



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFFECTO DEL NIVEL DE INCLUSIÓN DE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS
EN LA DIETA PARA REPRODUCTORAS DE LANGOSTA DE
AGUA DULCE *Cherax quadricarinatus*, EN RELACIÓN A
LA CALIDAD DEL HUEVO Y DEL JUVENIL

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

Hervey Rodríguez González

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2006

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 10 del Mes de Febrero del 2006, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

"EFECTO DEL NIVEL DE INCLUSIÓN DE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS EN LA DIETA PARA REPRODUCTORAS DE LANGOSTA DE AGUA DULCE *Cherax quadricarinatus*, EN RELACIÓN A LA CALIDAD DEL HUEVO Y DEL JUVENIL"

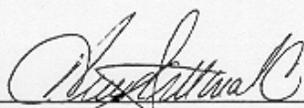
Presentada por el alumno:

Hervey Rodríguez González

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuacultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

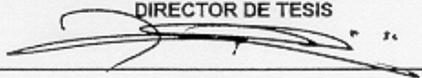
LA COMISIÓN REVISORA



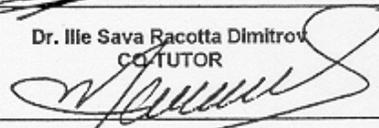
Dr. Humberto Villarreal Colmenares
DIRECTOR DE TESIS



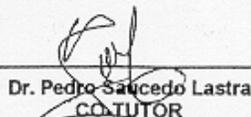
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
CO-TUTOR



Dr. Héctor Nolasco Soría
CO-TUTOR



Dr. Manuel García Ulloa Gómez
CO-TUTOR



Dr. Pedro Saucedo Lastra
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Humberto Villarreal Colmenares	CIBNOR
Dr. Ilie Racotta Dimitrov	CIBNOR
Dr. Manuel García Ulloa Gómez	UAG
Dr. Pedro Saucedo Lastra	CIBNOR
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Humberto Villarreal Colmenares	CIBNOR
Dr. Ilie Racotta Dimitrov	CIBNOR
Dr. Manuel García Ulloa Gómez	UAG
Dr. Pedro Saucedo Lastra	CIBNOR
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Humberto Villarreal Colmenares	CIBNOR
Dr. Ilie Racotta Dimitrov	CIBNOR
Dr. Manuel García Ulloa Gómez	UAG
Dr. Pedro Saucedo Lastra	CIBNOR
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. Alfredo Hernández Llamas (Suplente)	CIBNOR

RESUMEN

La dinámica de nutrientes durante el desarrollo gonadal y el efecto de la variación de proteínas y lípidos en dieta para la reproducción de hembras reproductoras de *Cherax quadricarinatus* con relación a la calidad de la progenie, fueron evaluados. Se utilizó el índice gonadosomático (IGS) como una variable que es comúnmente usada en la acuicultura para determinar el desarrollo gonadal, y se relacionó con el índice hepatosomático (IHS), composición química (proteínas, lípidos y carbohidratos) en gónada y hepatopancreas, indicadores histológicos (diámetro y frecuencia de ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y post-vitelogénicos), y análisis histoquímico (índices de lípidos (IL) y carbohidratos (IC)). Los resultados muestran una correlación negativa entre IGS e IHS ($P < 0.01$). Se presenta una correlación lineal positiva en el contenido de proteínas ($P < 0.01$) y lípidos ($P < 0.01$), mientras que para carbohidratos la correlación es potencial negativa ($P < 0.01$) con el IGS ($P < 0.01$). En el hepatopáncreas, el contenido de lípidos disminuyó al incrementar el IGS ($P < 0.05$). Las frecuencias de ovogonias, ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos primarios disminuyeron significativamente conforme se desarrolló la gónada ($P < 0.01$). Se presentó una frecuencia máxima de ovocitos vitelogénicos secundarios a 4.06 IGS. Se propone que a valores de IGS = 4 se presenta una fase de desarrollo ideal para introducir machos en estanque de reproducción, debido a que empiezan a aumentar significativamente los ovocitos en etapa final (postvitelogénicos). IL aumentó durante el desarrollo de los ovocitos ($P < 0.01$), mientras IC varió entre los diferentes estadios ($P < 0.01$), siendo mayor durante la vitelogénesis primaria. Por lo anterior, se concluye que el IGS es un indicador confiable que puede usarse para determinar el grado de madurez de reproductoras de *C. quadricarinatus*.

Para definir una dieta óptima, en términos de proteína y lípido, para hembras reproductoras de *C. quadricarinatus*, con relación a la calidad del huevo y del juvenil producido, variables de producción (fecundidad y número de desoves), calidad del huevo (peso, tamaño, composición química) y calidad del juvenil (peso, talla, composición química y pruebas de estrés) fueron registrados en hembras (25 ± 3 g), bajo condiciones controladas ($T = 28 \pm 1^\circ\text{C}$; $\text{O}_2 > 4\text{mg/L}$). Dietas con diferente nivel de proteína cruda (18 a 38% PC) y lípidos (3 a 12% LIP) fueron utilizadas. Los resultados indican que el número de desoves, fecundidad, tamaño y peso del huevo, número de juveniles y supervivencia a la prueba de estrés de los juveniles producidos, pueden usarse como indicadores para determinar el efecto de las variaciones en la composición de la dieta de reproductoras de *C. quadricarinatus*, durante el proceso de reproducción. Dietas con bajo nivel de proteína (18% PC) provocan una disminución en el crecimiento, lo que sugiere que el organismo sacrifica la energía para crecer y la utiliza para el proceso de reproducción. No se presentaron cambios en la composición química (proteína, lípidos, carbohidratos, vitelina y contenido energético) del huevo y juvenil, lo que sugiere que las hembras reproductoras buscan garantizar la calidad de la progenie

usando diferentes fuentes de nutrientes, y desovando sólo después de que la composición química del huevo sea equilibrada y uniforme. Los indicadores de calidad de huevo y juvenil muestran que hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con dietas conteniendo 32% de proteína, 8% de lípidos y 16 mg/kJ P/E presentan una mejor respuesta, lo cual sugiere que se optimiza el proceso reproductivo.

Palabras claves: *Cherax quadricarinatus*, desarrollo gonadal, calidad del huevo y del juvenil, dieta, proteína y lípidos.

ABSTRACT

Nutrient dynamics during gonad development and the effect of dietary protein and lipid variations for female *Cherax quadricarinatus* broodstock were evaluated from the perspective of the quality of the progeny. The gonadosomatic index (GSI), commonly used to determine gonad development in aquaculture, was correlated to hepatosomatic index (HSI), gonad and hepatopancreas proximate composition, oocyte diameter and frequency and histochemical analyses (lipid (LI) and carbohydrates (CI) indexes). Results show a negative correlation between GSI and HSI ($P < 0.01$). Protein and lipids increased, while carbohydrates declined in the gonad as GSI increased ($P < 0.01$). Lipids in hepatopancreas diminished as GSI increased ($P < 0.05$). On the other hand, oogonia, previtelogenic and primary vitelogenic oocyte frequency diminished as the gonad developed ($P < 0.01$). The maximum number of secondary vitelogenic oocytes occurred at $GSI = 4.06$. This GSI level represents an ideal development phase for the introduction of males in reproduction ponds, as the number of postvitelogenic oocytes begins to increase significantly. LI increased during egg development ($P < 0.01$) while CI was higher during the primary vitelogenesis ($P < 0.01$). From the information gathered, it is concluded that GSI is a viable indicator to determine ripeness for *C. quadricarinatus* female broodstock.

To determine optimum dietary protein and lipid levels for female broodstock *C. quadricarinatus* (25 ± 3 g), egg and juvenile quality was evaluated. Fecundity, number of spawning, egg weight, size and proximate composition, and juvenile weight, size, number, proximate composition and survival to stress tests, were recorded under controlled conditions ($T = 28 \pm 1^\circ\text{C}$; $\text{O}_2 > 4\text{mg/L}$). Diets with different crude protein (18 to 38% PC) and lipids (3 to 12% LIP) were tested. Results show that proximate composition and juvenile weight and size were inadequate markers. Feeding a diet with 18% PC results in a decline in growth, suggesting that the organisms directs energy from growth to reproduction. There were no significant changes in egg or juvenile proximate composition, vitellin and energy content. The reproductive strategy of female broodstock *C. quadricarinatus* is, apparently, directed at guaranteeing uniform progeny composition, by using different structural blocks and energy sources, before spawning. Egg and juvenile quality indicators show that female broodstock *C. quadricarinatus* fed a 32% PC and 8% LIP diet with 16 mg/kJ P/E produce a better response, suggesting that the reproductive process is optimized.

Key words: *Cherax quadricarinatus*, gonad development, egg and juvenile quality, diet, protein and lipids.

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme nuevamente la oportunidad de terminar este proyecto.

A mi esposa:

Ing. Rosa Alicia Esquivias Jaime

Por estar siempre a mi lado y apoyarme durante todo este periodo

A mi hija:

Danae Rodríguez Esquivias

Por ser la alegría en todo momento.

A mí bebe (en camino):

Por ser nuestra nueva ilusión.

A mis padres y hermanos:

Lic. Francisco Rodríguez Velázquez

Sra. Ma. Antonia González Díaz

c. Dr. Ary Rodríguez González

Ing. Omar Rodríguez González y Familia (Laura y André)

Por estar siempre conmigo, aunque la distancia nos separe.

A mi director de tesis:

Dr. Humberto Villarreal Colmenares

Por sus enseñanzas y su gran apoyo, pero sobre todo por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., por el apoyo brindado para realizar el presente trabajo, a través del Programa de Posgrado, siendo su directora la Dra. Thelma Castellanos Cervantes, la cual, dirige a un excelente grupo de trabajo comprendido por la Lic. Leticia González, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Beatriz Gálvez, Horacio Sandoval, Juan Manuel Melero, Ma. Guadalupe Sánchez y Claudia Olachea.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización del doctorado.

A mi comité tutorial, comprendido por Dr. Ilie Racotta Dimitrov, Dr. Pedro Saucedo Lastra, Dr. Manuel García Ulloa Gómez y Dr. Héctor Nolasco Soria, por su siempre disposición a ayudarme mediante sus valiosos comentarios en la elaboración del presente trabajo.

Un agradecimiento especial al Dr. Alfredo Hernández Llamas, por su apoyo en la elaboración de los artículos generados durante este proyecto, además, de sus enseñanzas y amistad brindada.

Al grupo de trabajo de Langosta de Agua Dulce, por su apoyo fundamental para la realización de este trabajo, dirigido por el Dr. Humberto Villarreal Colmenares.

Al personal de apoyo de los siguientes laboratorios del CIBNOR: Histología: M. en C. Ma. del Carmen Rodríguez y Teresa Arteche; Bromatología: IBQ. Sonia Rocha y IBQ. Dolores Rondero; Nutrición Experimental: Biol. Sandra de La Paz; y Fisiología Experimental: M. en C. Diana Carreño y M.C. Roberto Hernández; Laboratorio de Nutrición Acuícola: M. en C. Ernesto Goytortua.

Y muy en especial a mis amigos: Gintas, Brenda, Manolo, Coco, Humberto, Carmen, Francisco E., Andrea, Rodolfo, Hugo, Toriz, Liz, Cristina, Mirta, Aldo, Edna, Angie, Laura, José N., Berenice, Vero, Arturo, Beatriz, Monthiel, Anahi, German, Maribel, José, Atienzo, Ávila, Yolanda, Rita, Prof. Raúl, Alexandra, Cecy, Miguel, Adriana, Marlene, que aunque algunos la distancia nos separa, siempre han estado conmigo apoyándome.

Y finalmente a mis compañeros de la generación y a todas las personas que desinteresadamente me apoyaron en la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Portada	I
Acta de Revisión de Tesis.	II
Conformación de Comités.	III
Jurado de Examen de Grado.	IV
Resumen	V
Abstract	VII
Dedicatoria	VIII
Agradecimientos	IX
Índice General	XI
Índice de Figuras	XIV
Índice de Tablas	XVI
Lista de Publicaciones	XVIII
Introducción	1
Antecedentes	5
1. Generalidades de la especie	5
2. Morfología	6
3. Ciclo reproductivo	8
3.1. Vitelogénesis	10
4. Efecto de la dieta en la reproducción	12
4.1. Dieta Natural	15
4.2. Dieta Artificial	17
4.2.1. Proteínas	17
4.2.2. Lípidos	18
4.2.2.1. Lípidos totales.	18
4.2.2.2. Triglicéridos y fosfolípidos.	20
4.2.2.3. Ácidos grasos.	22
4.2.2.4. Colesterol	23
4.2.3. Carbohidratos.	24
4.2.4. Vitaminas.	26
4.2.5. Minerales.	27
4.2.6. Pigmentos.	29
4.2.7. Energía	31
5. Parámetros de calidad en huevo y juvenil	32
5.1.1. Pruebas de estrés.....	34
Hipótesis	38
Objetivos	39
1. Objetivo general.	39
2. Objetivos específicos.	39
Material y Métodos	41
1. Organismos experimentales.....	

2. Diseño, formulación y fabricación de los alimentos	41
3. Unidades experimentales	41
4. Desarrollo gonadal de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	43
4.1. Desarrollo y composición química de la gónada de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i> , en relación al índice gonadosomático	48
5. Calidad de huevo de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	48
5.1. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en la composición química y talla del huevo de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	50
5.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta para hembras reproductoras de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i> en la composición química del músculo y hepatopáncreas y el contenido de vitelina en el huevo.....	50
6. Calidad del juvenil de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	55
6.1. Efecto del nivel de proteína y lípidos de la dieta en la composición química, peso y longitud del juvenil de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	58
6.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en indicadores fisiológicos del juvenil de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	58
6.2.1. Determinación de LT ₅₀ y LC ₅₀ para amonio total, salinidad e hipoxia, en juveniles de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	60
6.2.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en la respuesta a pruebas de estrés de juveniles de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	60
7. Análisis proximales.	62
7.1. Analisis de dietas.....	64
7.2. Analisis químicos de gónada, hepatopáncreas, músculo, huevos y juveniles.....	64
7.3. Analisis de vitelina.....	64
8. Análisis histológicos.	65
9. Análisis estadístico.	66
Resultados	68
1. Desarrollo gonadal de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	71
1.1. Desarrollo y composición química de la gónada de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i> , en relación al índice gonadosomático	71
2. Calidad de huevo de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	71
2.1. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en la composición química y talla del huevo de langosta de	

agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	77
2.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta para hembras reproductoras de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i> en la composición química del músculo y hepatopáncreas y el contenido de vitelina en el huevo.....	
3. Calidad del juvenil de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	83
3.1. Efecto del nivel de proteína y lípidos de la dieta en la composición química, peso y longitud del juvenil de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	88
3.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en indicadores fisiológicos del juvenil de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	88
3.2.1. Determinación de LT ₅₀ y LC ₅₀ para amonio total, salinidad e hipoxia, en juveniles de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	90
3.2.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en la respuesta a pruebas de estrés de juveniles de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	90
Discusión.	91
1. Desarrollo gonadal de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	96
2. Calidad del huevo de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	96
3. Calidad del juvenil de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i> .	101
4. Discusión general	107
Conclusión.	113
Bibliografía.	117
Anexo 1	119
Artículo 1	142
Artículo 2	147
Artículo 3	157
	183

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG	DESCRIPCION	PAG.
1	Orificio genital de hembra de <i>Cherax quadricarinatus</i> , el cual se localiza en el coxopodito del 3er par de periópodos o patas	7
2	Localización de los apéndices del abdomen (pleópodos, telson y urópodos) en la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> .	8
3	Batidora industrial utilizada para la mezcla de los ingredientes	42
4	Molino de carne utilizado para la elaboración del alimento peletizado.	43
5	Sistemas utilizados para la realización de las evaluaciones experimentales. Módulo A con 24 unidades de 1500L (A). Modulo B con 48 acuarios de 80L (B). Fotografías del interior de las unidades experimental del Modulo A (c) y B (d), las cuales contenían escondrijos.	45
6	Sistemas utilizados para la realización de las evaluaciones experimentales. Módulo C con 12 unidades de 1000L (A). Módulo D con 100 unidades de 0.25 L.	47
7	Hembra grávida de langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i>	54
8	A) Imagen digitalizada de huevos de <i>C. quadricarinatus</i> . B) Medición del volumen, área, diámetro mayor y menor del huevo utilizando el programa Image Pro ® 5.5, con un microscopio estereoscópico (0.65x)	55
9	A) Imagen digitalizada de juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> . B) Medición del longitud mediante el programa Image Pro ® versión 5.5 (0.65x).	59
10	Imagen digitalizada de ovocitos en la gónada de <i>C. quadricarinatus</i> teñidos con Acid-Shiff (PAS) para cuantificar la presencia de carbohidratos (cho; color magenta) y Sudan black para cuantificar lípidos (lip; color rojo).	67
11	A) Imagen digitalizada de ovocitos en la gónada de <i>C. quadricarinatus</i> . B) Medición del diámetro mayor y menor de ovocitos.	68
12	Relación entre el Índice Gonadosomático (IGS) e Índice Hepatosomático (IHS) durante el desarrollo gonadal de hembras de langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> .	71
13	Relación de niveles de proteína (A), lípidos (B) y carbohidratos (C) en gónada con relación al índice gonadosomático (IGS) en hembras de <i>Cherax quadricarinatus</i> .	73
14	Relación de niveles de proteína (A), lípidos (B) y carbohidratos (C) en hepatopáncreas con relación al índice gonadosomático (IGS) en hembras de <i>Cherax quadricarinatus</i> .	75

15	Frecuencia (f) de oogonias, ovocitos pre-vitelogénicos, vitelogénicos primarios y secundarios, y post-vitelogénicos en relación al índice gonadosomático (IGS) en hembras <i>Cherax quadricarinatus</i> .	76
16	Ajuste de ecuación cuadrática del promedio de fecundidad (FEC) de hembras de <i>Cherax quadricarinatus</i> , alimentadas con diferente nivel de proteínas (A; 22, 27 y 32 y 37%) y lípidos (B; 4, 8 y 12 %).	80
17	Contenido de carbohidratos en el huevo de la langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> alimentadas con diferente nivel de lípidos (4, 8 y 12%)	83
18	Peso final promedio de hembras de <i>Cherax quadricarinatus</i> alimentadas con 4 niveles de proteína (18, 25, 31 y 37%) por 75 días.	84
19	Porcentajes desoves (s) de hembras de <i>Cherax quadricarinatus</i> después de 75 días de alimentación con ocho dietas con diferente nivel de proteína y energía (10, 11, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 mg/kJ proteína/energíaPE). La línea punteada representa el óptimo del porcentaje de desoves en función a la relación 17.1 mg/kJ.	85
20	Niveles de carbohidratos en músculo de hembras de <i>C. quadricarinatus</i> , en función del nivel de proteína en la dieta.	87
21	Numero de juveniles (NJUV) en relación con al nivel de proteína y enenergía incluido en dietas para hembras de <i>Cherax quadricarinatus</i> . La relación de P/E que produce el máximo de numero de juveniles fue calculado con coeficientes de regresión: $-46.506 / (2 \times -1.4554) = 16 \text{ mg/kJ}$ (línea punteada)	90
22	Figura 22. Peso final (PF) de juveniles, provenientes de hembras de <i>Cherax quadricarinatus</i> , después de 50 días de alimentación con cuatro nivel de proteínas (18, 25, 31 y 37%). El nivel de proteínas que produce el máximo peso de juveniles fue calculado con coeficientes de regresión: $0.1312 / (2 \times -0.0026) = 25.2\% \text{ PC}$ (línea punteada).	93

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCION	PAG.
I	Requerimientos de vitaminas para <i>Litopenaeus vannamei</i> , <i>Penaeus japonicus</i> (Lawrence y He, 1999) y formulación propuesta para <i>Cherax quadricarinatus</i> (Villarreal y Peláez, 1999).	27
II	Nivel recomendado de minerales en alimentos comerciales de camarón (Tomado de Akiyama <i>et al.</i> , 1999).	29
III	Fórmulas de las dietas experimentales (g/kg) para reproductores con cuatro niveles de proteína (22, 27, 32 y 37% PC) y tres niveles de lípidos (4, 8 y 12% LIP) que se utilizaron en la evaluación de la calidad de huevos y juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> .	51
IV	Análisis proximal de las doce dietas utilizadas en la evaluación de la calidad de huevos y juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> .	52
V	Formulas de las dietas experimentales (g/kg) para reproductores con cuatro niveles de proteína (18, 25, 31 y 37% CP) y tres niveles de lípidos (3 y 7% LIP) que se utilizaron en la evaluación de la calidad de huevos y juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> .	57
VI	Porcentaje de cobertura de lípidos y carbohidratos para diferentes estadios de ovocitos de hembras de langosta de agua dulce <i>Cherax quadricarinatus</i> .	77
VII	Peso, sobrevivencia, desoves y fecundidad de hembras de <i>C. quadricarinatus</i> alimentadas con 4 niveles de proteína cruda (22, 27, 32 y 37% PC) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12% LIP).	78
VIII	Peso húmedo, seco, diámetro menor, mayor y promedio, área y volumen de huevos de hembras de <i>C. quadricarinatus</i> alimentadas con 4 niveles de proteína (22, 27, 32 y 37%) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12%) por 75 días.	81
IX	Contenido químico (proteínas, lípidos, carbohidratos) y de energía de huevos de hembras de <i>C. quadricarinatus</i> alimentadas con 4 niveles de proteína (22, 27, 32 y 37%) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12%) por 75 días.	82
X	Composición proximal (proteínas, lípidos, carbohidratos y energía) de músculo de hembras de <i>C. quadricarinatus</i> alimentadas con 4 niveles de proteína (18, 25, 31 y 37%) y 2 niveles de lípidos (3 y 7 %) por 75 días	86
XI	Contenido químico (proteínas, lípidos, carbohidratos) y de energía del hepatopáncreas de hembras de <i>C. quadricarinatus</i> alimentadas con 4 niveles de proteína (18, 25, 31 y 37%) y 2 niveles de lípidos (3 y 7 %) por 75 días.	87

XII	Pesos húmedo y seco, y longitud de juveniles recién eclosionados de hembras de <i>C. quadricarinatus</i> alimentadas con 4 niveles de proteína (22, 27, 32 y 37%) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12%)	88
XIII	Contenido químico (proteínas, lípidos, carbohidratos) y de energía de juveniles de hembras de <i>C. quadricarinatus</i> alimentadas con 4 niveles de proteína (22, 27, 32 y 37%) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12%).	89
XIV	Toxicidad de diferentes concertación de amonia y salinidad para juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> .	91
XV	Composición bioquímica (n = 3) en juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> producidos por hembras alimentadas con 4 niveles de proteína (PC; 18, 25, 31 y 37%) y 2 niveles de lípidos (LIP) (3 y 7 %).	92
XVI	Peso final de juveniles de <i>C. quadricarinatus</i> producidos por hembras alimentadas con cuatro niveles de proteínas (PC; 18, 25, 31 y 37 %) y dos niveles de lípidos (LIP; 3 y 7%), después de 50 días de cultivo. Sobrevivencia pruebas de estrés (hipoxia, salinidad y amonio).	95

LISTA DE PUBLICACIONES

- I. Rodríguez-González, H., Hernández-Llamas, A., Villarreal, H., Saucedo, P., García-Ulloa, M., Rodríguez-Jaramillo, C. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the Gonadosomatic Index at first maturation. *Aquaculture* (en prensa). Artículo 1.

- II. Rodríguez-González, H., García-Ulloa, M., Hernández-Llamas, A., Villarreal, H. Effect of dietary protein level on spawning and egg quality of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture* (en prensa). Artículo 2.

- III. Rodríguez-González, H., García-Ulloa, M., Hernández-Llamas, A., Villarreal, H. Spawning and egg quality of crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) varying the lipid level in broodstock diet. Artículo 3.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la langosta de agua dulce (*Cherax quadricarinatus*, von Martens) ha generado un gran interés durante los últimos quince años debido a su talla comercial y a la aceptación por parte del consumidor. *C. quadricarinatus* es la última langosta de agua dulce Australiana en incorporarse al sistema productivo acuícola (Villarreal y Peláez, 1999), debido a que su cultivo se inició a finales de los 80's en Queensland, Australia, mostrando índices de supervivencia de alrededor de 70% en periodos cortos de engorda (Villarreal *et al.*, 1999), tasas de crecimiento a talla comercial adecuadas (Hutchings y Villarreal, 1996) y un manejo de su reproducción en forma sencilla (Jones, 1995a). Estos y otros factores, como la aceptación en el mercado por parte de los consumidores, subrayan el potencial de cultivo de la especie (Villarreal y Peláez, 1999).

El cultivo de *C. quadricarinatus* en México es muy incipiente. En 1990, la Dirección de Acuicultura de la Secretaría de Pesca (SEDEPESCA) importó un lote de reproductores de *C. quadricarinatus* al país. La primera granja de cultivo comercial se inició en 1994 en Soto La Marina, Tamaulipas, teniendo resultados alentadores, con rendimientos superiores a 2,500 kg/ha/ciclo, y precios por kilo de producto vivo de US \$10-15/kg, dependiendo de la talla (Villarreal y Peláez, 1999). La tecnología de producción de *C. quadricarinatus* se basa en el uso de las prácticas de "mejores resultados". Jones (1989), Hutchings y Villarreal (1996), y Villarreal y Peláez (1999), entre otros, han elaborado manuales de producción que

describen detalladamente estas prácticas; sin embargo, el desarrollo comercial del cultivo está limitado por la carencia de investigación científica (Austin, 1992). Aunque la especie es tolerante a variaciones de parámetros medio ambientales, su cultivo requiere agua con niveles de dureza superiores a 150 mg/L de CaCO₃, pH entre 7 y 8.5, y niveles de oxígeno superiores a 4 mg/L (Villarreal y Peláez, 1999). La langosta de agua dulce es capaz de mantener mas de 80 % de su tasa máxima de crecimiento entre los 23 y 31 °C (King, 1994), con un óptimo de 27 °C (Jones, 1988), se reproduce a temperaturas mayores de 23 °C (Yeh y Rouse, 1995) y es capaz de tolerar agua salobre sin afectar su crecimiento (Jones, 1989; Villarreal y Peláez, 1999). Esta capacidad adaptativa la hace un candidato ideal para el cultivo en diversas regiones en México.

Desde el punto de vista nutricional, se conoce que la langosta de agua dulce es omnívora, aunque la selección del alimento y la ración alimenticia adecuada deben establecerse aun (Jones, 1990a). D´Abramo *et al.* (1997), indican que es necesario formular una ración óptima, para la mayoría de cultivos semi-intensivos de crustáceos; el establecimiento de esta ración en langosta ha sido retrasada por la escasez de información de sus requerimientos nutricionales en diferentes estadios de desarrollo. Recientemente en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), se han realizado estudios para definir los requerimientos nutricionales de juveniles y pre-adultos de *C. quadricarinatus* (Cortés-Jacinto *et al.*, 2003), digestibilidad de dietas e ingredientes (Campaña, 2001), conocimiento de la actividad enzimática (López-López *et al.*, 2003) y

efectos de niveles de proteínas y lípidos en el desarrollo de la gónada, en el que se reporta que dietas con 32% de proteína cruda y 8% de lípidos, presentan una mejor respuesta (Rodríguez-González, 2001).

Por otro lado, existen algunos estudios relacionados con el ciclo reproductivo de *C. quadricarinatus* en forma controlada (vgr. Jones, 1988; Yeh y Rouse, 1995; Sagi, *et al.*, 1995; Sagi *et al.*, 1996; Sagi *et al.*, 1997; Villarreal *et al.*, 1999; Serrano-Pinto *et al.*, 2003). Sin embargo, no existe información sobre los requerimientos nutricionales de reproductores con relación a la calidad de su progenie. En este estudio se define calidad, como la capacidad del organismo de maximizar variables comúnmente usadas (morfológicas, químicas, supervivencia a pruebas de estrés en juveniles), con el fin de dilucidar la condición del huevo y juvenil (De Caluwé, 1995). Algunos estudios reportan que la nutrición en animales en proceso de maduración puede afectar la condición fisiológica de los huevos y juveniles producidos, debido a que la calidad del producto reproductivo depende en buena medida de la dieta que reciben las reproductoras (Bromage *et al.*, 1991).

Actualmente se considera que la variación en la calidad de los huevos y juveniles constituye uno de los problemas para la producción acuícola, que generalmente se refleja en los organismos que se destinan para la engorda (Bromage *et al.*, 1991) y en algunos casos, representan un factor para determinar si una especie puede ser potencialmente considerada para cultivo (Fernández-Palacios *et al.*, 1994).

Por lo tanto, en el presente trabajo se estudiaron los diversos aspectos relacionados con la fisiología reproductiva de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, así como los mecanismos que afecten la calidad de su progenie, para poder mejorar la estrategia de maduración en los sistemas de producción. Esto, con la finalidad de obtener organismos más sanos, resistentes y de mayor calidad. Además, se pretende contribuir a reducir los costos de alimentación al definir los niveles óptimos de proteína y lípidos durante esta etapa del cultivo.

ANTECEDENTES

1. Generalidades de la especie

El origen de las langostas de agua dulce está relacionado con el género *Protastacus*, una especie marina que existió durante el periodo Carbonífero. Actualmente, dos grupos pueden definirse de acuerdo a su distribución geográfica: Los Astácidos en el hemisferio norte, y los Parastácidos en el hemisferio sur. Un estudio enfocado a la distribución geográfica de las langostas de agua dulce y los parásitos relacionados con ellos (vgr. oligoquetos y gusanos termocefálicos), indica que el género *Parastacus*, nativo de América del Sur, y las especies Australianas están relacionados (Villarreal y Peláez, 1999).

C. quadricarinatus es una de las más de 100 especies de langostas de agua dulce que pertenecen a la familia Parastacidae. Su posición taxonómica según Hobbs (1988), se describe a continuación:

- Reino: Animal
- Phylum: Arthropoda
- Subphylum: Crustácea
- Clase: Malacostraca
- Superórden: Eucárida
- Orden: Decápoda

- Superfamilia: Parastacoidea
- Familia: Parastacidae
- Género: *Cherax*
- Especie: *quadricarinatus*

2. Morfología

El cuerpo de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* se divide en dos regiones principales: cefalotórax y abdomen, los cuales están recubiertos por el caparazón (Bliss, 1983; Villarreal y Peláez, 1999; New y Valenti, 2000).

El cefalotórax comprende la cabeza y el tórax, las cuales están fusionadas. Externamente, la línea cervical indica la división entre cabeza y tórax. La superficie dorsal anterior del cefalotórax tiene 4 protuberancias que le dan su nombre científico de “quadricarinatus” a la especie (Bliss, 1983; Martínez, 1999; Villarreal y Peláez, 1999; New y Valenti, 2000).

Típicamente, los apéndices de *C. quadricarinatus* están formados por 3 secciones principales: La base o protopodito, y dos ramas, el exopodito y el endopodito. Cinco pares de apéndices se encuentran en la cabeza: antenas, anténulas, mandíbulas, maxilas y maxílulas. La región torácica presenta 8 secciones ó somitas: Tres pares de maxilípedos y 5 pares de pereiópodos o patas.

El orificio genital de la hembra (Fig. 1) se localiza en el coxopodito del 3er par de pereiópodos, mientras que en los machos, el 5° par presenta 2 penes. La primera antena es bifurcada y más pequeña que la segunda antena, que proporciona capacidad sensorial de 360°, útil para la localización de alimento y evaluación de la calidad del agua (Jones, 1990a; Villarreal y Peláez, 1999).

