect on production variables of wild and pond-reared shrimp. Variables recorded for each female and averaged for consecutive matings (mating order). The results for the two-way analysis of variance or one way analysis of covariance are in the bottom rows. Data are reported as mean \pm SD. Values in parenthesis are maximum and minimum days between matings.

Mating order	Days between matings	Fertilization (%)	Nauplii/spawn ^a	Hatching ^a (%)
1 st Wild	20 \pm 7 (1-90)	82.7 \pm 20.0	47,000 \pm 27,500	28.8 \pm 16.3
Pond	23 \pm 3 (1-97)	85.0 \pm 18.5	62,800 \pm 24,800	50.5 \pm 16.4
2 nd Wild	12 \pm 2 (1-75)	83.9 \pm 17.2	Not sampled	Not sampled
Pond	16 \pm 4 (1-85)	83.2 \pm 18.6	51,000 \pm 24,100	57.4 \pm 22.8
3 rd Wild	11 \pm 2 (2-50)	81.1 \pm 17.3	64,400 \pm 29,000	34.3 \pm 19.0
Pond	12 \pm 3 (1-68)	85.6 \pm 16.1	66,700 \pm 34,500	44.0 \pm 24.0
4 th Wild	09 \pm 1 (1-51)	84.3 \pm 17.8	57,500 \pm 31,800	20.1 \pm 2.2
Pond	11 \pm 2 (1-57)	85.2 \pm 15.4	80,000 \pm 27,800	60.9 \pm 23.0
5 th Wild	10 \pm 2 (2-38)	83.9 \pm 17.0	Not sampled	Not sampled
Pond	12 \pm 4 (2-55)	87.1 \pm 16.3	106,400 \pm 78,400	46.5 \pm 6.8
6 th Wild	09 \pm 2 (1-36)	86.0 \pm 16.5	Not sampled	Not sampled
Pond	09 \pm 2 (2-41)	91.1 \pm 11.7	60,000	42.9
7 th Wild	08 \pm 2 (1-28)	82.4 \pm 18.3	85,000	36.4 \pm 3.3
Pond	06 \pm 1 (2-26)	84.6 \pm 16.0	75,700 \pm 34,300	52.7 \pm 29.1
8 th Wild	08 \pm 2 (3-28)	86.1 \pm 17.8	Not sampled	Not sampled
Pond	08 \pm 2 (3-28)	83.2 \pm 14.9	100,700 \pm 42,400	50.4 \pm 27.0
9 th Wild	08 \pm 2 (3-27)	87.4 \pm 18.7	Not sampled	Not sampled
Pond	08 \pm 2 (3-25)	80.8 \pm 19.1	Not sampled	Not sampled
10 th Wild	06 \pm 1 (2-19)	82.8 \pm 17.0	82,500 \pm 10,600	35.1 \pm 8.5
Pond	08 \pm 2 (2-28)	81.6 \pm 18.0	52,000	32.5
>10 Wild	07 \pm 1 (2-17)	85.8 \pm 17.0	68,800 \pm 25,400	52.5 \pm 27.3
Pond	06 \pm 1 (2-22)	83.5 \pm 18.3	94,000 \pm 43,800	47.8 \pm 20.7
Order	$P < 0.05$	$P = 0.08$	Covariate ^b	Covariate ^b
Origin	$P = 0.42$	$P = 0.45$	$P = 0.14$	$P < 0.01$
Interaction	$P = 0.27$	$P = 0.13$		

^a Nauplii/spawn and hatching ratio were registered from occasional sampling of individual spawns during the production period.

^b Analyzed by an ANCOVA because of missing data.

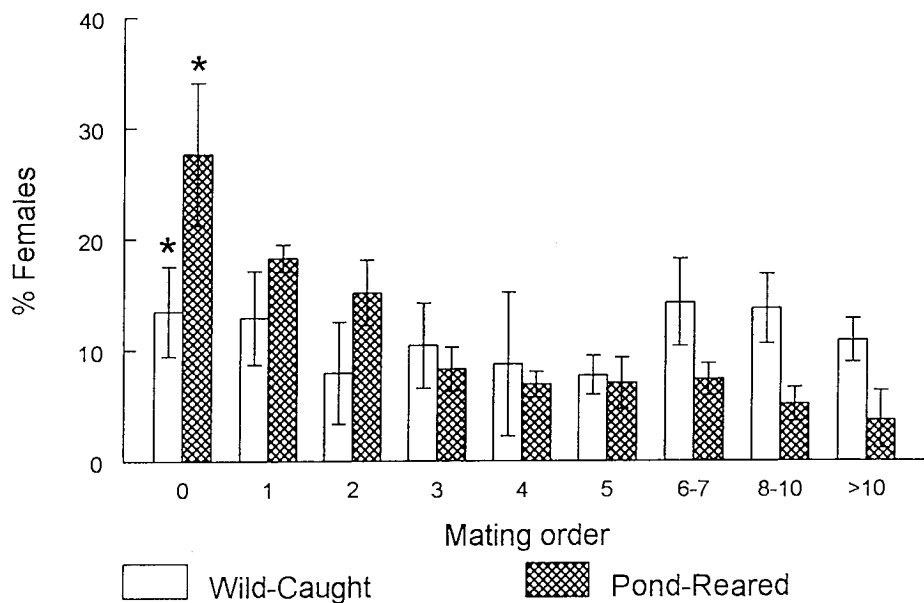


Fig. 1. Proportion (%) of wild and pond-reared females with no mating, mated once, twice, and up to ten times during the production period. Data were calculated per tank and reported as the percentage for each origin. Superscript indicates significant difference between wild and pond-reared shrimp.

Fig. 1 illustrates the proportion of females that never mated, had only one mating, two matings, and so on. Pond-reared shrimp have a larger proportion of females with no matings or only few matings, whereas wild females had higher potential for multiple matings.

The contribution of females to the nauplii production in relation to the number of matings during the period is shown in Fig. 2. Total nauplii production of all females that have a different number of matings indicates the principal contribution in pond-reared shrimp is from females that had from 1 to 7 matings. In wild females, the range is 3 to 13 matings (Fig. 2A). When the nauplii production is expressed per female, the individual production can be observed to be more related to the number of times a female has mated, even if not all matings produced viable spawn (Fig. 2B).

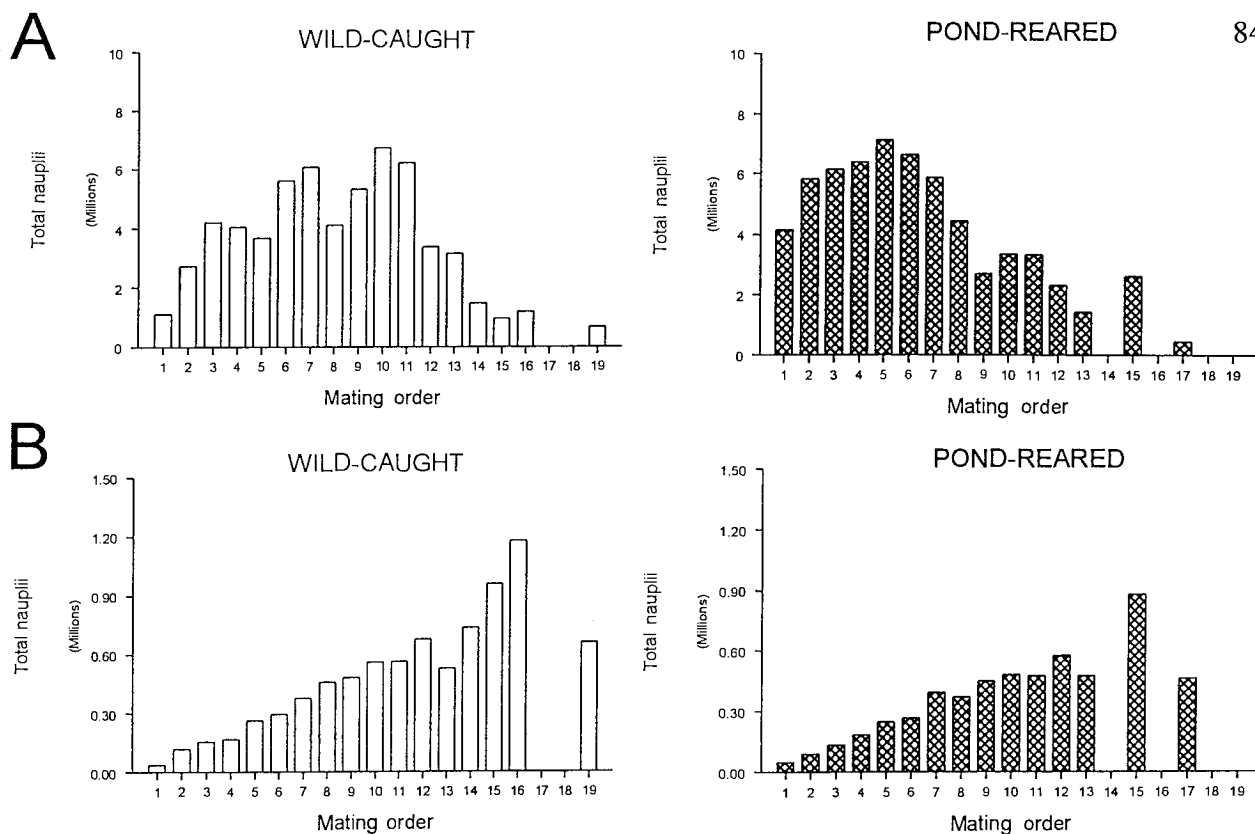


Fig. 2. Contribution to nauplii production in relation to consecutive matings: A) Sum of the production of all the females with only one mating, two matings, etc. for wild-caught and pond-reared broodstock, and B) Production expressed per female with only one mating, two matings, etc. for wild-caught and pond-reared broodstock.

DISCUSSION

The optimization of reproduction under large-scale conditions could partially rely on the individual analysis of female reproductive performance (Ashmore, 1988; Bray et al., 1990; Wyban and Sweeney, 1991; Gendrop-Funes and Valenzuela-Espinoza, 1995; Makinouchi and Hirata, 1995; Cavalli et al., 1997). By individual female identification, Wyban and Sweeney (1991) have reported that 10% of the females were responsible for 50% of the nauplii production. Similarly, Bray et al. (1990) demonstrated that less than a quarter of females produced almost 70% of the larvae. We observed that the nauplii production of one wild female with multiple spawns equaled the production of 30 of the wild females that had only one mating. Similarly, six pond-reared females with multiple spawns had a nauplii production almost equivalent to 91 females with only one mating (Fig. 2A). Furthermore, of the total females stocked, 14% of the wild and 28%

of the pond-reared females never mated (Fig. 1), and 20% of wild and 34% of pond-reared females produced no viable spawn. Stocking with non- or low-producing females implies a high cost of feeding and maintenance, so the selection of females based on superior individual performance should be considered. It is possible that an underestimation of individual performance may have occurred as a result of a loss of the coded rings or by spawns lost in the maturation tank, as reasoned by Chamberlain and Lawrence (1981) for *P. stylirostris*. Similarly, Bray et al. (1990) suggested that 25% of the females that never spawned under his conditions may have died before spawning, did not mate, or were not detected during daily evaluation. For *P. vannamei*, Yano et al. (1988) suggested that spermatophore transfer, which takes place immediately before spawning, may play a role in final maturation of oocytes and spawning, and hence the error of lost spawns in the maturation tank might be diminished at least in this species.

Because not all the females mature and spawn, it has been proposed that the nonreproductive females be replaced to improve total nauplii production (McGovern, 1988; Bray et al., 1990). However, the cost of catching fresh wild shrimp on a continuing basis may be too high to permit a replacement based on a statistical assumption with an implied error. Replacement with pond-reared shrimp may be an alternative, although the reproductive performance of pond-reared is controversial and, at best, lower. Our results show that some quality traits of pond-reared shrimp, such as percentage of viable spawns in relation to total matings (Table 2 and 3) are similar for both origins, and other traits, such as fertilization (Table 2) and hatching rate (Table 4), are even higher for pond-reared shrimp. Similarly, some quality indices have been reported to be comparable or higher for pond-reared shrimp of several species (Browdy et al. 1986; Menasveta et al. 1993; Menasveta et al., 1994; Cavalli et al., 1997; Ibarra et al., 1997). Quantity variables, such as number of matings, viable spawns per month, and number of nauplii were lower in pond-reared compared to wild shrimp in the present study (Table 2, Fig. 2). A smaller body weight for pond-reared shrimps could partially account for some of these differences, since the number of eggs (Aquacop, 1977; Emmerson, 1980; Ottogalli et al., 1988; Hansford and Marsden, 1995) and nauplii (Wyban et al., 1987) have been reported to be affected by body size. Lower fecundity and nauplii number have been reported when pond-reared females were smaller than their wild counterparts (Menasveta et al., 1993; Cavalli et al., 1997; Ibarra et al., 1997), but conflicting results exist when spawners of similar size were used (Browdy et al., 1986; Menasveta et al., 1994; Mendoza, 1997). The number of spawns per female could also be related to size. For pond-reared broodstock, we obtained a significant correlation between number of spawns and body weight ($r = 0.5$; $P < 0.01$), in agreement with Menasveta et al., (1994). This relation is affected in wild shrimp ($r = 0.24$; $P > 0.05$) that have declining reproductive performance as a result of age (Ottogalli et al., 1988; Cavalli et al., 1997; Crocos and Coman 1997). Fertilization rate has also been associated with body size, with higher rates for small shrimp (Menasveta et al., 1994; Cavalli et al., 1997). In our case, body weight does not fully explain lower productivity and higher fertility of pond-reared shrimp, since tank W4 stocked with wild females had a similar size compared to pond-reared shrimp. In this tank, nauplii production was intermediate between both origins, but mating and spawning frequencies were the highest and the fertilization rate was the lowest of all the tanks.

Regardless of the lower performance of pond-reared shrimp, there is a considerable advantage in having ponds stocked with spawner-size shrimp that can be used to replace year-round nonproductive females. For example, of the total pond-reared females, 161 never spawned. This is roughly equivalent to 2 maturation

tanks, which could have been stocked with new pond-reared females. In this case, the suggestion by Cavalli et al. (1997) of discarding females that have not matured within 25 days, and replaced by new females could be useful. However, care should be taken in choosing a particular time-period for different species and maturation conditions. In the present experiment, most females spawned for the first time 20 days after ablation, but 17% of the pond-reared and 11% of the wild shrimp spawned for the first time after a month. Of the shrimp that spawned after a month, 9% of the pond-reared and 6% of the wild-caught had multiple spawns (at least two). These proportion of mating could give an indication on how many females would be wasted if a time-period of one month would be used. As reported by other authors, the latency period for first spawning was longer than for subsequent rematurations (Menasveta et al., 1994; Cavalli et al., 1997; Mendoza, 1997). Menasveta et al. (1994) proposed the longer latency period between ablation and first spawning compared to subsequent rematurations might be caused by time requirements for biochemical and physiological changes occurring after ablation, and that once these requirements were fulfilled, rematuration can take place faster. The biochemical and endocrinological mechanisms implicated in these spawning latency differences remain to be investigated.

The spawning frequency and the number of times a female can produce viable spawns varies between species and maturation conditions (Lumare, 1979; Emmerson, 1980; Beard and Wickins, 1980; Aquacop, 1983; Ottogalli et al., 1988; Bray et al., 1990; Gendrop-Funes and Valenzuela-Espinoza, 1995; Makinouchi and Hirata, 1995). For *P. vannamei*, the frequency of spawns per female has been reported to vary from 1 spawn to 2.4 spawns per month (Aquacop, 1983; Galgani and Aquacop, 1989). In the present study, some spawners had up to 3 matings and spawns every two days per intermolt period, with no differences in the fertilization rate, and an average spawning frequency per month of 1.8 for wild and 1.3 for pond-reared. However, a decline in spawn quality as a result of either consecutive spawnings or time in production after eyestalk ablation has been documented in several studies based on data of fecundity (Browdy and Samocha, 1985; Hansford and Marsden, 1995), fertility (Simon, 1982; Menasveta et al., 1993; Palacios et al., 1998), number of nauplii and associated hatching (Emmerson, 1980; Beard and Wickins, 1980; Chamberlain and Lawrence, 1981; Bray et al., 1990), biochemical indices (Palacios et al., 1998; Palacios et al., 1999), and larval survival to further stages (Hansford and Marsden, 1995; Marsden et al., 1997; Palacios et al., 1999). This would compromise the quality of larvae produced by multiple spawners and would raise some limitations to the strategy of selection of females with such characteristics, unless it is shown that at least some quality traits are not seriously affected by mating or spawning order. Under our conditions; the quality of spawn from wild and pond-reared females with multiple matings, measured in terms of fertilization rate, viable spawn in relation to matings, number of nauplii and associated hatching, was comparable to spawn from the first mating (Table 3 and 4). Similarly, other authors did not obtain a clear influence of consecutive spawns on fertilization and hatching rates (Lumare, 1979; Browdy and Samocha, 1985; Ottogalli et al., 1988). Spawning order, days elapsed after ablation, or time in production in the maturation tanks could be closely related, however it is of importance to distinguish between them since each factor can affect the spawning quality in a different way. In a previous work, we obtained a decline in the fertilization rate as days after ablation or in the maturation tank elapsed, both for wild (Palacios et al., 1998) and pond-reared broodstock (Palacios et al., 1999), whereas in the present study, we did not observe an effect of the mating order on the

fertilization rate. Fertilization can be affected by multiple factors, such as maturation condition (i.e. diet, water quality, temperature, etc.), and the condition of the shrimp that determines the quality of the eggs and sperm, and can be influenced by age, season, genetic traits, differences in origin, stress, and ablation. The effect of days elapsed after ablation on biochemical composition of eggs and larvae, and the subsequent lower larval performance (Palacios et al., 1999) remains to be investigated for multiple spawns. Diet can improve the quality of continuous spawnings (Marsden et al., 1997). The use of pond-reared generations, which may be better adapted to a continual stress by manipulation (Browdy et al., 1986), may improve the frequency and quality of spawnings. In equal origin and maturation conditions, the difference in the number of spawns and general performance between females (up to 19 spawns for wild and 17 for pond-reared vs. none), may be determined by genetic traits (Wyban and Sweeney, 1991).

In summary, the use of tags allows the identification of spawners with a higher performance and the replacement of nonreproductive females with pond-reared shrimp, instead of discarding all in the tank after a period of time (Simon, 1982; Bueno, 1990). In the present study, no important quality deteriorations by the use of pond-reared broodstock or by multiple spawns produced by the same female were observed.

REFERENCES

- Aquacop.** Penaeid reared brood stock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Proc. World Maricult Soc.* 10: 445-452, 1979.
- Aquacop.** Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps in the Centre Oceanologique du Pacifique. In: *CRC handbook of mariculture, vol. 1, Crustacean aquaculture*, edited by J.P. McVey. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 105-122, 1983.
- Ashmore, S.B.** Nauplii production results from a commercial *Penaeus vannamei* maturation facility in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.* 19: 15A, 1988.
- Beard, T.W. and J.F. Wickins.** Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture* 20: 79-89, 1980.
- Benzie, J.A.H.** A review of the effect of genetics and environment on the maturation and larval quality of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 155: 69-85, 1997.
- Bray, W.A., A.L. Lawrence and J.L. Lester.** Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 41-52, 1990.
- Bray, W.A. and A.L. Lawrence.** Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: *Marine shrimp culture: Principles and practices*, edited by A.W. Fast and J.L. Lester. St Louis, USA: Elsevier Science, p. 93-170, 1992.
- Browdy, C.L. and T.M. Samocha.** The effect of eyestalk ablation on spawning, molting and mating of *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Aquaculture* 49: 19-29, 1985.
- Browdy, C.L., A. Hadani, T.M. Samocha and Y. Loya.** The reproductive performance of wild and pondreared *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Aquaculture* 59: 251-258, 1986.
- Browdy, C. L.** A review of the reproductive biology of penaeus species: perspective on controlled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 22-51, 1992.
- Bueno, S.L.d.L.** Maturation and spawning of the white shrimp *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936, under large scale rearing conditions. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 170-179, 1990.
- Cavalli, R.O., M.P. Scardua and W. Wasielesky Jr.** Reproductive performance of different sized wild and

- pond-reared *Penaeus paulensis* females. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 260-267, 1997.
- Chamberlain, G.W. and A.L. Lawrence.** Maturation, reproduction, and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. *J. World Maricult. Soc.* 12: 209-224, 1981.
- Crococ, P.J. and G.J. Coman.** Seasonal and age variability in the reproductive performance of *Penaeus semisulcatus* broodstock: optimizing broodstock selection. *Aquaculture* 155: 55-67, 1997.
- Emmerson, W.D.** Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Galgani, M.L. and Aquacop.** Influence du regime alimentaire sur la reproduction en captivite de *Penaeus vannamei* et *P. stylirostris*. *Aquaculture* 80: 97-109, 1989.
- Gendrop-Funes, V. and E. Valenzuela-Espinoza.** Unilateral ablation of *Penaeus stylirostris* (Stimpson). *Cien. Mar.* 21: 401-413, 1995.
- Hansford, S.W. and G.E. Marsden.** Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J. World Aquacult. Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Ibarra, A. M., Ramirez, J. L., Racotta, I. S., Palacios, E. and Magallon, F.** Performance comparison of eggs and nauplii for spawners from a second generation domesticated and wild shrimp of *Penaeus vannamei*. Pages 159-160 in: D.E. Alston, B.W. Green, and H.C. Clifford, editors. IV Symposium on Aquaculture in Central America, Tegucigalpa, Honduras. 1997
- Lucien-Brun, H.** Evolution of world shrimp production: fisheries and aquaculture. *World Aquacult.* 28: 21-33, 1997.
- Lumare, F.** Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture* 18: 203-214, 1979.
- Makinouchi, S. and H. Hirata.** Studies on maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus monodon* for developing a closed life-cycle culture system. *Isr. J. Aquacult. Bangladesh* 47: 68-77, 1995.
- Marsden, G.E., J. McGuren, S.W. Hansford and M.J. Burke.** A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145-156, 1997.
- McGovern, K.M.** Management strategies for *Penaeus vannamei* Broodstock. *J. World Aquacult. Soc.* 19: 51A, 1988.
- Menasveta, P., S. Piyatiratitivorakul, S. Rungsupa, N. Moree and A.W. Fast.** Gonadal maturation and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman sea and pond-reared sources in Thailand. *Aquaculture* 116: 191-198, 1993.
- Menasveta, P., S. Sangpradub, S. Piyatiratitivorakul and A.W. Fast.** Effect of broodstock size and source on ovarian maturation and spawning of *Penaeus monodon* Fabricius from the Gulf of Thailand. *J. World Aquacult. Soc.* 25: 41-49, 1994.
- Mendoza, R.** Nauplii production from wild, cultivated and mixed populations of Blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. Applied Aquacult.* 7: 41-50, 1997.
- Ottogalli, L., C. Galine and D. Goxe.** Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia. *J. Aqua. Trop.* 3: 111-125, 1988.
- Palacios, E., A.M. Ibarra, J.L. Ramirez, G. Portillo and I.S. Racotta.** Biochemical composition of egg and nauplii in White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquacult. Res.* 29: 183-189, 1998.
- Palacios, E., C.I. Pérez-Rostro, J.L. Ramirez, A.M. Ibarra and I.S. Racotta.** Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. *Aquaculture* 171: 209-221, 1999.
- Simon, C.M.** Large-scale commercial application penaeid shrimp maturation technology. *J. World Maricult. Soc.* 13: 301-312, 1982.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf.** *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research.* N.Y.:

W.H. Freeman and Company, 859 p. 1981

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

Wyban, J. and J.N. Sweeney. *Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual*. Honolulu; HI, USA: The Oceanic Institute, 198 p. 1991.

Wyban, J., Swingle, J. S., Sweeney, J. N. and Pruder, G. D. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. Pages 254-259. *in* Wyban, J., editor. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Baton Rouge, LA, USA, World Aquaculture Society. 1992

Yano, I., R.A. Kanna, R.N. Oyama and J. Wyban. Mating behaviour in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Mar.Biol.* 97: 171-175, 1988.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DE LA GÓNADA EN RELACIÓN AL NÚMERO DE DESOVES

COMPARACIÓN DE LA HISTOLOGÍA DEL OVARIO
ENTRE HEMBRAS DE *Penaeus vannamei*
DE DIFERENTE TAMAÑO Y ORIGEN

ARTÍCULO (En prensa):

Palacios E., C. Rodríguez-Jaramillo and I.S. Racotta. Comparison of ovary histology between different-size wild and pond-reared shrimp *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*). *Invert.Reprod.Develop.* In press, 1999.

ABSTRACT

Ovarian maturation of pond-reared and wild *Penaeus vannamei* broodstock were compared by analyzing morphohistological characteristics. The number of spawns by each female was also considered to determine if successive rematuration can affect the maturation. Individually tagged 42 wild and 47 pond-reared females were sampled at the end of a production period in a commercial hatchery. Morphological variables were recorded and ovaries were histologically evaluated for oocyte type and diameter. Although wild shrimp were bigger than pond-reared, no differences were seen in gonadosomatic indexes, either considered as a group or within stages of maturation. Differences between pond-reared and wild shrimp were observed in previtellogenic and early-vitellogenic oocyte distribution in vitellogenic and cortical stages. However, no differences were obtained in relation to the proportion of late vitellogenic oocytes and mature oocytes with cortical rods, or oocyte diameter in each maturation stage. Occurrence of atresia was negatively correlated to the number of spawns of each female, whereas gonadosomatic index and postovulatory follicles had a positive correlation with the number of spawns. Pond-reared broodstock appeared to have a normal maturation compared to wild *Penaeus vannamei* in our conditions. Successive spawnings did not seem to produce substantial alterations in the rematuration capacities of individual spawners, in terms of the variables measured and the conditions of this experiment.

INTRODUCTION

Shrimp reproduction in captivity is important as seed supply for growout in farms. Optimization strategies to improve nauplii production and quality are needed to achieve independence from wild seedstock. Today, though nauplii production is achieved in captivity, a large reliance on wild broodstock is still a common practice in many countries. The use of pond-reared broodstock could represent an adequate strategy to avoid uncertain availability of wild spawners. The reproductive performance between wild and pond-reared shrimp have been compared, and some reported a greater quantity and quality of nauplii from wild stocks (Menasveta et al., 1993; Cavalli et al., 1997; Mendoza, 1997). However, others report practically no differences between wild and captive stocks (Simon, 1982; Browdy et al., 1986; Menasveta et al., 1994; Palacios et al., 1999). The production of nauplii depends on an adequate maturation process. One way to evaluate differences in maturation between shrimp of different origins is through histological analyses. For shrimp matured in captivity, histology has been used to analyze the effect of eyestalk ablation, and as a comparison between wild and pond-reared broodstock (Ramos and Torras, 1986; Tan-Fermin, 1991; Medina et al., 1996). Using histology, no substantial differences in oocyte distribution for pond-reared *Penaeus monodon* were observed (Tan-Fermin, 1991). However, an inability to attain complete mature oocytes was observed in pond-reared *P. kerathurus* (Medina et al., 1996). It is necessary to evaluate the maturation of wild versus pond-reared shrimp matured ideally under identical hatchery conditions.

If the conditions are adequate, shrimp that are put into production under hatchery conditions usually remature several times (Wyban and Sweeney, 1991; Palacios et al., 1999). The effect of the subsequent rematurations on the physiological condition of the female and on nauplii quality is still controversial (Simon, 1982; Ottogalli et al., 1988; Bray et al., 1990; Hansford and Marsden, 1995; Palacios et al., 1999). Lumare (1979) observed that females with several spawnings had ovaries that did not fully enlarge and in which the

development was not uniform. He suggested this to represent reproductive exhaustion. However, no histological evaluation of the effect of several maturations under hatchery conditions has been made.

In a previous study, we evaluated the productive data of a batch of pond-reared and wild broodstock, taking into account the number of spawns, and we observed a higher spawning frequency and number of nauplii/spawn. However, fertilization and hatching rates were higher for pond-reared shrimp (Palacios et al., 1999). In the present work, we analyzed the histology of ovaries from wild and pond-reared females to determine if there is a difference in the reproductive process. Females of both origins with different sizes and with different number of spawns were sampled, to evaluate the effect of multiple spawns on the histology.

MATERIAL AND METHODS

General hatchery conditions

Wild and pond-reared adult shrimp were brought to maturation at the commercial hatchery Acuacultores de La Paz, S.A. (APSA). Wild shrimp were captured on the coast of Sinaloa-Nayarit (México), and averaged 50 g. Pond-reared broodstock was selected during initial growout in 1995, when G1 juveniles (first generation of captive shrimp produced from wild spawners "G0" from the coast of Sinaloa-Nayarit) were subjected to an accidental oxygen depletion in the growout ponds of Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), which caused massive mortalities among smaller shrimp (< 4 g) leaving mostly large shrimp (\geq 4 g) alive (F. Magallón, personal communication). Survivors were raised till 20 g for four months in tidal earthen ponds at a density of five shrimp/m² and with pellets containing 35% protein of commercial growout diet (P.I.A.S.A, La Paz, B.C.S., México). Food was administered with the use of feeding trays; when food was completely consumed, the ration was increased by 5% (Martínez-Cordova et al. 1998). At 20 g, shrimp were further grown to spawner size (approximately 35 g) for five months in CIBNOR, at a density of 1/m². Fresh squid was offered twice a week (approximately 10% of biomass on a fresh weight basis) in addition to pellets. This shrimp (G1) were used as spawners by APSA, to obtain a second generation (G2) of domesticated shrimp. Growout of G2 was done in conditions similar for G1. When an average weight of 11.5 g was obtained, a selection for weight of the 1,000 individuals from the top 20% was made (> 14 g). The selected shrimp were grown to spawner size (35 g, age 12 months) under conditions similar for G1.

Both wild and pond-reared (G2) shrimp were acclimated in the hatchery for two weeks before eyestalk ablation. Shrimp were stocked and matured under normal hatchery conditions; 25 m² black fiberglass maturation tanks, six animals/m², 1:1 male to female ratio, 200% daily water exchange, and 28°C and 36‰ (average temperature and salinity). The diet was composed (on a fresh weight basis) of 40% squid, 15% polychaetes, 40% clams, and 5% of a commercial maturation diet (Rangen Inc., Idaho, USA) divided into five daily rations accounting for a total daily supply of 10% of biomass.

Ablation, tagging of females, and daily inspection for mature females have been previously described (Palacios et al., 1999). For spawning, mature females with an attached spermatophore were placed in individual 160 L spawning tanks. Females with a mature gonad, but which were not mated, were returned to the maturation tank. In the morning, the females were returned to the maturation tank whether they had spawned or not.

Female sampling

At the end of the production cycle (approximately 3 months), 42 wild and 47 pond-reared females were sampled. Total weight of the females was determined after blotting them dry, and total length and width of the first abdominal segment was recorded. The gonad from the abdominal region was dissected and fixed in Davidson solution for 24 h, embedded in a paraffin-paraplast mixture, sectioned (6 to 8 μm), and stained with Harris hematoxylin-eosin (Humanson, 1972). The hepatopancreas and gonad from the cephalothoracic region were dissected and weighed. The gonadosomatic index (GSI) and hepatopancreatic index (HPI) were calculated as their proportion relative to total body weight.

Gonad histology

Four stages of gonadal maturation were determined based on the classification proposed by Tan-Fermin and Pudadera (1989); Previtellogenic, Vitellogenic, Cortical and Spent stage. The oocyte frequency was estimated in three different regions of an ovary, counting the total number of oocytes appearing in a predetermined test area (Briarty, 1975) and determining the percentage of each type of oocyte per area. The diameter range of the oocytes was determined in three different regions of an ovary by use of an objective micrometer, and only oocytes showing nuclei sectioned approximately at the equatorial plane were measured. The average and maximum oocyte diameter for each female were calculated. Depending on the stage of maturation and individual variations per female, the number of oocytes considered ranged from 30 to 200. The oocytes were classified according to their vitellogenic stage, as described by Mohamed and Diwan (1994); previtellogenic oocytes (PVO), early or endogenous vitellogenic oocytes (EVO), late or exogenous vitellogenic oocytes (LVO), and mature oocytes with cortical rods (MO). The oocyte frequency was used to calculate the proportion of oocyte types (Tan-Fermin, 1991; Medina et al., 1996). Besides the oocyte proportion, the occurrence of postovulatory follicles (POF) and atresia (A) was recorded and reported as number of occurrences in a determined test area. Oocytes with vacuolated cytoplasm were also considered atresic, as suggested by Tan-Fermin and Pudadera (1989).

Statistical Analysis

a) Two-way analyses of variance followed by Tukey test for unequal N post-hoc mean comparisons (Statistica Version 4.3) were done to assess significant differences in each maturation stage (Factor MS with four levels; previtellogenic, vitellogenic, cortical and spent) and between the origin of the shrimp (Factor O with two levels; wild or pond-reared). When there was a significant effect of the shrimp body weight, it was included as a covariable (Grant and Tyler, 1983).

b) Correlations were made between number of spawns and oocyte frequency or gonadosomatic index to determine the effect of consecutive spawns on the maturation process. The number of spawns each female had was determined during the production period in the hatchery using the colored number-coded tag. Females were grouped according to their origin (wild or pond-reared), and to the stage of maturation (three groups: previtellogenic, vitellogenic-spent, or cortical).

Oocyte frequencies and gonadosomatic index were transformed to arcsine for the analyses (Sokal and Rohlf, 1981), but data are presented in percentage. Data are reported as mean \pm SE.

RESULTS

Wild shrimp were larger than pond-reared animals when stocked in the maturation tank (see methods), a difference that was still apparent when organisms were sampled at the end of the production period (Table 1). The gonadosomatic index (GSI) was not significantly different between origins, but the hepatopancreatic index (HPI) was higher for pond-reared females ($P < 0.01$). When the weight was used as a covariable in the ANOVA analyses, there were no significant differences in length between wild and pond-reared shrimp, but the first abdominal segment was wider for pond-reared females.

Table 1. Comparison of morphometric variables (means \pm SE) between wild and pond-reared broodstock at the end of a production period. When body weight was used as a covariable, the adjusted means are shown in parenthesis.

	Wild (<i>n</i> = 42)	Pond (<i>n</i> = 47)	ANOVA
Spawners weight (g)	52.1 \pm 8.2	39.1 \pm 5.8	$P < 0.01$
Body length (cm)	17.7 \pm 1.0	16.2 \pm 1.0	$P < 0.01$
(adjusted mean: $r = 0.85$)	(17.0 \pm 1.0)	(17.0 \pm 1.0)	(N.S.)
First Abdominal Width (cm)	1.85 \pm 0.14	1.69 \pm 0.12	$P < 0.01$
(adjusted mean: $r = 0.82$)	(1.74 \pm 0.14)	(1.80 \pm 0.12)	($P < 0.05$)
Gonad weight (g)	1.41 \pm 0.78	0.86 \pm 0.60	$P < 0.01$
Hp weight (g)	0.98 \pm 0.30	0.88 \pm 0.28	N.S.
GSI (%)	2.87 \pm 1.80	2.39 \pm 1.73	N.S.
HPI (%)	1.87 \pm 0.49	2.29 \pm 0.72	$P < 0.01$
Somatic condition index ¹	1.04 \pm 0.08	0.99 \pm 0.09	$P < 0.05$

N.S.: Not significantly different.

¹ [Body weight]/[$a \times (\text{Body length})^b$] as described by Emmerson (1980)

At the end of the experiment, the GSI and the average and maximum diameter of oocytes had a similar distribution among the different maturation stages (Table 2). No significant differences between wild and pond-reared shrimp were observed for GSI or oocyte diameter. There were significant correlations between the GSI and oocyte average diameter ($r = 0.72$; $P < 0.01$) and maximum diameter ($r = 0.78$; $P < 0.01$). There were no significant correlations found between the oocyte diameter and body weight.

There was no significant difference in the frequency of previtellogenic oocytes (PVO) or early vitellogenic oocytes (EVO) in maturation stages or in origin (Table 3). However, both types of oocytes had a significant interaction. The frequency of PVO was higher in wild females which were in Vitellogenic stage compared to the Cortical stage, whereas pond-reared shrimp had a similar PVO frequency in all stages. In wild females, the frequency of EVO was higher in the Cortical stage compared to Vitellogenic stage. In contrast, pond-reared females had a greater proportion of EVO in the Vitellogenic than the Cortical stage. The oocytes in late vitellogenesis (LVO) were only present in Vitellogenic and Spent stages for both wild and pond-reared shrimp. Similarly, mature oocytes with cortical rods (MO) were mostly present in Cortical stage for both origin (Table 3). We saw that 57% of the females in the Cortical stage had an attached spermatophore when sampled.

Table 2. Comparison of gonadosomatic index, average oocyte diameter, and maximum oocyte diameter (means \pm SE) between wild and pond-reared broodstock in four stages of ovary maturation; Previtellogenic stage, Vitellogenic stage, Cortical stage, and Spent stage. The results of the bifactorial analysis of variance are shown for each variable; O = Origin factor (wild and pond), MS = Maturation stage factor, INT = Interaction. Values not sharing the same letter are significantly different ($P < 0.05$) by Tukey test for unequal N post-hoc test.

		Previtellogenic Stage	Vitellogenic Stage	Cortical Stage	Spent Stage	ANOVA	
GSI (%)	Wild	0.7 \pm 0.2 ^c	2.9 \pm 1.0 ^b	5.0 \pm 0.9 ^a	2.0 \pm 1.2 ^{bc}	O	N.S.
	Pond	0.9 \pm 0.6 ^c	2.1 \pm 1.1 ^{bc}	4.6 \pm 1.8 ^a	2.1 \pm 0.8 ^{bc}	MS	$P < 0.01$
						INT	N.S.
Average oocyte diameter (μ m)	Wild	35.1 \pm 11.2 ^b	61.0 \pm 24.9 ^b	131.1 \pm 39.5 ^a	62.5 \pm 22.7 ^b	O	N.S.
	Pond	34.3 \pm 6.1 ^b	55.7 \pm 26.1 ^b	116.7 \pm 42.1 ^a	42.4 \pm 15.8 ^b	MS	$P < 0.01$
						INT	N.S.
Maximum oocyte diameter (μ m)	Wild	66.0 \pm 15.2 ^c	175.3 \pm 43.3 ^b	251.0 \pm 30.1 ^a	193.0 \pm 37.5 ^{ab}	O	N.S.
	Pond	77.3 \pm 22.9 ^c	156.9 \pm 50.2 ^b	263.4 \pm 27.9 ^a	148.4 \pm 45.5 ^b	MS	$P < 0.01$
						INT	N.S.

N.S.: Not significantly different.

Table 3. Proportion of oocyte types (means \pm SE) between wild and pond-reared broodstock in four stages of ovary maturation; Previtellogenic, Vitellogenic, Cortical, and Spent stage. The results of the bifactorial analysis of variance are shown for each variable; O = Origin factor (wild and pond), MS = Maturation stage factor, INT = Interaction. Values not sharing the same letter are significantly different ($P < 0.05$) by Tukey test for unequal N post-hoc test, except for the late vitellogenic oocytes and oocytes with cortical rods, where no post-hoc test was applied.

Oocyte types (%)		Previtellogenic Stage	Vitellogenic Stage	Cortical Stage	Spent Stage	ANOVA	
Previtellogenic oocytes	Wild	62.7 \pm 20.1 ^{ab}	77.5 \pm 13.2 ^a	47.9 \pm 27.0 ^b	70.7 \pm 30.8 ^{ab}	O	N.S.
	Pond	67.3 \pm 11.2 ^{ab}	56.7 \pm 21.2 ^{ab}	64.1 \pm 16.6 ^{ab}	71.1 \pm 14.4 ^{ab}	MS	N.S.
						INT	$P < 0.01$
Early vitellogenic oocytes	Wild	37.3 \pm 20.1 ^a	13.7 \pm 12.7 ^b	34.7 \pm 21.7 ^a	20.6 \pm 31.6 ^{ab}	O	N.S.
	Pond	32.7 \pm 11.2 ^{ab}	35.3 \pm 18.0 ^a	22.8 \pm 16.4 ^{ab}	22.9 \pm 11.0 ^{ab}	MS	N.S.
						INT	$P < 0.01$
Late vitellogenic oocytes	Wild	0	8.8 \pm 5.8	0.01 \pm 0.04	8.6 \pm 4.5	O	N.S.
	Pond		7.3 \pm 6.1	0.01 \pm 0.02	5.9 \pm 4.6	MS	$P < 0.01$
						INT	N.S.
Oocytes with cortical rods	Wild	0	0.09 \pm 0.24	17.5 \pm 10.2	0	O	N.S.
	Pond		0.67 \pm 2.32	13.1 \pm 6.7	0.02 \pm 0.06	MS	$P < 0.01$
						INT	N.S.

