



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL  
NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**INDICADORES BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICOS DE  
CALIDAD LARVARIA Y POSTLARVARIA DE  
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Roberto Hernández Herrera**

La Paz, B.C.S. Julio del 2001.

## RESUMEN.

En el presente trabajo, se analizaron varios criterios para determinar la calidad o condición fisiológica de larvas y postlarvas de camarón. Las variables analizadas a lo largo del cultivo larvario fueron: composición bioquímica, variables de producción a nivel de desove (numero de huevos y nauplios, porcentaje de fertilización y eclosión) y a nivel de cultivo larvario (supervivencia a distintos estadios), características morfométricas de huevos y larvas, pruebas de estrés a alta concentración de amonio en zoea II y baja salinidad en postlarvas de 2 (PL2) y 20 días de edad (PL20). Para esto se contó con tres grupos de desoves individuales, los cuales conservaron su identidad en todo momento: un grupo de desoves en 1999 a partir de huevo y dos en el 2000 a partir de nauplio.

En primera instancia se estableció el valor de  $LC_{50}$  para 24 horas de exposición al amonio en el estadio de zoea II que fue de 19.4 mg/L. Se encontraron correlaciones significativas entre esta prueba y la supervivencia en los estadios larvarios subsecuentes en la segunda remesa del 2000. Por otro lado, se estableció el nivel de salinidad para ser utilizado en postlarvas de 2 días (PL2), la cual fue de 18 ppm. En la segunda remesa del 2000, se observó una correlación entre esta prueba y la supervivencia en cultivo entre PL1 y PL20. Sin embargo, la prueba de estrés de salinidad en PL20 (exposición en agua dulce) se correlacionó negativamente con la supervivencia a lo largo del cultivo larvario y no se correlacionó con la prueba de estrés en PL2.

Se encontraron correlaciones altamente significativas entre la supervivencia a los diferentes estadios larvarios, en las tres remesas, permitiendo incluso la generación de modelos matemáticos para predecir la supervivencia a postlarva a partir de la supervivencia de zoeas o mysis. El número de nauplios por desove y el porcentaje de eclosión, presentaron alta correlación con la supervivencia en los estadios larvarios, por lo que podrían considerarse como buenos indicadores tempranos de calidad larvaria posterior.

Al analizar las variables morfológicas, solo se observaron correlaciones significativas aisladas con otras variables, a pesar de que han sido señalados por diversos autores como indicadores de calidad.

En la remesa de 1999 fue posible analizar de manera particular la composición bioquímica de huevos y se observó que los niveles de carbohidratos y lípidos totales fueron significativamente más altos en los huevos que tuvieron desarrollo a postlarva. Sin embargo la composición bioquímica de los nauplios no se correlacionó o se correlacionó negativamente con la supervivencia en cultivo larvario.

En conclusión, el mejor indicador predictivo de la supervivencia en cultivo larvario es la supervivencia en los estadios tempranos (por ejemplo zoea). El número de nauplios, el porcentaje de eclosión y la supervivencia a la prueba de estrés de amonio pueden ser usados como indicadores predictivos, aunque se requieren más estudios para verificar su pertinencia. La composición bioquímica de huevo es un mejor indicador del desempeño larvario que la composición bioquímica del nauplio. Finalmente, la prueba de estrés de baja salinidad evalúa características diferentes dependiendo de la edad de la postlarva en la cual se aplica (PL2 o PL20). Al parecer en PL2 esta prueba es más útil como indicador predictivo que en PL20.

Palabras Clave: Pruebas de estrés, calidad larvaria, *Litopenaeus vannamei*.

Vo.Bo.

---

**Dr. Ilie S. Racotta D.**

## ABSTRACT

In the present work, several criteria were analyzed to determine the quality or physiological condition of shrimp larvae and postlarvae. The analyzed variables during larval culture were: biochemical composition, production variables at spawning (number of eggs and nauplii percentage of fertilization and hatching), survival to different larval stage, morphometric characteristics of eggs and larvae and stress tests to high ammonia concentration in zoea II and lower salinity in two days (PL2) and twenty days (PL20) old postlarvae. For this purpose we used three groups of multiple individual spawns with their identity preserved kept at all times: the first one a group of spawns (1999 batch) from egg and the second and third were two groups of spawns (2000 batches) from nauplii.

The value of  $LC_{50}$  for 24 hours of ammonia exposure in the zoea II stage was first established, obtaining a value of 19.4 mg/L. A significant correlation was found between this stress test and survival to the subsequent larval stages for the second batch of 2000. With regard to the stress test using low salinity to exposure PL2, it was established 18 ppm as the best salinity level. A correlation was observed between this stress test and the survival during culture between PL1 and PL20 stages. Nevertheless, the salinity stress test at PL20 to freshwater exposure was correlated negatively with the survival during larvae culture and was not correlated with the stress test in PL2.

Highly significant correlations among survival to the different larvae stages were found, in all three batches, allowing the derivation of a mathematical model to predict survival to postlarvae from the survival of zoea or from mysis stages. The number of nauplii per spawn, and the hatching rate, had a significant correlation with survival to larval stages, which indicates that they may be used as good indicators of larvae quality.

When analyzing the morphologic variables, some significant correlations were observed with other variables but there was not a clear pattern that would allow to use them as quality indicators of larval performance, in spite of the fact that they have been proposed by diverse authors as quality indicators.

In the 1999 batch, it was possible to analyze the biochemical composition of eggs. The results indicated that levels of carbohydrates and total lipids were significantly higher in the eggs that develop into postlarvae. However, the nauplii biochemical composition was not correlated, or in some cases was negatively correlated with survival during larval culture.

In conclusion, the best predictive indicator of the survival of larvae during culture, is in fact survival in early stages (for example, zoea). Number of nauplii, hatching rate and larval survival to the ammonia stress test could be used as predictive indicators, but more studies are needed to verify this conclusion. The biochemical composition of eggs is a better indicator of larvae performance when compared to the biochemical composition of nauplii. Finally, the stress test to a low salinity evaluates different characteristics depending on the age of the postlarvae in which it is applied (PL2 or PL20). Apparently, in PL2 this test is more useful as a predictive indicator of larval quality or performance than in PL20.

Key Words: stress test, larval quality, *Litopenaeus vannamei*

## DEDICATORIA

Al faro en mi tormenta. Gabi con amor

A mi idea feliz: Roberto Alfredo, con toda mi esperanza.

Al Clan Herrera (Carmen, Eva Angelina, Rosario, Miriam, Karina, Yesica, Pati, Concepción, Lourdes, Aline, Mitzi, Paola y Sami).por ser mi lejana compañía.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por todo el apoyo logístico y por la oportunidad de realizar este trabajo. A los proyectos institucionales ABM-14 y ABM-15.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado (folio 144030)

A los proyectos: CONACYT J28160-B, SIMAC 98016078 y SIMAC 00BCS7501

Al Proyecto Red Mexicana de Investigación en Acuicultura (CONACYT) clave 100-2

Al Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov, porque sin sus atenciones hubiera tardado otros tres años en terminar este escrito, por su paciencia y por todo lo que ha hecho por mi.

Al Comité revisor, por sus comentarios y la atención que dieron al escrito a pesar de la premura.

Al grupo de Genética Acuícola: Dra. Ana María Ibarra, José Luís, Gabriel, Manuel Macklish, Susana, Dulce, Armando, Rosalio y Cipriano, en especial a Carlos, Fabiola y Basilio por ser la mejor compañía que uno pueda tener en una desvelada de trabajo.

Al personal de la dirección de posgrado: Dr. Sergio Hernández, Lety, Osvelia, Lupita, Horacio, Manuel y Carlos.

Al grupo de Bioquímica Metabólica Dr. Ilie Racotta, Dra. Elena Palacios, Diana Carreño y Araceli Bonilla, por seguir siendo un equipo de trabajo.

A los "Estudiantillos de Indias" (Primera Generación de Maestría en el CIBNOR) por ser algo mas que mis compañeros, mis amigos.

A mi familia que ha estado conmigo siempre, aunque no estemos cerca.

A Gabi y Roberto Alfredo, por ser mis motivos para superarme día con día, por recibirme con una sonrisa cada que llego a casa y por hacer que todo esfuerzo valga la pena.

A todo ellos y a los que me faltaron. Gracias.

## CONTENIDO

Acta de Revisión de tesis.....	i
Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Contenido.....	vi
Lista de tablas.....	viii
Lista de figuras.....	x
Introducción .....	1
Pruebas de estrés.....	4
Resistencia a estrés de salinidad.....	5
Resistencia a Altas Concentraciones de Amonio.....	6
Otras pruebas de resistencia.....	8
Composición Bioquímica.....	9
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos específicos.....	16
Metodología.....	17
Experimento A.- Estandarizaciones de pruebas de estrés.....	17
I.- Prueba de estrés al amonio. ....	17
II.- Prueba de estrés de salinidad. ....	19
Experimento B.- Comparación entre lotes de larvas obtenidos a partir de reproductores silvestres y domesticados.....	20
Experimento C.- Análisis de calidad larvaria en desoves individuales.....	21
Obtención de organismos.....	21
Cultivo larvario.....	22
Variables de producción.....	23
Pruebas de estrés.....	24
Obtención del perfil bioquímico general de huevos y nauplios.....	24
Análisis de datos.....	25
Resultados.....	27
Experimento A. Estandarizaciones de pruebas de estrés.....	27
I.- Prueba de estrés de amonio.....	27
1.- LC <sub>50</sub> de amono sin tapa.....	27
2.- LC <sub>50</sub> en recipientes cerrados.....	27
II Prueba de estrés de salinidad.....	30
Experimento B. Comparación entre lotes de larvas obtenidos a partir de reproductores silvestres y domesticados.....	31
Experimento C. Análisis de calidad larvaria en desoves individuales.....	33
I.- Desoves obtenidos en el CIBNOR (1999) .....	33
1.- Características del hueo y nauplio en relación a la calidad del desove.....	34
2.- Análisis de correlación entre las distintas variables registradas..	35
2.1.-Variables morfométricas.....	36

2.2.- Variables de producción.....	37
2.3.- Pruebas de estrés.....	38
3- Calidad del desove y calidad larvaria en relación al tamaño corporal de los reproductores.....	39
II.- Desoves de Maricultura del Pacífico (2000) .....	41
1.- Primera remesa del 2000.....	41
1.1.- Variables morfométricas.....	41
1.2.- Variables de producción.....	42
1.3.- Composición bioquímica.....	42
1.4.- Prueba de estrés.....	42
2.- Segunda remesa del 2000.....	42
2.1.- Variables morfométricas.....	43
2.2.- Variables de producción.....	44
2.3.- Composición bioquímica.....	44
2.4.- Prueba de estrés.....	45
III.- Comparación entre remesas del 2000.....	45
Discusión.....	50
Niveles letales de alta concentración de amonio y baja salinidad.....	50
Pruebas de estrés como indicador de la condición fisiológica.....	57
Variables de producción y morfométricas.....	62
Criterios Bioquímicos.....	65
Tamaño del reproductor.....	72
Conclusiones.....	79
Literatura Citada.....	81
Anexo. Tablas de correlación.....	89

## LISTA DE TABLAS

Tabla I: Porcentaje de mortalidad acumulada para distintas concentraciones de amonio total y diferentes tiempos de exposición (recipientes abiertos).

Tabla II: Concentración de amonio después de 24 horas, pH inicial y final, en recipientes abiertos y cerrados.

Tabla III. Porcentaje de mortalidad acumulada de zoea II de *L. vannamei*, expuestas a distintas concentraciones de amonio y diferentes tiempos de exposición (recipientes cerrados).

Tabla IV. Valores de pH de las soluciones de amonio al inicio y final del experimento.

Tabla V. Resumen de los datos del material biológico obtenido y analizado en el CIBNOR durante 1999.

Tabla VI. Comparación bioquímica de huevos con relación a la clasificación del desove. HNE= Huevos No Eclosionados; HSD= Huevos Sin Desarrollo a Postlarva; HPL= Huevos que produjeron Postlarvas.

Tabla VII. Variables analizadas mediante correlaciones remesa de 1999.

Tabla VIII. Comparación entre resultados tomando en cuenta el peso de las hembras

Tabla IX. Variables analizadas mediante correlaciones, primera remesa del 2000.

Tabla X. Variables analizadas mediante correlaciones, segunda remesa del 2000.

Tabla XI. Comparación entre los dos grupos de desove del 2000.

Tabla XII. Valores de LC50 de amonio a las 24 y 48 horas para zoea II de diferentes especies de peneidos.

Tabla XIII. Niveles de salinidad, edad de postlarvas y tiempo de exposición reportados por otros autores en pruebas de estrés de salinidad

### **En Anexo.**

Tabla I-A. Coeficientes de correlación de las variables morfométricas con las variables bioquímicas, en la remesa de 1999.

Tabla II-A. Coeficientes de correlación entre distintas variables de producción a nivel de cultivo larvario y a nivel de desove, en la remesa de 1999.

Tabla III-A. Coeficientes de correlación entre producción a nivel de desove y cultivo larvario en la remesa de 1999.

Tabla IV-A Coeficientes de correlación entre Supervivencia a pruebas de estrés y producción en cultivo larvario, en la remesa de 1999.



Tabla V-A. Coeficientes de correlación entre supervivencias a pruebas de estrés y composición bioquímica de huevos y nauplios, en la remesa de 1999.

Tabla VI-A. Supervivencia a pruebas de estrés y producción a nivel de desove, en la remesa de 1999.

Tabla VII-A. Coeficientes de correlación entre las distintas variables morfométricas analizadas, en la primera remesa del 2000.

Tabla VIII-A. Coeficientes de correlación entre distintas variables de producción a nivel de cultivo larvario, en la primera remesa del 2000.

Tabla IX-A. Coeficientes de correlación entre distintas variables de producción a nivel de cultivo larvario , en la segunda remesa del 2000.

Tabla X-A. Coeficientes de correlación entre distintas variables de producción a nivel de cultivo larvario y la composición bioquímica de los nauplios, en la segunda remesa del 2000.

Tabla XI-A. Coeficientes de correlación entre las variables de producción y la supervivencia a las pruebas de estrés, en la segunda remesa del 2000.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Supervivencia de postlarvas expuestas a diferentes niveles de salinidad.
- Figura 2. Supervivencia a 30 mg/L y 20 mg/L de amonio total de larvas en zoea II, provenientes de reproductores silvestres y domesticados.
- Figura 3. Supervivencia a baja salinidad (A) y en cultivo (B) de postlarvas de dos días, provenientes de reproductores silvestres y domesticados.
- Figura 4. Comparación entre la composición bioquímica de huevos que complementaron su desarrollo hasta postlarva y los nauplios resultantes.

## INDICADORES BIOQUÍMICO FISIOLÓGICOS DE CALIDAD LARVARIA Y POSTLARVARIA DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

### INTRODUCCIÓN.

El cultivo de camarones de la familia Penaeidae, particularmente de *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*, constituye una importante actividad en México, por lo cual nuestro país ocupa el segundo lugar en la camaronicultura en el continente americano (Rosenberry, 1998). Dado el incremento sustancial de esta actividad y las medidas que se han tomado para proteger los lotes de postlarvas silvestres, se ha incrementado la demanda de postlarvas, por lo que se requiere desarrollar y maximizar los sistemas de reproducción en cautiverio a través de estrategias enfocadas a buscar un mayor rendimiento y una mayor calidad de las larvas a obtener.

Una de las actividades que limitan el cultivo de camarón es la producción de “semilla” (nauplio o postlarva), debido a que en nuestro país el número de laboratorios productores de postlarva es proporcionalmente bajo en comparación con el número de granjas. Por lo tanto se considera que la producción de postlarvas es insuficiente para satisfacer los requerimientos de los productores, los cuales recurren a la captura de postlarvas silvestres. Sin embargo, la disponibilidad de estas es variable y su captura empieza a generar problemas sociales entre los acuicultores y los pescadores de camarón.

Los laboratorios productores de larvas (hatcheries, en inglés) tienen como objetivo producir larvas que presenten alta supervivencia y alta tasa de crecimiento (Abi-ayad, *et al.*, 1997). No todos los laboratorios tienen la

infraestructura necesaria para lograr la reproducción en cautiverio y dependen de la captura de hembras grávidas (poco usual en México) o bien se utilizan organismos considerados adultos por su talla que son capturados (silvestres) o que provienen de cultivo y son mantenidos hasta reproductor (domesticados).

Cualquiera que sea su origen, los reproductores se aparean en el laboratorio y son puestos a desovar para así obtener la semilla. Esta variación en el origen de los reproductores, así como el manejo que implica su mantenimiento, alimentación y condiciones de desove, tienen como repercusión diferencias en la condición de las postlarvas resultantes (Bray y Lawrence, 1991). De ahí surge la necesidad de distinguir las larvas con buena condición fisiológica que se supone presentarían mejor supervivencia a condiciones no óptimas y permitirían un mejor manejo de los recursos de los laboratorios. Sin embargo, hasta el momento no se han identificado indicadores suficientemente confiables, lo cual repercute en una producción de postlarvas cuya condición (calidad) es muy diversa y que generalmente se evalúa hasta el momento de la cosecha, lo cual puede traer pérdidas económicas a los productores. El problema es más delicado si se toma en cuenta que durante el ciclo de cultivo existe alta mortalidad o crecimiento deficiente, atribuido a una mala "calidad" de la postlarva proveniente de los laboratorios, por lo que aún existe marcada preferencia por organismos capturados en lugar de los cultivados, lo mismo de reproductores capturados en lugar de los madurados en granja (Castille et al., 1993).

La condición y supervivencia de larvas y postlarvas es una resultante del estado de los progenitores, su condición nutricional y la cantidad y calidad de las

reservas en los huevos (De la Cruz, 1992). Los desoves en cautiverio pueden ser afectados por el manejo de los organismos, la manipulación del reproductor y los métodos de cultivo larvario (Castille et al., 1993).

Para evaluar la calidad de los organismos en alguna de las etapas de cultivo (huevo, larvas, semillas, juveniles, etc.), se toman en cuenta varios criterios, que van desde las características de las hembras maduras, hasta la talla de los organismos cosechados. Para el caso de los reproductores, generalmente se suele aplicar criterios visuales, como: edad, talla y distribución de tallas, peso, color, actividad, porcentaje y grado de deformidades, limpieza del caparazón, estado de los apéndices, presencia o ausencia de patógenos (virus, bacterias, hongos, protozoarios, etc.), color y patrón de cromatóforos, forma y coloración de la musculatura, resistencia a estrés ambiental, historia nutricional y origen biológico (silvestres, domesticados; Bray y Lawrence, 1991; Clifford, 1992). Estos criterios no son muy recomendables para cuantificar la calidad de los organismos, son poco prácticos, dado que por lo general requieren de un microscopio y personal entrenado y por lo mismo son subjetivos.

Bray y Lawrence (1991) mencionan entre los criterios de evaluación de los desoves: el número de huevos por desove, el diámetro de los huevos, el porcentaje de eclosión, fototaxis del nauplio y composición bioquímica ya sea de huevos o de nauplios.