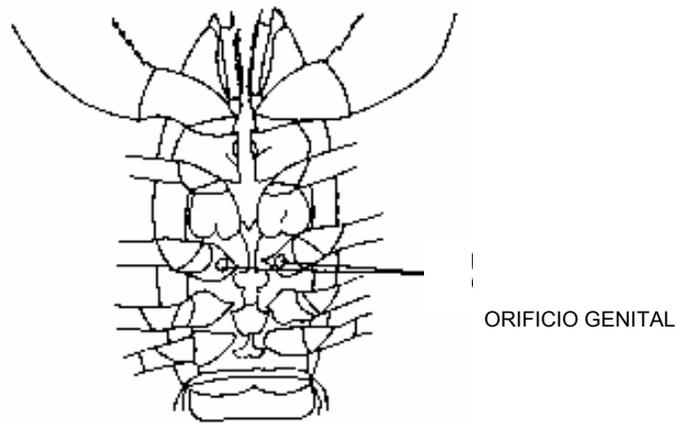


Figura 1. Orificio genital de hembra de *Cherax quadricarinatus*, el cual se localiza en el coxopodito del 3er par de pereiópodos o patas.

Por otro lado, el primer pereiópodo es largo y con quelas grandes. Su función principal es la defensa y establecer jerarquía (dominancia). En el macho adulto (> 20 g de peso), la quela es más prominente y tiene una ampolla membranosa color rojo brillante. El segundo y tercer pereiópodo tienen branquias y quelas en el otro extremo. Su función principal es la recolección de alimento, mientras que el cuarto y quinto pereiópodo terminan en una espina redondeada,

ya que su función principal es la alimentación (Jones, 1990a; Naranjo, 1999; Villarreal y Peláez, 1999).

El abdomen está formado de apéndices que salen de cada somita, los cuales son llamados pleópodos, cuyas funciones incluyen la cópula, circulación de agua, retención de huevos en las hembras y, algunas veces, natación (Jones, 1990b; Villarreal y Peláez, 1999) (Fig. 2).

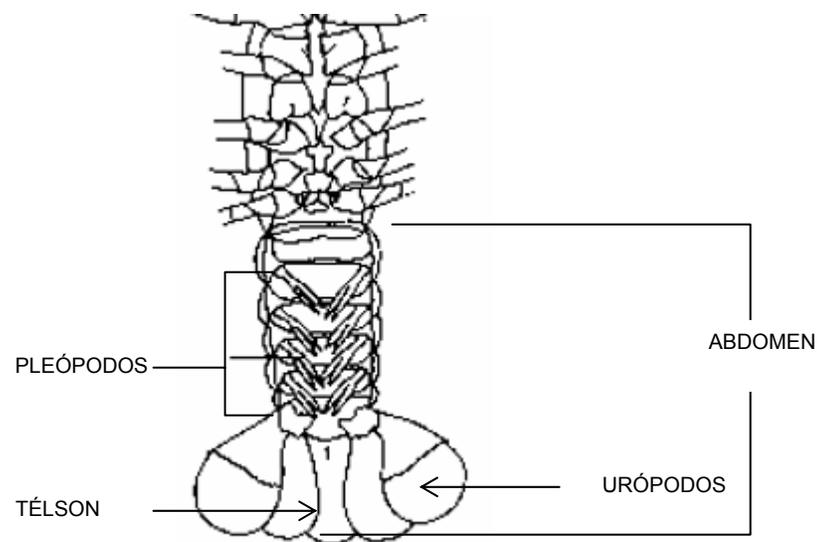


Figura. 2. Localización de los apéndices del abdomen (pleópodos, telson y urópodos) en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

3. Ciclo reproductivo.

El ciclo de vida simple del *C. quadricarinatus* representa una ventaja adaptativa importante, para su cultivo comercial con respecto a otros crustáceos y peces (Jones, 1990a). Un factor fundamental es la ausencia de estadios larvales

libres, ya que todo el desarrollo embrionario ocurre dentro del huevo. Esto se traduce en una mayor facilidad para el proceso de reproducción comercial, lo que aunado a la facilidad para inducir a la maduración y el desove, hace a la especie muy atractiva para el cultivo (Villarreal y Peláez, 1999; García-Guerrero *et al.*, 2003b).

C. quadricarinatus alcanza la madurez sexual entre los 7 y 9 meses de edad (Rouse *et al.*, 1991) o a una talla promedio de 15 a 20 g (Naranjo, 1999; Villarreal y Peláez, 1999; Rodríguez-González, 2001). Durante este periodo las hembras presentan la maduración gonadal, la cual involucra varios procesos como la gonadogénesis (desarrollo del tejido gonadal), gametogénesis (producción de ovocitos) y vitelogénesis primaria y secundaria (Adiyodi, 1985).

El periodo de reproducción puede presentarse a lo largo de todo el año, siempre y cuando las condiciones del ambiente son las adecuadas (Villarreal y Peláez, 1999). Esencialmente, esto significa que la temperatura del agua debe permanecer arriba de 23 °C y por debajo de 32 °C, condición con la cual pueden obtenerse hasta 5 desoves por año por hembra (Villarreal y Peláez, 1999). En lo que respecta a la incubación de los huevos, García-Guerrero *et al.* (2003c), determinaron que el intervalo óptimo de temperatura es de 25 a 28 °C, siendo 25 °C la mejor temperatura en términos de costo energético y consumo de proteínas. El desarrollo embrional de esta especie requiere de 6 a 10 semanas, dependiendo de la temperatura a la que estén expuestos los huevos (Naranjo, 1999; García-

Guerrero *et al.*, 2003c). Esta relación directa entre temperatura y desarrollo, se debe a que la tasa metabólica en el huevo se ve incrementada con el aumento de temperatura lo que a su vez afecta el crecimiento, a la supervivencia y la tasa de absorción de la vitelo por parte del embrión (García-Guerrero *et al.*, 2003c).

C. quadricarinatus presenta un huevo de tipo lecitotrófico de gran tamaño que es rico en lípidos (Reynolds, 2002). Esta característica permite al embrión concluir su desarrollo de forma satisfactoria, debido a que éste dependerá total y únicamente de las reservas contenidas en el huevo hasta que el estado juvenil independiente se haya alcanzado (García-Guerrero *et al.*, 2003a). Fan Li *et al.*, (2000) y García-Guerrero *et al.*, (2003b) han reconocido diferentes estadios embrionales en *C. quadricarinatus* (de 5 y 10, respectivamente) basados en criterios de color del huevo y en cambios morfológicos externos; reconociendo además estadios post-embrionarios (2 y 3, respectivamente) durante los cuales las reservas contenidas en el saco vitelino (de color café) continúan proporcionando nutrientes y energía al nuevo organismo después de la eclosión, hasta que los juveniles se vuelven independientes de la protección del cuerpo de la madre y de las reservas alimenticias que el saco vitelino les proporciona (Naranjo, 1999).

3.1. Vitelogénesis.

Una característica de la reproducción de los decápodos es la acumulación de sustancias de reserva en los ovocitos por los individuos reproductores, las que serán transferidas, además del material genético, a los huevos, larvas y/o juveniles. Este proceso recibe el nombre de vitelogénesis. El vitelo es constituido por una lipo-glico-caroteno-proteína el cual es el principal componente del huevo (Adiyodi, 1985), y contiene todos los constituyentes bioquímicos necesarios para la embriogénesis y supervivencia de la progenie hasta el momento en que puedan alimentarse por si mismas. Las reservas vitelinas presentes en los ovocitos, constituyen el material energético y estructural transmitido a la progenie (Serrano-Pinto *et al.*, 2003).

La calidad de las reservas vitelinas depende en gran medida de la alimentación de los progenitores, por lo que su evaluación en el desarrollo embrionario representa un posible indicador de la respuesta del animal a las diferentes dietas utilizadas en la etapa de maduración. Mendoza *et al.* (1993) estandarizaron técnicas que utilizan ELISA para la determinación de vitelogeninas en la hemolinfa, mientras que Vazquez-Boucard *et al.* (1986) y Vazquez-Boucard (1990), lograron la estandarización de una técnica inmunoenzimática capaz de cuantificar, con la ayuda de anticuerpos específicos, la lipovitelina, molécula constitutiva de las reservas vitelinas. Con ello es factible identificar los tejidos implicados en el fenómeno de la reproducción. Recientemente, Serrano-Pinto *et al.*, (2003, 2004) describen el proceso de caracterización química de las vitelinas de *C. quadricarinatus*. Estos análisis son útiles para evaluar el contenido del vitelo,

el cual tiene una influencia en el desarrollo embrionario y la supervivencia de los juveniles

4. Efecto de la dieta en la reproducción

Los estudios enfocados a la nutrición generalmente consideran los requerimientos de proteínas o lípidos de los reproductores en función de la composición de estos nutrientes en las gónadas de hembras maduras (Middleditch *et al.*, 1979; Harrison, 1990; Mohamend y Diwad, 1994; Millamena *et al.*, 1993). De esta manera se suministran, a través de raciones alimenticias, componentes que probablemente utilizan los organismos durante el proceso reproductivo (Palacios, 1999).

Un aspecto fundamental en la nutrición de reproductores de crustáceos es el adecuado nivel de nutrientes y energía que les permitan enfrentar la maduración gonadal. Ya que se sugiere, que los nutrientes que la madre ingiere durante el desarrollo de los ovarios hasta el desove, pueden ser especialmente críticos e influenciar tanto la composición de los ovarios como el estado nutricional de los huevos. La maduración gonadal se encuentra asociada a un enorme costo de energía, por el incremento del trabajo biosintético, tal como la manufactura de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, para la formación de material genético (ADN), gónadas, ovocitos y en la producción y acumulación de vitelo (vitelogénesis) (Harrison, 1990). A pesar de su importancia, el papel que los nutrientes específicos juegan en la reproducción es poco comprendido y los

requerimientos mínimos de nutrientes críticos para el desarrollo de gametos y la producción de huevos viables y juveniles saludables aún no ha sido determinado (Tandler, 1991; Harrison, 1997)

Es importante considerar que la calidad y la cantidad de nutrientes en la producción de huevos y juveniles dependen de la interacción de diversos factores internos y externos que influyen sobre los reproductores y que, a su vez, afectan a la progenie (García-Ulloa, 2000). Los factores internos se pueden dividir en dos tipos: 1) genéticos, los cuales son afectados por los caracteres hereditarios y pueden ser manipulados para la selección de un carácter específico, como mayor tamaño; y 2) no genéticos, como la edad y el tamaño de los reproductores, y la posición de los ovocitos en el ovario. Los factores externos son: 1) abióticos, como la temperatura, oxígeno disuelto, salinidad; y 2) bióticos, como la densidad poblacional y el alimento; destacando para este último, aspectos como la cantidad, disponibilidad y calidad (Kamler, 1992).

Lo anterior establece que existe una clara influencia de la dieta recibida por los reproductores en el periodo previo al desove, al igual que las condiciones de mantenimiento en el laboratorio, sobre su progenie. Esto ha sido corroborado por diversos trabajos en peces y crustáceos. Por ejemplo, Somerton *et al.*, (1995), observaron que hacia el final de la etapa reproductiva, el diámetro de los huevos disminuyó gradualmente. Lo anterior sugiere que en cautiverio y debido a las condiciones de estrés a que los animales fueron sometidos, el esfuerzo

reproductivo se ve aumentado, teniendo como resultado una disminución en la producción de huevos, lo que parece ir en directa relación a la limitación nutricional del aporte de alimento en comparación con el que los animales pueden encontrar en el ambiente natural.

Una de las dificultades a las que se han enfrentando los nutriólogos de crustáceos y que ha limitado el aporte de resultados concluyentes, es la variación intra e interespecífica. Racotta *et al.* (2003), realiza una revisión de los trabajos de calidad larvaria de camarones con relación a la condición de los reproductores, en la cual, define factores que afectan o determinan la calidad de la larva como: composición química, morfología, condiciones ambientales, supervivencia a pruebas de estrés, nutrición de reproductores, entre otros. Sin embargo, para algunas especies de crustáceos, los efectos de las dietas sobre la maduración y calidad de la progenie, pueden variar entre especies e incluso entre poblaciones de la misma especie. Rodríguez-González (1998), observó que para el langostino *Macrobrachium tenellum*, el efecto de la variación dietética en reproductores se reflejó en el volumen de los huevos y no en otros parámetros de calidad que son utilizados para camarones peneidos y otros langostinos del género *Macrobrachium*, como el número promedio de huevos, peso húmedo de la masa total de huevos y peso seco individual del huevo. Por lo tanto, es necesario uniformar criterios de calidad, para evaluar el ciclo reproductivo de la especie en cautiverio (Sorgeloos y Léger, 1992) mediante estudios que contemplen la

interacción de la nutrición de los reproductores y la calidad de la progenie (Tandler, 1991).

Actualmente, existe una gran cantidad de bibliografía que se refiere a la calidad de la progenie en respuesta a variaciones de algún compuesto específico en la dieta para reproductores (García-Ulloa, 2000), así como el gasto energético que es generado por el proceso de la reproducción, el cual es evaluado no solo con el estado de maduración de los organismos reproductores sino también con varias características de los productos sexuales, ya sean los gametos, huevos (Brooks *et al.* 1997) o las crías mismas (Guisande *et al.*, 1998; Racotta *et al.*, 2003)

Sin embargo, a la fecha han sido muy diversas las investigaciones tratando de encontrar un alimento “óptimo” que satisfaga los requerimientos nutricionales de una especie. Estos trabajos se pueden dividir con relación a la dieta utilizada en dos tipos:

- Dieta natural
- Dieta artificial

4.1. Dieta Natural

Se han utilizado diferentes alimentos frescos para la alimentación de reproductores de crustáceos y peces tanto en estanques, como en laboratorio. En crustáceos, existe una gran cantidad de alimentos frescos como los poliquetos (*Glyceradibranchiata* sp.), que es comúnmente utilizado para alimentar hembras listas para el desove, de diferentes especies de camarón como *Litopenaeus vannamei*, *L. schmitti* (Nascimento *et al.*, 1991) y *L. stylirostris* (Cahu, 1998). El efecto positivo que ejerce los poliquetos en la reproducción de los peneidos ha sido parcialmente atribuido al alto nivel de ácidos grasos polinsaturados (Lytle *et al.*, 1990). Además, algunos organismos marinos, que son utilizados como alimento fresco han inducido efectos positivos en la reproducción del camarón, entre ellos el calamar, el mejillón, el camarón y la artemia. Algunas veces pueden estar congelados, pero esto puede deteriorara su valor nutricional; por ejemplo, Alvarez *et al.*, (1989) demostraron que el número de huevos producidos por hembras de *F. indicus* alimentadas con mejillones congelados es mucho menor que el número obtenido con hembras alimentadas con mejillón fresco.

Por otro lado, a medida que se incrementa el conocimiento sobre los requerimientos nutricionales de las especies, la alimentación está siendo complementada cada vez más con raciones balanceadas peletizadas. Algunos estudios recientes han concluido que la dieta mixta genera mejores resultados (Nascimento *et al.*, 1991). Sin embargo, para algunas especies de importancia comercial, es necesario sustituir completamente el alimento natural durante la reproducción, debido a que su calidad y disponibilidad son muy variables.

4.2. Dieta Artificial

4.2.1. Proteínas

Las proteínas son el principal componente orgánico en algunos tejidos animales (del 65-75 % en base seca) (D'Abramo *et al.*, 1997) y el componente más abundante en el huevo y en las larvas de decápodos (Hernández, 2001). Las proteínas son grandes moléculas de estructura compleja, constituidas por alrededor de 20 aminoácidos (aa) principales, los cuales son obtenidos de la dieta por la digestión o hidrólisis de proteínas y que a su vez pueden ser utilizados por los tejidos para sintetizar nuevas proteínas. Aquellos aminoácidos que el organismo no puede sintetizar *de novo* se denominan aminoácidos esenciales (D'Abramo *et al.*, 1997; Villarreal y Peláez, 1999). En langostas de agua dulce se considera que aproximadamente el 58% del total de aminoácidos corresponde aminoácidos no esenciales, mientras que los esenciales son: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, los cuales son obtenidos de la productividad natural presente en los estanques de cultivo o de las raciones alimenticias suplementadas (Villarreal y Peláez, 1999).

En la maduración y reproducción de decápodos las proteínas juegan un papel muy importante, debido a que pueden ser oxidadas para la obtención de

energía, o bien formar parte de las proteínas de tejidos embrionales. Además, proveen de aa. esenciales y no esenciales para la formación de músculos, tejidos conectivos y proteínas respiratorias de la hemolinfa. Las proteínas también proveen nitrógeno para la síntesis de coenzimas y del material genético (ácidos nucleicos y nucleótidos). El papel crítico que juegan las proteínas en la maduración se refleja en los cambios registrados en la composición del hepatopáncreas y ovarios durante la vitelogénesis (Harrison, 1990). El requerimiento para reproductores de *C. quadricarinatus* aún no ha sido reportado, pero estudios realizados en juveniles reportan que el requerimiento de proteína es de 31 % siendo mayor para dicha etapa que el requerido por adultos (Cortés-Jacinto *et al.*, 2003). La proteína es el elemento más costoso en la formulación de dietas para crustáceos. La relación económica entre el costo de la proteína y el precio del animal de cultivo ha significado que la definición del nivel mínimo de requerimientos de proteína y aminoácidos es esencial para la formulación de alimentos. Una de las metas en acuicultura es utilizar la menor cantidad de proteína en la dieta para el crecimiento, permitiendo que los carbohidratos y lípidos proporcionen la energía metabólica. A esto se le llama el proceso de liberación de la proteína (Villarreal y Peláez, 1999).

4.2.2. Lípidos

4.2.2.1. Lípidos totales

Los lípidos constituyen una fuente altamente energética y son esenciales para el desarrollo del metabolismo de crustáceos (García *et al.*, 1996). La

preferencia de los organismos para el uso de lípidos como fuente de energía los coloca como el principal material energético de reserva. Otras funciones de estos compuestos se refieren a la formación de estructuras celulares de gran importancia como lo son las membranas celulares y al desarrollo de moléculas específicas como hormonas (García-Ulloa, 2000).

Se sabe que el almacenamiento de lípidos juega un papel crucial en la biología reproductiva de los crustáceos dado que, a lo largo del ciclo de maduración, el ovario incrementa los niveles de lípidos mientras que, en los lugares de almacenamiento (vgr. hepatopáncreas) disminuyen, lo cual sugiere una transferencia de lípidos de este órgano hacia la gónada (Castille y Lawrence, 1989; Millamena y Pascual, 1990), sugiriendo que esta transferencia es de manera rápida (Castille y Lawrence, 1989).

Bray y Lawrence (1990) concluyen que el requerimiento de lípidos del camarón azul *L. stylirostris* es más alto en una dieta para reproductores que para juveniles. De hecho, los lípidos representan del 22 al 26 % de materia seca en los huevos de dicha especie después del desove, y la deposición de lípidos se realizó durante la vitelogénesis, siendo menor que los datos reportados por García-Guerrero *et al.*, (2003a) para *C. quadricarinatus* equivalente a 37 %.

Los niveles de lípidos recomendados para alimentos comerciales de camarón fluctúan del 6 al 7.5 %, sin exceder 10 %. Una disminución en el

crecimiento y un incremento en la mortalidad están asociados con niveles de lípidos que exceden 10 %, lo cual probablemente es debido a los desequilibrios y deficiencias de los demás nutrientes (Cahu, 1998).

El requerimiento de lípidos de *C. quadricarinatus* en sus diferentes estadios de desarrollo ha sido poco estudiada (Cortés-Jacinto *et al.*, 2005). Además, esta especie presenta en los estadios de juvenil y adulto un coeficiente alto de digestibilidad aparente de lípidos provenientes de ingredientes de origen vegetal (pasta de soya y trigo texturizado, 94.1 %) en juveniles y pre-adultos (Campaña, 2001).

4.2.2.2. Triglicéridos y fosfolípidos

Los triglicéridos son el grupo más abundante de lípidos y sirven principalmente como energía de reserva, la cual es depositada en el tejido hepático. Este tipo de lípido está compuesta por uno, dos ó tres ácidos grasos y una molécula de glicerol (García-Ulloa, 2000).

Una gran parte de las reservas disponibles en las larvas esta en forma de triglicéridos, que son el principal lípido energético almacenado en células animales. Los triglicéridos en el huevo son normalmente agotados de manera gradual hasta el momento en que una fuente exógena satisfaga las demandas (Holland, 1978). Por lo tanto, se recomienda que las dietas para reproductores contengan niveles apropiados de triglicéridos (Glencross y Smith, 1997).

Entre los lípidos, los fosfolípidos tienen también gran importancia. Estudios en camarones peneidos reportan que representan un 45-52 % de los lípidos totales en los huevos en desarrollo. Esta concentración puede ser alcanzada alimentando a los reproductores con una dieta que contenga 2 % de fosfolípidos. Sin embargo, si se usa lecitina, el requerimiento se reduce a 1%. Subsecuentemente, si los fosfolípidos contienen 20:5n-3 y 22:6n-2 en la posición número 2 del fosfolípido, solo se requiere de 0.4 % (Akiyama *et al.*, 1999).

Existe muy poca información en la literatura sobre los requerimientos y funciones de los fosfolípidos en la reproducción. Sin embargo, Teshima *et al.*, (1988) han demostrado que la fosfatidilcolina es transferida en altas concentraciones del hepatopáncreas a los ovarios durante la maduración, mientras que Alva *et al.*, (1993) observaron una reducción en el desarrollo del ovario en *Penaeus japonicus* alimentado con una dieta libre de fosfolípidos. Por otro lado, dietas que contenían 0.8, 2.4 y 4.6% de fosfolípidos, no presentaron diferencias en la composición química del hepatopáncreas, ovarios y músculo de hembras de *M. rosenbergii*. Por lo tanto, es probable que los requerimientos de fosfolípidos puedan ser cubiertos por una dieta comercial, debido al contenido de fosfolípidos en los ingredientes (Cavalli *et al.*, 2000).

D'Abramo *et al.* (1991), y Kanazawa (1985), han mostrado evidencia de una reducción en la tasa biosíntesis de fosfolípidos en crustáceos. El beneficio de los fosfolípidos en la dieta para camarón, ha sido atribuido a la forma del transporte,

lípidos en forma de lipoproteínas, lo que favorece la utilización de ácidos grasos por parte de los tejidos (Palacios, 1999).

4.2.2.3. Ácidos grasos

Cinco ácidos grasos se consideran esenciales para decápodos: linoléico (18:2n-6), linolénico (18:3n-3), araquidónico (20:4n-6), eicosapentaenólico (20:5n-3) y docosahexaenólico (22:6n-3). Las fuentes vegetales tienen generalmente niveles más altos de 18:2n-6 y 18:3n-3, mientras que los aceites animales proporcionan mayores cantidades de 20:5n-3, 20:4n-6 y 22:6n-3 (Villarreal y Peláez, 1999).

La composición de ácidos grasos en la gónada varía durante la maduración de crustáceos. En particular, se ha observado que aumenta la concentración de los ácidos araquidónico (20:4n-6), eicosapentaenólico (20:5n-3), docosahexaenólico (22:6n-3) en gónadas maduras. Estos ácidos grasos altamente saturados (HUFA) son importantes en ectotermos de medios salinos por aumentar la fluidez de la membrana celular y de los organelos. El araquidónico, por otra parte, actúa como precursor de las prostaglandinas aparentemente involucradas en el desove (Palacios, 1999).

Es bien sabido que los crustáceos tienen una baja habilidad de desaturar las cadenas de ácidos grasos, por lo que estos componentes deben de ser adicionados en la dietas. Los HUFA de la serie n-3, son componentes esenciales

para las membranas biológicas en los organismos marinos. Particularmente, los huevos en eclosión deben contener una concentración de n-3 HUFA suficiente para sostener el desarrollo de la fase embrionaria. El papel de los n-3 HUFA en la reproducción y calidad de huevos en los camarones ha sido estudiado por varios autores, demostrando que estos componentes son esenciales para los reproductores (Xu *et al.*, 1994; Cahu, 1998). La cantidad de n-3 HUFA contenida en la dieta de reproductores es determinante para la calidad de huevos y larvas (Cahu, 1998).

El nivel recomendado de ácidos grasos esenciales en raciones comerciales es aproximadamente 0.4 % del total de la composición de la dieta. Una deficiencia en ácidos grasos puede originar una reducción del crecimiento, incrementos en el contenido de agua del tejido y una reducción en la resistencia a infecciones bacterianas (Villarreal y Peláez, 1999).

4.2.2.4. Colesterol

El suministro de colesterol en la dieta es necesario debido a que los crustáceos no tienen la maquinaria enzimática para la síntesis de este esteroide (Palacios, 1999). Tanto el colesterol como los fosfolípidos están implicados en la estructura de membrana celular, en los transportadores de lípidos (lipoproteínas). Además el colesterol, es precursor de la vitamina D y de hormonas esteroideas, que controlan el proceso reproductivo. La eliminación de colesterol de la dieta o su inadecuada absorción (i.e. por falta de fosfolípidos), puede producir una

disminución en el crecimiento o un incremento en la mortalidad en juveniles debido a la incapacidad para completar la muda. El calamar es un alimento que se administra al camarón como fuente de colesterol. De hecho, la administración de calamar a hembras de *L. vannamei* puede inducir la síntesis de vitelogenina (Palacios, 1999).

Los requerimientos de colesterol para *M. rosenbergii* van de 0.5 a 0.6 % (D'Abramo y Daniels, 1994). Las harinas y aceites de invertebrados marinos, como el calamar, camarón, almeja y cangrejo, son excelentes fuentes de colesterol (Akiyama *et al.*, 1999).

4.2.3. Carbohidratos

Son compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno que constituyen la fuente de energía más económica en las dietas peletizadas (New, 1987; Tacon, 1990). La mayoría de las dietas de especies acuáticas incluyen azúcares simples o monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; estos últimos incluyen el almidón (Akiyama y Dominy, 1989; Tacon, 1990). Los carbohidratos se almacenan como glucógeno, y se utiliza como fuente de energía, en la síntesis de quitina y en la formación de aminoácidos y ácidos grasos no esenciales (New, 1976; D' Abramo y Sheen, 1996).

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 relevancia desde el punto de vista económico, debido al alto costo asociado a la alimentación con proteínas (Cruz-Suárez *et al.*, 1994), como del ambiental, ya que el aumento en la ingestión de proteínas incrementa la producción de amonio y otros productos metabólicos, que en altas concentraciones constituyen uno de los problemas de contaminación ambiental por acuicultura (Velasco *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista de la maduración de reproductores, estudios realizados con camarones peneidos, mostraron que las reservas de carbohidratos en el hepatopáncreas disminuyen, posiblemente debido al requerimiento energético en esta fase de reproductiva (Palacios, 1999).

Los requerimientos de carbohidratos no han sido definidos, ya que no se consideran elementos dietéticamente esenciales en alimentos para camarón, aunque su utilidad y su efectividad en el costo es innegable (Akiyama *et al.*, 1999). Sin embargo, se recomienda una proporción de 4:1 para la relación entre carbohidratos y lípidos en dietas para *M. rosenbergii*, lo cual puede ser una guía

apropiada para el diseño de dietas específicas para *C. quadricarinatus* (Villarreal y Peláez, 1999).

4.2.4. Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos requeridos en la dieta para un crecimiento normal. Al mismo tiempo, intervienen en un gran cantidad de reacciones químicas corporales destacando el proceso reproductivo y el mantenimiento de la condición sanitaria de los organismos (García-Ulloa, 2000).

Es bien sabido que las vitaminas juegan un papel muy importante en el proceso reproductivo, particularmente en el desarrollo embrionario de diferentes organismos como crustáceos, insectos o peces. Por ejemplo, los efectos de la vitamina E y vitamina C en la reproducción del camarón y la calidad larval, han sido estudiadas por considerar que los camarones no pueden producir estos compuestos y se les debe adicionar en la dieta en cantidades suficientes para que puedan desarrollar la etapa lecitotrófica del embrión (Cahu, 1998).

El requerimiento de estos compuestos orgánicos varía de acuerdo a factores como la especie, la edad, tasa de crecimiento, talla de los animales, la calidad de la dieta, la temperatura del agua, el metabolismo del organismo, entre otros (Akiyama y Dominy, 1989, García-Ulloa, 2000).

Los estudios de requerimientos de vitaminas en crustáceos se han realizado principalmente en especies de camarón (Lawrence y He, 1999). Villarreal y Peláez (1999) han presentado una formulación para *C. quadricarinatus* (Tabla I).

Tabla I. Requerimientos de vitaminas para *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus japonicus* (Lawrence y He, 1999) y formulación propuesta para *Cherax quadricarinatus* (Villarreal y Peláez, 1999).

Vitamina	<i>L. vannamei</i> (mg/kg de dieta)	<i>P. japonicus</i> (mg/kg de dieta)	<i>C. quadricarinatus</i> (mg/kg de dieta)
Tiamina	25	60-120	150
Riboflavina	38	80	100
Piridoxina	80	120	50
Ácido Pentanoico	No requerida	No requerida	100
Ácido Nicotínico	50	400	-
Biotina	-	4	1
Ácido Fólico	20	-	20
Vitamina B12	-	-	0.1
Colina	1000	600	400
Inositol	No requerida	2000	300
Vitamina C	120/41	10000	1200
Vitamina A	2600 UI	-	15000 UI
Vitamina D	2000 UI	-	5000 UI
Vitamina E	99	200	400
Vitamina K	No requerida	-	20

4.2.5. Minerales

Existen aproximadamente 20 elementos inorgánicos que realizan funciones esenciales en el organismo (Akiyama y Dominy, 1989; Tacon, 1990). Algunos de ellos son requeridos en cantidades considerables, por lo que se les conoce como macroelementos. Otros se requieren en menor cantidad y son considerados microelementos (Tacon, 1990).

Algunos minerales forman parte del exoesqueleto, participan en el balance de la presión osmótica, en la contracción muscular y en la transmisión del impulso nervioso. También forman parte de enzimas, vitaminas, hormonas y pigmentos, e intervienen en algunos procesos metabólicos. Algunos minerales se requieren en grandes cantidades y se denominan macro-minerales, que incluyen calcio, fósforo, potasio, magnesio, sodio, cloro y azufre.

Los requerimientos cuantitativos de minerales no han sido definidos para *C. quadricarinatus* (Villarreal y Peláez, 1999). Sin embargo, para especies de camarón se tiene definido un nivel recomendado de minerales (Akiyama *et al.*, 1999) (Tabla II).

Se ha sugerido que los moluscos incorporados en la dieta, promueven la maduración de crustáceos debido a que presentan altas concentraciones de microelementos, tales como zinc, cobre y cadmio, necesarios para la activación de múltiples enzimas (Civera, 1993). A medida que la maduración gonádica en crustáceos avanza, las concentraciones de zinc aumentan, mientras que la de

cobre y cadmio disminuyen. En camarones peneidos también se ha visto que la concentración de zinc en el ovario aumenta con el desarrollo gonádico (Méndez *et al.*, 2001).

Tabla II. Nivel recomendado de minerales en alimentos comerciales de camarón (Tomado de Akiyama *et al.*, 1999).