N.S.: Not significantly different.

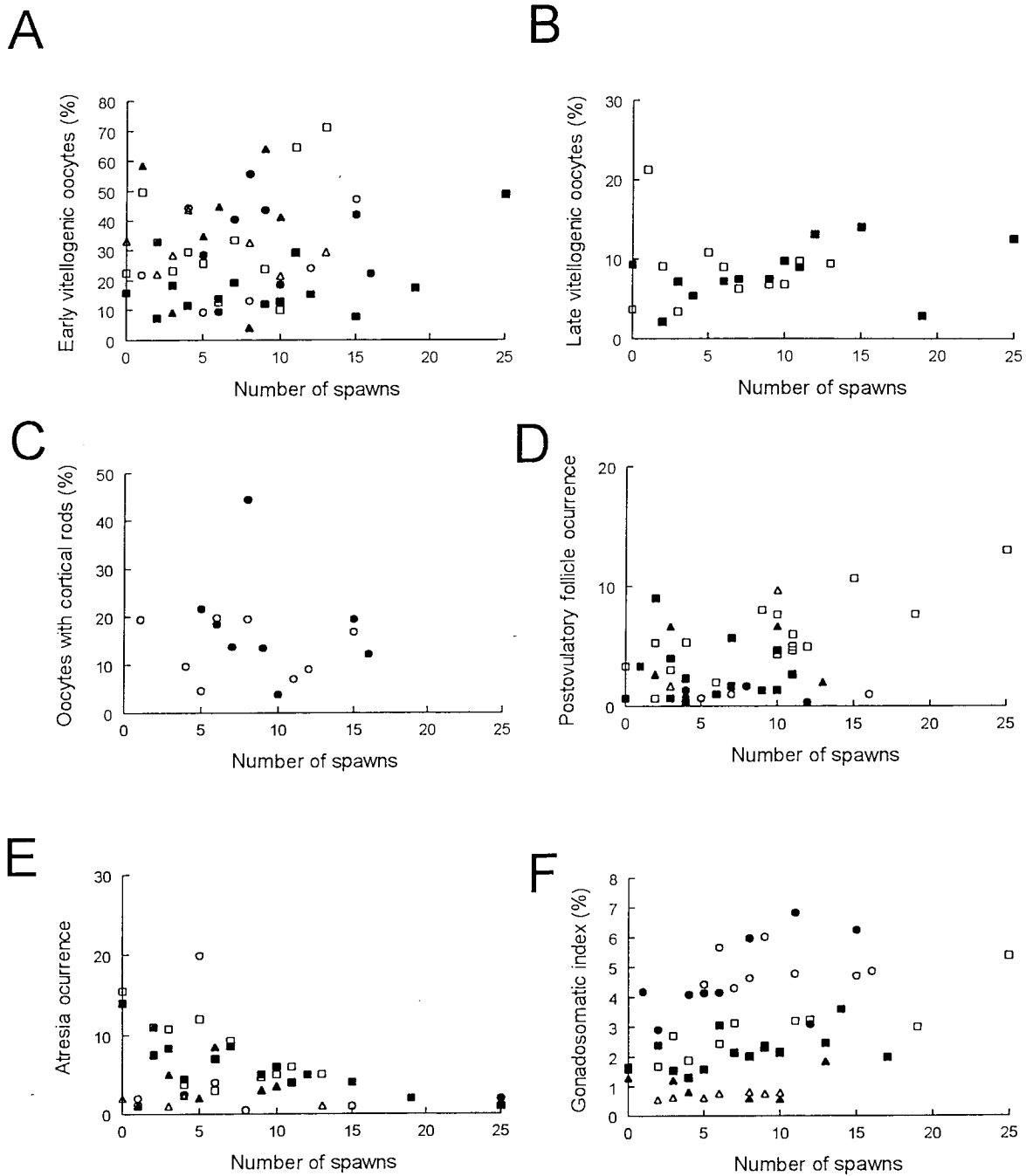


Fig. 1. Correlation between oocyte types and the number of spawns each female had; early vitellogenic oocytes (A), late vitellogenic oocytes (B), oocytes with cortical rods (C), postovulatory follicles (D), atresia (E), and gonadosomatic index (F) in wild (white) and pond-reared (black) broodstock in three stages of ovary maturation; Previtellogenic stage (triangles), Vitellogenic and Spent stages (squares), and Cortical stage (circles).

The GSI of the females sampled at the end of the production cycle was correlated to the number of spawns each female had, both in wild ($r = 0.36$; $P < 0.05$) and pond-reared shrimp ($r = 0.34$; $P < 0.05$; Fig. 1F). Occurrence of postovulatory follicles (POF) was correlated to the number of spawns in wild shrimp ($r = 0.50$; $P < 0.01$), but no significant correlation was found in pond-reared animals (Fig. 1E). A negative correlation was found between the occurrence of atresic oocytes and the number of spawns in wild ($r = 0.35$; $P < 0.05$) and pond-reared females ($r = 0.33$; $P < 0.05$; Fig. 1D). No significant correlation was found between the proportion of EVO, LVO, or MO and the number of spawns, regardless of origin or maturation stage (Fig. 1A, B, and C). The average oocyte diameter was not correlated with number of spawns, but a positive correlation was found between the maximum oocyte diameter and number of spawns in pond-reared females ($r = 0.31$; $P < 0.05$), but not in wild females.

DISCUSSION

In the present study, we compared histologically the maturation in pond-reared and wild shrimp. There were other differences besides origin that we are aware of, and which must be noted; 1) wild shrimp used to stock the maturation tanks were bigger, 2) the prematuration conditions were different, and 3) pond-reared shrimp were submitted to selection criteria for broodstock conformation (see methods). Therefore, when referring to differences in origin, the differences listed above are implicit.

In the present study, the histological comparison of wild and pond-reared shrimp revealed differences in the distribution between maturation stages of PVO and oocytes in EVO from different origins (Table 3). Oocyte growth in Crustaceans can be divided into two phases; endogenous vitellogenesis, when the oocytes are in the process of synthesizing endogenous glycoproteins (i.e. previtellogenic or PVO and early vitellogenic oocytes or EVO), and exogenous vitellogenesis, when growth is mainly increased by the endocytotic incorporation of extra oocytic material (i.e. late vitellogenic oocytes or LVO) (Charniaux-Cotton, 1985; Van Herp, 1992; Browdy, 1992). The formation of cortical rods occurs in the final step of the maturation process, before spawning (Yano, 1988; Tan-Fermin and Pudadera, 1989; Mohamed and Diwan, 1994). Thus, differences between origins observed in the immature oocytes (PVO and EVO) could indicate that the triggering or recruitment of endogenous vitellogenesis differs between origins. In contrast, a similar proportion of LVO and MO in wild and pond-reared females was found, indicating that no differences in the process of exogenous vitellogenesis between origins were revealed by the present experimental approach. In accordance, the analyses of the production data obtained from the same batch of females (Palacios et al., 1999) revealed that spawn quality evaluated from the proportion of viable spawns was similar and the fertilization and hatching rates were significantly higher for pond-reared shrimp, indicating pond-reared females have a successful completion of the final steps of the maturation process. Tan-Fermin (1991) did not find differences in cell types between wild and pond-reared shrimp, but Medina et al. (1996) found that unablated pond-reared *P. kerathurus* shrimp had no oocytes with cortical rods, when compared to wild shrimp of similar size. In addition to possible species differences, in the work of Medina et al. (1996) pond-reared and wild shrimp were in different environmental (e.g. light intensity) and nutritional conditions.

In our study both populations were in the same maturation conditions in a commercial hatchery (i.e. diet, eyestalk ablation, rematurations, handling) for at least three months. This allowed comparison of the long-term effect on the maturation process between origins. As a consequence, most of the differences in diet,

temperature, or light to which the shrimp were subjected during the prematuration conditions are expected to be diluted. However, the proportion of immature oocytes may be affected by the inherent characteristics mentioned before (e.g. size and genetics) in a different way in response to, for example, eyestalk ablation. Ablation is widely used in hatcheries to increase maturation because it decreases the levels of the Gonad Inhibiting Hormone (GIH). The GIH has been proposed to inhibit vitellogenesis either in its early phases (Meusy and Payen 1988) or in late vitellogenesis (Charniaux-Cotton, 1985). Ablation has been reported to have an effect limited to the population of small oocytes (Tan-Fermin, 1991; Sagi et al., 1997).

Another effect of ablation was observed by Tan-Fermin (1991), who described late vitellogenic oocytes and small cortical oocytes that still remained in the ovary of ablated shrimp after spawning. She proposed this as the reason for the shorter rematuration period in ablated females. In the present experiment, both wild and pond-reared shrimp were ablated, but wild females had a higher (although not significant) proportion of LVO and diameter of oocytes in the spent stage. This could partially explain a higher spawning frequency in wild females (Palacios et al., 1999), which in turn seems to be related to a difference in size between origins. Qunitio et al. (1993) concluded that small females tend to channel their nutrients into somatic growth rather than reproductive development unless they are ablated or reach sexual maturity. In the present experiment, pond-reared females had reached a reproductive size, according to previous studies on pond-reared spawners (Aquacop, 1983), and further supported by the production of viable nauplii from these spawners (Palacios et al., 1999). However, a smaller body and ovary size may have had a constraining effect on the quantity of reserves which in turn affects not only the number of eggs, but also the vitellogenesis rate, at least its endogenous phase, as was observed here. In addition to absolute values of body weight, Emmerson (1980) proposed a method for determining the relative condition factor of a shrimp, using the fresh weight and carapace length of the female. According to Emmerson, a female in good condition would have a condition factor above one, and a female in poor condition a factor below one. We found the condition factor for wild (> 1) and pond-reared shrimp (< 1) (Table 1). A poorer condition of the pond-reared broodstock could further explain the differences observed. Further studies with an individual follow-up of ovary histology and spawning events are needed to elucidate the relation between spawn frequency and quality with the events of vitellogenesis evaluated by ovarian biopsy, and its relation to body size.

Another topic examined in the present study was the possible alteration in ovary morphology caused by frequent and multiple spawns. Continuous enhanced reproduction can exhaust the female's nutrient reserves, and the time between spawning may not be sufficient for accumulation of enough nutrients (Aquacop, 1977; Primavera, 1985; Harrison, 1990; Browdy, 1992). Lumare (1979) was the first to observe that only the anterior and median gonad lobes in ablated *P. kerathurus* contained gametes after successive spawning, and suggested this to be a kind of reproductive exhaustion. Hence, it is believed that the first spawns of a female are the best. As a result of a decrease in the nutrient reserves of a female, as well as altered maturation as a result of ablation, lower quality eggs were expected from successive spawns. However, in a previous paper (Palacios et al., 1999), it was reported that some females were able to spawn more than 10 times without an apparent decrease in spawn viability. Similarly, Ottogalli et al. (1988) reported females that could spawn nine times within the same month without any decline in the spawn quality. Sagi et al., (1997) reported the number and time of release of larvae in crayfish was not affected by previous spawning. In the present study, no major alteration in oocyte proportions in relation to the number of spawns a female had were detected. We did not

observe any decline in fertilization and hatching rates in relation to multiple spawning for the same females (Palacios et al., 1999). However, atresia was slightly but significantly and negatively correlated with number of spawns both in pond-reared ($r = 0.33$; $P < 0.05$) and wild shrimp ($r = 0.30$; $P < 0.05$). This means that females from both origins that spawned repeatedly had less atresia in all stages (Fig. 1E). Therefore, it is possible that a low spawning frequency could be an effect of oocyte atresia and reabsorption before maturation is fully completed and a female has had a chance to spawn.

In summary, the present study indicates that there are differences in oocyte recruitment between wild and pond-reared spawners. However, the general maturation capacity evaluated by morphohistological traits revealed no substantial differences between mature populations of oocytes in terms of the variables measured. The results indicate the normal maturation process, evaluated by percentage of vitellogenic and mature oocytes, is not affected by multiple spawnings for the conditions of this experiment.

REFERENCES

- Aquacop.** Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps in the Centre Oceanologique du Pacifique. In: *CRC handbook of mariculture, vol. 1, Crustacean aquaculture*, edited by J.P. McVey. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 105-122, 1983.
- Bray, W.A., A.L. Lawrence, and J.L. Lester.** Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 41-52, 1990.
- Briarty, L.G.** Stereology methods for quantitative light and electron microscopy. *Sci. Prog.* 62: 1-32, 1975.
- Browdy, C.L., A. Hadani, T.M. Samocha, and Y. Loya.** The reproductive performance of wild and pond-reared *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Aquaculture* 59: 251-258, 1986.
- Browdy, C.** A review of the reproductive biology of penaeus species: perspective on controlled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 22-51, 1992.
- Cavalli, R.O., M.P. Scardua, and W. Wasielesky Jr.** Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 260-267, 1997.
- Charniaux-Cotton, H.** Vitellogenesis and its control in Malacostracan crustacea. *Am. Zool.* 25: 197-206, 1985.
- Emmerson, W.D.** Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Grant, A. and P.A. Tyler.** The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturation indices. *Int. J. Invert. Reprod.* 6: 259-269, 1983.
- Hansford, S.W. and G.E. Marsden.** Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J. World Aquacult. Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Harrison, K.** The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: A review. *J. Shellfish. Res.* 9: 1-28, 1990.
- Humanson, G.L.** *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: Freeman and Co., 641 p. 1972.
- Lumare, F.** Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture* 18: 203-214, 1979.
- Martínez-Cordova, L.R., M. Porchas-Cornejo, H. Villareal, J.A. Calderón-Pérez, and J. Naranjo-Paramo.** Evaluation of three feeding strategies on the culture of White shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931 in low water exchange ponds. *Aquacult. Eng.* 17: 21-28, 1998.
- Medina, A., G. Mourente, and A. Rodriguez.** A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus* (Forsk. 1775). *Aquaculture* 148: 63-75, 1996.
- Menasveta, P., S. Piyatiratitivorakul, S. Rungsupa, N. Moree, and A.W. Fast.** Gonadal maturation and

- reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman sea and pond-reared sources in Thailand. *Aquaculture* 116: 191-198, 1993.
- Menasveta, P., S. Sangpradub, S. Piyatiratitivorakul, and A.W. Fast.** Effect of broodstock size and source on ovarian maturation and spawning of *Penaeus monodon* Fabricius from the Gulf of Thailand. *J. World Aquacult. Soc.* 25: 41-49, 1994.
- Mendoza, R.** Nauplii production from wild, cultivated and mixed populations of Blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. Applied Aquacult.* 7: 41-50, 1997.
- Meusy, J.J. and G.P. Payen.** Female reproduction in malacostracan crustacea. *Zool.Sci.* 5: 217-265, 1988.
- Mohamed, K.S. and A.D. Diwan.** Vitellogenesis in the indian white prawn *Penaeus indicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *J. Aqua.Trop.* 9: 157-172, 1994.
- Ottogalli, L., C. Galine, and D. Goxe.** Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia. *J. Aqua. Trop.* 3: 111-125, 1988.
- Palacios, E., I.S. Racotta and APSA.** Spawning frequency analysis of wild and pond-reared of White Pacific shrimp *Penaeus vannamei* broodstock under large-scale hatchery conditions. *J. World Aquacult. Soc.* 30: 180-191, 1999.
- Primavera, J. H.** A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In: *Proceedings of the First International Conference on the culture of Penaeid Prawn/Shrimp*, edited by Y. Taki, J.H. Primavera, J.A. Llobrera. Iloilo City, Philippines, p. 47-64, 1985.
- Quinitio, E.T., R.M. Caballero, and L. Gustilo.** Ovarian development in relation to changes in the external genitalia in captive *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 114: 71-81, 1993.
- Ramos, L. and E. Torras.** Histología del ovario maduro del camarón rosado *Penaeus notialis* con ablación de los pedúnculos oculares. *Rev. Inv. Mar.* 8: 53-61, 1986.
- Sahul Hameed, A.** Quality of eggs produced from wild and captive spawners of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards and their bacterial load. *Aquacult. Res.* 28: 301-303, 1997.
- Simon, C.M.** Large-scale commercial application penaeid shrimp maturation technology. *J. World Maricult. Soc.* 13: 301-312, 1982.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf.** *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. N.Y.: W.H. Freeman and Company, 859 p. 1981.
- Tan-Fermin, J.D. and R. Pudadera.** Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 77: 229-242, 1989.
- Tan-Fermin, J.D.** Effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pondreared *Penaeus monodon* (fabricus) broodstock. *Aquaculture* 93: 77-86, 1991.
- VanHerp, F.** Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in Crustacea. *Invert. Reprod. Develop.* 22: 21-30, 1992.
- Wyban, J. and J.N. Sweeney.** *Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual.* Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual. The Oceanic Institute, Hawaii, 198 p. 1991.
- Yano, I.** Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mar.Biol.* 99: 547-553, 1988.

**PRESENCIA/AUSENCIA DE ESPERMATÓFORO
EN RELACIÓN A LA MADURACIÓN OVÁRICA**

INFORME TÉCNICO A APSA

INTRODUCCIÓN

El éxito del apareamiento (persecuciones/presencia del espermátforo) puede variar en función de la especie, o más específicamente, en función de si el camarón es de télico cerrado (donde el espermátforo se encuentra protegido por el exosqueleto de la hembra) o abierto (donde es fácil que el espermátforo se desprenda). El espermátforo puede caerse o ser colocado en alguna parte que no sea el télico por la interferencia de otros machos o por colisiones con la pared del tanque de maduración durante o después de la cópula (Aquacop, 1979; Bueno, 1990). En el caso particular de *P. vannamei*, la pérdida del espermátforo es frecuente, pero se ha reportado que los huevos pueden ser fertilizados en hembras que han perdido el espermátforo, con la condición de que permanezca la masa espermática en el télico (Bray et al., 1983; Robertson et al., 1993; Ogle, 1995), por lo que se ha sugerido que el espermátforo se tiene que romper para liberar la masa espermática y que ésta ruptura puede deberse al manipuleo de la hembra sobre el espermátforo (Bueno, 1990; Ogle, 1995). Para *P. vannamei*, el porcentaje de hembras que presentan espermátforo en relación al número de hembras maduras varía de un 10 al 20% (Aquacop, 1979; Wyban et al., 1987; Yano et al., 1988). El éxito del apareamiento y la calidad espermática en diferentes especies de Peneidos es afectado por la reducción de luz (Wyban et al., 1987; Ottogalli et al., 1988), cambios en temperatura (Robertson et al., 1991), el tamaño del tanque de maduración (Crococ y Kerr, 1986), la ablación de machos (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985; Crococ y Kerr, 1986; Alfaro y Lozano, 1993; Gomes y Honculada-Primavera, 1993; Pratoomchat et al., 1993; Browdy et al., 1996), la dieta ofrecida (Ottogalli et al., 1988; Alfaro y Lozano, 1993; Wang et al., 1995) y la administración de hormonas (Alfaro, 1996). En una encuesta realizada a 18 laboratorios de producción que reproducen *P. vannamei*, se reportó que la mayoría de las granjas obtenían de 3 a 7% de éxito de apareamientos por noche (Ogle, 1991). Robertson et al. (1991) reportan que un 3 al 10% del total de las hembras de una piscina son apareadas por noche y que los valores superiores (7 al 10%) corresponden a hembras silvestres o domesticadas de mayor tamaño.

Además de que el éxito del apareamiento es variable, la maduración de los machos presenta otro problema: la degeneración y/o necrosis del aparato reproductor (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985; Alfaro y Lozano, 1993; Pascual et al., 1998) y la disminución de la calidad espermática (i.e. número de espermatozoides, porcentaje de espermatozoide anormal, porcentaje de espermatozoide muerto, éxito de reacción acrosómica, etc.) después de que los machos han pasado varios días en producción. La necrosis y disminución de la calidad espermática es más común en algunas especies de Peneidos que en otras. En especies de télico cerrado, se ha reportado disminución del porcentaje de fertilización, probablemente por la mala calidad del espermatozoide, después de 22 días en organismos domesticados y 12 días en silvestres (Menasveta et al., 1993; Menasveta et al., 1994), pero aún existe controversia sobre el efecto del tiempo en el desempeño reproductivo de machos, incluso si estos están ablacionados (Gomes y Honculada-Primavera, 1993). En especies de télico abierto, los primeros en observar disminución de la calidad espermática y asociarlo con agotamiento en *P. setiferus*, fueron Brown et al. (1979). En *P. setiferus* se ha reportado ya sea que los machos son infértiles, presentan infección bacteriana o disminución de la calidad de los espermatozoides antes de un mes en producción (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987; Talbot et al., 1989), o que no presentan degeneración del espermátforo o disminución de la fertilización en un período de 68 días (Browdy et al., 1996). En *P. vannamei*, no se observó deterioro de la calidad espermática o de la gónada a lo largo del tiempo de muestreo, aun en machos ablacionados (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985), aunque algunos laboratorios de producción

ocasionalmente reportan melanizaciones en esta especie (Ogle, 1991; Alfaro y Lozano, 1993). El desarrollo de necrosis aparentemente se encuentra asociado a altas temperaturas en los tanques de maduración. La temperatura parece jugar un papel crucial en la degeneración, dado que en la especie con mayor susceptibilidad a la necrosis (*P. setiferus*) se ha reportado que se puede disminuir su incidencia cuando los machos son madurados entre 25 y 27°C, hasta por 30 días (Pascual et al., 1998). Heitzmann et al. (1993) reportaron en un estudio realizado en *P. vannamei* que la espermatogénesis es un proceso continuo, mientras que el desarrollo del espermátforo se encuentra en función del estadio de muda (probablemente, los dos procesos se encuentran regulados por diferentes hormonas). Ellos concluyeron que el espermátforo no era liberado como consecuencia de la muda y que la eyaculación continua evitaba la necrosis. En estudios realizados en *P. vannamei* se concluyó que el deterioro del espermátforo es un proceso natural (no debido a bacterias o estrés) y que da lugar a la regeneración de un nuevo espermátforo (Alfaro y Lozano, 1993), que puede llevarse a cabo en períodos hasta de dos días (Heitzmann et al., 1993).

El objetivo del presente estudio fue el determinar si la presencia del espermátforo en el tético de la hembra se encuentra asociado a alguna variable dependiente de las hembras, como por ejemplo el tamaño, origen, estadio de maduración gonádico o número de desoves previos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación de la presencia de espermátforo con el estadio gonádico determinado por histología.

De las hembras muestreadas en el presente estudio, sólo aquellas que se encontraban en estadio Cortical presentaron espermátforo pegado (Tabla 1). Esto concuerda con trabajos previos, donde se describe que los machos persiguen hembras maduras, inmaduras y hasta machos, pero sólo transfieren el espermátforo a hembras maduras (Yano et al., 1988; Bueno, 1990). Debido a la diferenciación entre persecución y cópula, Yano et al. (1988) sugirió la presencia de dos feromonas; Feromona Estimuladora de Persecución (ya que la persecución de los machos es estimulada sólo por el agua donde ha estado una hembra madura) y Feromona Estimuladora de Cópula (probablemente reconocida por contacto de antenas). Yano et al. (1988) observó que el desove de hembras apareadas de *P. vannamei* ocurría aproximadamente dos horas después del apareamiento. Esta sincronización en la transferencia del espermátforo y el desove llevó a Yano et al. (1988) a sugerir que la presencia del espermátforo en especies de tético abierto podría afectar la maduración final de los ovocitos y determinar la ocurrencia del desove. Según la descripción de Anderson et al. (1984) en Peneidos de tético cerrado, pueden pasar 4 días desde el inicio de la formación de bastones corticales hasta el desove; la ruptura de la vesícula germinal (inicio de meiosis) ocurre 24 horas antes del desove, mientras que la ruptura de las células foliculares y la salida de ovocitos maduros al oviducto (ovulación) ocurre solamente unas horas antes de que empiece a desovar la hembra. Hasta la fecha no se han realizado análisis de sincronización en Peneidos de tético abierto, pero es posible que la cópula coincida con la ruptura de la capa de células foliculares (posiblemente inducida por la liberación de feromona).

Relación entre presencia del espermátforo y el tamaño y origen de la hembra.

Los camarones silvestres presentaron mayor porcentaje de apareamiento que los domesticados, tanto en relación al número total de hembras muestreadas (silvestres = 21.3% vs domesticadas = 6%), como al considerar únicamente las hembras maduras (silvestres = 92% vs domesticadas = 27%; Tabla 1). No se calculó

el éxito de apareamiento debido a que no se determinó el número de persecuciones. Lo anterior concuerda con resultados de Robertson et al., (1993) quienes reportaron que el porcentaje de éxito de apareamiento para *P. vannamei* variaba entre un 3.15% de hembra totales por noche y hasta un 10% en hembras silvestres o domesticadas grandes. La comparación entre Peneidos silvestres y domesticados, ha revelado resultados contradictorios incluso para la misma especie. En *P. stylirostris* se ha reportado que las hembras apareadas con machos silvestres tuvieron mayor porcentaje de eclosión en comparación con machos domesticados (Mendoza, 1997). En *P. monodon*, se ha reportado diferencia en el apareamiento entre machos silvestres y domesticados (67 vs 32%) (Makinouchi y Hirata, 1995), pero otros no observan diferencia en esta especie en relación al origen (Pratoomchat et al., 1993). Menasveta et al. (1994) llegaron a la conclusión que el desempeño reproductivo en *P. monodon* dependía del tamaño más que del origen.

Tabla 1. Número de hembras con presencia del espermatozoido en relación a la evaluación con dos escalas (morfo cromática e histológica) del grado de desarrollo gonádico en hembras silvestres y domesticadas de *P. vannamei* muestreadas en noviembre de 1996.

	c/espermatozoido		s/espermatozoido	
	Domesticadas	Silvestres	Domesticadas	Silvestres
Escala morfo cromática:				
inmaduras	0	0	52	14
madurando	4	1	44	22
maduras	4	12	29	12
Escala histológica:				
cortical	3	11	8	1
otros estadios	0	0	32	26

En el capítulo III, reportamos que el porcentaje de apareamiento con respecto al total de las hembras era superior en las hembras silvestres (1.8%) en comparación con las domesticadas (1.3%), promedio obtenido a lo largo de un ciclo de producción. Si se considera que durante el ciclo de producción, una mayor proporción de hembras domesticadas nunca maduro, y estas se eliminan del análisis, el porcentaje de apareamiento para las domesticadas podría ser mayor. Dado que los machos solamente transfieren el espermatozoido a hembras maduras, podríamos suponer que todas las hembras en estadio cortical fueron perseguidas, y con la mayoría se realizaron intentos de transferencia de espermatozoido. El porcentaje de hembras maduras con respecto al total fue de 27% en domesticadas y de 31% en silvestres, lo cual no explica la diferencia observada en el porcentaje de apareamiento entre los dos orígenes. Esta diferencia podría implicar que los machos domesticados no fueron suficientes (ya sea por generación de necrosis o de tamaño muy chicos para madurar aún después de 3 meses en producción) para aparearse con todas las hembras maduras o que las hembras domesticadas dejaban caer con mayor facilidad el espermatozoido. Sin embargo, la comparación del diámetro promedio de los ovocitos corticales (Tabla 2) reveló que entre las hembras maduras o en estadio cortical, solamente aquellas con los ovocitos más grandes estaban apareadas. Anderson et al. (1984), concluyó que los ovocitos corticales tardan cuatro días en madurar desde la aparición de los primeros vestigios de bastones corticales, hasta el

rompimiento de las células foliculares. Es posible que el espermatóforo solamente sea transferido en las últimas etapas de maduración de los ovocitos corticales por acción de la feromona estimuladora de la cópula (Yano et al., 1988). Por lo tanto, la presencia de hembras domesticadas en estadio cortical sin presencia de espermatóforo puede deberse a que los ovocitos aún no están maduros y no a algún problema asociado a machos.

Tabla 2. Comparación del tamaño de los ovocitos y del índice gonadosomático entre hembra en estadio Cortical agrupadas en relación a la presencia del espermatóforo.

Hembras en estadio Cortical	c/espermatóforo		s/espermatóforo	
	Domesticadas	Silvestres	Domesticadas	Silvestres
Diametro máximo de los Ovocitos	268	258	262	175
Diametro medio de los Ovocitos	147	138	105	51
GSI total	5.1	5.1	4.4	4.2

Una de las diferencias entre los camarones de diferente origen fue el tamaño, por lo menos en el caso de las hembras. Aunque los machos no fueron pesados, la diferencia entre el tamaño de las hembras de ambos orígenes también podría ser válida para los machos. Existen numerosos estudios que estudian el efecto de la edad y tamaño del macho sobre la calidad espermática en camarones de télico abierto (Ottogalli et al., 1988; Alfaro, 1993; Robertson et al., 1993; Wang et al., 1995). No obstante, en el presente estudio, el tamaño de la hembra de cada origen no fue determinante para influenciar la presencia del espermatóforo (Tabla 3). En el capítulo III se observó una correlación entre el peso corporal de la hembra y el número de desoves durante el período, pero únicamente para organismos domesticados. Un mayor número o frecuencia de desoves puede deberse a una capacidad de remaduraciones mayor, a un mayor éxito de apareamiento o a ambas. Sin embargo, en esta sección las hembras que presentaron presencia de espermatóforo no fueron de tamaño mayor (Tabla 3). Aparentemente, el tamaño de las hembras no influye en el éxito de apareamiento o tiene un efecto indirecto, como consecuencia de la mayor frecuencia de remaduraciones.

Relación entre presencia de espermatóforo y agotamiento de las hembras (número de desoves y tiempo en producción).

En el presente estudio, no se observó diferencia de la presencia del espermatóforo entre las hembras "agotadas" ya sea por tiempo en producción o número de desoves. Por lo anterior, las consecuencias del agotamiento en términos de cantidad de desoves y nauplios totales subsecuentes no se deben a una disminución en el éxito de apareamiento, o bien, se relacionan de manera indirecta con una menor incidencia de hembras maduras. En términos de calidad del desove, faltaría por determinar la calidad espermática, más que el éxito de apareamiento, en función del tiempo en producción y número de regeneraciones.

En la Tabla 3, se puede observar que las hembras que presentaban adherido el espermatóforo, eran en promedio aquellas que presentaron desoves un mayor número de días antes del muestreo. Lo anterior se debe a que se requiere un tiempo determinado para que las hembras remaduren y sean apareadas, lo cual se encuentra apoyado por los valores del GSI.

Tabla 3. Comparación de variables morfométricas y de producción agrupadas en relación a la presencia de espermatóforo en hembras silvestres o domesticadas de *P. vannamei* (media + *SD*). Se realizó análisis bifactorial (P: presencia/ausencia de espermatóforo, O: silvestres/domesticadas, PxO: Interacción).

	c/espermatóforo		s/espermatóforo		ANOVA	
	Domesticadas	Silvestres	Domesticadas	Silvestres		
Peso corporal (g)	36.9 ± 4.2	52.4 ± 9.7	38.9 ± 4.8	52.1 ± 8.1	P	N.S.
					O	<i>P</i> < 0.01
					PxO	N.S.
Longitud (cm)	16.1 ± 0.8	17.7 ± 0.9	16.2 ± 0.8	17.6 ± 0.9	P	N.S.
					O	<i>P</i> < 0.01
					PxO	N.S.
Ancho (pulgadas)	0.66 ± 0.04	0.74 ± 0.06	0.68 ± 0.04	0.75 ± 0.06	P	N.S.
					O	<i>P</i> < 0.01
					PxO	N.S.
GSI	5.07 ± 1.5	5.11 ± 0.9	2.20 ± 1.6	2.13 ± 1.3	P	<i>P</i> < 0.01
					O	N.S.
					PxO	N.S.
Número de desoves	5.0 ± 4.0	9.3 ± 3.7	4.5 ± 3.7	8.7 ± 4.7	P	N.S.
					O	<i>P</i> < 0.01
					PxO	N.S.
Tiempo en producción	92.6 ± 15.5	128.9 ± 27.2	91.3 ± 17.9	127.0 ± 28.5	P	N.S.
					O	<i>P</i> < 0.01
					PxO	N.S.
Días desde el último desove	17.7 ± 10.6	13.6 ± 15.7	11.7 ± 14.3	9.02 ± 10.0	P	<i>P</i> = 0.13
					O	N.S.
					PxO	N.S.

Conclusiones

Solamente las hembras que se encontraban en estadio de maduración Cortical presentaron espermatóforo adherido en el télico. Los camarones silvestres presentaron mayor porcentaje de apareamiento, probablemente debido a que las hembras silvestres en general estaban en un estadio de maduración más avanzado durante el muestreo. No se encontró asociación entre el apareamiento y el tamaño, el orden de desove o el tiempo en producción después de la ablación unilateral de las hembras.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, J. and X. Lozano. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 522-529, 1993.
- Alfaro, J. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a growout pond. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 6-11, 1993.
- Alfaro, J. Effect of 17 α -Methyltestosterone and 17 α -hydroprogesterone on the quality of White shrimp *Penaeus vannamei* spermatophores. *J. World Aquacult. Soc.* 27: 487-492, 1996.
- Anderson, S.L., E.S. Chang, and W.H. Clark. Timing of postvitellogenic ovarian changes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* (Penaeidae) determined by ovarian biopsy. *Aquaculture* 42: 257-271, 1984.
- Aquacop. Penaeid reared brood stock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 445-452, 1979.
- Browdy, C.L., K. McGovern-Hopkins, A.D. Stokes, J.S. Hopkins, and P.A. Sandifer. Factors affecting the reproductive performance of the Atlantic white shrimp, *Penaeus setiferus*, in conventional and unisex tank systems. *J. Appl. Aquacult.* 6: 11-25, 1996.
- Bueno, S.L.d.L. Maturation and spawning of the white shrimp *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936, under large scale rearing conditions. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 170-179, 1990.
- Crococ, P.J. and D. Kerr. Factors affecting induction of maturation and spawning of the tiger prawn, *Penaeus esculentus* (haswell), under laboratory conditions. *Aquaculture* 58: 203-214, 1986.
- Gomes, A.O.L. and J. Honculada-Primavera. Reproductive quality of male *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 112: 157-164, 1993.
- Heitzmann, J.-C., A. Diter, and Aquacop. Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931; dependence on the intermoult cycle. *Aquaculture* 116: 91-98, 1993.
- Leung-Trujillo, J.R. and A.L. Lawrence. The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. *J. World Maricult. Soc.* 16: 258-266, 1985.
- Leung-Trujillo, J.R. and A.L. Lawrence. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 65: 363-370, 1987.
- Makinouchi, S. and H. Hirata. Studies on maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus monodon* for developing a closed life-cycle culture system. *Isr. J. Aquacult. Bamigdesh* 47: 68-77, 1995.
- Menasveta, P., S. Piyatiratitivorakul, S. Rungsupa, N. Moree, and A.W. Fast. Gonadal maturation and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman sea and pond-reared sources in Thailand. *Aquaculture* 116: 191-198, 1993.
- Menasveta, P., S. Sangpradub, S. Piyatiratitivorakul, and A.W. Fast. Effect of broodstock size and source on ovarian maturation and spawning of *Penaeus monodon* Fabricius from the Gulf of Thailand. *J. World Aquacult. Soc.* 25: 41-49, 1994.
- Mendoza, R. Nauplii production from wild, cultivated and mixed populations of Blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. Applied Aquacult.* 7: 41-50, 1997.
- Ogle, J.T. Maturation of *Penaeus vannamei* based upon a survey. *Gulf Res. Rep.* 8: 295-297, 1991.
- Ogle, J.T. A study of factors influencing the hatch rate of *Penaeus vannamei* eggs. II. Presence of a spermatophore. *Gulf Res. Rep.* 9: 127-130, 1995.
- Ottogalli, L., C. Galine, and D. Goxe. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia. *J. Aqua. Trop.* 3: 111-125, 1988.
- Pascual, C., E. Valera, C. Re-Regis, G. Gaxiola, A. Sanchez, L. Ramos, L.A. Soto, and C. Rosas. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 477-484, 1998.
- Pratoomchat, B., S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta, and A.W. Fast. Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 530-540, 1993.

- Ramos, L. and J.H. Primavera. Induced maturation in ablated *Penaeus notialis* and *Penaeus schmitti*. In: *The first Asian Fisheries Forum*, edited by J.L. McLean, L.B. Dizon and L.V. Hosillos. Asian Fisheries Society. Manila, Philippines, p. 697-700, 1986.
- Robertson, L., W.A. Bray, and A.L. Lawrence. Reproductive response of *Penaeus stylirostris* to temperature manipulation. *J. World Aquacult. Soc.* 23: 109-117, 1991.
- Robertson, L., W.A. Bray, T.M. Samocho, and A.L. Lawrence. Reproduction of Penaeid shrimp: an operation guide. In: *CRC Handbook of Mariculture*, edited by J.P. McVey. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, p. 107-132, 1993.
- Talbot, P., D. Howard, J.R. Leung-Trujillo, T.W. Lee, W.Y. Li, H. Ro, and A.L. Lawrence. Characterization of male reproductive tract degenerative syndrome in captive Penaeid shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture* 78: 365-377, 1989.
- Wang, Q., M. Misamore, C.Q. Jiang, and C.L. Browdy. 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, 1995.
- Wyban, J., C.S. Lee, J.N. Sweeney, and W.K.J. Richards. Observations on development of a maturation system for *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 18: 198-200, 1987.
- Yano, I., R.A. Kanna, R.N. Oyama, and J. Wyban. Mating behaviour in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.* 97: 171-175, 1988.

CAPÍTULO V

**COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE
REPRODUCTORES, HUEVOS Y NAUPLIOS
EN RELACIÓN A NÚMERO DE DESOVES**

**COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LOS TEJIDOS EN RELACIÓN A
DESOVES MÚLTIPLES EN HEMBRAS SILVESTRES Y
DOMESTICADAS DE *Penaeus vannamei***

ARTÍCULO (En prensa):

Palacios E., A.M. Ibarra and I.S. Racotta. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*. In press, 1999.

ABSTRACT

The effect of the number of spawns on several biochemical components of ovary, hepatopancreas, and hemolymph was investigated. Shrimp of two origins were compared; wild-caught and pond-reared spawners. Individually tagged females were sampled at the end of a production period in a commercial hatchery. Females with multiple spawns had higher gonadosomatic index, increased levels of protein in the ovary, and increased levels of acylglycerides and total protein in the hepatopancreas. Wild shrimp had a higher fecundity and higher levels of acylglycerides in hepatopancreas, and acylglycerides, cholesterol, protein, and glucose in hemolymph. Pond-reared shrimp had a higher hepatosomatic index than wild counterparts. The biochemical composition of the ovary reflected the typical nutrient accumulation associated with maturation. The capacity to have multiple spawns could be related to metabolism of energetic lipids that are accumulated in the hepatopancreas, which in turns depends on spawner size and origin. Females with multiple spawning capacity may be adequate for production purposes, although more research is needed to address the possibility of specific metabolic indicators of a multiple-spawning capacity without a decline in spawn quality, and to define whether this is an inherited characteristic that can be selected in an improvement program.

Key words: shrimp reproduction, multiple spawns, lipid, hepatopancreas, ovary, hemolymph,

INTRODUCTION

The majority of the nauplii production in a hatchery can be attributed to only a limited proportion of females (McGovern, 1988; Bray et al., 1990; Cavalli et al., 1997). The females that contribute to the majority of the production share at least one common characteristic; an ability for frequent and multiple spawnings (Bray et al., 1990; Wyban and Sweeney, 1991; Palacios et al., 1999b). Shrimp can rematurate and have successive spawnings in a relatively short time as a consequence of ablation. However, frequent spawnings and the implied shorter rematuration period produces a strain on a female. A strain caused by successive spawns was first described and named "reproductive exhaustion" by Lumare (1979), who observed that females of *P. kerathurus* with several spawnings had ovaries that did not enlarge to a full degree and did not have a uniform development. If a female has frequent rematurations, there may not be sufficient time for the accumulation of nutrients in the hepatopancreas and transport to the ovary as it matures (Aquacop, 1977; Beard and Wickins, 1980; Emmerson, 1980; Primavera, 1985; Harrison, 1990; Browdy, 1992). The evaluation of the production of females that have had successive rematurations and spawnings has produced contradictory results (Beard and Wickins, 1980; Ottagalli et al., 1988; Bray et al., 1990; Hansford and Marsden, 1995; Sagi et al., 1997; Palacios et al., 1999b). Successive rematurations without an apparent decrease in the quality of the spawn have been proposed to be a consequence of adequate maturation conditions that could be correcting for a rapid depletion of reserves of the female (Emmerson, 1980; Browdy et al., 1986; Harrison, 1990; Marsden et al., 1997). The effect of successive spawnings has yet to be addressed from a biochemical point of view.