A nivel de larvas se pueden considerar los siguientes criterios: porcentaje de supervivencia larvaria, duración de los estadios larvarios, longitud de zoea,

composición bioquímica y pruebas de estrés (Bray y Lawrence, 1991; Castille et al., 1993)

En el caso de las postlarvas, su estado fisiológico o calidad se evalúa en el momento de la compra según su movilidad, color, apariencia, actividad, intervalo de tallas, la historia de desarrollo larvario (supervivencia, duración de estadios larvarios) y pruebas de estrés, entre otros muchos criterios. También se evalúa por medio de su desempeño a lo largo del cultivo larvario y engorda posterior, tomando en cuenta: supervivencia, tamaño y peso final, así como el tiempo que tardan en alcanzar cierta talla, lo cual implica altos costos si la postlarva no es de buena calidad (Bray y Lawrence, 1991).

Desafortunadamente pocos han sido las variables o criterios de evaluación que se han correlacionado con variables a nivel de producción (crecimiento y supervivencia en cultivo por ejemplo) con suficiente sustento estadístico y precisión para ser utilizados como un criterio predictivo de calidad (Bray y Lawrence, 1991 y 1992).

A continuación se analiza más a fondo la información sobre dos grupos de criterios potenciales de calidad larvaria: las pruebas de estrés y la composición bioquímica de huevos y nauplios.

## **PRUEBAS DE ESTRÉS**

Algunos autores han desarrollado pruebas que permitieran dilucidar la condición de las postlarvas, a menudo referida como “calidad de las postlarvas”, dichas pruebas son conocidas como pruebas de resistencia o pruebas de estrés.

Las pruebas de estrés o de resistencia son usadas como un criterio de control de calidad en los laboratorios de producción de semilla, en laboratorios de investigación y en laboratorios de algunas empresas (Bray y Lawrence, 1991; Wouters et al., 1997), probando por ejemplo dietas de reproductores (Paibulkichakul et al., 1998), estado de reproductores (Palacios et al., 1998; Palacios et al., 1999a) y dietas de larvas (Dhert et al., 1990; Kanazawa, 1997; Kontara et al., 1997; Wouters et al., 1997). Tales pruebas consisten en someter a las postlarvas 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 exposición al aire (Ibarra et al., 1998), altas concentraciones de amonio (Cavalli et al., 1999, Cavalli et al., 2000), formalina o contaminantes (Samocha et al. 1998) entre otros.

Se asume que la supervivencia de los organismos que son sometidos a una condición extrema es reflejo de su calidad, producto de su resistencia y se debe a su condición fisiológica.

### **Resistencia a Estrés de Salinidad**

La prueba de resistencia más utilizada en la evaluación de postlarvas de camarón es el estrés a baja salinidad (Samocha et al., 1998; Thuy, 1999; Cavalli et al., 2000), que consiste en someter a las larvas a una disminución abrupta de salinidad por un tiempo determinado, permitiendo su posterior recuperación. A pesar de lo extendido de tales pruebas, no existen evidencias claras que garanticen que una mayor resistencia a cambios de salinidad a nivel de postlarva se traduzca en mejor rendimiento en engorda. La supervivencia a la prueba de

estrés de salinidad se debe principalmente a la capacidad osmorreguladora de los organismos, y esto depende del grado de desarrollo de la postlarva, por lo que es una forma de evaluar su condición fisiológica. La capacidad de resistir cambios en la salinidad así como la capacidad de osmorregulación se incrementa con la edad (Charmantier et al., 1988; Samocha et al., 1998), por lo cual es importante realizar este tipo de pruebas a determinadas edades y niveles de salinidad.

Se han propuesto una serie de metodologías, muy similares entre si, para realizar pruebas de resistencia a bajas salinidades. También, se han reportado niveles de tolerancia y dosis letales para diferentes especies, tallas y edades de las larvas, así como diferentes tiempos de exposición (Charmantier et al., 1988; Tackaert et al., 1989; Paibulkichakul et al., 1998; Samocha et al., 1998). Sin embargo, no existe homogeneidad en las condiciones que se utilizan durante las pruebas, el número de réplicas, la edad de los organismos, el tiempo de exposición, etc. Debido a esto es necesario encontrar y unificar los criterios de aplicación de esta prueba de calidad larvaria.

### **Resistencia a Altas Concentraciones de Amonio**

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 principal forma de excreción nitrogenada y una de las sustancias tóxicas más comunes en los sistemas de cultivo (Regnault, 1987; Chen y Kou 1992). El amonio en el agua se encuentra en equilibrio en su forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) y no ionizada ( $\text{NH}_3$ ), dicho equilibrio depende del pH: altos niveles de pH desplazan el equilibrio hacia la



forma no ionizada ( $\text{NH}_3$ ), la cual se difunde a través de las membranas celulares por su gradiente de presión y por su alta solubilidad en los lípidos. Cuando los niveles de amonio se incrementan en el agua, la excreción de amonio disminuye y los niveles de amonio en la sangre y otros tejidos se incrementan. Esto provoca una elevación del pH en la sangre produciendo efectos negativos en la estabilidad de las membranas celulares y en las reacciones enzimáticas del organismo, que entre otros posibles efectos: inhibe el transporte de sodio, incrementa el consumo de oxígeno, provoca daño en los epitelios branquiales y reduce la capacidad de captación y transporte de oxígeno, lo cual incluso puede provocar la muerte (Armstrong et al., 1978).

La tolerancia a la toxicidad del amonio en camarones se relaciona con su estadio larvario y la resistencia de los organismos acuáticos a la concentración de amonio en el medio se incrementa con la edad (Chen y Kou, 1992; Chen y Nan, 1993; Thuy, 1999).

De manera reciente Thuy (1999) y Cavalli (et al., 1999; et al., 2000) han desarrollado una prueba de estrés a altas concentraciones de amonio para evaluar la calidad de *Macrobrachium rosenbergii* con resultados prometedores y plantean la posibilidad de aplicar dicha prueba para otras especies de crustáceos.

Para realizar dichas pruebas de estrés, es necesario determinar la dosis letal del 50% de la población ( $\text{LC}_{50}$ ) en 24 hrs. para *L. vannamei*. Varios autores han determinado la  $\text{LC}_{50}$  de amonio para 24 horas en otras especies de camarón como: *Penaeus indicus* (Jayasankar y Muthu, 1983), *P. monodon* (Chin y Chen,

1987), *Metapenaeus ensis* (Chen et al., 1991), *P. japonicus* (Lin et al., 1993) y *P. paulensis* (Ostrensky et al., 1995)

### **Otras pruebas de resistencia.**

Resistencia a estrés por baja concentración de oxígeno disuelto. Esta prueba fue inicialmente aplicada en larvas de peces (*Pagurus major*) expuestas al aire por 5 segundos para evaluar su resistencia (Watanabe 1983).

Recientemente se ha sugerido una metodología para exponer postlarvas de camarón a condiciones de hipoxia, que consiste en someter PL 15-23 a un estrés por baja concentración de oxígeno en el agua ( $[O_2] < 1 \text{ mg/ml}$ ). Para ello se burbujea nitrógeno u otro gas inerte por un cierto tiempo (20 minutos), posteriormente se permite la recuperación de los supervivientes al colocarlos en una solución saturada de oxígeno por 30 minutos y se cuantifica su supervivencia (Ibarra et al. 1998)

Formalina: Consiste en exponer postlarvas por un período determinado en una solución mezclada de formaldehído y metanol, de acuerdo a la edad de la postlarva y de la concentración de la solución de formalina. Posteriormente, se cuantifica y calcula la supervivencia (Samocha, et al., 1998).

Estas dos pruebas fueron propuestas de manera relativamente reciente, por lo que no son procedimientos comunes y su utilidad aún se encuentra en evaluación.

Temperatura-salinidad. Se han sugerido metodologías que involucran simultáneamente una reducción de salinidad y de temperatura, a 22 ppm y 10°C

respectivamente, por cuatro horas (Clifford, 1992) a 5 ppm y 20°C (Fegan, 1992) y a 10 ppm y 20°C (Briggs, 1992) durante una hora.

Finalmente, es importante señalar que desafortunadamente no se han encontrado correlaciones significativas entre los resultados de las pruebas de estrés (salinidad, amonio, hipoxia, formalina y temperatura-salinidad) y las supervivencias o el desempeño de los organismos en condiciones de cultivo (Bray y Lawrence, 1992; Fegan 1992).

### **COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA.**

Otro criterio importante a evaluar en la condición de las larvas es su composición bioquímica, principalmente en las etapas más tempranas de su desarrollo, pues las reservas energéticas y nutrientes específicos contenidos en los huevos determinan en gran medida la calidad de las larvas. Estas reservas son importantes ya que se utilizan durante el desarrollo del embrión durante las primeras etapas larvarias (nauplio) en las que los organismos no se alimentan. Estas reservas son cruciales en el período de metamorfosis a zoea, ya que estas etapas requieren una gran cantidad de energía, por lo que huevos con alta cantidad de reservas metabólicas y alta capacidad de transformar dicha energía tienen mayores probabilidades de pasar a estadios posteriores y sobrevivir a condiciones no óptimas. Laing y Earl (1998) afirman que un balance adecuado entre proteínas, lípidos y carbohidratos pueden ser un factor crítico para la metamorfosis. Castille (et al., 1993) señalan que los indicadores bioquímicos pueden indicar el potencial crecimiento de los organismos.

Los combustibles metabólicos, son compuestos bioquímicos de los cuales se obtiene energía química (Lehninger, 1988). Pueden clasificarse en tres grandes grupos según su naturaleza o estructura química: carbohidratos, proteínas y lípidos.

Los carbohidratos o hidratos de carbono son compuestos de los cuales puede obtenerse energía de manera rápida y pueden ser utilizados de manera anaerobia por ciertos tejidos. De hecho, el sistema nervioso central y los eritrocitos de vertebrados dependen de los carbohidratos como fuente de energía. De los carbohidratos, la glucosa es el más utilizado y es el que se encuentra circulante en mayores proporciones en los animales.

Los crustáceos utilizan los carbohidratos, principalmente glucosa, para obtener energía (ATP) ya sea a partir de su dieta (absorción), hidrolizando su reserva de glucógeno (glucogenólisis) y por formación de glucosa a partir de otras fuentes como glicerol, aminoácidos, etc. (gluconeogénesis) (Stryer, 1990). El glucógeno es un polisacárido de glucosa y es una fuente de reserva de esta, pero tiene la desventaja de asociar agua, por lo que el contenido calórico de un gramo de glucógeno es muy bajo. Además, los crustáceos tienen la capacidad de sintetizar carbohidratos a partir de proteínas (Rosas et al., 2001) y su principal fuente de energía son los lípidos. Por esta razón los carbohidratos no son una reserva energética importante durante el desarrollo embrionario y larvario

En los crustáceos la importancia de los carbohidratos radica en que son parte de estructuras corporales, como el exoesqueleto, el cual está formado por un complejo de quitina y minerales, razón por la cual están presentes en las reservas

contenidas en los huevos y pueden ser un factor limitante para la supervivencia de los nauplios en sus subsecuentes mudas y metamorfosis.

Los lípidos representan una fuente concentrada de energía, son la principal reserva de combustible metabólico, forman parte integral de estructuras celulares como la membrana, son vehículo de vitaminas liposolubles (A,D,E y K) y son precursores de algunas hormonas y de otros compuestos (Stryer, 1990).

Los triglicéridos son particularmente importantes para obtener energía, mientras que los fosfolípidos tienen gran importancia a nivel estructural.

Los triglicéridos se conforman de una molécula de glicerol y tres de ácidos grasos, son depósitos muy concentrados de energía metabólica, un gramo de triglicéridos contiene casi seis veces más energía que un gramo de glucógeno, esto es por ser moléculas con alto potencial de oxidación y porque se almacenan en forma anhidra. Por lo anterior los triglicéridos son el principal reservorio de energía y cuantitativamente representan una reserva mucho mayor que la del glucógeno (Stryer, 1990).

Los ácidos grasos que conforman los triglicéridos y los fosfolípidos provienen de la dieta, por lipólisis o hidrólisis dando como producto glicerol y dos o tres moléculas de ácidos grasos libres. Por otro lado, también pueden provenir de la síntesis endógena a partir de acetil coenzima-A que deriva del piruvato, glucosa y aminoácidos (lipogénesis). Los ácidos grasos pueden ser oxidados por la mayor parte de los tejidos.

Tanto en peces como en crustáceos, los lípidos son reconocidos como componentes bioquímicos fundamentales de la reserva de los huevos, no sólo por

su gran aporte de energía (triglicéridos), sino también porque tienen funciones importantes al formar parte de estructuras celulares (fosfolípidos y colesterol) y de sustancias necesarias para el organismo como las hormonas (colesterol y ácido araquidónico). Los niveles de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el 22:6n-3, se consideran muy importantes para ciertas funciones específicas, como el desarrollo de estructuras del sistema nervioso central. Por lo anterior, los niveles de lípidos en los huevos han sido usados como indicador nutricional de los desoves (Cahu et al., 1988; Lavens y Sorgeloos, 1991; Cahu et al., 1995; Palacios et al., 1999a). También, los niveles de lípidos y particularmente de triglicéridos, han sido propuestos como un indicador de la calidad de las postlarvas, como un índice de condición o como indicador del potencial de supervivencia larvaria. Varios autores (Fraser 1989; Lavens et al. 1991; Ouellet et al., 1992; Palacios et al. 1998) señalan a los triglicéridos en particular como un indicador de calidad de huevos o nauplios. Sin embargo Fraser (1989) señala que el contenido de triglicéridos en las larvas no puede ser un indicador directo de su condición, debido a que el contenido de triglicéridos depende del tamaño de la larva y debe expresarse en función del peso seco o tamaño de la larva. Por ello se han sugerido y aplicado algunos índices de calidad de larvas con base en la cantidad de triglicéridos y la longitud de las larvas con la finalidad de predecir la calidad de los desoves (Fraser 1989; Ouellet et al., 1992; Lovrich y Ouellet, 1994; Palacios et al., 1998).

Las proteínas también constituyen una fuente de energía cuyo combustible circulante son los aminoácidos, los cuales son obtenidos de la dieta o por hidrólisis

de proteínas. En contraste con el glucógeno y los lípidos, no existe una forma de almacenamiento equivalente de las proteínas o los aminoácidos. En los vertebrados el metabolismo de aminoácidos ocurre en el tejido hepático, el grupo amino de los aminoácidos excedentes es eliminado dado un desecho nitrogenado y un cetoácido como intermediario metabólico, el cual puede ser oxidado hasta  $\text{CO}_2$  aprovechando su valor calórico o bien se convierten en glucosa o en ácidos grasos para su utilización o posterior almacenamiento en glucógeno y triglicéridos respectivamente (Stryer, 1990).

Las proteínas no son sólo una fuente de energía metabólica, son el constituyente relativamente más abundante en los crustáceos, juegan un papel importante en el transporte de otras moléculas, son mediadores y catalizadores de reacciones químicas (enzimas) y constituyen el grupo más numeroso de hormonas (Stryer, 1990).

El desarrollo embrionario es un proceso complejo en el que se utilizan los constituyentes bioquímicos almacenados en el huevo, los cuales proveen energía y precursores estructurales para la formación, desarrollo y crecimiento del embrión. Además, después de eclosionada la larva, esta reserva sigue siendo utilizada hasta que la larva no se alimente de material exógeno, por lo que las proteínas también pueden ser una limitante para la supervivencia en esta etapa crítica.

Las proteínas son el principal componente en huevos y larvas de decápodos (Anger et al, 1988), constituyen alrededor del 50% del peso seco de los huevos de camarón (Chu y Ovisianico-Koulikowsky, 1994). No existe un

acuerdo sobre el porcentaje de proteína que es utilizado como fuente de energía durante el desarrollo del embrión, aparentemente su función principal no es el aporte de energía en huevo y larvas tempranas, en estas etapas la principal fuente de energía proviene de los lípidos. Las proteínas que se encuentran en el vitelo del huevo y posteriormente en la larva nauplio, se utilizan en la síntesis de tejidos y enzimas. Algunos aminoácidos libres tienden a acumularse en los huevos conforme se desarrolla el embrión y se les ha atribuido un posible papel en la osmorregulación de los huevos y posteriormente de las primeras etapas larvianas (Claybrook, 1983).

El principal producto final del catabolismo de proteínas es el amonio, los organismos acuáticos utilizan tres mecanismos principales para deshacerse del amonio metabólico: por difusión pasiva de la sangre al agua, por intercambio de iones  $\text{NH}_4^+$  por  $\text{Na}^+$  y por la conversión del amonio a otros compuestos nitrogenados menos tóxicos (urea, ácido úrico, etc). De estos mecanismos, la difusión pasiva es la ruta principal de excreción en los organismos marinos, debido a que sus niveles de amonio en la sangre son normalmente mucho más altos que los del agua (Regnault, 1987).

Los niveles requeridos para que el amonio se vuelva tóxico, varían acorde con la especie, su estado de desarrollo y sus condiciones de cultivo como: oxígeno disuelto, temperatura, salinidad, pH, etc. (Regnault, 1987).

Normalmente se evalúa la composición bioquímica aunada a pruebas de estrés o contrastando la supervivencia de las larvas en experimentos donde se



prueban dietas, ya que generalmente la composición bioquímica de los huevos refleja la composición del alimento (Abi-ayad et. al, 1997).

Todo lo anterior demuestra lo importante que es la composición bioquímica de los huevos, ya que tiene un efecto sobre la supervivencia y calidad de las larvas. Por ello es recomendable realizar el análisis bioquímico de los huevos y nauplios y correlacionar los resultados de dichos análisis con rendimientos en el cultivo larvario para obtener un posible criterio de calidad de la subsecuente progenie.

## HIPÓTESIS

La composición bioquímica de huevos y nauplios, y/o las pruebas de resistencia a estrés, pueden ser utilizadas como indicadores de calidad de camarón blanco *L. vannamei*

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Analizar diferentes criterios bioquímicos y fisiológicos que permitan predecir una buena supervivencia durante el cultivo larvario y una óptima condición fisiológica de la postlarva resultante.

### Objetivos específicos

1.- Determinar la dosis letal del 50% de larvas en edad de zoea II (LC<sub>50</sub>), expuestas a amonio para 24 horas en el estadio larvario de zoea II. Evaluar la utilidad de la supervivencia a altas concentraciones de amonio (LC<sub>50</sub>) como criterio de calidad larvaria

2.- Estandarizar una prueba de resistencia a baja salinidad para PL 2, y utilizarla como un posible indicador de la condición fisiológica de las postlarvas.

3.- Determinar si existe alguna correlación entre la composición bioquímica de huevos y nauplios, con el posterior desempeño de los organismos en cultivo y la condición fisiológica de las postlarvas.

## METODOLOGÍA.

### EXPERIMENTO A.-ESTANDARIZACIÓN DE PRUEBAS DE ESTRÉS

#### I.- Prueba de estrés de amonio.

Para llevar a cabo una prueba de resistencia a altas concentraciones de amonio en estadio de zoea II fue necesario determinar la concentración letal del 50% de los organismos ( $LC_{50}$ ), lo cual se realizó en dos partes.