MINERAL	CANTIDAD REQUERIDA (por kg de dieta)
Calcio	2.8 %
Fósforo disponible	0.9 %
Fósforo total	1.8 %
Magnesio	0.2 %
Sodio	0.6 %
Potasio	0.9 %
Hierro	300 ppm
Cobre	25 ppm
Zinc	110 ppm
Manganeso	20 ppm
Selenio	1 ppm
Cobalto	10 ppm

4.2.6. Pigmentos

La mayoría de los crustáceos contienen pigmentos carotenoides en el exoesqueleto, hipodermis, ojos, hemolinfa, hepatopáncreas, ovario y en el huevo (Harrison 1990). En el huevo, se considera que desempeña diversas funciones en

la maduración, reproducción, respiración y en el mejoramiento de la respuesta inmune (Sagi *et al.*, 1996). Estos son depositados en los tejidos en forma de esteroides de astaxantina. Los carotenoides generalmente se encuentran asociados a los lípidos o formando complejos con proteínas de forma no covalente (Palacios, 1999). Hasta la fecha se han identificado más de 500 carotenoides los cuales difieren en el grado de saturación, ciclización, oxidación y números de carbonos que presentan. Se ha propuesto que los carotenoides participan en múltiples funciones, tales como protección solar, pigmentación de la cutícula del embrión, reservas intracelulares de oxígeno (como parece ser el caso en los moluscos), resistencia a altas temperaturas, al amonio e incremento en la resistencia inmunológica (Sagi *et al.*, 1996; Cahu, 1998). En el caso particular de huevos de crustáceos los niveles de carotenoides han cobrado importancia debido a su relación con la producción de vitamina C y E, además en la protección contra la oxidación de lípidos insaturados (Cahu, 1998). Sagi *et al.*, (1996) observaron que el carotenoide de mayor acumulación en el ovario de *Cherax quadricarinatus* es la astaxantina y que, además, existe una correlación entre el contenido de este pigmento en la hemolinfa y el diámetro de los ovocitos formados. Lo que ha sugerido la asociación de éste pigmento con la vitelina y la vitelogenina (Sagi *et al.*, 1996).

A pesar de la importancia de los carotenoides, no ha sido determinada claramente su función. Es evidente su acumulación durante la maduración, la cual es considerada como un reflejo de sus importantes funciones durante la

gonadogénesis, gametogénesis, embriogénesis y durante el desarrollo larval temprano (Sagi *et al.*, 1995; Sagi *et al.*, 1996). Se considera que el enriquecimiento de carotenoides en la dieta de reproductores puede influenciar la calidad de los huevos y la viabilidad y vitalidad del producto eclosionado (Harrison 1990).

Durante la maduración temprana (vitelogénesis primaria) los carotenoides se acumulan en el hepatopáncreas de forma libre y esterificada y durante la vitelogénesis secundaria son transportados en la hemolinfa como lipo-glicocaroteno-proteínas hacia los ovarios e incorporados mediante pinocitosis por los ovocitos para su almacenamiento (Harrison, 1990). El rango de colores que proporcionan los pigmentos varía con cada carotenoide y con el tipo de complejo de glucoproteína o lipoproteína del cual esté formado. La pigmentación que proporcionan a los ovarios es visible y puede ser usado inclusive como un indicador de su grado de maduración (Sagi *et al.*, 1995; Sagi *et al.*, 1996).

4.2.7. Energía

Los crustáceos se alimentan para satisfacer sus requerimientos energéticos para el crecimiento, actividad muscular y reproducción (Villarreal, 1987). Sin embargo, el exceso o insuficiencia en los niveles de energía en la dieta reduce la tasa de crecimiento o el desarrollo de la gónada. Por ello, el balance entre proteína y energía en la dieta debe ser mantenido (New, 1987).

El proceso biológico de utilización de energía es definido como metabolismo. La velocidad a la que la energía es utilizada es llamada tasa metabólica, la cual está influenciada por factores como temperatura del agua, especie, edad, talla, actividad reproductiva, condición física, concentración de oxígeno y CO₂, salinidad y pH (Akiyama y Dominy, 1989; Villarreal *et al.*, 1999).

Es importante entender que la energía no es un nutriente sino el resultado del desdoblamiento metabólico de compuestos alimenticios como lo son las proteínas, las grasas y los carbohidratos. Las proteínas, las grasas y los carbohidratos en la dieta presentan características energéticas capaces de proveer de calorías a los animales para desarrollar sus funciones fisiológicas (García-Ulloa, 2000).

El proceso de la reproducción, desarrollo embrionario y larvario, en organismos acuáticos requiere de una gran cantidad de energía, la cual se deriva del desdoblamiento de los compuestos alimenticios (García-Ulloa, 2000).

5. Parámetros de calidad en huevos y juvenil.

Actualmente el aprovisionamiento de huevos y/o larvas en cantidades suficientes y calidad aceptables representa uno de los principales “cuellos de botella” en la producción de organismos acuáticos bajo condiciones controladas (García-Ulloa, 2000).

Existe una amplia diversidad de criterios de calidad del huevo, que son utilizados en forma indiscriminada para las diferentes especies. Algunos de los parámetros que se han empleado como estimadores de calidad son: el tamaño del huevo, la fertilización, la transparencia, el contenido energético, el contenido de enzimas, el volumen del huevo, el contenido de vitaminas, el peso seco y la morfología larval, entre otros (De Caluwé, 1995). Estos criterios han sido comúnmente extrapolados de manera ínter específica, creando una confusión al momento de interpretar los resultados, por lo que es importante la caracterización y determinación de criterios específicos para cada especie.

Por ejemplo, la condición fisiológica de los huevos, se refiere a su composición proximal, la cual tiene una relación directa con la nutrición de los reproductores y con la mayoría de los parámetros antes mencionados. Como lo apunta Lall (1995), “el balance nutricional en la dieta de los organismos acuáticos es un importante factor para evaluar la calidad de la progenie”, lo cual puede ser aplicado no solo en los animales que se encuentran en proceso de engorda, sino también a los reproductores y al huevo. El contenido energético de una dieta para reproductores debe contemplar no solo el gasto metabólico que se requiere para el mantenimiento de las funciones básicas del organismo, sino además debe cubrir la fuerte demanda energética que el proceso reproductivo y la transferencia de reservas implica. Kamler (1992) reconoce y describe detalladamente tres etapas alimenticias a partir del mantenimiento de los reproductores: endógena,

que comprende la transferencia de energía y nutrientes de la hembra al huevo (iniciando con la dieta en maduración sexual y finalizando hasta que la larva o embrión absorbe la mayor parte del vitelo); mixta, que incluye la etapa en que la larva aun conteniendo algo de vitelo, comienza ya a ingerir alimento externo como rotíferos, microalgas, entre otros, y exógena, en el que la larva se alimenta exclusivamente de microorganismos hasta que es “destetado” e ingiere alimento balanceado o peletizado principalmente.

La calidad del huevo de tipo lecitotrófico, como el que presenta *C. quadricarinatus*, es de gran importancia, puesto que su desarrollo depende de las reservas químicas transferidas hacia el embrión por la madre; de ahí que huevos con alta cantidad de reservas metabólicas y alta capacidad de transformar dicha energía cuenten con mayores probabilidades de pasar a estadios posteriores y sobrevivir a condiciones no óptimas (Racotta *et al.*, 2003). Racotta *et al.*, (2003) y García-Guerrero *et al.*, (2003a) entre otros, consideran que la cuantificación del nivel inicial de reservas en el huevo pueden determinar en gran medida la calidad larval posterior; es decir que consideran a la composición química del huevo (proteínas, lípidos, carbohidratos) como un criterio predictivo de calidad de la progenie.

5.1. Pruebas de estrés

Algunos autores han desarrollado criterios que permitieran dilucidar la condición de los juveniles y/o larvas, a menudo referida esta como “calidad”.

Dichas evaluaciones son conocidas como pruebas de resistencia o estrés (Racotta *et al.*, 2003). Estas son usadas como un criterio de control de calidad en los laboratorios de producción de juveniles y/o larvas (Álvarez *et al.*, 2004). Tales pruebas consisten en someter a los juveniles y/o larvas a cambios bruscos de algún factor ambiental como salinidad, cambios en la temperatura del agua o bien a factores que han sido propuestos recientemente como bajas concentraciones de oxígeno o exposiciones a amonio (Ibarra *et al.*, 1998), altas concentraciones de amonio (Cavalli *et al.*, 1999; Cavalli *et al.*, 2000), entre otros.

Las pruebas de estrés salino consisten en someter a los juveniles a un cambio abrupto en la concentración de sal durante cierto periodo (Cavalli *et al.*, 2000). La supervivencia a la prueba de estrés de salinidad se basa principalmente en la capacidad osmorreguladora de los organismos, y esto depende a su vez del grado de desarrollo de la postlarva, por lo que es una forma de evaluar la condición fisiológica (Austin, 1995; Charmantier *et al.*, 1998; Racotta *et al.*, 2004; Palacios *et al.*, 2004). *C. quadricarinatus* pueden sobrevivir y desarrollarse durante periodos largos en aguas con salinidades de alrededor de 12 a 14 UPS (Villarreal y Peláez, 1999). Por lo que, al realizar las pruebas de estrés se debe considerar su intervalo de tolerancia.

Por otro lado, pruebas agudas de toxicidad al amonio han sido desarrolladas para estimar la tolerancia de organismos acuáticos. El amonio es el principal producto final del metabolismo de proteínas, siendo la forma de excreción

nitrogenada y una de las sustancias tóxicas más comunes en los sistemas de cultivo (Chen y Kou, 1992, Hernández, 2001). El amonio es un componente que al estar en grandes cantidades en el medio, se diluye o es absorbido por diferentes tejidos provocando un incremento en el pH de la sangre y un desequilibrio en las reacciones enzimáticas del organismo, como es la inhibición del transporte del sodio. Además, este compuesto provoca daños en los epitelios branquiales y reduciendo la capacidad del organismo de captación del oxígeno y transporte del mismo provocando su muerte (Armstrong *et al.*, 1978). Para la realización de dichas pruebas, es necesario calcular la dosis considerada letal para un 50% de la población (LC₅₀), esto durante un periodo de 24 h (Jayasankar y Muthu, 1983).

Otra prueba que recientemente se ha usado, es el someter al organismo a un medio donde la concentración de oxígeno en el agua es baja (hipoxia). Esto se puede realizar burbujeando nitrógeno u algún otro gas inerte en el agua (durante 20 minutos). Después de haber sometido a los organismos a hipoxia, éstos son llevados nuevamente en recipientes con saturación de oxígeno para un periodo de recuperación, y evaluar la supervivencia de los organismos (Ibarra *et al.* 1998)

La calidad en los juveniles es uno de los problemas para el desarrollo de la producción acuícola que generalmente se ve reflejada en los organismos que se destinan para engorda (Bromage *et al.*, 1991) y, en algunos casos, como un factor para determinar si una especie puede ser potencialmente considerada para cultivo (Fernández-Palacios *et al.*, 1994).

Siendo la langosta de agua de dulce *C. quadricarinatus* un organismo que presenta un ciclo de vida simple y un alto potencial de desarrollo en la acuicultura, es conveniente buscar la optimización en todas las etapas de cultivo, primordialmente para la obtención de juveniles en cantidades suficientes y calidad aceptable. La definición de los requerimientos nutricionales de los reproductores, es uno de los pasos para estandarizar criterios óptimos para la reproducción de esta especie.

HIPÓTESIS

Se plantean dos hipótesis:

1) La dinámica de la síntesis, almacenamiento y utilización de nutrientes durante el desarrollo gonadal de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* es similar a especies de decápodos como *M. rosenbergii* y *Litopenaeus sp.* Consecuentemente, el índice gonadosomático (IGS), siendo una variable comúnmente usada para determinar el grado de desarrollo de la gónada, presentará una correlación con los indicadores químicos, histoquímicos e histológicos utilizados, lo cual contribuirá a establecer el momento ideal para introducir a los machos y mejorar la eficiencia del número de desoves.

2) Los requerimientos nutricionales de los organismos son similares durante la maduración y etapas no reproductivas. Esto quiere decir que una vez que se alcanza la madurez reproductiva, los nutrientes se canalizan de manera principal a la reproducción. Esto se reflejará en la acumulación de nutrientes en la gónada, lo cual puede ser medido con el IGS, número de desoves y fecundidad. Por otro lado, especies lecitotróficas buscan garantizar la calidad de la progenie usando diferentes fuentes de nutrientes para desarrollar la gónada, y desovando sólo después de que la composición química del huevo (proteínas, lípidos, carbohidratos y vitelina) sea uniforme. Por ello, se propone que *C. quadricarinatus* deberá ser capaz de mantener la composición química de la gónada independientemente de la composición de la dieta. Sin embargo, valores similares

a nivel macromolecular (proteínas, lípidos, carbohidratos y vitelina), no necesariamente reflejará un balance de compuestos esenciales. Sino que, estas limitaciones deberán ser traducidas en diferencias en la calidad del huevo y del juvenil, lo cual se reflejarán en parámetros como número de desoves, fecundidad, tamaño y peso del huevo, número de juveniles y respuesta a la prueba de estrés de los juveniles producidos. De los resultados obtenidos se podrá estimar el nivel óptimo de proteína y lípidos en la dieta para eficientizar el proceso reproductivo de *C. quadricarinatus*.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Definir el proceso de acumulación de nutrientes durante el desarrollo gonadal y los efectos de los niveles de proteínas y lípidos incluidos en dietas para la maduración de reproductoras de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*, con relación con la calidad del huevo y juvenil.

2. Objetivos específicos

- Describir el desarrollo gonadal de hembras de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* bajo condiciones controladas de cautiverio.

- Determinar la calidad del huevo obtenido de hembras de *Cherax quadricarinatus* alimentadas con dietas con diferente nivel de inclusión de proteínas y lípidos, utilizando indicadores químicos y morfológicos.
- Definir cambios en el contenido de vitelina en el huevo, mediante la variación de niveles de inclusión de proteínas y lípidos en la dieta de hembras reproductoras.
- Determinar la calidad de los juveniles de *Cherax quadricarinatus* con relación a la variación en el nivel de proteínas y lípidos incluidos en dieta para hembras reproductoras, utilizando indicadores químicos, morfológicos y fisiológicos.
- Evaluar el efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en variaciones en la respuesta a pruebas de estrés de juveniles de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.
- Definir la relación proteína / lípidos que produzca una mejor calidad del huevo y juvenil.

MATERIALES Y METODOS

1. Organismos experimentales

Las hembras de *C. quadricarinatus* (25.0 ± 4 g y 15.0 ± 3 g) utilizadas en el presente trabajo, fueron obtenidas a partir de la población de reproductores que posee el CIBNOR. La primera talla utilizada corresponde a la reportada por Naranjo (1999), para el cultivo monosexual de esta especie. En algunos ensayos se utilizaron organismos más pequeños debido a que se buscó garantizar que los organismos estuvieran en fase de primera madurez (King, 1993; Villarreal y Peláez, 1999).

2. Diseño, formulación y fabricación de alimentos experimentales

En el presente estudio se elaboraron dietas experimentales compuestas, formuladas con el paquete MIXIT-Win y fabricadas según el método descrito por Civera-Cerecedo (1989). Tanto los ingredientes como las dietas elaboradas fueron analizadas para conocer su composición proximal y contenido energético (AOAC, 1995; ver sección 7).

De acuerdo al tratamiento experimental, las dietas tuvieron una composición específica. Los ingredientes utilizados fueron: harina de pescado (sardina), harina de calamar, pasta de soya, harina de trigo, harina de sorgo,

aceite de pescado, lecitina de soya, grenetina, premezcla de minerales CIB'93 (Civera *et al.*, 1996), premezcla de vitaminas Conklin '98 (Civera *et al.*, 1996), ácido ascórbico (Star C), cloruro de colina (62%) y carbonato de calcio. Los macroingredientes utilizados fueron molidos y tamizados a 500 μm , previo a la elaboración de las dietas, para que la mezcla fuera homogénea. Cada dieta fue preparada mezclando primeramente los macroingredientes en una batidora industrial (Thunderbird ®, Berlín, Alemania) hasta obtener un homogenizado (Fig. 3).



Figura 3. Batidora industrial utilizada para la mezcla de los ingredientes

Los microingredientes como las premezclas de vitaminas y minerales, cloruro de colina y carbonato de calcio, se mezclaron en un recipiente plástico,

antes de ser adicionado a los macroingredientes. El aceite de pescado y la lecitina de soya se homogenizaron hasta obtener una emulsión antes de ser incorporados a la mezcla. Utilizando una batidora y agregando agua en una proporción de 30% del peso de los ingredientes. El alimento se pasó por un molino de carne (Tor-Rey®, Monterrey, N. L., México), utilizado un dado con orificio de 2 mm (Fig. 4).



Figura 4. Molino de carne utilizado para la elaboración del alimento peletizado.

3. Unidades experimentales.

Se utilizaron cuatro módulos experimentales para la realización de las evaluaciones experimentales.

Modulo A.

La figura 5A muestra el sistema de 24 tanques de fibra de vidrio de 1,500 L (2 x 1 x 0.75 m) cada uno. El fotoperíodo fue controlado mediante relojes automáticos, manteniendo 14h luz y 10h oscuridad. La temperatura se mantuvo constante ($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$) con dos calentadores de 300 W (Aquarium Pharmaceuticals, Inc. Paris, Francia), en cada tanque. El oxígeno disuelto fue superior a 4 mg/L, por medio de un difusor de aire conectado a un soplador de 5 HP (Sweetwater®, Apopka, FL, EUA) a través de piedras de sílice. Cada unidad experimental contaba con escondrijos consistentes en 2 racimos de 5 lienzos de malla de nylon de 0.7 m x 1 m y 40 tubos de PVC de 7 cm de diámetro x 24 cm de largo, distribuidos al azar en el fondo, con el fin de reducir el estrés y canibalismo.

Modulo B.

El sistema consistió de 48 acuarios de fibra de vidrio (0.70 x 0.40 x 0.38 m) de 80 L cada uno. La temperatura se mantuvo constante ($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$) mediante un calentador de 100 W (Aquarium Pharmaceuticals, Inc. Paris, Francia) en cada acuario. El oxígeno disuelto se mantuvo por encima de 4 mg/L, mediante piedras de sílice conectadas a un soplador de 5 HP (Sweetwater®, Apopka, FL, EUA). Cada acuario contaba con escondrijos (2 lienzos de malla de nylon de 30 cm x 30 cm y 2 tubos de PVC de 4 cm de diámetro x 24 cm de largo) (Figura 5 B).



Figura 5. Sistemas utilizados para la realización de las evaluaciones experimentales. Módulo A con 24 unidades de 1500L (A). Módulo B con 48 acuarios de 80L (B). Fotografías del interior de las unidades experimental del Módulo A (c) y B (d), las cuales contenía escondrijos.

Modulo C.

Sistema de 12 tanques circulares de fibra de vidrio de 1,000 L (2 m diámetro x 1 m de altura) cada uno. La temperatura se mantuvo constante ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) con dos calentadores de 300 W (Aquarium Pharmaceuticals, Inc. Paris, Francia) en cada tanque. El oxígeno disuelto fue superior a 4 mg/L, al utilizar difusión de aire proveniente de un soplador de 5 HP (Sweetwater®, Apopka, FL, EUA) a través de piedras de sílice.

Cada tanque contaba con escondrijos (2 racimos de 5 lienzos de malla de nylon de 0.7 m x 1 m y 40 tubos de PVC de 7 cm de diámetro x 24 cm de largo) distribuidos al azar en el fondo (Fig. 6 A).

Modulo D.

El sistema consistió de 100 recipientes de plástico de 250mL cada uno, los cuales fueron colocados dentro de jvas de plástico (60X40X12 cm), con 15 cm de agua. La temperatura se mantuvo constante ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) con un calentador de 100 W (Aquarium Pharmaceuticals, Inc. Paris, Francia) (Fig. 6 B).



Figura 6. Sistemas utilizados para la realización de las evaluaciones experimentales. Módulo C con 12 unidades de 1000L (A). Módulo D con 100 unidades de 0.25 L.

4. Desarrollo gonadal de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

4.1. Desarrollo y composición química de la gónada de hembras de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, en relación al índice gonadosomático.

Previo al inicio del experimento, se realizó una inspección visual, para evitar la selección de organismos heridos o enfermos. Ello permitió recolectar 180 hembras saludables, las cuales se midieron y pesaron (78 ± 6.2 mm y 25.5 ± 3.8 g respectivamente), para posteriormente ser marcadas individualmente con tinta permanente (Paper Mate ®) y transferidos al módulo A, donde fueron mantenidas durante 70 días. Durante este período, los organismos se alimentaron con una dieta experimental con 33% proteína cruda y 8% lípidos, y una proporción de proteína y energía (P/E) de 17.16 mg/kJ, siguiendo el criterio de Rodríguez-González (2001) para el desarrollo óptimo de la gónada.

Durante este periodo, cinco hembras fueron colectadas al azar de cada tanque cada 15 días, y se registró el peso y la longitud. Posteriormente, las hembras se disectaron para extraer la gónada y el hepatopáncreas, los cuales se pesaron para calcular dos índices:

- (1) Índice Gonadosomático (IGS) = peso de la gónada/peso del organismo $\times 100$ (McRae y Mitchell, 1995; Sagi et al., 1996),
- (2) Índice Hepatosomático (IHS) = peso del hepatopáncreas/peso del organismo $\times 100$ (McRae y Mitchell, 1995).

Se tomó una muestra de gónada y se realizó el análisis histológico e histoquímico, evaluando la talla de los ovocitos y núcleo en diferentes etapas de desarrollo, así como cambios cuantitativos en la composición de lípidos y carbohidratos (Rodríguez-Jaramillo, 2004; ver sección 7). Para este propósito, el área de 30 ovocitos de cada tipo, fue delineada con el ratón de la computadora, la cual permite que el software (Image Pro Plus ® Vers 4.5., Maryland, EUA) calcule su diámetro, área y volumen automáticamente. Posteriormente para determinar la suma del área teñida con relación al área total del citoplasma del ovocito, se calcularon dos índices como los indicadores de calidad de los ovocitos:

$$(3) \text{ Índice de lípidos (IL) = Área de lípidos/ área del citoplasma x 100}$$

$$(4) \text{ Índice de carbohidratos (IC) = Área de carbohidratos/ área del citoplasma x 100.}$$

Además, para evaluar la dinámica de desarrollo de la gónada, los ovocitos fueron clasificados según su fase de vitelogénesis de acuerdo a los esquemas propuestos por Tan Fermin y Pudadera (1989) para camarón, y Abdu *et al.*, (2000) para esta especie: previtelogénicos (ovocitos pequeños e inmaduros con un núcleo localizado en el centro, el cual contiene cromatina basófila y una membrana celular definida), vitelogénico primario (aparición de gotas de vitelo en el citoplasma), vitelogénico secundario (abundantes gotas de vitelo en el citoplasma) y postvitelogénico (ovocitos totalmente crecidos y maduros con un núcleo irregular). Se analizaron cambios en la frecuencia y talla de cada tipo de ovocito en cada muestra. Estos datos se correlacionaron con los valores del IGS.

Se extrajeron muestras adicionales de gónada y hepatopáncreas, y se determinó su composición química (proteínas, lípidos y carbohidratos; ver sección 7). Los parámetros químicos obtenidos se correlacionaron con las variaciones en los valores IGS.

5. Calidad del huevo de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

5.1. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en la composición bioquímica y talla del huevo de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Hembras de 25.0 ± 4 g fueron colocadas en el módulo A, a una densidad de 40 organismos por tanque (11 org/m^2). Los machos fueron colocados en el módulo C, bajo las mismas condiciones que las hembras. Después de 7 días de acondicionamiento, los organismos fueron pesados y marcados en el caparazón, con tinta indeleble (Paper Mate ®). Doce dietas con diferente nivel de proteína cruda (22, 27, 32 y 37%) y lípidos (4, 8 y 12%), fueron utilizadas durante esta fase experimental. Las dietas fueron analizadas, por triplicado, para determinar su composición proximal y contenido energético (Tabla III y IV).

Tabla III. Fórmulas de las dietas experimentales (g/kg) para reproductores con cuatro niveles de proteína (22, 27, 32 y 37% PC) y tres niveles de lípidos (4, 8 y 12% LIP) que se utilizaron en la evaluación de la calidad de huevos y juveniles de *C. quadricarinatus*.

Ingrediente	22% PC			27% PC			32% PC			37% PC		
	4% LIP	8% LIP	12% LIP	4% LIP	8% LIP	12% LIP	4% LIP	8% LIP	12% LIP	4% LIP	8% LIP	12% LIP
Harina de pescado	38.23	45.81	53.47	121.28	129.26	137.31	204.95	213.32	221.78	289.23	298.01	221.78
Harina de sorgo	476.78	429.24	381.25	393.95	345.84	297.30	310.48	261.82	212.73	226.38	177.17	212.73
Aceite de sardina	12.18	32.19	52.38	12.10	32.15	52.40	11.98	32.10	52.40	11.90	32.10	52.40
Lecitina de soya	12.17	32.15	52.30	12.06	32.15	52.38	11.99	32.16	52.49	11.88	32.11	52.49
H. Trigo Integral	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00
Harina de Calamar	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Pasta de Soya	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00	150.00
Grenetina	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
Premezcla de Min ¹	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Premezcla de Vit ²	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamina C	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Cloruro de Colina	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Carbonato de Calcio	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

¹ Premezcla de minerales (g/kg de alimento): Cloruro de potasio (KCl) 0.5, Sulfato de magnesio (MgSO₄.7H₂O) 0.5, Sulfato de zinc (ZnSO₄.7H₂O) 0.09, Cloruro de manganeso (MnCl₂.4H₂O) 0.0234, Sulfato cúprico (CuSO₄.5H₂O) 0.005, Ioduro de potasio (KI) 0.005, Cloruro de cobalto (CoCl₂.2H₂O) 0.0025, Fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄) 2.37.

² Premezcla de vitaminas (excepto donde las unidades se indican, los valores son en mg/kg): Vitamina A Acetato (Retinol) 5000 UI, Vitamina D₃ (Colecalciferol) 4000 UI, Vitamina E (Tocoferol) 100, Vitamina K, Menadiona 5, Tiamina (B₁) 60, Riboflavina (B₂) 25, Piridoxina (B₆) 50, Ac. DL-Pantoténico 75, Niacina (ácido nicotínico) 40, Biotina 1, Inosito 400I, Cianocobalamina (B₁₂) 0.2, Ac. fólico 10, vehículo (celulosa).

Tabla IV. Análisis proximal de las doce dietas utilizadas en la evaluación de la calidad de huevos y juveniles de *C. quadricarinatus*.

	22% PC			27% PC			32% PC			37% PC		
	4% LIP	8% LIP	12% LIP	4% LIP	8% LIP	12% LIP	4% LIP	8% LIP	12% LIP	4% LIP	8% LIP	12% LIP
Proteínas	22.47±0.17	22.62±0.14	22.85±0.18	27.19±0.20	27.65±0.08	28.01±0.16	32.19±0.34	32.38±0.29	32.19±0.17	36.52±0.32	37.18±0.09	37.35±0.08
Extracto etéreo	3.69±0.12	7.37±0.2	11.51±0.15	4.06±0.06	8.03±0.03	11.74±0.08	4.05±0.03	7.73±0.03	11.92±0.11	4.21±0.10	8.21±0.02	12.08±0.03
Cenizas	6.35±0.05	6.51±0.02	6.49±0.03	7.44±0.05	7.33±0.01	7.31±0.54	8.54±0.06	8.71±0.22	8.84±0.08	9.84±0.03	10.00±0.03	7.99±0.01
Fibra	-	-	-	1.23±0.07	0.96±0.03	0.90±0.02	0.59±0.03	0.28±0.01	0.30±0.05	0.62±0.07	0.42±0.01	0.38±0.03
E.L.N. ¹	67.49	63.5	59.15	60.08	56.03	52.04	54.63	50.89	46.75	48.81	44.19	42.24
Energía (kJ/g)	19.54±0.06	20.45±0.05	21.44±0.02	19.25±0.03	20.19±0.08	21.00±0.07	19.71±0.01	20.74±0.1	21.73±0.07	20.57±0.1	21.61±0.1	22.17±0.1
P/E (mg/kJ)	11.49	11.05	10.65	14.11	13.69	13.33	16.32	15.61	14.80	17.74	17.20	16.84

¹ Calculado por diferencia: E.L.N. = 100 - (% Proteínas + % Lípidos + %F. Cruda, + %Cenizas)

La alimentación fue a saciedad, dosificada el alimento en dos raciones al día (10:00 y 17:30 h). Cada dos días se retiró el exceso de alimento y las heces fecales, mediante el cambio del 40-50% del volumen total del agua.

A fin de propiciar la cópula, después de 45 días de alimentación, se colocaron machos azarosamente en los tanques donde se encontraban las hembras en una relación 3 H : 1 M.

Cada dos días se registró el número de hembras grávidas (Fig. 7) en cada estanque. Las hembras se pesaron (0.01 g), midieron (0.01 mm), y se despegaron 20 huevos con pinzas de disección (García-Guerrero *et al.*, 2003a). De los huevos recolectados se registraron los siguientes parámetros:

- Peso húmedo y seco (g),
- Volumen (m^3), área (m^2), diámetro mayor y menor (mm). Los huevos fueron despegados de la hembra, y colocados en un recipiente de vidrio para tomarles una foto con un microscopio estereoscópico con ocular con objetivo de 0.64X (Leica ® MZ16, Wetzlar, Alemania) y una cámara digital (Olympus®, DP11, New York, EUA). Las imágenes resultantes fueron procesadas mediante el programa Image Pro ® (vers. 4.5), en una computadora Dell (Pentium 4) mediante la delineación del contorno de los huevos con el ratón de la

computadora, permitiendo obtener los valores antes mencionados de manera automática (Fig. 8).

- Composición química (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y energía; ver sección 7).



Figura 7. Hembra grávida de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*

La fecundidad se determinó mediante la extracción de la masa ovigera con una espátula, tratando de que el animal no perdiera sus periópodos y/o fuera lastimado. Posteriormente se realizó un conteo total de los huevos (Rodríguez-González, 1998).

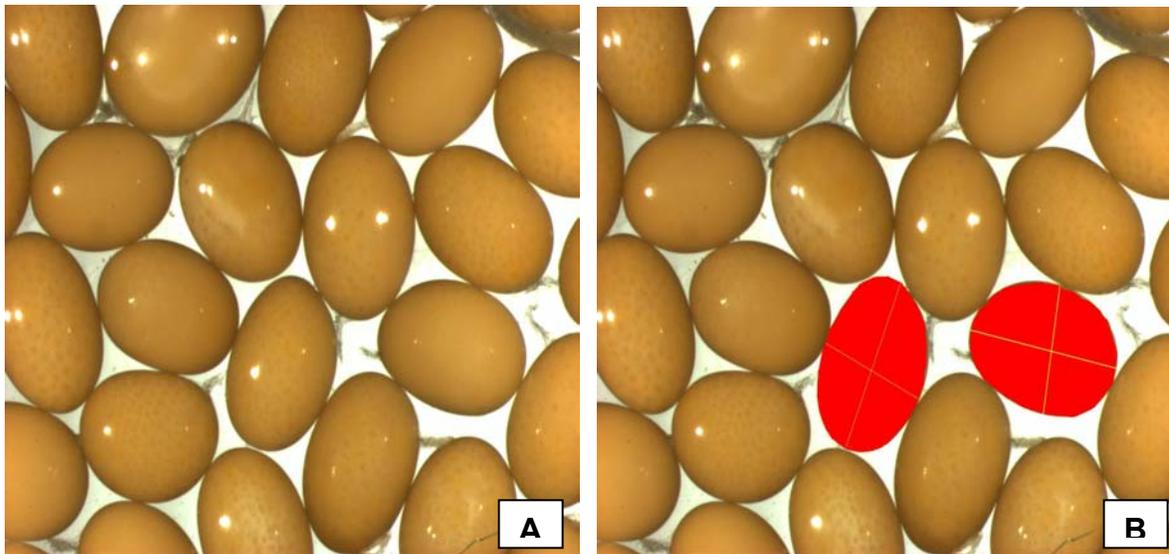


Figura 8. A) Imagen digitalizada de huevos de *C. quadricarinatus*. B) Medición del volumen, área, diámetro mayor y menor del huevo utilizando el programa Image Pro ® 4.5, con un microscopio estereoscópico (0.65x).