Increasing interest has been placed on the use of pond-reared shrimp as an alternative to wild shrimp in hatcheries. The use of pond-reared spawners has several advantages; their year-round availability, decreased seasonal variations, the capability of having genetic improvement programs, and the reduced impact on other fisheries. However, their use has been limited because it has long been believed that pond-reared shrimp do not have a satisfactory reproductive performance. In a previous paper, we found an overall acceptable reproductive performance of pond-reared shrimp compared to wild spawners in spite of differences in size (Palacios et al., 1999b).

In the present study, the relations between several biochemical components and the number of spawns were investigated in *P. vannamei*. Wild and pond-reared spawners were compared to determine if the origin of the shrimp can affect the reserves and maturation capabilities during successive spawnings in different ways.

MATERIAL AND METHODS

General hatchery conditions

Wild and pond-reared adult shrimp were brought to maturation at the commercial hatchery Acuacultores de La Paz, S.A. (APSA). Wild shrimp were captured on the coast of Sinaloa-Nayarit (México), and averaged 50 g. A first generation (G1) of pond-reared broodstock was obtained from wild spawners (G0), and were raised till 20 g for four months in tidal earthen ponds at a density of five shrimp/m² and with pellets, containing 35% protein, of commercial growout diet (P.I.A.S.A, La Paz, B.C.S., México). At 20 g, shrimp were further grown to spawner size (approximately 35 g) for five months at CIBNOR, at a density of one shrimp/m². Fresh squid was offered twice a week (approximately 10% of biomass on a fresh weight basis) in addition to pellets. These shrimp (G1) were used as spawners by APSA, to obtain a second generation (G2) of domesticated shrimp. Growout of G2 was done in conditions similar for G1. When an average weight of 11.5 g was obtained, a selection for weight of the 1,000 individuals from the top 20% was made (> 14 g). The selected shrimp were grown to spawner size (35 g, age 12 months) under conditions similar for G1.

Shrimp were stocked and matured under the hatchery conditions: 25-m² black fiberglass maturation tanks, six animals/m², 1:1 male to female ratio, 200% daily water exchange, and 28 °C and 36 ppt (average temperature and salinity). The diet was composed of 40% squid, 15% polychaetes, 40% clams, and 5% of a commercial maturation diet (Rangen Inc., Idaho, USA) divided into five daily rations accounting for a total daily supply of 10% of biomass. After a one-week acclimation period during which 80% of the animals molted, females were subjected to unilateral eyestalk ablation by cutting, and individually tagged with a color- and number-coded ring placed around the remaining eyestalk. Gonad development was monitored daily, and mature females with an attached spermatophore were placed in individual 160-L spawning tanks. Number of eggs/female (fecundity) was recorded from three 5-mL subsamples after stirring the spawning tank. In the morning, after recording the code, the females were returned to the maturation tank. Fertilization rate per spawn was assessed in three 5-mL samples of each spawn, based upon the presence of a double membrane in the egg. Viable spawns (fertilization rate > 40%) were transferred to 70-L fiberglass tanks for hatching. On the next day, nauplii were collected by positive phototropism and transferred to a bucket, where they were counted in three samples of 5 mL each.

Sampling

In November 1996, at the end of the production cycle, tagged females were sampled. Total weight of the females was determined after blotting them dry, and total length and width of the first abdominal segment was recorded. From the pleopod base of the first abdominal segment of each female, 300 µL of hemolymph was obtained using a 1-mL syringe rinsed with precooled anticoagulant solution of 5% sodium oxalate in isotonic saline. The hemolymph was centrifuged in a Eppendorf centrifuge for 2 minutes, and the plasma separated from the precipitated cells and stored at -70 °C for further biochemical analysis. The gonad from the abdominal region was dissected and fixed in Davidson solution for 24 h, embedded in a paraffin-paraplast mixture, sectioned (6 to 8 µm), and stained with Harris hematoxylin-eosin (Humanson 1972). The hepatopancreas and gonad from the cephalothoracic region were dissected, weighed, and stored at -70 °C till further analysis. The gonadosomatic index (GSI) and Hepatopancreatic index (HPI) were calculated as their proportion relative to total body weight by subtracting the weight of the gonad, as proposed by Clarke (1982). A sample of a uropod was taken from each female to assess the molting stage, and only those females in moulting stage C and early D, as described by Robertson et al. (1987), were considered for the analysis ($n = 56$ wild and $n = 44$ pond-reared).

Biochemical Analysis

Samples of tissue were weighed and homogenized in 3 mL of saline solution with a Polytron. Part of the homogenate was centrifugated at 3000 rpm for 10 min. Enzymatic-colorimetric analyzes for glucose (GOD-PAP, Merck), acylglycerides (GPO-PAP, Merck), lactate (Sigma), and cholesterol (Chod-PAP, Merck) were made with an adaptation for small samples using ELISA-microplates on the plasma (Palacios et al., 1998) or the centrifuged homogenate. Protein (Bradford, 1976) was determined in the plasma or in the crude homogenate after digestion with 0.1 N NaOH. Total lipids were determined by the sulphophosphovanillin method (Barnes and Blackstock, 1973), and total carbohydrates with the anthrone method (Van Handel, 1965).

Statistical Analysis

Two-way analysis of variance followed by a Tukey test for unequal *N post-hoc* mean comparisons (Statistica Version 4.3) were done to assess significant differences in morphometric and production variables, using as independent parameters origin (O: wild and pond) and number of viable spawns per female (S: divided in three groups: from 1 to 3 spawns/female, between 4 and 8, and more than 9 spawns/female). Spawns with a fertilization rate < 40% were considered as nonviable spawns.

Three-way analysis of variance followed by a Tukey test for unequal *n post-hoc* mean comparisons were done to assess significant differences in biochemical composition of tissues, using origin (O: wild and pond-reared), number of spawns (S: divided in two groups : one to four and five or more spawns/female), and maturation stage (M: immature and ripe) as independent variables. The stage of maturation was assigned according to the oocyte type and maximum oocyte diameter for each female, determined in a parallel work (Palacios et al., in press): Females with previtellogenic and early vitellogenic oocytes, which corresponds to the Previtellogenic stage described by Tan-Fermin (1989), and maximum oocyte diameter smaller than 150 μm were classified as immature ($102 \pm 6 \mu\text{m}$). Females classified as mature had a maximum oocyte diameter larger than 150 μm ($228 \pm 6 \mu\text{m}$), and had late vitellogenic oocytes (Vitellogenic stage) and oocytes with cortical rods (Cortical stage), as described by Tan-Fermin (1989).

Pearson's correlations between the number of spawns per female and biochemical levels in tissue were made. The acylglycerides/lipid ratio (AG/TL) expressed as percentage was transformed to arcsine for the analysis (Sokal and Rohlf, 1981), but only untransformed data are presented. Data are reported as mean \pm standard error. The level of significance was preset at $P < 0.05$.

RESULTS

Production variables

The latency period between eyestalk ablation and the first spawn for each female was shorter in shrimp with multiple spawns (main effect: $P < 0.05$; Table 1). The proportion of viable spawns (main effect: $P < 0.05$), the fecundity (main effect: $P < 0.05$), and the individual contribution to nauplii production (main effect: $P < 0.05$) was higher in shrimp with multiple spawns (Table 1). Wild females had a higher fecundity than pond-reared shrimp (main effect: $P < 0.05$; Table 1). Wild females with multiple spawns produced more nauplii/spawn than pond-reared shrimp (interaction: $P < 0.05$) or wild shrimp with few spawns (main effect: $P < 0.05$; Table 1). No other significant differences were found in the production variables between origins.

Table 1. Differences in production variables as an effect of spawning order in wild and pond-reared *P. vannamei* broodstock (means \pm SE). Females were classified according to the number of viable spawns each had into three groups: less than three spawns, between 4 and 8 spawns, and more than 9 spawns. The results of the ANOVA are presented in the last column: main effect of Origin (O), Number of Spawns (N), and Interaction (OxN). N.S. Not significant.

Number of spawns		less than 3 spawns	4 to 8 spawns	more than 9 spawns	ANOVA	
Days till first spawn	Wild	40.3 \pm 10.7	24.8 \pm 2.1	26.0 \pm 4.0	O	N.S.
	Pond	33.6 \pm 4.7	22.0 \pm 3.0	17.0 \pm 6.4	N	$P < 0.05$
					OxN	N.S.
No. spawns/month/female	Wild	1.13 \pm 0.23	2.56 \pm 0.27	3.60 \pm 0.46	O	N.S.
	Pond	1.01 \pm 0.12	2.78 \pm 0.13	3.75 \pm 0.33	N	$P < 0.01$
					OxN	N.S.
No. Viable spawns/month/female	Wild	0.55 \pm 0.12	1.94 \pm 0.17	3.21 \pm 0.58	O	N.S.
	Pond	0.65 \pm 0.09	1.99 \pm 0.10	3.08 \pm 0.26	N	$P < 0.01$
					OxN	N.S.
% Viable spawns	Wild	59.8 \pm 13.6	77.1 \pm 4.0	84.9 \pm 9.2	O	N.S.
	Pond	65.2 \pm 6.2	75.0 \pm 3.7	82.0 \pm 1.2	N	$P < 0.05$
					OxN	N.S.
No. Eggs/spawn/female (x10³)	Wild	194.1 \pm 12.2	197.7 \pm 18.7	215.3 \pm 16.9	O	$P < 0.05$
	Pond	110.0 \pm 11.6	149.4 \pm 08.7	189.6 \pm 13.0	N	$P < 0.05$
					OxN	N.S.
% Fertilization	Wild	65.1 \pm 6.0	63.3 \pm 2.1	72.9 \pm 5.1	O	N.S.
	Pond	58.0 \pm 3.4	63.0 \pm 2.6	68.0 \pm 3.3	N	N.S.
					OxN	N.S.
No. Nauplii/spawn/female (x10³)	Wild	41.2 \pm 5.1	55.5 \pm 10.7	73.4 \pm 3.9	O	N.S.
	Pond	53.3 \pm 5.2	52.7 \pm 6.3	51.8 \pm 4.9	N	$P < 0.05$
					OxN	$P < 0.05$
Total nauplii produced by each female (x10³)	Wild	140.4 \pm 20.9	487.3 \pm 30.0	830.1 \pm 110.9	O	$P < 0.05$
	Pond	160.5 \pm 17.7	427.0 \pm 21.2	675.9 \pm 56.3	N	$P < 0.01$
					OxN	N.S.

Morphometric variables

Body weight (main effect: $P < 0.05$) and ovary weight (main effect: $P < 0.01$) were higher in females with multiple spawns (Table 2). Wild females had higher body weight (main effect: $P < 0.05$) and ovary weight (main effect: $P < 0.05$) than pond-reared shrimp (Table 2). Body weight was positively correlated with multiple spawns in pond-reared shrimp ($r = 0.47$; $P < 0.01$), but no significant correlation was found in wild shrimp. No significant differences were observed in the weight of the hepatopancreas between origins or as an effect of multiple spawns.

Gonadosomatic index (GSI) increased as a result of maturation stage (main effect: $P < 0.01$; Fig. 1A), and number of spawns (main effect: $P < 0.05$). The GSI was positively correlated to number of spawns, both in wild ($r = 0.34$; $P < 0.05$), and pond-reared females ($r = 0.33$; $P < 0.01$). The hepatosomatic index (HPI)

was higher in pond-reared females than wild shrimp (main effect: $P < 0.01$; Fig. 1B). No significant differences in HPI were observed as a result of maturation stage or number of spawns, and no correlation between the number of spawns and the HPI was found.

Table 2. Differences in morphometric variables as an effect of spawning order in wild and pond-reared *P. vannamei* broodstock (means \pm SE). Females were classified according to the number of viable spawns each had into three groups: less than three spawns, between 4 and 8 spawns, and more than 9 spawns. The results of the ANOVA are presented in the last column: main effect of Origin (O), Number of Spawns (N), and Interaction (OxN). N.S. Not significant.

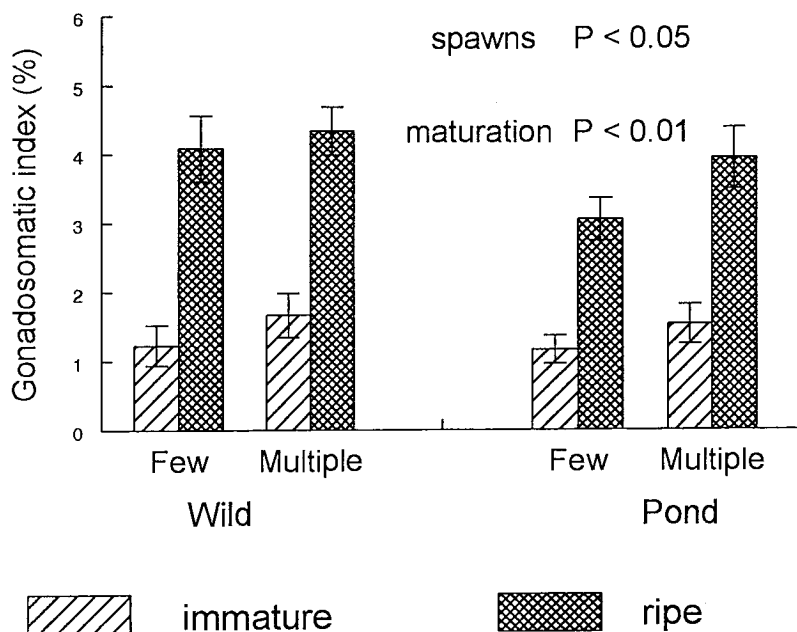
Number of spawns		less than 3	4 to 8	more than 9	ANOVA	
		spawns	spawns	spawns		
Body weight (g)	Wild	50.0 \pm 2.5	52.9 \pm 1.7	51.8 \pm 2.9	O	$P < 0.01$
	Pond	37.0 \pm 0.8	41.2 \pm 1.0	46.1 \pm 3.0	N	$P < 0.05$
					OxN	N.S.
Body length (cm)	Wild	17.5 \pm 0.3	17.8 \pm 0.2	17.6 \pm 0.3	O	$P < 0.01$
	Pond	15.9 \pm 0.2	16.5 \pm 0.1	17.3 \pm 0.8	N	$P < 0.05$
					OxN	N.S.
Width first abdominal segment (cm)	Wild	1.80 \pm 0.05	1.87 \pm 0.03	1.81 \pm 0.05	O	$P < 0.05$
	Pond	1.65 \pm 0.02	1.74 \pm 0.02	1.84 \pm 0.08	N	$P < 0.01$
					OxN	N.S.
Ovary weight (g)	Wild	1.03 \pm 0.20	1.48 \pm 0.15	1.80 \pm 0.33	O	$P < 0.05$
	Pond	0.65 \pm 0.07	1.12 \pm 0.13	1.41 \pm 0.48	N	$P < 0.01$
					OxN	N.S.
HP weight (g)	Wild	0.90 \pm 0.08	0.98 \pm 0.06	1.13 \pm 0.05	O	N.S.
	Pond	0.86 \pm 0.04	0.90 \pm 0.06	0.99 \pm 0.07	N	N.S.
					OxN	N.S.

Biochemical variables in hemolymph

Acylglyceride (main effect: $P < 0.01$; Fig. 2A), cholesterol (main effect: $P < 0.01$; Fig. 2B), glucose (main effect: $P < 0.05$; Fig. 2C), and total protein (main effect: $P < 0.05$; Fig. 2D) levels in hemolymph were higher for wild females than for pond-reared spawners.

Cholesterol and glucose levels were affected by number of spawns in a different way in relation to origin, as shown by significant interactions depicted in Fig. 2B and C.

A



B

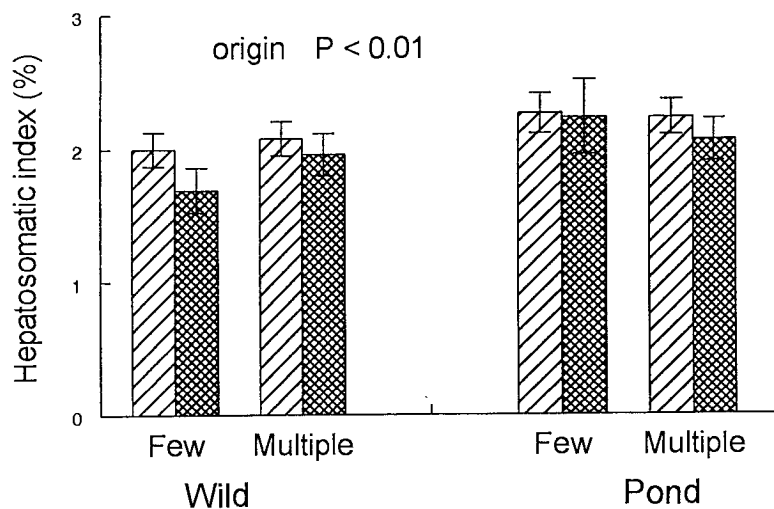


Fig. 1. Means \pm SE of gonadosomatic (A) and hepatosomatic indexes (B) in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock in relation to the number of spawns and maturation stage. The results of the trifactorial analysis of variance are inserted in the figure. Factors considered for the analysis were origin (wild vs pond-reared), maturation stage (immature vs ripe, grouped according to the maximum oocyte diameter), and number of spawns (few = less than four vs multiple = more than four). The main effects and interactions are shown only when significant. A mean comparison was done by Tukey test for unequal n only when there was a significant effect of the interactions. Bars not sharing the same letter are significantly different ($P < 0.05$).

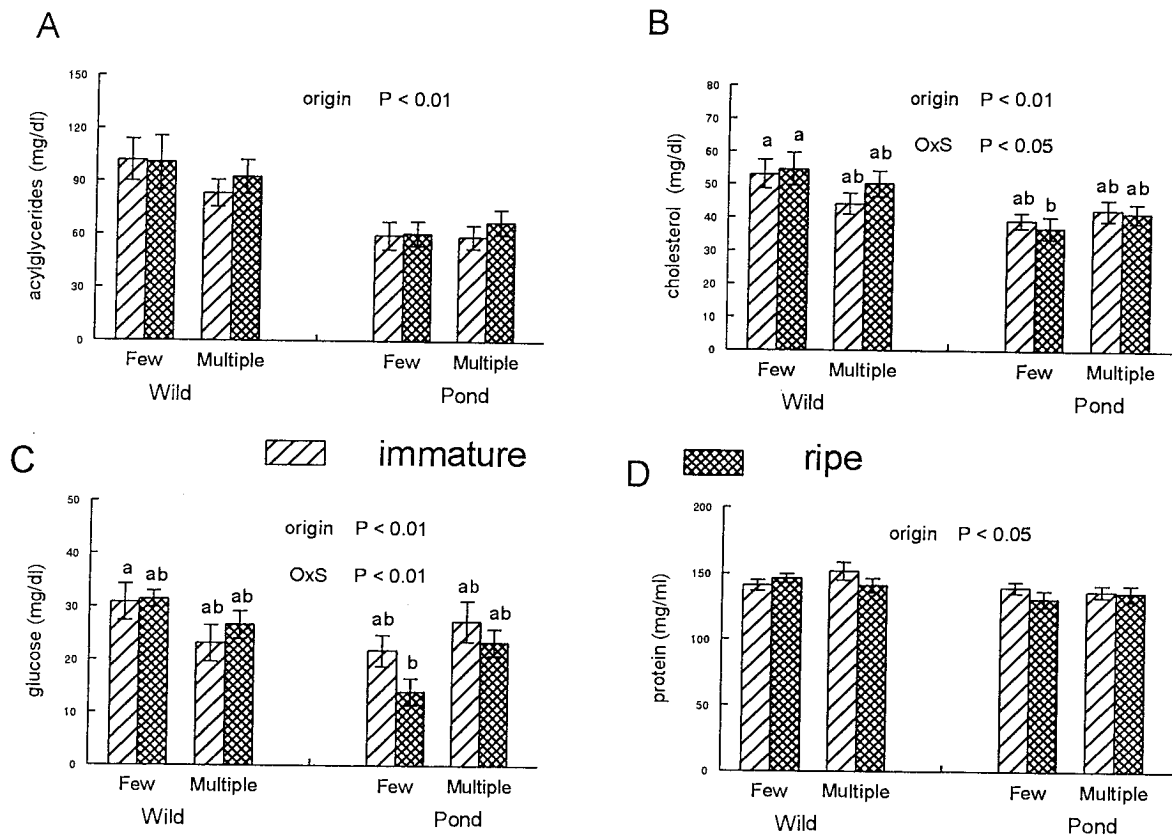


Fig. 2. Means \pm SE of hemolymph concentration of acylglycerides (A), cholesterol (B), glucose (C), and total protein (D) in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock in relation to the number of spawns and maturation stage. See Fig. 1 for statistical analysis.

Biochemical variables in hepatopancreas

Acylglyceride levels in hepatopancreas were higher in wild spawners (main effect: $P < 0.05$; Fig. 3B). Regardless of origin and maturation, shrimp with multiple spawns had higher levels of acylglyceride (main effect: $P < 0.05$), AG/TL ratio (main effect: $P < 0.01$; Fig. 3C), and total protein (main effect: $P < 0.01$; Fig. 4C) levels in hepatopancreas. AG/TL ratio was lower in mature females (main effect: $P < 0.05$; Fig. 3C). Total lipid levels in hepatopancreas were affected in a different way in relation to origin and number of spawns, as shown by a significant interaction (interaction; $P < 0.05$; Fig. 3A), and carbohydrate levels in hepatopancreas were affected in a different way in relation to origin, maturation, and number of spawns, as shown by a significant interaction between the three factors (interaction; $P < 0.05$; Fig. 4B). No significant effect was observed in the glucose levels in hepatopancreas in relation to origin, number of spawns, or maturation stage.

A positive correlation between number of spawns and AG levels was found for wild ($r = 0.41$; $P < 0.01$) and pond-reared females ($r = 0.25$; $P < 0.05$). A positive correlation was found between number of spawns and AG/TL ratio for wild ($r = 0.52$; $P < 0.01$) and pond-reared females ($r = 0.37$; $P < 0.05$). A positive correlation between number of spawns and carbohydrate levels was found for wild ($r = 0.30$; $P < 0.05$) and pond-reared females ($r = 0.39$; $P < 0.01$).

Biochemical variables in ovary

Regardless of origin, higher levels of total lipid (main effect: $P < 0.01$; Fig. 5A), acylglyceride (main effect: $P < 0.01$; Fig. 5B), cholesterol (main effect: $P < 0.01$; Fig. 5D), and total protein (main effect: $P < 0.01$; Fig. 6C) were found in females with ripe ovaries. AG/TL ratio in ripe females was affected by origin (interaction: $P < 0.05$; Fig. 5C). Protein levels in ovary were higher in females with multiple spawns (main effect: $P < 0.05$; Fig. 6C). No significant effect was observed in glucose or carbohydrate levels in ovary in relation to origin, number of spawns, or maturation stage.

There was a significant negative correlation between AG/TL ratio and GSI for wild ($r = 0.31$; $P < 0.05$) and pond-reared females ($r = 0.29$; $P < 0.05$), between lipid levels in the ovary and GSI for wild ($r = 0.53$; $P < 0.01$) and pond-reared shrimp ($r = 0.69$; $P < 0.01$), and between AG levels in ovary and GSI for wild ($r = 0.41$; $P < 0.01$) and pond-reared shrimp ($r = 0.38$; $P < 0.01$). A positive correlation between total protein levels in ovary and number of spawns was found for wild ($r = 0.27$; $P < 0.05$) and pond-reared females ($r = 0.32$; $P < 0.05$).

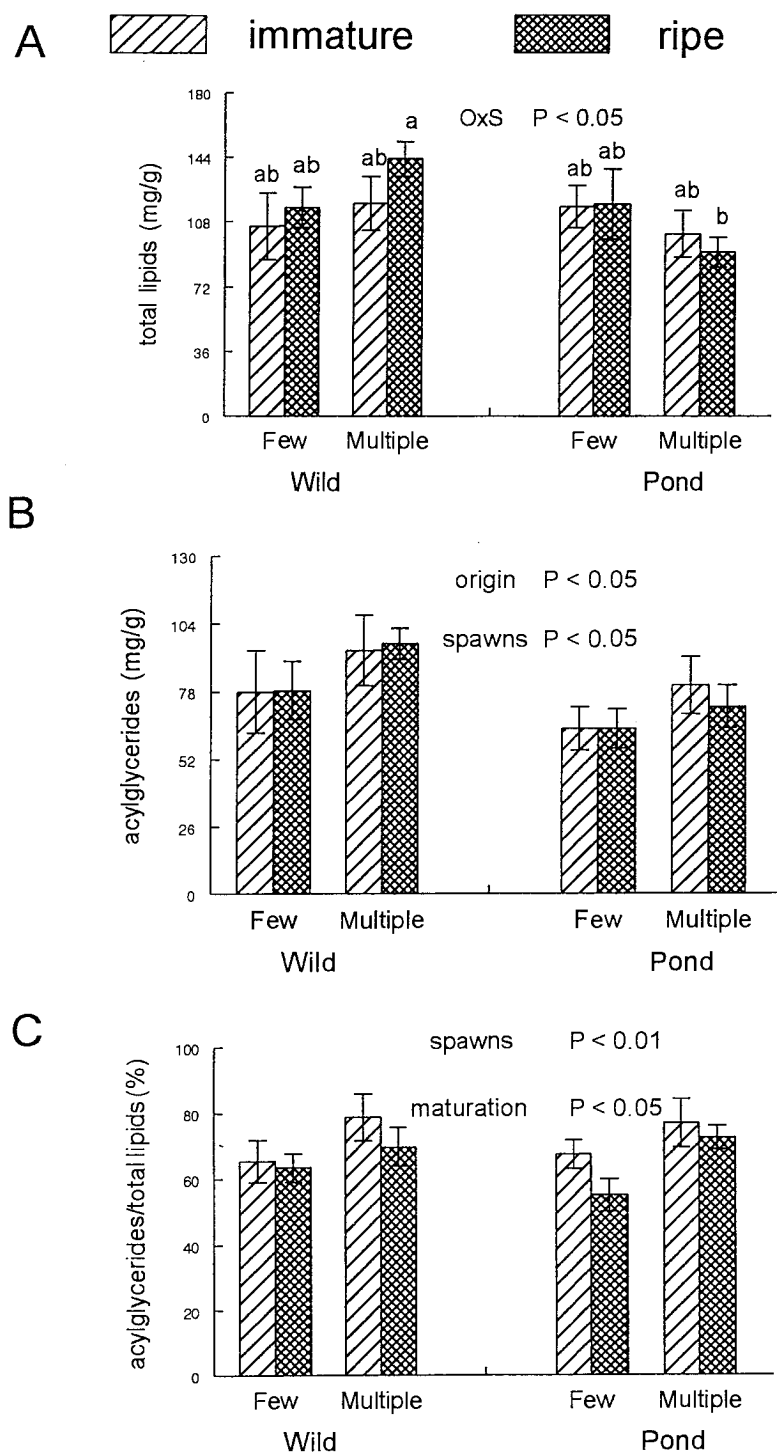


Fig 3. Means \pm SE of hepatopancreas concentration of total lipids (A), acylglycerides (B), and acylglycerides/total lipids ratio (C) in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock in relation to the number of spawns and maturation stage. See Fig. 1 for statistical analysis.

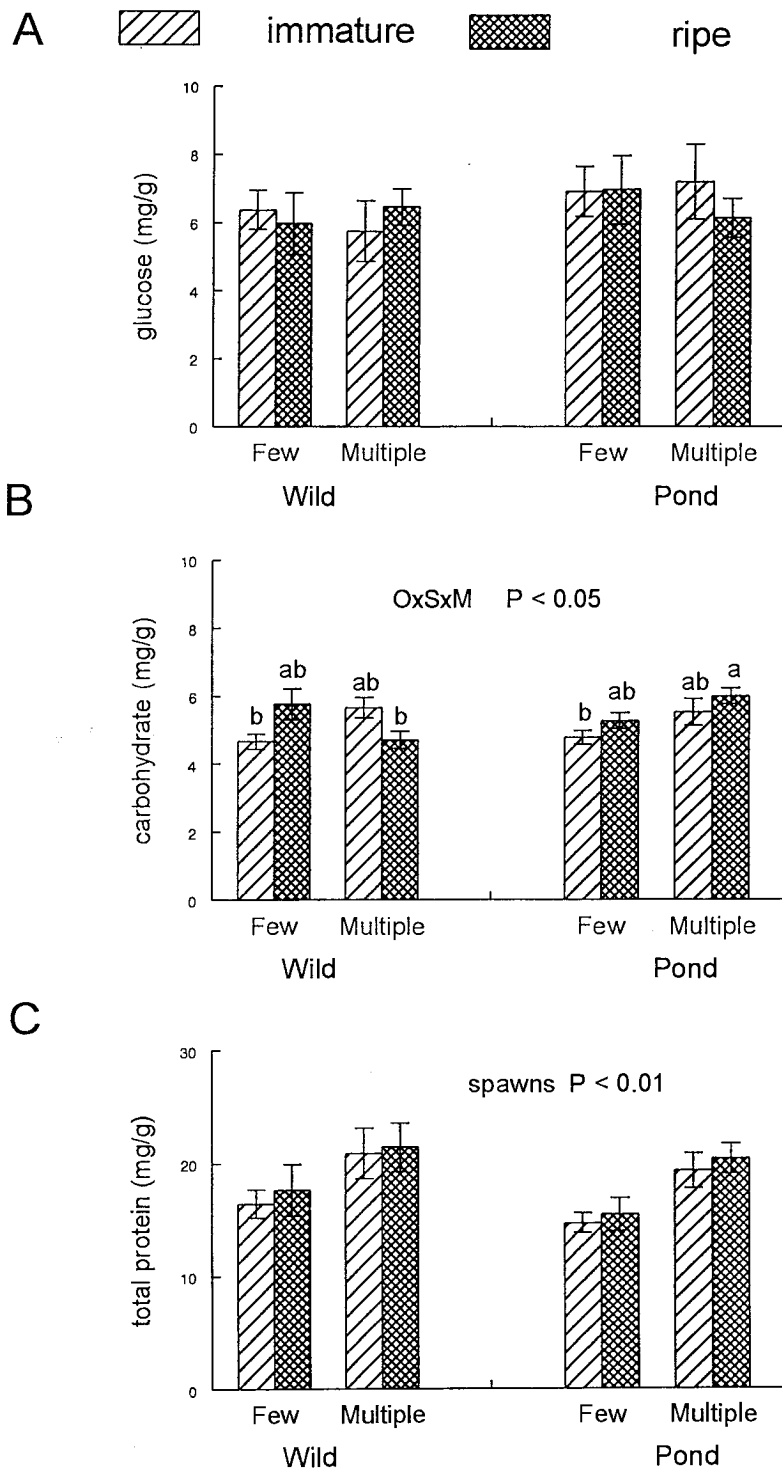


Fig 4. Means \pm SE of hepatopancreas concentration of glucose (A), carbohydrate (B), and total protein (C) in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock in relation to the number of spawns and maturation stage. See Fig. 1 for statistical analysis.

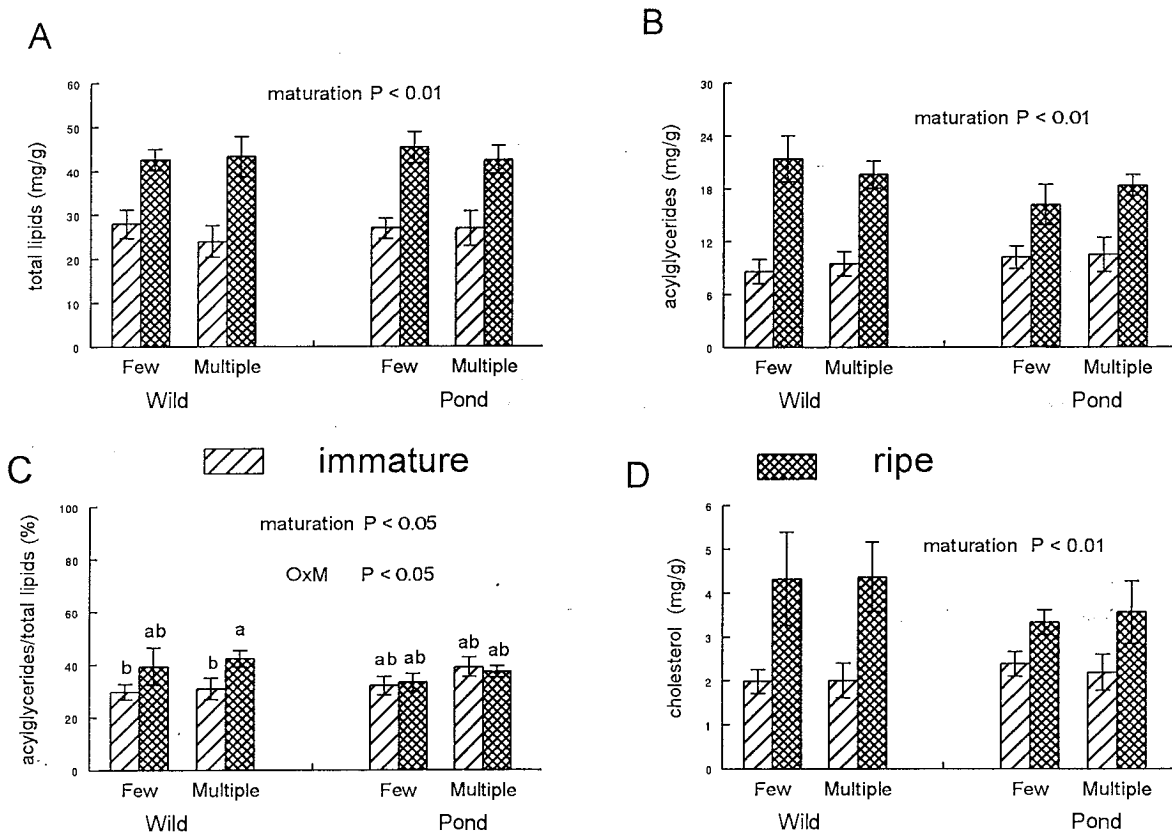


Fig 5. Means \pm SE of ovary concentration of total lipids (A), acylglycerides (B), acylglycerides/total lipid ratio (C), and cholesterol (D) in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock in relation to the number of spawns and maturation stage. See Fig. 1 for statistical analysis.

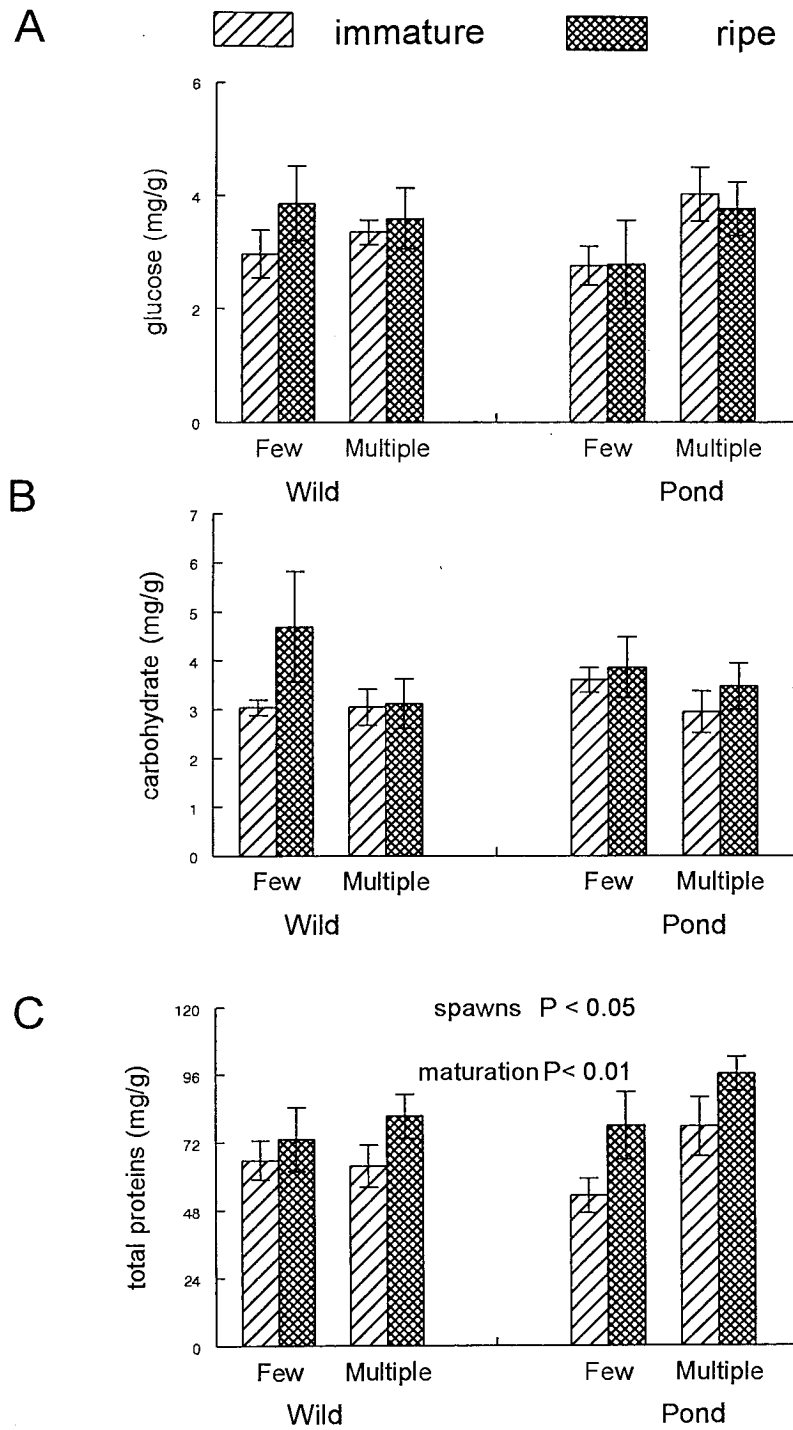


Fig 6. Means \pm SE of ovary concentration of glucose (A), carbohydrate (B), and total protein (C) in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock in relation to the number of spawns and maturation stage. See Fig. 1 for statistical analysis.

DISCUSSION

Our purpose was to compare the biochemical reserves of wild and pond-reared females in relation to the number of spawns after a 3-month production period. In addition, changes in biochemical levels occur as a result of maturation stage, so this was considered as additional variable because of its effect on the mobilization and accumulation of reserves in several tissues. Accumulation of biochemical components, especially lipids, in the maturing ovary has been reported in several shrimp species (Gehring, 1974; Kulkarni and Nagabhushanam, 1979; Galois, 1984; Castille and Lawrence, 1989; Millamena and Pascual, 1990; Mourente and Rodríguez, 1991; Mohamed and Diwan, 1992). In our study, an increase in the level of total lipids, acylglycerides (AG), cholesterol, and total proteins in mature ovaries was observed. The positive correlations between lipid levels in the ovary and GSI is in agreement with Galois (1984), who found a correlation between lipid accumulation in the ovary and the GSI. Acylglycerides represent the bulk of lipids in the hepatopancreas, whereas in the ovary this lipid class represents a lower fraction because phospholipids are reported to be predominant (Gehring, 1974; Chappelle, 1986; Millamena and Pascual, 1990; Mourente and Rodríguez, 1991). Several authors report a decrease in total or specific lipids in the hepatopancreas during maturation, and assume they are mobilized to the ovary (Galois, 1984; Teshima et al., 1988; Castille and Lawrence, 1989; Millamena and Pascual, 1990). Depletion of the total lipids in hepatopancreas could also be explained by a decrease in dietary lipid (Clarke, 1982) or by an increase in energy consumption (Teshima et al., 1988; Harrison, 1990). However, as in our case, this decrease has not always been observed, and several factors such as species differences, the use of eyestalk ablation, and influence of diet could partially explain these conflicting results (Castille and Lawrence, 1989; Mourente and Rodríguez, 1991; Millamena et al., 1993). We did observe a decrease in the hepatopancreas of the relative amount of AG (AG/TL ratio) in ripe females, which could indicate a mobilization of this particular lipid class to the ovaries. The biochemical levels in hepatopancreas and hemolymph were affected by the maturation stage in a different way in wild and pond-reared shrimp, but these differences were also a consequence of number of spawns and will be discussed below.