Una primera prueba consistió en someter larvas en estadio larvario de zoea II provenientes de una mezcla de diferentes familias, las cuales fueron expuestas a soluciones de cloruro de amonio de 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 mg/L de amonio total (ionizado + no ionizado), en recipientes abiertos de 500mL, preparadas a partir de una solución madre (1000 mg/mL) hasta llegar a las concentraciones correspondientes.

Se utilizaron 3 réplicas para cada concentración, incluyendo un control (sin solución de amonio) con aproximadamente 30 larvas por réplica. El sistema contó con aireación continua y durante el experimento las larvas no fueron alimentadas.

Con la finalidad de controlar la temperatura del sistema, los recipientes fueron sumergidos parcialmente en agua contenida en estanques plásticos de 40 L, en los que previamente se había colocado un calentador para mantener la temperatura a 28°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Los organismos fueron transferidos de manera abrupta a los recipientes con su respectiva solución de amonio y los recipientes fueron revisados a las 6, 12, 15, 18, 21, 24 y 48 horas.

Para registrar la mortalidad acumulada, se revisaron las muestras con un microscopio estereoscópico y se consideraban como muertas las larvas que ya no presentaban movimiento alguno. Posteriormente, a partir de los datos registrados en el experimento, se calculó la  $LC_{50}$  para los distintos tiempos de exposición, con un intervalo de confianza del 95%, mediante un análisis de Probit (Stephan, 1977).

En un ensayo posterior se montó un sistema similar para evaluar una posible pérdida de amonio por evaporación después de 24 horas. Este ensayo se realizó en ausencia de organismos y se comparó la concentración final de amonio en el agua entre recipientes abiertos y cerrados. Para lo anterior, se tomaron muestras de agua de cada uno de los recipientes y se cuantificó la concentración de amonio en las soluciones de prueba, mediante el método de Solorzano (1969) modificado para microplaca. Asimismo, se determinó el pH inicial y final.

Una vez analizados los resultados del ensayo anterior se realizó una determinación de la  $LC_{50}$  de amonio en zoea II, en la que se utilizaron recipientes tapados.

Las concentraciones de amonio utilizadas fueron 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L de amonio total (ionizado + no ionizado). Los tiempos de exposición fueron de 12, 15, 18, 21, 24 y 27 horas. Las condiciones de este experimento fueron similares a la determinación de la  $LC_{50}$  de amonio en recipientes sin tapa, es decir a temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), con aireación continua y sin alimento. Se utilizaron 3 réplicas para cada concentración (incluyendo el control), con aproximadamente 30 organismos por réplica. Se realizó una revisión continua de mortalidad acumulada y se calculó la  $LC_{50}$  en la misma forma que en el ensayo anterior.

Al inicio y al final del período de exposición se determinaron los valores de pH y la concentración real de amonio.

## **II.- Prueba de estrés de salinidad**

Para establecer la concentración de salinidad a utilizar en la prueba de resistencia a la disminución de salinidad (estrés de salinidad) en postlarvas de dos días (PL2), se realizó un experimento con tres concentraciones de salinidad: 11, 15 y 18 ppm, se usó agua de mar filtrada y diluida con agua dulce hasta alcanzar las concentraciones deseadas. La salinidad se midió con ayuda de un refractómetro.

Cada una de las diluciones utilizadas contó con tres réplicas, con aproximadamente 30 organismos por réplica. Se utilizaron recipientes de un litro, los cuales se encontraban parcialmente sumergidos en un estanque plástico, con agua a 28°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) de temperatura. Durante este experimento las larvas no fueron alimentadas.

La prueba consistió en la transferencia abrupta de las postlarvas a los recipientes que contenían agua con las concentraciones de baja salinidad durante 30 minutos, después de lo cual las postlarvas fueron regresadas a recipientes con agua a salinidad normal (35 ppm); luego de 30 minutos se contaron los organismos vivos y muertos para calcular la supervivencia. Se tomaron como muertas las larvas inmóviles que no respondieron a un estímulo (al ser tocadas).

Se decidió utilizar la salinidad de 18 ppm para postlarvas de dos días (PL2). Para postlarvas de 20 días (PL20) se utilizó agua dulce (0 ppm), de acuerdo a lo establecido en estudios previos (Palacios et al., 1999).

## **EXPERIMENTO B.- COMPARACIÓN ENTRE LOTES DE LARVAS OBTENIDOS A PARTIR DE REPRODUCTORES SILVESTRES Y DOMESTICADOS.**

En este experimento se comparó el desempeño de reproductores silvestres y domesticados. Se obtuvieron dos lotes de nauplios procedentes de dos desoves colectivos, uno a partir de diez hembras silvestres (capturadas del medio natural) y otro del mismo número de hembras domesticadas (quinta generación de crecimiento en cautiverio). En estadio de zoea II y con base en los resultados del experimento de  $LC_{50}$  de amonio (experimento A), las larvas fueron expuestas a concentraciones de 20 y 30 mg de amonio por litro, en tres réplicas para cada lote y concentración. Se realizó el registro de supervivencia al cabo de 21, 24 y 27 horas de exposición.

En estadio de postlarva de un día (PL1), las larvas fueron concentradas en cubetas de un litro, en las cuales se estimó la supervivencia en cultivo por medio de conteos en alícuotas de 5mL por triplicado. Grupos de 30 a 40 postlarvas fueron expuestos a condiciones de baja salinidad (18 ppm o 50% de la salinidad del cultivo), en envases de 1 L, con tres réplicas por grupo. El período de exposición fue de 30 minutos seguido por un tiempo de recuperación de 30 minutos a la salinidad normal de cultivo (36 ppm), después del cual se realizó el conteo para cuantificar la supervivencia.

Los datos obtenidos (en porcentaje) fueron transformados aplicando arcoseno de la raíz cuadrada (Castille et al., 1993; Sokal y Rohlf, 1995). Se realizó un análisis de varianza unifactorial con los resultados de la prueba de estrés de salinidad en PL2 para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los lotes estudiados.

Por otro lado y para analizar de manera conjunta los datos de supervivencia al amonio, se utilizó un análisis de varianza trifactorial tomando en cuenta las siguientes variables: concentración (dos niveles: 20 y 30 mg/L), tiempo de exposición (tres niveles: 21, 24 y 27 horas) y lote (dos niveles: silvestres y domesticados).

## **EXPERIMENTO C.- ANÁLISIS DE CALIDAD LARVARIA EN DESOVES INDIVIDUALES**

### **Obtención de organismos.**

Se contaron con desoves individuales provenientes del programa de establecimiento de un pie de cría, del Laboratorio de Genética Acuícola. Durante 1999 se contó con reproductores en el laboratorio de maduración del CIBNOR, mientras que para el 2000 se contó con nauplios procedentes de dos grupos de desoves individuales obtenidos en los laboratorios de la empresa Maricultura del Pacífico, en Mazatlán Sinaloa, México.

En el caso de los desoves de 1999 fue posible contar con la información de los reproductores y de los desoves.

Diariamente se revisaron las piscinas al atardecer y se transfirieron las hembras con parche espermático a cubos de desoves individuales de 60 litros. A media noche, se revisaban los cubos para ver si había ocurrido algún desove, en cuyo caso se retiraba a la hembra y se registraban los valores de peso corporal, longitud total y ancho del primer segmento abdominal. A partir de los valores de

peso corporal y longitud total se calculó un Índice de Condición (ICE) (Emmerson, 1980) que se basa en la relación exponencial entre peso y longitud:

$$Pc = aL^b \quad (1)$$

Donde: Pc es peso corporal, L es longitud, a y b son la ordenada al origen (a) y la pendiente ( $b \approx 3$ ).

Despejando:  $IC = Pc/aL^b$ ; cuyo valor tiende a ser 1.

Se tomaron dos muestras de huevo, una en formol para determinar diámetro, estadio de desarrollo y deformidades; la otra para fue congelada para posteriormente realizar los análisis bioquímicos. El porcentaje de fertilización se calculó como el número de huevos con división celular dividido por el número de huevos totales, y el porcentaje de eclosión como el número de nauplios dividido por el número de huevos totales. En el caso de los desoves del 2000, se recibieron los nauplios sin contar con la información previa.

Para todos los desoves obtenidos (1999 y 2000) se tomaron dos alicuotas de nauplios, una en formol para determinar longitud, estadio de desarrollo y deformidades; la otra para los análisis bioquímicos. El diámetro del huevo y la longitud del nauplio se obtuvieron con un microscopio que contaba con un ocular graduado.

### **Cultivo Larvario**

Los nauplios fueron sembrados en estadio de nauplio V, en estanques cilíndricos de 200L a una densidad de 100 nauplios/L. Todo el material biológico conservó su identidad individual por desove a lo largo de toda la etapa larvaria y postlarvaria. La temperatura permaneció constante a 28°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) y se realizaron



revisiones diarias para cuantificar supervivencia y porcentaje de deformidades. El alimento proporcionado consistió en una mezcla de algas compuesta por *Chaetoceros mulleri*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Thalassiosira pseudonana*, además de *Artemia* sp a partir del estadio de zoea III. La proporción de cada alga y de artemia, así como la cantidad total de alimento fue acorde con el estadio larvario. En estadio de postlarva de un día (PL1) se disminuyó la densidad de organismos hasta 30 organismos/L, en esta etapa el alimento consistió en *Artemia* sp. de 50 a 100 artemias/PL y se incrementó con la edad de la postlarva, además se añadió alimento peletizado en migaja con 60% de proteína a partir de PL8.

La supervivencia en cultivo en los estadios de zoea II, mysis I, mysis II, PL1 y PL20, se estimó por extrapolación volumétrica a partir de estimaciones realizadas en tres alicuotas de cada tanque de cultivo. Los cálculos efectuados se especifican en la siguiente sección.

### **Variables de Producción.**

El porcentaje de supervivencia se calculó con base en el total de nauplios sembrados, el número de organismos en un estadio larvario fue dividido entre el número de nauplios sembrados (12000), multiplicando el resultado por 100.

$$\% \text{ de Supervivencia} = \frac{\text{Total de organismos en un estadio}}{\text{Total de nauplios sembrados (12000)}} * 100 \quad (2)$$

La supervivencia relativa entre estadios (SR), es un reflejo del porcentaje de metamorfosis, se calculó la SR a mysis y PL1 tomando en cuenta el total de organismos en un subestadio (B), dividido entre el total de organismos en un subestadio anterior (A) y multiplicando dicho cociente por 100, por ejemplo, para

calcular la supervivencia relativa a PL1, se tomó en cuenta el número total de PL1 y se dividió entre el número de mysis II, el resultado se multiplicó por 100.

$$\text{Supervivencia relativa} = \frac{\text{Total de organismos en sub estadio B}}{\text{Total de organismos en sub estadio A}} * 100 \quad (3)$$

### **Pruebas de Estrés**

Se aplicaron pruebas de supervivencia al estrés de amonio en zoea II (20 mg/L por 24 horas) y de resistencia a salinidad en PL2 (a 18 ppm por 30 minutos) y PL20 (a 0 ppm por 30 minutos). Para el caso de los desoves de 1999 se aplicaron las pruebas de amonio y salinidad en PL2. Para la primera remesa del 2000 por un error metodológico no pudieron aplicarse las pruebas de estrés de amonio y la prueba de salinidad en PL2 y sólo se aplicó la prueba de supervivencia a estrés de salinidad en PL20. Por último, a la segunda remesa del 2000 se le aplicaron todas estas pruebas (amonio, salinidad en PL2 y PL20) .

### **Obtención del Perfil Bioquímico General de Huevos y Nauplios**

Las muestras de huevos (1999) y nauplios (1999 y 2000) se procesaron por medio de un taladro (Dremel) en solución salina isotónica fría para obtener un extracto crudo, a partir del cual se realizaron las determinaciones bioquímicas por métodos colorimétricos.

Se utilizaron métodos enzimáticos para la cuantificación de los niveles de glucosa (GOD-PAP, Merck) y triglicéridos (GPO-PAP, Merck). Los lípidos totales se cuantificaron por el método de sulfosfosvoinillina (Barnes y Blackstock, 1973), las proteínas por la técnica de Bradford (1976) y los carbohidratos totales por el

método de la Antrona, según la técnica de Van Handel (1965) para muestras pequeñas.

Los carotenoides totales se determinaron por extracción con acetona y lectura de absorbancia a 480 nm. (Palacios *et al.* 1999a).

### **Triglicéridos x Longitud de Nauplio.**

La concentración de triglicéridos en nauplio se multiplicó por la longitud del mismo, esto con el fin de minimizar el efecto de la variabilidad debida al grado de desarrollo del nauplio sobre la concentración de triglicéridos (Palacios *et al.*, 1998).

### **ANÁLISIS DE DATOS.**

Para los desoves de 1999, se realizó una separación de los huevos obtenidos en tres grupos: huevos no eclosionados (HNE), huevos eclosionados sin desarrollo a postlarva (HSD) y huevos que produjeron postlarvas (HPL) y se aplicó un análisis de varianza unifactorial a los resultados de los perfiles bioquímicos.

En los desoves de 1999 con la finalidad de comparar mediante un análisis de varianza unifactorial las características del reproductor y las variables asociadas a sus productos (huevo y larva), se agruparon todas las variables con base en el peso de las hembras, a partir del cual se formaron dos grupos: hembras chicas que pesaron de 35.5 a 50.6 gramos, y hembras grandes de 52.5 a 86 gramos de peso total.

En todos los casos en los que se contó con datos en porcentaje (fertilización, eclosión, supervivencia y supervivencia relativa entre estadios) los datos fueron “normalizados” por una transformación al aplicar el arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje (Sokal y Rohlf, 1995).

Se realizaron correlaciones entre todas las variables analizadas. Previamente dichas variables fueron agrupadas según su naturaleza

- Variables a nivel de desove (sólo en el caso de los desoves de 1999): número de huevos, número de nauplios, % de fertilización y % de eclosión.

- Desempeño en cultivo larvario: supervivencia a zoea, mysis, a PL2; supervivencia relativa a mysis y a PL.

- Composición bioquímica de huevos (sólo en 1999) y nauplios: triglicéridos, glucosa, lípidos totales, carbohidratos totales y proteínas.

- Variables morfométricas: Diámetro de huevos (sólo en 1999), longitud de nauplio, longitud de zoea y mysis.

- Supervivencia a pruebas de estrés: a alta concentración de amonio en zoea II y a baja salinidad en PL2 y en PL20

- Características de los reproductores (sólo en el caso de los desoves de 1999): peso, longitud total, ancho del primer segmento abdominal e índice de condición (IC).

## RESULTADOS.

### EXPERIMENTO A. - ESTANDARIZACIÓN DE PRUEBAS DE ESTRÉS.

#### I. – Prueba de estrés de amonio.

##### 1. LC<sub>50</sub> de amonio sin tapa.

En la tabla I se muestran los valores de la prueba realizada para obtener la concentración letal de amonio del 50% de la población (LC<sub>50</sub>) de larvas de camarón blanco en estadio de zoea II, con recipientes abiertos. Cabe destacar los valores de LC<sub>50</sub> para 24 y 48 horas de exposición, que fueron de 34 y 22.7 mg de amonio/L respectivamente. De manera general, se observa que la LC<sub>50</sub> de amonio decrece conforme aumenta el tiempo de exposición.

**Tabla I: Porcentaje de mortalidad acumulada para distintas concentraciones de amonio total y diferentes tiempos de exposición (recipientes abiertos).**

Amonio (mg/L)	Tiempo de Exposición (horas)					
	12	15	18	21	24	48
<b>C (0.1)</b>	0	0	0	0	6.6 (53)	22.8 (6)
<b>20</b>	0	0	0	3.5 (80)	13.1(13)	42.8 (6)
<b>30</b>	0	0	0	13.3 (37)	38.0 (14)	94.4 (2)
<b>40</b>	0	0	8.3 (10)	34.0 (12)	73.5 (6)	100
<b>50</b>	0	0	10.8 (7)	47.3 (19)	75.3 (10)	100
<b>60</b>	3.2 (24)	12.1 (9)	40.9 (25)	80.7 (8)	95.4 (6)	100
<b>70</b>	17.9 (12)	35.1 (2)	77.0 (12)	95.4 (2)	100	
<b>80</b>	48.5 (29)	91.5 (5)	100			
<b>LC<sub>50</sub></b>	81.7 (79-86.2)	70.7 (69.5-72)	59.9 (55.6-63.9)	48.2 (46-50)	34 (29-38.1)	22.7 (21.6-24)

El valor entre paréntesis, junto a cada dato de mortalidad acumulada, corresponde al coeficiente de variación de tres réplicas. En el último renglón se indican los valores de la concentración letal de amonio del 50% de la población (LC<sub>50</sub>) para los distintos tiempos de exposición (datos reportados como media e intervalo de confianza del 95% entre paréntesis).

En un ensayo posterior, pero en ausencia de organismos, se comparó la posible pérdida de amonio entre recipientes abiertos y cerrados. La concentración de amonio en los recipientes abiertos es ligeramente menor a la que presentan los recipientes cerrados (Tabla II). Sin embargo, esta pérdida no es significativa,

excepto para los niveles de 60 y 80 mg/L, en las cuales la concentración de amonio es aproximadamente 10% mayor en los recipientes cerrados ( $p < 0.001$ ). Cabe destacar que en los recipientes abiertos, los valores reales de amonio se encuentran por debajo de la concentración nominal, mientras que, en los recipientes cerrados los valores reales son ligeramente mayores a los valores nominales en casi todos los casos.

Con respecto al pH, los valores decrecen conforme aumenta la concentración de amonio, después de 24 horas en ambos tipos de recipientes los valores de pH son más altos que al principio del ensayo (Tabla II). Los valores de pH para cada concentración fueron muy similares entre recipientes abiertos y cerrados.

**Tabla II: Concentración de amonio después de 24 horas, pH inicial y final, en recipientes abiertos y cerrados.**

AMONIO Concentración nominal (mg/L)	Recipientes sin tapa		Recipientes con tapa	
	Concentración real de amonio	PH Inicial Final	Concentración real de amonio	PH Inicial Final
0	0.014 (7.62)	8.29 8.32	0.017 (7.19)	8.31 8.33
10	9.79 (0.34)	8.21 8.28	9.95 (0.49)	8.23 8.26
20	18.87 (0.43)	8.19 8.28	20.84 (0.12)	8.24 8.26
30	29.50 (0.07)	8.17 8.23	30.69 (0.29)	8.20 8.22
40	39.62 (0.08)	8.15 8.22	40.63 (0.22)	8.16 8.20
50	48.13 (0.06)	8.05 8.15	50.78 (0.17)	8.04 8.16
60	56.76 (0.10)	8.00 8.10	61.87 (0.17)*	7.99 8.11
70	69.25 (0.12)	7.97 8.07	70.05 (0.83)	7.88 8.08
80	75.06 (0.21)	7.68 8.02	82.81 (0.23)*	7.69 8.05

Datos de concentración de amonio reportados como la media de tres réplicas y su coeficiente de variación.\*  $p < 0.01$  vs. recipientes sin tapa.