5.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta para hembras reproductoras de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* en la composición química del músculo y hepatopáncreas y el contenido de vitelina en el huevo

Ochocientos cuarenta hembras y doscientos ochenta machos (15.0 ± 3 g) fueron seleccionados, verificando su condición de salud (ninguna herida o parasito externo) antes de su introducción al modulo A, a una densidad de 40 organismos por tanque (11 org/m^2). El recambio de agua se realizó cada dos días, mediante el cambio del 40-50% del volumen total del agua. La alimentación fue a saciedad, dosificada en dos raciones al día (10:00 y 17:30 h).

Ocho dietas con diferente nivel de proteína cruda (18, 25, 31 y 37%), lípidos (3 y 7%) y relación proteína y energía (P/E; 10, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 24 mg/kJ; Tabla V).

Después de 15 días de alimentación, se colocaron machos en los tanque de hembras para establecer una relación 3 H:1 M, durante 55 días. Cada dos días se registró el número de hembras grávidas de cada tratamiento, para determinar el porcentaje de desoves.

10 hembras grávidas fueron seleccionadas al azar y pesadas (g), para posteriormente tomar 20 huevos cuidadosamente con pinzas de disección, con el fin de evaluar el contenido de vitelina en estos (Serrano-Pinto *et al.*, 2003; ver sección 7).

Además, para determinar la composición química (proteínas, lípidos, carbohidratos) y contenido de energía (ver sección 7) del músculo y hepatopancreas, cinco hembras por tratamiento fueron sacrificadas después de la obtención de los huevos.

Tabla V. Formulas de las dietas experimentales (g/kg) para reproductores con cuatro niveles de proteína (18, 25, 31 y 37% CP) y dos niveles de lípidos (3 y 7% LIP) que se utilizaron en la evaluación de la calidad de huevos y juveniles de *C. quadricarinatus*

Ingrediente	18% PC		25% PC		31% PC		37% PC	
	3% LIP	7% LIP	3% LIP	7% LIP	3% LIP	7% LIP	3% LIP	7% LIP
Harina de Pescado	35.80	40.10	118.60	123.70	181.10	186.80	243.80	249.40
Pasta de Soya	35.80	40.00	118.00	124.00	181.10	186.50	244.00	250.00
Harina de Sorgo	742.10	693.70	574.00	522.70	445.90	394.60	317.90	266.10
Harina de Trigo Integral	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Aceite de sardina	2.70	22.80	4.40	24.50	5.60	24.80	6.90	26.90
Lecitina de Soya	2.80	22.80	4.40	24.40	5.60	26.50	6.70	26.90
Grenetina	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
Premezcla de minerales ¹	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Premezcla de vitaminas ²	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamina C	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Cloruro de Colina	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Carbonato de Calcio	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Composición proximal								
Proteínas	17.68±0.12	17.72±0.09	25.34±0.03	24.66±0.7	31.11±0.07	30.66±0.01	36.7±0.20	38.06±0.06
Extracto etéreo	3.44±0.41	6.83±2.9	2.81±0.22	6.11±1.1	2.64±0.40	6.78±0.16	3.06±0.06	6.55±0.06
Fibra cruda	1.49±0.01	1.35±0.05	1.33±0.02	1.47±0.01	1.5±0.01	1.5±0.03	1.31±0.01	1.51±0.03
Cenizas	5.03±0.02	6.87±0.16	6.2±0.01	6.39±0.22	7.18±0.05	7.22±0.05	7.89±0.09	8.05±0.03
E. L. N. ³	73.36	67.23	64.32	61.37	57.57	53.84	51.04	45.83
Energía (kJ/g)	16.22±0.03	16.95±0.03	16.09±0.03	16.76±0.02	16.08±0.02	17.25±0.03	15.8±0.02	17.48±0.03
P/E (mg/kJ)	10.9	10.4	15.8	14.7	19.3	17.8	23.2	21.8

¹ Premezcla de minerales (g/kg de alimento): Cloruro de potasio (KCl) 0.5, Sulfato de magnesio (MgSO₄.7H₂O) 0.5, Sulfato de zinc (ZnSO₄.7H₂O) 0.09, Cloruro de manganeso (MnCl₂.4H₂O) 0.0234, Sulfato cúprico (CuSO₄.5H₂O) 0.005, Ioduro de potasio (KI) 0.005, Cloruro de cobalto (CoCl₂.2H₂O) 0.0025, Fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄) 2.37.

² Premezcla de vitaminas (excepto donde lãs unidades se indican, los valores son em mg/kg): Vitamina A Acetato (Retinol) 5000 UI, Vitamina D₃ (Colecalciferol) 4000 UI, Vitamina E (Tocoferol) 100, Vitamina K, Menadiona 5, Tiamina (B₁) 60, Riboflavina (B₂) 25, Piridoxina (B₆) 50, Ac. DL-Pantoténico 75, Niacina (ácido nicotínico) 40, Biotina 1, Inosito 400I, Cianocobalamina (B₁₂) 0.2, Ac. fólico 10, vehiculo (celulosa).

³ Calculado por diferencia: E.L.N. = 100 - (% Proteínas + % Lípidos + %F. Cruda, + %Cenizas)

6. Calidad de juvenil de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

6.1. Efecto del nivel de proteína y lípidos de la dieta en la composición química, peso y longitud del juvenil de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Para determinar la variación en la calidad del juvenil, 12 dietas experimentales (Tabla III) con diferente nivel de proteína (22, 27, 32 y 37%) y lípidos (4, 8 y 12%), se evaluaron por duplicado en el módulo A, con una densidad de 40 organismos de 25.0 ± 4 g por tanque (11 org./m^2),

Se colocaron los machos en los tanques de las hembras para establecer una relación 3 H : 1 M, y obtener hembras grávidas, después de 45 días de alimentación. Seis hembras grávidas de cada réplica fueron seleccionadas al azar y colocadas en el modulo B. La densidad de siembra fue de 3 organismos por cada acuario, en donde permanecieron durante el desarrollo embrionario hasta la eclosión y liberación de los juveniles. La alimentación en todas las fases, fue a saciedad, dosificada en dos raciones al día (10:00 y 17:30 h). Cada dos días se retiro el exceso de alimento y las heces fecales.

Después de la eclosión, se evaluó una muestra de 60 juveniles obtenidos al azar de cada hembra, para registrar los siguientes parámetros: pesos húmedo y seco, longitud, composición química (niveles de proteínas, carbohidratos, lípidos) y contenido de energía (ver sección 7).

La longitud del juvenil se midió de la base al rostrum al telson, con ayuda de un microscopio estereoscópico (0.64X; Leica®, Wetzlar, Alemania) a 0.64 X y una cámara digital (Olympus®, DP11, New York, EUA). Los juveniles fueron fotografiados y analizados digitalmente con el software Image Pro (vers. 4.5). Para ello se midió, mediante el trazo de vectores alrededor del contorno de los juveniles con el ratón de la computadora, permitiendo obtener la longitud total de los organismos (Fig. 9).

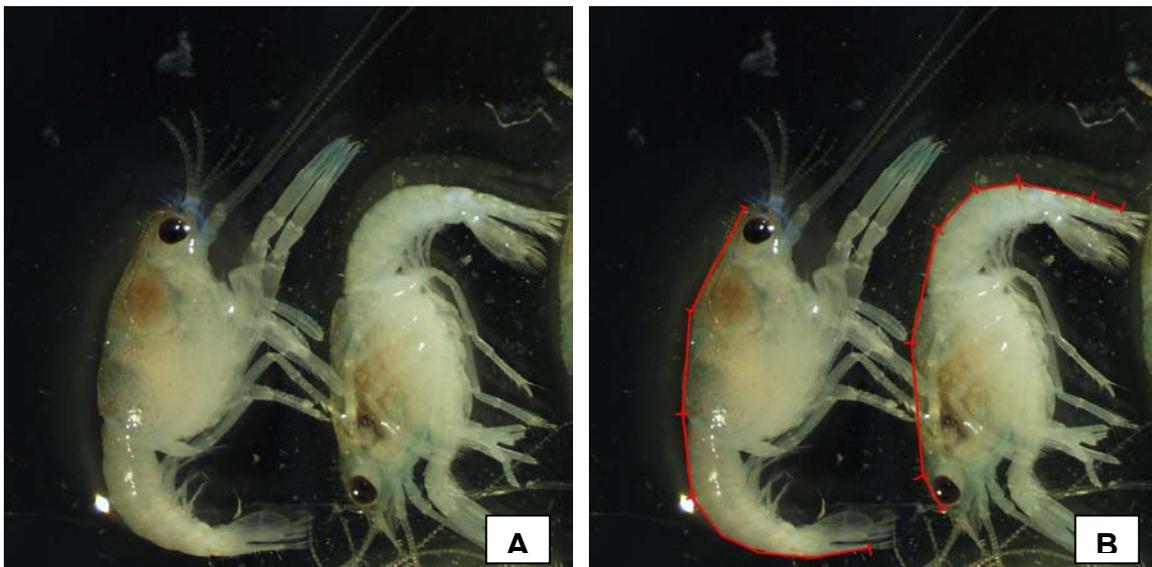


Figura 9. A) Imagen digitalizada de juveniles de *C. quadricarinatus*. B) Medición del longitud mediante el programa Image Pro® vers. 4.5 (0.65x).

6.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en indicadores fisiológicos del juvenil de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

6.2.1. Determinación de LT_{50} y LC_{50} para amonio total, salinidad e hipoxia, en juveniles de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Para la determinación de LT_{50} y LC_{50} de amonio total, salinidad e hipoxia, se extrajeron tres hembras ovigeras (25.0 ± 4 g) del stock de reproducción del CIBNOR. Posterior a la eclosión de los organismos se seleccionaron 100 juveniles al azar de cada hembra. Los juveniles utilizados registraron un peso de 0.013 ± 0.0034 g. Para las evaluaciones los organismos se colocaron en recipientes de plástico de 250 mL por triplicado y un grupo control. En cada recipiente se colocaron 10 juveniles y se mantuvo una temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A partir de los datos registrados de mortalidad en las pruebas de estrés, se calculó la LC_{50} para los diferentes concentraciones, con un intervalo de confianza del 95%, mediante un análisis de Probit (Hernández, 2001)

Amonio Total

Se sometió a los juveniles a cuatro concentraciones de amonio total 50, 100, 150 y 200 mg/L por un periodo de 24 hrs. Se realizaron muestreos cada hora para registrar el número de organismos vivos y muertos, excepto para la concentración de 200 mg/L, en donde se realizaron muestreos cada 30 minutos. Las diferentes concentraciones fueron preparadas a partir de una solución base (1000 mg/ml) y se diluyó con agua destilada. La solución base fue preparada con cloruro de amonio (Productos Químicos Monterrey ®). Para corroborar la

concentración de amonio total en el agua se tomó una muestra y se registró el pH. Para la preparación de las diferentes concentraciones se utilizó la siguiente ecuación:

$$(5) \quad C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde C_1 = concentración inicial, V_1 = volumen inicial; C_2 = concentración final y V_2 = volumen final.

Salinidad

Se sometió a los juveniles a cuatro diferentes salinidades (5, 10, 20 y 38 UPS), por un periodo de 24 hrs. Las diferentes concentraciones fueron preparadas con agua de mar filtrada y diluciones con agua destilada. La salinidad se midió con la ayuda de un refractómetro (Lenox ®, Massachussets, EUA). Se realizaron muestreos cada hora para registrar el número de organismos vivos y muertos.

Hipoxia

La eliminación del oxígeno disuelto (<0.1 mg/L) en el agua se realizó mediante la adición de Bisulfito de Sodio (0.15 g/ 500 ml). Los juveniles fueron

expuestos a hipoxia, por un periodo de 1 hr y se realizaron muestreos cada 5 minutos para registrar el número de organismos vivos y muertos.

6.2.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en la respuesta a pruebas de estrés de juveniles de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Se prepararon 8 dietas experimentales con diferentes niveles de proteína (18, 25, 31 y 37%) y lípidos (3 y 7%; Tabla IV), las cuales fueron formuladas de acuerdo a lo expuesto en el inciso 5.2.

Después de 15 días de alimentación, se colocaron los machos en los tanques de las hembras para obtener una relación 3 H:1 M, y propiciar la obtención de hembras grávidas, por un periodo de 55 días. Seis hembras grávidas de cada replica fueron seleccionadas al azar y colocadas en el módulo B. La densidad de siembra fue de un organismo por cada acuario, en donde permanecieron durante el desarrollo embrionario hasta la eclosión y liberación de los juveniles.

Una vez liberados los juveniles, se tomó una muestra al azar de 10 juveniles de cada una de las unidades del módulo experimental (48 muestras en total). Con los juveniles obtenidos, se registraron los siguientes parámetros: pesos húmedo y seco, composición química (niveles de proteínas, lípidos y

carbohidratos), contenido de energía (ver sección 7) y supervivencia a las pruebas de estrés (salinidad, amonio e hipoxia).

Cada una de las pruebas de estrés se llevó a cabo por triplicado utilizando un grupo control con un total de 100 recipientes de plástico de 250 mL (Modulo D). En cada uno de los recipientes se colocaron 10 juveniles para ser expuestos a las diferentes concentraciones de los parámetros a evaluar.

Las concentraciones utilizadas fueron las que presentaron el LC_{50} en un menor tiempo. Sin embargo, se utilizó una concentración menor para disminuir la desviación estándar entre las replicas, para las pruebas de estrés de salinidad y amonio.

La prueba de amonio se realizó a una concentración de 100 mg/L de amonio total por 2.5 h, mientras que para la prueba de salinidad se expusieron los juveniles a 25 UPS por 4 horas. La prueba de hipoxia (<0.1 mg/L) se realizó en el tiempo determinado (40 min; ver sección 6.2.1).

7. Análisis proximales

7.1. Análisis de dietas

Los análisis se realizaron por triplicado, de acuerdo a los siguientes métodos (AOAC, 1995):

- Humedad (determinación por diferencia de peso a 70°C/ 24 hrs),
- Proteína (método de micro-kjeldahl (% N x 6.25)),
- Extracto etéreo (método soxleth),
- Fibra cruda (método de hidrólisis sucesiva (ácido / base)),
- Cenizas (determinación por diferencia de peso, calcinación a 500° C / 24 hrs),
- E.L.N. (calculado por diferencia: 100 - (% Proteínas + % Lípidos + %F. Cruda, + %Cenizas)),
- Energía bruta: con calorímetro adiabático, marca PARR ®.

7.2. Análisis químicos de gónada, hepatopáncreas, músculo, huevos y juveniles

Por otro lado, se realizaron análisis químicos de gónada, hepatopáncreas, huevos y juveniles, de acuerdo a la siguiente metodología:

- Proteínas: a partir del homogeneizado con solución salina al 1.2%, se realizó la digestión de proteínas con NaOH 0.5 N. Se cuantificó las proteínas por el método de Bradford (1976), usando albúmina como estándar, y posteriormente la lectura se realizó a 595 nm de absorbancia con espectrofotómetro (Spectron Genesys ®),
- Carbohidratos: a partir del mismo homogeneizado se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 20% y se centrifugó en frío a 2608g por 10 min. a 4°C. Del sobrenadante resultante se realizó la cuantificación

de carbohidratos totales por el método de antrona (Van Handel, 1967). Se utilizó glucosa como estándar y se realizó la lectura a 620 nm en espectrofotómetro,

- Lípidos: se utilizó una adaptación del método de Barnes y Blastock (1973), en el que una alícuota de homogenizado se mezcló con H_2SO_4 y se incubó a $80^\circ C$ durante 10 min. La solución ácida obtenida se mezcló con el reactivo de fosfovanilina y la absorbancia se midió con un lector de microplacas (Biorad) a 560 nm. Como estándar se utilizó una mezcla de triglicéridos (12 mg/mL) y colesterol (8 mg/mL).

Como resultado de lo anterior, se obtuvieron concentraciones en miligramos por gramo de peso húmedo para cada parámetro evaluado.

7.3. Análisis de vitelina

Para la determinación del contenido de vitelina en los huevos se homogenizaron en un Potter-Elvehjem de vidrio con un amortiguador Tris 0.05 M, 0.1 M NaCl, 5mM EDTA, pH 7.0 (3:1 v/v, amortiguador/tejido) y una solución cocktail inhibidora de proteasas (0.003% SIGMA, St. Louis MO, EUA). El sobrenadante fue colectado y conservado a $-20^\circ C$.

La titulación de los anticuerpos fue determinada mediante la técnica ELISA (Serrano-Pinto *et al.*, 2003). La cual permite mediante la intensidad de la coloración determinar espectrofotométricamente (405 nm; Multiskan Labsystem®), la concentración del antígeno y a su vez la concentración de vitelina (Anexo 1).

8. Análisis histológicos

Para determinar la fase de desarrollo gonadal en hembras se registró la talla de los ovocitos y la frecuencia de los diferentes estadios de desarrollo (Rodríguez-Jaramillo, 2004; Gómez-Robles *et al.*, 2005). Para ello, muestras por triplicado de la gónada se fijaron en solución de Davidson, por 24 hrs; para posteriormente incluirla en parafina, para ser cortada a 5 micras con un micrótomo (LEICA ®, RM2025), y teñida con hematoxilina y eosina (H&E) para histología general, acid-Shiff (PAS) para cuantificar la presencia de carbohidratos y Sudan black para cuantificar lípidos (triglicéridos; Lightner y Bell, 1988; Fig 10).

Las laminillas se examinaron con un microscopio compuesto Olympus BX-41. Las imágenes resultantes se guardaron en una computadora usando una cámara digital Cole-Snap (I-media Cybernetics) y se analizaron con el programa Image Pro ® (vers. 4.5). Posteriormente las imágenes fueron utilizadas para medir el área, diámetro mayor y menor de los ovocitos en desarrollo (Fig. 11)

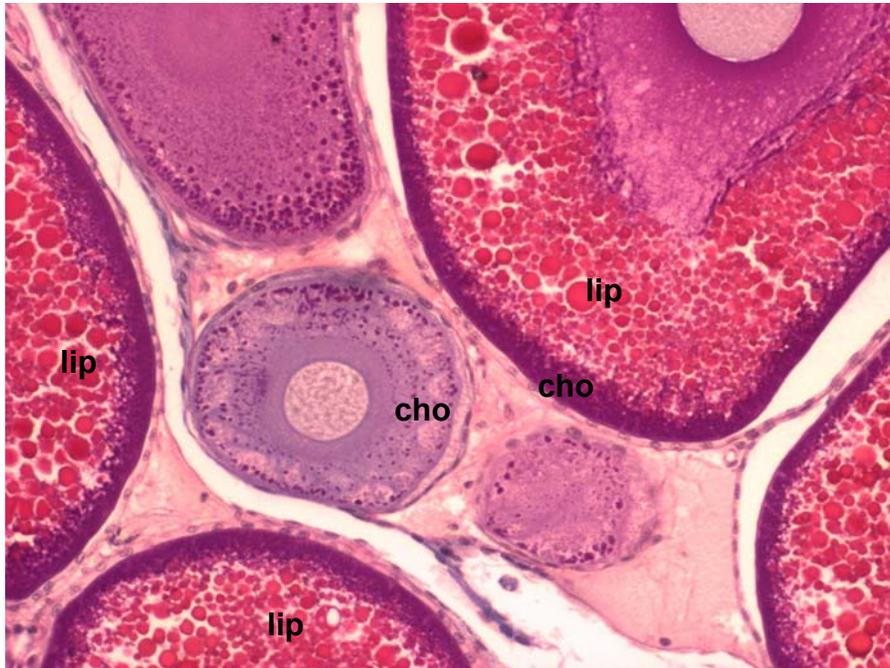


Figura 10. Imagen digitalizada de ovocitos en la gónada de *C. quadricarinatus* teñidos con acid-Shiff (PAS) para cuantificar la presencia de carbohidratos (cho; color magenta) y Sudan black para cuantificar lípidos (lip; color rojo).

9. Análisis estadísticos

Los datos sobre descripción de desarrollo de la gónada, calidad de huevos y juveniles, para los diferentes dietas experimentales (inclusión de proteína y lípidos), fueron analizados con una prueba de normalidad (Prueba de Lilliefors) y una prueba de homoscedasticidad (Prueba de Bartlett) antes de aplicar el método de análisis de varianza a utilizar (Sokal y Rohlf, 1995). Los valores registrados en unidades de porcentaje, se transformaron con arco seno antes de realizar el análisis apropiado.

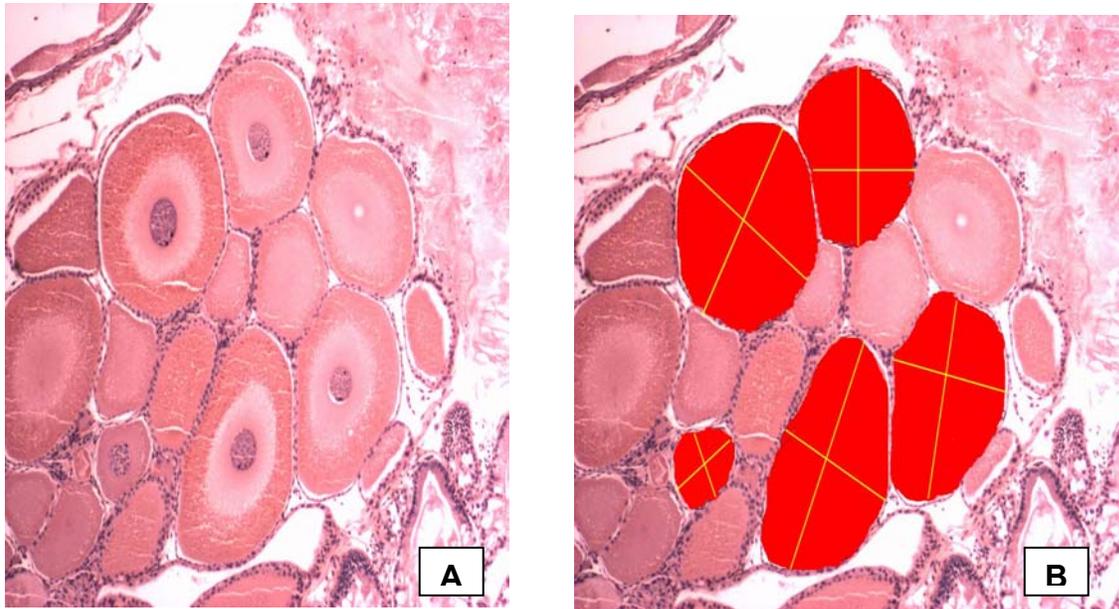


Figura 11. A) Imagen digitalizada de ovocitos en la gónada de *C. quadricarinatus*. B) Medición del diámetro mayor y menor de ovocitos.

Para el desarrollo gonadal, se utilizó un análisis de regresión simple entre el índice hepatosomático (IHS) y gonadosomático (IGS). De la misma manera, se correlacionaron las variables químicas e histológicas con los valores de IGS. Ecuaciones exponenciales y cuadráticas fueron utilizadas en lugar de regresión simple para los niveles de carbohidratos en la gónada y la frecuencia de los ovocitos vitelogénicos secundarios, después de que los coeficientes de la ecuación demostraron ser significativos ($p < 0.05$) y la variación residual de regresión disminuyó, cuando se comparó con la regresión lineal simple. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple para probar la variación de índices de lípidos (IL) y carbohidratos (IC) con respecto al desarrollo de la gónada.

Las diferencias fueron comparadas mediante la prueba de rangos múltiples de medias de Ducan, a un nivel de significancia de 95% (Sokal y Rohlf, 2000). Cuando se encontraron resultados no significativos, fue aplicado un análisis de poder el cual determina la probabilidad de no aceptar una hipótesis nula falsa (Cohen, 1998; Searcy-Bernal, 1994). El nivel de confiabilidad se fijó en $P=0.05$ e impulsa a 0.95 (es decir la $\beta = 0.05$). El tamaño de efecto para el análisis de poder se estimó de resultados obtenidos por Rodríguez-González (2001) para variación explicada en la proteína ($R^2=0.95$) y carbohidratos ($R^2=0.87$) contenidos en el hepatopáncreas de *C. quadricarinatus*.

En los experimentos de calidad de huevo y juvenil, se realizó un análisis de regresión para determinar la respuesta de fecundidad y peso final de juveniles a variaciones en los niveles de proteína y/o lípidos incluidos en la dieta. Así mismo, variables como el porcentaje de desoves y número de juveniles, se relacionaron con el nivel de P/E en las dietas.

A fin de establecer el nivel óptimo de las variables registradas, se utilizó un ecuación cuadrática mediante regresión (Shearer, 2000), utilizando la fórmula.

$$(6) PE = a_0 + a_1S + a_2S^2$$

donde a_0 , a_1 , a_2 son coeficientes de regresión y S es el porcentaje de sustitución.

El porcentaje de sustitución óptima fue calculado por:

$$(7) PS_m = -a_1(2a_2)^{-1}$$

Para los demás parámetros se utilizó el análisis de varianza de dos vías (ANOVA), para encontrar diferencias entre los tratamientos. Si el análisis de varianza indicó diferencias significativas, se llevó a cabo un análisis de comparación múltiple de medias (Prueba de Duncan) para definir qué tratamiento o tratamientos fueron diferentes significativamente ($p < 0.05$; Sokal y Rohlf, 2000).

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa computacional Statistica, versión 6.0 ®.

RESULTADOS

1. Desarrollo gonadal de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

1.1. Desarrollo y composición química de la gónada de hembras de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, en relación al índice gonadosomático.

En la figura 12 se presenta la relación entre IHS y IGS, observando una relación inversa entre ambos índices ($R = 0.43$; $P < 0.01$), descrita en la ecuación $IHS = 8.787 - 0.242IGS$.

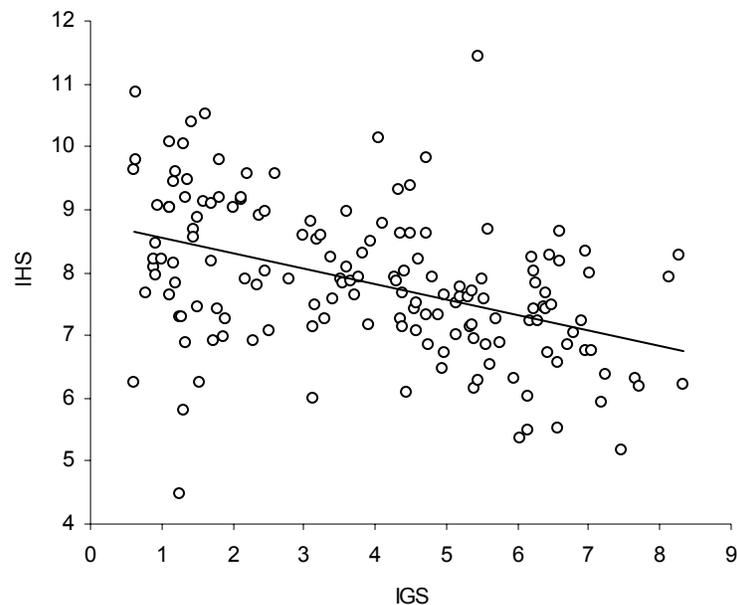
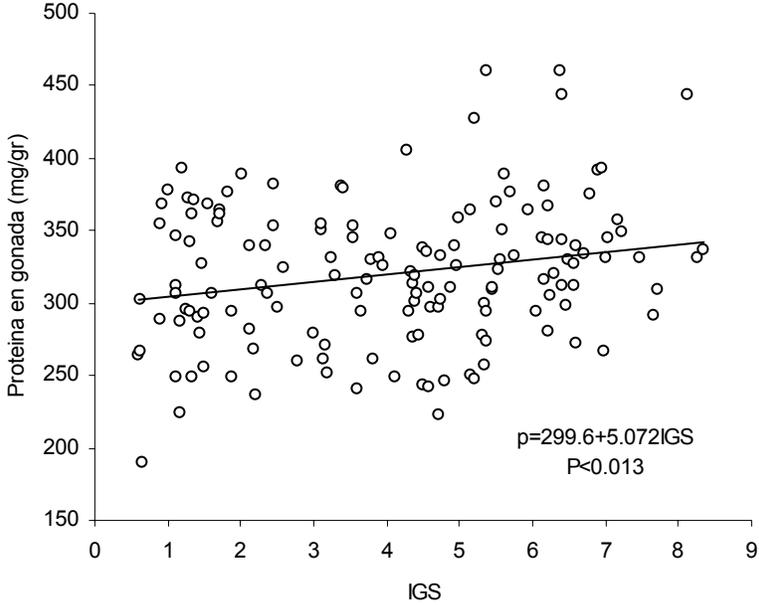


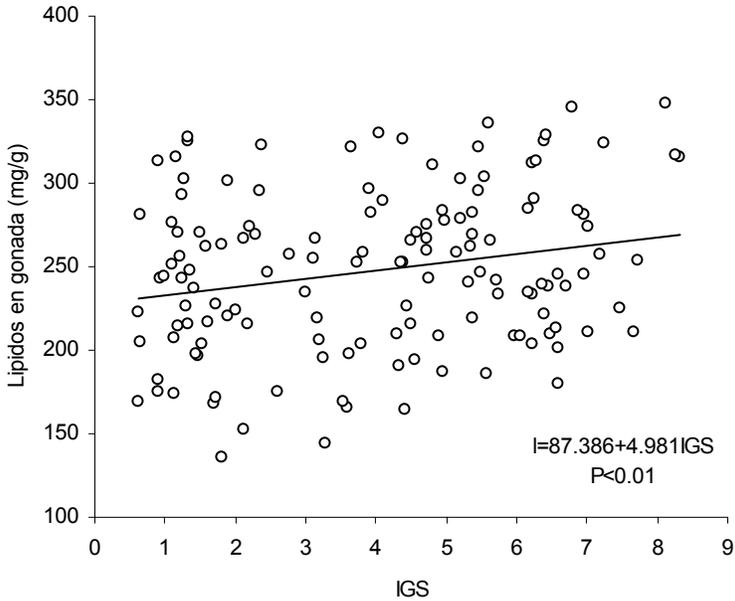
Figura 12. Relación entre el Índice Gonadosomático (IGS) e Índice Hepatosomático (IHS) durante el desarrollo gonadal de hembras de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

La composición de proteína, lípidos, y carbohidratos en la gónada, con respecto a los IGS se muestran en la figura 13. Se presenta una correlación lineal

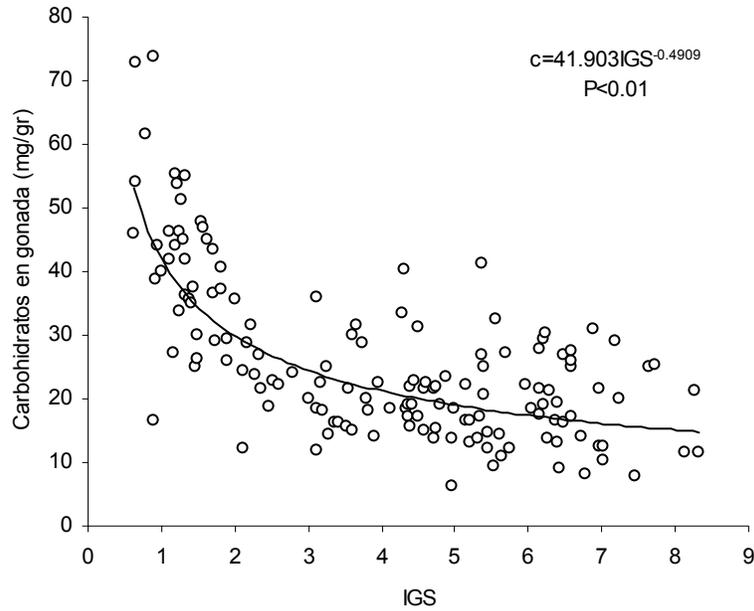
positiva en el contenido de proteínas ($P < 0.01$) y lípidos ($P < 0.01$), mientras que para carbohidratos la correlación es potencial negativa ($P < 0.01$) con el IGS.