The goal of hatcheries is to increase production. This increased production is forced by the eyestalk ablation of females. However, continuous forced reproduction has been suggested to produce exhaustion of the female reserves because of insufficient time between spawnings to allow the shrimp to accumulate sufficient nutrients (Aquacop, 1977; Beard and Wickins, 1980; Primavera, 1985; Harrison, 1990; Browdy, 1992). If this is true, we would expect females with multiple spawns to have diminished reserves, especially in the ovary, and as a consequence, to have an inadequate maturation process. If a female with diminished reserves is forced to mature, it may produce eggs of lower quality. It has been reported the first spawns of a female are the best in terms of fecundity, fertilization, hatching, and metamorphosis rates (Emmerson, 1980; Beard and Wickins, 1980; Bray et al., 1990; Marsden et al., 1997; Palacios et al., 1998), however, in a number of cases, no substantial alterations in spawn quality with successive spawns has been reported (Browdy and Samocha, 1985; Ottogalli et al., 1988; Palacios et al., 1999b).

The comparison of the biochemical levels between females with few or multiple spawns revealed higher levels of acylglycerides, total proteins and carbohydrates, and AG/TL ratio in the hepatopancreas and increased levels of protein in the ovary of females with multiple spawns. However, no differences were observed in the AG fraction or total lipids in the ovary. In agreement, Vázquez-Boucard (1990) found no differences in total lipid and lipovitellin levels in the ovaries of *P. indicus* females that had three successive spawns. Similar

biochemical levels in ovaries in spite of the number of spawns may indicate some kind of regulation of the reserves. The ovary may need to reach a certain level of reserves to mature and spawn. If these levels are not reached, instead of spawning, the ovary may enter a reabsorption phase. Females that had a low spawning frequency did have a high incidence of oocyte atresia and reabsorption before maturation was fully completed and the female had a chance to spawn (Palacios et al., in press). Eyestalk ablation could be forcing females in a poor physiological condition, or that are channeling energy into growth, to enter the process of maturation and later reabsorb the gonad without spawning. An analogous physiological situation is the well-known reabsorption of mature ovaries at the premolt stage, and it was concluded this may help in the conservation of energy and in synchronizing molt and reproduction (Adiyodi, 1985; Emmerson, 1980; Browdy, 1992; Qunitio et al., 1993). If a female is in a poor condition and has few reserves, it may fail to spawn or it may produce spawns of poor quality. However, if it is in excellent condition, it can be expected to have multiple and therefore, more frequent spawns through the production period.

The reason why acylglyceride content and its relative proportion to total lipid levels in hepatopancreas are higher in females with multiple spawns is not known. This result is surprising and appears to be contrary to the hypothesis of depletion of reserves associated with successive rematurations (Primavera, 1985; Harrison, 1990), and with the decrease in total and specific lipid classes in hepatopancreas in mature *P. indicus* females that had spawned three times compared to females that only spawned once (Vázquez-Boucard, 1990). Increased levels in hepatopancreas of some reserves could be a result of a diminished mobilization from the hepatopancreas to the ovary. However, the differences found in the hepatopancreas of females with multiple spawns did not seem to affect the biochemical reserves in ovaries. Therefore, we could assume that the mobilization from the hepatopancreas to the ovary is not reduced in such a way as to alter the levels of reserves in the ovary.

In addition to the data presented above, we sampled four immature females that never spawned. When we compared the biochemical data of these females with the other immature females of both groups (few and multiple spawns), we found that the females with no spawns had significantly lower levels of acylglycerides in the hepatopancreas (no spawns = 41.9 mg/g; few spawns = 77.9 mg/g; multiple spawns = 94.1 mg/g; $P < 0.05$), and of protein in the hepatopancreas (no spawns = 14.5 mg/g; few spawns = 15.6 mg/g; multiple spawns = 20.6 mg/g; $P < 0.01$). Therefore, successive rematuration could be addressed in another way; females that accumulate more acylglycerides and protein in the hepatopancreas may have the capacity to remature several times. It is possible that an efficient assimilation, storage, and mobilization of nutrients (particularly the energetic lipid fraction, i.e. acylglycerides) are reflected in their content in the hepatopancreas. In turn, the ability of individuals to have successive rematurations and spawns could be related to an increased metabolic efficiency in the process considered above, which is associated with higher levels of neutral lipids in the hepatopancreas. If this is so, more research is needed to address the possibility of specific metabolic indicators of a multiple-spawning capacity without a decline in spawn quality and to define whether this is an inherited characteristic that can be selected in a genetic improvement program. For example, the four females that had not spawned had significantly lower levels of protein in the hemolymph (no spawns = 109.3 mg/dl; few spawns = 140.9 mg/dl; multiple spawns = 144.2 mg/dl; $P < 0.05$). This is in agreement with Aquacop (1983), who had suggested that protein levels in hemolymph could be used as a predictive indicator of the spawning capabilities. This could be important for production because it is not known why pronounced differences in maturation

capabilities between females exist even when the overall conditions are the same for all individuals. The biochemical analysis were done at the end of a production period of three months, and it is probable that the biochemical variables were affected by the maturation conditions (e.g. diet). Further studies are needed to explore predictive metabolic indicators of multiple spawning capability, evaluated before the females are used in production.

If there are no differences in the accumulation of reserves in the ovary as a result of multiple spawns, we would expect the larvae of a first or last spawn to be of similar quality. We did not observe an effect of number of spawns on the fertilization (Table 1), and percent of viable spawns was higher in females with multiple spawns (Table 1). In agreement, an individual follow-up of tagged females in the same maturation condition has shown there is no substantial decline of the spawn quality as an effect of number of spawns evaluated from fertilization and hatching rates (Palacios et al. 1999b), or in the maturation process of the oocytes in relation to number of spawns (Palacios et al., in press). However, we have also found that the spawn quality decreases over the time spent in a production cycle (Palacios et al., 1998; Palacios et al., 1999a). The females used in the present study were sampled at the end of the production cycle, and we can only speculate on the biochemical reserves the females had at the beginning of the cycle. It is possible that spawners at the beginning of the cycle have more reserves or have a better overall condition compared to females that have been in production for several months. As a consequence, the decrease in the quality of the spawn that can be observed over the production period would be a consequence of a decrease in reserves of the females over the production cycle. However, this decrease is not necessarily a direct consequence of the number of spawns, but it is possible it is a result of other maturation conditions that can be altered during the production cycle (i.e. diet, disease, stress, ablation). Further studies are needed to elucidate possible differential effects of time after eyestalk ablation and number of spawns on adult and larval characteristics.

We did not find significant differences in the biochemical levels in the ovary between wild and pond-reared shrimp. This is in agreement with previous results in which no differences in the biochemical composition of the resulting eggs and nauplii were obtained between wild and pond-reared spawners (Ibarra et al., 1997). In addition, the proportions of vitellogenic and cortical oocytes or oocyte diameter in each maturation stage were also similar for both origins (Palacios et al., in press). However, fecundity was higher in wild spawners compared to pond-reared shrimp. The number of eggs is known to be related to spawner size (Aquacop, 1977; Emmerson, 1980; Ottogalli et al., 1988; Hansford and Marsden, 1995; Cavalli et al., 1997; Ibarra et al., 1997), and this could explain the higher fecundity of wild shrimp. We found a positive correlation between number of spawns and body weight ($r = 0.47$; $P < 0.01$) for pond-reared broodstock. In this case, size could be associated not only with fecundity but also with the multiple spawning capacity. However, in larger wild shrimp, size is not so closely related to the spawning frequency (Palacios et al., 1999b), and the fecundity would represent the maximum number of eggs that a shrimp of that size may produce. Pond-reared females were ablated at a smaller size than wild counterparts, and as a consequence, they may be channeling their nutrients into somatic growth rather than reproduction (Quinitio et al., 1993). In accordance, body weight of pond-reared females that had not spawned was lower than that of pond-reared females with multiple spawns, with intermediate values for females with few spawns (no spawns = 34.6 g; few spawns = 37.2 g; multiple spawns = 42.4 g; $P < 0.05$). If small shrimp have to channel their energy to both growth and reproduction, then to mature, pond-reared shrimp probably have to deplete their hepatopancreatic reserves or put more strain on

the hepatopancreatic metabolism. We found that wild shrimp had higher levels of AG in hepatopancreas and higher levels of AG, cholesterol, glucose, and protein in hemolymph than pond-reared females. In contrast, previous work reported increased levels of neutral lipids in the hepatopancreas of farmed shrimp compared to those obtained from the wild (O'Leary and Matthews, 1990; Jiménez et al., 1995). These differences could be attributed to dietary deficiencies of farmed shrimp (O'Leary and Matthews, 1990; Jiménez et al., 1995) or to general rearing conditions which may play an important role in subsequent reproductive performance (Browdy, 1992). Prematuration conditions probably have little influence on our experiment in which all animals were on the same diet for at least three months. Different capacities of assimilation, storage, and mobilization of several nutrients (especially lipids) could exist and explain our results when comparing wild and pond-reared shrimp. As discussed above, AG levels in hepatopancreas could be related to multiple spawning capacity in wild and pond-reared shrimp. This assumption could also explain differences between origins because wild organisms had higher AG in hepatopancreas (present work) and also had more spawns (Palacios et al., 1999b). Whether this finding can be related to the higher levels of several biochemical components in the hepatopancreas and hemolymph of wild shrimp, or to differences in size between wild and pond-reared females remains to be explained.

In conclusion, females with multiple spawning capacity are recommended for production purposes although more studies are needed to address the resulting spawn and larval quality. This capacity could be related to metabolism of energetic lipids, which in turns depends on spawner size and origin. Ovary biochemical composition only reflects the typical nutrient accumulation associated with maturation but no relation was found with multiple spawning capacities, size, or origin of shrimp.

REFERENCES

- Adiyodi, R.G.** Reproduction and its control. In: *The biology of Crustacea*, edited by D.E. Bliss and L.H. Mantel. Vol 9, Integument, Pigments and Hormonal Processes, Academic Press, Inc. New York, p. 147-215. 1985.
- Aquacop.** Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon*, Fabricius in Polynesia. *Proc. World Maricult. Soc.* 8: 927-945, 1977.
- Aquacop.** Use of serum protein concentration to optimize Penaeid shrimp quality. In: *Proceedings of the First International Conference Warmwater Aquaculture of Crustacea*, edited by G.L. Rogers, R. Day, and A. Lim. Laie, Hawaii, p. 373-381, 1983.
- Barnes, H. and J. Blackstock.** Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphovanillin method for 'total' lipids. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 12: 103-118, 1973.
- Beard, T.W. and J.F. Wickins.** Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture* 20: 79-89, 1980.
- Bradford, M.M.** A refined method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-253, 1976.
- Bray, W.A., A.L. Lawrence, and J.L. Lester.** Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. *J.World Aquacult.Soc.* 21: 41-52, 1990.
- Browdy, C. L.** A review of the reproductive biology of penaeus species: perspective on controlled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 22-51, 1992.
- Browdy, C.L. and T.M. Samochoa.** The effect of eyestalk ablation on spawning, molting and mating of

- Penaeus semisulcatus* de Haan. *Aquaculture* 49: 19-29, 1985.
- Browdy, C.L., A. Hadani, T.M. Samocha, and Y. Loya.** The reproductive performance of wild and pond-reared *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Aquaculture* 59: 251-258, 1986.
- Castille, F.L. and A.L. Lawrence.** 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, 1989.
- Cavalli, R.O., M.P. Scardua, and W. Wasielesky Jr.** Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *J.World Aquacult.Soc.* 28: 260-267, 1997.
- Chapelle, S.** Aspects of phospholipid metabolism in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. *Comp.Biochem.Physiol.* 84: 423-439, 1986.
- Clarke, A.** Lipid synthesis and reproduction in the polar shrimp *Chorismus antarticus*. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 9: 81-90, 1982.
- Emmerson, W.D.** Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Galois, R.G.** Variations de la composition lipidique tissulaire au cours de la vitellogenèse chez la crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards. *J.Exp.Mar.Biol.*, 84: 155-156, 1984.
- Gehring, W.R.** Maturation changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Comp.Biochem.Physiol.* 49: 511-524, 1974.
- Hansford, S.W. and G.E. Marsden.** Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J.World Aquacult.Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Harrison, K.** The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: A review. *J.Shellfish Res.* 9: 1-28, 1990.
- Humanson, G.L.** *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: Freeman and Co., 641 p. 1972.
- Ibarra, A. M., Ramirez, J. L., Racotta, I. S., Palacios, E., and Magallon, F.** Performance comparison of eggs and nauplii for spawners from a second generation domesticated and wild shrimp of *Penaeus vannamei*. In: *IV Symposium on Aquaculture in Central America*, edited by D.E. Alston, B.W. Green, and H.C. Clifford. Tegucigalpa, Honduras. p. 159-160, 1997.
- Jimenez, M.A., E. Garcia, G. Gandonou, and M. Oliva.** Metabolismo lipidico del hepatopancreas de *Penaeus schmitti* en cultivo y del medio natural. *Rev.Inv.Mar.* 16: 157-164, 1995.
- Kulkarani, K.G. and R. Nagabhushanam.** Mobilization of organic reserves during ovarian development in a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers)(Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture* 18: 373-377, 1979.
- Lumare, F.** Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture* 18: 203-214, 1979.
- Marsden, G.E., J. McGuren, S.W. Hansford, and M.J. Burke.** A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145-156, 1997.
- McGovern, K.M.** Management strategies for *Penaeus vannamei* Broodstock. *J.World Aquacult.Soc.* 19: 51A, 1988.
- Millamena, O.M. and F.P. Pascual.** Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* Fabricius broodstock from the wild. *J.World Aquacult.Soc.* 21: 116-121, 1990.
- Millamena, O.M., R. Pudadera, and M.R. Catacutan.** Tissue lipid content and fatty acid composition during ovarian maturation of ablated *Penaeus monodon*. *Isr.J.Aquacult.Bamigdes* 45: 120-125, 1993.
- Mohamed, K.S. and A.D. Diwan.** Biochemical changes in different tissues during yolk synthesis in marine prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian J.Marine.Sci.* 21: 30-34, 1992.
- Mourente, G., A. Medina, S. Gonzalez, and A. Rodriguez.** Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Mar.Biol.* 110: 21-28, 1991.
- O'Leary, C.D. and A.D. Matthews.** Lipid class distribution and fatty acid composition of wild and farmed

- prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture* 89: 65-81, 1990.
- Ottogalli, L., C. Galine, and D. Goxe. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia. *J.Aqua.Trop.* 3: 111-125, 1988.
- Palacios, E., A.M. Ibarra, J.L. Ramirez, G. Portillo, and I.S. Racotta. Biochemical composition of egg and nauplii in White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquacult.Res.* 29: 183-189, 1998.
- Palacios, E., C.I. Pérez-Rostro, J.L. Ramirez, A.M. Ibarra, and I.S. Racotta. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. *Aquaculture* 171: 209-221, 1999a.
- Palacios, E., I.S. Racotta, and APSA. Spawning frequency analysis of wild and pond-reared of White Pacific shrimp *Penaeus vannamei* broodstock under large-scale hatchery conditions. *J.World Aquacult.Soc.* 30: 180-191, 1999b.
- Palacios, E., C. Rodriguez-Jaramillo, and I.S. Racotta. Comparison of ovary histology between different-size wild and pond-reared shrimp *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*). *Invert. Reprod. Develop.* In press, 1999.
- Primavera, J. H. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In: *Proceedings of the First International Conference on the culture of Penaeid Prawn/Shrimp*, edited by Y. Taki, J.H. Primavera, J.A. Llobrera. Iloilo City, Philippines, p. 47-64, 1985.
- Quinitio, E.T., R.M. Caballero, and L. Gustilo. Ovarian development in relation to changes in the external genitalia in captive *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 114: 71-81, 1993.
- Robertson, L., W.A. Bray, J.R. Leung-Trujillo, and A.L. Lawrence. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J.World Aquacult.Soc.* 18: 180-185, 1987.
- Sagi, A., R. Shoukrun, T. Levy, A. Barki, G. Hulata, and H. Karplus. Reproduction and molt in previously spawned and first-time spawning red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus* females following eyestalk ablation during the winter period. *Aquaculture* 156: 101-111, 1997.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. N.Y.: W.H. Freeman and Company, 859 p. 1981.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parson. *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, 310 p. 1972.
- Teshima, S.I., A. Kanazawa, K. Horinouchi, and S. Koshio. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus japonicus*: induced maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1123-1129, 1988.
- Van Handel, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal.Biochem.* 11: 256-265, 1965.
- Vázquez-Boucard, C. Etude de la reproduction chez les crevettes peneides nature et devenir de la masse vitelline: aspects fondamentaux et appliqués. 171 p. Centre d'Océanologie de Marseille. Thèse de Doctorat, 1990.
- Wyban, J. and J.N. Sweeney. *Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual*. Intensive shrimp production technology: *The Oceanic Institute Shrimp Manual*. Honolulu, HI, USA: The Oceanic Institute, 198 p. 1991.

**COMPOSICION BIOQUÍMICA DE HUEVOS Y NAUPLIOS
EN CAMARONES SILVESTRES Y DOMESTICADOS
DE *Penaeus vannamei* EN RELACIÓN AL NÚMERO DE DESOVES.**

MANUSCRITO (en preparación):

Palacios, E. and I.S. Racotta. Effect of number of spawns on the biochemical composition of eggs and nauplii in wild and pond-reared shrimp (*Penaeus vannamei*).

INTRODUCTION

At the commercial hatcheries, the proportion of females that participate in the overall nauplii production is small, suggesting that selective replacement of nonproductive females in a production period and selection of high-performance spawners through generations could represent important strategies to improve nauplii production (McGovern, 1988; Browdy, 1990; Palacios et al., 1999b). Pond-reared broodstock could be an adequate source for this strategy because of their year-round availability and an overall acceptable reproductive performance (Browdy and Samocha, 1985). Those females who spawn frequently would be more desirable, provided offspring quality is not affected. However, it has been reported, that after a few months in a hatchery cycle, ablated females "burn out" and there is a trend to produce lower quality eggs and larvae per spawn leading to replacement of broodstock (Simon, 1982). This decline in spawn quality has been described in association to either consecutive spawnings or time in production after eyestalk ablation and as an effect of fecundity (Browdy and Samocha 1985; Hansford and Marsden, 1995), fertility (Simon, 1982; Menasveta et al., 1993; Palacios et al., 1998), number of nauplii and associated hatching (Emmerson, 1980; Beard and Wickins, 1980; Chamberlain and Lawrence, 1981; Bray et al., 1990), biochemical indices (Palacios et al., 1998; Palacios et al., 1999a), and larval survival to further stages (Hansford and Marsden, 1995; Marsden et al., 1997; Palacios et al., 1999a). This would compromise the quality of larvae produced by multiple spawners and would raise some limitations to the strategy of selection of females with such characteristics, unless it is shown that at least some quality traits are not seriously affected by mating or spawning order. In this work we evaluated the effect of spawning order on the quality of the spawns.

MATERIAL AND METHODS

Wild shrimp captured in Sonora-Nayarit and third generation pond-reared adult white shrimp, *Penaeus vannamei*, were brought to maturation at the commercial hatchery Acuacultores de la Paz, S.A. (APSA). Shrimp were stocked under the following conditions: 25 m² black fiberglass maturation tanks, six animals/m², 1:1 male to female ratio, 200% daily water exchange, 28°C and 36‰ (average temperature and salinity). After a one-week acclimation period during which 80% of the animals molted, females were subjected to unilateral eyestalk ablation by cutting and pinching. The diet was composed of 40% squid, 15% polychaetes, 40% clams, and 5% of a commercial maturation diet (Rangen Inc., Idaho, USA) divided into five daily rations accounting for a total daily supply of 10% of biomass. After a one-week acclimation period during which 80% of the animals molted, females were subjected to unilateral eyestalk ablation by cutting, and individually tagged with a color-and number-coded ring placed around the remaining eyestalk to determine the spawning order per female.

Egg and Nauplii sampling

A total of 48 spawns from wild and 69 spawns from pond-reared shrimp were sampled during a production cycle (3 months). Gonad development was monitored daily, and mature females with an attached spermatophore were placed in individual 160-L spawning tanks. In the morning, after recording the code, the females were returned to the maturation tank. For those which spawned, three 5-mL samples of each spawn were assessed for fertilization rate. Therefore, a female on the spawning tank could be assigned the following code: viable spawn, spawn with no eggs, and not fertilized spawn (< 40% fertilization). This procedure was

done till the end of the production cycle for each female.

When eggs were sampled, each female was measured (total length and first abdominal segment width) and weighed after spawning and returned to the maturation tank after recording the code. Number of eggs (fecundity) and nauplii per spawn were estimated by stirring the tanks and counting four subsamples. Egg and nauplii samples were collected for biochemical and morphometric analysis. All spawns were hatched individually. A nauplii sample (30 larvae) from each spawn was used to determine nauplii size (rostrocaudal length) and the size of the lipidic droplet using light microscopy and a micrometer. Another sample was collected for biochemical analysis. The percentage of viable nauplii was estimated by stirring the tanks and counting four subsamples after positive phototropism and negative geotactism selection.

Biochemical Analysis

For the biochemical analysis, each egg and nauplii sample was concentrated using a 75 μm mesh and filtration under a vacuum. The egg and nauplii mass was collected from a Millipore filter, weighed, resuspended in 1.5 mL isotonic saline solution, homogenized with a Polytron, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Enzymatic-colorimetric analysis for glucose (GOD-PAP, Merck), acylglycerides (GPO-PAP, Merck) and cholesterol (Chod-PAP, Merck) were made on the supernatant fluid, with an adaptation for small samples using ELISA-microplates in the centrifuged homogenate (Palacios et al., 1998). Protein (Bradford, 1976) was determined in the crude homogenate after digestion with 0.1 N NaOH.

Statistical Analysis

Production and biochemical variables from eggs and nauplii were compared by a bifactorial ANOVA, considering as the independent variables the origin (wild and pond-reared broodstock) and the spawning order, divided into five groups; first spawn, second spawns, third spawn, spawn order from 4 to 6, and spawn order from 7 to 12.

The percentage of fertilization and hatching rate were transformed to arcsine values for the analysis, but only untransformed data are reported. The percentage of viable nauplii was estimated as the number of viable nauplii relative to the number of eggs spawned by a female. A nauplii condition index (NCI) previously reported and justified on the basis of the relation between the acylglycerides (AG) levels and nauplii development (Palacios et al., 1998).

RESULTS

Wild females were larger and had a higher fecundity than pond-reared shrimp (Table 1). The hatching rate and nauplii length of spawns from wild broodstock were lower. In a general way, the condition index (Emmerson, 1980) decreased in females in relation to spawning order. This effect was more pronounced in pond-reared shrimp as shown by the significant interaction between origin and number of spawns. A higher fecundity was obtained in females with a more advanced spawning order.

Table 1. Comparison of production variables (means \pm SE) in *P. vannamei* shrimp between origin (O) and in relation to the number of spawns (N)

	Origin	one spawn	few spawns (2 to 4)	multiple (5 or more)	ANOVA	
Female body weight (g)	Wild	45.8 \pm 1.9	49.5 \pm 3.2	54.0 \pm 2.7	N	N.S.
	Pond	34.0 \pm 0.9	35.0 \pm 1.9	33.0 \pm 4.9	O	$P < 0.01$
					NxO	N.S.
Female length (cm)	Wild	17.8 \pm 0.2	18.0 \pm 0.4	17.6 \pm 0.4	N	N.S.
	Pond	16.9 \pm 0.3	16.8 \pm 0.5	16.7 \pm 0.2	O	$P < 0.05$
					NxO	N.S.
Female condition index ¹	Wild	0.95 \pm 0.02	0.96 \pm 0.03	0.92 \pm 0.02	N	$P < 0.05$
	Pond	1.06 \pm 0.04	0.96 \pm 0.05	0.90 \pm 0.01	O	N.S.
					NxO	$P < 0.05$
No. Eggs/spawn (x10 ³)	Wild	179.9 \pm 11.7	215.5 \pm 23.9	244.0 \pm 13.9	N	$P < 0.05$
	Pond	79.1 \pm 11.3	115.6 \pm 16.3	105.0 \pm 30.0	O	$P < 0.01$
					NxO	N.S.
Fertilization (%)	Wild	69.5 \pm 4.8	68.8 \pm 7.7	68.7 \pm 9.1	N	N.S.
	Pond	68.4 \pm 9.9	80.0 \pm 2.9	83.5 \pm 1.5	O	N.S.
					NxO	N.S.
No. Nauplii/spawn (x10 ³)	Wild	50.6 \pm 7.5	42.5 \pm 21.2	82.5 \pm 23.1	N	$P = 0.15$
	Pond	52.5 \pm 8.9	41.7 \pm 25.2	67.5 \pm 21.9	O	N.S.
					NxO	N.S.
Hatching rate (%)	Wild	32.9 \pm 4.9	32.0 \pm 14.4	35.1 \pm 6.01	N	N.S.
	Pond	58.4 \pm 8.3	50.1 \pm 10.6	57.5 \pm 11.2	O	$P < 0.05$
					NxO	N.S.
Days in production ²	Wild	39.8 \pm 5.5	63.9 \pm 6.3	70.5 \pm 0.6	N	$P < 0.01$
	Pond	10.3 \pm 1.9	27.6 \pm 8.5	21.0 \pm 1.0	O	$P < 0.01$
					NxO	N.S.
Nauplii length (μ m)	Wild	397.7 \pm 7.2	388.3 \pm 2.7	374.3 \pm 12.0	N	N.S.
	Pond	396.5 \pm 16.0	427.6 \pm 9.8	416.5 \pm 16.5	O	$P < 0.05$
					NxO	$P = 0.15$

N.S.: Not significantly different.

¹ [Body weight]/[ax(Body length)^b] as described by Emmerson (1980).² The days in production was calculated as days after ablation (day 1) till the end of the production cycle.

No differences in the biochemical composition of eggs and nauplii between wild and pond-reared shrimp were observed. However, eggs from wild broodstock had a trend to present higher levels of glucose. The lipidic droplet in nauplii was larger in spawns from wild females, but this was not reflected on the AG content of the nauplii. The NCI was higher in spawns from pond-reared broodstock (Table 2).

Table 2. Comparison of biochemical variables (means \pm SE) in *P. vannamei* egg and nauplii between origin (O) and in relation to number of spawns (N).

		Origin	one spawn	few spawns (2 to 4)	multiple (5 or more)	ANOVA	
Egg	AG (mg/g)	Wild	19.93 \pm 1.08	16.15 \pm 1.27	18.95 \pm 0.86	N	$P < 0.05$
		Pond	19.62 \pm 1.21	15.88 \pm 0.83	16.93 \pm 2.85	O	N.S.
						NxO	N.S.
	Glucose (mg/g)	Wild	6.02 \pm 0.41	4.95 \pm 0.32	5.23 \pm 0.24	N	$P < 0.05$
		Pond	5.46 \pm 0.50	3.77 \pm 0.25	4.12 \pm 0.23	O	$P < 0.05$
						NxO	N.S.
	Cholesterol (mg/g)	Wild	4.58 \pm 0.31	3.52 \pm 0.37	5.29 \pm 0.57	N	$P = 0.055$
		Pond	5.53 \pm 0.46	4.59 \pm 0.28	3.59 \pm 0.60	O	N.S.
						NxO	$P = 0.08$
Nauplii	AG (mg/g)	Wild	11.54 \pm 0.72	8.29 \pm 1.14	12.80 \pm 0.78	N	N.S.
		Pond	11.30 \pm 0.81	9.23 \pm 0.80	11.05 \pm 2.40	O	N.S.
						NxO	N.S.
	Glucose (mg/g)	Wild	2.12 \pm 0.23	1.60 \pm 0.25	1.60 \pm 0.08	N	N.S.
		Pond	2.11 \pm 0.65	1.47 \pm 0.24	1.99 \pm 0.34	O	N.S.
						NxO	N.S.
	Cholesterol (mg/g)	Wild	3.09 \pm 0.63	2.92 \pm 0.46	1.69 \pm 0.70	N	N.S.
		Pond	2.81 \pm 0.47	2.81 \pm 0.34	2.54 \pm 0.11	O	N.S.
						NxO	N.S.
	Lipidic droplet (μ m)	Wild	131.5 \pm 2.8	139.0 \pm 4.5	125.5 \pm 2.3	N	N.S.
		Pond	129.5 \pm 5.2	119.7 \pm 6.3	119.1 \pm 4.9	O	$P < 0.05$
						NxO	$P = 0.15$
NCI*	Wild	1.51 \pm 0.26	1.13 \pm 0.64	1.36 \pm 0.09	N	N.S.	
	Pond	2.88 \pm 0.46	2.17 \pm 0.42	2.43 \pm 0.06	O	$P < 0.01$	
					NxO	N.S.	

N.S.: Not significantly different; AG = acylglycerides; NCI = Nauplii condition index.

* NCI = (nauplii AG) x (% viable nauplii) x (nauplii length)/100

The AG, glucose, and cholesterol content in eggs were lower in spawns from broodstock with two to four spawns for both origins. A similar trend was observed in the AG content in nauplii.

For PL1, sample size was not representative enough ($n = 10$) to analyze the associated variables by the same two-way analysis of variance design, so only the influence of origin was statistically analyzed. This comparison does not reveal any significant differences between PL1 from wild and pond-reared females (Table 3).

Table 3. Comparison of biochemical variables (means \pm SE) in *P. vannamei* postlarvae between origins.

	WILD	POND	ANOVA
PL1 Weight (mg)	0.081 \pm 0.026	0.075 \pm 0.008	N.S.
PL1 glucose (mg/g)	2.08 \pm 0.10	1.64 \pm 0.26	N.S.
PL1 AG (mg/g)	2.11 \pm 1.53	3.66 \pm 0.82	N.S.
PL1 cholesterol (mg/g)	3.89 \pm 0.51	2.62 \pm 0.52	N.S.

N.S.: Not significantly different; AG = acylglycerides; PL1 = postlarvae of one day after metamorphosis

DISCUSSION

In a previous work (Palacios et al., 1998), we observed that as the days after ablation increased, the broodstock produced eggs with lower levels of fuel (i.e. glucose and AG). In this work, eggs and nauplii of the first spawn of the female had the highest levels of fuels and NCI. We could expect the first spawn to have the highest hatching and survival rate. However, no difference was observed in the hatching rate in relation to the spawning order. In a previous work, we demonstrated that the quality and biochemical reserves of the eggs and nauplii could have an effect on the larval survival as late as postlarval stages (Palacios et al., 1999a). It is possible that the quality of the eggs and nauplii in relation to spawning order could be reflected in further development stages during larval culture.

A tendency to present lower biochemical levels in eggs from spawns produced by females that had between two and four spawns was observed. This effect was observed both in wild and in pond-reared broodstock. Controversy, females with five or more spawns had higher fuel levels in eggs. This could be an indication that females with multiple spawns produce spawns that are of higher quality than females that have a few spawns. The NCI also tended to be higher in spawns produced from females with multiple spawns.

We had previously found that the quality of spawn from wild and pond-reared females with multiple matings, measured in terms of fertilization rate, viable spawn in relation to matings, number of nauplii and associated hatching, was comparable to spawn from the first mating (Palacio et al., 1999b). Based on these data, we proposed that a selection of individual females with higher performance should be implemented in the hatcheries. The low proportion of females responsible for the overall nauplii production (Bray et al., 1990; Wyban and Sweeney, 1991; Palacios et al., 1999b) suggests that females have different reproductive potential. Those females with frequent spawning characteristics would be more desirable, provided offspring quality is not affected.

In a previous work, we obtained a decline in the fertilization rate as days after ablation or in the maturation tank elapsed, both for wild (Palacios et al., 1998) and pond-reared broodstock (Palacios et al., 1999a). However, no decline in fertilization rate was obtained as a consequence of number of spawns in the present study or in previous works (Palacios et al., 1999b). Fertilization can be affected by multiple factors, such as water quality (Palacios et al., 1998) and in addition, there is an effect of the performance of the male. The quality of the sperm has been reported to decline as the time in production increases, and this could be affecting the fertilization rate in the works that evaluate the time in production. Spawning order or time spent in production could be closely related, however it is of importance to distinguish between them since each factor

can affect the spawning quality in a different way. The decrease in the quality of the spawn that can be observed over the production period would be a consequence of a decrease in reserves of the females over the production cycle. However, this decrease is not necessarily a direct consequence of the number of spawns, but possibly a result of other maturation conditions that can be altered during the production cycle (i.e. diet, disease, stress, ablation).

Further studies are needed to elucidate possible differential effects of time in production after eyestalk ablation and number of spawns on shrimp. Pond-reared broodstock can be an adequate source for applying a selection strategy of females with multiple spawning capabilities because of their year-round availability and an overall acceptable reproductive performance.

REFERENCES

- Beard, T.W. and J.F. Wickins. Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture* 20: 79-89, 1980.
- Bray, W.A., A.L. Lawrence and J.L. Lester. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 41-52, 1990.
- Browdy, C.L. and T.M. Samocha. The effect of eyestalk ablation on spawning, molting and mating of *Penaeus semisculatus* de Haan. *Aquaculture* 49: 19-29, 1985.
- Chamberlain, G.W. and A.L. Lawrence. Maturation, reproduction, and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. *J. World Maricult. Soc.* 12: 209-224, 1981.
- Emmerson, W.D. Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Hansford, S.W. and G.E. Marsden. Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J. World Aquacult. Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Marsden, G.E., J. McGuren, S.W. Hansford and M.J. Burke. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145-156, 1997.
- McGovern, K.M. Management strategies for *Penaeus vannamei* Broodstock. *J. World Aquacult. Soc.* 19: 51A, 1988.
- Menasveta, P., S. Piyatiratitivorakul, S. Rungsupha, N. Moree and A.W. Fast. Gonadal maturation and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman sea and pond-reared sources in Thailand. *Aquaculture* 116: 191-198, 1993.
- Palacios, E., A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, Portillo, G. and I.S. Racotta. Biochemical composition of egg and nauplii in White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquacult. Res.* 29: 183-189, 1998.
- Palacios, E., C.I. Pérez-Rostro, J.L. Ramírez, A.M. Ibarra and I.S. Racotta. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. *Aquaculture* 171: 209-221, 1999a.
- Palacios, E., I.S. Racotta and APSA. Spawning frequency analysis of wild and pond-reared of White Pacific shrimp *Penaeus vannamei* broodstock under large-scale hatchery conditions. *J. World Aquacult. Soc.* 30: 180-191, 1999b.
- Simon, C.M. Large-scale commercial application penaeid shrimp maturation technology. *J. World Maricult. Soc.* 13: 301-312, 1982.

CAPÍTULO VI

EFECTO DE LA ABLACIÓN DEL TALLO OCULAR EN LA CALIDAD DE LARVAS, MADURACIÓN Y BIOQUÍMICA DE HEMBRAS DE *Penaeus vannamei*.

ARTÍCULO (En prensa):

Galacios E., D. Carreño, M.C. Rodríguez-Jaramillo, and I.S. Racotta. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance, and biochemistry of White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, broodstock. *Appl. Aquacult.* In press, 1999.

ABSTRACT

Eyestalk ablation increases reproductive output in Penaeid shrimp, and it is widely used to obtain larvae in commercial hatcheries. Disruptions in the overall endocrine mechanisms of spawners are likely to occur and larval quality could also be affected by uncontrolled acceleration of maturation. In the present work, we analyzed, during a production period in a commercial hatchery, several traits of females, ablated by cutting one eyestalk at its base, and unablated controls. These analyses included reproductive performance, biochemical characteristics of eggs and nauplii, and larvae survival. In addition, possible long-term physiological alterations of spawners were evaluated using histological and biochemical approaches. The number of spawns a female had or the maturation stage of spawners were also considered as additional factors influencing the variables recorded. Ablated females had more frequent spawns and a higher gonadosomatic index, but a lower weight gain than unablated controls. Ablated females had lower levels of hemocyanin in hemolymph and of glucose in hepatopancreas, but higher levels of total carotenoids in hepatopancreas. The eggs of ablated females had higher levels of acylglycerides. There were some differences in the biochemical levels in tissues and eggs between ablated and unablated females as a function of the number of spawns. No differences in the biochemical composition of nauplii or in the larval survival during culture to postlarvae I were found between ablated and unablated females.

INTRODUCTION

Shrimp maturation in captivity is mainly achieved by the use of unilateral eyestalk ablation, beginning with its application for production by Caillouet (1972). Eyestalk ablation involves the extirpation of one sinus gland, which is the principal endocrine gland of crustaceans that produces, among others, the gonad- or vitellogenesis-inhibiting hormone (GIH or VIH). By the elimination of part of the supply of GIH, a fast gonadic maturation can be achieved. Ablation leads to predictable peaks of maturation and spawning that facilitate the establishment of production schedules, in contrast to scattered spawns from unablated females (Primavera, 1985; Browdy, 1992). Several studies have demonstrated the advantage of unilateral eyestalk ablation because of the increased production of a greater quantity of spawns and total nauplii per female (Primavera, 1985; Browdy, 1992; Bray and Lawrence, 1992). Ablated females have a faster rematuration, which can increase the bioenergetic demands of the spawner (Browdy, 1992), and thus have an effect on the quality or survival of the spawner. Spawn quality and subsequent survival of the larvae have been reported to be negatively affected when these are obtained from ablated females (Emmerson, 1980; Bray and Lawrence, 1992; Redon and San-Feliu, 1993; Yano, 1993). This results are still controversial, and similar spawn quality from ablated and unablated broodstock has been reported (Browdy and Samocha, 1985; Rothlisberg et al., 1991; Gendrop-Funes and Valenzuela-Espinoza, 1995). Spawn quality can be diminished during production as a result of successive rematurations (Beard and Wickins, 1980; Emmerson, 1980). This corresponds to the reproductive exhaustion reported for ablated females after they have had multiple spawns (Lumare, 1979; Vazquez-Boucard, 1990). However, no studies have previously compared the physiological condition of ablated and unablated spawners after they are subjected to an intensive reproduction schedule.

Studies analyzing the influence of eyestalk ablation must be done in a homogenous population of shrimp, using optimal maturation conditions, and with a multidisciplinary approach. For this reason, we used pond-reared shrimp in a commercial hatchery having 10-years experience. The influence of eyestalk ablation was

evaluated on productive traits, biochemical characteristics, and larvae survival. In addition, possible long-term physiological alterations of spawners were evaluated using histological and biochemical approaches.

MATERIAL AND METHODS

General Hatchery Conditions

A third generation of *Penaeus vannamei* pond-reared shrimp was used in this study. Shrimp were stocked and matured in the commercial hatchery Acuacultores de la Paz, S.A. (APSA) in 25-m² black fiberglass maturation tanks with a density of six animals/m² and a male:female ratio of 1:1. The daily water exchange was 200%, and the water was maintained at 28 °C and a salinity of 36‰. The diet was composed of 40% squid, 15% polychaetes, 40% clams, and 5% of a commercial maturation diet (Rangen Inc., Idaho, USA) divided into five equal daily rations accounting for a total daily supply of 10% of biomass, and adjusted weekly.