## 2. LC<sub>50</sub> en recipientes cerrados.

Tomando en cuenta los resultados de los ensayos anteriores, se procedió a determinar la LC<sub>50</sub> de amonio en zoea II en recipientes cerrados. Se observa que

los valores de  $LC_{50}$  en recipientes cerrados son menores a los de recipientes abiertos. Para 24 horas, la  $LC_{50}$  en recipientes abiertos fue de 34 mg/L, mientras que en recipientes cerrados fue de 19.4 (Tabla III). En este caso también se observa que al incrementarse el tiempo de exposición, el valor de la  $LC_{50}$  disminuye.

**Tabla III. Porcentaje de mortalidad acumulada de zoea II de *L. vannamei*, expuestas a distintas concentraciones de amonio y diferentes tiempos de exposición (recipientes cerrados).**

Amonio (mg/L)	Tiempo de exposición (horas)					
	12	15	18	21	24	27
<b>C (0.1)</b>	0	0	0	0	0	1.7 (87)
<b>10</b>	0	0	0	4.3 (43)	11.9 (25)	16.3 (43)
<b>20</b>	0	9.1 (78)	20.5 (17)	32.9 (16)	42.0 (22)	53.4 (46)
<b>30</b>	0	15.7 (37)	38.9 (14)	54.6 (17)	77.8 (35)	85.2 (22)
<b>40</b>	18.1 (10)	42.2 (17)	79.5 (34)	93.9 (25)	100 (69)	
<b>50</b>	56.0 (20)	78.0 (46)	95.6 (29)	100 (43)		
<b><math>LC_{50}</math></b>	48.3 (45.3-53.9)	40.1 (36.1-45.9)	29.4 (26.2-32.4)	24.2 (17.5-29.7)	19.4 (14.0-24.1)	17.4 (14.8-19.5)

El valor entre paréntesis, junto a cada dato de mortalidad acumulada, corresponde al coeficiente de variación de tres réplicas. En el último renglón se indican los valores de la concentración letal de amonio del 50% de la población ( $LC_{50}$ ) para los distintos tiempos de exposición (datos reportados como media e intervalo de confianza del 95% entre paréntesis).

En este ensayo se procedió a determinar el pH inicial y final, así como la concentración de amonio final luego de 24 horas de exposición (Tabla IV). Al igual que en el ensayo sin organismos, las concentraciones reales de amonio son ligeramente más altas que las concentraciones nominales. La tendencia en los valores de pH también fue la misma que en el ensayo anterior: a mayor concentración de amonio, menores valores de pH, aunque dichos valores y su variación son más bajos.

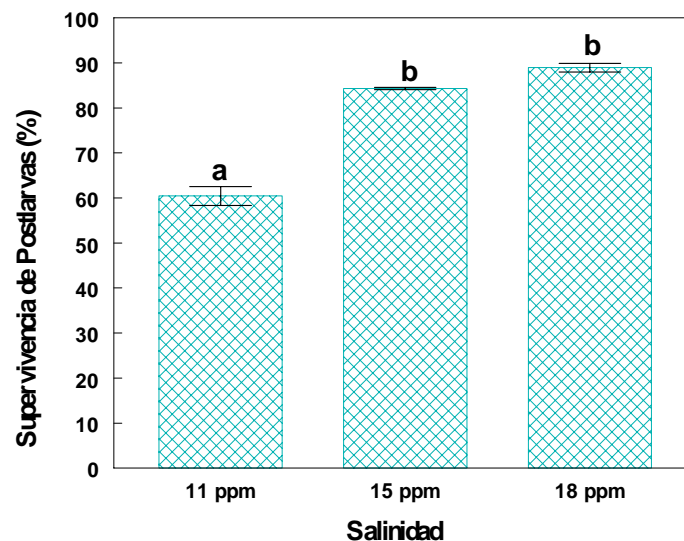
**Tabla IV. Valores de pH de las soluciones de amonio al inicio y final del experimento.**

Amonio nominal (mg/L)	PH		Amonio real (mg/L)
	Inicial	Final	
0	8.18	8.25 (0.25)	0.01 (34.40)
10	8.14	8.13 (0.25)	11.33 (3.04)
20	8.12	8.19 (0.14)	22.64 (1.80)
30	8.07	8.12 (0.12)	33.43 (5.09)
40	8.02	8.09 (0.07)	43.83 (5.94)
50	7.99	8.10 (0.14)	50.82 (1.75)

Los datos de pH final corresponden a una media de tres réplicas con su coeficiente de variación entre paréntesis. La concentración de amonio total corresponde a una media de seis determinaciones, entre paréntesis se encuentra el coeficiente de variación.

## **II.- Prueba de estrés de salinidad.**

En el ensayo para establecer la concentración de salinidad a utilizar en la prueba de estrés, se observó una mayor mortalidad a menores salinidades. La supervivencia a 11 ppm presentó diferencias estadísticamente significativas al ser comparada con la supervivencia de las larvas sometidas a 15 y 18 ppm de salinidad, mientras que en estas dos últimas concentraciones no se obtuvieron diferencias significativas (figura 1).



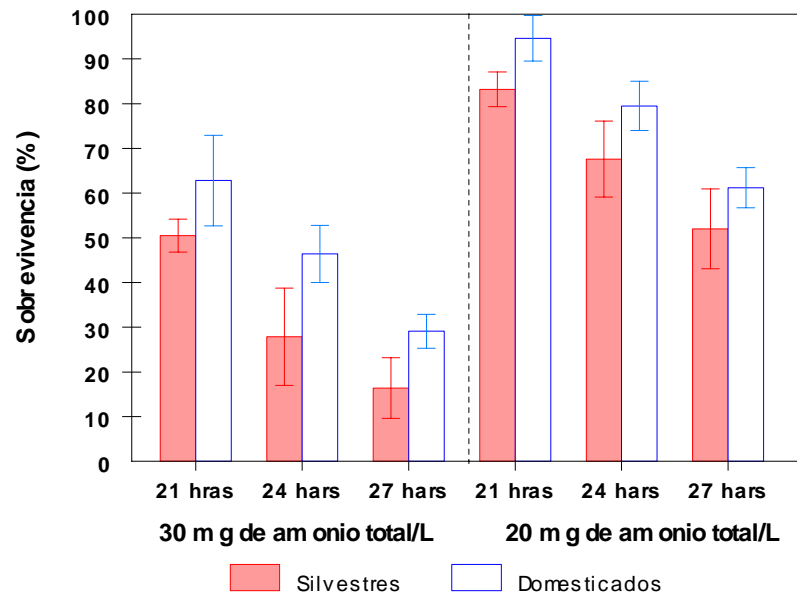
**Figura 1. Supervivencia de postlarvas expuestas a diferentes niveles de salinidad. Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).**



En ensayos posteriores, se observó gran variación en la supervivencia de PL2 sometidas a estrés de salinidad de 11 ppm, en algunos casos se obtuvo una mortalidad casi absoluta en algunos lotes de postlarvas. Debido a esto se eligió la salinidad de 18 ppm para usarse de manera rutinaria en las pruebas de estrés de salinidad posteriores.

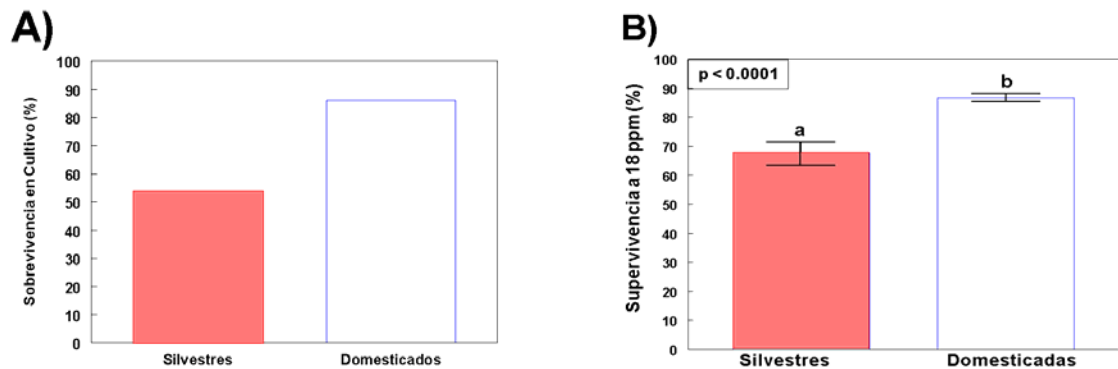
### **EXPERIMENTO B.- COMPARACIÓN ENTRE LOTES DE LARVAS OBTENIDOS A PARTIR DE REPRODUCTORES SILVESTRES Y DOMESTICADOS.**

Dada la diferencia en la  $LC_{50}$  entre recipientes abiertos y cerrados, así como la diferencia en los niveles reales de amonio en ambas condiciones, se optó por utilizar recipientes cerrados, con su respectiva  $LC_{50}$ . Sin embargo, en un primer ensayo se utilizaron recipientes abiertos en los cuales se expusieron organismos provenientes de diferentes lotes de reproductores (silvestres y domesticados) a concentraciones de 30 y 20 mg de amonio total/L por diferentes tiempos. Se analizaron los resultados en conjunto mediante un análisis de varianza trifactorial (Concentración x Tiempo de exposición x Lote). La supervivencia fue mayor en los menores tiempos de exposición (factor tiempo  $F[2,24]= 52.97$ ;  $P < 0.001$ ) y en la concentración más baja (factor concentración  $F[1,24]= 156.7$ ;  $P < 0.001$ ). Por otro lado se observó un efecto significativo del factor Lote ( $F[1,24]= 24.3$ ,  $P < 0.001$ ), con mejor supervivencia de las larvas provenientes de reproductores domesticados (figura 2). No hubo ninguna interacción significativa entre dos o tres factores analizados.



**Figura 2: Supervivencia a 30 mg/L y 20 mg/L de amonio total de larvas en zoea II, provenientes de reproductores silvestres y domesticados. Datos provenientes de la media de tres réplicas.**

Al someter los lotes de postlarvas (provenientes de reproductores silvestres y domesticados) a la prueba de estrés de salinidad a 18 ppm se encontró diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia entre ambos lotes ( $p < 0.001$ ), siendo más alta la del lote de postlarvas de reproductores domesticados (figura 3A). Esto concuerda con una mayor supervivencia en cultivo del lote de postlarvas domesticadas, comparado con el lote de postlarvas de reproductores silvestres (figura 3B).



**Figura 3. Supervivencia a baja salinidad (A) y en cultivo (B) de postlarvas de dos días, provenientes de reproductores silvestres y domesticados. Letras diferentes denotan diferencia estadística ( $p < 0.001$ ).**

## EXPERIMENTO C.- ANÁLISIS DE CALIDAD LARVARIA EN DESOVES INDIVIDUALES.

### I.- Desoves obtenidos en el CIBNOR (1999)

De los desoves obtenidos en el CIBNOR durante 1999, se presenta un resumen indicativo del total de desoves logrados, así como de los exitosos. Adicionalmente, se indican cuántos se utilizaron para análisis bioquímicos, tanto en huevo como en estadios posteriores y cuántos fueron sometidos a pruebas de estrés (Tabla V).

**Tabla V. Resumen de los datos del material biológico obtenido y analizado en el CIBNOR durante 1999.**

Obtenidos		Analizados bioquímicamente		Pruebas de estrés	
Total de desoves	125	Huevo no eclosionado	20	Amonio	20
Desoves eclosionados	32	Huevo sin desarrollo a PL	13	Salinidad	19
Con nauplio viables	24	Huevo que produjo PL	19		
Con metamorfosis a zoea	20	Nauplios	18		
Con metamorfosis a mysis	19				
Con producción de postlarva	19				

Cabe destacar que durante 1999, el éxito de eclosión fue muy bajo, de 125 desoves obtenidos sólo 32 produjeron nauplios, lo que representa un 25.6%. Además, se obtuvieron nauplios viables sólo en 24 desoves, lo cual corresponde a un 19.2% del total de desoves, de los cuales sólo 19 desoves produjeron postlarvas, lo que representa apenas un 15.2% con relación al total de los desoves. Esto permite hacer una agrupación de los desoves dependiendo de la eclosión y el desarrollo posterior a postlarva, lo cual se presenta en la siguiente sección.

### 1.- Características del huevo y nauplio en relación a la calidad del desove.

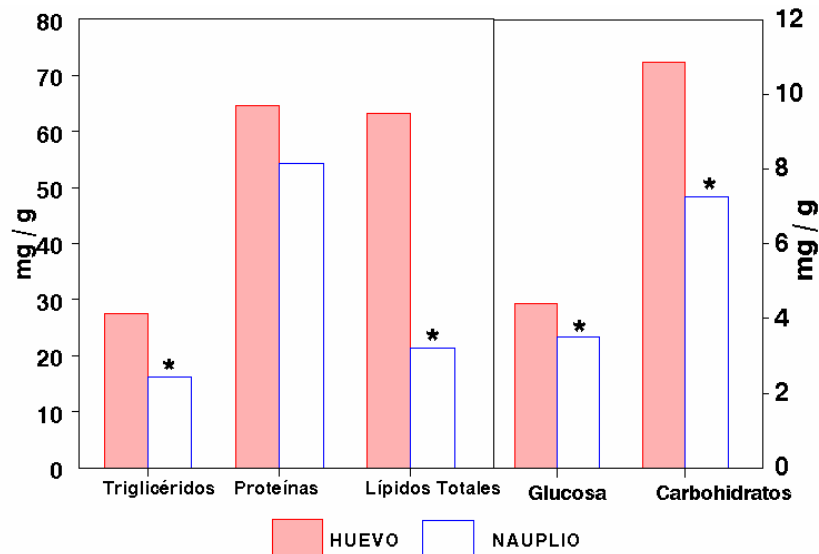
En la tabla VI se reportan los valores de la composición bioquímica general de los desoves obtenidos en el CIBNOR en 1999, se separaron en tres grupos: Huevos No Eclosionados (HNE), Huevos Eclosionados Sin Desarrollo a postlarvas (HSD) y Huevos que produjeron Postlarvas (HPL). Las concentraciones de casi todos los componentes bioquímicos, excepto proteínas, presentaron una tendencia a ser más elevadas en los huevos que produjeron postlarvas (HPL). Sin embargo, sólo en el caso de carbohidratos y lípidos totales se obtuvieron concentraciones significativamente más altas en los huevos que produjeron postlarvas en comparación con los otros dos grupos. En huevos sin desarrollo (HSD) se incluyen los huevos que eclosionaron pero que no produjeron postlarvas. Por otro lado, no se observó diferencia significativa en el diámetro de huevo, mientras que la longitud del nauplio fue ligeramente mayor en el grupo con desarrollo a postlarva.

**Tabla VI. Comparación bioquímica de huevos con relación a la clasificación del desove. HNE= Huevos No Eclosionados; HSD= Huevos Sin Desarrollo a postlarva; HPL= Huevos que produjeron Postlarvas.**

Componentes Bioquímicos (mg/g)	HNE	HSD	HPL	ANOVA
Triglicéridos	25.1 ± 4.95	23.0 ± 5.06	27.5 ± 9.41	n.s.
Glucosa	3.87 ± 0.57	3.54 ± 0.69	4.39 ± 1.73	n.s.
Carbohidratos	8.92 ± 1.95 <sup>ab</sup>	8.37 ± 1.96 <sup>a</sup>	10.8 ± 3.36 <sup>b</sup>	p<0.03
Proteínas	65.6 ± 13.8	64.8 ± 21.4	64.6 ± 15.6	n.s.
Lípidos Totales	41.5 ± 8.19 <sup>a</sup>	37.7 ± 6.92 <sup>a</sup>	63.3 ± 25.9 <sup>b</sup>	p<0.001
Diámetro de huevos(µm)	262 ± 7.2	260 ± 12.1	261 ± 8.1	n.s.
Longitud de nauplios(µm)		362 ± 8.7 <sup>a</sup>	370 ± 6.5 <sup>b</sup>	p<0.004

Datos reportados como media ± desviación estándar. En la última columna se indica el valor de probabilidad resultante de la ANOVA. n.s. = diferencia no significativa. Letras diferentes en el mismo renglón denotan diferencia significativa.

Al comparar la composición bioquímica de los huevos que produjeron postlarvas y los nauplios resultantes se observó una disminución en las concentraciones de los diferentes compuestos en el estadio de nauplio con respecto a las concentraciones encontradas en huevo (figura 4).



**Figura 4. Comparación entre la composición bioquímica de huevos que complementaron su desarrollo hasta postlarva y los nauplios resultantes. El asterisco denota diferencia significativa.**

Esta disminución fue estadísticamente significativa en los triglicéridos, lípidos totales, glucosa y carbohidratos totales ( $p < 0.05$ ), los lípidos totales presentaron la diferencia más marcada con una disminución de poco más del 66% (de 63.26 a 21.33 mg/g). Por otra parte, aunque las proteínas también disminuyeron la diferencia no fue estadísticamente significativa.

## 2.- Análisis de correlación entre las distintas variables registradas

En esta sección de resultados únicamente se describen las correlaciones significativas obtenidas y se mencionan los casos en los que no hubo ninguna

correlación. Adicionalmente, en el anexo de esta tesis se reportan tablas con los coeficientes de correlación obtenidos.

Los tipos de variables registradas que se usaron para los análisis de correlación se presentan en la tabla VII, en la cual se indican las medias y la desviación estándar para cada variable.

**Tabla VII. Variables analizadas mediante correlaciones, datos de la remesa de 1999.**

<b>Variables de producción a nivel de desove</b>		<b>Variables de producción en cultivo larvario (%)</b>	
Número de huevos	121,157 ± 59,263	Supervivencia. a Zoea	75.6 ± 23.4
Número de nauplios	30,400 ± 19,718	Supervivencia a Mysis	61.5 ± 27.2
% de fertilización	47.5 ± 30.0	Supervivencia a PL 2	53.7 ± 26.3
% de eclosión	28.4 ± 16.0	Supervivencia relativa a Mysis	85.6 ± 16.1
		Supervivencia relativa a PL	81.3 ± 16.2
<b>Composición bioquímica de huevos (mg/g)</b>		<b>Composición bioquímica de nauplios (mg/g)</b>	
Triglicéridos	27.5 ± 9.41	Triglicéridos	16.2 ± 3.22
Glucosa	4.39 ± 1.73	Glucosa	3.49 ± 1.06
Lípidos totales	63.3 ± 25.9	Lípidos totales	21.3 ± 3.20
Carbohidratos totales	10.9 ± 3.36	Carbohidratos totales	7.27 ± 2.73
Proteínas	64.6 ± 15.7	Proteínas	54.3 ± 11.3
<b>Variables morfométricas</b>		<b>Supervivencia a pruebas de estrés (%)</b>	
Diámetro de huevo (µm)	261 ± 0.8	A alta concentración de amonio	80.9 ± 16.7
Longitud de nauplio (µm)	370 ± 2.5	A baja Salinidad PL2	88.5 ± 9.5
Longitud de zoea (µm)	1446 ± 9.9		

<b>Características del reproductor</b>	
Peso (g)	52.1 ± 7.87
Longitud total (cm)	17.4 ± 1.05
Ancho primer segmento abdominal (mm)	12.5 ± 0.70
Índice de Condición	1.00 ± 0.05

Datos reportados como media ± desviación estándar.