A



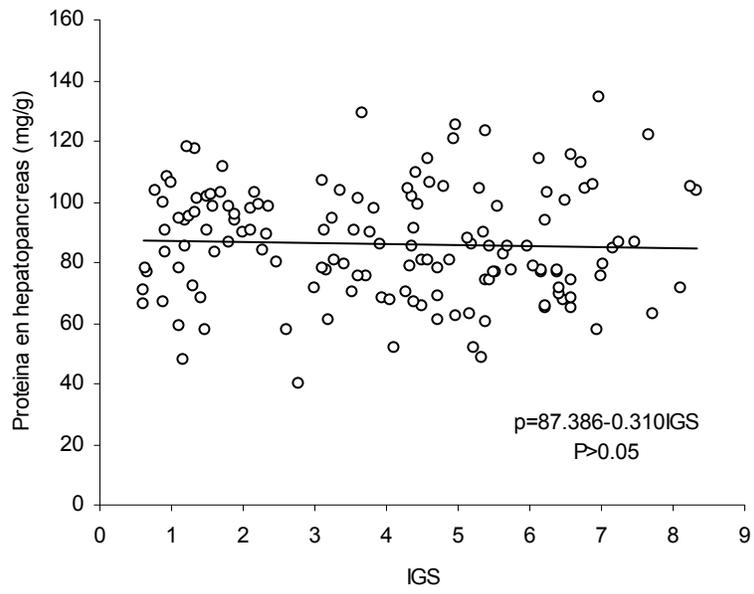
B



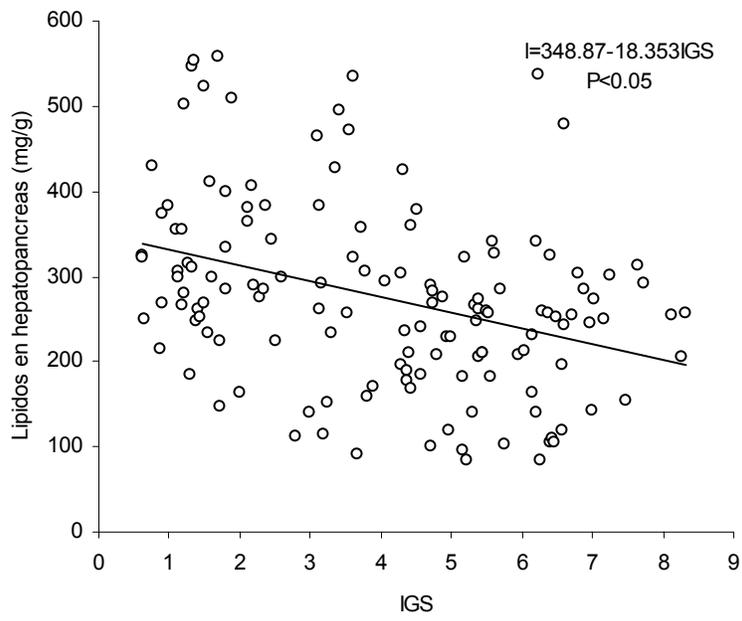
C

Figura 13. Relación de niveles de proteína (A), lípidos (B) y carbohidratos (C) en gónada con relación al índice gonadosomático (IGS) en hembras de *Cherax quadricarinatus*.

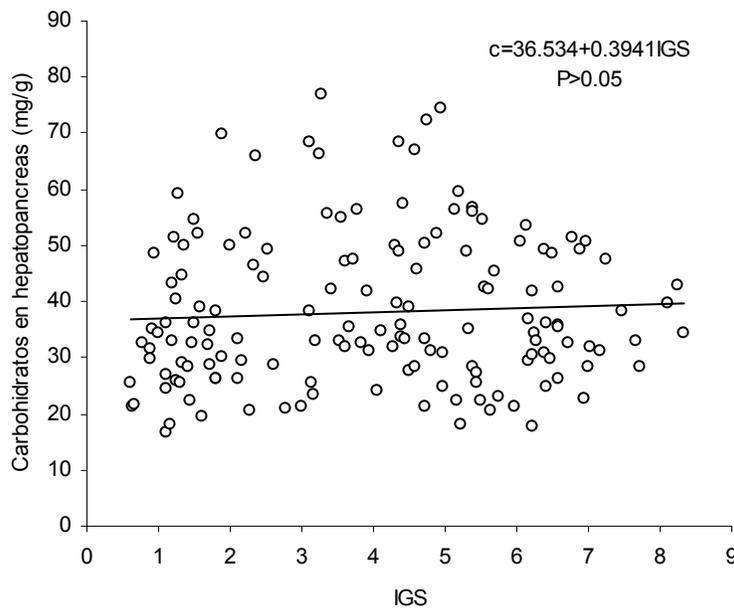
Para el hepatopáncreas, el contenido de lípidos se correlaciona negativamente con el IGS ($P < 0.05$). No se presentó diferencias entre el contenido de proteínas y carbohidratos ($P > 0.05$). El análisis de poder es alto (> 0.99 para ambos nutrientes) lo que indicó que la proteína y los carbohidratos permanecen relativamente constantes en el hepatopáncreas a lo largo del desarrollo gonadal. Dando un $\alpha = \beta = 0.05$ y $N = 143$, lo cual es mucho menor a los tamaños de efecto reportados por Rodríguez-González (2001; $R^2 = 0.95$ y $R^2 = 0.87$). De hecho, efectos tan pequeño como $R^2 = 0.085$ y $R^2 = 0.047$ pueden ser determinados, dado los parámetros anteriores. Esto indica que la variación explicada en la concentraciones de proteína y carbohidratos con relación con el IGS pudiera ser tan pequeña como 8.5% y 4.7%, respectivamente (Fig. 14).



A



B



C

Figura 14. Relación de niveles de proteína (A), lípidos (B) y carbohidratos (C) en hepatopáncreas con relación al índice gonadosomático (IGS) en hembras de *Cherax quadricarinatus*.

La gónada registró una concentración de proteína de 300 % superior al hepatopáncreas, mientras las concentraciones de lípidos y carbohidratos fueron similares entre ambos órganos.

Los cambios en la frecuencia de los diferentes tipos de ovocitos respecto al IGS se muestran en la figura 15. Se presenta una correlación lineal significativa en la frecuencia de ovogonias ($P < 0.01$), ovocitos previtelogénicos ($P < 0.01$), y ovocitos vitelogénicos primarios ($P < 0.01$) y el GSI. Por otro lado, la ecuación cuadrática $f=37.06+13.674IGS-1.6805IGS^2$ mostró que había una frecuencia máxima de ovocitos vitelogénicos secundarios cuando $IGS = 4.06$. Finalmente se

observó una correlación lineal significativa y positiva entre los ovocitos postvitelogénicos y el IGS.

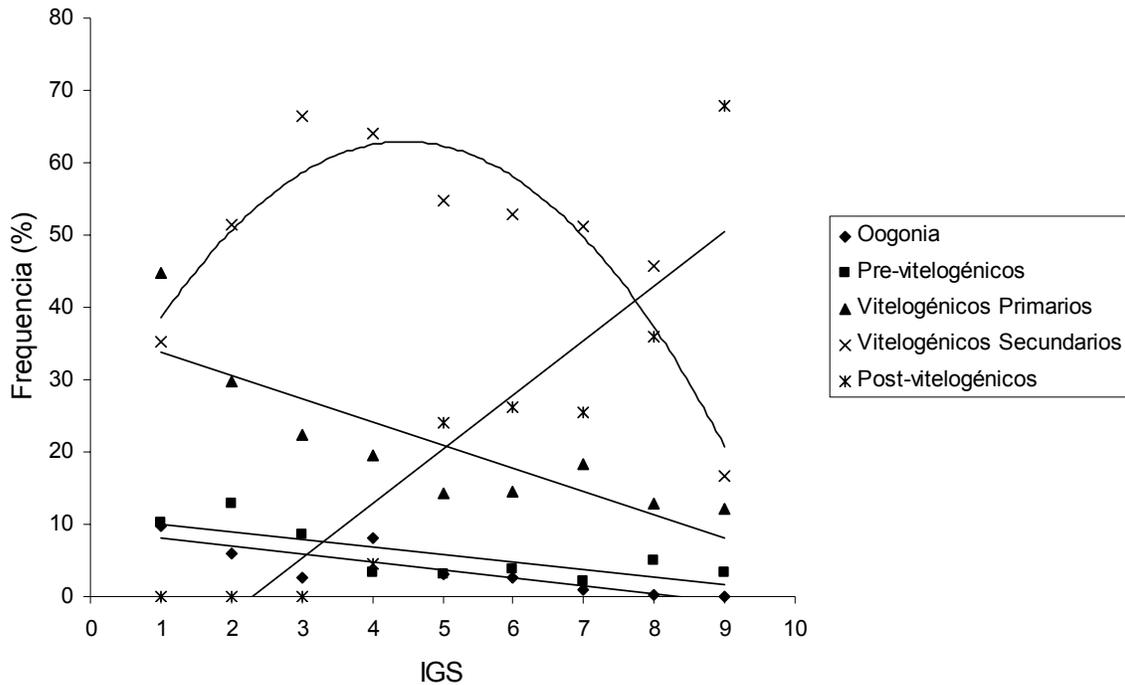


Figura 15. Frecuencia (f) de oogonias, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos primarios y secundarios, y postvitelogénicos en relación al índice gonadosomático (IGS) en hembras *Cherax quadricarinatus*.

Se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tamaño del diámetro y núcleo de los ovocitos durante los estadios de desarrollo (Tabla VI).

Los índices de lípidos (IL) y carbohidratos (IC) mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) durante el desarrollo de los ovocitos. Los lípidos en los ovocitos incrementaron conforme se desarrollaban. Este incremento es particularmente evidente para la transición de ovocitos vitelogénicos primarios a

secundarios. Los carbohidratos alcanzan su máximo en la fase del vitelogenésis primaria (Tabla VI).

Tabla VI. Porcentaje de cobertura de lípidos y carbohidratos para diferentes estadios de ovocitos de hembras de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

Estadio	Diámetro (μm)		Índices (% cobertura)		Equivalencia
	ovocitos	núcleo	Lípidos	Carbohidratos	IGS
I. Ovogonias	21.77 \pm 3.0d	15.33 \pm 1.7d	-	-	
II. Prévitelogénicos	56.30 \pm 8.7cd	27.58 \pm 5.2c	2.35 \pm 3.9c	1.81 \pm 1.8c	
III. Vitelogénicos Primarios	203.17 \pm 75.02c	52.90 \pm 14.0b	7.85 \pm 7.2c	15.06 \pm 11.5a	1
IV. Vitelogénicos Secundarios	1014.45 \pm 353.8b	74.90 \pm 20.0a	43.76 \pm 11.5b	7.70 \pm 7.75bc	2 a 7
V. Postvitelogénicos	1401.47 \pm 218.9a	-	61.45 \pm 15.6a	0.57 \pm 1.7c	8 y 9

2. Calidad del huevo de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

2.1. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en la composición química y talla del huevo de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

La Tabla VII muestra una serie de variables relacionadas con el desempeño reproductivo de *C. quadricarinatus*. Después del periodo de aclimatación y durante la alimentación por 45 días, las hembras no presentaron diferencias significativas

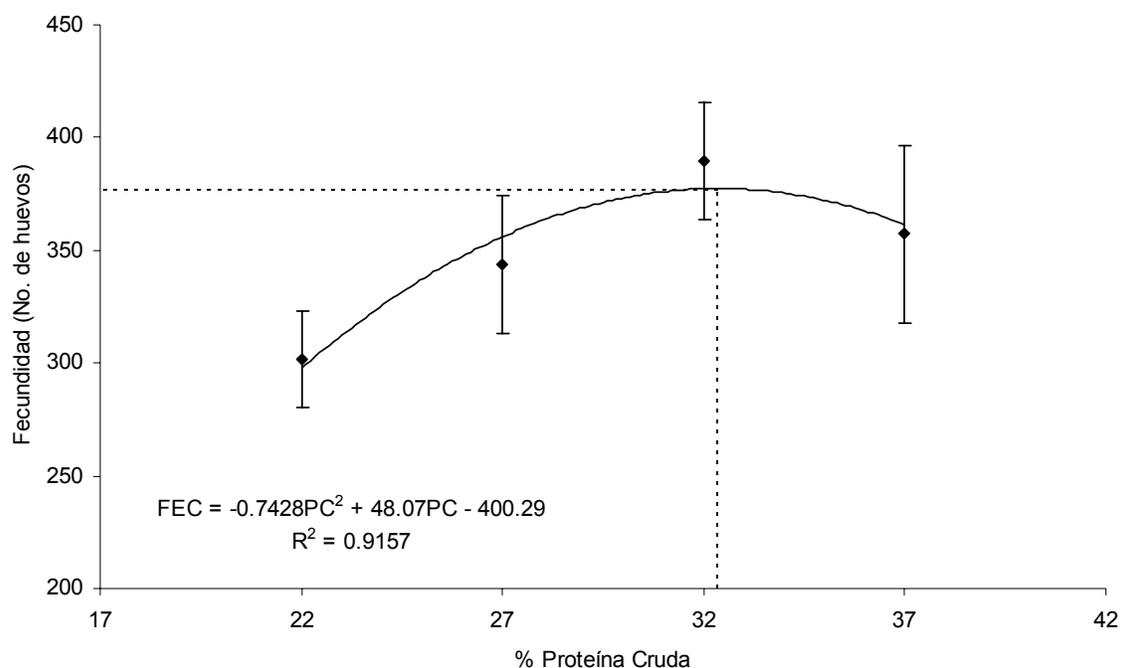
en peso y supervivencia entre los tratamientos ($P>0.05$). De 747 hembras alimentadas con diferentes dietas, desovaron 164 (22%). Las dietas que contenían una razón de proteína cruda/ lípidos de 27/8, 27/12, 22/4, y 32/8, registraron el número promedio de desoves totales más alto, al final del periodo experimental ($P>0.05$)

Tabla VII. Peso, supervivencia, desoves y fecundidad de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con 4 niveles de proteína cruda (22, 27, 32 y 37% PC) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12% LIP).

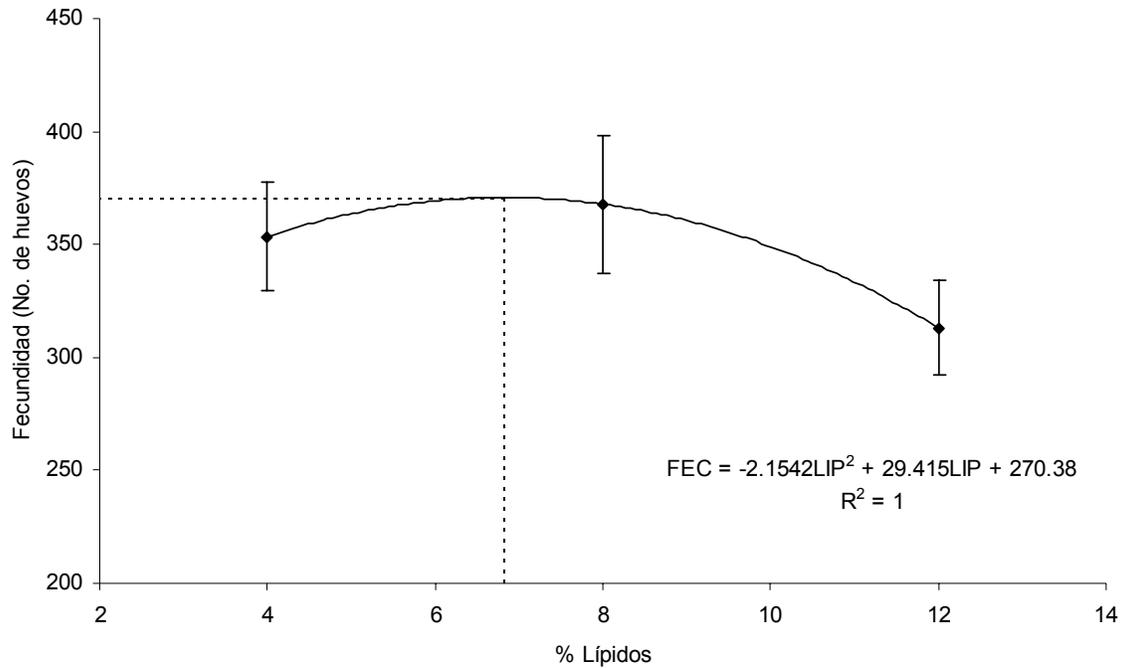
Dieta PC/LIP	Peso (g) 75 días	Supervivencia (%)	Desoves (%)	Fecundidad (No. Huevos)
22/4	42.11 ± 2.7	90.5 ± 3.3	28.17 ± 0.5	304 ± 108
22/8	41.54 ± 0.1	84.5 ± 1.6	20.56 ± 14.4	343 ± 83
22/12	39.67 ± 1.6	85.7 ± 6.7	18.01 ± 5.9	272 ± 46
27/4	41.02 ± 1.2	84.5 ± 11.7	16.95 ± 2.0	413 ± 80
27/8	41.42 ± 1.5	78.6 ± 13.4	26.49 ± 3.7	264 ± 72
27/12	42.2 ± 0.07	82.1 ± 1.6	30.95 ± 5.3	336 ± 115
32/4	43.77 ± 1.6	86.9 ± 1.6	21.79 ± 0.8	411 ± 95
32/8	41.08 ± 1.7	82.1 ± 1.6	27.38 ± 8.3	381 ± 103
32/12	41.51 ± 0.5	84.5 ± 1.6	18.12 ± 9.7	386 ± 100
37/4	42.52 ± 1.0	86.9 ± 5.0	14.06 ± 8.8	364 ± 100
37/8	43.11 ± 5.2	84.5 ± 1.6	19.76 ± 6.7	440 ± 191
37/12	41.41 ± 0.9	90.5 ± 3.3	20.43 ± 7.4	286 ± 74
Probabilidad¹	0.834	0.766	0.370	0.228
Proteína²	0.717	0.388	0.404	0.214
Lípidos²	0.543	0.302	0.623	0.337
PxL²	0.749	0.976	0.247	0.341

¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos. ² ANOVA de dos vías. No se presentaron diferencias estadísticas ($P>0.05$)

La fecundidad (FEC) no presentó diferencias significativas entre los valores promedio para los tratamientos (Tabla VII). Los valores promedio de FEC, con relación al nivel de inclusión de proteína, presentaron un comportamiento representado por la curva $FEC = -400.29 + 48.06PC - 0.74PC^2$ ($R^2 = 0.91$), en donde el punto máximo de la curva, equivale a 32.3% PC (Fig. 16A). La curva $FEC = 270.38 + 29.41LIP - 2.15LIP^2$ ($R^2 = 0.99$), representa el comportamiento de los lípidos (LIP) con relación con la fecundidad y cuyo punto de inflexión es 6.8 % LIP (Fig. 16B).



A



B

Figura 16. Ajuste de ecuación cuadrática del promedio de fecundidad (FEC) de hembras de *Cherax quadricarinatus*, alimentadas con diferente nivel de proteínas (A; 22, 27 y 32 y 37%) y lípidos (B; 4, 8 y 12 %).

La talla y el peso de los huevos se presentan en la Tabla VIII. El mayor peso (húmedo y seco) y talla (diámetro, área y volumen) de los huevos, fue registrado a 32 % PC / 8 % LIP ($P < 0.05$).

Tabla VIII. Peso húmedo, seco, diámetro menor, mayor y promedio, área y volumen de huevos de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con 4 niveles de proteína (22, 27, 32 y 37%) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12%) por 75 días.

Dieta PROT/LIP	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Diámetro menor (mm)	Diámetro mayor (mm)	Diámetro promedio (mm)	Área (mm ²)	Volumen (mm ³)
22/4	5.08 ± 0.51 ^{ab}	2.39 ± 0.26 ^{abc}	1.82±0.07 ^{ab}	2.62±0.10 ^{ab}	2.22±0.07 ^{ab}	3.75±0.25 ^{ab}	36.69±3.89 ^{ab}
22/8	4.68 ± 0.54 ^b	2.32 ± 0.23 ^{bc}	1.78±0.08 ^b	2.56±0.14 ^{ab}	2.17±0.10 ^{ab}	3.60±0.34 ^b	34.53±4.45 ^b
22/12	4.90 ± 0.35 ^{ab}	2.45 ± 0.12 ^{abc}	1.78±0.04 ^b	2.60±0.07 ^{ab}	2.19±0.04 ^{ab}	3.63±0.13 ^b	34.95±1.90 ^b
27/4	4.93 ± 0.67 ^{ab}	2.40 ± 0.28 ^{abc}	1.81±0.08 ^{ab}	2.59±0.11 ^{ab}	2.20±0.09 ^{ab}	3.67±0.29 ^b	35.59±4.38 ^b
27/8	4.91 ± 0.45 ^{ab}	2.40 ± 0.34 ^{abc}	1.79±0.07 ^b	2.58±0.10 ^{ab}	2.19±0.07 ^{ab}	3.63±0.25 ^b	35.01±3.25 ^b
27/12	5.01 ± 0.67 ^{ab}	2.47 ± 0.23 ^{abc}	1.82±0.09 ^{ab}	2.62±0.11 ^{ab}	2.22±0.09 ^{ab}	3.76±0.31 ^{ab}	36.80±4.90 ^{ab}
32/4	4.81 ± 0.85 ^b	2.29 ± 0.13 ^c	1.79±0.07 ^b	2.52±0.08 ^b	2.15±0.05 ^b	3.52±0.18 ^b	34.03±2.93 ^b
32/8	5.36 ± 0.56 ^a	2.55 ± 0.26 ^a	1.86±0.11 ^a	2.67±0.11 ^a	2.27±0.10 ^a	3.90±0.36 ^a	39.31±6.13 ^a
32/12	4.96 ± 0.49 ^{ab}	2.53 ± 0.19 ^{ab}	1.82±0.06 ^{ab}	2.63±0.08 ^{ab}	2.23±0.06 ^{ab}	3.77±0.20 ^{ab}	36.54±3.14 ^{ab}
37/4	5.11 ± 0.47 ^{ab}	2.54 ± 0.19 ^a	1.81±0.06 ^{ab}	2.63±0.08 ^{ab}	2.22±0.06 ^{ab}	3.74±0.21 ^{ab}	36.34±3.05 ^{ab}
37/8	5.11 ± 0.59 ^{ab}	2.43 ± 0.17 ^{abc}	1.81±0.07 ^{ab}	2.61±0.11 ^{ab}	2.21±0.08 ^{ab}	3.71±0.28 ^{ab}	37.14±4.25 ^{ab}
37/12	4.89 ± 0.36 ^{ab}	2.28 ± 0.25 ^c	1.78±0.03 ^b	2.57±0.07 ^{ab}	2.17±0.04 ^b	3.58±0.13 ^b	34.16±1.57 ^b
Probabilidad ¹	0.143	0.028	0.065	0.012	0.007	0.008	0.015
Proteína ²	0.608	0.636	0.977	0.391	0.785	0.755	0.568
Lípidos ²	0.820	0.830	0.558	0.464	0.530	0.449	0.447
PxL ²	0.041	0.005	0.001	0.033	0.001	0.001	0.004

¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos. Valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Duncan's test, P=0.05).

² ANOVA de dos vías (P<0.05).

Los contenidos de proteínas, lípidos y energía en los huevos, no presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ($P>0.05$; Tabla IX). Dietas con 32% PC obtuvieron el valor promedio más alto de concentración de proteínas (2148.08 $\mu\text{g}/\text{ind}$; $P>0.05$) y energía (13.44 $\mu\text{g}/\text{ind}$; $P>0.05$). Así mismo, cuando las dietas contenían 8% LIP se observó el mismo comportamiento para los valores promedio en proteínas (2205.98 $\mu\text{g}/\text{ind}$; $P>0.05$) y energía (13.52 $\mu\text{g}/\text{ind}$; $P>0.05$; Tabla IX). De manera general, las dietas con 4% LIP presentaron el valor promedio mas alto de concentración de CHO en los huevos (77.19 $\mu\text{g}/\text{ind}$; $P<0.05$; Fig. 17).

Tabla IX. Contenido químico (proteínas, lípidos, carbohidratos) y energía de huevos de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con 4 niveles de proteína (22, 27, 32 y 37%) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12%) por 75 días.

Dieta	Proteínas	Lípidos	Cho*	Energía
PROT/LIP	($\mu\text{g}/\text{huevo}$)	($\mu\text{g}/\text{huevo}$)	($\mu\text{g}/\text{huevo}$)	(cal/mg)
22/4	2042.35 \pm 440.5 ^a	451.63 \pm 94.8 ^a	79.61 \pm 7.9 ^a	12.88 \pm 1.79 ^a
22/8	2107.70 \pm 544.3 ^a	440.26 \pm 80.1 ^a	70.69 \pm 6.9 ^{bc}	12.83 \pm 2.34 ^a
22/12	2189.44 \pm 490.7 ^a	448.61 \pm 104.1 ^a	77.51 \pm 11.0 ^{abc}	13.27 \pm 2.15 ^a
27/4	2030.42 \pm 448.5 ^a	467.92 \pm 88.62 ^a	80.71 \pm 8.7 ^a	12.75 \pm 2.03 ^a
27/8	2369.73 \pm 320.3 ^a	408.43 \pm 93.3 ^a	69.23 \pm 10.7 ^c	13.80 \pm 1.77 ^a
27/12	1954.22 \pm 562.7 ^a	481.97 \pm 103.3 ^a	74.9 \pm 7.5 ^{abc}	12.51 \pm 2.57 ^a
32/4	2486.14 \pm 284.6 ^a	443.41 \pm 93.2 ^a	72.96 \pm 7.6 ^{bc}	14.75 \pm 1.54 ^a
32/8	2176.66 \pm 530.4 ^a	422.15 \pm 74.6 ^a	78.60 \pm 10.1 ^{ab}	13.28 \pm 2.21 ^a
32/12	2028.66 \pm 565.3 ^a	468.91 \pm 81.3 ^a	74.21 \pm 11.7 ^{abc}	12.73 \pm 2.36 ^a
37/4	2037.49 \pm 678.4 ^a	460.79 \pm 113.0 ^a	80.64 \pm 11.2 ^a	12.12 \pm 2.55 ^a
37/8	2238.51 \pm 331.3 ^a	463.08 \pm 94.1 ^a	75.53 \pm 12.2 ^{abc}	13.67 \pm 1.53 ^a
37/12	2081.51 \pm 501.1 ^a	452.27 \pm 99.9 ^a	72.34 \pm 9.0 ^{abc}	12.35 \pm 1.52 ^a
Probabilidad ¹	0.610	0.639	0.020	0.975
Proteína ²	0.994	0.930	0.920	0.952
Lípidos ²	0.328	0.213	0.043	0.534
PxL ²	0.385	0.679	0.009	0.938

*Cho= Carbohidratos. ¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos. Valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Duncan's test, $P=0.05$). ²ANOVA de dos vías ($P<0.05$).

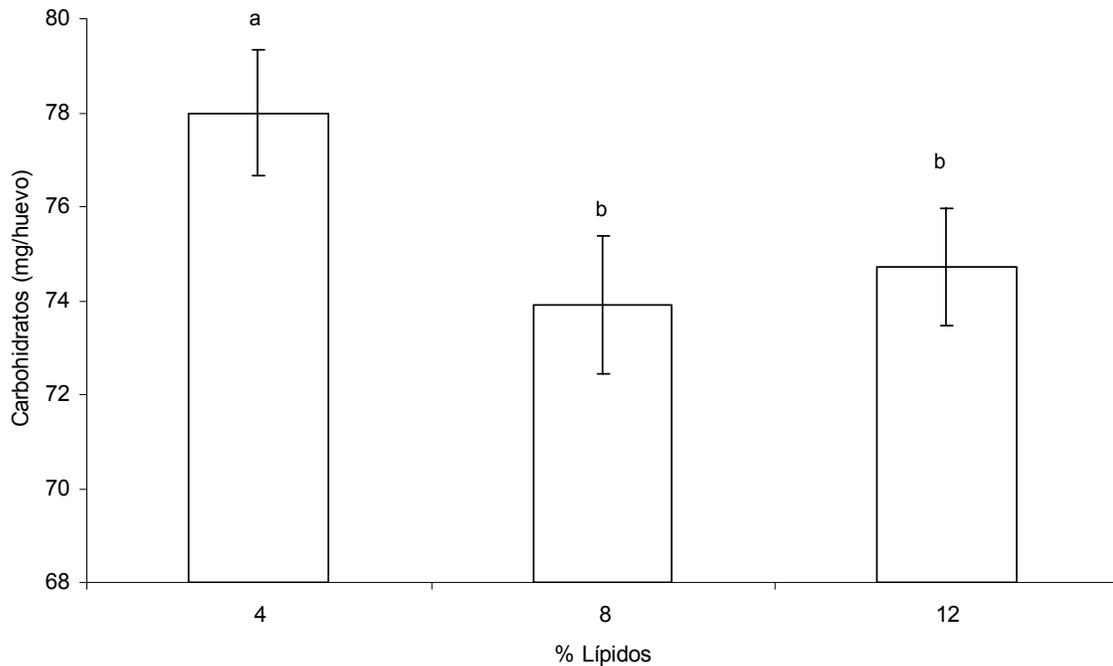


Figura 17. Contenido de carbohidratos en el huevo de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* alimentadas con diferente nivel de lípidos (4, 8 y 12%)

2.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta para hembras reproductoras de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* en la composición química del músculo y hepatopáncreas y el contenido de vitelina en el huevo.

Las hembras alimentadas con dieta con 18% PC presentaron un peso final promedio significativamente menor ($P < 0.05$), comparado con los otros tratamientos (Fig. 18).