Ablation, Spawning, and Production Follow Up

Adult shrimp started to spontaneously mature in June 1997. After 80% of the animals had molted, 37 females were subjected to unilateral eyestalk ablation. Unilateral eyestalk ablation was performed with a scissor, the eyestalk was cut at the base, and pressure was applied for one or two minutes to stop hemorrhaging. During the whole ablation procedure, the females were kept under water to avoid additional hypoxic stress. The rest of the females in the tank ($n = 60$) were left intact (unablated group). We used more unablated females because we expected them to spawn less frequently. Each female of both groups was individually tagged with a color- and number-coded ring placed around the eyestalk. Gonad development was assessed daily with a lamp, from 1800 to 2300, by observing the size and color of the gonad through the exoskeleton. Mature females with an attached spermatophore were placed in individual 160-L spawning tanks. In the morning, after recording the code, the females were returned to the maturation tank. Three 5-mL samples of each spawn were assessed for fecundity and average fertilization rate, and viable spawns were transferred to 70-L fiberglass tanks for hatching. On the next day, nauplii were collected by positive phototropism and transferred to a bucket, where they were counted in three 5-mL samples.

Egg and Nauplii Sampling

For morphometric analysis, 30 eggs at first-second cleavage and 30 nauplii at stage IV were collected per spawn and preserved in 4% formaldehyde. Egg diameter and nauplii rostrocaudal length was estimated with a light microscope and micrometer. For biochemical analyses, approximately 100 mg of egg and nauplii samples from each spawn were concentrated using a 75- μ m mesh, collected on a 5- μ m Millipore filter using vacuum, and frozen at -70 °C until further analysis.

A nauplii condition index (NCI) was estimated from the following equation:

$$\text{NCI} = [(\text{nauplii acylglycerides levels}) \times (\% \text{ hatching}) \times (\text{nauplii length})]/(100)$$

The NCI was previously reported and justified on the basis of the relation between acylglycerides levels and nauplii development (Palacios et al., 1998) (see Biochemical Analysis section).

Larval Culture

Nauplii IV, collected 36 hours after spawning, were reared to postlarvae 1 stage. Spawns from 13 ablated and 6 unablated females were used. Larvae of each spawn were stocked individually in 60-L conical fiberglass tanks, 100 nauplii/L, 28°C and 36‰ (average temperature and salinity). During larval culture, estimations of survival percentage at each larval substage were made. The diet was composed of brine shrimp, *Artemia* sp. (from zoea III) and an algae mixture (from nauplii V) of *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, and *Thalassiosira pseudonana*. The algae mixture from nauplii V to zoea III was administered with a continuous feeding system combined with a daily water exchange of 30%. The amount of food and ration of *Artemia* sp./algae added was adjusted for each larval stage.

Female Sampling

After spawning, the total weight of each female was determined after blotting them dry, and total length and width of the first abdominal segment was recorded. At the end of the production period (3 months), hemolymph and tissues of ablated and unablated females were sampled. From the pleopod base of the first abdominal segment of each female, 300 µL of hemolymph was obtained using a 1-mL syringe coated with cooled anticoagulant solution of 5% sodium oxalate in isotonic saline. The hemolymph was centrifuged in an Eppendorf centrifuge for 5 minutes, and the plasma was separated from the precipitated cells and stored at -70°C for further biochemical analysis. After hemolymph sampling, the gonad from the abdominal region was fixed in Davidson solution for further histological analysis. The cephalothorax was frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C for further biochemical determination. The gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic (HPI) index were calculated subtracting the weight of the ovary from the total body weight to eliminate the variations that could be caused by the maturation stage (Clarke, 1977).

$$\text{GSI} = [\text{Gonad weight} \times 100] / [\text{Body weight} - \text{gonad weight}]$$

$$\text{HPI} = [\text{Hepatopancreas weight} \times 100] / [\text{Body weight} - \text{gonad weight}]$$

Only those females in molting stage C and early D were used for the analysis.

Ovary Sampling and Histological Analysis

The gonad from the abdominal region was dissected and fixed in Davidson solution for 24 h, embedded in a paraffin-paraplast mixture, sectioned (6 to 8 µm), and stained with Harris hematoxylin-eosin. The oocyte frequency was estimated in three different regions of an ovary, counting the total number of oocytes appearing in a predetermined test area and determining the percentage of each type of oocyte per area. The oocytes were classified according to their stage; previtellogenic oocytes, early or endogenous vitellogenic oocytes, late or exogenous vitellogenic oocytes, and mature oocytes with cortical rods. For statistical analysis, the mature oocytes with cortical rods and the late vitellogenic oocytes were considered as one group (mature oocytes). The diameter range of the oocytes was determined by using an objective micrometer at three different regions of the ovary of each female. Only oocytes showing nuclei sectioned approximately at the equatorial plane were measured. Besides the oocyte proportion, the occurrence of postovulatory follicles and atresia was recorded and reported as number of occurrences in a determined test area.

Biochemical Analysis

Samples of tissues, eggs, and nauplii were weighed and homogenized in 3-mL saline solution. Part of the homogenate was centrifugated at 3000 rpm for 10 min. Enzymatic-colorimetric analyses for glucose (GOD-PAP, Merck), acylglycerides (GPO-PAP, Merck), lactate (Sigma), cholesterol (Chod-PAP, Merck), and α -amylase (CI-PNP-G₇, Merck) were made with an adaptation for small samples using ELISA-microplates on the plasma or in the centrifuged homogenate (Palacios et al. 1998). Protein (Bradford 1976) was determined in the plasma or in the crude homogenate after digestion with 0.1N NaOH. Total lipids were determined by the sulphophosphovanillin method (Barnes and Blackstock, 1973), and total carbohydrates with the anthrone method (Van Handel, 1965). Total carotenoids (Strickland and Parsons, 1972) were extracted from the crude homogenate with acetone:methanol (2:1) and measured by spectrophotometry at 495 nm. For hemocyanin determination, hemolymph samples were diluted 1:20 and absorbance at 340 nm was recorded (Spectronic, Genesys 2), and concentrations were calculated as reported by Chen et al. (1994).

Statistical Analysis

Two-way analyses of variance followed by a Tukey's test post-hoc mean comparisons (Statistica Version 4.5, StatSoft Inc. 1993) were done to assess significant differences in production variables, female morphometry, and biochemical variables in eggs and nauplii, using as independent variables ablation (ablated and unablated) and number of spawns per female (divided in two groups: one and more than one spawn/female). The main effects of the analyses of variance are reported in the Results section. Only the significant mean comparisons are shown in the Tables.

One-way analysis of variance was used to assess differences in survival in the different larval stages, using ablation (ablated and unablated females) as the independent variable.

Two-way analyses of variance followed by a Tukey's test post-hoc mean comparisons were done to assess significant differences in histology and biochemical composition of tissues, using ablation (ablated and unablated females) and maturation stage (immature and ripe) as independent variables. Maturation stage was assigned to each female based on the GSI and the average oocyte diameter. The main effects of the analyses of variance are reported in the Results section, and only the significant mean comparisons are shown in the Tables. Pearson's correlations between the number of spawns or the GSI, and different biochemical levels in tissue were also made.

Data are reported as mean \pm standard error. Percent fertilization, hatching, acylglycerides/lipid ratio, oocyte types, and larval survival were transformed to arcsine for the analysis (Sokal and Rohlf, 1981), but only untransformed data are presented. The level of significance was preset at $P < 0.05$.

RESULTS

Reproductive Performance, Production, and Morphometric Variables

Mortality through the production period was similar for ablated (17%) and unablated females (13%). Ablated females had more spawns than unablated spawners (Table 1). Only two unablated females mated and produced spawns three times, while some ablated females had more than 10 spawns in the same period. Ablated females mated more frequently than unablated spawners, as can be seen by the number of spawns/female/month (Table 1) and by the days between matings ($P < 0.01$; Table 2).

Table 1. Percent of unablated ($n = 60$) and ablated ($n = 37$) White Pacific shrimp *P. vannamei* females that never spawned, or that spawned only once, twice, etc. during the production period (3 months). Below is the average number of spawns/female in a month (means \pm SE).

Number of spawns	Unablated (%)	Ablated (%)
0 spawns	57.9	11.1
1 spawn	24.6	27.8
2 spawns	14	8.3
3 spawns	5.6	11.1
4 spawns	0	16.7
5 to 6 spawns	0	11.1
7 to 10 spawns	0	8.3
more than 10 spawns	0	5.6
Spawns/female/ month	0.58 \pm 0.11 ^b	2.94 \pm 0.43 ^a

The morphometric characteristics of female spawners and productive traits per female are shown in Table 2. Ablated females had significantly lower body weight compared to unablated spawners ($P < 0.05$). No significant differences between ablated and unablated females were found in the total body length and the relative condition index, calculated from the length-mass relationship described by Emmerson (1980).

The comparison between number of spawns (one, or more than one) revealed that fecundity was significantly higher ($P < 0.05$) in females that had more than one spawn regardless of ablation (Table 2). The egg diameter and the hatching rate were significantly lower in successive spawns in both groups ($P < 0.05$). There were no differences in fertilization rate, number of nauplii, and nauplii length as a consequence of number of spawns or between ablated and unablated females.

Table 2. Morphometric variables and productive traits (means \pm SE) in relation to ablation (A: ablated = 24 and unablated = 18) white Pacific shrimp *P. vannamei* females, organized by number of spawns/female (N: one or more than one spawn per female). Means with different letters are significantly different. Letter where assigned only when there was a significant interaction (AxN) by analysis of variance.

	One spawn		> 1 spawn		ANOVA
	Ablated	Unablated	Ablated	Unablated	
Body weight (g)	34.8 \pm 2.5	36.4 \pm 1.9	33.3 \pm 1.1	38.1 \pm 2.3	A $P < 0.05$ N N.S. AxN N.S.
Body length (mm)	143.3 \pm 3.9	145.8 \pm 3.5	143.1 \pm 2.1	148.6 \pm 3.2	A N.S. N N.S. AxN N.S.
Relative condition index ¹	1.01 \pm 0.04	1.03 \pm 0.04	0.98 \pm 0.02	1.03 \pm 0.03	A N.S. N N.S. AxN N.S.
Days between matings ²	11.2 \pm 2.0	16.5 \pm 2.1	7.2 \pm 0.8	15.8 \pm 3.4	A $P < 0.01$ N N.S. AxN N.S.
Eggs/spawn ($\times 10^3$)	134.7 \pm 31.4	123.2 \pm 36.6	221.9 \pm 32.1	178.7 \pm 39.9	A N.S. N $P < 0.05$ AxN N.S.
Egg diameter (μm)	276 \pm 1	278 \pm 1	271 \pm 2	273 \pm 2	A N.S. N $P < 0.01$ AxN N.S.
% Fertilization	92.3 \pm 2.2	76.6 \pm 4.5	74.6 \pm 2.2	84.5 \pm 7.4	A N.S. N N.S. AxN N.S.
Nauplii/spawn ($\times 10^3$)	81.4 \pm 12.6	102.9 \pm 12.5	110.8 \pm 10.6	81.4 \pm 42.7	A N.S. N N.S. AxN N.S.
Nauplii length (μm)	360 \pm 1	371 \pm 1	376 \pm 1	373 \pm 2	A N.S. N N.S. AxN N.S.
% Hatching	74.9 \pm 16.4	70.7 \pm 5.4	45.8 \pm 4.7	50.8 \pm 14.3	A N.S. N $P < 0.05$ AxN N.S.

N.S.: Not significantly different

¹ [Body weight]/[a x (Body length)^b] (Emmerson, 1980).

² Days elapsed from stocking till the first spawn, or between successive spawns.

Biochemical Variables in Eggs and Nauplii and Larval Culture

Acylglycerides (AG) levels in eggs were significantly higher in spawns from ablated females ($P < 0.05$). As shown by a significant interaction ($P < 0.05$), the total protein and total carotenoid levels in eggs were affected in a different way by number of spawns in unablated and ablated shrimp; these variables decreased in successive spawns of ablated females and increased in successive spawns of unablated shrimp (Table 3). No differences in the levels of total lipids, cholesterol, glucose, and the acylglycerides/total lipids (AG/TL) ratio in eggs were observed as a consequence of number of spawns or between ablated and unablated females.

Table 3. Egg biochemical variables (means \pm SE) between ablated ($n = 19$) and unablated ($n = 12$) females of White Pacific shrimp *P. vannamei* organized by number of spawns/female (one or more than one spawn per female).

	One spawn		> 1spawn		ANOVA	
	Ablated	Unablated	Ablated	Unablated		
Acylglycerides (mg/g)	30.04 \pm 2.72	26.38 \pm 0.71	32.05 \pm 0.87	29.53 \pm 2.56	A	$P < 0.05$
					N	N.S.
					AxN	N.S.
Total lipids (mg/g)	54.56 \pm 4.17	49.93 \pm 4.37	58.45 \pm 3.20	58.86 \pm 3.34	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
Cholesterol (mg/g)	7.96 \pm 0.56	7.53 \pm 0.25	7.94 \pm 0.30	8.10 \pm 0.69	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
Total Carotenoids (μ g/g)	17.93 \pm 2.40 ^a	14.20 \pm 1.58 ^{ab}	11.40 \pm 0.80 ^b	16.20 \pm 1.19 ^a	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	$P < 0.05$
Total Protein (mg/g)	116.2 \pm 09.7 ^{ab}	91.3 \pm 14.2 ^b	103.8 \pm 06.1 ^{ab}	120.9 \pm 13.8 ^a	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	$P < 0.05$
Glucose (mg/g)	5.52 \pm 0.39	4.92 \pm 0.11	5.53 \pm 0.25	5.31 \pm 0.33	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
% AG/TL ¹	55.4 \pm 3.8	54.9 \pm 5.1	56.2 \pm 2.6	50.1 \pm 2.4	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.

N.S.: Not significantly different

¹ Acylglycerol/total lipids.

No significant differences were found in the biochemical composition of nauplii obtained from ablated and unablated females (Table 4). No significant difference in the the nauplii condition index (NCI) was found between ablated and unablated females. The lipid utilization, calculated from the difference in lipid levels between egg and nauplii, increased in nauplii from successive spawns, regardless of ablation ($P < 0.05$). No significant differences were found in the survival of different stages of larvae produced by ablated and unablated females (Fig. 1).

Table 4. Nauplii biochemical variables (means \pm SE) between ablated ($n = 19$) and unablated ($n = 12$) White Pacific shrimp *P. vannamei* females organized to number of spawns/female (one or more than one spawn per female).

	One spawn		> 1spawn		ANOVA	
	Ablated	Unablated	Ablated	Unablated		
Acylglycerides (mg/g)	8.05 \pm 1.32	8.59 \pm 0.94	7.87 \pm 1.28	7.87 \pm 0.73	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
Total lipids (mg/g)	18.63 \pm 1.16	21.72 \pm 2.03	15.91 \pm 0.76	20.33 \pm 0.90	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
Cholesterol (mg/g)	2.23 \pm 0.35	2.49 \pm 0.26	2.28 \pm 0.21	2.16 \pm 0.16	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
Total Carotenoids (μ g/g)	5.04 \pm 0.46	4.78 \pm 0.30	4.98 \pm 0.28	4.82 \pm 0.20	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
Total Proteins (mg/g)	77.3 \pm 11.3	77.9 \pm 4.8	74.5 \pm 12.4	84.8 \pm 12.3	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
Glucose (mg/g)	2.71 \pm 0.37	2.73 \pm 0.33	2.63 \pm 0.26	2.34 \pm 0.17	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
% AG/TL ¹	43.3 \pm 2.9	41.5 \pm 4.1	52.9 \pm 6.6	40.5 \pm 4.2	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
NCI	2.31 \pm 0.58	1.90 \pm 0.40	1.23 \pm 0.23	1.69 \pm 0.90	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
AG utilization ²	23.4 \pm 4.0	17.6 \pm 0.9	24.4 \pm 1.8	21.7 \pm 3.2	A	N.S.
					N	N.S.
					AxN	N.S.
TL utilization ²	36.6 \pm 6.9	27.3 \pm 5.2	44.8 \pm 3.8	39.9 \pm 4.1	A	N.S.
					N	$P < 0.05$
					AxN	N.S.

N.S.: Not significantly different

¹ Acylglycerides/total lipids

² The acylglycerides (AG) and Total lipid (TL) utilization were calculated subtracting the lipid content in nauplii from the lipid content in eggs.

Biochemical Variables in Hemolymph and Muscle

Ablated females had lower levels of hemocyanin in the hemolymph than unablated controls ($P < 0.05$; Table 5). The AG levels in hemolymph increased in ripe females, regardless of ablation ($P < 0.05$). No significant differences were observed in the hemolymph levels of cholesterol, glucose, lactate, and total protein and in the muscle levels of carbohydrates, glycogen, and lactate as a result of maturation stage or ablation.

Table 5. Hemolymph and muscle biochemical variables (means \pm SE) between ablated ($n = 12$) and unablated ($n = 16$) White Pacific shrimp *P. vannamei* females as a function of the stage of gonadal maturation (M: Immature or Ripe). See Table 2 for presentation of statistical results.

	Immature		Ripe		ANOVA	
	Ablated	Unablated	Ablated	Unablated		
Hemolymph Acylglycerides(mg/dL)	49.61 \pm 2.03	59.48 \pm 7.54	78.48 \pm 13.69	65.48 \pm 05.39	A	N.S.
					M	$P < 0.05$
					AxM	N.S.
Cholesterol (mg/dL)	34.99 \pm 1.62	39.11 \pm 3.26	41.04 \pm 4.48	39.11 \pm 2.25	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Glucose (mg/dL)	16.55 \pm 4.20	25.46 \pm 3.95	21.02 \pm 2.75	18.05 \pm 3.17	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Lactate (mg/dL)	14.56 \pm 3.46	20.09 \pm 2.80	14.45 \pm 3.74	17.09 \pm 4.04	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Protein (mg/mL)	149.81 \pm 7.92	152.35 \pm 5.22	159.92 \pm 5.07	155.16 \pm 3.95	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Hemocyanin (mg/mL)	104.00 \pm 7.82	121.60 \pm 5.19	114.08 \pm 4.11	128.80 \pm 3.40	A	$P < 0.01$
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Muscle Carbohydrates (mg/g)	4.71 \pm 0.69	4.13 \pm 0.63	4.68 \pm 0.49	3.96 \pm 0.42	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Glycogen (mg/g)	1.04 \pm 0.21	0.98 \pm 0.17	1.06 \pm 0.08	1.02 \pm 0.07	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Lactate (mg/g)	1.17 \pm 0.24	1.44 \pm 0.22	1.19 \pm 0.17	1.15 \pm 0.20	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.

N.S.: Not significantly different

Biochemical Variables in Ovary

The GSI was higher in ablated females ($P < 0.05$; Table 6). Ripe females had a higher GSI ($P < 0.01$), AG ($P < 0.01$), and cholesterol ($P < 0.05$) levels in the ovary regardless of ablation. Ripe ablated females had a more pronounced increase in the AG and cholesterol levels than unablated controls (Interaction: $P < 0.05$). Glucose levels decreased as a result of maturation only in unablated controls (Interaction: $P < 0.05$)

Table 6. Ovary biochemical variables (means \pm SE) between ablated ($n = 12$) and unabladed ($n = 15$) White Pacific shrimp *P. vannamei* as a function to the stage of gonadal maturation (M: Immature or Ripe). See Table 2 for presentation of statistical results.

	Immature		Ripe		ANOVA
	Ablated	Unabladed	Ablated	Unabladed	
Gonadosomatic index (%) ¹	2.13 \pm 0.30	1.61 \pm 0.27	3.13 \pm 0.24	2.46 \pm 0.28	A $P < 0.05$ M $P < 0.01$ AxM N.S.
Total Lipids (mg/g)	17.67 \pm 4.78	15.03 \pm 2.60	22.42 \pm 3.42	15.29 \pm 1.96	A N.S. M N.S. AxM N.S.
Acylglycerides (mg/g)	4.99 \pm 0.75 ^b	7.20 \pm 1.40 ^b	11.35 \pm 1.29 ^a	7.91 \pm 1.50 ^b	A N.S. M $P < 0.01$ AxM $P < 0.05$
Cholesterol (mg/g)	0.74 \pm 0.05 ^b	0.92 \pm 0.12 ^b	1.59 \pm 0.38 ^a	0.95 \pm 0.12 ^b	A N.S. M $P < 0.05$ AxM $P < 0.05$
Total Carotenoids (μ g/g)	3.20 \pm 0.79	3.50 \pm 0.75	5.02 \pm 0.88	3.12 \pm 0.56	A N.S. M N.S. AxM N.S.
% AG/TL ²	37.1 \pm 3.8	49.2 \pm 4.6	47.5 \pm 1.8	49.1 \pm 4.4	A N.S. M N.S. AxM N.S.
Carbohydrates (mg/g)	4.62 \pm 0.24	5.34 \pm 0.69	4.17 \pm 0.33	4.15 \pm 0.27	A N.S. M N.S. AxM N.S.
Glucose (mg/g)	1.07 \pm 0.14 ^b	2.02 \pm 0.42 ^a	1.12 \pm 0.17 ^b	1.10 \pm 0.16 ^b	A N.S. M N.S. AxM $P < 0.05$
Total Protein (mg/g)	77.52 \pm 2.23	76.00 \pm 8.66	88.02 \pm 1.60	73.51 \pm 4.20	A N.S. M N.S. AxM N.S.

¹ [Gonad weight x 100]/[Body weight - gonad weight]

² Acylglycerides/total lipids

Biochemical Variables in Hepatopancreas

Ablated females had higher levels of total carotenoids ($P < 0.05$) and lower levels of glucose ($P < 0.05$) in the hepatopancreas (Table 7). Total protein levels increased in hepatopancreas in ripe females regardless of ablation ($P < 0.05$). No significant differences were observed as a result of ablation or maturation stage for the hepatosomatic index, AG, cholesterol, AG/TL ratio, carbohydrates, glycogen, and amylase activity in hepatopancreas.

Table 7. Hepatopancreas biochemical variables (means \pm SE) between ablated ($n = 12$) and unablated ($n = 16$) White Pacific shrimp *P. vannamei* females as a function of the stage of gonadal maturation (Immature or Ripe). See Table 2 for presentation of statistical results.

	Immature		Ripe		ANOVA	
	Ablated	Unablated	Ablated	Unablated		
Hepatosomatic index (%) ¹	2.56 \pm 0.19	2.72 \pm 0.17	2.37 \pm 0.18	2.47 \pm 0.14	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Total Lipids (mg/g)	37.28 \pm 4.99	47.09 \pm 5.28	50.46 \pm 6.65	51.05 \pm 4.75	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Acylglycerides (mg/g)	24.48 \pm 4.40	33.13 \pm 3.91	35.78 \pm 6.83	32.89 \pm 3.70	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Cholesterol (mg/g)	0.88 \pm 0.11	0.93 \pm 0.10	1.00 \pm 0.06	0.75 \pm 0.06	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Total Carotenoids (μg/g)	67.36 \pm 10.44	40.48 \pm 8.90	71.69 \pm 12.73	51.92 \pm 6.25	A	$P < 0.05$
					M	N.S.
					AxM	N.S.
% AG/TL ²	64.0 \pm 4.2	69.9 \pm 3.4	67.3 \pm 7.0	63.6 \pm 3.7	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Carbohydrate (mg/g)	4.38 \pm 0.88	4.95 \pm 0.43	5.74 \pm 0.41	4.82 \pm 0.55	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Glycogen (mg/g)	1.15 \pm 0.16	1.75 \pm 0.22	1.48 \pm 0.22	1.51 \pm 0.34	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Glucose (mg/g)	1.57 \pm 0.12	2.51 \pm 0.31	2.01 \pm 0.30	2.40 \pm 0.53	A	$P < 0.05$
					M	N.S.
					AxM	N.S.
Total Protein (mg/g)	24.88 \pm 1.92	24.15 \pm 0.76	27.25 \pm 1.6	27.57 \pm 1.81	A	N.S.
					M	$P < 0.05$
					AxM	N.S.
Amylase (ΔA/min) ³	0.11 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.10 \pm 0.09	A	N.S.
					M	N.S.
					AxM	N.S.

¹ [Hepatopancreas weight x 100]/[Body weight - gonad weight]

² Acylglycerol/total lipids

³ Amylase activity is reported as increase in absorbance/min

Table 8. Histological comparison (means \pm SE) between ablated ($n = 12$) and unablated ($n = 15$) White Pacific shrimp *P. vannamei* females as a function of the stage of gonadal maturation (Immature or Ripe). See Table 2 for presentation of statistical results.

	Immature		Ripe		ANOVA
	Ablated	Unablated	Ablated	Unablated	
Maximum oocyte diameter (μm)	196.0 \pm 17.6	106.7 \pm 18.2	278.6 \pm 11.9	222.9 \pm 10.3	A $P < 0.01$ M $P < 0.01$ AxM N.S.
Average oocyte diameter (μm)	84.1 \pm 17.1	45.6 \pm 08.5	118.7 \pm 12.5	102.8 \pm 08.2	A $P < 0.05$ M $P < 0.01$ AxM N.S.
Previtellogenic oocytes (%)	92.3 \pm 1.1	97.3 \pm 2.0	87.8 \pm 1.7	86.7 \pm 2.6	A N.S. M $P < 0.01$ AxM N.S.
Early vitellogenic oocytes (%)	7.0 \pm 2.0	2.6 \pm 1.4	2.6 \pm 1.5	5.1 \pm 2.0	A N.S. M $P < 0.05$ AxM N.S.
Mature oocytes (%)	0.70 \pm 0.26	0.02 \pm 0.02	9.6 \pm 2.0	8.2 \pm 3.1	A N.S. M $P < 0.01$ AxM N.S.
Postovulatory follicles ¹	1.5 \pm 0.8 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b	1.5 \pm 0.4 ^a	1.7 \pm 0.5 ^a	A N.S. M $P < 0.05$ AxM $P < 0.05$
Atresia ¹	03.8 \pm 2.7 ^b	28.9 \pm 8.2 ^a	10.0 \pm 4.1 ^b	05.5 \pm 1.6 ^b	A N.S. M N.S. AxM $P < 0.05$
Lipidic Droplets ¹	07.0 \pm 2.7 ^b	20.2 \pm 3.0 ^a	14.1 \pm 4.0 ^{ab}	11.9 \pm 3.1 ^b	A N.S. M N.S. AxM $P < 0.05$

N.S.: Not significantly different

¹ Postovulatory follicles, atresia, and lipidic droplets are reported as occurrence in a predetermined test area.

Histological Analysis

Ablated females had larger oocytes than unablated controls, as can be seen by the maximum ($P < 0.01$) and average oocyte diameter ($P < 0.05$, Table 8). Ripe females had larger oocytes ($P < 0.01$), less previtellogenic oocytes ($P < 0.01$), more mature oocytes ($P < 0.01$), and more postovulatory follicles ($P < 0.05$) than immature females, regardless of ablation. Early vitellogenic oocytes decreased in ripe ablated females and increased in ripe unablated controls (Interaction: $P < 0.05$). The occurrence of atresia and lipid droplets increased in ripe ablated females and decreased in ripe unablated shrimp (Interaction: $P < 0.05$). Postovulatory follicles were present in immature ovaries only in ablated females (Interaction: $P < 0.05$).

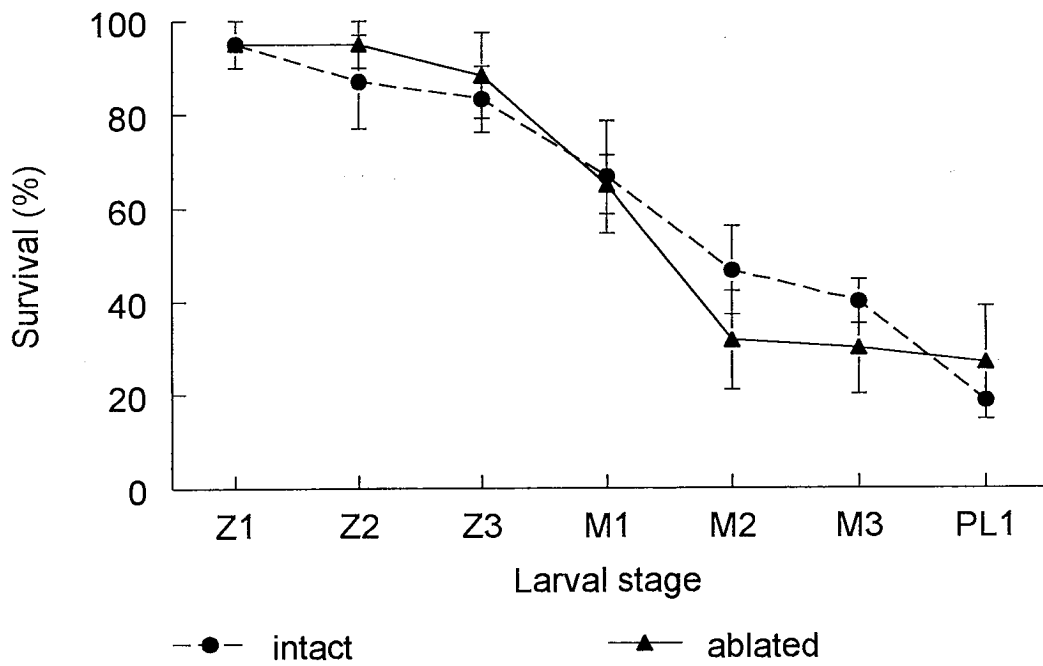


Fig. 1. Larvae survival between spawns from ablated and unablated *P. vannamei* females. Z = Zoea (from stage 1 to 3); M = Mysis (from stage 1 to 3); PL1 = Postlarvae 1 day old.

DISCUSSION

Shrimp eyestalk ablation can affect the quality of the spawns produced at two points: i) immediately after ablation, females can produce abortive or low viability spawn, and ii) ablated females may produce spawns of decreasing quality over time or in successive spawns. Increased mortality immediately after the ablation procedure has been reported, which seems to depend on the molting stage of the shrimp, the procedure used for ablation, and the stress (i.e. handling, infection, hemolymph loss) that is involved during the ablation procedure (Primavera, 1985; Bray and Lawrence, 1992; Browdy, 1992). Decreased spawn viability or abortive spawns that have been reported to occur immediately after ablation (Primavera, 1985) are probably not a consequence of decreased hormone levels, but a result of the stress involved in the ablation procedure. Unilateral eyestalk ablation technique involves the extirpation of one sinus gland, which is the principal endocrine gland of crustaceans. The sinus gland produces the gonad inhibiting hormone (GIH), among other hormones. The GIH has been shown to inhibit the incorporation of yolk during late vitellogenesis (Charniux-Cotton and Payen, 1988; Van Herp, 1992), although it was suggested that it can also influence early previtellogenesis (Eastman-Reks and Fingerman, 1984). Thus, by the elimination of part of the physiological supply of GIH, a fast oocyte maturation can be achieved, which results in frequent spawns and an increased nauplii production (Table 1).

Removal of one eyestalk has many other far-reaching effects on the physiology of the animal, because hormones controlling molt, metabolism, and several other functions also originate in the sinus gland (Harrison, 1990; Browdy, 1992). The decrease in the levels of GIH and molt-inhibiting hormone (MIH) as a result of eyestalk ablation forces the female to reproduce and to molt more frequently, both of which require a large amount of energy. Ablation has been reported to increase food ingestion (Anilkumar and Adiyodi, 1980; Peter Marian and Murugadass, 1991; Rosas et al., 1993), and to produce a more efficient physiological use of energy (Peter Marian and Murugadass, 1991; Rosas et al., 1993). One of the consequences of the increased energetic demand imposed by ablation, at least in shrimp that are in the process of reproduction, can be a reduced weight gain. In accordance, in our study ablated shrimps were smaller than the unablated controls (Table 2).

If eyestalk ablation increases the energy demand, which can affect the survival and growth of the shrimp, the reproduction process can also be expected to be altered. One of the long-term effects of eyestalk ablation on reproduction could be altered oocyte maturation because of the decrease in the GIH and other hormones. Several studies have compared histologically the oocyte development between ablated and unablated females. Ablation has been reported to cause an uneven development of the ovary (Lumare, 1979; Primavera, 1985), asynchronous oocyte development (Anilkumar and Adiyodi, 1980), concurrent gametogenesis and cytolysis (Browdy, 1992), a disarrangement of the cortical rods (Ramos and Torras, 1986), and an altered release pattern of mature oocytes (Tan-Fermin, 1991). However, a similar distribution, size, and frequency of oocyte between ablated and unablated females has been reported (Ramos and Torras 1986; Tan-Fermin 1991). Most of the studies do not consider the time in production elapsed after the process of eyestalk ablation, so some effects may be a consequence of the stress involved in the ablation procedure, and others a consequence of altered hormone levels as a result of ablation. We made the histological comparison in females at the end of a production cycle to determine the long-term effect of ablation on oocyte development, and found no significant differences in the proportion of different oocyte types between ablated and unablated females (Table 8). However, the maximum oocyte diameter and GSI were higher in ablated females, suggesting a more developed

ovary and a more advanced maturation stage as a result of ablation. Apparently, there was a difference in the recruitment of early vitellogenic oocytes between ablated and unablated females. Another difference between ablated and unablated females was the presence of postovulatory follicles in the immature ablated females, which was probably a consequence of a higher spawning frequency. The occurrence of atresia and lipidic droplets was more frequent in unablated immature females and in ablated ripe females. This difference could indicate that unablated females reabsorb the early vitellogenic oocytes before they enter secondary vitellogenesis. We found a positive correlation between the lipidic droplets and the occurrence of atresia in ablated females ($r = 0.59$; $P < 0.05$), but not in unablated controls. It is possible that ablated females reabsorb the oocytes that were not spawned or the mature oocytes before they had a chance to be spawned. In either case, reabsorption in ablated females occurs for mature oocytes, which are saturated with lipids.

The reduction of several hormones as a consequence of eyestalk ablation not only induces oocyte growth, but concomitant metabolic processes are expected to be affected. Several authors have investigated the influence of eyestalk ablation on the metabolism and accumulation of biochemical reserves, especially lipids (Teshima et al., 1988; Millamena and Pascual, 1990; Millamena et al., 1993). It is difficult to draw conclusions because the conditions of each experiment are different. Our main interest was to evaluate possible alterations in the biochemical composition of tissues that could affect the overall maturation efficiency, and therefore, the resulting quality of the offspring. If the effect of ablation is mainly a faster oocyte growth, it is possible the oocytes may not be provided with sufficient yolk because of a shorter rematuration time (Emmerson, 1980; Primavera, 1985; Harrison, 1990; Browdy, 1992). As a consequence of a faster rematuration, we would expect ablated females to have less biochemical reserves in the ovary, because there is an increased transfer to the eggs and probably not enough time to accumulate more reserves. Therefore, a second long-term effect of ablation on reproduction could be insufficient time for the deposition of biochemical reserves between frequent spawnings. Ablation may be depleting the reserves in other tissues, such as the hepatopancreas and muscle, for rematuration and molting, or it could be affecting the transfer from hepatopancreas to ovary. In either case, we can expect altered biochemical levels at least in the ovary, which could result in negative effects on the eggs and larvae. Changes in biochemical composition produced by eyestalk ablation must be addressed in relation to ovary development because of the influence of maturation on several components. For this reason, we evaluated if ablated and unablated females had differences in the maturation process. In the hemolymph, the only component affected by eyestalk ablation was hemocyanin, which was lower in ablated shrimp (Table 5). It has been reported that hemocyanin captured from the hemolymph is present in crustacean eggs, in which it can accelerate oxygen diffusion in the developing embryo (Twerliger, 1991). Females that have frequent spawns probably use up their hemocyanin pool at a higher rate than females with few spawns (i.e. unablated females). No major changes of other biochemical components in the hemolymph were observed as a result of eyestalk ablation or maturity stage except for an increase in acylglycerides in shrimp with ripe ovaries, in agreement with a gradual increase of lipids in the hemolymph with increasing maturity caused by substrate mobilization to the ovary (Mohamed and Diwan, 1992).

The increase in total and specific lipid classes in developing ovaries is a well-known process (Harrison, 1990). In accordance, shrimp with ripe ovaries had a significant increases of acylglycerides and cholesterol and a trend to higher levels of total lipids and total carotenoids. However, these effects were more pronounced in ablated shrimp, as indicated by significant interactions for acylglycerides and cholesterol levels and by a trend

to increased total lipid and total carotenoid levels (Table 6). We also found a positive correlation between AG ($r = 0.67$; $P < 0.05$), cholesterol ($r = 0.64$; $P < 0.05$), carotenoid ($r = 0.59$; $P < 0.05$), and AG/TL ratio ($r = 0.77$; $P < 0.01$) in the ovary in relation to the GSI, but only in ablated females. A more evident effect of maturation in ablated females can be a result of a more advanced degree of oocyte development and maturation, as can be seen by the maximum oocyte diameter and GSI (Table 8). Similarly, ablated shrimp have been reported to have a higher content of lipids, probably because they had a higher GSI (Teshima et al., 1988). Even when compared to fully mature unablated shrimp, the lipid levels are still higher in ablated shrimp (Millamena and Pascual, 1990; Millamena et al., 1993). Moreover, unablated shrimp do not show any increase in lipid content from early vitellogenic ovaries to fully mature ovaries, whereas ablated shrimp continue to increase their lipid levels through the entire maturation process (Millamena and Pascual, 1990; Millamena et al., 1993).

In hepatopancreas, only carotenoid levels were affected by ablation, with higher levels in ablated females. Increased carotenoid accumulation in ablated Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, fed a diet rich in carotenoids has been reported (Maugle et al., 1980), and the increased levels of carotenoid in hepatopancreas could be a consequence of increased food intake or an altered carotenoid metabolism in ablated females. A negative correlation was found between amylase activity in the hepatopancreas and GSI, regardless of ablation ($r = -0.40$; $P < 0.05$). If the amylase activity and thus dietary carbohydrate assimilation is reduced in ripe females, we would expect the females to have lower levels of carbohydrates in the tissues, as the carbohydrates are being metabolized. In accordance, there were negative correlations for glucose ($r = -0.65$; $P < 0.01$) and carbohydrate levels ($r = -0.54$; $P < 0.05$) to GSI in unablated females. Eystalk ablation also decreases the levels of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH), therefore, we also addressed the effect of ablation on carbohydrate metabolism. Glucose levels in hemolymph were not affected by a long-term effect of unilateral eystalk ablation in the present study. Similarly, the amylase activity, which is enhanced by CHH (Keller and Sedlmeier, 1988), was not affected by ablation (Table 7). These results are in accordance with those obtained in lobster where blood glucose was affected only if bilateral eystalk ablation is done (Diaz-Iglesia et al., 1987).

Production traits (i.e. percent of spawning females, number of spawns/female, total number of eggs and nauplii) have generally been reported to increase after eystalk ablation (Primavera, 1985; Bray and Lawrence, 1992). In agreement, we obtained increased spawn frequency for ablated shrimp (Table 1). Some of the traits that may indicate the quality of the spawn (i.e. number of eggs/spawn; percent of viable spawns, hatch rate, percent of metamorphosis to zoea) have been reported to decrease after ablation (Emmerson, 1980; Redon and San-Feliu, 1993; Yano, 1993). In the present study, no differences were observed in the number of eggs and nauplii per spawn, in the fertilization rate, or in the hatching rate as a result of ablation (Table 2), in accordance to several previous studies (Browdy and Samocha, 1985; Rothlisberg et al., 1991; Gendrop-Funes and Valenzuela-Espinoza, 1995). This may indicate that in some species, when optimal maturation conditions are met, no substantial differences in spawn quality evaluated from these traits are observed (Browdy, 1992).

Acylglycerides are transferred from the ovary to the eggs, therefore, the acylglycerides contents in the eggs have been used to infer the physiological status of the female spawner (Fraser, 1989; Lavens et al., 1991; Cahu et al., 1995; Mourente et al., 1995; Palacios et al., 1998). During the nauplii stage, larvae do not feed; they depend on the fuel present in the yolk to meet energy requirements. Metamorphosis requires a large amount

of energy, so nauplii that have more available metabolic fuel have a greater probability of surviving to zoea (Lavens et al., 1991), and increasing their survival up to postlarval stages (Palacios et al., 1999). Rothlisberg et al. (1991) reported nauplii from spawns of ablated females had higher lipid and carotenoid levels, regardless of the diet. We found eggs from ablated females had higher levels of acylglycerides (Table 3), but no significant differences were found in the biochemical composition of nauplii and in the NCI as a result of ablation (Table 4). We did not find significant differences in the survival during larvae culture up to postlarvae 1 in spawns from ablated and unablated females (Fig. 1). Ablation has been reported to produce a decreased survival and metamorphosis into zoea (Redon and San-Feliu, 1993), and the quality of the spawn has been reported not to be affected by ablation (Lawrence et al., 1980; Chamberlain and Lawrence, 1981; Browdy and Samocha, 1985; Gendrop-Funes and Valenzuela-Espinoza, 1995). It was concluded by Browdy (1992) that the negative perceptions or experimental results relative to decreased quality of progeny have been shown not to be caused by ablation per se, but rather the apparent contradictions in the literature may relate to differences in conditions of the maturation systems coupled with decreased tolerance of suboptimal conditions following eyestalk ablation.