## 2.1. - Variables morfométricas.

El diámetro del huevo presentó valores entre los 240 y 290 µm (Coeficiente de Variación=3.1), mientras que el intervalo de tallas en los nauplios es más amplio que en huevo (de 330 a 450 µm, CV=6.9), debido a que se encontraron varios estadios de nauplio, aunque predominaron los estadios IV y V. Las zoeas también presentaron un intervalo de talla más amplio en el estadio de zoea II (de

1200 a 1725  $\mu\text{m}$ ,  $\text{CV}=6.8$ ). No se obtuvo ninguna correlación significativa entre las distintas variables morfométricas entre si.

En el análisis de correlación entre las variables morfométricas y las variables de producción tanto en cultivo larvario como en producción, la correlación entre el diámetro de huevo y la supervivencia relativa a mysis fue negativa y la única estadísticamente significativa ( $r=-0.498$ ,  $p=0.03$ ).

Al correlacionar las variables morfométricas con las variables bioquímicas se encontraron correlaciones significativas entre el diámetro de huevo con la concentración de proteínas en nauplio ( $r=0.556$ ,  $p=0.048$ ), la longitud de nauplio con la concentración de triglicéridos en huevo ( $r=-0.638$ ,  $p=0.019$ ), la longitud de zoeas con la concentración de triglicéridos en nauplio ( $r=0.698$ ,  $p=0.008$ ). Por su parte el Índice TG x Long. Nauplio se correlacionó significativamente con la longitud de zoea ( $r=0.743$ ,  $p=0.004$ ).

No se encontraron correlaciones significativas entre las variables morfométricas y la supervivencia a las pruebas de estrés.

## **2.2. - Variables de producción.**

Al correlacionar distintas variables de producción entre si, se observó que a nivel de cultivo larvario existió alta correlación entre las supervivencias a distintos estadios larvarios ( $r^2>0.5$ ;  $p<0.02$ ). Cabe destacar, por ejemplo la relación entre supervivencia a postlarva y supervivencia a zoea.

La supervivencia relativa en cada estadio larvario tomó en cuenta el número total de larvas en un estadio y se dividió entre el número de larvas del siguiente estadio, multiplicando el resultado por 100 (ver fórmula 2 en metodología) No se

reporta la supervivencia relativa a zoea por ser la misma que la supervivencia absoluta a zoea.

No se encontró alguna correlación significativa la supervivencia relativa a los estadios de mysis y PL con otra variable de producción de cultivo larvario.

Al analizar la producción a nivel de desove y de cultivo larvario se observó una correlación significativa entre el número de nauplios con respecto a los valores de supervivencia en cultivo a los 3 estadios: zoea ( $r=0.612$ ,  $p=0.006$ ), mysis ( $r=0.667$ ,  $p=0.002$ ) y postlarva ( $r=0.642$ ,  $p=0.003$ ). Por otro lado, las correlaciones entre el porcentaje de eclosión y la supervivencia tanto a mysis como a postlarva también fueron significativas ( $r=0.551$ ,  $p=0.015$ ;  $r=0.501$ ,  $p=0.03$  respectivamente).

No se observó ninguna correlación entre variables de producción a nivel de cultivo larvario con la composición bioquímica de huevo y nauplios, excepto por una correlación negativa entre la supervivencia relativa a mysis y la concentración de proteínas en nauplio ( $r=-0.592$ ,  $p=0.033$ ).

### **2.3. - Pruebas de estrés.**

La supervivencia a la prueba de estrés al amonio se analizó de manera particular, dado que su evaluación constituye uno de los principales objetivos del presente trabajo.

No se encontró correlación significativa entre la supervivencia a pruebas de estrés (amonio y salinidad) y la supervivencia en los diferentes estadios larvarios analizados.



La supervivencia a la prueba de estrés de amonio se correlacionó significativamente con la concentración en huevo y nauplio de carbohidratos totales ( $r=0.481$ ,  $p=0.049$  en huevo y  $r=0.536$ ,  $p=0.031$  en nauplio) y lípidos totales ( $r=0.496$ ,  $p=0.047$  en huevo y  $r=0.542$ ,  $p=0.037$  en nauplio). Con respecto a la supervivencia a estrés de salinidad, solo se encontró una correlación negativa con la concentración de proteínas en huevo ( $r=-0.553$ ,  $p=0.014$ ).

La correlación entre las dos pruebas de estrés (de amonio y de salinidad) presentó un coeficiente de correlación en el límite de la significancia ( $r=0.435$ ,  $p=0.063$ ).

Al correlacionar la supervivencia a ambas pruebas de estrés y la producción a nivel de desove, solo la supervivencia a estrés de salinidad se correlacionó negativamente con el porcentaje de eclosión ( $r=-0.549$ ,  $p=0.015$ ).

### **3.- Calidad del desove y calidad larvaria en relación al tamaño corporal de los reproductores**

El peso corporal de las hembras se correlaciona significativamente con la longitud total ( $r=0.937$ ,  $p<0.001$ ), el ancho del primer segmento abdominal ( $r=0.912$ ,  $p<0.001$ ), el número de huevos por desove ( $r=0.513$ ,  $p=0.025$ ) y el porcentaje de fertilización ( $r=0.516$ ,  $p=0.024$ ).

Se encontró también que el diámetro de huevo se correlacionó significativamente ( $r=0.465$ ,  $p=0.045$ ) con el Índice de Condición del reproductor (IC). Ninguna otra de las características del reproductor se correlacionó significativamente con las variables morfométricas.

Los datos de las variables de desoves se separaron en dos grupos, con base en el peso corporal de la hembra en: chicas y grandes. Al contrastar los

valores de las variables en estos dos grupos se encontraron diferencias significativas en: el peso de la hembra, la longitud de la hembra, el ancho del primer segmento abdominal, el número de huevos por desove, el índice de condición y la longitud del nauplio. No se encontraron diferencias en la supervivencia en cultivo larvario ni en la composición bioquímica de los huevos (Tabla VIII).

**Tabla VIII. Comparación entre resultados tomando en cuenta el peso de las hembras**

<b>Variable</b>	<b>Chicas 35.5 a 50.6</b>	<b>Grandes 52.5 a 86</b>	<b>p</b>
<b>Peso hembra (g)</b>	45.1 ± 0.54	57.2 ± 0.96	p<0.001
<b>Long-total de la hembra (cm)</b>	16.6 ± 0.09	18.1 ± 0.11	p<0.001
<b>Ancho 1er seg. Abd (mm).</b>	11.9 ± 0.07	13.0 ± 0.08	p<0.001
<b>Índice de condición (ICE)</b>	0.99 ± 0.01	1.02 ± 0.01	p<0.05
<b>Número de huevos</b>	113,745 ± 6,484	146,136 ± 7,784	p<0.005
<b>Número de nauplios</b>	28,649 ± 6,859	33,253 ± 3,408	n.s.
<b>% de Fertilización</b>	36.6 ± 4.36	41.4 ± 4.92	p<0.05
<b>% de Eclosión</b>	29.5 ± 4.84	23.3 ± 3.99	n.s.
<b>Diámetro de huevo (µm)</b>	262 ± 0.8	261 ± 0.7	n.s.
<b>Long. de nauplio (µm)</b>	364 ± 1.5	378 ± 3.2	p<0.001
<b>Long. de zoea (µm)</b>	1460 ± 9.9	1430 ± 9.7	n.s.
<b>Supervivencia a zoea (%)</b>	69.9 ± 7.32	78.6 ± 7.07	n.s.
<b>Supervivencia a mysis (%)</b>	52.6 ± 6.61	59.7 ± 8.35	n.s.
<b>Supervivencia a PL (%)<sup>1</sup></b>	44.1 ± 6.36	50.2 ± 6.93	n.s.
<b>Estrés de salinidad (%)</b>	86.4 ± 3.89	90.4 ± 2.23	n.s.
<b>Estrés de amonio (%)</b>	83.6 ± 4.35	78.4 ± 6.26	n.s.
<b>Triglicéridos en huevo (mg/g)</b>	26.2 ± 3.47	28.6 ± 2.78	n.s.
<b>Glucosa en huevo(mg/g)</b>	4.58 ± 0.64	4.22 ± 0.52	n.s.
<b>Carbohidratos huevo (mg/g)</b>	11.6 ± 1.26	10.2 ± 0.94	n.s.
<b>Proteínas en huevo (mg/g)</b>	63.1 ± 5.69	65.9 ± 4.70	n.s.
<b>Lípidos tot. en huevo (mg/g)</b>	71.8 ± 11.1	55.61 ± 4.74	n.s.

Datos reportados como media ± desviación estándar. En la última columna se indica el valor de probabilidad resultante de la ANOVA. n.s. = diferencia no significativa.

## **II.- Desoves de Maricultura del Pacífico (2000).**

### **1.- Primera remesa del 2000.**

Los tipos de variables registradas que se usaron para los análisis de correlación se presentan en la tabla IX, en esta se indican las medias y la desviación estándar para cada variable.

**Tabla IX. Variables analizadas mediante correlaciones, primera remesa del 2000.**

<b>PRODUCCIÓN En cultivo larvario (%)</b>		<b>Composición bioquímica de nauplios</b>	
Supervivencia a zoea II	83.9 ± 20.7	Triglicéridos	11.6 ± 1.58
Supervivencia a mysis II	79.1 ± 19.2	Glucosa	2.28 ± 0.31
Supervivencia a PL 1	66.3 ± 21.0	Lípidos totales	14.62 ± 2.13
Supervivencia relativa a mysis	93.7 ± 12.3	Carbohidratos totales	7.56 ± 2.07
Supervivencia relativa a a PL	79.6 ± 17.4	Proteínas	73.2 ± 12.1
		Carotenoides totales	0.11 ± 0.06
<b>Supervivencia a pruebas de mstrés (%)</b>		<b>Variables morfométricas</b>	
- A baja salinidad en PL20	65.4 ± 19.8	Longitud de nuaplio (µm)	449 ± 2.2
		Longitud de zoea (µm)	1553 ± 15.4
		Longitud de mysis (µm)	3292 ± 40.7

Datos reportados como media ± desviación estándar.

#### **1.1.- Variables morfométricas.**

La variabilidad en el intervalo de tallas en cada estadio larvario analizado se incrementa conforme se avanza en el desarrollo de las larvas: los nauplios tienen un menor intervalo de talla (de 34 a 50 µm, CV=3.65) que el de las zoeas (de 1125 a 2350 µm, CV=7.59) y mysis (de 1840 a 4080 µm, CV=9.93). Esta misma tendencia ya había sido observada en los desoves de 1999.

Por otra parte, no se encontraron correlaciones significativas entre las variables morfométricas y otras variables analizadas, excepto entre las propias variables morfométricas

### **1.2. - Variables de producción.**

Al igual que en los desoves de 1999 se encontró alta correlación entre las supervivencias a distintos estadios larvarios, la supervivencia a zoea con supervivencia a mysis ( $r=0.701$ ,  $p<0.001$ ); supervivencia a zoea con supervivencia a PL1 ( $r=0.727$ ,  $p<0.001$ ) y supervivencia a mysis con supervivencia PL 1 ( $r=0.81$ ,  $p<0.001$ ).

Por otro lado, se observó que la supervivencia relativa (metamorfosis) a mysis se correlacionó significativamente con la supervivencia a mysis ( $r=0.348$ ;  $p=0.024$ ), y también con la supervivencia a PL1 ( $r= 0.366$ ;  $p=0.017$ ). Además la supervivencia a PL1 presentó correlación significativa con la supervivencia relativa (metamorfosis) a PL1 ( $r=0.394$ ;  $p=0.01$ ).

### **1.3. - Composición bioquímica.**

En cuanto a las variables de producción a nivel de cultivo larvario y la composición bioquímica se observó una correlación negativa entre la supervivencia a zoea y la concentración de glucosa en nauplio ( $r=-0.348$ ,  $p=0.024$ ).

### **1.4. - Prueba de estrés.**

Al correlacionar la supervivencia a la prueba de estrés de salinidad en PL20 no se encontró correlación significativa con ninguna variable.

## **2.- Segunda remesa del 2000.**

Debido a las condiciones de desove y tratamiento de los reproductores como la fecha de ablación y la época del año, los dos grupos de desoves del 2000 fueron considerados como dos “remesas” diferentes y por eso se analizan por separado. Además, en este lote se analizan algunas variables como la

supervivencia de PL1 a PL20, la supervivencia a las pruebas de estrés de amonio en zoea y salinidad en PL2, que por razones operativas no fue posible registrar en la remesa anterior.

Las variables utilizadas para los análisis de correlación se resumen en la tabla X.

**Tabla X. Variables analizadas mediante correlaciones, segunda remesa del 2000.**

<b>PRODUCCIÓN En cultivo larvario (%)</b>		<b>Composición bioquímica de nauplios</b>	
Supervivencia a Zoea II	75.6±23.6	Triglicéridos	12.9±1.71
Supervivencia a Mysis II	60.8±28.0	Glucosa	2.47±0.49
Supervivencia a PL 1	57.7±29.4	Lípidos totales	14.1±1.69
Supervivencia de PL1 a PL20	41.4±26.3	Carbohidratos totales	5.32±0.52
Supervivencia relativa a Mysis	84.4±17.0	Proteínas	75.9±11.2
Supervivencia relativa a PL	88.5±13.1	Carotenoides totales	0.07±0.05
<b>Supervivencia a pruebas de estrés (%)</b>		<b>Variables morfométricas</b>	
- A alta concentración de amonio	16.3±13.2	Longitud de. Nuaplio (µm)	470±2.0
- A baja salinidad en PL2	60.7±22.8	Longitud de Zoea (µm)	1540±12.0
- A baja salinidad en PL20	42.8±17.9	Longitud de. Mysis (µm)	3410±34.0

Datos reportados como media ± desviación estándar.

Cabe destacar que ocurrió alta mortalidad después de realizar los conteos en el estadio de PL1, lo cual se refleja en el porcentaje de supervivencia entre PL1 y PL20 de 41.4%, valor muy bajo comparado con lo que normalmente ocurre en producción

### **2.1.- Variables morfométricas.**

Con relación a las variables morfométricas se observó la misma tendencia que en los desoves de 1999 y la primer remesa del 2000, conforme se desarrolla la larva la variabilidad de tallas se incrementa para cada estadio.

Por otra parte, al correlacionar las variables morfométricas con el resto de las variables analizadas, se observaron correlaciones significativas entre la longitud

de las zoeas y la longitud de mysis ( $r=0.857$ ,  $p<0.001$ ) y entre los resultados de la prueba de estrés de salinidad en PL2 con la longitud de zoea ( $r=0.428$ ,  $p=0.026$ ) y con la longitud de mysis ( $r=0.446$ ,  $p=0.02$ )

## **2.2. - Variables de producción.**

Se observó que al correlacionar las variables de producción entre si, se presentó alta correlación entre las supervivencias a distintos estadios larvarios.

La supervivencia a zoea se correlacionó tanto con la supervivencia a mysis ( $r=0.794$ ;  $p<0.001$ ) como con la supervivencia a PL1 ( $r=0.733$ ;  $p<0.001$ ). La supervivencia a mysis se correlacionó con la supervivencia relativa a mysis ( $r=0.658$ ;  $p<0.001$ ) y a su vez con la supervivencia a PL1 ( $r=0.960$ ;  $p<0.001$ ). No se encontró alguna correlación significativa entre la supervivencia entre PL1 y PL20 con otra variable de producción de cultivo larvario.

## **2.3. - Composición bioquímica**

En el análisis de correlación, los lípidos totales se correlacionaron negativamente con la supervivencia y la supervivencia relativa a zoea ( $r=-0.336$ ;  $p=0.045$ ), la supervivencia a mysis ( $r=-0.373$ ;  $p=0.025$ ), las supervivencias a PL1 ( $r=-0.330$ ;  $p=0.049$ ) y de PL1 a PL20 ( $r=-0.425$ ;  $p=0.009$ ). Las proteínas se correlacionaron negativamente con la supervivencia a mysis ( $r=-0.466$ ;  $p=0.004$ ) y con la supervivencia a PL1 ( $r=-0.385$ ;  $p=0.020$ ). Por su parte, los triglicéridos se correlacionaron negativamente con la supervivencia de PL1 a PL20 ( $r=-0.335$ ;  $p=0.046$ ). No se observó ninguna correlación entre la composición bioquímica la supervivencia relativa a mysis y a PL1

Por su parte, el Índice triglicéridos x Longitud del Nauplio se correlacionó negativamente con la supervivencia a zoea ( $r=-0.349$ ,  $p=0.047$ ) y con la supervivencia de PL1 a PL20 ( $r=-0.395$ ,  $p=0.023$ ).

#### **2.4. - Pruebas de estrés.**

La supervivencia al estrés de alta concentración de amonio se correlacionó significativamente con todas las supervivencias a los distintos estadios larvarios ( $r>0.55$ ;  $p<0.001$ ), excepto con la supervivencia de PL1 a PL20. La supervivencia a baja salinidad en PL20 se correlacionó negativamente con las mismas variables ( $r>0.55$ ;  $p<0.001$ ) y con la supervivencia relativa a mysis. La supervivencia a baja salinidad en PL2 solo se correlacionó significativamente con la supervivencia de PL1 a PL20 ( $r=0.451$ ;  $p=0.014$ ).

Al analizar las correlaciones entre la supervivencia a las pruebas de estrés de amonio en zoea y de salinidad en PL2 y PL20 no se encontró alguna correlación significativa entre tales datos, ni siquiera entre las supervivencias a baja salinidad en las dos edades de postlarva.

### **III.- Comparación entre remesas del 2000.**

Debido a las diferencias en las características de los desoves del 2000, y a pesar de provenir del mismo laboratorio, fueron tomados como grupos diferentes principalmente por los distintos tiempos de ablación y de desove (y meses de diferencia entre los dos grupos). Por ello, se compararon los 2 grupos entre si mediante un ANOVA , cuyos resultados están en la tabla XI:

Tabla XI. Comparación entre los dos grupos de desove del 2000.