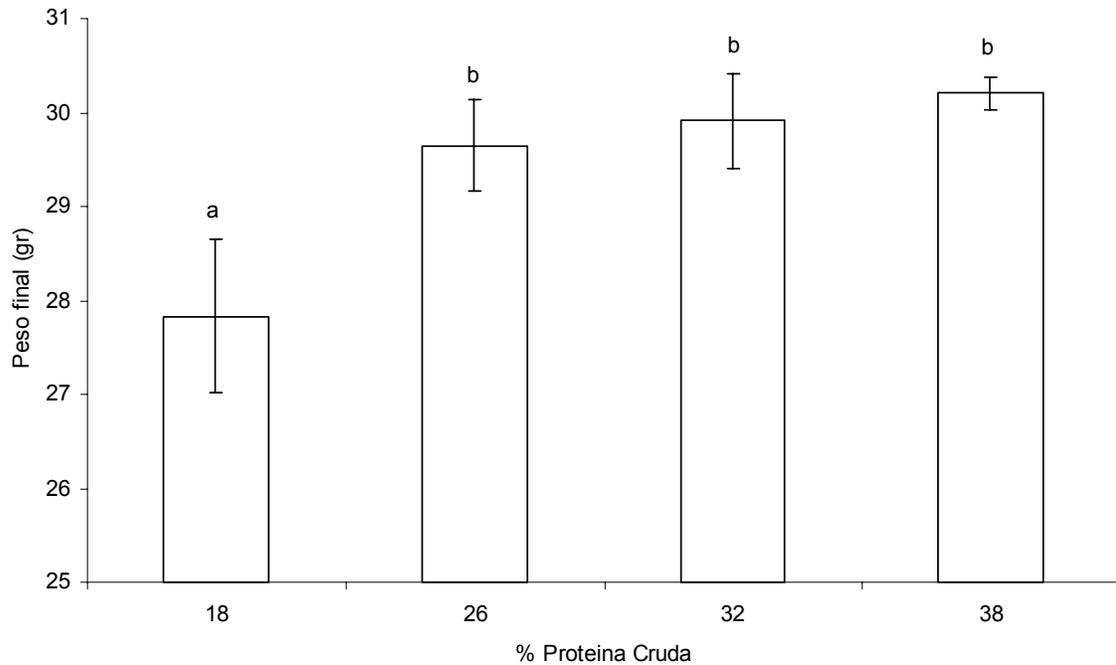


Figura 18. Peso final promedio de hembras de *Cherax quadricarinatus* alimentadas con 4 niveles de proteína (18, 25, 31 y 37%) por 75 días.

No se observaron diferencias en el porcentaje de supervivencia entre los tratamientos (81.36-94.77%). La relación del porcentaje de desoves se ajustó a una ecuación cuadrática ($P < 0.05$). La relación de P/E que produjo el máximo de porcentaje de desoves fue calculado con el coeficiente de regresión ($-11.137 / (2 \times 0.3241) = 17.1 \text{ mg/kJ}$; Fig. 19). El porcentaje de desoves en las hembras varió de 34.19 a 65.48%.

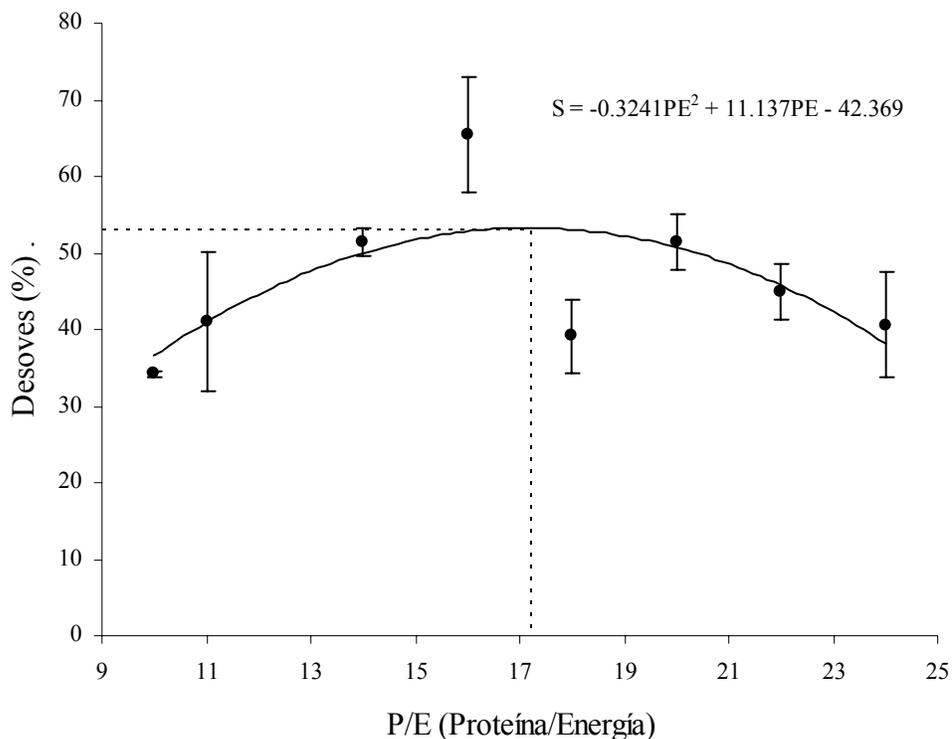


Figura 19. Porcentajes desoves (s) de hembras de *Cherax quadricarinatus* después de 75 días de alimentación con ocho dietas con diferente nivel de proteína y energía (10, 11, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 mg/kJ PE). La línea punteada representa el óptimo del porcentaje de desoves en función a la relación 17.1 mg/kJ.

El nivel de vitelina en el huevo (149.98 - 163.58 mg/huevo) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

La Tabla X muestra la variación de la composición química del músculo con relación a la dieta suministrada. Se observa una mayor acumulación de lípidos en el músculo de organismos alimentados con la dieta con 3% LIP ($P < 0.05$). Se registró una correlación entre el contenido de carbohidratos en el músculo y el porcentaje de proteína en la dieta, mostrando una mayor concentración a 18% PC

($P < 0.05$; Fig. 20). Los niveles de proteína, lípidos y energía en el músculo no presentan diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Tabla X. Composición proximal (proteínas, lípidos, carbohidratos y energía) de músculo de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con 4 niveles de proteína (18, 25, 31 y 37%) y 2 niveles de lípidos (3 y 7 %) por 75 días.

Dieta	Proteínas	Lípidos	Cho*	Energía
PROT/LIP	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\text{cal}/\mu\text{g}$)
18/3	505.25 \pm 48.3	30.89 \pm 3.3	61.48 \pm 20.3	2702.45 \pm 86.1
18/7	601.06 \pm 114.1	28.20 \pm 5.4	74.26 \pm 35.5	3113.24 \pm 374.9
25/3	603.70 \pm 34.2	33.98 \pm 6.0	57.97 \pm 9.13	3102.07 \pm 104.7
25/7	566.27 \pm 112.8	28.31 \pm 2.4	37.07 \pm 10.1	2810.71 \pm 480.3
31/3	497.29 \pm 81.5	34.31 \pm 1.2	56.79 \pm 19.9	2642.33 \pm 275.6
31/7	608.80 \pm 45.8	27.78 \pm 0.5	37.50 \pm 24.9	2991.13 \pm 293.2
37/3	507.07 \pm 15.1	31.77 \pm 4.5	36.79 \pm 12.2	2582.35 \pm 20.4
37/7	474.04 \pm 81.2	30.97 \pm 2.4	38.89 \pm 25.0	2442.58 \pm 349.9
Probabilidad ¹	0.595	0.264	0.338	0.611
Proteína ²	0.539	0.827	0.175	0.474
Lípidos ²	0.458	0.022	0.501	0.696
PxL ²	0.502	0.564	0.493	0.545

*Cho= Carbohidratos. ¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos.

²ANOVA de dos vías. No se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$).

Las variaciones del contenido químico en el hepatopáncreas se muestran en la Tabla XI. Los niveles de proteínas y energía en el hepatopáncreas presentaron una correlación positiva con el nivel de inclusión de proteína en la dieta ($P < 0.05$). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Las dietas con 31% de proteína obtuvieron el nivel más alto de lípidos y carbohidratos ($P < 0.05$).

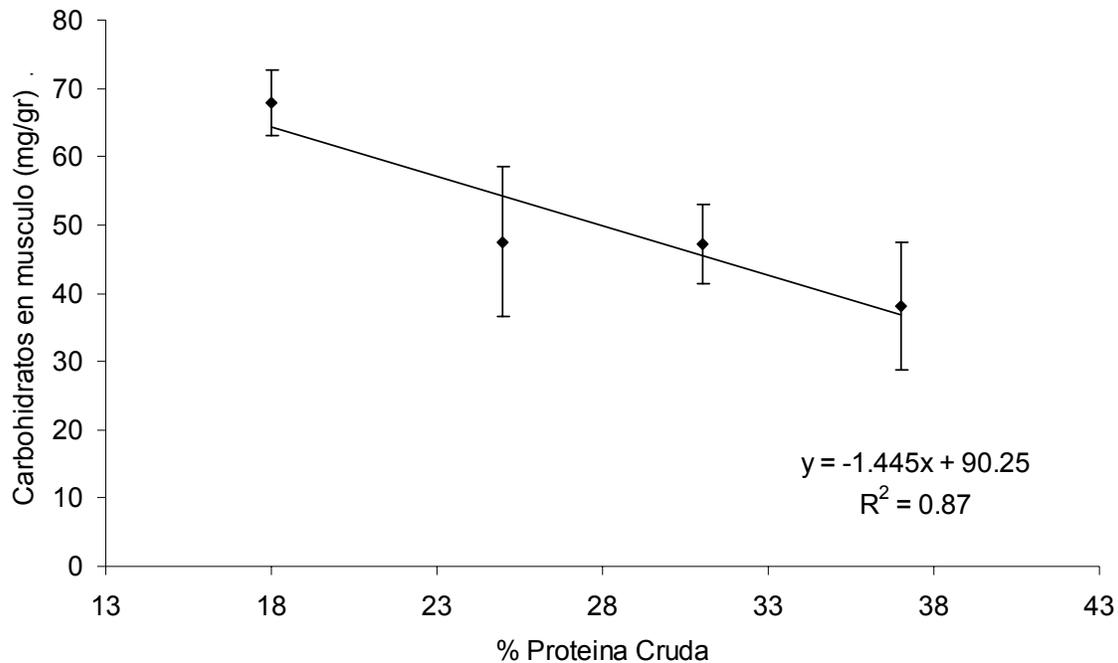


Figura 20. Niveles de carbohidratos en músculo de hembras de *C. quadricarinatus*, en función del nivel de proteína en la dieta.

Tabla XI. Contenido químico (proteínas, lípidos, carbohidratos) y energía del hepatopáncreas de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con 4 niveles de proteína (18, 25, 31 y 37%) y 2 niveles de lípidos (3 y 7 %) por 75 días.

Dieta PROT/LIP	Proteínas ($\mu\text{g/g}$)	Lípidos ($\mu\text{g/g}$)	Cho* ($\mu\text{g/g}$)	Energía (cal/ μg)
18/3	110.31 \pm 21.5	289.67 \pm 101.2	58.80 \pm 28.5	3003.86 \pm 982.9
18/7	115.30 \pm 5.3	246.96 \pm 91.8	48.78 \pm 5.7	2646.84 \pm 730.1
25/3	139.50 \pm 32.4	291.46 \pm 78.9	50.44 \pm 16.5	3109.26 \pm 630.6
25/7	131.04 \pm 36.7	254.33 \pm 50.9	64.45 \pm 40.9	2837.03 \pm 726.4
31/3	148.09 \pm 20.5	306.68 \pm 24.4	70.33 \pm 31.8	3347.98 \pm 45.47
31/7	164.02 \pm 39.8	284.99 \pm 18.2	63.33 \pm 16.0	3216.42 \pm 103.2
37/3	178.51 \pm 56.0	249.93 \pm 49.8	80.51 \pm 21.8	3072.23 \pm 62.7
37/7	184.34 \pm 26.9	310.57 \pm 19.6	53.67 \pm 5.1	3466.24 \pm 192.4
Probabilidad ¹	0.092	0.852	0.331	0.717
Proteína ²	0.015	0.882	0.162	0.472
Lípidos ²	0.730	0.706	0.873	0.709
PxL ²	0.924	0.548	0.353	0.727

*Cho= Carbohidratos. ¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos.
²ANOVA de dos vías. No se presentaron diferencias estadísticas (P>0.05).

3. Calidad del juvenil de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

3.1. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en el peso, longitud y composición química del juvenil de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

En los tratamientos con 32/8 y 37/12 (PC/LIP), produjeron juveniles con mayor longitud ($P>0.05$). Dietas que contenían 32% PC presentaron los valores promedio más altos de pesos húmedo y seco de los juveniles, aunque no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P>0.05$, Tabla XII).

Tabla XII. Pesos húmedo y seco, y longitud de juveniles recién eclosionados de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con 4 niveles de proteína (22, 27, 32 y 37%) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12%).

Dieta PROT/LIP	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Longitud (mm)
22/4	15.70 ± 1.0	2.336 ± 0.19	8.21 ± 0.42
22/8	15.16 ± 1.6	2.383 ± 0.51	8.23 ± 0.30
22/12	15.83 ± 0.7	2.636 ± 0.14	8.32 ± 0.22
27/4	14.49 ± 1.8	2.233 ± 0.35	8.21 ± 0.35
27/8	14.80 ± 1.7	2.550 ± 0.40	8.26 ± 0.44
27/12	15.15 ± 1.0	2.520 ± 0.38	8.25 ± 0.28
32/4	15.25 ± 1.7	2.385 ± 0.52	7.98 ± 0.53
32/8	15.75 ± 0.7	2.489 ± 0.31	8.45 ± 0.12
32/12	16.16 ± 1.8	2.651 ± 0.39	8.28 ± 0.27
37/4	15.34 ± 1.0	2.648 ± 0.40	8.37 ± 0.17
37/8	15.27 ± 1.8	2.303 ± 0.14	8.12 ± 0.23
37/12	15.03 ± 1.4	2.387 ± 0.18	8.49 ± 0.34
Probabilidad ¹	0.572	0.297	0.168
Proteína ²	0.119	0.881	0.874
Lípidos ²	0.535	0.200	0.211
PxL ²	0.788	0.134	0.133

¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos. ²ANOVA de dos vías. No se presentaron diferencias estadísticas (P>0.05). No se presentaron diferencias significativas en la composición química de los juveniles (P>0.05, Tabla XIII).

Tabla XIII. Contenido químico (proteínas, lípidos, carbohidratos) y energía de juveniles de hembras de *C. quadricarinatus* alimentadas con 4 niveles de proteína (22, 27, 32 y 37%) y 3 niveles de lípidos (4, 8 y 12%).

Dieta	Proteínas	Lípidos	Cho*	Energía
PROT/LIP	($\mu\text{g}/\text{ind}$)	($\mu\text{g}/\text{ind}$)	($\mu\text{g}/\text{ind}$)	(cal/mg)
22/4	523.93 \pm 96.4	257.58 \pm 83.3	42.14 \pm 10.4	4.46 \pm 0.53
22/8	446.49 \pm 98.3	231.39 \pm 107.1	41.77 \pm 15.6	3.81 \pm 0.99
22/12	467.59 \pm 121.7	301.13 \pm 72.9	53.51 \pm 9.9	4.76 \pm 0.76
27/4	472.08 \pm 158.5	238.39 \pm 99.1	37.08 \pm 15.3	4.06 \pm 1.25
27/8	410.98 \pm 167.3	253.63 \pm 96.2	56.54 \pm 17.5	4.00 \pm 1.56
27/12	460.22 \pm 106.6	239.28 \pm 59.1	51.23 \pm 19.7	4.07 \pm 0.76
32/4	410.13 \pm 145.6	258.90 \pm 103.6	47.70 \pm 15.9	3.95 \pm 1.04
32/8	439.52 \pm 111.6	249.33 \pm 94.4	49.52 \pm 16.6	4.06 \pm 1.15
32/12	441.63 \pm 111.0	211.85 \pm 79.54	49.24 \pm 23.5	3.77 \pm 0.92
37/4	418.64 \pm 162.2	224.81 \pm 112.7	55.04 \pm 20.5	3.80 \pm 1.40
37/8	570.76 \pm 144.2	240.5 \pm 103.9	42.18 \pm 17.9	4.52 \pm 1.39
37/12	456.70 \pm 143.4	249.5 \pm 57.4	46.65 \pm 13.9	4.12 \pm 0.89
Probabilidad ¹	0.486	0.880	0.548	0.746
Proteína ²	0.410	0.719	0.923	0.548
Lípidos ²	0.934	0.947	0.532	0.899
PxL ²	0.260	0.625	0.235	0.520

*Cho= Carbohidratos. ¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos. ²ANOVA de dos vías. No se presentaron diferencias estadísticas (P>0.05).

Por otro lado, el análisis de regresión fue significativo al ajustar una ecuación cuadrática entre el número de juveniles y el contenido de P/E en las dietas. El punto máximo se presentó en 16 mg/kJ (P/E; Fig. 21).

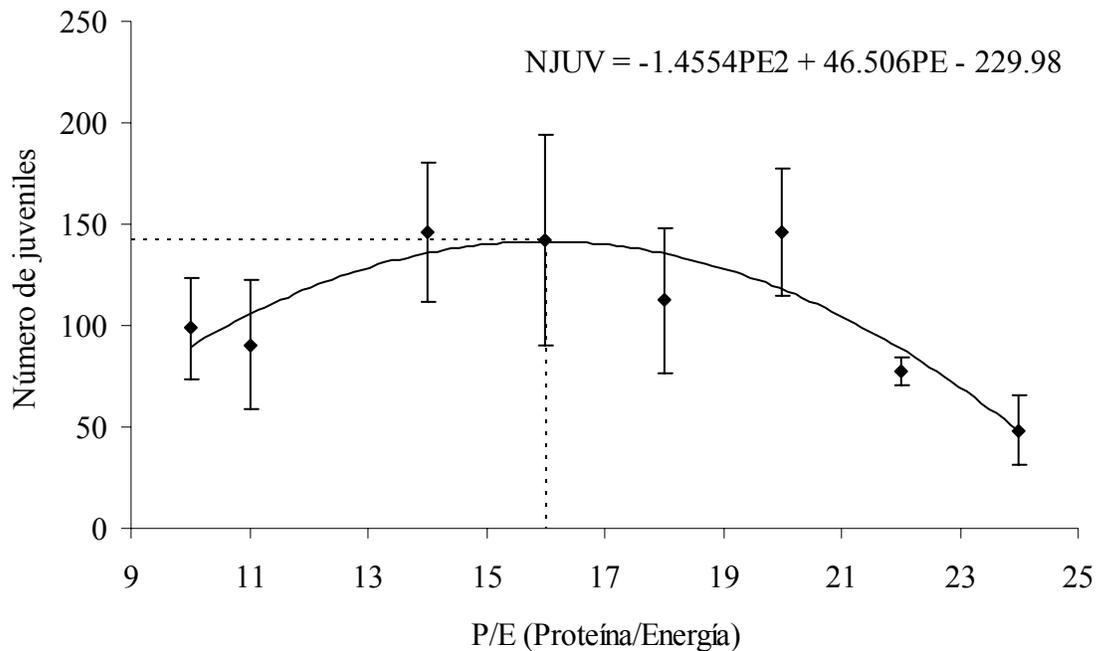


Figura 21. Numero de juveniles (NJUV) en relación con al nivel de proteína y emergía incluido en dietas para hembras de *Cherax quadricarinatus*. La relación de P/E que produce el máximo de número de juveniles fue calculado con coeficientes de regresión: $-46.506 / (2 \times -1.4554) = 16 \text{ mg/kJ}$ (línea punteada).

3.2. Efecto del nivel de proteína y lípidos de la dieta en indicadores fisiológicos del juvenil de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

3.2.1. Determinación de LT_{50} y LC_{50} para amonio total, salinidad e hipoxia, en juveniles de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

En la tabla XIV se muestran los valores de la prueba realizada para obtener las concentraciones letales del 50% (LT_{50}) de amonio y de salinidad para juveniles de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

Para amonio total, las concentraciones de 100 a 200 mg/L registraron una mortalidad de 50% de los animales, en menos de 6 hr.

Con relación a las pruebas de la capacidad de respuesta a variaciones de salinidad, el LT_{50} a concentraciones de 5, 10 y 20 UPS, fue observado después de 24 hrs. Concentraciones de 38 UPS de salinidad registran un LT_{50} a 4 hr.

Tabla XIV. Toxicidad de diferentes concertaciones de amonio y salinidad para juveniles de *C. quadricarinatus*.

Amonio Total		Salinidad	
(mg/L)	LT_{50}	(UPS)	LT_{50}
50	18 hr	5	>24 hr
100	6 hr	10	>24 hr
150	4 hr	20	>24 hr
200	2.5 hr	38	4 hr

Para los juveniles expuestos a hipoxia (<0.1 mg/L), se registró una mortalidad significativa, registrando el LT_{50} después 40 minutos. Después de 55 minutos se presenta una mortalidad total de los organismos.

Los valores calculados de LC_{50} para 2, 6, 12 y 24 hrs. para pruebas de amonio total son 188.64, 104.98, 78.53 y 12.56 mg/L respectivamente. Para pruebas a diferentes concentraciones de salinidad el valor de LC_{50} para 24 hrs. es de 29.23 UPS.

3.2.2. Efecto del nivel de inclusión de proteína y lípidos de la dieta en la respuesta a pruebas de estrés de juveniles de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Los pesos húmedos (13.5 ± 1.0 mg) y secos (1.19 ± 0.1 mg) de los juveniles no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. La composición química de los juveniles se muestra en la tabla XV. Las concentraciones promedio fueron de 60.88 ± 11.5 mg/g para proteínas, 4.23 ± 1.9 mg/g para lípidos y 1.96 ± 0.9 mg/g para carbohidratos. No se presenta una influencia significativa de los diferentes niveles de proteína y lípidos de la dieta sobre la composición química del juvenil ($P > 0.05$).

Tabla XV. Composición química (n = 3) en juveniles de *C. quadricarinatus* producidos por hembras alimentadas con 4 niveles de proteína (PC; 18, 25, 31 y 37%) y 2 niveles de lípidos (LIP) (3 y 7 %).

Dieta	Proteína	Lípidos	Carbohidratos
PROT/LIP	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
18/3	57.76 ± 20.8^a	5.33 ± 3.1^a	2.60 ± 1.6^a
18/7	56.18 ± 6.2^a	5.78 ± 3.8^a	1.62 ± 0.6^a
25/3	61.25 ± 22.0^a	3.14 ± 0.9^a	1.28 ± 0.6^a
25/7	63.93 ± 5.1^a	4.85 ± 0.9^a	2.51 ± 0.9^a
31/3	60.51 ± 5.5^a	3.48 ± 0.7^a	1.46 ± 0.5^a
31/7	65.2 ± 11.15^a	3.42 ± 0.2^a	1.76 ± 1.1^a
37/3	53.14 ± 8.86^a	2.99 ± 0.1^a	1.78 ± 1.0^a
37/7	69.08 ± 6.40^a	4.85 ± 2.2^a	2.70 ± 0.8^a
Probabilidad¹	0.814	0.531	0.505
Proteína²	0.320	0.837	0.712
Lípidos²	0.241	0.304	0.377
PxL²	0.798	0.666	0.265

¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos. ²ANOVA de dos vías. No se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$).

En la Tabla XV se presentan los valores promedio del peso final de los juveniles después de 50 días de cultivo y la supervivencia a las pruebas de estrés (hipoxia, salinidad y amonio).

La concentración de proteína en la dieta afectó el peso final (PF) de los juveniles después de 50 días de cultivo. El análisis de regresión se ajusta a una ecuación cuadrática ($PF = -0.0026CP^2 + 0.1312CP - 0.5756$) entre el peso final de los juveniles y el nivel de proteína. El nivel de proteínas que proporciona el máximo de peso después del cultivo es a 25.2 % (Fig. 22). El ANOVA no presentó diferencias al evaluar la interacción entre los niveles de proteínas y lípidos, en el peso final de los juveniles ($P > 0.5$; Tabla XVI).

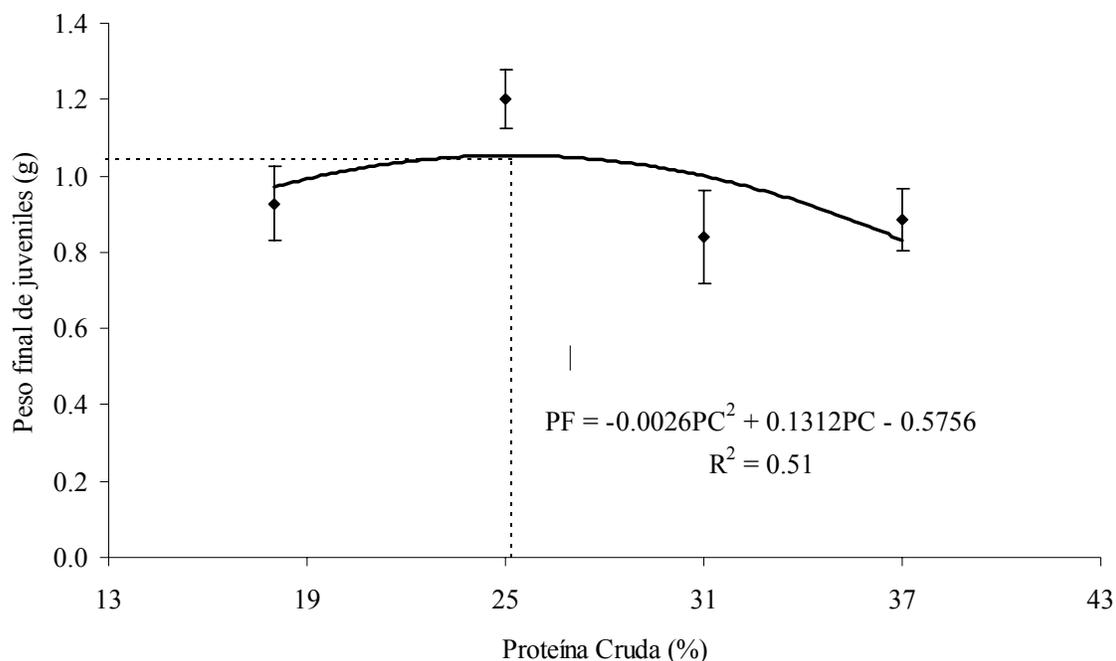


Figura 22. Peso final (PF) de juveniles, provenientes de hembras de *Cherax quadricarinatus*, después de 50 días de alimentación con cuatro nivel de proteínas (18, 25, 31 y 37%). El nivel de proteínas que produce el máximo peso de juveniles

fue calculado con coeficientes de regresión: $0.1312 / (2 \times -0.0026) = 25.2\%$ PC (línea punteada).

En las pruebas de estrés, el análisis de dos vías reveló que existe un efecto significativo del nivel de proteína con relación a la supervivencia de los juveniles. Juveniles alimentados con dietas con 18% de proteína cruda presentaron la menor supervivencia a las prueba de hipoxia ($12.5 \pm 12\%$) y amonio ($63.3 \pm 18\%$; $P < 0.05$). Mientras que juveniles alimentados con 25, 31 y 37 % PC no presentaron diferencias significativas a estas pruebas. Para la prueba de salinidad registró una menor supervivencia en juveniles alimentados con 18 y 37 % PC (65 ± 15 y 47.2 ± 7 respectivamente).

Los niveles de lípidos no presentaron diferencia en los parámetros muestreados, excepto en la supervivencia para la prueba de amonio (A_{So}). Juveniles alimentados con dietas con 3% de lípidos presentaron una menor supervivencia a esta prueba (61.85 ± 14).

De manera general, las dietas con 31% PC y 7% LIP presentaron los valores de supervivencia mas altos para las pruebas de estrés (hipoxia, salinidad y amonio).

Tabla XVI. Peso final de juveniles de *C. quadricarinatus* producidos por hembras alimentadas con cuatro niveles de proteínas (PC; 18, 25, 31 y 37 %) y dos niveles de lípidos (LIP; 3 y 7%), después de 50 días de cultivo. Supervivencia pruebas de estrés (hipoxia, salinidad y amonio).

Dieta PROT/LIP	Peso final de juveniles (g)	Hipoxia (%)	Supervivencia	
			Salinidad (%)	Amonio (%)
18/3	0.923 ± 0.48 ^a	0.00 ± 0.0 ^a	56.66 ± 11.5 ^{abc}	46.66 ± 5.7 ^a
18/7	0.936 ± 0.59 ^a	25.00 ± 25.0 ^{ab}	73.33 ± 15.2 ^{cd}	80.00 ± 0.0 ^{cd}
25/3	1.248 ± 0.50 ^a	75.00 ± 25.0 ^c	80.00 ± 20.0 ^{cd}	60.00 ± 17.3 ^{abc}
25/7	1.132 ± 0.47 ^a	8.33 ± 14.4 ^a	66.66 ± 5.7 ^{bcd}	53.33 ± 15.2 ^{ab}
31/3	0.906 ± 0.71 ^a	8.33 ± 14.4 ^a	70.00 ± 20.0 ^{cd}	66.66 ± 5.7 ^{abc}
31/7	0.795 ± 0.63 ^a	83.33 ± 14.4 ^c	90.00 ± 10.0 ^d	81.48 ± 23.1 ^{cd}
37/3	0.984 ± 0.55 ^a	50.00 ± 0.0 ^{bc}	43.33 ± 5.7 ^{ab}	74.07 ± 12.8 ^{bcd}
37/7	0.727 ± 0.34 ^a	58.33 ± 38.1 ^{bc}	40.00 ± 10.0 ^a	86.66 ± 5.7 ^d
Probabilidad ¹	0.079	0.000	0.003	0.014
Proteína ²	0.025	0.015	0.000	0.025
Lípidos ²	0.222	0.229	0.373	0.020
PxL ²	0.806	0.000	0.135	0.105

¹Probabilidad para ANOVA de una vía entre tratamientos. Valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Prueba de Duncan, P=0.05). ² ANOVA de dos vías (P<0.05).

DISCUSION

1. Desarrollo gonadal de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

Los resultados mostraron que el IGS permite estimar la condición reproductiva de hembras de *C. quadricarinatus* en primera madurez. Adicionalmente, es evidente que las fuentes externas de proteína y energía son necesarias para la acumulación de nutrientes en la gónada. Además los valores de IGS registrados fueron mayores a lo anteriormente reportado para esta especie. El modelo de flujo de utilización de reservas (proteína, lípidos y carbohidratos) entre el hepatopáncreas y la gónada durante la oogénesis es similar a los resultados obtenidos en otros decapados (por ejemplo: Castille y Lawrence, 1989; Lee y Chang, 1997). Una correlación inversa entre el IHS y el IGS sugiere una transferencia continua de reservas de energía del hepatopáncreas a la gónada para activar y sostener la gametogénesis. Esta tendencia confirma los resultados reportados por Rodríguez-González (2001) para esta especie y son similares a los resultados observados para otros decápodos, como *Penaeus aztecus* y *Penaeus setiferus* (Castille y Lawrence, 1989), *Penaeus monodon* (Millamena y Pascual, 1990) y *Macrobrachium rosenbergii* (Cavalli *et al.*, 2001). Palacios *et al.* (2000), considera que la transferencia de nutrientes esta influenciado por el aporte de nutrientes a partir de la dieta que consumen.

En este estudio, el nivel más alto de proteína en la gónada fue observado a mayor grado de desarrollo gonadal. Resultados similares han sido reportados en

Parapenaeosis hardwickii (Kulkarni y Nagabhushanam, 1979), *Crangon crangon* (Spaargaren y Haefner, 1994), y *Penaeus indicus* (Quinitio y Millamena, 1992). Para *C. quadricarinatus*, Abdu *et al.*, (2000) encontraron un aumento en la concentración de la proteína en la gónada, como resultado de una movilización activa de reservas de energía de fuentes exógenas a la gónada y su introducción al ovocito por endocitosis. De la misma manera, Yano y Chinzei (1987) indicaron que un aumento en la proteína en hembras cercanas a la madurez o maduras de *P. japonicus*, está asociado con el crecimiento rápido de los ovocitos durante las últimas fases de vitelogénesis. En *C. quadricarinatus* la molécula del vitelina sirve como un vehículo para el transporte de lípidos y por ende de energía, como una lipoglicoproteína (Serrano-Pinto *et al.*, 2003). Dentro de este contexto, la falta de correlación entre la concentración de proteína del hepatopáncreas y la madurez gonadal (IGS) es consistente con las observaciones de Chang y O'Connor (1983) para los crustáceos. Castille y Lawrence (1989) sugirieron que se usa proteína del hepatopáncreas para el desarrollo del gonadal en *P. aztecus*, pero el contenido total de proteína del hepatopáncreas no es variable como consecuencia de la síntesis de la lipoproteína. Serrano-Pinto *et al.* (2004), demostraron que el hepatopáncreas es el sitio extra-ovárico de síntesis de lipoproteínas (vitelogenina) en *C. quadricarinatus*.