Another consequence of increased energy expenditure after eyestalk ablation may be a deterioration in spawn quality over time (Beard and Wickins, 1980; Emmerson, 1980). Faster rematuration and a decreased latency period between spawns in ablated females corresponds to a greater increase in the bioenergetic demands of the spawner (Browdy, 1992) and thus can affect the spawn quality and the performance of resulting larvae. This reproductive exhaustion as a result of either consecutive spawnings or time in production elapsed after eyestalk ablation has been documented in several studies based on data of fecundity (Browdy and Samocha, 1985; Hansford and Marsden, 1995), fertility (Simon, 1982; Menasveta et al., 1993; Palacios et al., 1998), number of nauplii and associated hatching (Beard and Wickins, 1980; Emmerson, 1980; Chamberlain and Lawrence, 1981), biochemical indices (Palacios et al., 1998; Palacios et al., 1999), and larval survival to further stages (Hansford and Marsden, 1995; Marsden et al., 1997; Palacios et al., 1999). This decline in performance limits the reproductive life of the ablated spawners, requiring the replacement of broodstock several weeks after ablation (Aquacop, 1979; Beard and Wickins, 1980; Simon, 1982).

Some data indicate the decrease in spawn quality is a direct consequence of eyestalk ablation, because a reduction in fecundity (Browdy and Samocha, 1985) and hatching rates (Emmerson, 1980) has been observed over consecutive spawns only in ablated shrimp. In the present study, a decrease in spawn quality with successive spawns was observed, as can be seen by the decrease in the hatching rate after the first spawn (Table 2). A decrease, although not significant, was also observed in the NCI after the first spawn (Table 4). The number of eggs increased from the first to later spawns (Table 2). However, the decrease in the hatching rate and NCI, and the increase in the fecundity per spawns were independent of ablation. If the hatching rate is decreased both in ablated and unablated females with consecutive spawns, then the problem may not be directly associated to eyestalk ablation. As concluded by Browdy and Samocha (1985), the deterioration in spawn quality may not be a direct result of ablation, but rather an indirect result of a worsening condition of the animals over time. It is possible the hatching rate may be dependent on other factors, such as fertilization rate, which also depends on the sperm quality (Beard and Wickins, 1980; Kelemec and Smith, 1980; Primavera, 1985), or a decrease in the condition of the females during the production cycle caused by an inadequate diet, handling stress, etc. When we compared the biochemical reserves in eggs and nauplii, we found

the carotenoid and protein levels in eggs decreased in ablated females with more than one spawn, and increased in eggs of unablated females with more than one spawn (Table 3). However, no significant differences were observed as a result of number of spawns on the nauplii biochemical composition (Table 4). The lipid use from egg to nauplii increased from the first spawns compared to later spawns in both ablated and unablated females.

All the spawns of unablated females used for larval culture were from the first spawn. For ablated females, of the 13 spawns used for larval culture, 4 were from a first spawn and the other 9 ranged from the second and up to the sixth spawn. No clear differences were observed in the larval survival between the first and last spawns, and the highest survival to PL1 in spawns from ablated females was observed for two spawns which were the third for those particular females (53%). We had previously found that the time a female spends in production can affect the larval survival and the resistance to a salinity stress test in postlarvae 15 (Palacios et al., 1999). Apparently, larval survival is affected in a different way by consecutive spawns and time in production. Further studies are needed to elucidate the effect of multiple spawns on larval survival.

CONCLUSION

The present results confirm the increase in reproductive output induced by unilateral eyestalk ablation. The reproductive process of the ablated females revealed some differences in the biochemical composition and histological analysis compared to controls. Spawn quality inferred from productive traits and biochemical composition of eggs and nauplii was not affected by eyestalk ablation although some differences were observed at the biochemical level in eggs. Survival to further larval stages was similar for spawns obtained from unablated or ablated spawners, indicating larval quality is not compromised by accelerated reproduction induced by eyestalk ablation. The overall production was higher for ablated females, and considering the survival of larvae was not affected, the use of eyestalk ablation is still recommended in females of white Pacific shrimp *Penaeus vannamei* for production purposes in controlled maturation conditions. Further studies are needed to elucidate the effect of consecutive spawns on larval survival and to determine if eyestalk ablation is the cause of reproductive exhaustion.

REFERENCES

- Anilkumar, G. and K.G. Adiyodi. Ovarian growth, induced by eyestalk ablation during the prebreeding season, is not normal in the crab *Paratelphusa hydrodromus* (Herbst). *Int.J.Invert.Reprod.* 2: 95-105, 1980.
- Aquacop. Penaeid reared brood stock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Proc.World Maricult.Soc.* 10: 445-452, 1979.
- Barnes, H. and J. Blackstock. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphovanillin method for 'total' lipids. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 12: 103-118, 1973.
- Beard, T.W. and J.F. Wickins. Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture* 20: 79-89, 1980.
- Bradford, M.M. A refined method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-253, 1976.
- Bray, W.A. and A.L. Lawrence. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: *Marine shrimp culture: Principles and practices*, edited by A.W. Fast and J.L. Lester. St Louis, USA: Elsevier Science, p. 93-170, 1992.

- Browdy, C.L. and T.M. Samochoa.** The effect of eyestalk ablation on spawning, molting and mating of *Penaeus semisculatus* de Haan. *Aquaculture* 49: 19-29, 1985.
- Browdy, C. L.** A review of the reproductive biology of penaeus species: perspective on controled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 22-51, 1992.
- Cahu, C.L., G. Cuzon, and P. Quazuguel.** Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp.Biochem.Physiol.* 112: 417-424, 1995.
- Caillouet, A.C., Jr.** Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in the pink shrimp *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Proc.World Maricult.Soc.* 3: 205-225, 1972.
- Chamberlain, G.W. and A.L. Lawrence.** Effect of light intensity and male and female eyestalk ablation on reproduction of *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *J.World Maricult.Soc.* 12: 357-372, 1981.
- Charniaux-Cotton, H. and G.P. Payen.** Crustacean reproduction. In: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, edited by H. Laufer and R.G.H. Downer. N.Y.: Alan R. Liss, Inc., p. 279-304, 1988.
- Chen, J.C., S.Y. Cheng, and C.T. Chen.** Changes of hemocyanin, protein and free aminoacid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp.Biochem.Physiol.* 109A: 339-347, 1994.
- Clarke, A.** Seasonal variations in the total lipid content of *Chorismus antarticus* (Pfeffer) (Crustacea: Decapoda) at south Georgia. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 27: 93-106, 1977.
- Díaz Iglesia, E., R. Brito, and I. Hernández.** Efectos de la ablación del complejo neurosecretor peduncular en juveniles de langosta, *Panulirus argus*. II Algunos aspectos metabólicos. *Rev.Inv.Mar.* 8: 81-93, 1987.
- Eastman-Reks, S. and M. Fingerman.** Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth in vivo and in vitro in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp.Biochem.Physiol.* 79A: 679-684, 1984.
- Emmerson, W.D.** Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Fraser, A.J.** Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 46: 1868-1873, 1989.
- Gendrop-Funes, V. and E. Valenzuela-Espinoza.** Unilateral ablation of *Penaeus stylirostris* (Stimpson). *Ciencias Marinas* 21: 401-413, 1995.
- Hansford, S.W. and G.E. Marsden.** Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* form Cook Bay, Australia. *J.World Aquacult.Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Harrison, K.** The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: A review. *J.Shellfish Res.* 9: 1-28, 1990.
- Kanazawa, A., L. Chim, and A. Laubier.** Tissue uptake of radioactive cholesterol in the prawn *Penaeus japonicus* Bate during induced ovarian maturation. *Aquat.Living Resour.* 1: 85-91, 1988.
- Kelemec, J.A. and I.R. Smith.** Induced ovarian development and spawning of *Penaeus plebejus* in a recirculating laboratory tank after unilateral eyestalk enucleation. *Aquaculture* 21: 55-62, 1980.
- Keller, R. and D. Sedlmeier.** A metabolic hormone in Crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In: *Endocrinology of selected invertebrate types*, edited by H. Laufer and R.G.H. Downer. N.Y.: Alan R. Liss, Inc., p. 315-326, 1988.
- Lavens, P., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, S., and Sorgeloos, P.** HUFA levels in eggs of wild and cultured broodstock of *Macrobrachium rosenbergii*. In: *Larvii '91* (ed by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier), pp.260-263 European Aquaculture Society, Belgium, 1991.
- Lawrence, A.L., Y. Akamine, B.S. Middleditch, G.W. Chamberlain, and D. Hutchins.** Maturation and reproduction of *Penaeus setiferus* in captivity. *Proc.World Maricult.Soc.* 11: 481-487, 1980.

- Lumare, F. Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture* 18: 203-214, 1979.
- Marsden, G.E., J. McGuren, S.W. Hansford, and M.J. Burke. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145-156, 1997.
- Maugle, P.T., S. McLean, K.L. Simpson, and T. Katayama. The influence of eyestalk ablation on the carotenoid composition of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 46: 901-904, 1980.
- Menasveta, P., S. Piyatiratitivorakul, S. Rungsupa, N. Moree, and A.W. Fast. Gonadal maturation and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman sea and pond-reared sources in Thailand. *Aquaculture* 116: 191-198, 1993.
- Millamena, O.M. and F.P. Pascual. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* Fabricius broodstock from the wild. *J.World Aquacult.Soc.* 21: 116-121, 1990.
- Millamena, O.M., R. Pudadera, and M.R. Catacutan. Tissue lipid content and fatty acid composition during ovarian maturation of ablated *Penaeus monodon*. *Isr.J.Aquacult.Bamigdes* 45: 120-125, 1993.
- Mohamed, K.S. and A.D. Diwan. Biochemical changes in different tissues during yolk synthesis in marine prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian J.Marine.Sci.* 21: 30-34, 1992.
- Mourente, G., A. Medina, S. Gonzalez, and A. Rodriguez. Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture* 130: 187-199, 1995.
- Palacios, E., A.M. Ibarra, J.L. Ramirez, G. Portillo, and I.S. Racotta. Biochemical composition of egg and nauplii in White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquacult.Res.* 29: 183-189, 1998.
- Palacios, E., C.I. Pérez-Rostro, J.L. Ramirez, A.M. Ibarra, and I.S. Racotta. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. *Aquaculture* 171: 209-221, 1999.
- Peter-Marian, M. and Murugadass, S. Effect of eyestalk ablation on egg production and food conversion efficiency of the commercially important riverine prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. In: *Larvii '91* (ed by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier), pp. 251-254 European Aquaculture ociety, Belgium, 1991.
- Primavera, J. H. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In: *Proceedings of the First International Conference on the culture of Penaeid Prawn/Shrimp*, edited by Y. Taki, J.H. Primavera, J.A. Llobrera. Iloilo City, Philippines, p. 47-64, 1985.
- Ramos, L. and E. Torras. Histología del ovario maduro del camarón rosado *Penaeus notialis* con ablación de los pedúnculos oculares. *Rev.Inv.Mar.* 8: 53-61, 1986.
- Rosas, C., I. Fernandez, R. Brito, and E. Diaz-Iglesia. The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the pink shrimp, *Penaeus notialis*. *Comp.Biochem.Physiol.* 104: 183-187, 1993.
- Rothlisberg, P. C., Crocos, P. J., and Smith, D. M. The effect of diet and eyestalk ablation on maturation, spawning, hatching, and larval fitness of *Penaeus esculentus*. In: *Larvii '91* (ed by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier), pp. 247-250 European Aquaculture Society, Belgium, 1991.
- Simon, C.M. Large-scale commercial application penaeid shrimp maturation technology. *J.World Maricult. Soc.* 13: 301-312, 1982.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. N.Y.: W.H. Freeman and Company, 859 p. 1981.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parson. *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, 310 p. 1972.
- Tan-Fermin, J.D. Effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pondreared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture* 93: 77-86, 1991.
- Teshima, S.I., A. Kanazawa, K. Horinouchi, and S. Koshio. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus*

japonicus: induced maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1123-1129, 1988.

Twerliger, N.B. Hemocyanins in crustacean oocytes and embryos. In: *Crustacean Issues*, edited by A. Wenner and A. Kuris. Balkema, Rotterdam, p. 31-40, 1991.

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

VanHerp, F. Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in Crustacea. *Invert. Reprod. Develop.* 22: 21-30, 1992.

Vázquez-Boucard, C. Etude de la reproduction chez les crevettes peneides; nature et devenir de la masse vitelline: aspects fondamentaux et appliqués. Thèse de Doctorat, Centre d'Océanologie de Marseille, France. 171 p. 1990.

Yano, I. Ultraintensive culture and maturation in captivity of penaeid shrimp. In: *Handbook of mariculture: Crustacean aquaculture*, edited by J.P. McVey. Boca Raton, CRC Press, 1993, p. 289-313.

DISCUSIÓN GENERAL

La disminución en la producción de desoves y nauplios de camarones madurados en cautiverio es un fenómeno al cual los acuacultores se tienen que enfrentar periódicamente. El tiempo en el cual se presenta la disminución de los parámetros de producción a lo largo del tiempo, o el agotamiento reproductivo, varía según la especie y las condiciones de maduración (Aquacop, 1979; Simon, 1982; Primavera, 1985; Wyban et al., 1987). Los primeros en sugerir la renovación de lotes de camarones después de cierto tiempo en producción fueron los integrantes del grupo de Aquacop (1979), quienes concluyeron que debido a que la frecuencia de muda disminuía después de unas 4 a 6 semanas, existía una alta probabilidad de que los camarones estuvieran viejos o enfermos. Simon (1982) trabajando con *P. monodon* fue el primero en reportar el agotamiento en términos de producción por piscina. Este investigador caracterizó el agotamiento como una disminución en una serie de variables de producción (e.g. porcentaje de fertilización, porcentaje de eclosión y supervivencia y metamorfosis a nauplios y zoeas), que ocurría entre 6 y 8 semanas después de la ablación, y sugirió que los camarones debían ser remplazados cuando se observaba este agotamiento en la producción. Posteriormente a los trabajos mencionados, se ha descrito el efecto del agotamiento de las hembras en una serie de variables de producción, como son la disminución de la frecuencia de desoves y de la calidad del desove en relación al tiempo transcurrido después de la ablación (Bray et al., 1990; Nascimento et al., 1991). Sin embargo, previo a la presente tesis, no existían estudios bioquímico-fisiológicos en donde se evaluara, por ejemplo, la composición bioquímica de la progenie en relación al agotamiento. La mayoría de los estudios que relacionaban la calidad del huevo con la composición bioquímica fueron realizados para evaluar la calidad de las dietas de maduración, ya sea en crustáceos o en peces (Cahu y Quazuguel, 1989; Lavens y Sorgeloos, 1991; Cahu et al., 1995).

Efecto del agotamiento reproductivo sobre la progenie

Como primera aproximación en la presente tesis, se evaluaron las reservas bioquímicas de huevos en relación al alimento ofrecido (i.e. con o sin poliqueto), y en relación a la supervivencia correspondiente a zoea. Con esta aproximación, se determinó si nuestros indicadores reflejaban el efecto que tenía la dieta sobre la composición bioquímica y supervivencia larvaria. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla I del capítulo I). Se observó que los nauplios obtenidos a partir de reproductores alimentados con poliqueto tenían niveles de glucosa (G) y acilglicéridos (AG) significativamente mayores y presentaban mayor supervivencia a zoea (>75%).

A continuación, se procedió a evaluar una serie de variables de producción y la acumulación de reservas bioquímicas en la progenie, buscando entender el agotamiento reproductivo cuando las piscinas tenían diferente tiempo en producción (i.e. 18, 34, 76 y 96 días después de la ablación). Estos resultados se muestran en las tablas 2 a 4 del capítulo I. Las hembras de la piscina que tenía 18 días en producción fueron significativamente más pequeñas, tuvieron mayores valores de fertilización y mayores niveles de G en huevo y nauplio. Las hembras de la piscina de 96 días presentaron mayor fecundidad y menores niveles de AG en huevo. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de AG en los nauplios. Los AG nos resultaban particularmente interesantes dado que estos son considerados como la más importante reserva bioquímica del huevo y del nauplio y, por ende, una disminución en sus niveles podría ser indicativo de una menor probabilidad de supervivencia. Un resultado no esperado fue que los nauplios provenientes de hembras que

tenían diferente tiempo en producción eran de diferente tamaño. La comparación directa de las reservas bioquímicas (particularmente AG) en nauplio era incorrecta, debido a que los nauplios eran de diferente tamaño, y probablemente, estaban en distinto grado de desarrollo. De esto se puede inferir que además de la posible diferencia en los niveles de combustibles como consecuencia del agotamiento, los combustibles podrían ser usados en forma diferencial en relación a la condición fisiológica durante el desarrollo embrionario y larvario temprano (nauplio). Los nauplios menos desarrollados tienen que sobrevivir durante más tiempo con las reservas bioquímicas que tienen, hasta que sufran una metamorfosis a zoea, estadio en el cual pueden alimentarse (Fraser, 1989). La diferencia en los niveles de compuestos bioquímicos, o en la utilización de estos, podría determinar el grado de desarrollo de las larvas, ya que se observó que la longitud de los nauplios disminuía significativamente en relación al tiempo en producción después de la ablación. Otra posibilidad es que el desarrollo estuviera afectado por diferencias en factores ambientales, como por ejemplo la temperatura en el tanque de eclosión. En cualquier caso, para corregir el efecto de desarrollo diferencial se estableció el índice de condición de nauplios (NCI), el cual toma en cuenta el desarrollo del nauplio y sus niveles de AG. En la Tabla 4 del Capítulo I, se observa que el NCI disminuye progresivamente en relación al tiempo que tenían las hembras en producción después de la ablación. Estos resultados fueron los primeros en establecer que la composición bioquímica de los huevos y nauplios variaban en relación al agotamiento reproductivo de los reproductores.

Debido a que el nauplio no presenta ingestión de alimento, la supervivencia a zoea se encuentra determinada, entre otros factores, por la obtención de energía a partir de combustibles endógenos (Lavens et al., 1991; Lovrich y Ouellet, 1994). El único trabajo que reportaba algún efecto de agotamiento sobre la condición de la larva es el de Simon (1982), quien observó una disminución en la supervivencia a zoea por efecto del tiempo en producción. Sin embargo, no existían estudios sobre el efecto del agotamiento más allá de zoea. Una vez determinado que las hembras ablacionadas y con diferente tiempo en producción producen prole con diferentes características, se procedió a determinar si estas diferencias afectaban la supervivencia subsecuentemente de las larvas.

El segundo problema abordado en la tesis fue evaluar si estadios larvarios posteriores a nauplio y hasta postlarva (PL) estaban afectados por el tiempo que los progenitores llevan en producción (i.e. 15, 45 y 75 días). Los resultados de este trabajo se reportan en el capítulo II, sección I. Las hembras muestreadas 15 días después de la ablación fueron más pequeñas, tuvieron menor fecundidad y produjeron huevos y nauplios con mayores reservas bioquímicas (G, AG, colesterol y carotenoides totales) que las hembras de las mismas piscinas muestreadas después de 75 días. La longitud de los nauplios y el NCI disminuyeron progresivamente en desoves muestreados a los 45 y 75 días. Un efecto similar se observó en la supervivencia durante el cultivo larvario desde nauplio hasta PL (Fig. 1A). La evaluación de la supervivencia de PL1 a PL15 reveló que el porcentaje de supervivencia fue el mismo para los desoves muestreados a los 15 y 45 días después de la ablación, y que sólo los desoves muestreados a los 75 días mostraron una disminución en la supervivencia durante el desarrollo de postlarva (Fig. 1B). En PL15, se aplicó una prueba de tolerancia al estrés de salinidad (Fig. 1B). La prueba de tolerancia al estrés de salinidad aplicada en PL15 está basada en el principio de que la condición fisiológica determina la probabilidad de supervivencia, ya que los organismos sometidos a diferentes condiciones (i.e. dieta, factores fisicoquímicos) pasan por cambios fisiológicos que afectan su

resistencia o desempeño cuando son sometido a pruebas de estrés antes de que se observen cambios en crecimiento y supervivencia en cultivo (Dhert et al., 1992). Al aplicar la prueba de estrés de salinidad en estadio de PL15, se observó que las postlarvas provenientes de los desoves del principio de ciclo (15 días) presentaban mayor tolerancia a los cambios de salinidad. Con lo anterior, se puede inferir que estas postlarvas se encontraban en un estadio de desarrollo más avanzado que las postlarvas derivadas de desoves al final del ciclo, o que tenían mejor condición y reservas bioquímicas como para tolerar el estrés. En estadio de mysis, puede ocurrir un ayuno parcial (Mourete et al., 1998) debido a que los Peneidos pasan por un cambio en los hábitos alimenticios desde zoea (herbívoro) hasta PL (omnívoro), con el consecuente cambio en la maquinaria enzimática. Como consecuencia de este ayuno parcial, es posible que la larva siga dependiendo de las reservas bioquímicas del estadio de zoea, que a su vez, depende de la condición fisiológica y reservas bioquímicas del estadio de nauplio. Las PL15 de desoves muestreados a los 15 días eran de mayor tamaño y tenían mayores reservas de G, AG y colesterol que las larvas muestreadas a los 75 días (Tabla 4). Este trabajo fue el primero en observar que la calidad de los huevos y nauplios podía afectar la supervivencia y desempeño durante el desarrollo larvario y hasta PL.

Es importante señalar la similitud de resultados a nivel de huevos y nauplios entre los dos capítulos antes discutidos, considerando que para el capítulo I se usaron desoves provenientes de hembras silvestres, mientras que en el capítulo II se usaron desoves de hembras domesticadas. En términos generales, esperábamos mayor variación en los organismos silvestres (ya que no se conoce su edad o las condiciones previas a la maduración) en comparación con los domesticados (población homogénea, de la misma edad y cultivada bajo las mismas condiciones). Además de éstas diferencias de origen, es interesante destacar que los efectos generales encontrados son similares en los dos estudios a pesar de que se siguieron protocolos distintos. En los organismos silvestres (Capítulo I), se consideraron cuatro piscinas con diferente fecha de ablación pero con un solo período de muestreo a lo largo de cuatro días. En el caso de organismos domesticados (Capítulo II), las piscinas consideradas iniciaron producción en la misma fecha (i.e. un solo día de ablación), por lo cual para obtener resultados a lo largo del tiempo en producción se realizaron tres muestreos consecutivos en el tiempo (i.e. 15, 45 y 75 días después de la ablación). Adicionalmente, esperábamos encontrar mayor diferencia entre estos estudios debido a que en el primer estudio (Capítulo I), la maduración fue inducida en diferentes épocas del año, lo cual puede afectar el desempeño reproductivo (Crococ y Coman, 1997). En el segundo trabajo (Capítulo II), la maduración se inició simultáneamente para todos los reproductores, aunque algunas variables ambientales cambiaron durante el estudio. A pesar de que el efecto del agotamiento podría estar enmascarado por variaciones de un muestreo a otro por factores como el ciclo lunar, ya que se ha reportado que éste afecta el número de desoves (Nascimento et al., 1991), los resultados similares entre los estudios indican que los efectos del agotamiento son lo suficientemente fuertes como para no ser enmascarados por diferentes condiciones de maduración o el origen de los organismos.

Efecto del agotamiento reproductivo sobre el reproductor

El efecto del agotamiento reproductivo sobre las reservas del huevo podría ser indicativo de que existe una alteración en, por lo menos, la transferencia de compuestos bioquímicos desde las hembras al producto. En el siguiente trabajo se intentó determinar el efecto del agotamiento sobre los reproductores. En trabajos

donde se había estudiado el efecto de la ablación sobre la maduración y frecuencia de desoves se reportaba que las hembras no desovaban al mismo tiempo después de la ablación, atribuyendo ésto al estadio de muda en el que las hembras fueron ablacionadas (Emmerson, 1980; Gendrop-Funes y Valenzuela-Espinoza, 1995; Fig. 1), las condiciones de maduración (e.g. alimento y fotoperíodo), la condición de la hembra (Emmerson, 1980) y la época del año (Gendrop-Funes y Valenzuela-Espinoza, 1995; Hansford y Marsden, 1995).

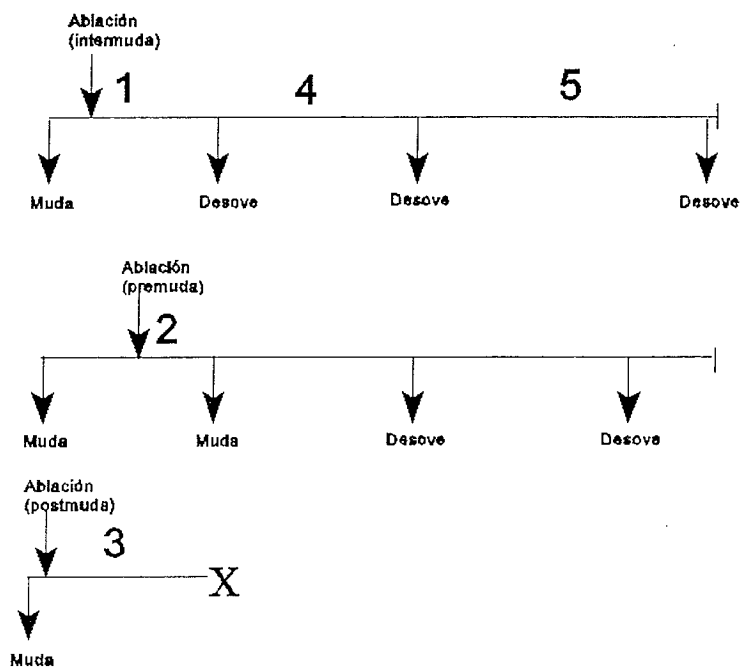


Fig. 1. Efecto de la ablación sobre la frecuencia de desoves y mudas, en relación al estadio de muda. Si la ablación se realiza en intermuda, la hembra madura y desova (No. 1). Si se realiza en premuda, la hembra muda y posteriormente madura (No. 2). Si se realiza en postmuda, es probable que la hembra muera (No. 3). Los días entre desoves consecutivos (No. 4) son relativamente constantes (No. 4) o se incrementan en latencia después de varios desoves (No. 5).

Por ejemplo, se ha reportado que la latencia entre la ablación y el primer desove es de 3 a 9 días en hembras ablacionadas en primavera, mientras que en aquellas que son ablacionadas en otoño, la latencia es de aproximadamente 3 semanas (Makinouchi y Honculada-Primavera, 1987; Wyban et al., 1987; Gendrop-Funes y Valenzuela-Espinoza, 1995; Hansford y Marsden, 1995). No obstante, una vez que las hembras maduraban por primera vez, se reportaba una frecuencia de desoves relativamente constante (entre una y tres semanas, dependiendo de la especie) que era independiente del orden de desove (Emmerson, 1983; Choy, 1987;

Menasveta et al., 1994) o con una disminución en su frecuencia después de varios desoves (Nascimento et al., 1991) y subsecuente muerte del reproductor (Aquacop, 1979; Lumare, 1979; Emmerson, 1980; Primavera, 1985; Bray et al., 1990).

La posibilidad de que algunas hembras estuvieran madurando y desovando periódicamente, mientras que otras empezaban a madurar, nos llevó a realizar un seguimiento individual de las hembras en cada tina. De esta forma, al finalizar el ciclo de producción, podríamos muestrear hembras que durante el ciclo hubiesen tenido diferente número de desoves. Nuestro interés en analizar hembras con diferente número de desoves y su posible relación con el agotamiento reproductivo se basaba en el trabajo de Lumare (1979). Este autor reportó agotamiento en relación al número de desoves consecutivos (u orden de desove) que presentaba cada hembra ablacionada de *P. kerathurus*, al observar que existía maduración diferencial entre la parte anterior y posterior de la gónada de hembras con más de un desove. El reportó que las hembras con varios desoves ocasionalmente morían como consecuencia del agotamiento. Desde entonces, varios autores han propuesto que el primer desove de la hembra es el mejor y, entre más tiempo pasa en producción (y por ende, más desoves tiene), se espera que la calidad de los desoves disminuya (Emmerson, 1980; Beard y Wickins, 1980; Bray et al., 1990). En forma general la evaluación del número de desoves era sinónimo de la evaluación de tiempo en producción.

En el capítulo III se muestran los resultados del marcaje individual de más de 800 hembras. En la Fig. 2 se observa que entre un 14 y el 28% de las hembras no se apareó y entre un 20 y 34% no tuvo ningún desove viable durante los tres meses de producción. Esto puede representar un importante gasto de alimento en los laboratorios de producción. El análisis del efecto del orden de desoves (Tabla 3) reveló que el porcentaje de desoves viables en relación al número de apareamientos no por hembra es significativamente afectado por el orden de desove. No se observaron diferencias en otras variables de producción que determinan calidad, tales como el porcentaje de fertilización y el número de nauplios por desove. En la Fig. 1B se observa que la mayoría de los nauplios producidos se deben a unas cuantas hembras con desoves múltiples, que desovan con mayor frecuencia (Tabla 4). La presencia de un número considerable de hembras con desoves múltiples (>10) fue sorprendente. La posibilidad de que las hembras de Pencidos desovaran más de 10 veces había sido observada, pero en una o dos del total de las hembras marcadas de *P. semisulcatus* (Browdy y Samocha, 1985), *P. stylirostris* (Bray et al., 1990) y *P. vannamei* (Wyban y Sweeney, 1991). Los resultados del capítulo III fueron el primer indicio de que las hembras presentan un potencial de desove o desempeño reproductivo diferente, en las mismas condiciones de maduración y bajo condiciones de producción intensiva. Una alta proporción de hembras no desova durante el ciclo de producción, por lo que se podrían seleccionar hembras que maduran y desechar aquellas que no maduran, como fue propuesto por McGovern (1988). Las hembras que sí llegan a madurar pueden tener un número muy variable de desoves que puede ir desde 1 a 19 en un periodo de 3 meses. La calidad del desove, evaluado por variables de producción, no es menor en las hembras con desoves múltiples. Esto concordaba con lo observado por Browdy y Samocha (1985), que evaluaron la calidad de los desoves en un periodo de 176 días, y no observaron una disminución de la calidad de los desoves (porcentaje de fertilización y de eclosión) con respecto al orden de desove.

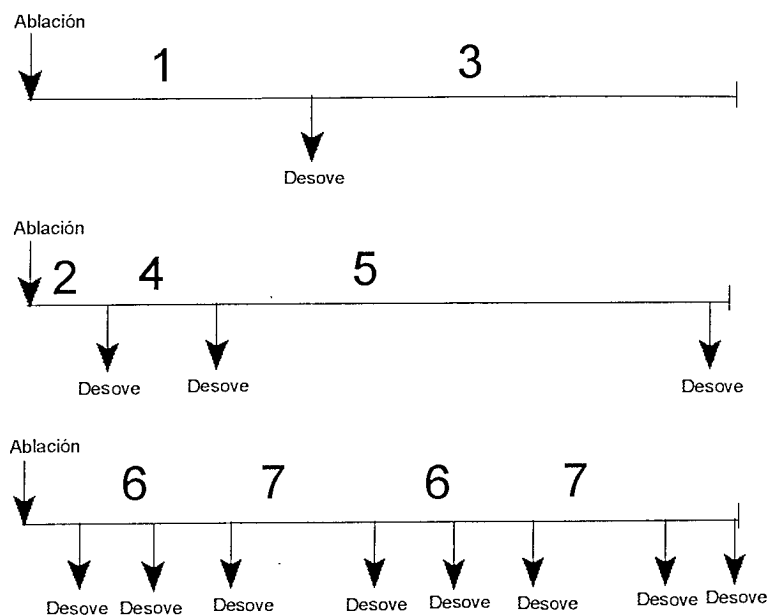


Fig. 2. Frecuencia de desoves en diferentes hembras. La latencia entre la ablación y el primer desove puede variar desde 1 día hasta más de un mes (No. 1 y 2). Algunas hembras solamente presentaron un desove durante el ciclo de producción de tres meses (No. 3). La latencia entre desoves consecutivos no fue semejante incluso en la misma hembra (No. 4 y 5). Las hembras con desoves múltiples presentaban varios desoves rápidos (3 desoves en una semana, posiblemente desoves parciales, No. 6), seguido por un período de reposo (que muy probablemente corresponda al período de premuda-muda-postmuda: No. 7).

La ablación del tallo ocular estimula la maduración y disminuye el tiempo entre remaduraciones consecutivas. Se ha propuesto que el incremento en la frecuencia de las remaduraciones a causa de la ablación puede afectar la calidad de los desoves consecutivos, debido a que la hembra no tiene suficiente tiempo para acumular reservas bioquímicas en la gónada entre desoves (Aquacop, 1977; Lumare, 1979; Beard y Wickins, 1980; Primavera, 1985; Harrison, 1990; Browdy, 1992). Por lo anterior, el primer desove de la hembra es generalmente considerado como el mejor y entre más tiempo pasa en producción (y por ende, más desoves tiene) se espera que la calidad de los desoves disminuya (Emmerson, 1980; Beard y Wickins, 1980; Bray et al., 1990). El agotamiento reproductivo podría ser la consecuencia de un desbalance entre el almacenamiento de compuestos bioquímicos requeridos por la gónada y el aporte de éstos a partir de la dieta, así como su posterior transferencia al ovario desde el hepatopáncreas. Vázquez-Boucard (1990) evaluó las reservas bioquímicas en tejidos de reproductores en relación a número de desoves y encontró que las reservas de lípidos en hepatopáncreas disminuyeron a lo largo de 3 desoves consecutivos. La disminución de las reservas

bioquímicas podría alterar la vitelogénesis y, de hecho, se ha reportado que la distribución de ovocitos en las gónadas se encuentra afectada por la ablación (Anilkumar y Adiyodi, 1980; Ramos y Torras, 1986; Tan-Fermin, 1991; Browdy, 1992). No obstante, a nuestro conocimiento, no existían reportes sobre la influencia del orden de desove sobre la histología del ovario en Peneidos. Una vez clasificadas las hembras por orden de desove, se procedió con el análisis histológico para determinar si existían diferencias sobre la maduración ovárica entre hembras con pocos desoves y hembras con múltiples desoves.

Los resultados del análisis histológico de la gónada se encuentran en el capítulo IV, sección 1. En la Fig. 1 se muestra la relación entre el orden de desove y los diferentes tipos de ovocitos. Las hembras silvestres con mayor números de desoves presentaron mayor frecuencia de folículos postovulatorios (POF; Fig. 1D). No se observaron diferencias entre la proporción de ovocitos en relación al orden del desove al cabo de tres meses en producción después de la ablación. La evaluación de las reservas bioquímicas en diferentes tejidos se realizó en las mismas hembras en las cuales se analizó la gónada histológicamente. Los resultados se encuentran en el capítulo V, sección 1, donde se observa que las hembras con desoves múltiples presentaron mayores niveles de proteínas totales en la gónada (Capítulo V, sección 1; Tabla 4). Las variaciones de los otros compuestos bioquímicos estuvieron afectados por el estadio de maduración, pero no por el orden de desove. La acumulación de reservas en el ovario, independientemente del orden de desoves, es apoyado por la maduración aparentemente normal, evaluada histológicamente en el capítulo IV, sección 1. Por otro lado, en las hembras con desoves múltiples se observó una mayor concentración de AG y de proteínas totales en el hepatopáncreas (Capítulo V, sección 1; Tabla 3) y una disminución de AG en la hemolinfa (Capítulo V, sección 1; Tabla 2). El incremento de AG en el hepatopáncreas podría estar indicando un incremento en la ingestión de alimento en las hembras con múltiples desoves o un incremento en la capacidad de asimilación y en el metabolismo del organismo, lo cual, aunque no necesariamente implique una relación de causa-efecto, podría estar relacionado con una mayor capacidad de remaduración. En cualquier caso, los resultados histológicos indican que las hembras con desoves múltiples tienen la capacidad de satisfacer las demandas de la gónada en maduración sin disminuir las reservas del hepatopáncreas y/o al mismo tiempo acumular más reservas en el hepatopáncreas.

Un resultado inesperado fue que las hembras con menor número de desoves presentaban mayor número de atresias (Capítulo IV; Fig 1E). La presencia de atresias en otros organismos (e.g. peces) es un fenómeno común cuando la gónada está desovada. En el caso de crustáceos, se ha propuesto que las atresias ocurren como parte de un mecanismo por medio del cual las reservas contenidas en los ovocitos que no fueron desovados puedan ser reutilizados por el organismo (Browdy, 1992; Bray y Lawrence, 1992). De hecho, Lee y Walker (1995) propusieron que la presencia de vitelogenina en la hemolinfa se debía a su captación por parte de los hemocitos y su probable transporte hacia el hepatopáncreas después de la atresia de los ovocitos. Sin embargo, en nuestro caso se encontraron atresias en todos los estadios gonádicos irrespectivo del origen de los respoructores, inclusive en organismos en estadio previtelogénico que según nuestro seguimiento individual no habían tenido desoves. La presencia de atresias en gónadas de hembras que no han presentado ningún desove podría indicar que la gónada es reabsorbida antes de que la hembra madure y, podría ser uno de los motivos por los cuales algunas hembras tienen un reducido número de desoves. La atresia de los ovocitos antes del desove podría estar relacionada con la menor concentración de proteínas totales en el ovario en hembras con pocos desoves (Capítulo V, sección 1; Tabla 4), lo cual podría indicar que la ablación estimula la vitelogénesis

aún cuando la hembra no está preparada fisiológicamente para madurar.

Además de la insuficiencia de las reservas bioquímicas, podría existir un límite en el número de ovocitos viables por hembra, es decir, en la denominada “vida reproductiva útil” (Galgani et al., 1989). Esto es, el agotamiento podría no ser efecto de un desbalance hormonal o nutricional, sino más bien una consecuencia de la aceleración en la frecuencia de desoves, lo cual podría resultar en una disminución consecutiva del número de ovocitos que cada hembra es capaz de producir, o por lo menos de aquellos que son capaces de completar la maduración. En este sentido, es necesario estudiar con mayor detalle la capacidad reproductiva de las hembras, por ejemplo, en términos de gametogénesis y determinar cuántos ovocitos son capaces de entrar en vitelogénesis; es decir, cuantas remaduraciones podemos esperar que tenga una hembra. Esta evaluación debería hacerse en hembras de diferente tamaño y edad. Por otro lado, varios desoves podrían ser parte de una sola maduración con desoves parciales. Es decir, una hembra podría tener un solo desove total que presentara mayor fecundidad o varios desoves parciales más pequeños. El desarrollo de técnicas tipo biopsias permitiría llevar a cabo estos estudios, que potencialmente pudiesen proporcionar indicadores predictivos sobre la capacidad de la hembra de tener desoves múltiples, antes de que ésta sea ablacionada.

Los resultados de los capítulos III, IV y V muestran la existencia de hembras con diferente número de desoves y, que aquellas con múltiples desoves no presentaban una disminución en la calidad de los desoves evaluada por variables de producción, en contraste a lo encontrado en el capítulo I y capítulo II, sección 1. Estos resultados fueron el primer indicio de que el agotamiento reproductivo podría estar dividido en por lo menos dos componentes: tiempo en producción y orden de desove.