	Primera remesa	Segunda remesa	p
<b>Supervivencia a zoea (%)</b>	83.9 ± 20.7	75.6 ± 23.6	n.s.
<b>Supervivencia a mysis (%)</b>	79.1 ± 19.2	60.8 ± 28.0	p<0.01
<b>Supervivencia a PL 1 (%)</b>	66.3± 21.0	57.7 ± 29.4	n.s.
<b>Supervivencia relativa a mysis (%)</b>	93.7± 12.3	84.4 ± 17.0	p<0.005
<b>Supervivencia relativa a PL (%)</b>	79.6± 14.7	88.0 ± 13.1	p<0.005
<b>Sup. a estrés de salinidad PL2 (%)</b>		60.7 ± 22.8	
<b>Sup. a estrés de amonio zoea 2 (%)</b>		16.3 ± 13.2	
<b>Sup. a estrés de salinidad PL20 (%)</b>	63.9 ± 18.9	42.8 ± 17.9	p<0.001
<b>Triglicéridos (mg/g)</b>	11.6 ± 1.58	12.9 ± 1.7	p<0.005
<b>Glucosa (mg/g)</b>	2.28 ± 0.31	2.47 ± 0.49	p<0.05
<b>Lípidos totales (mg/g)</b>	14.6 ± 2.13	14.1 ± 1.69	n.s.
<b>Carbohidratos totales (mg/g)</b>	7.56 ± 2.07	5.32 ± 0.52	p<0.001
<b>Proteínas (mg/g)</b>	73.2 ± 12.01	75.9 ± 11.2	n.s.
<b>Carotenoides (mg/g)</b>	0.11 ± 0.06	0.07 ± 0.05	p<0.01
<b>TG x Long. nauplio</b>	5.22 ± 0.73	6.08 ± 0.78	p<0.001
<b>Longtud de nauplio (µm)</b>	449 ± 22.0	470 ± 170	p<0.001
<b>Longtud de zoea (µm)</b>	1553 ± 150	1539 ± 117	n.s.
<b>Longtud de mysis (µm)</b>	3292 ± 407	3410 ± 339	p<0.001

Datos reportados como media ± desviación estándar. En la última columna se indica el valor de probabilidad resultante de la ANOVA. n.s. = diferencia no significativa.

En la primera remesa las supervivencias en los estadios larvarios fueron ligeramente más altas que en la segunda remesa, pero solo la supervivencia a mysis presentó diferencias significativas. La supervivencia relativa a mysis fue significativamente más alta en la primera remesa, por el contrario la supervivencia relativa a PL fue significativamente mayor en la segunda remesa.

La prueba de supervivencia a estrés de salinidad en PL20 fue la única prueba que se aplicó en ambas remesas. La supervivencia a estrés de salinidad en PL20 fue significativamente mayor en la primera remesa.

Con respecto a la composición bioquímica de los nauplios, la concentración de triglicéridos y glucosa fue estadísticamente más alta en la segunda remesa, mientras que la concentración de carbohidratos y carotenoides totales fue significativamente más alta en la primera remesa. Por otra parte la concentración



de lípidos y proteínas totales no presentó diferencia estadística entre las dos remesas.

En la segunda remesa se obtuvieron nauplios y mysis estadísticamente más grandes que en la primera remesa, mientras que la longitud de zoeas no fue significativamente diferente.

Por último, el Índice Triglicéridos x Longitud de nauplio fue más alto en la segunda remesa y estadísticamente diferente al de la primera remesa del 2000.

En resumen:

- En los huevos obtenidos de los desoves de 1999 se encontraron concentraciones bioquímicas por lo general más altas en los huevos que produjeron postlarvas (HPL) que en los otros dos grupos (HNE y HSD), las diferencias fueron significativas en la concentración de carbohidratos y lípidos totales.

- Sólo para los desoves de 1999 se contó con información de la producción a nivel de desove y se observaron correlaciones significativas entre la supervivencia a distintos estadios larvarios con el número de nauplios y el porcentaje de eclosión.

- El tamaño de los reproductores únicamente se correlacionó de manera significativa con algunas variables de producción a nivel de desove (número de huevos, porcentaje de fertilización y longitud de nauplio), mas no con el desempeño al nivel de cultivo larvario.

- Como era de esperarse se observaron correlaciones altamente significativas entre las supervivencias de los diferentes estadios larvarios en todos los casos, mas no con la supervivencia relativa.

- La composición bioquímica de huevos y nauplios no se correlacionó con el desempeño al nivel de cultivo larvario, excepto por una correlación entre supervivencia relativa a mysis y la concentración de lípidos en nauplio en los desoves de 1999. Por otro lado, se encontraron algunas correlaciones negativas entre la composición bioquímica de nauplios y la supervivencia larvaria en los desoves del 2000.

- Las variables morfométricas no se correlacionaron con el desempeño al nivel de cultivo larvario. Este tipo de variables sólo presentó correlaciones significativas aisladas con respecto a algunas variables bioquímicas (desoves de 1999) con respecto a las mismas variables morfométricas (primera y segunda remesa de desoves del 2000) y con los resultados de supervivencia a la prueba de estrés de salinidad en PL2.

- Los resultados de la prueba de resistencia a estrés de amonio fueron variables: no se encontró una correlación significativa con la supervivencia larvaria para los desoves de 1999, mientras que para la segunda remesa del 2000, la correlación fue significativa a nivel de todos los estadios larvarios.

- Para la prueba de resistencia a estrés de salinidad los resultados más confiables y completos son los de la segunda remesa del 2000, en la cual se obtuvieron la siguientes correlaciones significativas:

- Entre supervivencia a baja salinidad en PL2 y supervivencia en cultivo de PL1 a PL20.
- Entre supervivencia a baja salinidad en PL20 y supervivencia en cultivo de los estadios de zoea, mysis y PL1, estas correlaciones fueron negativas.

Por otro lado, no se encontró correlación significativa entre la supervivencia a baja salinidad en PL2 y en PL20.

## DISCUSIÓN.

### Niveles letales de alta concentración de amonio y baja salinidad.

Antes de discutir la utilidad de las pruebas de estrés es necesario comparar los niveles de amonio y de salinidad utilizados en el presente trabajo con los obtenidos por otros autores.

Las LC<sub>50</sub> de amonio obtenidas en el experimento A, son similares o ligeramente más altas a las reportadas por otros autores para otras especies de peneidos en el mismo estadio larvario (zoea II; Tabla XII).

**Tabla XII. Valores de LC<sub>50</sub> de amonio a las 24 y 48 horas para zoea II de diferentes especies de peneidos.**

<b>Especie</b>	<b>LC<sub>50</sub> a 24h (mg/L)</b>	<b>LC<sub>50</sub> a 48h (mg/L)</b>	<b>Referencia</b>
<i>P. indicus</i>	22.96		Jayasankar y Muthu, 1983
<i>P. monodon</i>	8.48		Chin y Chen, 1987
<i>M. ensis</i>	4.80		Chen et al., 1991
<i>P. paulensis</i>	22.9 (16 - 29)	14.5 (10.2-20.6)	Ostrensky <i>et al.</i> , 1995
<i>P. japonicus</i>	23.1 (14.5-34)	12.5 (3.8 - 29.8)	Lin <i>et al.</i> , 1993
<i>P. vannamei</i>	34 (28.9-38.1)	22.7 (21.6-23.7)	*Recipientes abiertos
<i>P. vannamei</i>	19 (10 - 24.1)	17.4 (14.8-19.5)	*Recipientes cerrados

\* Este estudio.

Las diferencias encontradas entre este estudio y los reportes anteriores pueden deberse a diferencias en las condiciones en las que se realizaron los experimentos, en los parámetros fisicoquímicos del agua, especialmente el pH, a la especie o en particular a las características de los organismos (condición fisiológica).

Los estudios antes mencionados han demostrado que la tolerancia al amonio se incrementa con el desarrollo de los organismos, y también muestran que la tolerancia es muy diferente de una especie a otra. Por ejemplo, la LC<sub>50</sub> de amonio a las 24 horas para *Metapenaeus ensis* y para *Penaeus monodon* es

inferior a los 10mg/L (Chin y Chen, 1987; Chen et al., 1991) mientras que para otras especies de peneidos es de alrededor de 20 mg/L (Jayasankar y Mutu, 1983; Lin *et al.*, 1993; Ostrensky et al., 1995; este estudio en recipientes cerrados) e inclusive superior a los 30 mg/L (este estudio en recipientes abiertos).

Para poder explicar las diferencias en los niveles letales de amonio utilizando recipientes abiertos y cerrados se tienen que analizar en primera instancia los parámetros fisicoquímicos del agua. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de amonio en los recipientes abiertos y cerrados, salvo para dos concentraciones (Tabla II). La diferencia promedio entre recipientes abiertos y cerrados fue de 2.3%, lo cual indica que la pérdida de amonio en los recipientes abiertos no fue tan marcada y probablemente no explica las diferencias entre las  $LC_{50}$ . Tampoco se registraron cambios significativos en el pH de las soluciones de prueba entre los recipientes abiertos y cerrados. El monitoreo del pH era necesario dado que la toxicidad del amonio se incrementa con el aumento de la temperatura y del pH (Regnault, 1987). El equilibrio entre las formas de amonio depende principalmente del pH y en menor grado de la temperatura y salinidad: al incrementarse el pH, el equilibrio tiende hacia la forma de amonio no ionizada ( $NH_3$ ), que es mucho más tóxica que la forma ionizada ( $NH_4^+$ ) (Armstrong et al., 1978).

Por lo anterior, es probable que la principal fuente de variación entre recipientes abiertos y cerrados se debe a las diferencias en la condición de los organismos pues no se tiene control sobre dicha variable, a pesar que ambos lotes en su momento provinieron de desoves mezclados. Esta variabilidad también

puede apreciarse si se comparan los resultados de la supervivencia al estrés de amonio (20 mg/L en recipientes cerrados y con valores de pH y amonio real similares) en la remesa de 1999 (supervivencia promedio del 81%; Tabla VII), con la segunda remesa del 2000 (supervivencia del 16%; Tabla X).

En cuanto a las pruebas de estrés de salinidad, existen variaciones en cuanto a los niveles de salinidad y el tiempo de exposición reportadas en la literatura, que dependen principalmente de la edad de la postlarva y de la especie en cuestión (Tabla XIII).

Por lo arriba mencionado, a continuación se divide la discusión en tres partes en función de la edad de la postlarva: temprana (PL1-2), intermedia (PL 5 a PL10) y tardía (>PL15).

Para postlarva temprana Samocha y colaboradores (1998) obtuvieron una  $LC_{50}$  de salinidad para *P. vannamei* de 16.8 ppm, que se acerca a la concentración utilizada en las pruebas de estrés que se aplicaron en este trabajo (18 ppm). Sin embargo, los tiempos de exposición son diferentes entre los dos estudios (2 horas v.s. 30 minutos) y quizás por esto los valores de supervivencia son más bajos en el trabajo de Samocha (60.7%) comparados con la supervivencia promedio obtenida en este trabajo (88.6%). Por otro lado, AQUACOP (et. al., 1991) al utilizar 2 horas de exposición a 20 ppm en esa misma edad, reporta una supervivencia menor al 5%. Lo anterior junto con las diferencias entre los tratamientos del presente trabajo (dependiendo del lote) nos sugiere que estas diferencias dependen de la condición de los organismos. Otros factores como la diferencia entre especies o temperaturas se pueden descartar dado que en los tres estudios

**Tabla XIII. Niveles de salinidad, edad de postlarvas y tiempo de exposición reportados por otros autores en pruebas de estrés de salinidad.**

Edad	Salinidad	Tiempo	Supervivencia	Especie	Autor
PL1-PL2	16.8 ppM	2 horas	50% LC50	<i>P. vannamei</i>	Samocha et al., 1998
PL1-PL2	18 ppM	30 minutos**	60.7 al 88.6%	<i>P. vannamei</i>	Este estudio (Lotes)
PL2	20 ppM	2 horas	<5%	<i>P. vannamei</i>	AQUACOP et al., 1991
PL5	8.3 ppM	2 horas	50% LC50	<i>P. vannamei</i>	Samocha et al., 1998
PL5	14 ppM	30 minutos	0 a 43% ~17.4%	<i>P. monodon</i>	Tackaert et al., 1989
PL5	15 ppM	1 hora**	46 al 94%	<i>P. setiferus</i>	Gallardo et al., 1995 (dietas)
PL5	20 ppM	2 horas	~40%	<i>P. vannamei</i>	AQUACOP et al., 1991
PL5	21 ppM	30 minutos	70 a 90% ~83.5%	<i>P. monodon</i>	Tackaert et al., 1989
PL5	21 ppM	1 hora	45 a 80% ~69.8%	<i>P. monodon</i>	Tackaert et al., 1989
PL10	0 ppM	1 hora	17.8 a 35.8% 24.6%	<i>P. vannamei</i>	Wouters et al., 1997
PL10	10 ppM	1 hora	70%	<i>P. monodon</i>	Rees et al., 1994
PL10	10 ppM	2 horas	23%	<i>P. monodon</i>	Rees et al., 1994
PL10	10 ppM	2 horas	~25%	<i>P. vannamei</i>	AQUACOP et al., 1991
PL10	14 ppM	30 minutos	36 a 97% ~68.8%	<i>P. monodon</i>	Tackaert et al., 1989
PL10	14 ppM	1 hora	24 a 68% ~47.5%	<i>P. monodon</i>	Tackaert et al., 1989
PL15	0 ppM	30 minutos	50 a 96% ~74.0%	<i>P. monodon</i>	Tackaert et al., 1989
PL15	0 ppM	30 minutos	84 a 100% ~95.2%	<i>P. monodon</i>	Tackaert et al., 1990
PL15	0 ppM	30 minutos**	38.7 a 89.2%	<i>P. vannamei</i>	Palacios et al., 1999 (días de ablación)
PL15	2 ppM	1 hora LT50	50%b *(LT50)	<i>P. monodon</i>	Paibulkichakul et al., 1998
PL15	5 ppM	2 horas	~70%	<i>P. vannamei</i>	AQUACOP et al., 1991
PL15	10 ppM	1 hora	100%	<i>P. monodon</i>	Rees et al., 1994
PL17	0 ppM*	30 minutos**	76.7 a 90%	<i>P. japonicus</i>	Tackaert et al., 1991 (dietas)
PL18	0 ppM*	1 hora**	85.8%	<i>P. vannamei</i>	Coutteau et al., 1996
PL20	0 ppM	30 minutos**	42.8 a 63.7%	<i>P. vannamei</i>	Este estudio (Lotes)
PL20	2 ppM	2 horas	>90%	<i>P. vannamei</i>	AQUACOP et al., 1991
PL31	0 ppM*	30 minutos**	43.3 a 86.7%	<i>P. japonicus</i>	Tackaert et al., 1991 (dietas)
PL32	0 ppM	1 hora	32.5%	<i>P. vannamei</i>	Kontara et al 1997
PL41	0 ppM*	1 hora**	90%	<i>P. vannamei</i>	Coutteau et al., 1996

\* En agua desionizada. \*\*Con recuperación en agua de mar. El paréntesis después de la referencia indica que la supervivencia dependió de las condiciones particulares del estudio.

se utiliza la misma especie (*P. vannamei*) y la temperatura es muy similar (de 27 a 30°C). A pesar de las diferencias entre estos autores, la salinidad utilizada no es menor a 15 ppm, que es cercana al 50% del agua de mar, lo cual facilita la aplicación de la prueba a esta edad.

La  $LC_{50}$  de 2 horas para PL5 es de 8.3 ppm (Samocha et al., 1998). Sin embargo, AQUACOP (et al., 1991) reportan para el mismo tiempo de exposición y especie, supervivencias del 40%, pero a salinidad de 20ppm. Por su parte Tackaert y colaboradores (1989) encontraron supervivencias del 69.8% al 83.5% en PL5 de *P. monodon* sometidas a 21 ppm de salinidad por una hora y por 30 minutos respectivamente. Estos mismos autores reportan supervivencias de 0 a 43% si las postlarvas son expuestas a 14 ppm durante 30 minutos. Gallardo y colaboradores (1995) utilizando PL5 de *P. setiferus* expuestas a 15 ppm durante una hora, reportan supervivencias del 46 al 94% dependiendo de la dieta de las larvas. Es posible que tanto la diferencia en las especies estudiadas como la condición de los organismos utilizados sean las principales causas de las diferencias entre los resultados de los trabajos arriba mencionados. Adicionalmente, hay que considerar la dieta utilizada a lo largo del cultivo larvario cuya importancia se aprecia en el trabajo de Gallardo y colaboradores (1995).

Larvas de edades iguales o mayores a PL10 generalmente son expuestas a bajas salinidades (2, 5 o 10 ppm) o bien a agua dulce, y las supervivencias resultantes generalmente son arriba del 50%. En este caso, el tiempo de exposición y la especie no parecen tener mucha influencia en los resultados de la prueba de estrés de salinidad a estas edades, por lo que las diferencias pueden



ser atribuidas principalmente a la condición fisiológica de los organismos, que puede ser resultado de los tratamientos experimentales como: dietas (Coutteau et al., 1996; Kontara et al., 1997; Paibulkachicul et al., 1998; Rees et al., 1994; Tackaert et al., 1989), condición del reproductor (Palacios et al., 1999b) o lotes de larvas (este estudio).

Es evidente que conforme se incrementa la edad de la postlarva, la supervivencia a estrés de salinidad aumenta, esto es debido a que su capacidad osmorreguladora se incrementa con la edad de la postlarva (AQUACOP et al., 1991; Charmantier et al., 1988; Dhert et al., 1994; Rees, et al., 1994; Samocha et al., 1998) y por ende a partir de PL15 se utilizan generalmente niveles de 0 ppm de salinidad (agua dulce) para las pruebas de estrés. A edades tempranas, la capacidad de osmorregulación de las postlarvas es deficiente debido a que las estructuras que realizan dicha función (branquias) no están completamente ramificadas y su área de intercambio no le es suficiente para compensar un choque osmótico (Rees et al., 1994) o todavía no pueden realizar un intercambio iónico eficiente. Esto concuerda con lo mencionado por AQUACOP (et al., 1991), acerca de que la osmoregulación de tipo hiper-hipo-osmótica no se desarrolla hasta que las estructuras branquiales cuenten con un cierto nivel de actividad de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ . Charmantier y colaboradores (1988) señalan que la capacidad de osmorregular se incrementa progresivamente partir de los estadios de PL5-PL6 y su eficiencia se establece gradualmente después de PL10-PL12. Por lo anterior, se puede entonces considerar que la resistencia a bajas salinidades en edades tempranas, depende de su capacidad de tolerancia (osmoconformación), mientras

que a edades más avanzadas dependería de su capacidad osmorreguladora. A su vez la condición de las postlarvas influiría sobre la tolerancia osmoconformadora (PL1 a PL5) o sobre su capacidad osmorreguladora (PL10 en adelante).

La falta de correlación entre la resistencia a baja salinidad en PL2 y PL20 (segunda remesa del 2000) indica que la tolerancia osmoconformadora al parecer es independiente del desarrollo de la capacidad osmorreguladora y por consiguiente la prueba de estrés de salinidad podría tener significados y utilidades distintos dependiendo de la edad en la cual se aplica.

Samocha y colaboradores (1998) sugieren que en cada edad de la postlarva debe usarse una determinada salinidad para la prueba de estrés y en los manuales técnicos se recomiendan ciertos niveles y tiempos para una edad específica (Samocha et al., 1998; Villalon 1991; Clifford 1992). Sin embargo, a partir de los resultados de otros estudios (Wouters com. pers.), resalta la importancia de estandarizar los niveles para cada lote particular.