En este estudio cambios en la cantidad de lípidos en el hepatopáncreas y la gónada durante la maduración, sugieren una transferencia de este combustible a la gónada. Esto es consistente a los resultados obtenidos de la evaluación histoquímica, donde el IL en los ovocitos presentó una alta correlación con el

grado de desarrollo de la gónada. De manera similar, Galois (1984) reporta una acumulación de lípidos en la gónada durante la maduración de *P. indicus*. Así mismo, otros autores también han reportado movilización activa de reservas de lípidos de los tejidos del almacenamiento (hepatopáncreas y tejido adiposo) a la gónada para la formación de gametos en crustáceos (Galois, 1984; Castille y Lawrence, 1989; Mourente *et al.*, 1994; Rodríguez-González, 2001). Mourente *et al.* (1994) reportan que la acumulación de lípidos en el desarrollo de los ovocitos del cangrejo *Uca tangeri* depende principalmente del alimento consumido. En *C. quadricarinatus*, este mecanismo podría indicar que los lípidos requeridos para la maduración vienen de la dieta suministrada a los reproductores. Sin embargo, se requiere más investigación para confirmar esto y determinar si se presenta una movilización adicional de las reservas.

Por otro lado, el nivel de carbohidratos en la gónada disminuyó durante la maduración. Normalmente se ha reportado que los carbohidratos son una fuente importante de energía inmediata durante las fases tempranas de desarrollo gonadal. El valor máximo de IC corresponde a la fase del vitelogénesis primaria de los ovocitos. Esta fase fue la más frecuente (44.6%) durante las primeras fases de desarrollo de la gónada ($IGS \leq 1$), disminuyendo posteriormente conforme el IGS aumentó. La reducción en la frecuencia de ovocitos en fase de vitelogénesis primaria se acompañó por una disminución de carbohidratos en la gónada. Se ha demostrado que los carbohidratos pueden ser utilizados como una fuente de energía, reduciendo el consumo de proteína (Bautista, 1986). También se han observado niveles bajos de carbohidratos en huevos y embriones de *C.*

quadricarinatus (García-Guerrero *et al.*, 2003a), sugiriendo que este componente no se usa como una fuente importante de energía durante el desarrollo embrionario. Observaciones similares han sido hechas para otros decápodos (Clarke, 1982; Roustaian y Kamarudin, 2001).

La relación óptima de proteína y energía (P/E) es esencial para la deposición eficaz de nutrientes, dónde la proteína disponible se usa principalmente para el desarrollo gonadal y los requerimientos de energía, tanto de reserva como de consumo, son cubiertos por lípidos y en menor grado, por carbohidratos (Cortés-Jacinto *et al.*, 2004). La P/E de la dieta en el presente estudio se encuentra dentro del intervalo (13 – 17 mg/kJ) considerado óptimo para los crustáceos (Cuzon y Guillaume, 1997). Los niveles de carbohidratos en el hepatopáncreas permanecen sin alteración conforme el IGS se incrementa. Como se mencionó anteriormente, los carbohidratos en la gónada disminuyen durante la maduración, por lo que se sugiere que este combustible tiene menor importancia y no requiere ser proveído durante el desarrollo gonadal.

El diámetro y el núcleo del ovocito aumentaron significativamente durante la maduración de la gónada. Un comportamiento similar es reportado por Abdu *et al.* (2000), para la especie. Cambios en la frecuencia de los diferentes estados de desarrollo de ovocitos se han usado como indicadores del grado de madurez ovárica en los crustáceos (Palacios *et al.*, 1999). Por ejemplo, la frecuencia relativamente similar de ovocitos en diferentes fase de desarrollo en el langostino de agua dulce *M. rosenbergii* indican sincronización en el desarrollo de la gónada

(O'Donovan *et al.*, 1984). En este estudio, la presencia de ovocitos en diferentes fases de desarrollo sugiere que algunos ovocitos crecen rápidamente incorporando la vitelina, mientras otros permanecen inactivos. Observaciones similares han sido reportadas por Sagi *et al.* (1996) para la especie, registrando un valor máximo de IGS de 5, para organismos colectados al azar en estanques de tierra y tanques de laboratorio. En el presente estudio, el valor más alto IGS fue de 9. Estas diferencias pueden relacionarse con diversos factores, incluso con la variabilidad genética; sin embargo, se considera que la diferencia con el estudio de Sagi *et al.* (1996), es posiblemente resultado de utilizar una dieta con un nivel óptimo de P/E (32 % proteína y 17 mg/kJ; Rodríguez-González, 2001), y de ofrecer condiciones apropiadas a las hembras (temperatura y fotoperiodo controlado). Los ovocitos vitelogénicos secundarios alcanzan la frecuencia máxima a un IGS = 4.06. A un IGS más alto, los ovocitos vitelogénicos secundarios disminuyeron en número y los postvitellogénicos aparecen en forma dominante.

Un adecuado entendimiento de la dinámica de utilización de nutrientes durante el desarrollo del gonadal en *C. quadricarinatus* contribuye a reforzar el éxito de la producción comercial de huevos y juveniles. La relación entre la frecuencia del ovocitos y IGS muestran que, para la acuicultura, IGS = 4 representan una fase de desarrollo ideal por introducir a los machos para iniciar el proceso de reproducción, debido a que se presenta el porcentaje más grande de ovocitos correspondientes a la fase secundaria y empieza a aumentar significativamente la proporción de ovocitos en etapa final (postvitellogénicos). Se

concluye que este estudio muestra que el IGS puede usarse como un indicador fiable para determinar la condición de hembras de *C. quadricarinatus* en etapa reproductiva. Sin embargo, es necesario evaluar otros indicadores predictivos. Por ejemplo, Arcos *et al.* (2003), determinaron que niveles de vitelogenina en hemolinfa podrían ser usados como un criterio predictivo de la capacidad de madurar, en *L. vannamei*, lo que implica un ahorro en tiempo y mantenimiento de organismos.

2. Calidad del huevo de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

Ha sido comprobado que la dieta juega un papel muy importante en la reproducción de organismos acuáticos bajo condiciones controladas (Goos y Richter, 1996; Cavalli *et al.*, 1999; Wouters *et al.*, 2001). Diversos estudios reportan que variaciones en la composición de la dieta se ven reflejados en cambios en la frecuencia de desoves, fecundidad (Cahu, 1998; Wouters *et al.*, 2000), tasa de eclosión, composición química (Cavalli *et al.*, 1999; Cavalli *et al.*, 2000), talla o peso del huevo (Bromage *et al.*, 1991; Izquierdo *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2001), calidad larvaria (Racotta *et al.*, 2003) entre otros.

En el presente estudio se registraron variaciones en la fecundidad, número de desoves, peso de las hembras, tamaño, peso y contenido de carbohidratos en el huevo al variar los niveles de proteínas y lípidos en la dieta. Para los otros parámetros, no se presentaron diferencias significativas (ejem.: composición de

proteínas, lípidos y energía en huevo). Es posible que esto se deba a la alta digestibilidad de los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas (Campaña, 2001), y la eficiencia energética de *C. quadricarinatus* (Villarreal, 1987), que pueden además ser factores que contribuyen a enmascarar la deficiencia de una dieta baja en proteínas y lípidos en experimentos sin restricción del consumo de alimento (Guillaume, 1997).

Además, algunos estudios reportan que las demandas energéticas en crustáceos pueden ser cubiertas de manera adecuada por un aumento del nivel de carbohidratos en la dieta (Capuzzo, 1982; Koshio *et al.*, 1990; Cruz Suárez *et al.*, 1994). De hecho, un aumento de la cantidad de carbohidratos en la dieta 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 (Palacios, 1999). Dietas con un bajo nivel de proteínas y lípidos utilizados en el presente estudio presentaron un alto contenido de carbohidratos en el huevo (42 a 67%). Recientemente, se ha demostrado que *C. quadricarinatus* posee un sistema digestivo capaz de degradar celulosa y sustratos similares (Xue *et al.*, 1999). Además, López-López *et al.* (2003), observan que el efecto de la suplementación de ingredientes en el crecimiento y la actividad enzimática digestiva, presentan una correlación positiva entre crecimiento y el contenido de carbohidratos en la dieta, y sugieren que *C. quadricarinatus* tiene la capacidad de modificar los niveles de enzimas en el hepatopáncreas de acuerdo a la digestibilidad de la dieta.

Por otro lado, los crustáceos se alimentan para satisfacer sus requerimientos energéticos para el crecimiento, actividad muscular y reproducción. Sin embargo, el exceso o insuficiencia en los niveles de energía en la dieta reduce la tasa de crecimiento o la reproducción (New, 1987; Harrison, 1997). En este estudio, el crecimiento de hembras de *C. quadricarinatus* fue menor con dietas con 18% PC, lo que sugiere que el organismo sacrifica la energía para crecer y la utiliza para el gasto de reproducción. Esta misma estrategia es reportada por Ra'Anan (1991), para *M. rosenbergii*. Además se considera que la sustitución de proteína por carbohidratos en la dieta genera un exceso de energía no proteica (de carbohidratos y/o lípidos) lo cual puede retardar el crecimiento de una especie (Rosas *et al.*, 2001). En este estudio, dietas con bajo nivel de proteína y lípidos en este estudio presentaron alto contenido de carbohidratos, lo pudiera influenciar en la disminución del crecimiento de hembras de *C. quadricarinatus*.

Para *C. quadricarinatus*, Abdu *et al.* (2000), reportan un aumento en la concentración de nutrientes en la gónada durante la maduración, como resultado de una movilización activa de reservas de energía de las fuentes exógenas. En este estudio, se determinó la composición química del músculo y hepatopáncreas para determinar si se presentaban cambios en los dos anteriores órganos, en función del nivel de proteína y lípidos en la dieta, y si se utilizaban reservas de energía de estos tejidos. No se observaron variaciones en la composición química del músculo y hepatopáncreas, lo que sugiere que *C. quadricarinatus* al parecer solo reduce su crecimiento para ahorrar energía. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis, debido a que existen pocos estudios que

evalúan la influencia de dieta en la composición química de músculo y hepatopáncreas (Guillaume, 1997; Rodríguez-González, 2001).

En el presente estudio se presentó un nivel óptimo de P/E (17 mg/kJ) que maximiza el número de desoves. Esto sugiere que para esta ración de P/E, se reúnen los requerimientos nutricios para las hembras reproductoras. Aunque no hay estudios que determinen el nivel óptimo de proteínas que maximicen el número de desoves en hembras de *C. quadricarinatus*, existen trabajos que reportan valores similares para el desarrollo gonadal (17.16 mg/kJ; Rodríguez-González, 2001) y crecimiento de juveniles (16.3 mg/kJ; Cortés-Jacinto *et al.*, 2003).

Por otro lado, King (1993) propone una fórmula para la determinación de la fecundidad con relación al peso de las hembras de *C. quadricarinatus*. Aplicando la fórmula con el peso promedio final de las hembras (42 g), se obtiene un valor de 378 huevos por hembra, el cual es similar a lo obtenido en este estudio con los diferentes tratamientos.

Se ha definido calidad del huevo como la habilidad de éste para ser fertilizado y garantizar el desarrollo embrionario de una especie (Holcomb *et al.*, 2004). Las variables morfológicas de los huevos, talla, color, porcentaje de eclosión, composición química, y niveles específicos de nutrientes, generalmente son consideradas como buenos indicadores de la calidad del huevo (Clarke *et al.*,

1990; Lavens *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1991; Racotta *et al.*, 2003; García-Ulloa *et al.*, 2004). En este estudio, dietas con 32% proteína cruda y 8% lípidos (17.16 mg/kJ de P/E) presentan valores mayores en el diámetro, volumen, área, y peso del huevo. La media de la talla del huevo obtenido en nuestro estudio (2.60 mm) coincide con el tamaño de ovocitos antes del desove (2.55 mm) reportado por Sagi *et al.* (1996).

Por otro lado, en los dos experimentos de calidad de huevo, no se presentaron cambios en la composición química (proteína, lípidos, carbohidratos) y contenido energético entre tratamientos. Por ello, este parámetro no se considera un buen indicador de calidad de huevo en las condiciones de estos estudios.

Se evaluó la concentraciones de vitelina contenida en los huevos debido a que, aparentemente la molécula de vitelina sirve como vehículo para el transporte de energía, como lipoglicoproteína en *C. quadricarinatus* (Serrano-Pinto *et al.*, 2003). Sin embargo, tampoco se observaron cambios en el contenido de este compuesto en los huevos. En función a la dieta, esta respuesta se puede deber a dos factores; García-Guerrero *et al.* (2003a), determinaron que la composición química de huevos en *C. quadricarinatus* presenta una alta variabilidad. Por otro lado, la estrategia del reproductor también juega un papel importante. *C. quadricarinatus* tiene una fecundidad relativamente baja y presenta cuidados maternos (Holdich, 2002). Con base en esta estrategia, se sugiere que las hembras reproductoras buscan garantizar la calidad del huevo usando diferentes

fuentes de nutrientes, y desovando sólo después de que la composición química del huevo sea equilibrada y uniforme.

Finalmente, es importante destacar que al incluir 32% PC y/o 8% LIP se registran valores significativamente más altos o una tendencia a mostrar el valor promedio más alto en la mayoría de las variables registradas (número de desoves, fecundidad, talla del huevo, contenido de proteínas y energía en el huevo). Esto coincide con el trabajo de Rodríguez-González (2001), encontrando los niveles óptimos de proteína y lípidos para el desarrollo gonadal de *C. quadricarinatus*.

Por otro lado, Cortés-Jacinto *et al.* (2004), indican que el requerimiento de proteína para preadultos de *C. quadricarinatus* es de 26% PC durante la engorda. La comparación de ambos trabajos indican que el requerimiento es menor en la etapa no reproductiva, y se espera que los requerimientos de proteínas y lípidos aumenten durante la maduración y reproducción de la especie (Harrison, 1990). En dietas comerciales para otros decápodos, como el camarón en general contienen en general de 10-20% mas que para la etapa de engorda, con lo que se busca satisfacer los requerimientos nutricios durante el periodo reproductivo de los organismos. Los nivel de lípidos óptimos (8%) encontrados se encuentra dentro del intervalo que se recomienda para dietas artificiales de maduración de decápodos (Wouters *et*

al., 2001). En general, niveles de inclusión de lípidos altos (>10%) pueden afectar la tasa de ingestión (Aranyakananda y Lawrence, 1993).

Es posible que no se hayan presentado variaciones en algunos parámetros debido a la capacidad compensatoria que parecen tener los decápodos para obtener proteína al incrementar el consumo (Palacios, 1999). Al parecer *C. quadricarinatus* cambia su estrategia alimenticia hasta obtener un óptimo energético y nutricional que le permite maximizar el proceso reproductivo. En consecuencia, se propone que *C. quadricarinatus*, es capaz de acumular los nutrientes necesarios para el proceso reproductivo a partir de la alta digestibilidad de los ingredientes utilizados en las dietas experimentales (Campaña, 2001). Sin embargo, en procesos de cultivo comercial, es deseable que una dieta peletizada contenga niveles óptimos de proteína y lípido, a fin de optimizar el proceso reproductivo (Harrison, 1990; Villarreal y Pelaez, 1999; Wounters *et al.*, 2001). En este caso 32% PC y 8% LIP cumplen con este propósito.

Es evidente que algunos criterios de evaluación de calidad de huevo utilizados en este estudio no fueron suficientemente sensibles, posiblemente por la falta de restricción de alimento. Se sugiere utilizar una estrategia de restricción del alimento para evaluar el efecto de variaciones en la concentración de proteínas y lípidos en las variaciones en la composición de aminoácidos y ácidos grasos, de la dieta de los reproductores.

3. Calidad del juvenil de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

Es de esperarse que la variación de los niveles de proteína y lípidos incluidos en la dieta, influye también en la calidad de juvenil de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*. Actualmente la producción de juveniles en cantidades suficientes y calidad aceptable representa uno de los principales “cuellos de botella” en la producción de organismos acuáticos bajo condiciones controladas (García-Ulloa, 2000). De ahí surge la necesidad de identificar las larvas y/o juveniles de buena condición fisiológica, que se considera presentan mejor supervivencia en condiciones subóptimas, asegurando el éxito de la progenie durante la fase de la engorda (Racotta *et al.*, 2003). Se ha comprobado que la condición y supervivencia de juveniles es parcialmente determinada por el estado de los progenitores, su condición nutricional y la calidad y cantidad de reservas en los huevos. En nuestro estudio variables de producción como el número de juveniles eclosionados por tratamiento experimental, se maximiza cuando la dieta presentaba un valor de 16 mg/kJ de proteína y energía (P/E), lo cual es similar al óptimo encontrado en estudios previos para el número de desoves (17.1 mg/kJ; P/E) y talla y peso del huevo (17.16 mg/kJ; P/E) en este trabajo. Así mismo, datos similares han sido reportados por Cortés-Jacinto *et al.* (2003), quienes señalaron que a P/E de 16.30 mg/kJ se optimiza el crecimiento de juveniles de la misma especie. De manera similar, Jones *et al.* (1996), en *C. destructor* también reportan un valor similar para el crecimiento de juveniles (15.96 mg/kJ).

Por otro lado, se define la calidad del juvenil dependiendo de la respuesta de los organismos a diferentes criterios como: composición química, supervivencia, talla y pruebas de estrés, entre otros muchos criterios, los cuales pueden ser muy subjetivos. Bray y Lawrence (1991), evalúan la calidad de los juveniles por medio de su desempeño en la engorda, tomando en cuenta supervivencia y tamaño final. En el presente trabajo se determinó la calidad del juvenil mediante los criterios comúnmente usados (composición química, talla y respuesta a pruebas de estrés). En relación a la composición química y talla de los juveniles, no se presentaron diferencias estadísticas. Es posible que no se encuentren diferencias en la calidad del juvenil debido a que en los experimentos de calidad de huevo, no hubo variación en el contenido químico del huevo, al variar la dieta de los reproductores.

Se sabe que las evaluaciones de capacidad de respuesta al estrés, se basan en el hecho de que la condición fisiológica del organismo, se determina su habilidad de sobrevivir a las condiciones medioambientales adversas. Se han propuesto varios métodos para estimar calidad larval en crustáceos (Bray y Lawrence, 1992; Samocha *et al.*, 1998; Racotta *et al.*, 2003). Estos métodos incluyen exposición de organismos, a condiciones extremas, como baja salinidad (Samocha *et al.*, 1998), baja temperatura, formalina, alta concentración de amonio, bajo nivel de oxígeno disuelto y otros (Bray y Lawrence, 1992; Racotta *et al.*, 2003) por periodos cortos. Para realizar dichas pruebas de estrés, primero es necesario determinar la dosis letal del 50% de la población (LC_{50}) en un tiempo determinado (Bray y Lawrence, 1992).

Los niveles de LC₅₀ para pruebas de amonio del presente estudio presentan diferencias con lo reportado para *C. quadricarinatus* por Meade y Watts (1995). Las diferencias encontradas pueden deberse a diferencias en factores ambientales como el pH y la temperatura del agua, así como en la talla de los organismos (Hernández, 2001). Sin embargo, los resultados de LC₅₀ en pruebas de amonio presentan valores similares a los reportados para *P. monodon* (Chin y Chen, 1987) y *M. ensis* (Chen *et al.*, 1991). En este estudio se evidencia que *C. quadricarinatus* es una especie que demuestra una alta tolerancia a la presencia de amonio en el agua. Los resultados obtenidos (LC₅₀) en la prueba de salinidad e hipoxia son difícilmente comparables, ya que no existen en la literatura reportes de estudios similares para esta especie y la mayoría de estos se han realizado en especies de crustáceos marinos. Sin embargo, la prueba de cambio de salinidad es la más utilizada en la evaluación de la respuesta del organismo a cambios de concentraciones abruptas del medio de donde viven (Cavalli *et al.*, 2000). A pesar de ello en la actualidad, no existen evidencias claras que garanticen un mejor rendimiento de los organismos en etapa de engorda comercial al seleccionar una mayor resistencia a cambios de salinidad, ya que esta evalúa principalmente la capacidad osmorreguladora de los organismos. Por ello se considera que las pruebas de estrés son una forma de evaluar su condición fisiológica y no de su capacidad de crecimiento (Álvarez *et al.*, 2004).

Con relación a las pruebas de estrés aplicadas a juveniles obtenidos de hembras alimentadas con diferente nivel de proteína y lípidos en la dieta,

encontramos que se presenta un efecto del contenido de proteína en la dieta y la respuesta a las diferentes pruebas de estrés (hipoxia, salinidad y amonio). El efecto de los niveles de lípidos incluidos en la dieta solo se reflejó en la prueba de amonio, por lo que se sugiere que esta prueba presentó mayor sensibilidad que las otras (amonio y salinidad). Se ha demostrado que la prueba de estrés de amonio es más sensible y reproducible para establecer la calidad larval en *M. rosenbergii* en fases tempranas de desarrollo (Cavalli *et al.*, 2000). De manera general, Cavalli *et al.* (2000), comprobaron la eficacia de alimentar larvas de langostino con nauplios de artemia enriquecidos con altos niveles de ácidos grasos y vitamina C. Sus resultados demostraron la influencia de la calidad de la dieta en el desarrollo de las larvas, pues los organismos alimentados con dieta enriquecida presentaron mejores resultados en crecimiento, metamorfosis y resistencia a estrés de amonio, que aquellos alimentados con nauplios de artemia en ayuno. En penidos, específicamente en *L. vannamei*, se observó una correlación positiva entre la supervivencia de zoea a la prueba de estrés a altas concentraciones de amonio y la supervivencia al estadio de postlarvas (Racotta *et al.*, 2003).

Por otro lado, es posible que las pruebas de estrés de salinidad y/o hipoxia sean menos sensibles, debido a que la especie tiene mayor tolerancia a variaciones de salinidad y capacidad de adaptación a bajos niveles de oxígeno, esto hace que la respuesta sea menos clara (Cavalli *et al.*, 1999; Thuy, 1999; Cavalli *et al.*, 2000). *C. quadricarinatus* es una especie eurihalina que también resiste condiciones altas de hipoxia, debido a que las poblaciones de langosta de

agua dulce en su hábitat natural se extienden desde esteros salinos a ríos ubicados en zonas montañosas lo que aunado al hecho de realiza migraciones frecuentes, las hace capaces de resistir niveles bajos de oxígeno (Villarreal y Peláez, 1999). Sin embargo, se observa que el nivel de inclusión de proteína en la dieta de hembras presenta una variación en la respuesta a las pruebas de estrés de los juveniles producidos. Es posible que esto se deba a que las proteínas no son solo una fuente de energía metabólica para los reproductores, sino que también son el componente más abundante en los crustáceos y juegan un papel importante en el transporte de otras moléculas, como mediadores y catalizadores de reacciones químicas y constituyen el mas numerosos grupo de hormonas (Stryer, 1990). Además las proteínas representan el componente mas abundante en el contenido de los huevos (García-Guerrero *et al.*, 2003a). García-Guerrero *et al.* (2003a) describe la variación del contenido proteína en el huevo durante el desarrollo embrionario, así como, el contenido de lípidos y carbohidratos. Por otro lado, aparentemente su función principal no es el aporte de energía en el desarrollo embrionario, ya que en estas etapas la principal fuente de energía proviene de los lípidos. Más bien, las proteínas que se encuentran en el vitelo del huevo se utilizan para la síntesis de tejidos y enzimas. Algunos aminoácidos libres tienden a acumularse en el huevo para el desarrollo del embrión y se les ha atribuido un posible papel en la osmorregulación, por lo que se extiende a los juveniles recién eclosionados (Claybrook, 1983; García-Guerrero *et al.*, 2003a).

De los resultados del presente estudio, puede concluirse nuevamente que dietas con 32% PC y 8% LIP es adecuada para la producción de juveniles de

optima calidad de *C. quadricarinatus*. Esta ración es similar a lo recomendado para calidad del huevo en este trabajo, desarrollo gonadal (Rodríguez-González, 2001), crecimiento de pre-adultos (Cortés-Jacinto *et al.*, 2004) y juveniles (Cortés-Jacinto *et al.*, 2005). Esta información debe contribuir al desarrollo de dietas prácticas nutricionalmente balanceadas para la reproducción de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

4) Discusión General

A partir de la década de los 80's, surgen los primeros estudios relacionados con el control y la inducción de la maduración en reproductores de crustáceos, particularmente para camarones peneidos (Harrison, 1990). Para la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, se ha estudiado el efecto de ablación del tallo ocular (Sagi *et al.*, 1997) y la inyección de hormonas (Abdu *et al.*, 2001) en la reproducción. También se ha determinado potencial de fecundidad (King, 1993), el ciclo anual de desoves (Yeh y Rouse 1994; Barki *et al.*, 1997), el control ambiental (Yeh y Rouse, 1995) y otros estudios relacionados con el ciclo reproductivo (Jones, 1988; Yeh y Rouse, 1995; Sagi *et al.*, 1995; Sagi *et al.*, 1996; Sagi *et al.*, 1997; Villarreal *et al.*, 1999; Serrano-Pinto *et al.*, 2003). Sin embargo, existe poca información sobre los requerimientos nutricionales de reproductores y el efecto de la dieta sobre la calidad de la progenie. Por lo que en este estudio, se evaluó la dinámica de la utilización de los nutrientes durante el desarrollo gonadal y se

optimizó la etapa reproductiva, mediante la definición de una dieta óptima con relación a la calidad de progenie, de hembras reproductoras de *C. quadricarinatus*.

En la primera fase, utilizando el IGS como una variable comúnmente usada para determinar el desarrollo de la gónada de algunas especies de crustáceos, en la acuicultura, se determinó la relación de esta variable con la dinámica de nutrientes durante el desarrollo del gonadal en *C. quadricarinatus*. Los estudios relacionados con la variación de componentes químicos en la gónada son muy diversos en diferentes especies de crustáceos (Carrillo *et al.*, 1993; Cavalli *et al.*, 1999; Cavalli *et al.*, 2000; Palacios *et al.*, 2000). Sin embargo, no existen reportes para hembras de langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, debido a que es una especie que recientemente se ha incorporado a la acuicultura. Por ejemplo, los estudios de morfología gonadal de langosta de agua dulce, son recientes (Sagi *et al.*, 1996). Existen otros reportes relacionados con el cultivo y la reproducción de la especie (vgr. Sagi, *et al.*, 1995; Yeh y Rouse, 1995; Sagi *et al.*, 1996; Sagi *et al.*, 1997; Silkovsky *et al.*, 1998; Verhoef *et al.*, 1998; Villarreal y Pelaez, 1999). En este estudio, definimos un valor de IGS (4) que representan una fase de desarrollo ideal para introducir a los machos a los estanques durante la reproducción, debido a que se presenta el porcentaje más alto de ovocitos en fase de vitelogénesis secundaria y empiezan a aumentar significativamente el número de ovocitos en etapa final. Además, este estudio muestra que el IGS puede usarse como un indicador confiable para determinar la condición de hembras en estado reproductivo de *C. quadricarinatus*.

En las dos fases siguientes, el enfoque del presente trabajo fue definir una dieta óptima en términos de proteínas y lípidos para hembras reproductoras de *C. quadricarinatus*, con relación a la calidad del huevo y del juvenil producido. Los estudios enfocados a la nutrición de reproductores generalmente consideran los requerimientos de proteínas o lípidos, en función de la composición de estos nutrientes en las gónadas de hembras maduras (Middledich *et al.*, 1979; Harrison, 1990; Mohamend y Diwad, 1992; Millamena *et al.*, 1993). En organismos con desarrollo lecitotrófico uno de los factores que puede afectar la condición fisiológica de huevos y juveniles producidos, es la nutrición de los reproductores. De esta manera se suministran, a través de raciones alimenticias, componentes que probablemente utilizan los organismos durante el proceso reproductivo (Palacios, 1999). Se sugiere que la calidad de la progenie es parcialmente controlada por la dieta que reciben los reproductores, particularmente en el caso de las hembras (Bromage *et al.*, 1991; Racotta *et al.*, 2003).

Por otro lado, la calidad del huevo y/o juvenil ha sido evaluada utilizando diversos parámetros. Algunos de los parámetros que se han empleado son: peso seco, transparencia, contenido de energía, enzimas o vitaminas, volumen y talla del huevo, porcentaje de fertilización, fecundidad y morfología y viabilidad de los estadios larvales (De Caluwé, 1995; García-Ulloa, 2000; Racotta *et al.*, 2003). Sin embargo, estos parámetros definidos para algunas especies han sido extrapolados, creando confusión al interpretar los resultados. Por ello, es importante la caracterización y determinación de criterios que determinen la calidad para cada especie (Rodríguez-González, 2001). En el presente estudio,

parámetros como número de desoves, fecundidad, talla y peso del huevo, número de juveniles y respuesta a la prueba de estrés de los juveniles producidos, demostraron ser indicadores fiables para determinar el efecto de las variaciones en la composición de la dieta de reproductoras de *C. quadricarinatus* durante el proceso de reproducción.

Es importante tomar en cuenta que es difícil determinar de forma precisa los niveles óptimos de proteínas y lípidos en la dieta con relación a la calidad de progenie, ya que los organismos pueden compensar una dieta conteniendo un nivel más bajo de un nutriente, con un mayor consumo de alimento (Palacios, 1999). Sin embargo, el presente trabajo sugiere un nivel óptimo de 32% proteína, 8% de lípidos y 16.4 ± 0.6 mg/kJ P/E, ya que optimiza el proceso reproductivo de hembras de *C. quadricarinatus*. Estos valores óptimos de proteína y lípidos son similares a los recomendados para el desarrollo gonadal (Rodríguez-González, 2001), crecimiento de pre-adultos (Cortés-Jacinto *et al.*, 2004) y juveniles (Cortés-Jacinto *et al.*, 2005) de esta especie. Así mismo, Cortés-Jacinto *et al.* (2003), encuentran valores similares con el contenido de proteína/energía (P/E) incluido en la dieta (16.30 mg/kJ) el cual optimiza el crecimiento de juveniles de la especie. Por otro lado, es evidente que algunos criterios de evaluación de calidad de huevo y juvenil utilizados en este estudio no fueron suficientemente sensibles, posiblemente por la falta de restricción de alimento suministrado y la capacidad compensatoria de los organismos.

CONCLUSIONES

- A valores de IGS=4 se presenta una fase de desarrollo ideal para introducir a los machos en los estanque de reproducción. Lo anterior se sustenta en un mayor porcentaje de ovocitos en etapa de vitelogénesis secundaria y el aumentó inicial de ovocitos en etapa final (postvitelogénicos).
- En este estudio se registraron valores máximo de IGS (IGS = 9), que fueron mayores a lo anteriormente reportado para esta especie, indicando la existencia de condiciones óptimas para la reproducción.
- El IGS es un indicador fiable que puede usarse para determinar la condición de reproductoras de *C. quadricarinatus*.
- Dietas con bajo nivel de proteína (18% PC) se traduce en bajo crecimiento de las hembras, lo cual, en conjunto con la actividad reproductiva sostenida, sugiere que el organismo sacrifica la energía para crecer y la utiliza para el gasto de reproducción.
- Parámetros como número de desoves, fecundidad, tamaño y peso del huevo, número de juveniles y respuesta a la prueba de estrés de los juveniles producidos, puede usarse como un indicador fiable para determinar el efecto

de las variaciones en la composición de la dieta de reproductoras de *C. quadricarinatus* durante el proceso de reproducción.