Agotamiento reproductivo: tiempo en piscina versus orden de desove

Hasta la fecha, no está claro el efecto que tiene el tiempo en producción y/o el número de desoves sobre las variables de producción y la calidad larvaria. Una disminución en la frecuencia de desoves y la calidad del desove ha sido reportada en relación tanto a tiempo en producción (Simon, 1982; Bray et al., 1990; Nascimento et al., 1991), como a desoves consecutivos u orden de desove (Beard y Wickins, 1980; Emmerson, 1980; Bray et al., 1990; Menasveta et al., 1993; Hansford y Marsden, 1995; Mendoza, 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo (por ejemplo, porcentaje de fertilización) parecen indicar que los efectos del tiempo en producción (Capítulo I y capítulo II, sección 1) y del orden de desove (Capítulo III) no necesariamente son los mismos. Sin embargo, el tratar de distinguir entre ambos en forma experimental es complicado debido a que las hembras con más tiempo en producción tienen mayor probabilidad de tener más desoves. En la Tabla 1 que se presenta a continuación, se encuentran los valores de porcentajes de hembras que tiene su primer desove en la primera semana, segunda, etc. Si se comparan diferentes tiempos, se observa que cuando se muestrea una piscina en determinado tiempo, existe cierta probabilidad de muestrear un determinado orden de desove. De esta forma, en un solo muestreo existe la posibilidad de estar evaluando toda una gama de desoves, ya que es posible que hembras que hayan estado en producción durante tres meses estén desovando por primera vez. Por ejemplo, en el capítulo II, sección 1 se realizaron muestreos a los 15, 45 y 75 días en 3 piscinas de organismos domesticados. Según la tabla 1, es probable que en el muestreo a los 15 días, aproximadamente la mitad de las hembras estuvieran teniendo su primer desove. Un 30% aproximadamente estaría en el segundo, un 10% de las hembras en el tercer y menos del 1% estaría desovando por cuarta vez. En el segundo muestreo realizado

6 semanas después de la ablación, el 50% de las hembras estarían entre el segundo y cuarto desove, el 20% de los desoves provendrían de hembras que estarían en su primer desove, mientras que cerca del 30% de los desoves muestreados provendrían de hembras que se podrían considerar múltiples desovadoras. En el muestreo realizado 75 días o 10 semanas después de la ablación, la mitad de las hembras serían múltiples desovadoras y la otra mitad tendrían entre 2 y 4 desoves.

Tabla 1. Proporción (%) de hembras silvestres (W) y domesticadas (P) que se encuentran en el primer desove, segundo, o más allá del décimo en relación a las semanas transcurridas después de la ablación.

semanas	Orden de desove por hembra											
		1 ^{er}	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o	7 ^o	8 ^o	9 ^o	10 ^o	>10
1	W	85.3	14.7	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0
	P	85.0	13.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	W	47.9	38.5	12.5	1.0	0	0	0	0	0	0	0
	P	59.5	30.4	9.5	0.7	0	0	0	0	0	0	0
3	W	36.2	30.9	18.8	10.1	3.4	0.7	0	0	0	0	0
	P	50.0	19.0	15.6	10.7	3.4	1.2	0	0	0	0	0
4	W	13.9	19.7	34.4	19.7	7.4	3.3	1.6	0	0	0	0
	P	29.3	28.2	16.1	12.1	11.5	2.3	0.6	0	0	0	0
5	W	7.1	23.5	19.4	18.4	15.3	11.2	4.1	1.0	0	0	0
	P	19.6	21.0	27.3	16.1	12.1	11.5	2.3	0.6	0	0	0
6	W	7.6	6.8	12.7	23.7	21.2	11.0	8.5	6.8	0.8	0.8	0
	P	20.6	19.1	16.0	14.5	13.0	6.9	6.1	3.8	0	0	0
7	W	3.0	10.9	11.9	13.9	9.9	19.8	10.9	5.0	7.9	5.0	2.2
	P	12.3	15.8	13.2	18.4	14.0	8.8	5.3	6.1	3.8	0	0
8	W	3.8	4.8	11.4	9.5	15.2	12.4	14.3	12.4	6.7	4.8	4.8
	P	8.5	11.0	11.0	15.9	14.6	13.4	7.3	3.7	7.3	7.3	0
9	W	5.3	7.4	6.3	12.6	14.7	10.5	11.6	10.5	5.3	2.1	13.7
	P	7.0	11.3	19.7	11.3	14.1	9.9	8.5	4.2	1.4	2.8	9.9
10	W	4.1	4.9	6.2	6.2	8.6	12.3	11.1	11.1	12.3	8.6	18.5
	P	0	18.4	10.2	13.3	11.2	12.2	7.1	9.2	5.1	2.0	7.1
11	W	4.9	2.4	4.8	8.4	13.3	13.3	9.6	7.2	9.6	10.8	20.5
	P	0	10.8	8.8	11.8	13.7	11.8	7.8	8.8	4.9	7.8	8.8
12	W	0.9	1.9	4.6	2.8	9.3	8.3	12.0	8.3	9.3	9.3	33.3
	P	3.8	8.7	14.4	5.8	11.5	8.7	9.6	6.7	7.7	4.8	18.3

Antes habíamos observado que el tiempo que pasa la hembra en producción puede afectar las reservas bioquímicas de la progenie (Capítulo I). Sin embargo, no se había realizado la evaluación de los efectos del orden de desove sobre la composición bioquímica de los huevos y nauplios. Para evaluar este efecto, se clasificaron desoves en función del orden de desove que presentaba la hembra, y estos resultados se presentan en el capítulo V, sección 2. La evaluación de las reservas bioquímicas en huevo en relación al orden del desove,

reveló que los niveles eran menores en hembras en su segundo y cuarto desove en comparación con las hembras que estaban en el primer desove o que tenían más de cinco desoves (Tabla 2). Si se toma en cuenta que el primer desove es considerado el mejor y que los desoves de las hembras con múltiples desoves presentaron niveles más cercanos a aquellas hembras que sólo han tenido uno, esto podría ser indicativo de que las múltiples desovadoras transfieren reservas bioquímicas al huevo con una eficiencia similar a las hembras que tiene pocos desoves. No se observó un efecto del orden de desove sobre las reservas bioquímicas del nauplio o del NCI, a diferencia de los resultados obtenidos en relación al tiempo en producción (Capítulo I). Esta relación no lineal de las reservas bioquímicas en huevo, en relación al orden de desove y la probabilidad de muestrear diferentes órdenes de desove en un determinado tiempo en piscina, podría ser la causa de la variabilidad en los resultados obtenidos, en particular para los desoves muestreados en períodos intermedios (45 días). Es necesario tener en cuenta que la clasificación del orden de desove en tres grupos esta basada en el número de desoves con el cual se disponía para poder realizar el análisis estadístico. Es evidente que el seguimiento de todos los desoves de cada hembra hubiera proporcionado mayor información.

En general, se puede concluir que cuando se realiza el seguimiento de una variable en relación al tiempo en producción lo que se está evaluando es un fenómeno probabilístico de agotamiento por piscina. Por otro lado, la evaluación de variables en hembras marcadas, donde se puede determinar el orden de desove es un fenómeno por individuo. El conocer las posibles diferencias entre el agotamiento reproductivo que se observa durante el tiempo en producción (o por piscina) en comparación con el agotamiento reproductivo por orden de desove (o por individuo) puede ser de utilidad para proponer alternativas que pueden ser distintas en cada caso. Si se evalúa, por ejemplo, el porcentaje de fertilización, el cual es uno de los parámetros de calidad con más frecuencia utilizado a nivel de producción debido a su asociación con el porcentaje de eclosión esperado, se puede apreciar la dificultad de intentar distinguir qué factores lo afectan y en qué forma. Por ejemplo, además del efecto que puede tener el tiempo en producción o el orden de desove, el porcentaje de fertilización dependen tanto de la hembra como de la calidad del esperma producido por el macho. Se ha reportado que la calidad de los espermatozoides disminuye en relación al tiempo que pasa el macho en producción para varias especies de Peneidos (Capítulo IV, sección 2). No obstante, aún existe controversia sobre los efectos del tiempo en producción y número de regeneraciones del espermátforo, incluso si solamente se toma en cuenta estudios realizados con *P. vannamei* (Leung-Trujillo y Lawrence, 1985; Ogle, 1991; Alfaro y Lozano, 1993). La evaluación de la calidad espermática se ha realizado principalmente en camarones de télico cerrado. Es necesario señalar que en camarones de télico cerrado (e.g. *P. monodon*, *P. kerathurus*, *P. notialis*, *P. japonicus*, *P. semisulcatus*, *P. chinensis*, *P. californiensis*, *P. aztecus*), la hembra usa el mismo espermátforo en un ciclo de muda, durante el cual pueden ocurrir varios desoves. En este caso, una de las variables que está siendo evaluada es la disminución de la calidad y número de espermatozoides en el espermátforo adherido. En el caso de los camarones de télico abierto (e.g. *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. schmitti*, *P. setiferus*, *P. occidentalis*) hay un apareamiento por cada desove, con una posible contribución de distintos machos en cada desove. La contribución de los machos en el porcentaje de fertilización es más evidente en el capítulo VI, Tabla 2, donde se observa que la fertilización no es estadísticamente significativa en hembras ablacionadas e intactas o en relación al orden del desove. Es posible que debido a ésto, el efecto del orden de desove sobre la fertilización en nuestro caso (Capítulo III) no sea tan clara como la disminución de fertilización que se observa en relación

al tiempo en producción (Capítulo I y capítulo II, sección 1).

Además del efecto de tiempo en producción y orden de desove, puede haber otros factores que estén afectando la fertilización. Por ejemplo, el mayor porcentaje de fertilización observado en machos domesticados (Capítulo III; capítulo V, sección 2) puede deberse a las diferencias de edad con respecto a los silvestres. Existen reportes en relación a un efecto de deterioro en la calidad espermática o el porcentaje de fertilización asociado con la edad (Ottogalli et al., 1988; Alfaro y Lozano, 1993; Menasveta et al., 1994). La fertilización también puede ser afectada por otros factores no biológicos. En el capítulo I se discutió la importancia de la calidad y composición iónica del agua en relación al éxito de fertilización. La calidad del agua puede ser diferente en función del manejo del laboratorio de producción y en relación a la época del año, por lo que la fertilización puede variar independientemente de los progenitores. Otros factores ambientales, tales como el efecto de la temperatura sobre la calidad espermática, ha sido abordada más ampliamente (Leung-Trujillo y Lawrence 1985; Pascual et al., 1998). En general, la biología reproductiva de los machos ha sido poco estudiada en comparación con la información que existe para las hembras (Bray y Lawrence, 1992; Browdy, 1992). Por lo anterior, es necesario dirigir esfuerzos en este sentido, en particular hacia interrogantes que surgen del presente trabajo como serían: ¿Cuál es el efecto preciso de la edad en el desarrollo testicular y la calidad espermática asociada? ¿Cuál es el efecto de remaduraciones consecutivas del espermátforo en la calidad espermática en camarones de télico abierto? ¿Cómo afecta el tiempo en piscina, en particular bajo las condiciones óptimas descritas para hembras (e.g. altas temperaturas, dieta), al desempeño reproductivo de los machos? En este contexto, se pueden proponer como una alternativa para disminuir la necrosis espermática y la administración de alimento de maduración de alto costo a los machos, la maduración de las hembras y los machos en piscinas separadas con condiciones de temperatura y dieta distintas (Browdy et al., 1996).

Una ventaja que presenta el analizar la fecundidad o la composición bioquímica del huevo, es que la influencia del macho es mucho menor o hasta despreciable en comparación con la fertilización. En este caso, el efecto del tiempo en producción sobre el desempeño reproductivo de la hembra puede estar asociado a las condiciones en las cuales se realiza la maduración de los camarones. Por ejemplo, la nutrición o la calidad del agua en los tanques de maduración puede no ser la más adecuada, puede existir estrés debido a enfermedades, altas densidades de siembra o manejo continuo de las hembras, y esto a su vez, podría afectar la condición y desempeño de los reproductores a largo plazo. Si alguno de los factores anteriores está afectando la condición de la hembra, se deberían observar diferencias si se cambian las condiciones de maduración de una piscina a otra. Si este es el caso, sería posible alterar o modificar las condiciones de maduración a lo largo del ciclo de producción para incrementar la producción. Tal como se planteó en la sección de Antecedentes, existe mucha investigación sobre las condiciones óptimas de maduración (dietas, factores ambientales, instalaciones y procedimientos) que evalúan de manera puntual el desempeño reproductivo, la calidad de los desoves o la condición del reproductor. Sin embargo, se requiere un enfoque integrativo que analice las condiciones óptimas desde el punto de vista del curso temporal de las variables arriba mencionadas. En este sentido, se podría analizar la posibilidad de ir cambiando las condiciones de maduración a lo largo del tiempo de producción.

En relación al agotamiento reproductivo individual o por orden de desove, las alternativas pueden ser diferentes. En el capítulo III, IV y V se detectaron hembras con capacidad de desovar múltiples veces y que no presentaron una alteración aparente de la maduración evaluada por histología del ovario y reservas

bioquímicas en distintos tejidos. Aún queda como interrogante el por qué hay hembras que no tienen desoves después de ser ablacionadas, o que solamente tienen uno, o en el otro extremo, tienen más de diez. Se ha propuesto que la capacidad para producir desoves consecutivos, sin la disminución en la calidad del desove, puede lograrse por medio de condiciones óptimas de maduración que puedan corregir la disminución de las reservas bioquímicas en los tejidos de la hembra entre desoves (Emmerson, 1980; Browdy et al., 1986; Harrison, 1990; Marsden et al., 1997). Como ejemplo de lo anterior es digno de mencionarse los trabajos de Bray et al. (1990) y Marsden et al. (1997) en los cuales se analiza el valor de cierto tipo de dieta no sólo sobre la producción puntual o promedio de una piscina, sino en relación al orden de desove en sí. En el caso de hembras con desoves múltiples, que presentan un aumento de lípidos en el hepatopáncreas (Capítulo V, sección 1, Tabla 3) o de carotenoides totales en hepatopáncreas (Capítulo VI; Tabla 7), es posible que la dieta haya sido adecuada o que en estas hembras el consumo de alimento sea mayor. Se ha reportado que las hembras ablacionadas tienen un consumo mayor de alimento y utilizan de forma más eficiente la energía (Anilkumar y Adiyodi, 1980; Peter-Marian y Murugadass, 1991; Rosas et al., 1993). La importancia en la calidad del alimento puede apreciarse en el incremento en supervivencia a zoea presentado en la Tabla 1 del capítulo I. La evaluación de la ingestión de alimento en calidad y cantidad para determinar su efecto en el desempeño de hembras podría realizarse en forma individual en tanques de plástico de 60 L, ya que se ha observado que hembras ablacionadas pueden madurar y desovar, incluso en ausencia de machos (Racotta, comunicación personal).

La hiperfagia, aunque puede incrementar las reservas bioquímicas, no compensa por otros efectos de la ablación en sí. Como se mencionó en la sección de Antecedentes, la ablación podría estar produciendo un desbalance hormonal, por la disminución en los niveles de hormonas secretadas directamente por la glándula sinusal/Órgano X, o por afectar en forma indirecta la síntesis y secreción hormonal en otros órganos. Por otro lado, las hormonas generalmente se acumulan y son liberadas en respuesta a diferentes estímulos, y es posible que la disminución de los niveles hormonales se realice a lo largo de cierto tiempo (i.e. vida media). Aunado a lo anterior, es necesario tener en cuenta la complejidad de las posibles interacciones hormonales y sus efectos en diferentes procesos (por ejemplo, vitelogénesis o actividad enzimática en el hepatopáncreas). En el presente trabajo, no fue posible medir niveles hormonales para intentar esclarecer estos efectos. No obstante, sí se realizaron mediciones de la condición general de las hembras y de la progenie de éstas, a manera de una indicación de posibles desajustes hormonales. Como consecuencia de la ablación, además de un incremento en la frecuencia de desoves, esperábamos algún efecto sobre la condición fisiológica del reproductor y eventualmente, de la progenie. Sin embargo, la suposición de que la ablación del tallo ocular altera la maduración y produce desoves de baja viabilidad no fue corroborada en nuestro estudio dado que la supervivencia durante el cultivo larvario hasta PL fue semejante entre nauplios provenientes de hembra intactas y ablacionadas (Capítulo VI, Fig. 1).

Las diferencias entre hembras también podrían deberse a las condiciones previas a la ablación (Emmerson, 1980; Gendrop-Funes y Valenzuela-Espinoza, 1995). Por ejemplo, se ha observado que la ablación unilateral puede tener efectos distintos (ya sea estimular la maduración o la muda) en relación al estadio de muda. Sin embargo, no se sabe si el momento en que se realiza la ablación en relación a la muda tiene consecuencias a largo plazo (es decir, después de la primera muda después de la ablación). Trabajos anteriores donde se

evaluaba el efecto de la ablación señalaban un desarrollo desigual en el tamaño y la forma del ovario (Lumare, 1979; Primavera, 1985), desarrollo asincrónico de los ovocitos (Anilkumar y Adiyodi, 1980), atresias durante la gametogénesis (Browdy, 1992), desarreglo de los bastones corticales (Ramos y Torras, 1986) y desove de ovocitos inmaduros (Tan-Fermin, 1991). En estos trabajos, la evaluación histológica generalmente se realizaba inmediatamente después de la ablación. En nuestro caso, mientras que la calidad de la progenie se evaluó durante varios muestreos a lo largo del ciclo de producción, el efecto sobre las reservas bioquímicas en distintos tejidos y la histología del ovario se realizó al final. Esto nos permitió eliminar el efecto a corto plazo de la ablación, que tal como se discutió en el capítulo VI, se puede deber al estrés de la cirugía, y tengan poco que ver con la disminución de los niveles hormonales a largo plazo causadas por la ablación. La comparación de la maduración ovárica entre hembras domesticadas ablacionadas e intactas reveló una mayor proporción de ovocitos vitelógenicos tempranos en gónadas inmaduras de hembras ablacionadas y en gónadas maduras de hembras intactas, lo cual puede indicar un reclutamiento diferencial de ovocitos (Capítulo VI; Tabla 8). También se observaron diferencias debidas a la ablación en la distribución de folículos postovulatorios, en la presencia de atresias en diferentes estadios de maduración y en su relación con las gotas lipídicas. La relación de las atresias con las gotas lipídicas en hembras ablacionadas podría estar asociada a la citólisis de ovocitos maduros, que presentan un nivel mayor de lípidos. Por otro lado, es importante señalar que las atresias se presentaron incluso en las hembras intactas con gónadas inmaduras. Mientras que en este capítulo no se evaluó el efecto del orden de desove sobre el análisis histológico, en el capítulo IV se relacionó la presencia de atresias en organismos con pocos desoves. En el capítulo VI, menos del 6% de las hembras intactas presentaron tres desoves, mientras que el mismo porcentaje en las hembras ablacionadas presentó más de 10 desoves. La reabsorción gonádica podría estar asociada a la baja frecuencia de desoves independientemente de la ablación, pero tal vez se encuentra asociada a las reservas bioquímicas y/o inducción de la gametogénesis. De hecho, varios autores han reportado que los organismos ablacionados presentan menos reabsorciones y atresias (Anilkumar y Adiyodi, 1980; Kelemec y Smith, 1984; Browdy, 1992). A nivel de ovocitos maduros no se observaron diferencias en la distribución o en el arreglo de los bastones corticales. Esto concuerda con una composición bioquímica en nauplios y una supervivencia a PL1 similar entre hembras ablacionadas e intactas, que es independiente del número de desoves.

Como consecuencia de los resultados anteriores, se analizó la posibilidad de una propuesta alternativa: el hecho de que algunas hembras presenten uno o pocos desoves no se debe a un desgaste metabólico *per se*, sino a la recuperación o hipertrofia de la glándula sinusal/Órgano X aún presente en el tallo ocular que no fué ablacionado. Potencialmente, las hembras ablacionadas pueden regular o compensar la disminución de sus niveles de hormonas, al elevar el número de receptores hormonales a nivel celular, o por medio de hipertrofia de la glándula sinusal restante. Tanto la elevación del número de receptores cuando se disminuyen los niveles circulantes de hormonas y la hipertrofia de una glándula cuando su par ha sido disectada ha sido descrita ampliamente en vertebrados. En Peneidos, la hipertrofia en respuesta a la ablación unilateral fue primero propuesta por Lawrence et al. (1979). Si este es el caso, el agotamiento reproductivo atribuido a la ablación puede ser consecuencia del restablecimiento de las concentraciones hormonales en el organismo. Es decir, que el reproductor responda a la ablación o eliminación de uno del complejo glándula sinusal/Órgano X con la hipertrofia o aumento en la secreción de las neurohormonas en el otro complejo (agotamiento reproductivo =

recuperación o hipertrofia). Como consecuencia de una hipertrofia, se espera que se restablezcan los niveles circulantes de la GIH y de otras hormonas. El incremento de los niveles de GIH podría disminuir la maduración gonádica y la frecuencia de desoves, lo cual concuerda con lo observado en producción. Si ocurre hipertrofia, se esperaría que la acumulación de compuestos bioquímicos en la hembra y la calidad larvaria fuera semejante si el muestreo se realizara al principio o al final del ciclo, y sólo se observaría una disminución de la frecuencia de desoves.

La posibilidad de que algunas hembras con pocos desoves presenten hipertrofia del complejo glándula sinusal/Órgano X, mientras que aquellas con desoves múltiples compensen con hiperfagia es interesante, pero no explica la razón por la cual existe esta diferencia. En el caso de que no haya diferencia en la calidad del desove y en la supervivencia a PL en hembras con desoves múltiples, sería deseable usar para producción solamente a este grupo. Es posible que las hembras con desoves múltiples tengan una buena calidad de producción durante un determinado tiempo, por lo que sería necesario definir este período, o mejor aún, seleccionar hembras que no presenten una disminución en la calidad de la larva que producen a lo largo del tiempo. Mientras que la supervivencia durante cultivo larvario hasta PL fue afectada en forma importante por el tiempo en producción (Capítulo II, sección 1), aún es necesaria la evaluación de la supervivencia de nauplio hasta PL en relación al orden de desove. En el capítulo VI se sembraron nauplios de hembras con 1 y hasta 6 desoves, y no se observó una relación entre la supervivencia a PL1 y el orden de desove. Es necesario abordar la calidad larvaria a mayor profundidad. El establecimiento de alguna forma para evaluar tempranamente (i.e. huevo o nauplio) la supervivencia larvaria sería de gran utilidad, en particular si ésta se puede realizar de forma sencilla, rápida y económica. La relación entre desoves de calidad inferior y la supervivencia durante cultivo larvario nos llevó a intentar proponer algunos índices tempranos de calidad, tales como el NCI (Capítulos I y capítulo II, sección 1), el color del huevo, que no se encontró asociado en forma directa con los niveles de carotenoides totales (Capítulo II, sección 2) y el tamaño de la gota lipídica presente en el nauplio, la cual no se pudo asociar a los compuestos lipídicos medidos (Capítulo V, sección 2). Es necesario abordar con mayor profundidad criterios predictivos de la supervivencia larvaria, ya que hasta la fecha, ninguno de los anteriores se puede recomendar para fines de producción.

Se requieren más estudios para diferenciar los efectos del tiempo en producción después de la ablación versus los efectos del orden de desove en el camarón, así como para poder identificar indicadores metabólicos específicos con los cuales se pueda predecir la capacidad de la hembra de ser una múltiple desovadora, con una calidad de desove constante. Para ésto, sería necesario desarrollar algún criterio predictivo (de preferencia, antes de la ablación y sin la necesidad de sacrificar al organismo) que nos permitiera distinguir entre hembras que van a producir desoves múltiples y aquellas que no van a desovar. En este sentido, Aquacop (1983), propuso que los niveles de proteínas en hemolinfa podrían ser un indicador del desempeño reproductivo. En el capítulo VI, observamos que los niveles de proteínas en hemolinfa fueron significativamente menores en hembras que no habían desovado en comparación con hembras que sí desovaron (sin desoves = 109.3 mg/dl; pocos desoves = 140.9 mg/dl; múltiples desoves = 144.2 mg/dl; $P < 0.05$), pero esta determinación se realizó al final del ciclo de producción. Sería necesario evaluar un si los niveles de proteínas totales o los niveles de algún otro metabolito difiere entre hembras antes de que sean sometidas a condiciones de producción. Por otro lado, los niveles de la lipoproteína encargada del transporte de lípidos al ovario durante la vitelogénesis

(vitelogenina) representan un indicador del estadio de maduración (Vázquez-Boucard, 1990), pero no se ha determinado en relación con el agotamiento o la condición general de las hembras. Recientemente, se ha caracterizado en Peneidos la composición lipídica de la vitelogenina y como se modifica ésta una vez incorporada al ovario en donde se le denomina vitelina o lipovitelina (Lubzens et al., 1997). Dada la importancia de los lípidos en el proceso de maduración, así como en el desarrollo embrionario y larvario subsecuente, se debería analizar no sólo los niveles absolutos de vitelogenina sino establecer la composición de lípidos asociada a esta lipoproteína. Al tener un seguimiento individual de las posibles variaciones en la composición lipídica de la vitelogenina por efecto de tiempo en piscina y número de desoves, se podría analizar la posible relación de esta lipoproteína y de su composición con el desempeño reproductivo y la calidad larvaria individual. Otro criterio predictivo podría ser, como anteriormente se había sugerido, el uso de biopsias antes de la extirpación del tallo ocular para determinar la vida útil de las hembras. Finalmente, la determinación de los niveles hormonales o de la actividad enzimática en relación al orden de desove para determinar si existen diferencias entre las hembras que no están desovando en contraste con aquellas que desovan múltiples veces.

Es posible que existan diferencias genéticas entre las hembras, que les permiten bajo las mismas condiciones de maduración presentar un número de desoves distinto. Es necesaria la implementación de criterios que puedan ser indicativos de la heredabilidad del desempeño reproductivo, de tal forma que esta característica pueda ser seleccionada en un programa de mejoramiento genético. Para realizar este tipo de selección, sería necesario usar camarones de ciclo cerrado y engordados en estanques. No obstante, existe la posibilidad de que las hembras cultivadas y engordadas en estanques no presenten un desempeño reproductivo aceptable en términos de producción. En la presente tesis, se comparó el desempeño reproductivo de reproductores silvestres y cultivados en estanques (segunda generación de domesticados).

Comparación de organismos silvestres y domesticados

La utilización de organismos domesticados o engordados en cautiverio, tiene varias ventajas sobre el uso de organismos silvestres. Los organismos domesticados están disponibles durante todo el año, mientras que los silvestres están disponibles durante períodos de captura definidos. El uso de organismos domesticados permite la disminución de la variación estacional, ya que se administra el mismo alimento durante la postengorda. También se eliminaría el impacto ecológico de la captura de organismos silvestres que acarrea una considerable mortalidad en las poblaciones de otros organismos que son capturados junto con el camarón (e.g. tortuga) y reduciría así la posibilidad de un embargo. Para algunos estudios, el uso de organismos domesticados presenta la adicional ventaja de que la variabilidad entre organismos y lotes es menor. Finalmente, el uso de organismos domesticados provee la alternativa de un mejoramiento por selección.

Hasta recientemente, el uso de organismos domesticados para la obtención de nauplios comerciales ha sido limitado debido a que se considera que éstos producen desoves de calidad inferior en comparación con los organismos silvestres (Menasveta et al., 1993; Cavalli et al., 1997; Mendoza, 1997). Se considera que los organismos domesticados o engordados en estanques producen desoves de menor calidad o son incapaces de madurar adecuadamente. Medina et al. (1996) reportaron que las hembras cultivadas en estanques no alcanzan a producir ovocitos con bastones corticales, en comparación con hembras silvestres de *P. kerathurus*. Sin embargo, en *P. monodon* no se observó diferencia entre organismos silvestres y cultivados en estanques (Tan-

Fermin, 1991).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en los ovocitos maduros cuando se compararon hembras silvestres y domesticadas, aunque sí se observaron diferencias en lo que podría ser el reclutamiento de ovocitos entre orígenes. (Capítulo IV). La falta de diferencias entre ovocitos maduros entre orígenes concuerda con una calidad de los desoves similar de organismos silvestres y domesticados. Mientras que los organismos silvestres presentaban una mayor frecuencia de apareamiento (en relación a las hembras totales) y mayor número de desoves viables al mes, la calidad de los desoves individuales fue superior en los domesticados (Capítulo I; Capítulo III). Los organismos domesticados presentaron mayor porcentaje de eclosión y un mayor NCI en comparación con los silvestres. En el caso de AG en huevo, se observa que las hembras domesticadas con desoves múltiples tuvieron niveles menores que las silvestres, lo cual podría indicar un agotamiento prematuro en las domesticadas (Capítulo I; Tabla 2). Las variables bioquímicas y el peso de postlarvas de organismos silvestres y de domesticados no fue estadísticamente diferente (Capítulo I, Tabla 3).

No obstante, sí observamos un mayor desempeño reproductivo en organismos silvestres en relación a las variables de producción que evalúan cantidades (número de desoves, fecundidad, etc.). Una diferencia notable encontrada entre reproductores silvestres y domesticados fue la proporción de hembras domesticadas que nunca desovaron (domesticadas = 28 vs silvestres = 14%) y el número de hembras que tuvieron más de 10 desoves (domesticadas = 4 vs silvestres = 11%, Capítulo III, Tabla 3, Fig. 1). Lo anterior representa una clara ventaja para el uso de organismos silvestres. Es necesario considerar que los resultados reportados en los capítulo I y capítulo III se obtuvieron a partir de reproductores domesticados ablacionados en agosto de 1996. En el capítulo VI, se trabajó con reproductores domesticados que fueron puestos en producción a partir de mayo de 1997. En ese año, el 11% de los reproductores ablacionados nunca desovó (capítulo VI), mientras que de los organismos domesticados y ablacionados en 1996, un 28% nunca desovó (Capítulo III). El 11% de hembras domesticadas no desovadoras que se obtuvo en 1997 es similar al 14% de no desovadoras que se observó para organismos silvestres analizados en 1996 (Capítulo III). En un trabajo paralelo (Quiñones, 1999), se observó que los organismos domesticados presentan, en relación al tiempo en producción, un agotamiento prematuro en términos de número de desoves y producción de nauplios comparados con organismos silvestres, lo cual concuerda con lo observado en términos bioquímicos en huevo (Capítulo V, sección 2; Tabla 2).

El agotamiento prematuro de las hembras domesticadas podría ser una consecuencia de su menor tamaño en comparación con las hembras silvestres (Capítulo III). Una relación entre el tamaño de las hembras y los valores de producción cuantitativos ha sido descrita para diferentes especies de Peneidos. En general, las hembras de mayor tamaño presentan mayor fecundidad (Aquacop, 1977; Emmerson, 1980; Ottogalli et al., 1988; Menasveta et al., 1993). No obstante, en algunos trabajos se ha reportado la posibilidad de una disminución en el desempeño reproductivo de hembras de mayor tamaño, y esto ha sido atribuido a la senectud (Ottogalli et al., 1988; Cavalli et al., 1997; Crocos y Coman, 1997) o a la época del año y variaciones ambientales (Hansford y Marsden, 1995; Crocos y Coman, 1997). Sin embargo, la comparación de cada uno de los orígenes (silvestres y domesticados), los cuales presentaban una diferencia de tamaño considerable, reveló mayor diferencia del potencial reproductivo (número de desoves) dentro de cada origen que entre los dos orígenes. La vida reproductiva útil podría estar estrechamente relacionada con la edad de la hembra. No obstante, a la fecha no hay estudios que determinen la potencialidad en términos de gametogénesis en

crustáceos.

Si los organismos domesticados se cultivaran hasta un peso comparable al de los silvestres, sería más fácil comparar los valores de producción. No obstante, la rentabilidad de la producción de los organismos domesticados disminuiría si éstos son llevados al mismo peso que los organismos silvestres, debido al incremento en los costos de postengorda. Es necesario establecer una relación costo/beneficio entre el tamaño más adecuado (costo de postengorda) y el rendimiento reproductivo resultante, evaluado por la producción de nauplios. En cualquier caso, el problema de un agotamiento temprano puede ser solucionado sustituyendo los lotes más frecuentemente, ya que los organismos estarían disponibles en tanques de postengorda y tendrían menor costo que los silvestres.

Adicionalmente, falta por comparar la calidad de postlarvas obtenidas a partir de reproductores domesticados y silvestres. En este trabajo (Capítulo V, sección 2, Tabla 3), si bien no se observaron diferencias en tamaño o composición bioquímica entre postlarvas provenientes de hembras silvestres y domesticadas, no se determinó la supervivencia durante el cultivo larvario. En un trabajo preliminar, se compararon desoves múltiples obtenidos a partir de hembras domesticadas y silvestres. Las larvas de hembras domesticadas presentaron mayor supervivencia a PL1 y mayor resistencia a pruebas de estrés de altas concentraciones de amonio en zoea II y de baja salinidad en PL1 (Racotta, comunicación personal).

El hecho de que los organismos domesticados presenten un desempeño reproductivo en términos de calidad de desoves comparable al de los organismos silvestres, nos permite concluir que éstos son adecuados para ser utilizados en ciclos cerrados. El agotamiento reproductivo prematuro, a su vez, podría ser resuelto con el continuo recambio de reproductores agotados, ya que existiría una alta disponibilidad de organismos domesticados para su remplazo.

CONCLUSIONES

- Los efectos del agotamiento reproductivo en *Penaeus vannamei* no son enmascarados por diferentes condiciones de maduración y origen de los organismos.
- La composición bioquímica o calidad de los huevos y nauplios afecta la supervivencia y desempeño durante el desarrollo larvario y hasta postlarva.
- Algunas reservas bioquímicas (acilglicéridos, carotenoides y glucosa) de los huevos y nauplios disminuyen en relación al tiempo que pasan en producción los reproductores. Sin embargo, estos efectos no se deben al número acumulado de desoves consecutivos que hayan presentado las hembras.
- Por medio de marcaje se pueden seleccionar reproductores que maduran y desechar aquellos que no maduran o presentan pocos desoves viables durante el ciclo.
- Las hembras con múltiples desoves no presentan alteraciones en el proceso de maduración de la gónada, desde el punto de vista histológico y bioquímico. Las hembras con múltiples desoves tienen mayores concentraciones de acilglicéridos en el hepatopáncreas.
- La comparación del desempeño reproductivo de organismos silvestres y domesticados no reveló diferencias bioquímicas entre los huevos y nauplios entre orígenes. Los organismos silvestres presentaron un mejor desempeño desde el punto de vista cuantitativo (frecuencia de apareamientos, número de desoves viables, número de nauplios), pero la calidad en producción de desoves individuales fue superior en los domesticados (porcentaje de fertilización y eclosión).
- Los organismos domesticados pueden ser utilizados para la producción de nauplios, resolviendo problemas asociados con la colecta y uso de organismos silvestres.
- La suposición de que la ablación del tallo ocular altera la maduración y produce desoves de baja viabilidad no fue corroborada en nuestro estudio donde se evaluó el efecto a largo plazo. La supervivencia durante el cultivo larvario fue semejante entre desoves provenientes de hembra intactas y ablacionadas.
- La evaluación del efecto de la ablación unilateral del tallo ocular al final de un ciclo de producción no reveló alteraciones que pudieran ser detectadas en las características tisulares de la gónada y la composición bioquímica del ovario, hepatopáncreas y hemolinfa.

PERSPECTIVAS

- Desarrollar criterios predictivos del desempeño reproductivo de los camarones que puedan ser usados antes de la ablación. Estos criterios podrían indicar la condición fisiológica del organismo por medio de la determinación de algún compuesto circulante (proteínas, alguna hormona u otro componente) o de las características tisulares de la gónada (por medio de biopsias).
- El establecimiento de algún método para evaluar en el huevo o en estadios larvarios tempranos la calidad larvaria sería de gran utilidad, en particular si éste se puede realizar de forma sencilla, rápida y económica.
- Es necesario definir durante cuánto tiempo las hembras con múltiples desoves mantienen una calidad larvaria aceptable o, mejor aún, que no presenten una disminución en la calidad de la larva que producen a lo largo del tiempo. El desarrollo de técnicas como biopsias permitiría llevar a cabo estos estudios, que potencialmente pueden proporcionar indicadores predictivos sobre la capacidad de la hembra de tener desoves múltiples.
- Sería deseable determinar si la capacidad de ser una múltiple desovadora con una calidad de progenie constante es una característica heredable, de tal forma que esta característica pueda ser seleccionada en un programa de mejoramiento genético.
- Por medio de la distinción de los efectos del tiempo en producción (por piscina) y del orden de desove (por individuo) se podrían proponer alternativas para la optimización de la reproducción. Es necesario evaluar si el cambio en las condiciones de maduración o en el alimento pueden contrarrestar el efecto del agotamiento reproductivo.
- Es necesario evaluar en los machos el efecto del tiempo en piscina y del número de remaduraciones gonádicas en relación a la calidad espermática y necrosis del espermátforo.
- Es posible que la edad afecte el desempeño reproductivo (vida reproductiva útil), por lo cual es necesario establecer la edad o el tamaño en el cual los efectos del agotamiento son menos evidentes. Asimismo, es necesario establecer el efecto de otras variables sobre el desempeño reproductivo (por ejemplo, época del año).
- Los organismos domesticados podrían presentar un agotamiento prematuro en comparación con los silvestres, en términos de número de desoves y producción de nauplios comparados con organismos silvestres. Este agotamiento podría ser una consecuencia del menor tamaño de los reproductores domesticados usados en el presente trabajo. Es necesario establecer una relación costo/beneficio entre el tamaño más adecuado (costo de postengorda) y el rendimiento reproductivo resultante, evaluado a través de la producción de nauplios.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, J., and X. Lozano. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 522-529, 1993.
- Anilkumar, G., and K.G. Adiyodi. Ovarian growth, induced by eyestalk ablation during the prebreeding season, is not normal in the crab *Paratelphusa hydrodromus* (Herbst). *Int. J. Invert. Reprod.* 2: 95-105, 1980.
- Aquacop. Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon*, Fabricius in Polynesia. *Proc. World Maricult. Soc.* 8: 927-945, 1977.
- Aquacop. Penaeid reared brood stock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 445-452, 1979.
- Aquacop. Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps in the Centre Oceanologique du Pacifique. In: *CRC Handbook of mariculture, Crustacean Aquaculture*, edited by J.P. McVey. CRC Press, Florida. p 105-122, 1983.
- Beard, T.W., and J.F. Wickins. Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture* 20: 79-89, 1980.
- Bray, W.A., and A.L. Lawrence. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: *Marine shrimp culture: Principles and practices*, edited by A.W. Fast and J.L. Lester. St Louis, USA: Elsevier Science, p. 93-170, 1992.
- Bray, W.A., A.L. Lawrence and J.L. Lester. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 41-52, 1990.
- Browdy, C. L. A review of the reproductive biology of penaeus species: perspective on controlled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 22-51, 1992.
- Browdy, C.L., K. McGovern-Hopkins, A.D. Stokes, J.S. Hopkins and P.A. Sandifer. Factors affecting the reproductive performance of the Atlantic White Shrimp, *Penaeus setiferus*, in conventional and unisex tank systems. *J. Appl. Aquacult.* 6: 11-25, 1996.
- Browdy, C.L., A. Hadani, T.M. Samocha, and Y. Loya. The reproductive performance of wild and pond-reared *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Aquaculture* 59: 251-258, 1986.
- Cahu, C. L. and P. Quazuguel. Lipid metabolism of *Penaeus vannamei* broodstock: influence of dietary lipids. *Aquacult. Europe* 10: 45-46, 1989.
- Cahu, C.L., G. Cuzon and P. Quazuguel. Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 417-424, 1995.
- Cavalli, R.O., M.P. Scardua and W. Wasielesky Jr. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 260-267, 1997.
- Choy, S.C. Growth and reproduction of eyestalk ablated *Penaeus canaliculatus* (Olivier, 1811)(Crustacea:Penaeidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 112: 93-107, 1987.
- Cripe, G. Induction of maturation and spawning of pink shrimp, *Penaeus duorarum*, by changing water temperature, and survival and growth of young. *Aquaculture* 128: 255-260, 1994.
- Crococ, P.J. and G.J. Coman. Seasonal and age variability in the reproductive performance of *Penaeus semisulcatus* broodstock: optimizing broodstock selection. *Aquaculture* 155: 55-67, 1997.
- Dhert, P., P. Lavens, and P. Sorgeloos. Stress evaluation: a tool for quality control of hatchery-produced shrimp and fish fry. *Aquacult. Europe* 17: 6-10, 1992.
- Emmerson, W.D. Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 121-131, 1980.
- Fraser, A.J. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae.

Can.J.Fish.Aquat.Sci. 46: 1868-1873, 1989.