Los tiempos de exposición difieren entre los diversos trabajos y es común reportar una mortalidad acumulada a lo largo de dos horas con base en el trabajo de Tackaert y colaboradores de 1989, con la cual se calcula un índice de estrés acumulativo (De La Cruz 1992; Dhert et al., 1994; Gallardo et al., 1995; Merchie et al., 1998). Sin embargo, en este trabajo los organismos fueron expuestos únicamente durante 30 minutos a baja salinidad, lo cual fue suficiente para alcanzar mortalidades del 30% en PL2 (ver figura 3B). Por otro lado, en algunos trabajos (Coutteau et al., 1996; Gallardo et al., 1995; Palacios et al., 1999a; Tackaert et al., 1991; este estudio), después de someter a las postlarvas a baja

salinidad se ha optado por ponerlas en “recuperación” en la salinidad original durante un cierto periodo antes de determinar su supervivencia. Esto tiene la finalidad de ser más objetivos al momento de contar los organismos muertos, pues algunos organismos que aún están vivos pueden permanecer inmóviles y considerarse como muertos mientras están expuestos a bajas salinidades. Sin embargo, estos organismos son capaces de moverse una vez restablecida la salinidad original. Por lo cual la “recuperación” evita errores al contar a los organismos y en el cálculo de la supervivencia.

### **Pruebas de estrés como indicador de condición fisiológica.**

Según algunos autores (Tackaert et al., 1989; De La Cruz, 1992; Samocha et al., 1998), las pruebas de estrés deben cumplir con ciertas características: deben ser aplicables en cualquier laboratorio o bien en campo, estandarizarse o ajustarse con rapidez, evaluarse de manera sencilla, de ser posible con conteos y cálculos menores –para que cualquier persona con un mínimo de entrenamiento pueda llevarlas a cabo -, deben hacerse en el menor tiempo posible y los resultados deben ser interpretados con rapidez y claridad. Es deseable que las pruebas de estrés tengan un carácter predictivo y una alta confiabilidad, lo cual repercutiría en un manejo más eficiente de los recursos de los productores de semilla. La prueba de estrés de salinidad cumple con muchos de estos requisitos, aunque todavía exista cierta variabilidad en los criterios de edad y concentración de sales a utilizar. Dadas las variaciones observadas, sería recomendable adecuar esta prueba de acuerdo a la edad de la postlarva, a la especie así como a los tiempos de exposición y de recuperación. Debido a la facilidad de la prueba, tal

adecuación puede lograrse en poco tiempo y puede realizarse para cada experimento, lote o remesa particular.

La prueba de estrés de salinidad ha sido la más utilizada de manera rutinaria para evaluar la condición de postlarvas en laboratorios comerciales y en laboratorios de investigación, donde se ha probado su utilidad como una herramienta para diferenciar, principalmente, la supervivencia de organismos sometidos a diferentes tratamientos al suministrar diferentes dietas a larvas y postlarvas (Rees et al., 1994; Merchie et al., 1998; Paibulkachikul et al., 1998; Gallardo et al., 1995). Asimismo, también se ha utilizado para evaluar dietas de reproductores tanto en peces (Abi-Ayad et al., 1997) como en crustáceos (Wouters et al., 1997) o bien para evaluar la condición del reproductor (Palacios et al., 1999b). Los resultados de esta prueba pueden ser utilizados para adecuar las dietas ya sea de las larvas, postlarvas o reproductores, o bien para aumentar los cuidados al momento de la siembra si los resultados de la prueba son bajos (De la Cruz, 1992). Sin embargo, la validez de esta prueba para detectar diferencias entre los tratamientos arriba mencionados tiene que ser evaluada en términos de su relación con la condición del organismo y de su utilidad como indicador predictivo del desempeño posterior de los organismos.

Samocha y colaboradores (1998) mencionan un reporte de Bauman y Jamandre (1990), donde se dice que postlarvas de *P. monodon* que sobrevivieron a la prueba de estrés de salinidad presentaron mejor crecimiento, aunque dichos autores no presentaron un análisis estadístico al respecto. En este estudio, en la segunda remesa del 2000, se encontró que la supervivencia a estrés de salinidad

en PL2 se correlacionó significativamente con la supervivencia de PL1 a PL20, lo cual resaltaría el valor de la prueba de estrés de salinidad en PL2 como un buen indicador predictivo del desempeño posterior (“calidad”). Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en el Laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR, bajo las mismas condiciones de cultivo larvario no se ha podido obtener este tipo de correlación entre la supervivencia a salinidad en PL20 y el desempeño de los organismos durante la siembra y engorda (Pérez-Rostro, com. Pers.).

Por otro lado, un resultado hasta cierto punto sorpresivo fue la correlación negativa entre la prueba de estrés de salinidad en PL20 y la supervivencia en cultivo de nauplio a PL1 (segunda remesa del 2000). Si consideramos que la prueba de estrés de salinidad refleja la condición fisiológica del organismo, parecería que una mejor supervivencia en cultivo se traduce en la obtención de postlarvas de menor calidad. Sin embargo, lo anterior se puede explicar en términos de densidad de organismos en el cultivo: una menor supervivencia en el cultivo larvario da como resultado una menor densidad en cultivo y por ende un mejor crecimiento. A su vez las postlarvas de mayor tamaño son más resistentes a la prueba de estrés de salinidad tal como se ha observado en estudios previos (Palacios et al., 1999a).

Con respecto a la prueba de estrés de amonio, esta ha sido estandarizada y aplicada como un criterio de calidad larvario en la comparación de dietas de reproductores de *Macrobrachium rosebergii* (Cavalli et al., 1999) y de larvas (Thuy, 1999; Cavalli et al., 2000). En líneas generales, esos trabajos comprobaron la eficacia de alimentar larvas de langostino con nauplios de artemia enriquecidos

con altos niveles de ácidos grasos (n-3 HUFAS) y vitamina C. Sus resultados demostraron la influencia de la calidad de la dieta en las larvas, pues los organismos alimentados con la dieta enriquecida presentaron mejores resultados en crecimiento, metamorfosis y resistencia a estrés de amonio, que aquellos alimentados con nauplios de artemia en ayuno.

Estos autores (Thuy, 1999; Cavalli et al., 1999; Cavalli et al., 2000), argumentan que en *M. rosenbergii*, al ser un organismo que habita ambientes estuarinos con condiciones de mezcla de agua marina y agua dulce, la prueba de estrés de salinidad no fue tan concluyente para detectar diferencias en sus tratamientos como lo fue la prueba de estrés al amonio, por lo que plantean la posibilidad de utilizar dicha prueba con una mayor confianza que la prueba de salinidad en especies con estas características y plantean la posibilidad de aplicar esta prueba de estrés como un criterio de calidad larvaria en otras especies de crustáceos.

En el caso del camarón, la prueba de estrés de amonio puede tener la ventaja de ser aplicada en estadios tempranos del desarrollo. La sensibilidad de las zoeas al amonio se debe en gran medida a que los organismos en el estadio de zoea empiezan a alimentarse y no tienen bien formados y/o funcionales todos sus órganos, es decir es un estado de transición y por lo tanto es un estadio más sensible que otros (nauplio o mysis) para realizar esta prueba (Ostrensky y Wasilesky, 1995). Por lo anterior, en el presente trabajo asumimos que la mortalidad diferencial de distintos lotes de zoea a altas concentraciones de amonio sería indicativa de su condición fisiológica y por ende de su desempeño en cultivo.

En los experimentos preliminares se observó la posible utilidad de la prueba de estrés de amonio, al observar una mayor supervivencia por parte de postlarvas provenientes de reproductores domesticados, cuya mejor condición o “calidad” también se apreció por su supervivencia en cultivo y con la prueba de estrés de baja salinidad en PL2.

Al aplicar la prueba de estrés de amonio en la corrida de 1999 no se observaron correlaciones significativas con el cultivo larvario, mientras que en la segunda remesa del 2000 la supervivencia a estrés de amonio en zoea II se correlacionó significativamente con la supervivencia de los estadios larvarios posteriores. Esto pudo deberse, por un lado al bajo éxito de eclosión de los desoves de 1999 y en consecuencia a la diferencia en el número de desoves utilizados en estas dos corridas

Durante 1999 se obtuvieron 129 desoves de los cuales eclosionaron 32 y solo 19 produjeron postlarvas (Tabla V). Las larvas presentaron muy buena condición, esto se puede apreciar en los resultados de las pruebas de estrés de amonio (80.9%) y de salinidad (88.5%). En contraste, en la segunda remesa del 2000 se alcanzó 16.3% de supervivencia en la prueba de estrés de amonio y un 60.7% en la de estrés de salinidad en PL2 (Tabla X). Sobre el bajo éxito de eclosión en 1999, se puede considerar que hubo una “selección” de los desoves más aptos, ya que eclosionaron y sobrevivieron aquellos organismos provenientes de hembras de mejor condición fisiológica, lo cual se refleja en las pruebas de estrés de amonio y salinidad en sus progenies. Si la condición general de estos fue muy alta y si hubo poca variación entre las familias, es posible que no se

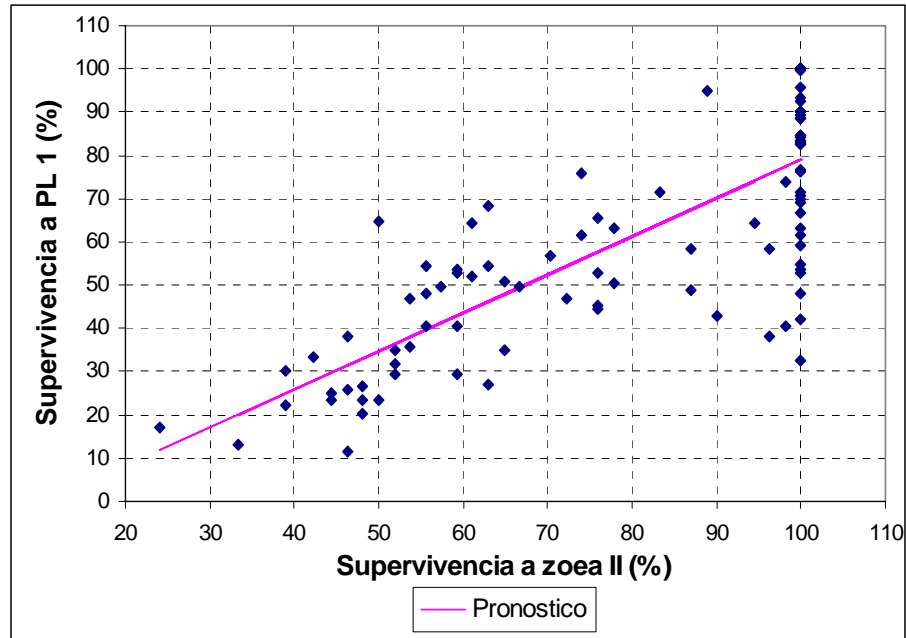
observen diferencias lo suficientemente marcadas que se puedan correlacionar con la supervivencia en cultivo. Por otro lado, el número de desoves en la segunda remesa del 2000 (n=36) fue mayor que en 1999 (n=19), por lo que estadísticamente la correlación es más poderosa en el 2000. Sin embargo, a pesar de las diferencias en las supervivencias a las pruebas de estrés, la supervivencia a PL1 fue similar en las dos remesas (53.7% en 1999 y 57.7% en la segunda del 2000).

La prueba de estrés a altas concentraciones de amonio permitiría, hasta cierto punto, evaluar la condición de las larvas en una etapa temprana (zoea II), dado que se correlaciona con supervivencias posteriores, como en el caso de la segunda remesa del 2000 y por lo tanto podría ser usada en términos predictivos. Sin embargo, dados los resultados de las pruebas de estrés al amonio en este estudio, se requieren de más experimentos para utilizar esta prueba con fines predictivos.

### **Variables de producción y morfométricas.**

La supervivencia larvaria ha sido mencionada como un criterio de calidad por diferentes autores (Bray y Lawrence, 1991 y 1992). En las tres corridas se observaron correlaciones altamente significativas entre la supervivencia de los diferentes estadios larvarios, por lo cual la supervivencia a zoea o mysis puede ser un indicador predictivo de la supervivencia posterior a postlarva. Si se relacionan las supervivencias de los estadios larvarios con la supervivencia a postlarva, pueden obtenerse modelos matemáticos con una alta correlación (figura 5).





$$\text{Supervivencia a PL1} = (\text{Sup. a zoea II} * 0.885) - 9.519 \quad (4)$$

**Figura 5. Regresión lineal entre la supervivencia a zoea II y la supervivencia a PL1, y su modelo matemático. Datos provenientes de los tres grupos de desove (1999, primera y segunda remesa del 2000).**

La aplicación de estos modelos permitiría una evaluación temprana de los lotes de larvas, lo que haría posible discriminar los cultivos de larvas a partir del estadio de zoea y continuar con el cultivo considerando solamente los que tengan un alto porcentaje de supervivencia, ya que tales lotes derivarían en altos porcentajes de supervivencia de postlarvas. Por ejemplo, al aplicar la ecuación matemática obtenida en este estudio se encontró que zoeas con menos del 50% de supervivencia produjeron una supervivencia a postlarva menor al 35%.

Se ha señalado al diámetro de huevos como un posible indicador de calidad en crustáceos (Mashiko, 1987; Bray y Lawrence, 1991 y 1992; Clarke et al., 1990; Clarke, 1993), moluscos (Kraeuter et al., 1982; Laing y Earl, 1998) y peces (Abiyad et al., 1997), en líneas generales se argumenta que huevos grandes tienen más reservas metabólicas (Mashiko, 1987; Clarke, 1993) y al compararlos

filogenéticamente huevos de mayor tamaño tienden a producir larvas más desarrolladas o más grandes (Clarke, 1993). Lo referente a reservas metabólicas se analiza más adelante.

Por otro lado, varios autores mencionan la utilidad de variables morfológicas como indicadores de calidad de las larvas (Cahu, 1999; Bray y Lawrence, 1991; Bray et al., 1990; Cavalli et al., 2000). Bray y colaboradores (1990) señalan que la longitud de las zoea puede ser tomada como indicador de calidad larvaria, aunque reconocen que el número de desoves utilizados en su estudio es muy bajo. En el presente trabajo solo se observaron correlaciones significativas aisladas entre las variables morfométricas y alguna otra variable, por lo que según estos resultados dichas variables no pueden ser tomadas como indicadores predictivos de calidad larvaria.

El número de huevos y nauplios por desove, así como el porcentaje de eclosión y el porcentaje de fertilización, son variables que se usan como criterio de calidad del desove, ya sea al evaluar la condición de los reproductores (Palacios et al., 2000) o bien al evaluar diferentes dietas (Mensaveta et al., 1994;). En este estudio el número de nauplios por desove presentó correlaciones altamente significativas con la supervivencia en los estadios larvarios (zoea, mysis y PL1), esta variable podría ser tomada como indicador de la supervivencia a estadios posteriores. Desafortunadamente no se contó con este dato en las dos remesas del 2000 para corroborar lo anterior.

### **Criterios Bioquímicos.**

En general, los organismos acuáticos dependen de las reservas contenidas en el huevo que son utilizadas como fuente de energía y componentes estructurales para el desarrollo embrionario y larvario temprano. En caso de camarones peneidos las reservas energéticas y estructurales del huevo deben satisfacer el desarrollo embrionario, la eclosión y las sucesivas mudas del estadio de nauplio.

La importancia de la reserva de lípidos radica en que son constituyentes fundamentales de estructuras celulares (fosfolípidos y colesterol) y la principal fuente de energía (triglicéridos y algunos fosfolípidos) durante el desarrollo embrionario y larvario de crustáceos y peces (Holland, 1978; Sargent, 1995). De punto de vista energético, se considera que la reserva principal está bajo forma de triglicéridos, que son utilizados hasta que las demandas energéticas de crecimiento y metabolismo son cubiertas por fuentes exógenas, es decir al iniciarse la alimentación de las larvas (Fraser, 1989), lo cual ocurre en zoea en el caso de peneidos (Dall y Moriarty, 1983; Fraser 1989; Ouellet et al., 1992). En el presente trabajo se observó una disminución tanto en lípidos totales como en triglicéridos entre los estadios de huevo a nauplio, lo anterior coincide con los resultados de otros trabajos que reportan una disminución de lípidos totales (Chu y Ovisianico-Koulikowsky, 1994), triglicéridos (Palacios et al., 1999a) o cantidad de ácidos grasos (Palacios et al., 2001). Es importante señalar que la diferencia entre huevos y nauplios fue de 41.93 mg/g para lípidos totales (66.3%) y sólo de 11.25 mg/g para triglicéridos (41%). Lo anterior sugeriría que además de la utilización de

triglicéridos, habría también una utilización importante de fosfolípidos como fuente de energía. En este sentido, se sabe que en varias especies de crustáceos y peces, algunos fosfolípidos como la fosfatidilcolina también tiene una función energética además de estructural (Sargent, 1995, Coutteau et al., 1997). Desafortunadamente, en el presente trabajo no se midieron los fosfolípidos totales o las clases de estos, aunque esto se está realizando actualmente en varios estadios a lo largo del desarrollo embrionario y naupliar (Palacios, comunicación personal). Alternativamente los resultados del presente trabajo pueden deberse a un artefacto metodológico debido a que las técnicas colorimétricas empleadas no son las más precisas y sensibles para evaluar este tipo de cambios. Por un lado la técnica de lípidos totales por fosfovanillina puede tener señales ligeramente diferentes dependiendo del tipo de lípido, es decir que a una misma concentración de triglicéridos o fosfolípidos, la absorbancia puede ser diferente (resultados preliminares obtenidos en laboratorio de Bioquímica-Fisiológica). Por otro lado, la determinación de triglicéridos, se basa en la medición del glicerol liberado a partir de la lipólisis de los triglicéridos, por lo cual el glicerol libre puede interferir en la medición. En caso del nauplio en el cual hay un proceso de lipólisis endógena, el glicerol libre que no se haya metabolizado se traduciría en una sobrestimación de triglicéridos. Lo anterior se está verificando actualmente en el laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR al utilizar una metodología que permite cuantificar por separado el glicerol libre y el originado a partir de la lipólisis de los triglicéridos.

Las proteínas tienen un papel fundamentalmente estructural, aunque también pueden llegar a ser usadas para fines energéticos principalmente en los estadios finales del nauplio (Chu y Ovisianico-Koulikowsky, 1994). En este trabajo no se observó una disminución significativa de proteínas (16%) al igual que en los trabajos de Palacios y colaboradores (1999a, 1999b), en los cuales la diferencia entre huevo y nauplio (18.8 y 19.3%) no es muy marcada. En *Metapenaeus ensis*, Chu y Ovisianico-Koulikowsky (1994) infirieron cierta utilización de proteínas a partir de la relación oxígeno consumido/nitrógeno excretado (O:N), aunque tampoco obtienen una disminución significativa de proteínas entre huevo y nauplios. Por lo anterior, en el presente trabajo no podemos descartar cierta utilización de proteínas debido a que la relación O:N es un indicador más sensible de la utilización energética de proteínas que los niveles totales de proteínas

Finalmente, los carbohidratos son un componente menor de huevos de crustáceos en general (Chu y Ovisianico-Koulikowsky, 1994, Heras et al. 2000), aunque su papel en la formación del exoesqueleto en crustáceos podría ser crucial. Los eventos de muda que ocurren a lo largo del desarrollo del nauplio no sólo son altamente demandantes de energía, también requieren de compuestos estructurales como la quitina del exoesqueleto y por ello se recurre a la reserva de carbohidratos, o bien a la síntesis de estos a partir de otras fuentes vía gluconeogénesis (Rosas et al., 2001). En este sentido tanto en el trabajo de Chu y Ovisianico-Koulikowsky (1994) como en el presente trabajo, se obtiene una disminución significativa de los carbohidratos entre los estadios de huevo y

nauplio, lo cual será analizado más adelante en términos de su importancia para la calidad larvaria.