- No se presentaron cambios en la composición bioquímica (proteína, lípidos, carbohidratos y vitelina) y contenido energético del huevo y juvenil. Se sugiere que hembras reproductoras busca garantizar la calidad de la progenie usando diferentes fuentes nutrientes, y desovando sólo después de que la composición química huevo sea equilibrada y uniforme. Con lo anterior se sugiere que estos indicadores no son lo suficientemente sensibles y eventualmente solo se pueden utilizar para detectar condiciones claramente deficientes.
- Para *C. quadricarinatus* hembras alimentadas dietas con 32% proteína, 8% de lípidos y 16.4 ± 0.6 mg/kJ P/E presentan una mejor respuesta a indicadores de calidad en huevo y juvenil, lo cual se sugiere que optimiza el proceso reproductivo.

BIBLIOGRAFIA

- Abdu, U., Yehezkel, G., Sagi, A., 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invert. Repro. Dev.* 37, 75-83.
- Abdu, U., Barki A., Karplus I., Barel S., Takac P., Yehezkel, G. Laufer H., Sagi, A., 2001. Physiological effects of methyl farnesoate and pyriproxyfen on wintering female crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 202, 163-175.
- Adiyodi, R.G. 1985. Reproduction and its control. In: *The Biology of Crustacea*. Edited by Bliss D.E. and Mantel H.L. Vol. 9, pp. 147-217. Academic Press, Orlando, Florida.
- Akiyama, D. M., Dominy, W.G. 1989. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. In. "Texas Shrimp Farming Manual, Vol. 1: Grow-out technology". Texas Agricultural Extension Service and Texas A&M University Sea Grant College Program, pp 1-50.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A.L. 1999. Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. y Mendoza, R. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola I. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutricional y Tecnología de Alimentos para Acuicultura*, 22 – 24 de febrero de 1993. Monterrey, Nuevo León, México.
- Alva, V.R., Kanazawa, A., Teshima, S.I., Koshio, S. 1993. Effects of dietary vitamins A, E and C on the ovarian development of *Penaeus japonicus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* Vol. 59, no.7, p. 1235-1241.

- Alvarez M., Cahu C., Stéphan G. 1989. Teneur en alpha tocopherol des oeufs et des organes des reproducteurs de *Penaeus indicus*. *Oceanis*, 15 (4), 553-560.
- Álvarez, A. L., Racotta, I.S. Arjona O., Palácios, E. 2004. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 237, 237-249.
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist. 16th. Ed. Washington, D.C., U.S.A. 935 pp.
- Aranyakananda, P., Lawrence, A.L. 1993. Dietary protein and energy requirements of the with legged shrimp, *Penaeus vannamei* and the optimal protein energy ratio. In: Carrillo M., Dahle, L., Morales, J., Sorgeloos, P., Svennevig, N., Wyban, J. (Eds). Discovery to commercialization. Oostende Belgium European Aquaculture Society, no 19, p 21.
- Arcos G.F., Ibarra A.M., Palacios E., Vázquez-Boucard C., Racotta I.S. 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Egg quality and female physiological condition. *Aquaculture* 228: 335-347.
- Armstrong. D.A., Chippendale, D., Knight, A.W., Colt, J.E. 1978. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.* 154, p.15-31.
- Austin, C.M. 1992. Preliminary pond production of the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* in the Central United States. *Journal of Applied Aquaculture* , 1(4): 93-102.

- Austin, C.M. 1995. Evolution in the Genus *Cherax* (Decapoda: Parastacidae).
Freshwater Crayfish 8; 12-31.
- Barnes H., Blackstock, J., 1973. Estimation of lipid in marine animals and tissues:
Detailed investigation of sulphophosphovanillin method for total lipids. J. Exp.
Mar. Biol. Ecol. 12, 103-118.
- Barki, A., Levi, T., Hulata G., Karplus I., 1997. Annual cycle of spawning and
molting in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under laboratory
conditions. Aquaculture 157, 239-249.
- Bautista, M.N., 1986. The response of *Penaeus monodon* juveniles to varying
protein/energy ratios in test diets. Aquaculture, 53, 229-242.
- Bliss, D.E. 1983. The Biology of Crustacean. Volumen 5 Internal Anatomy and
Physiological Regulation. Editorial Academic Press. New York, USA. 453p.
- Bradford, M., 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.
Biochem. 72, 248-254.
- Bray W.A., Lawrence A.L. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus
stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. Journal of the World
Aquaculture Society, 21 (1), 41-52.
- Bray W.A., Lawrence A.L. 1991. New concepts in seedstock production: learning to
determine quality: International symposium on commercial production of
shrimp larvae, p. 1-16.
- Bray W.A., Lawrence A.L. 1992. Reproduction of *Penaeus* Species in captivity. En:
Fast New concepts in seedstock production: learning to determine quality:
International symposium on commercial production of shrimp larvae, p. 1-16.

- Bromage, N.R., Shields, R., Young, C., Bruce, M., Basavaraja, N., Dye, J., Smith, P., Gillespie, M., Gamble, J., and K. Rana. 1991. Egg quality determinants in finfish with special reference to the timing of stripping and methods of fertilization in the Atlantic halibut (*Hippoplossus hippoplossus*). Abstract pp. 201-202, in: LARVI'91. Lavens, P., Soorgelos, P., Jaspers E., Ollevier, F. Editor. European Aquaculture Society, special publication No. 15, Gent, Belgium.
- Brooks, S., Tyler, Ch.R., Sumpter, J.P. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in fish Biology and Fisheries*, 7:378-416.
- Cahu C. 1998. Diets for shrimp broodstock and their effect on larval quality. En: IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, La Paz, B.C.S., México.
- Campaña A.T. 2001. Digestibilidad de dietas e ingredientes para juveniles y pre-adultos de langosta australiana de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Red claw). Tesis de Maestra en Ciencias, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S.
- Capuzzo, J.M. 1982. Crustacean bioenergetic 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.
- Carrillo, M., Dahle, L., Morales, J., Sorgeloos, P., Svenneving, N., Wyban, J. 1993. Changes with ovary development in the lipid and protein levels of the ovary and digestive gland for ablated and non-ablated Australian *Penaeus monodon*. Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc. European Aquaculture Soc., Oostende (Belgium), no. 19, p. 147.

- Castille, F.L., Lawrence, L.A., 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of gonads and digestive glands of shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus* (L.). *J. Crust. Biol.* 9, 202-211.
- Cavalli, R.O., Lavens, P., Sorgeloos, P. 1999. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture*, 179, 387-402.
- Cavalli R.O., Menschaert G., Lavens P., Sorgeloos P. 2000. Maturation performance, offspring quality and lipid composition of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females feed increased levels of dietary fosfolipids. *Aquaculture International* 8: 41-58.
- Cavalli R.O., Tamtin, M., Lavens, P., Sorgeloos, P. 2001. Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. *Aquaculture* 193, 311-324.
- Chang, E., O'Connor, J., 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: *The Biology of Crustacea*, Vol. 5. Bliss, D.E., Mantel H.L. (Eds.). Academic Press, New Cork, pp. 263-287.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Bouaricha, N., Thuet, P., Aiken, D.E., Triller, J.P., 1998. Ontogeny of osmorregulation and salinity tolerance in two decapod Crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*: *Biol. Bull.*, 175, p.102-110.
- Chen J.C., Liu, P.C., Nan, F.H. 1991. Acute toxicity of ammonia to larvae of *Metapenaeus ensis*. *Asian Fisheries Sciences* 4, p. 41-51.
- Chen Y.N, Kuo C.M. 1998. Purification and characterization from the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zool. Stud.* 37, 126-136.

- Chin , T.S., Chen, J.C. 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 66; 247-253.
- Civera-Cerecedo, R. 1989. Effets du phytates de sodium sur la croissance et la mineralisation de divers tissus de crevettes panaeides (CRUSTCEA: DECAPODA). Role de ce composant en tant que source de phosphore et d'inositol. PhD tesis. Université de Bretagne Occidentale, Francia. 153 pp.
- Civera, R. 1993. Requerimientos minerales de los crustáceos. In Memorias del primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura, editados por: E.L. Cruz-Suárez, D. Rique y R. Mendoza. U.A.N.L. México, p.107-121.
- Civera, R., Villarreal, H., Goytortúa, E., Rocha, S. Vega, F., Nolasco, H., Pastén, J. y Camarillo, T. 1996. La langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína en dietas experimentales para camarón. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. y Mendoza, R. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 11 al 13 de Noviembre. Monterrey Nuevo León, México.
- Clarke, A., 1982. Lipid synthesis and reproduction in the polar shrimp *Chorismus antarticus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9, 81-90.
- Clarke, A., Brown, J. H., Holmes, L. J., 1990. The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B, 505-511.
- Claybrook D.L. 1985. Nitrogen Metabolism. En Bliss, D. y L.H. Mantel (Eds). The biology of crustacea. Vol. 5. Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press. Londres. p. 158-193.

- Cohen, J., 1998. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Lawrence Erlbaum Associates Publishers, Hillsdale, New Jersey, USA. 567 pp.
- Cortés-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., Martínez-Cordova, R., 2003. Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquacult. Nutr.*, 9, 207-213.
- Cortés-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., Naranjo Páramo, J., 2004. Effect of dietary protein level on the growth and survival of pre-adult freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von martens) in monosex cultura. *Aquacult. Res.* 35, 71-79.
- Cortés-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Cruz-Suárez, L.E., Civera-Cerecedo, R., Nolasco-Soria, H., Hernandez-Llamas, A., 2005. Effect of dietary protein and level on the growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von martens). *Aquacult. Nutr.* 11, 1-9.
- Cruz-Suarez, L.E., D. Ricque-Marie, J.D. Pinal-Mansilla, Wesche-Ebelling, P. 1994. Effect of different carbohydrate source on the growth of *Pennaeus vannamei*: economical impact. *Aquaculture* 123: 349-360.
- Cuzon, G., Guillaume, J., 1997. Energy and protein: energy ration. In: R.L. DÁbrano, E.D., Conklin and D.M. Akiyama (Eds.), *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture Society, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA.* 51-70.
- D'Abramo L.R., Bordner C.E., Baum N.A., Conklin D.E. 1991. Essentiality of dietary phosphatidylcholine for the survival of juvenile lobster. *J. Nutr.*, 111.

- D'Abramo L.R., Daniels, W.H. 1994. Sterol requirement of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. In Abstracts of World Aquaculture '94, 14-18 January 1994, New Orleans, p200. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- D' Abramo, L., Sheen, S.D.J. 1996. Requerimientos nutricionales, formulación de dietas prácticas alimenticias para el cultivo intenso del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*. En: Mendoza, R., Cruz S.E. y Ricque (Eds). Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 7-9 de noviembre de 1994. Monterrey, N.L. México. p. 81-101
- D'Abramo, L., Conklin D., Akiyama D. 1997. Crustacean Nutrition. Editorial World Aquaculture Society. 587 p.
- De Caluwe, J. 1995. Egg quality of *Macrobrachium rosenbergii*. Notas técnicas. Curso de Reproducción. Universidad de Gante, Belgica.
- Fan Li, M., Yun-Long, Z., Li-Qiao, S., Zhi-Min, G., Gu-Xing, X. y Qi-Wen, L. 2000. The study of embryonic development of *Cherax quadricarinatus*. I. Morphogenesis of external structures of embryo. Zool. Res., 21 (6): 468-472.
- Fernandez-Palacios, H., Montero, D., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Vergara, J.M. 1994. First studies on spawning, embryonic and larval development of *Dentex gibbosus* (Rafinesque, 1810)(Osteichthyes, Sparidae) under cooled conditions, Aquaculture 122:63-73 p.
- Galois, R.G. 1984. Variations de la composition lipidique tissulaire au cours de la vitellogenese chez la crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 84, 155-166.

- García T., Sánchez R., Andreatta E.R., Villarreal H., Arango J., Daqui L., Cruz E., Martínez C., Rosas C. 1996. Documento Final del Grupo de Trabajo sobre NUTRICION. En: Calderón J., Margallón F., Aderatta E. y Sánchez R., 1997. Memorias del Taller "La Investigación Científica de Camarones de Ibero América" CYTED/Subprograma II-A: Acuicultura.
- García-Guerrero, M., Racotta, I.S., Villarreal, H. 2003a. Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (DECAPODA:PARASTACIDAE). *Journal of Crustacean Biology*, 23(1): 1-6.
- García-Guerrero, M., Hendrickx M.E. y Villarreal, H. 2003b. Description of embryonic development of *Cherax quadricarinatus* Von Martens, 1868 (DECAPODA:PARASTACIDAE) based on the staging method. *Journal of Crustacean Biology*, 76: 269-280
- García-Guerrero, M., Villarreal, H., Racotta I.S. 2003c. Effect of temperature on lipids, protein, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda:Parastacidae). *Comparative Biochemistry, Part A*, 135: 147-154.
- García-Ulloa, G.M. 2000. Fundamentos de nutrición acuícola. Editorial Folia Universitaria. Universidad Autónoma de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. 221 pp.
- García-Ulloa, G. M., Rodríguez-González, H., Ogura, T., 2004. Egg quality of two prawn species (Palemonidae) of the genus *Macrobrachium* (*M. rosenbergii*, De Man 1879, y *M. tenellum*, Smith, 1871) varying the brood stock diet: morphometric indexes. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 8, 17-27.

- Glencross B.D., Smith D.M. 1997. Comparison of triacylglycerols, esterified and free fatty acid as neutral lipid sources in the diet of prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 159: 67-85.
- Gomez-Robles, E., Rodriguez-Jaramillo C., Saucedo P.E. 2005. Digital image analysis of lipid and protein histochemical markers for measuring oocyte development and quality in pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), *J. Shellfish Res.* 24, 1197-1203.
- Goos, H.J.T., Richter, C.J.J. 1996. Internal and external factors controlling reproduction in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *The biology and culture of catfishes*. Legendre, M. eds.; Proteau, J.P. eds. Paris France Gauthier Villars. vol. 9.
- Guillaume, J.C. 1997. Protein and amino acids. In: D'Ábramo, D.E., Conklin y D.M. Akiyama (Eds). *Crustacean Nutrition*. Baton Rouge, Louisiana, World Aquaculture Society, p. 26-50.
- Guisande, C., Riveiro, I., Solá, A., Valdes, L., 1998. Effect of biotic and abiotic factors on the biochemical composition of wild eggs and larvae of several fish species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 163: 53-61
- Harrison, E.K. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapods crustaceans: A review. *J. Shellfish Res.* 9, 1-28
- Harrison, E.K. 1997. Broodstock nutrition and maturation diets. In: D'Ábramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.) *Crustacean Nutrition*, Baton Rouge, Louisiana, World Aquaculture Society, pp. 390-410.

- Hernández, H. R. 2001. Indicadores bioquímico-fisiológicos de calidad larvaria y postlarvaria de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S. México.
- Hobbs, H.H., Jr. 1988. Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. Pp. 52-82 in D.M. Holdich and R.S. Lowery (eds), Freshwater crayfish: biology, management and exploitation. Timber Press, Portland.
- Holcomb, M., Cloud, J. G., Woosley, J., Ingermann, R. L., 2004. Oxygen consumption in unfertilized salmonid eggs: an indicator of egg quality? Comp. Biochem. and Physiol. Part A 138, 349-354.
- Holdich, M.D., 2002. Biology of Freshwater Crayfish. Blackwell Science Ed. London, United Kingdom. 702 pp.
- Holland D. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In. Biochemical and biophysical perspectives in marine biology. Editor Malins D.C. Ed. Academic Press. Seattle W.
- Hutchings, R. W. y Villarreal, H. 1996. Biología y Cultivo de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Manual de Producción. Navimar, S.A. 500 pp. Guayaquil, Ecuador.
- Ibarra A.M., Palacios E., Perez-Rostro C.I., Ramirez J.L., Racotta I.S., Hernandez-Herrera R. 1998. Family variance for resistance to low oxygen and low salinity of pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, postlarvae. Abstract Book of Aquaculture 98. World Aquaculture Society, p. 260.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacón, A.G.J. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197, 25-42.

- Jayasankar, P., Muthu, M.S. 1983. Toxicity of ammonia to the larvae of *Penaeus indicus*. H. Milne Edwards. Indian J. Fish, 30:1-12.
- Jones, C. M. 1988. Aquaculture potential of *Cherax quadricarinatus*: Research objectives and preliminary results. In L.H. Evans and D. O' Sullivan, editors. Proceedings First Australian Shellfish Aquaculture Conference, 1988. Curtin University of Technology, Perth, Australia.
- Jones, C. M. 1989. Aquaculture potential of *Cherax quadricarinatus*. Queensland Department of Primary Industries, Fisheries Branch. Queensland, Australia.
- Jones, C. M. 1990a. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Queensland Department of primary Industries. Information series No. Q190028. Brisbane, Queensland, 130 p.
- Jones, C. M. 1990b. General biology of *Cherax quadricarinatus*. In: C.C. Shelly and M.C. Pearce, editors. Farming the red claw fresh water crayfish. NT Department of Primary Industry and Fisheries. Fishery Report No.21. Northern Territory, Australia. 1-6 pp.
- Jones, C. M. 1995a. Production of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von_Martens) (Decapoda, Parastacidae). 3. Managed pond production trials. Aquaculture 138, 247-255.
- Jones, C. M., De Silva, S.S., Mitchaell, B.D. 1996. Effect of dietary protein content on growth performance, feed utilization and carcass composition in the Australian freshwater crayfish, *Cherax albidus* Clark and *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae). Aquaculture Nutrition 2, 141-150.

- Kamler, E. 1992. Early life history of fish. An energetic approach. 1st. de Capman&Hall, London, UK. p. 20
- Kanazawa, A. 1985. Nutrition of penaeid prawns and shrimps. In Y. Taki, L.H. Primavera and J.A. Lobera (Ed.). Proceedings of the first international conference on the culture of penaeids prawns / shrimps. Aquacult. Dept. Southeast Asian Fish. Dev. Center Iloilo, Philippines.
- King, C. R. 1993. Potential fecundity of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens), in culture. Aquaculture 114, 237-241.
- King, C. R. 1994. Growth and survival of redclaw crayfish hatchings (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in relation to temperature, with comments on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland. Aquaculture, 122: 75-80.
- Koshio, S., O'Dor, R.K., Castell, J.D. 1990. 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.
- Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R., 1979. Mobilization of organic reserves during ovarian development in a marine penaeid prawn, *Parapenseopsis hardwickii* (Miers) (Crustacean, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture 18, 373-377.
- Lall, S.P., 1995. Nutrient balance: an important criteria for fish feed quality. Abstract, 63-64. In Quality in Aquaculture, Short communications and abstracts of attributions presented at the International Conference Aquaculture Europe'95 and the satellite meeting Nutrition and Feeding in cold Water Species. N. Svennevig and A. Kroghal (eds). August 9-12, 1995. European Aquaculture Society, Special Publication No.23, Gent Belgium.

- Lavens, P., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., Sorgeloos, P., 1991. HUFA levels in eggs of wild and cultured brood stock of *Macrobrachium rosenbergii*. In: Lavens, P. Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.). Larvi'91. EAS Special Publication No. 15, Gent, Belgium, pp. 260-263.
- Lawrence A.L., He H. 1999. Requerimientos vitamínicos para camarones peneidos. En: Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie, D. y Mendoza, R. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 11 al 13 de Noviembre. Monterrey Nuevo León, México.
- Lee, F.Y., Chang C.F., 1997. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 117A, 433-439.
- Lightner D.V., Bell T.A. 1988. A handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Ed. Word Aquaculture Society. Lawrence, Kansas, U.S.A.
- López-López, S., Nolasco, H. y Vega-Villasante, F. 2003. Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: vol. 135, no. 2, pp. 337-347
- Lytle J.S., Lytle T.F., Oogle J.T. 1990. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 89, 287-299.
- McRae, T.G., Mitchell, B.D. 1995. Studies on ovarian development in the yabby, *Cherax albidus* Clark. In: Freshwater Crayfish, Vol. 10. 10th Int. Sym. of

Astacology. Fielder, D.R., Richardson, A.M.M (Eds). Louisiana State Univ., Baton Rouge, LA, USA, pp. 521-531.

Meade, M.E., Watts, S.A., 1995. Weight gain and survival of juvenile Australian crayfish *Cherax quadricarinatus* fed formulated feeds. J. World Aquacult. Soc. 26, 469-474.

Méndez, L., Racotta, I.S., Acosta, B., Rodriguez-Jaramillo, C. 2001. Mineral concentration in tissues during ovarian development of the white shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). Mar. Biol.138, 687-692.

Mendoza, R., Guillaume, J.C., Fauvel, C.1993. Homologous ELISA procedures for the determination of Penaeid shrimp vitellogenin. Aquatic Living Resource 6: 39-48.

Middleditch, B.S., Missler, S.R., Ward, D.G., McVey, J.B., Brown, A., Lawrence, A.L. 1979. Maturation of Penaeid shrimp: dietary fatty acids. Proc. World Mari cult. Soc. 10: 472-476.

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

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

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

- Mourente, G., Medina, A., González, S., Rodríguez, A., 1994. Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodiadae) during maturation. Mar. Biol. 121, 187-197.
- Naranjo, J.P. 1999. Efecto de la densidad de siembra durante las fases de precría y la engorda monosexual de *Cherax quadricarinatus*, en sistemas de producción comercial. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico del Mar y Centro de Investigación y Graduados del Mar, Gimás, Sonora. México.
- Nascimento I.A., Bray W. A., Leung Trujillo J.R., Lawrence A. 1991. Reproduction of ablated and unablated *Penaeus schmitti* in captivity using diets consisting of fresh-frozen natural and dried formulated feeds. Aquaculture, 99, 378-398.
- New, M.B. 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. Aquaculture, 9: 101-144.
- New, M.B. 1987. Feed and feeding of fish and shrimp. A manual the preparation of compound feeds for shrimp and fish in aquaculture. F. A. O., Rome, 275 p.
- New, M.B., Valenti, W. C. 2000. Freshwater Prawn Culture. The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Editorial Blackwell Science. London, Inglaterra. 443 p.
- O'Donovan, P., Abraham M., Cohen D., 1984. The ovarian cycle during the intermoult in ovigerous *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 36, 347-358.
- Palacios, E., 1999. Caracterización fisiológica del agotamiento reproductivo y optimización de la reproducción del camarón blanco del pacífico *Penaeus*

- vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda: Penaeidae). Tesis Doctoral, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México. 193 pp.
- Palacios, E., Rodríguez-Jaramillo, C., Racotta, I.S., 1999. Comparison of ovary histology between different-sized wild and pond-reared shrimp *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*). *Invert. Repro. Dev.*, 35, 251-259.
- Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185, 353-371.
- Palacios, E., Bonilla, A., Perez, A., Racotta, I.S., Civera, R. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 299, 201-215.
- Quinitio, E.T., Millamena, O.M., 1992. Ovarian changes and female-specific protein levels during sexual maturation of the white shrimp *Penaeus indicus*. *Israeli J. Aquaculture Bamidgeh*. 44, 7-12.
- Racotta I.S., Palacios E., Ibarra A.M. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227, 107-130.
- Racotta I.S., Palacios E., Hernández-Herrera, R., Bonilla, A., Pérez-Rostro, C.I., Ramírez J.L. 2004. Criteria for assessing larval and postlarval quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture* 233, 181-195
- Ra'anan, Z., Sagi, A., Wax, Y., Karplus, I., Hulata, G., Kuris, A. 1991. Growth, size rank, and maturation of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Analysis of marked prawns in an experimental population.

Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, 181, 379-386.

Reynolds, J. 2002. Growth and reproduction. In: Holdich, D. Ed., Biology of Freshwater Crayfish: 152-184. Blackwell Science, Oxford, U.K.

Rodríguez-González, H. 1998. Determinación de parámetros de calidad de huevecillos del langostino popotillo *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871), variando la dieta de los reproductores, Tesis profesional, Universidad Autónoma de Guadalajara, México.

Rodríguez-González, H. 2001. Efecto del nivel de proteínas y lípidos en el desarrollo de la gónada en hembras de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (von Martens). Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S.

Rodríguez-Jaramillo, M. C., 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). Master Thesis. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B.C.S., México. 74 pp.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le-Priol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sanchez A., Van-Wormhoudt, A. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrates levels. J. Experimental Marine Biology and Ecology 259, 1-22.

Rouse, D.B., Austin, C.M., Medley, P.B. 1991. Progress toward profits? Information on the Australian crayfish. Aquaculture Magazine, 17, 46-56.

Roustaian, P., Kamarudin, M., 2001. Biochemical changes in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) during larval development. J. World Aqua. Soc. 31, 53-59.

- Sagi, A., Rise, M., Isam, K., Malis-Arad, S. 1995. Carotenoids and their derivatives in organs of the maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus*. Comp. Biochem. Physiol. 112B, 309-313.
- Sagi, A., Shokrum, R., Isam, K., Rise, M. 1996. Gonad maturation, morphological and physiological changes during the first reproductive cycle of the crayfish *Cherax quadricarinatus* female. Inv. Repro. Dev. 29, 235-242.
- Sagi, A., Shoukrun, R., Levy, T., Barki, A., Hulata, G., Karplus, I. 1997. Reproduction and molt in previously spawned and first-time spawning red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* females following eyestalk ablation during the winter reproductive-arrest period. Aquaculture 156: 101-111.
- Samocha, T.M., Guajardo H., Lawrence A.D., Castille F., Speed Michael, and Melard, C. 1998. A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture, 165, p. 233-242.
- Searcy-Bernal, R., 1994. Statistical power and aquaculture research. Aquaculture 127, 371-388.
- Serrano-Pinto, V., Vazquez-Boucard, C., Villarreal-Colmenares, H., 2003. Yolk proteins during ovary and egg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*), Comp. Bioch. Physiol. 134A, 33-43.
- Serrano-Pinto, V., Landais, I., Ogliaastro, M.H., Gutierrez-Ayala, M., Mejia-Ruiz, H., Villarreal-Colmenares, H., García-Gasca, A., Vazquez-Boucard, C., 2004. Vitellogenin mRNA expression in *Cherax quadricarinatus* during secondary vitellogenic at first maturation females. Mol. Reprod. Dev. 69, 17-21.

- Shearer, K., 2000. Experimental design, statistical analysis and modeling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. *Aquacult. Nutr.* 6, 91-102.
- Sikovsky, J., Chayoth, R., Sagi, A. 1998. Comparative study of effects of prostaglandin E sub(2) on camp levels in gonads of prawn *Macrobrachium rosembergii* and the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Crustacean Biology* 18:643-649
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 2000. *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research.* 3rd. ed., Freeman and Company, New York, USA. 887 pp.
- Somerton, D.C., Parrish, C.C., Zhu, P., Brown, J.A. 1995. Changes in Atlantic halibut (*Hippoplossus hippoplossus*) egg size, egg lipid content, and fertilization success within and among spawning season. Abstract pp. 35-38, in: LARVI'95. Lavens, P.; Jaspers E. and Y. Roetlans. Editors. European Aquaculture Society, special publication No. 24, Gent, Belgium.
- Sorgeloos, P., Leger, P. H. 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 23, no.4, 251-264 p.
- Spaargaren D.H., Haefner P.A. Jr., 1994. Interactions of ovary and hepatopáncreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II. Biochemical relationships. *J. Crust. Biol.* 14, 6-19.
- Stryer, L. 1990. *Bioquímica. Cuarta Edición.* Editorial Reveté, S.A. Barcelona, España, 434 p.

- Tacon, A. G. S., 1990. Standard Methods for Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. Argent Laboratories Press. 208 pp.
- Tan Fermin, J.D., Pudadera R.A., 1989. Ovarian maturation stage of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture. 77, 229-242.
- Tandler, A., 1991. Marine aquaculture in Israel with special emphasis on larval rearing, Abstract pp. 379-380, in: LARVI'91. Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jaspers E.; Ollevier, F. Editors. European Aquaculture Society, special publication No. 15, Gent, Belgium.
- Teshima, S. Kanasawa, A., Horinouchi, K. 1988. Lipid metabolism in destalks prawn *Penaeus japonicus*: induce maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. Nippon Suisan Gakkaishi, 54 (7), 1123-1129.
- Thuy, T.T., 1999. Evaluation of short-term ammonia toxicity test as larval quality criteria using *Macrobrachium rosenbergii* as model species. Master in Sciences (Aquaculture) Thesis. University of Ghent. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, p.84.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. Anal. Biochem. 11, 256-265.
- Vazquez-Boucard C.G., Ceccaldi H.J., Benyamin Y., Rousteau C. 1986. Identification, purification et caractérisation de la lipovitelline chez un crustacé décapode natantia *Penaeus japonicus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 97: 37-50.
- Vazquez-Boucard C.G. 1990. Etude de la reproduction chez les crevettes péneides. Nature et devenir de la masse vitelline. Aspects fondamentaux et appliqués. Thèses sciences. Université de Caen. France. p.171.

- Velasco, M., Lawrence A.L., Neil, W.H. 1996. Effects of dietary protein and phosphorus on aquacultural water quality. In: Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. U.A.N.L. México.
- Verhoef, G.D., Austin C.M., Jones, P.L., Stagnitti, F. 1998. Effect of temperature on molt increment and intermolt period of juvenile Australian fresh-water crayfish, *Cherax destructor*. Journal of Crustacean Biology. 18: 673-679.
- Villarreal, H. 1987. Feeding, growth and energetic of the freshwater crayfish *Cherax tenuimanus* (Smith) with special emphasis on its potential for commercial culture. Tesis Doctoral. University of Queensland, St. Lucia, Queensland, Australia. 245 p.
- Villarreal, H., Naranjo, J., Hinojosa, P., 1999. Effect of density on the growth, survival and biomass production of the australian freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (redclaw) in gravel-lined ponds in Ecuador. Abstract pp. 795, in: World Aquaculture 1999, The Annual International Conference and Exposition of the World Aquaculture Society. Sidney, Australia.
- Villarreal, H., Peláez, J., 1999. Biología y Cultivo de Langosta de Agua Dulce *Cherax quadricarinatus*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste and Acuacultivos Santo Domingo, La Paz, B.C.S., México.
- Watanabe, T., Lee, M., Mizutani, J., Yamada, T., Satoh, S., Takeuchi, T., Yoshida, N., Kitada, T., Arakawa, T., 1991. Effective components in cuttlefish meal and raw krill for improvement of quality of red seabream *Pagrus major* eggs. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 681-694.

- Wouters, R., Zambrano, B., Mendoza, S., Espín, M. y P. Laves. 2000. Ensayos con una dieta artificial de maduración basada en harina de *Artemia*. *Mundo Acuicola* 6 (1), 17-20.
- Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderón, J., 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stage of sexual maturation. *Aquaculture* 198, 307-323.
- Xu X.L. Ji W.J., Castell J.D., O'Dor R.K. 1994. Influence of dietary lipid source fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture*, 119, 359-370.
- Yano, I., Chinzei, Y. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B, 213-218.
- Yeh, H. S., Rouse, D.B., 1994. Indoor spawning and egg development of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *J. World Aquacult. Soc.* 25, 297-301.
- Yeh, H. S., Rouse, D.B., 1995. Effects of water temperature, density and sex ratio on the spawning rate of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *J. World Aqua. Soc.* 26, 160-16.