- Galgani M.-L., G. Cuzon, F. Galgani, and J. Goguenheim.** Influence du regime alimentaire sur la reproduction en captivite de *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 81: 337-350, 1989.
- Gendrop-Funes, V., and E. Valenzuela-Espinoza.** Unilateral ablation of *Penaeus stylirostris* (Stimpson). *Cien. Mar.* 21: 401-413, 1995.
- Hansford, S.W., and G.E. Marsden.** Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J.World Aquacult.Soc.* 26: 396-405, 1995.
- Harrison, K.** The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: A review. *J.Shellfish Res.* 9: 1-28, 1990.
- Kelemec, J.A., and I.R. Smith.** Induced ovarian development and spawning of *Penaeus plebejus* in a recirculating laboratory tank after unilateral eyestalk enucleation. *Aquaculture* 21: 55-62, 1980.
- Lavens, P., and P. Sorgeloos.** Variation in egg and larval quality in various fish and crustacean species. In: *Larvi '91*, edited by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and E. Ollevier. Belgium. p. 221-222, 1991.
- Lavens, P., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, S., and P. Sorgeloos.** HUFA levels in eggs of wild and cultured broodstock of *Macrobrachium rosenbergii*. In: *Larvi '91*, edited by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and E. Ollevier. Belgium. p. 260-263, 1991.
- Lee, R.E., and A. Walker.** Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J.Exp.Zool.* 271: 401-412, 1995.
- Lee, R. E., Oshima, Y., Browdy, C. L., Wang, Q., and Walker, A.** Lipovitellin utilization by nauplii of the shrimp *Penaeus vannamei*. *World Aquaculture '95*, San Diego, p. 161, 1995.
- Leung-Trujillo, J.R., and A.L. Lawrence.** The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. *J.World Maricult.Soc.* 16: 258-266, 1985.
- Lovrich, G.A., and P. Ouellet.** Patterns of growth and triacylglycerol content in snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidac) zocal stages reared in the laboratory. *Mar.Biol.* 120: 585-591, 1994.
- Lubzens, E., T. Ravid, M. Khayat, N. Daube, and A. Tietz.** Isolation and characterization of the high-density lipoproteins from the hemolymph and ovary of the Penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* (De Haan) apolipoproteins and lipids. *J. Exp. Zool.* 278: 339-348, 1997.
- Lumare, F.** Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture* 18: 203-214, 1979.
- Makinouchi, S., and J. Honculda-Primavera.** Maturation and spawning of *Penaeus indicus* using different ablation methods. *Aquaculture* 62: 73-81, 1987.
- Marsden, G.E., J. McGuren, S.W. Hansford, and M.J. Burke.** A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145-156, 1997.
- McGovern, K.M.** Management strategies for *Penaeus vannamei* broodstock. *J.World Aquacult.Soc.* 19: 51A, 1988.
- Medina, A., G. Mourente, and A. Rodriguez.** A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus* (Forsk. 1775). *Aquaculture* 148: 63-75, 1996.
- Menasveta, P., S. Piyatiratitivorakul, S. Rungsupha, N. Moree, and A.W. Fast.** Gonadal maturation and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman sea and pond-reared sources in Thailand. *Aquaculture* 116: 191-198, 1993.
- Menasveta, P., S. Sangpradub, S. Piyatiratitivorakul, and A.W. Fast.** Effect of broodstock size and source on ovarian maturation and spawning of *Penaeus monodon* Fabricius from the Gulf of Thailand. *J.World Aquacult.Soc.* 25: 41-49, 1994.
- Mendoza, R.** Nauplii production from wild, cultivated and mixed populations of Blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J.Appl.Aquacult.* 7: 41-50, 1997.

- Mourente, G., A. Medina, S. Gonzalez, and A. Rodriguez.** Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture* 130: 187-199, 1995.
- Mourente, G., M.P. Pereiro, and A. Rodriguez.** Contenido en acidos grasos de los lipidos totales, polares y neutros en musculo, hepatopáncreas y ovario de crustaceo *Penaeus kerathurus* (Forsk.) antes y despues de la puesta. *Aquat.Living Resour.* 3: 243-250, 1998.
- Nascimento, I.A., W.A. Bray, J.R. Leung-Trujillo, and A.L. Lawrence.** Reproduction of ablated and unablated *Penaeus schmitti* in captivity using diets consisting of freshfrozen natural and dried formulated feeds. *Aquaculture* 99: 387-398, 1991.
- Ogle, J.T.** Maturation of *Penaeus vannamei* based upon a survey. *Gulf Res.Rep.* 8: 295-297, 1991.
- Ottogalli, L., C. Galine, and D. Goxe.** Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia. *J.Aqua.Trop.* 3: 111-125, 1988.
- Ouellet, P., C.T. Taggart, and K.T. Frank.** Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 40: 368-378, 1992.
- Peter-Marian, M. and Murugadass, S.** Effect of eyestalk ablation on egg production and food conversion efficiency of the commercially important riverine prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. In: *Larvi '91*, edited by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and E. Ollevier. Belgium. p. 251-254, 1991.
- Primavera, J. H.** A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In: *Proceedings of the First International Conference on the culture of Penaeid Prawn/Shrimp*, edited by Y. Taki, J.H. Primavera, J.A. Llobrera. Iloilo City, Philippines, p. 47-64, 1985.
- Quiñones, M.** Desempeño reproductivo del camarón blanco *Penaeus vannamei* a lo largo de dos generaciones. ENEP-Iztacala, México. Tesis de licenciatura, 1999.
- Ramos, L. and Primavera, J. H.** Induced maturation in ablated *Penaeus notialis* and *Penaeus schmitti*. In: *The first Asian Fisheries Forum*, edited by J.L. MacLean, L.B. Dizon and L.V. Hosillos. Manila, Philippines, p. 697-700, 1986.
- Ramos, L. and E. Torras.** Histología del ovario maduro del camarón rosado *Penaeus notialis* con ablación de los pedúnculos oculares. *Rev.Inv.Mar.* 8: 53-61, 1986.
- Rosas, C., I. Fernandez, R. Brito, and E. Diaz-Iglesia.** The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the pink shrimp, *Penaeus notialis*. *Comp.Biochem.Physiol.* 104: 183-187, 1993.
- Simon, C.M.** Large-scale commercial application penaeid shrimp maturation technology. *J. World Maricult. Soc.* 13: 301-312, 1982.
- Tan-Fermin, J.D.** Effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pondreared *Penaeus monodon* (fabricus) broodstock. *Aquaculture* 93: 77-86, 1991.
- Vázquez-Boucard, C.** Etude de la reproduction chez les crevettes peneides; nature et devenir de la masse vitelline: aspects fondamentaux et appliqués. Thèse de Doctorat, Centre d'Océanologie de Marseille, France. 171 p. 1990.
- Wyban, J., C.S. Lee, J.N. Sweeney, and W.K.J. Richards.** Observations on development of a maturation system for *Penaeus vannamei*. *J.World Aquacult.Soc.* 18: 198-200, 1987.
- Wyban, J. and J.N. Sweeney.** *Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual*. Honolulu, HI, USA: The Oceanic Institute, 198 p. 1991.

ANEXO:
COMPARACIÓN DE DIFERENTES ESCALAS
PARA DETERMINAR MADURACIÓN OVÁRICA

VALIDACIÓN METODOLÓGICA

INTRODUCCIÓN

Índice morfocromático

Existen diferentes métodos para determinar el estadio de maduración gonádica de las hembras de Peneidos. El menos invasivo y donde se invierte menos tiempo y recursos es el índice morfocromático, donde se evalúa macroscópicamente el estadio de maduración por medio de una escala que toma en cuenta el tamaño, el color y la forma de la gónada, la cual se observa a través del exosqueleto. No obstante, la desventaja del índice morfocromático es que es subjetivo y requiere entrenamiento previo. Dicho método ha sido descrito (ver Bray y Lawrence, 1992) y es ampliamente usado en condiciones de producción.

Índice gonadosomático

La determinación cuantitativa más usada, rápida y fácil de implementar es el índice gonadosomático (GSI). El GSI relaciona el peso de la gónada (PG) como porcentaje del peso corporal del organismo (BW). No obstante, para su cálculo es necesario sacrificar al organismo. Además el GSI tiene varias posibles fuentes de error (de Vlaming et al., 1982; Grant y Tyler, 1983a; Packard y Boardman, 1987; Packard y Boardman, 1988):

1. Variación del GSI en relación a la maduración gonádica.

Una fuente de error es que el GSI no refleje de forma precisa la actividad gonádica, debido a una diferencia temporal en el reclutamiento de ovocitos, de grado de reabsorción (atresia) de ovocitos durante el reclutamiento o al finalizar la maduración, acumulación diferencial de fluidos ováricos (externos a los ovocitos) durante la maduración, etc. (Grant y Tyler, 1983a). Cuando el peso de la gónada se grafica contra el BW o alguna otra variable que indique el tamaño del animal, la pendiente puede ser diferente en diferentes estadios de maduración (de Vlaming et al., 1982). Para que sea posible comparar organismos en diferentes estadios sin necesidad de realizar histología, es deseable que el GSI permanezca constante entre diferentes estadios de maduración. En este sentido, de Vlaming et al. (1982) propone que el logaritmo del peso de la gónada dividido entre la longitud total del organismo es la mejor expresión del GSI, dado que presenta un coeficiente de correlación alto y permite eliminar las diferencias entre las líneas de regresión calculadas para distintos estadios de maduración.

2. Variación alométrica de la gónada

Al calcular el GSI se pretende estandarizar los pesos de la gónada en relación al peso corporal para obtener un indicador del estado de maduración gonádica que sea independiente del tamaño del organismo. Sin embargo, el tamaño relativo de la gónada expresado como GSI, a su vez puede no ser constante a medida que el animal crece, lo cual puede representar una fuente de error en caso de existir una variación importante en el tamaño de los organismos. El uso del GSI es correcto si la relación matemática entre el peso de la gónada y el peso corporal ($PG = aBW^b$) es isométrica (el exponente b debe tender a uno), lo cual no necesariamente ocurre en diferentes especies (Grant y Tyler, 1983a; Packard y Boardman, 1987; Packard y Boardman, 1988).

3. Variación en la medición del peso corporal

Otro problema potencial es que la precisión con la cual puede evaluarse el BW. El organismo puede presentar variaciones por contenido de agua externa y/o interna (de los tejidos) y puede haber alimento presente en el tracto digestivo (Grant y Tyler, 1983a). En crustáceos existe otra fuente de error; los cambios asociados a la muda. Dependiendo del ciclo de muda, el organismo puede retener agua o estar en proceso de calcificación, por lo que el GSI calculado será menor. Si el análisis lo permite, debe tomarse el peso seco, tanto del organismo como de la gónada, para evitar estas fluctuaciones (Grant y Tyler, 1983a). Si esto no es posible dado que se requiere una muestra fresca de gónada y tejidos para análisis bioquímicos, histológicos, etc., es recomendable tomar nota del estadio de muda por medio de la observación de los urópodos (Robertson et al., 1987). Adicionalmente, es recomendable muestrear a los organismos en estado de ayuno. Por último, el estadio de maduración en sí (peso de la gónada) afecta el peso corporal total y puede ser una fuente de error en el cálculo del GSI o de algún otro índice (p/e índice hepatopancreático). Para evitar ésta fuente de error, Clarke (1982) recomienda calcular los índices corporales de la siguiente manera:

$$\text{GSI} = [\text{Peso de la gónada} \times 100] / [\text{Peso de organismo} - \text{peso de la gónada}]$$

Al restar el PG del peso corporal se obtiene una relación precisa de cuanto representa el tejido ovárico con respecto al somático. Para el cálculo del índice somático de otros tejidos (c.g. hepatopáncreas), también se puede restar el PG del peso corporal en el denominador y usar como numerador el peso del tejido en cuestión.

Histología de la gónada

Otra forma de evaluar el estadio gonádico es por medio de la asignación de estadios de maduración en cortes histológicos. No obstante este método también es subjetivo, tanto por la persona que asigna los estadios, como por en qué se basa para asignarlos (Grant y Tyler, 1983a). El realizar cortes histológicos para solamente obtener una asignación subjetiva del estadio de maduración conlleva una baja eficiencia (tiempo/persona), es costoso y requiere de personal especializado. Si, por otro lado, una vez obtenidos los cortes histológicos se determinan los diámetros y frecuencias de ovocitos (u otras mediciones cuantitativas), se obtiene información complementaria con la cual es posible la evaluación de los estadios de maduración de forma objetiva, precisa, e independiente del tamaño del organismo (Grant y Tyler, 1983b). Solamente los ovocitos que están seccionados a través del núcleo se deben tomar en cuenta para la medición. Grant y Tyler (1983b) recomiendan la medición de entre 100 y 200 ovocitos/gónada y, preferentemente, de diferentes secciones de la gónada. El diámetro de los ovocitos puede dividirse entre diferentes clases de tamaño (entre 10 y 15) para realizar un histograma (Grant y Tyler, 1983a). Una alternativa es promediar los diámetros (diámetro medio) o destacar el diámetro máximo en una gónada (diámetro máximo).

El análisis estadístico entre la asignación de estadios de maduración (i.e. GSI, estadio de maduración morfo cromático y el estadio de maduración asignado por cortes histológicos) y el diámetro de los ovocitos representado por histograma es diferente, ya que en el primer caso, solamente se cuenta con un dato por individuo, mientras que el análisis de los diámetros (entre 100 o 200 diámetros por individuo) es más complejo. Después de calcular el diámetro medio, se puede calcular el coeficiente de variación ($SD \times 100/\text{media}$) como indicador de la variación del tamaño de ovocitos en un individuo (dentro), lo cual permite la comparación del

grado de variación entre diferentes individuos o muestras (Grant y Tyler, 1983b). Los datos de diámetro de ovocitos (para cada individuo) pueden manejarse como una variable anidada (nested) dentro del factor a analizar.

OBJETIVOS

- 1) Debido a que en los muestreos efectuados en los capítulos IV, V y VI se tomó únicamente el peso de la gónada localizada en el cefalotórax y el primer segmento abdominal, se pretende determinar la diferencia entre el peso de la gónada total y el peso de la gónada del cefalotórax y del primer segmento abdominal. A partir de estos pesos, calcular el GSI y la relación existente entre los dos GSI (total y cefalotorácico) para posteriormente corregir el valor del GSI obtenido durante los muestreos por medio de una ecuación.
- 2) Determinar la relación del GSI con el tamaño del organismo.
- 3) Determinar la variación que existe en el GSI en relación a los estadios de maduración, asignados histológicamente.
- 4) Comparar la variación entre los diferentes métodos de asignación de estadio de maduración gonádica en un mismo grupo de individuos, y determinar cuál es el más adecuado en nuestro caso para las comparaciones bioquímicas realizadas en este trabajo y reportadas en otros capítulos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las condiciones experimentales y el protocolo de muestreo usado para los datos que se presentan a continuación se desglosan en el capítulo IV sección 1 y capítulo V. Durante el muestreo de las hembras usadas para el análisis histológico, se anotó la evaluación morfocromática (a través del exosqueleto) de cada hembra con ayuda de personal de APSA (Morfocromático "A"). La asignación del estadio morfocromático A se dividió en tres estadios: A1 = inmaduro, A2 = en proceso de maduración, A3 = maduro (con posibilidad de desovar ese mismo día).

Durante la disección de la gónada, se tomó nota de un segunda evaluación morfocromática (sin el exosqueleto: Morfocromático "E"). La asignación del estadio morfocromático E se dividió en tres: E1 = inmaduro, E2 = en maduración, E3 = maduro.

En los cortes histológicos, se determinó el estadio de maduración gonádica tomando en cuenta la descripción realizada por Tan-Fermin y Pudadera (1989). Se realizaron mediciones del diámetro de los ovocitos en tres regiones diferentes de cada gónada y se calculó el promedio y diámetro máximo de los ovocitos de cada gónada. Por último, se realizaron histogramas para mostrar la distribución de frecuencia de los ovocitos, usando un ANOVA anidado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación entre el peso de la gónada total y el peso de la gónada del cefalotórax.

En los presentes muestreos realizados en APSA (Capítulo IV, V y VI), se tomó la gónada de la parte del cefalotórax y primer segmento abdominal para las determinaciones bioquímicas, mientras que la parte abdominal se usó para histología. Esto permitió un rápido procesamiento de los organismos y optimización de recursos existentes (personal, balanzas, etc). Sin embargo, el cálculo del GSI debe realizarse con el peso de

la gónada total. En la presente sección, se realizó la correlación entre el peso de la gónada del cefalotórax y la gónada total:

$$r = 0.997, r^2 = 0.994, n = 25, P < 0.001, y = - 0.011 + 1.158x$$

Se calculó qué proporción de gónada se encontraba en la parte abdominal (considerada a partir del segundo segmento abdominal) y se encontró que ésta representaba un 13.6% del peso de la gónada total. La alta correlación entre el peso de la gónada del cefalotórax (cefalotórax + primer segmento abdominal) y de la gónada total, nos permitió corregir el GSI calculado a partir del peso de la gónada del cefalotórax.

El uso de la fracción gonádica abdominal para la histología se justifica debido a que hasta la fecha, no se han revelado diferencias en maduración o distribución de ovocitos a lo largo de la gónada (Ramos y Torras, 1994; Rodríguez-Jaramillo, comunicación personal). No obstante, hay diferencia en relación al vaciamiento de la gónada o desove, donde se ha descrito que la ruptura de los folículos empieza en la gónada anterior y el proceso termina en la parte gonádica posterior (Anderson et al., 1984). En el presente experimento las hembras fueron muestreadas antes o después del desove, pero no durante éste. Por otro lado, es posible que existan diferencias bioquímicas entre la gónada del cefalotórax y primer segmento abdominal, en comparación con la gónada que se obtiene del resto del abdomen. La comparación bioquímica entre individuos se realizó siempre con el segmento del cefalotórax y primer segmento abdominal.

2. Variación del peso de la gónada en relación al peso corporal.

En nuestro caso, el efecto del peso corporal tenía particular importancia debido a que se compararon organismos de diferente tamaño (peso de silvestres = 51.85 ± 1.27 y domesticadas = 39.54 ± 0.73 g; $P < 0.001$). Es posible corregir el efecto que tiene el peso corporal sobre el peso de la gónada (o de otro órgano) por medio de índices somáticos. Sin embargo, el uso de índices somáticos no es correcto cuando no existe una relación isométrica. En general, nos interesaba comparar una serie de variables bioquímicas en relación al estadio de maduración. Sin embargo, si la asignación del estadio de maduración se realizaba por medio del GSI, o se correlacionaban las variables bioquímicas con el GSI cuando este no era isométrico, los resultados podrían estar afectados por el tamaño del organismo en mayor medida que por el estadio de maduración en sí. Grant y Tyler (1983a) proponen que como una evaluación aproximada, se realice una correlación del GSI con el peso corporal. Ellos discuten que la correlación del BW con el GSI (que a su vez se calcula a partir del BW) no es completamente correcta, pero que éste análisis es útil debido a que en algunos casos, el GSI sigue siendo dependiente del tamaño del organismo. La correlación entre GSI y BW no fue significativa ni para organismos silvestres ($r^2 = 0.001$, $P = 0.81$) ni para domesticados ($r^2 = 0.059$, $P = 0.10$). Lo anterior implica que en nuestro caso, el GSI corrige a grandes rasgos el efecto del tamaño del organismo sobre el peso de la gónada.

Otra forma, considerada más correcta para evaluar la relación entre el GSI y el peso corporal, es evaluando la relación $PG = aBW^b$. Si la relación es isométrica el exponente b tiende a 1. Para obtener el valor de la b , se transforman los datos a logaritmos, con lo cual se obtiene la siguiente ecuación lineal:

$$\log(PG) = \log(a) + b \log(BW)$$

Con nuestros datos, se obtuvo la siguiente correlación:

$$r = 0.42, r^2 = 0.17, n = 99, P < 0.001, y = - 6.24 + 1.59x; b = 1.59 \pm 0.35$$

Para analizar si el valor de b es significativamente diferente de 1, se aplicó una prueba análoga a la "t" pareada que compara la media de las diferencias entre dos grupos con respecto a 0. En este caso se compara el valor de la pendiente con respecto a 1 mediante la siguiente fórmula (Sokal y Rohlf, 1981):

$$t = [b-1]/[\sqrt{2S_b^2}] = [b-1]/[\sqrt{2(S_b)}]$$

El valor de t que se obtiene es de 1.20, que con éstos grados de libertad corresponde a una $P > 0.05$, por lo cual se concluye que b no es significativamente diferente de uno.

En conjunto, la falta de correlación entre GSI y peso corporal, así como la obtención de una relación aparentemente isométrica validaría el uso del GSI. No obstante, en caso de los organismos domesticados, la correlación tendió a la significancia estadística ($P = 0.10$) y un valor de $b = 1.59$ sugeriría cierta relación alométrica. Por lo anterior, parte de la variación del GSI si puede deberse al peso corporal adicionalmente al estadio de maduración. En este sentido, Grant y Tyler (1983b) sugieren el uso del diámetro de los ovocitos para la asignación del estadio de maduración, ya que ellos concluyen que éstos son independientes del peso corporal. La correlación entre el peso corporal y el diámetro máximo de los ovocitos no fue significativa ni para silvestres ($r^2 = 0.003$, $P = 0.92$) ni para domesticadas ($r^2 = 0.02$, $P = 0.35$). En este caso, no se observa ninguna tendencia de parte de ninguno de los orígenes, lo cual indica que no hay correlación entre el diámetro máximo y el peso corporal de la hembra.

3. Variación de pendientes en relación al estadio gonádico.

a) La relación entre el peso de la gónada y el peso corporal en organismos silvestres con diferentes estadios de maduración determinada histológicamente (Tan-Fermin y Pudadera, 1989) es la siguiente:

Previtelogénico: $r = 0.41$, $r^2 = 0.17$, $n = 12$, $P = 0.24$, $y = 0.059 + 0.006x$

Vitelogénico: $r = 0.66$, $r^2 = 0.43$, $n = 15$, $P < 0.01$, $y = - 1.134 + 0.049x$

Cortical: $r = 0.85$, $r^2 = 0.71$, $n = 12$, $P < 0.001$, $y = - 0.821 + 0.057x$

Desovado: $r = 0.29$, $r^2 = 0.09$, $n = 5$, $P = 0.63$, $y = - 0.106 + 0.019x$

b) La relación entre el peso de la gónada y el peso corporal en organismos domesticados es la siguiente:

Previtelogénico: $r = 0.69$, $r^2 = 0.48$, $n = 12$, $P < 0.05$, $y = - 1.410 + 0.047x$

Vitelogénico: $r = 0.19$, $r^2 = 0.04$, $n = 16$, $P = 0.48$, $y = 0.264 + 0.011x$

Cortical: $r = 0.52$, $r^2 = 0.27$, $n = 11$, $P = 0.11$, $y = - 0.639 + 0.053x$

Desovado: $r = 0.79$, $r^2 = 0.62$, $n = 8$, $P < 0.05$, $y = - 0.904 + 0.042x$

Packard y Boardman (1987) proponen el que se realice el análisis de variables usando covarianza para determinar la diferencia entre pendientes, por lo que se determinó por medio de éste análisis la variación del peso de la gónada en relación al BW: se consideró al estadio de maduración histológico como factor

independiente, el peso de la gónada como variable dependiente y el peso corporal como covariables. Se obtuvo un efecto significativo del estadio de maduración tanto en organismos silvestres ($P < 0.001$) como en domesticados ($P < 0.001$), indicando una correlación significativa entre el peso de la gónada y el BW. El peso corporal usado como covariable fue significativo en silvestres ($P < 0.001$) y domesticadas ($P < 0.01$). Debido a éstas diferencias, no es posible comparar a organismos de diferente peso corporal en diferente estadio de maduración por medio de GSI. Cuando se realizó un análisis de covarianza usando el diámetro máximo como variable dependiente, el estadio de maduración histológico como variable independiente y el peso corporal como covariable, se observó un efecto significativo del estadio de maduración en silvestres ($P < 0.001$) y domesticadas ($P < 0.001$). No obstante, el peso corporal no fue significativo en silvestres ($P = 0.88$) ni en domesticadas ($P = 0.62$), lo cual indica que no existe correlación entre diámetro y BW (por lo que no se pueden considerar pendientes). Por lo tanto, es preferible utilizar el diámetro de los ovocitos para asignar el estadio de maduración o utilizar el BW como covariable para analizar una serie de variables en relación al estadio de maduración (c.g. composición bioquímica).

4. Comparación entre los estadios subjetivos de evaluación del estadio de maduración gonádica.

Cuando se compararon por ANOVA bifactorial los diámetros (máximo y medio) y los valores del GSI en gónadas de hembras silvestres y domesticadas (factor: Origen) evaluando el estadio de maduración (factor: Maduración) con diferentes métodos, se obtuvieron los resultados que aparecen en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Relación entre estadio Morfocromático evaluado por personal de APSA (A) versus diámetro máximo, diámetro medio e índice gonadosomático (media \pm SE) en hembras silvestres y domesticadas.

		Diámetro máximo	Diámetro medio	GSI
Inmaduro	Silvestres	87.3 \pm 14.7	34.9 \pm 2.5	1.45 \pm 0.46
	Domesticadas	131.8 \pm 19.2	53.0 \pm 7.1	2.12 \pm 0.50
Madurando	Silvestres	177.9 \pm 10.8	62.0 \pm 5.9	2.29 \pm 0.22
	Domesticadas	169.1 \pm 16.0	65.1 \pm 10.4	2.43 \pm 0.30
Maduro	Silvestres	233.1 \pm 12.5	116.5 \pm 11.2	4.46 \pm 0.34
	Domesticadas	185.8 \pm 21.8	71.3 \pm 14.3	2.69 \pm 0.51
ANOVA	Origen	$P = 0.776$	$P = 0.308$	$P = 0.337$
	Maduración	$P = 0.000$	$P = 0.000$	$P = 0.000$
	Interacción	$P = 0.027$	$P = 0.004$	$P = 0.010$

En el estadio morfocromático A, se pueden observar ovocitos del máximo diámetro (entre 200 y 250 μm) en las hembras domesticadas que fueron clasificadas como inmaduras o en maduración (Tabla 1, Fig. 1). Esta diferencia de clasificación entre las hembras silvestres y domesticadas es la que determina que la Interacción sea significativa en las hembras evaluadas por medio de la clasificación asignada en APSA. La Interacción significativa en este caso implica que el estadio de maduración de la gónada se encuentra evaluada de forma diferente para las hembras silvestres y domesticadas. En un análisis donde se pretende comparar compuestos bioquímicos con respecto al estadio de maduración, esta diferencia en equivaler los diferentes estadios

gonádicos podría ocasionar error entre las muestras en función del origen. Por ésta razón, no se tomó en cuenta la escala morfocromática asignada por el personal de APSA en ninguno de los trabajos que consideran el estadio de maduración.

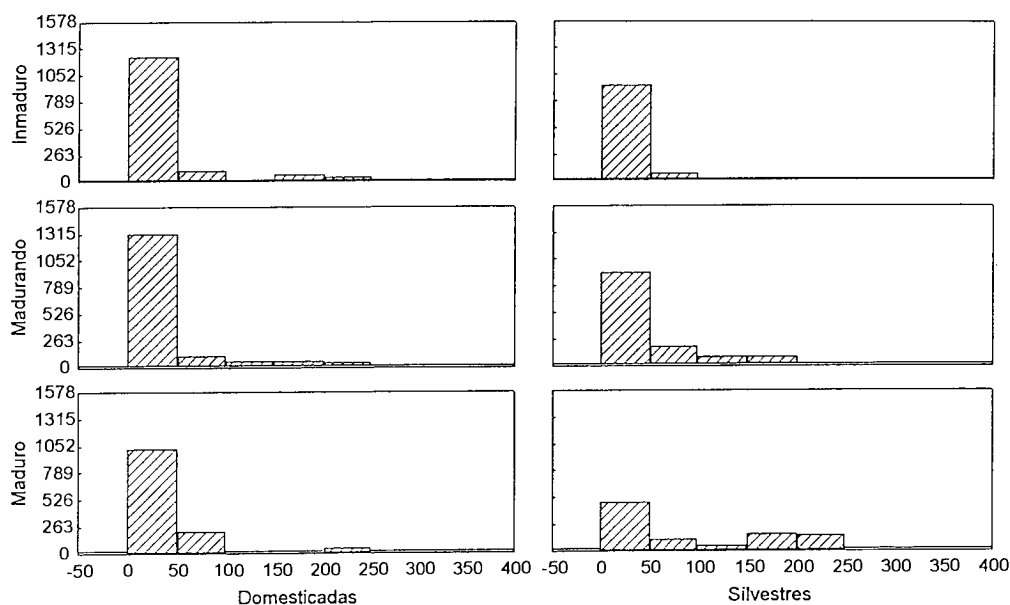


Fig. 1. Número de ovocitos ($n = 7,610$) en relación a su diámetro (μm), agrupados en función del estadio de maduración morfocromático "A" y en relación al origen (silvestres y domesticados: hembras anidadas dentro de Origen).

La evaluación con el estadio morfocromático E (Tabla 2, Fig. 2), revela una distribución de ovocitos de mayor diámetro a medida que la gónada madura. Esto indica que la clasificación de la maduración del organismo con ésta escala morfocromática es más exacta. La desventaja de éste método es que la asignación sigue siendo subjetiva y se requiere sacrificar al organismo. Su utilidad radica en que es posible reconocer si un organismo está maduro, aún si no es posible realizar análisis histológico.

Tabla 2. Relación entre estadio Morfocromático evaluado sin el exosqueleto (E) versus diámetro máximo, diámetro medio e índice gonadosomático (media \pm SE) en hembras silvestres y domesticadas.

		Diámetro máximo	Diámetro medio	GSI
Inmaduro	Silvestres	76.3 \pm 10.7	36.6 \pm 3.5	0.84 \pm 0.17
	Domesticadas	82.1 \pm 6.7	36.1 \pm 2.0	0.88 \pm 0.10
Madurando	Silvestres	176.9 \pm 11.6	63.2 \pm 6.0	2.66 \pm 0.27
	Domesticadas	171.3 \pm 11.3	57.4 \pm 8.5	2.47 \pm 0.19
Maduro	Silvestres	247.3 \pm 9.6	126.8 \pm 13.0	4.95 \pm 0.27
	Domesticadas	258.4 \pm 6.0	110.9 \pm 10.6	4.57 \pm 0.54
ANOVA	Origen	$P = 0.668$	$P = 0.264$	$P = 0.436$
	Maduración	$P = 0.000$	$P = 0.000$	$P = 0.000$
	Interacción	$P = 0.706$	$P = 0.666$	$P = 0.768$

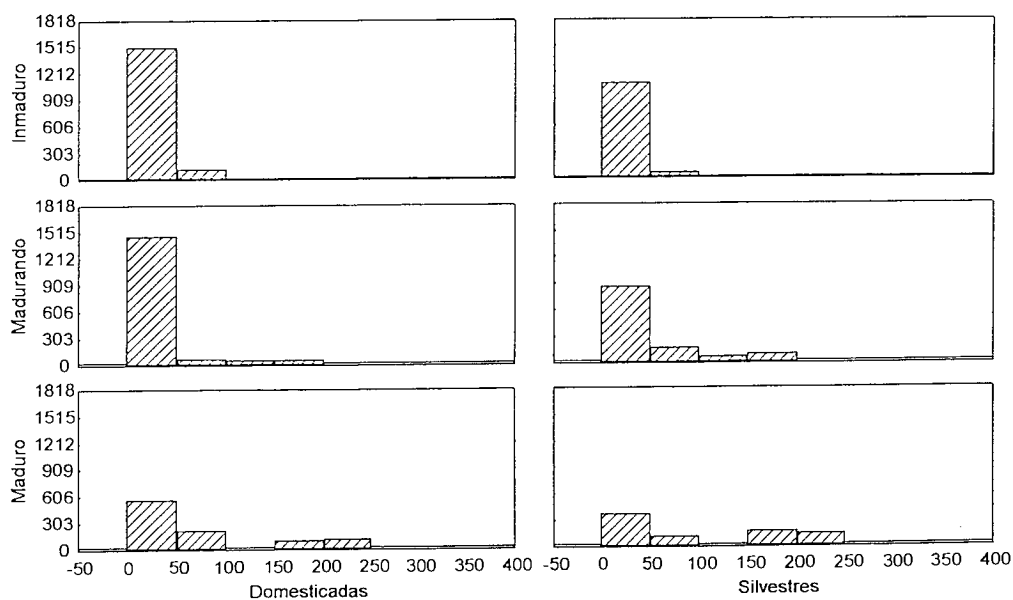


Fig. 2. Número de ovocitos ($n = 7,610$) en relación a su diámetro (μm), agrupados en función del estadio de maduración "E" y en relación al origen (silvestres y domesticadas: hembras anidadas dentro de Origen).

Los resultados de la evaluación histológica (Tabla 3, Fig. 3) fueron presentados y discutidos más a fondo en el capítulo IV, sección I y aquí sólo se tabulan para comparación.

En el capítulo V se presentó el problema de que de algunos organismos a los cuales se les determinaron los compuestos bioquímicos en los tejidos, no fue posible obtener cortes histológicos (10 organismos de $n = 100$). Debido a lo anterior, por medio del método de K de medias (Análisis de Cluster) se asignaron valores de madurez (inmaduras y maduras) a las hembras usando como variable el estadio morfocromático E.

Independientemente del uso de los estadio de maduración para propósitos fisiológicos, la diferencia entre orígenes puede ser una fuente de error en los muestreos de los laboratorios de producción, donde solamente se inspeccionan en busca del espermátforo las hembras maduras. Por medio de la evaluación del estadio morfocromático a través del exosqueleto, se puede pasar por alto hembras maduras, en particular si estas son domesticadas. Este error de muestreo podría ser la causa del mayor éxito aparente de apareamiento en organismos silvestres en comparación con domesticados. Si se están pasando por alto hembras maduras, una solución sería la implementación del uso de colectores de huevos directamente en la tina de maduración.

Tabla 3. Relación entre estadio histológico basado en el descrito por Tan-Fermin y Pudadera (1989) versus diámetro máximo, diámetro medio e índice gonadosomático (media \pm SE) en hembras silvestres y domesticadas.

Estadio	Origen	Diámetro máximo	Diámetro medio	GSI
Previtelogénico	Silvestres	66.0 \pm 4.8	35.1 \pm 3.5	0.73 \pm 0.08
	Domesticadas	77.3 \pm 6.9	34.3 \pm 1.8	0.99 \pm 0.17
Vitelogénico	Silvestres	175.3 \pm 11.2	61.0 \pm 6.4	2.89 \pm 0.25
	Domesticadas	156.9 \pm 15.0	55.7 \pm 6.5	2.08 \pm 0.28
Cortical	Silvestres	251.1 \pm 8.7	131.1 \pm 11.4	5.03 \pm 0.25
	Domesticadas	263.4 \pm 8.4	116.7 \pm 12.7	4.60 \pm 0.53
Desovadas	Silvestres	193.0 \pm 16.8	62.5 \pm 10.2	1.99 \pm 0.53
	Domesticadas	148.4 \pm 16.1	42.4 \pm 5.6	2.09 \pm 0.27
ANOVA	Origen	$P = 0.242$	$P = 0.104$	$P = 0.351$
	Maduración	$P = 0.000$	$P = 0.000$	$P = 0.000$
	Interacción	$P = 0.088$	$P = 0.717$	$P = 0.275$

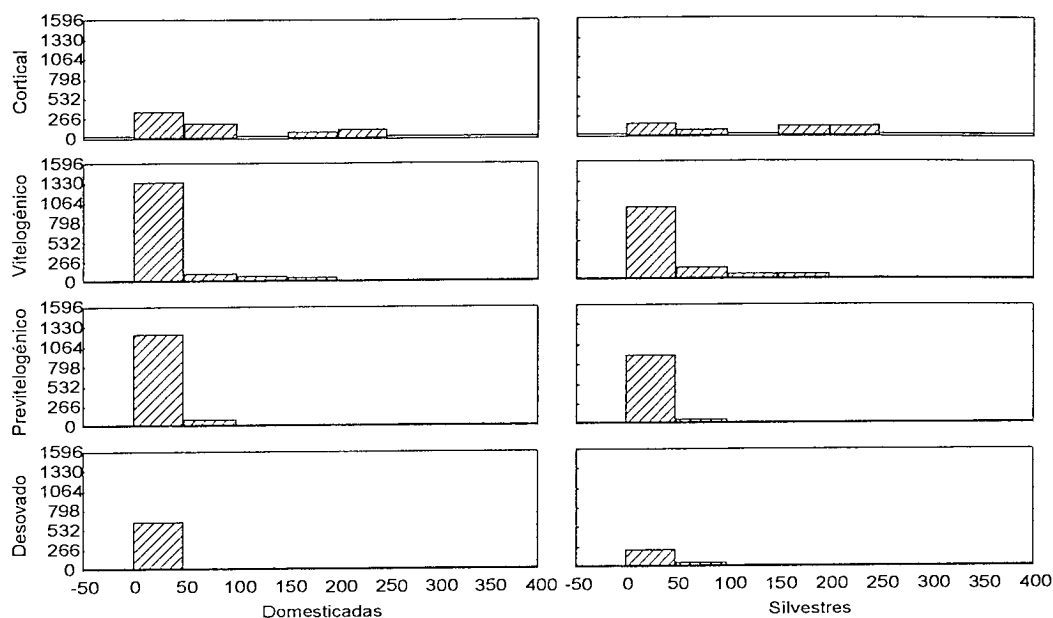


Fig. 3. Número de ovocitos ($n = 7,610$) en relación a su diámetro (μm), agrupados en función del estadio de maduración histológico y en relación al origen (silvestres y domesticados: hembras anidadas dentro de Origen).

CONCLUSIÓN

La escala histológica es la más adecuada para la comparación de variables bioquímicas, clasificadas en relación al estadio de maduración, por lo cual esta escala fue la usada para la asignación de estadios de maduración en el capítulo V y VI. Por otro lado, el uso del diámetro máximo es más correcto que el índice gonadosomático para la determinación del grado de madurez en organismos con diferente peso corporal. La representación gráfica de la distribución de los ovocitos por tamaño en diferentes estadios de maduración permite evaluar la distribución y maduración de diferentes cohortes de ovocitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, S.L., E.S. Chang, and W.H. Clark. Timing of postvitellogenic ovarian changes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* (Penaeidae) determined by ovarian biopsy. *Aquaculture* 42: 257-271, 1984.
- Bray, W.A. and A.L. Lawrence. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: *Marine shrimp culture: Principles and practices*, edited by A.W. Fast and J.L. Lester. St Louis, USA: Elsevier Science, p. 93-170, 1992.

- Clarke, A. Lipid synthesis and reproduction in the polar shrimp *Chorismus antarcticus*. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 9: 81-90, 1982.
- De Vlaming, V., G. Grossman, and F. Chapman. On the use of the gonadosomatic index. *J.Fish Physiol.* 1: 31-39, 1982.
- Grant, A. and P.A. Tyler. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturation indices. *Int.J.Invert.Reprod.* 6: 259-269, 1983a.
- Grant, A. and P.A. Tyler. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. II. The analysis of oocyte size/frequency data, and comparison of different types of data. *Int.J.Invert.Reprod.* 6: 271-283, 1983b.
- Packard, G.C. and T.J. Boardman. The misuse of ratios to scale physiological data that vary allometrically with body size. In: *New Directions in ecological physiology*, edited by M.E. Feder, A.F. Bennet, W.W. Burggren and R.B. Huey. Cambridge University Press, p. 216-239, 1987.
- Packard, G.C. and T.J. Boardman. The misuse of ratios, indices, and percentages in ecophysiological research. *Physiol.Zool.* 6: 1-9, 1988.
- Ramos, L. and E. Torras. Histología del ovario maduro del camarón rosado *Penaeus notialis* con ablacion de los pedunculos oculares. *Rev.Inv.Mar.* 7: 53-61, 1994.
- Robertson, L., W.A. Bray, J.R. Leung-Trujillo, and A.L. Lawrence. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J.World Aquacult.Soc.* 18: 180-185, 1987.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. N.Y.: W.H. Freeman and Company, 859 p. 1981.
- Tan-Fermin, J.D. and R. Pudadera. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricus. *Aquaculture* 77: 229-242, 1989.