A partir del análisis anterior podemos considerar la utilidad de la composición bioquímica de huevo y nauplio como indicador de calidad larvaria. Por su importancia particular como fuente de energía, la concentración de lípidos totales o triglicéridos en huevo y/o nauplio han sido propuestos como un indicador de calidad (Fraser, 1989; Lavens et al., 1991; Ouellet et al., 1992; Lovrich y Ouellet 1994; Mourente et al., 1995; Palacios et al., 1999a). El sustento principal se basa en que los estadios lecitotróficos (nauplios en este caso) no lograrán su desarrollo completo o bien su desarrollo será mas lento, si la reserva lipídica en términos energéticos es insuficiente (Fraser, 1989; Wickins, 1995). En apoyo a lo anterior, en los desoves de 1999 analizados en el presente estudio, se observó que la concentración de lípidos totales en los desoves que produjeron postlarvas fue significativamente mayor que en los otros dos grupos (Tabla VI). Un resultado similar fue obtenido por Palacios y otros (2001), en donde los huevos que presentaron baja supervivencia en el estadio de zoea III tuvieron niveles menores de triglicéridos y liso-fosfatidilcolina, comparados con los desoves con alta supervivencia a zoea III. En este trabajo no se observaron diferencias en los triglicéridos en función del desarrollo exitoso de los diferentes desoves, lo cual posiblemente se puede explicar, como se mencionó anteriormente, por una mayor importancia de los fosfolípidos.

Por otro lado, la concentración de carbohidratos también fue mayor en los desoves que dieron lugar a postlarvas, lo cual indicaría que estos componentes

pueden ser indicativos de un desarrollo óptimo, que implica una serie de mudas y metamorfosis sucesivas en cuales los carbohidratos juegan un papel estructural importante. El posible papel de los carbohidratos en la síntesis de quitina puede menospreciarse, dado que una buena parte de los componentes del exoesqueleto puede ser reabsorbida antes de la muda en camarones juveniles (Chan et al., 1988). Sin embargo, es posible que esta reabsorción no sea tan eficiente en los estadios larvales con mudas muy frecuentes. Por otro lado, la glucosa puede ser obtenida por gluconeogénesis a partir de aminoácidos y glicerol (Stryer, 1990). Aunque se contempla la importancia de esta vía metabólica en peneidos (Rosas et al., 2001), habría que considerar que tienen un alto costo energético (Stryer, 1990) y que se estarían empleando componentes estructurales como los aminoácidos.

Por todo lo expuesto anteriormente, parece justificable que la composición bioquímica del huevo pueda ser determinante para la eclosión, para el desarrollo a lo largo de los distintos estadios de nauplio y para la metamorfosis a zoea. Sin embargo, sería menos evidente relacionar la reserva del huevo a estadios posteriores al de zoea, a partir del cual la larva ya se alimenta. Para explicar esta relación se tienen que considerar los siguientes aspectos. En la sección anterior se discutió la correlación entre supervivencia a zoea y supervivencia posterior a postlarva, lo cual pone de manifiesto de manera clara que una baja metamorfosis a zoea se traducirá en bajo rendimiento a postlarva simplemente porque una buena parte de la población murió antes de la metamorfosis a zoea. Por otro lado, el estadio de mysis es una fase de transición de larvas planctónicas a bentónicas que conlleva una serie de cambios fisiológicos y digestivos, debido al cambio en la

alimentación, por lo cual se ha considerado como una etapa de ayuno parcial (Mourente et al., 1995). Si bien algunos autores concluyen que en el estadio de mysis, los organismos dependen de reservas acumuladas durante la alimentación en zoea, no podemos descartar que algunas reservas maternas todavía puedan jugar cierto papel. Finalmente, es muy factible considerar que las reservas del huevo no sólo determinarían el éxito en la metamorfosis de nauplio a zoea, sino también el desarrollo óptimo de los organismos en este estadio. Por ejemplo, algunos nauplios pueden llegar a presentar la metamorfosis a zoea, pero si su sistema digestivo no se desarrolla en forma óptima para un adecuado proceso de digestión y absorción de nutrientes, debido a las bajas reservas maternas, entonces es posible que tengan menor probabilidad de supervivencia a estadios posteriores.

Un último punto a discutir en esta sección es la comparación de la utilidad de la composición bioquímica del huevo o del nauplio como indicador de calidad larvaria. En la remesa de 1999 estudiada en el presente trabajo, sólo fue posible analizar la composición bioquímica del huevo con los resultados discutidos hasta ahora, que muestran la importancia de las reservas del huevo en el desarrollo posterior. Sin embargo, en el caso de la composición bioquímica del nauplio no se obtuvo ningún resultado evidente de su utilidad como indicador de calidad larvaria, debido a que no hubo ninguna correlación con el desempeño larvario e incluso se obtuvieron algunas correlaciones negativas. En los trabajos de Palacios y colaboradores (1998, 1999b), se asocia una mala calidad reproductiva y un subsecuente deterioro en la calidad larvaria con alteraciones en la composición



bioquímicas tanto a nivel de huevo como de nauplio. Sin embargo, un análisis más minucioso muestra que las diferencias en los niveles de triglicéridos no siempre son observables a nivel de nauplio, aún cuando se obtuvieron a nivel de huevo (Palacios et al., 1998). Tanto en este trabajo como en los trabajos de Palacios y colaboradores (1998, 1999a), las muestras de nauplios fueron obtenidas en estadio de nauplio IV, es decir, prácticamente al final de su etapa lecitotrófica, en el cual las reservas prácticamente se agotaron, aunque aún son indispensables para completar su desarrollo y sobretodo para la metamorfosis a zoea. Una posible fuente de error en la estimación de los niveles de reservas en nauplio, particularmente en triglicéridos, es que estas disminuyen a lo largo del desarrollo (Fraser, 1989), por lo cual si se obtienen muestras de nauplios en diferentes etapas de desarrollo, esto afectará los niveles estimados de triglicéridos. En realidad, en las muestras de nauplios se encuentran nauplios en estadios ligeramente diferentes de desarrollo, si bien la mayoría estaba en nauplio IV, había algunos en estadio III o V. Una forma de corregir la influencia del grado de desarrollo es multiplicando la concentración de triglicéridos por la longitud del nauplio, lo cual ha sido propuesto y justificado por Palacios (et al., 1998). Sin embargo, en este trabajo y aún con esta corrección, tampoco se obtiene relación alguna con el desempeño larvario posterior. La discrepancia entre los resultados del presente trabajo con los de Palacios y colaboradores (1998, 1999a) sólo se podrán explicar a través de estudios que consideren un mayor número de estadios de nauplio y con la medición de componentes más específicos (por ejemplo: clases de lípidos y tipo de ácidos grasos asociados). De cualquier manera, a partir

del presente trabajo se puede decir que la composición bioquímica de huevos sería mejor indicador del desempeño posterior, aunque para fines prácticos es mas fácil obtener muestras a nivel de nauplio.

### **Tamaño del reproductor.**

El tamaño del reproductor constituye el principal criterio de selección de reproductores, en primer lugar porque es un indicador muy sencillo de que los organismos son adultos, y en segundo lugar porque los organismos más grandes generalmente tienen un mejor desempeño reproductivo. El mejor ejemplo de lo anterior es la relación entre fecundidad y peso corporal, que es evidente para camarones peneidos, al igual que para otros organismos acuáticos. Existen varios antecedentes sobre una correlación significativa directa entre el peso del reproductor y el número de huevos (AQUACOP, 1977; Emmerson, 1980; Ottogalli et al., 1988; Hansford y Marsden, 1995; Palacios et al., 1998; Palacios et al., 1999a). Al separar a los reproductores en distintas clases de peso corporal, también se puede observar que los reproductores más grandes presentan mayor fecundidad (Menasveta et al., 1994; Cavalli et al., 1997). En este trabajo se comprueba esta relación tanto por la correlación observada entre peso del reproductor y número de huevos ( $r=0.513$ ;  $p=0.025$ ), como por las diferencias significativas entre hembras chicas (35 a 50 g, 113,745 huevos/desove) y grandes (52 a 86 g, 146,136 huevos/desove). El tamaño de la hembra también tiene relación con la frecuencia de desoves (Menasveta, 1994; Cavalli et al., 1997; Palacios et al., 1999b), lo cual potenciaría el efecto de la fecundidad si se considera el número total de huevos producidos por hembra por unidad de tiempo.

Con lo anterior se puede ver claramente la ventaja de seleccionar cierto tamaño de reproductores en términos de producción total. Sin embargo, la influencia sobre la calidad del desove no es tan clara al analizar la información existente en la bibliografía. En este sentido, varios autores reportan que existe menor porcentaje de fertilización (Mensaveta, 1994; Cavalli et al., 1997) y eclosión (Hansford y Marsden, 1995; Cavalli et al., 1997) en hembras de mayor tamaño, aunque las diferencias no siempre fueron significativas. En el presente trabajo, así como en el trabajo de Palacios et al. (1999b) los reproductores más grandes tienen mayores valores de porcentaje de fertilización y no se observa ninguna relación a nivel eclosión. Por otro lado, al analizar la calidad larvaria subsecuente, Cavalli et al. (1997) reportan una disminución en el tamaño de la zoea provenientes de reproductores más grandes. Sin embargo, concluyen que fueron muy pocos los desoves considerados y que la longitud de zoea no necesariamente es un buen indicador de la calidad larvaria, tal como se observó en el presente trabajo. Por otro lado, Mensaveta et al. (1994) no observaron diferencias en la metamorfosis a zoea. Finalmente, el presente trabajo analiza más a fondo la relación entre el tamaño de los reproductores y la calidad larvaria y no se observa ninguna diferencia entre reproductores chicos y grandes. Es particularmente importante resaltar la supervivencia a postlarva, es decir, el criterio de mayor relevancia a nivel producción, el cual fue muy similar entre ambos grupos de hembras con valores de 44.1% para reproductores chicos y de 50.2% para los grandes.

Sin embargo, es importante señalar que el tamaño del reproductor está asociado a la edad de los mismos y que este factor podría estar afectando la calidad temprana del desove, así como la calidad larvaria subsecuente. En general, se sabe que los reproductores más viejos tienen un menor desempeño reproductivo (Ottogalli et al., 1988; Cavalli et al., 1997; Crocos y Coman, 1997), aunque no hay reportes claros que evalúen lo anterior a nivel de calidad larvaria. La relación edad/tamaño podría explicar algunas de las controversias de la bibliografía anteriormente citadas y entonces tendría que tomarse en cuenta para la selección de reproductores. En el caso de reproductores silvestres, es difícil conocer la edad y por ende los reproductores más grandes no necesariamente serán los mejores, dado que serán muy probablemente los más viejos. En el caso de los reproductores domesticados, sería pertinente la selección de los organismos más grandes de una determinada edad por su superioridad, en términos de producción (cantidad) y porque no hay un compromiso con la calidad larvaria subsecuente.

En este trabajo, los reproductores chicos y grandes fueron separados con base en el peso corporal. Al comparar los dos grupos se encontraron diferencias estadísticas entre el resto de las características morfométricas de las hembras (longitud total y ancho del primer segmento abdominal). Este resultado era de esperarse debido a que estas variables están estrechamente relacionadas con el peso del organismo. Sin embargo, es importante analizar como pueden estar variando estas relaciones para los grupos de reproductores chicos y grandes. El índice de condición del reproductor (IC) que se utilizó en el presente trabajo, fue

propuesto por Emmerson (1980) y se basa en la relación peso/longitud de las hembras dado por la fórmula:  $P_c = a L^b$

Donde:  $P_c$  es peso corporal,  $L$  es longitud,  $a$  es la ordenada al origen y  $b$  la pendiente ( $b \geq 3$ ) de la ecuación lineal obtenida por transformación logarítmica. Al calcular los valores de  $a$  y  $b$  para esta población se puede calcular el índice de condición de la siguiente manera:  $IC = P_c / aL^b$ . Un valor de 1 indica el promedio poblacional, valores mayores a 1 indican que los organismos tienen un peso corporal más alto del esperado para determinada longitud y valores menores corresponden un peso más bajo. Por lo anterior, se ha considerado que los valores superiores a 1 concuerdan con una buena condición del reproductor, mientras que reproductores con valores menores a 1 no cuentan con buena condición. En este estudio, el índice de condición del reproductor fue estadísticamente diferente entre hembras chicas y grandes, esto indica una mejor condición de este último grupo. Lo anterior muestra concordancia con su mayor desempeño reproductivo y su índice de condición mayor a 1, dado que este índice se validó en términos del desempeño reproductivo asociado. (Emmerson, 1980).

Por otro lado, las diferencias entre las dos remesas del 2000 (Tabla XI) también pueden deberse a la condición del reproductor. En la primera remesa, los desoves fueron obtenidos en el mes de enero con hembras recién ablacionadas. En contraste, los desoves de la segunda remesa fueron obtenidos en el mes de abril, a partir de los mismos reproductores que seguían produciendo desoves desde el mes de enero o de reproductores que fueron remplazados entre enero y abril. La primera diferencia radica en que algunos desoves de la segunda remesa

proviene de hembras con más de tres meses de haber sido ablacionadas. Al respecto, Palacios et al. (1999a) señalan que hembras con 75 días en producción originan larvas de menor calidad en términos de supervivencia en cultivo y de resistencia a la prueba de estrés de salinidad. En el presente trabajo se obtuvieron resultados semejantes, debido a que el porcentaje de supervivencia a mysis, la supervivencia relativa a mysis y la supervivencia a estrés de salinidad fueron significativamente mayores en la primera remesa del 2000. El deterioro en la calidad larvaria puede ser consecuencia de los desoves consecutivos que tiene una misma hembra a lo largo del tiempo, la producción de múltiples desoves es una situación en la que la hembra no es capaz de acumular suficientes reservas y transferirlas a los huevos (Hansford y Marsden, 1995), esto se refleja en su supervivencia a zoea. En este trabajo la supervivencia a zoea fue mayor en la primera remesa. Sin embargo, tal diferencia no fue significativa. Por otro lado, hubo mayor dispersión estadística (varianza) en los datos de la segunda remesa, debido a que también hubo mayor variabilidad en la condición de los reproductores en términos de tiempo después de la ablación y del número de desoves producidos previamente. Desafortunadamente, no se pudo contar con el historial individual correspondiente de cada reproductor para evaluar de manera más precisa estas influencias. En trabajos anteriores, los huevos y nauplios provenientes de reproductores con mayor tiempo en piscina también presentan menor contenido de varios componentes bioquímicos, lo cual se ha interpretado como una disminución en la transferencia de reservas hacia la gónada y de ahí al huevo, por efecto de condiciones intensivas y prolongadas de maduración

(Palacios et al., 1998; 1999b). En el presente trabajo, sólo los carbohidratos totales y los carotenoides presentaron este patrón con menores niveles en los nauplios de la segunda remesa del 2000. Por el contrario, los niveles de glucosa y triglicéridos presentaron un patrón, sus niveles fueron mayores en los nauplios de la segunda remesa del 2000. Es posible que otras diferencias entre los reproductores de la primera y segunda remesa puedan explicar estos resultados.

Ya se ha mencionado que la edad del reproductor tiene implicaciones en la calidad de su progenie, que los reproductores más viejos tienen menor desempeño reproductivo (Ottogalli et al., 1988; Cavalli et al., 1997; Crocos y Coman, 1997). En este sentido, los reproductores utilizados en abril eran tres meses más viejos que los de enero, independientemente de la fecha de ablación. Por lo tanto, este factor también pudo haber contribuido parcialmente a la menor calidad larvaria de la segunda remesa.

Por otro lado, los dos grupos fueron obtenidos en épocas del año distintas, una remesa a principios de primavera y la otra a principios del verano. A pesar de mantener controladas algunas variables ambientales como temperatura o la calidad del agua dentro las instalaciones de maduración, pequeños cambios en las variables ambientales pueden provocar variaciones en la producción de huevos o nauplios y en la supervivencia larvaria (Bray y Lawrence, 1992). Por otro lado, de manera natural los factores ambientales son los que rigen las épocas del desove y estos pueden tener influencia sobre el estadio basal de maduración antes de que los organismos sean sometidos a las condiciones controladas de maduración y a la ablación del tallo ocular. Lo anterior puede explicar los picos de producción en

determinadas épocas del año (AQUACOP, 1977; Bray y Lawrence, 1992; Hansford y Marsden, 1995; Browdy et al., 1996). Aunque otros autores no observan una influencia clara de la época del año (Crocós y Coman, 1997). En el presente trabajo, tal influencia no se puede descartar, aunque hacen falta estudios dirigidos de manera directa a esta problemática para establecer esta relación.



## CONCLUSIONES

La prueba de estrés de salinidad resultó ser práctica, rápida y sencilla. A nivel de PL2, lo más recomendable es usar 18 ppm (dilución 1:2 de agua de mar con agua dulce). En este estudio la prueba de estrés de salinidad en PL2 tiene cierto carácter predictivo debido a que se observó una correlación con la supervivencia posterior en cultivo de PL1 a PL20. Sin embargo, el valor de la prueba de estrés de salinidad es cuestionable en edades más avanzadas (PL20), puesto que no se observaron correlaciones con otras variables e inclusive se observó una correlación negativa con la supervivencia durante el cultivo larvario de nauplio a postlarva.

Se estableció una  $LC_{50}$  de amonio a 24 horas para el estadio larvario de zoea II, en 19.4 mg de amonio total/L. La prueba de estrés a altas concentraciones de amonio permite evaluar la condición de las larvas en una etapa temprana (zoea II) y sugiere su uso como indicador predictivo de la calidad larvaria, debido a que se obtuvo una correlación con la supervivencia en cultivo en los estadios de zoea, mysis y postlarva.

Las variables morfométricas no se correlacionaron, salvo excepciones, con la supervivencia de las larvas en cultivo, además son un criterio subjetivo, por lo tanto no son consideradas buenas candidatas a ser indicadores predictivos de calidad.

La supervivencia entre los estadios larvarios presentó correlaciones altamente significativas entre sí, permitió la generación de modelos matemáticos y

por lo tanto puede servir como una herramienta para predecir la supervivencia a postlarva.

Existe una considerable utilización de lípidos a lo largo del desarrollo embrionario y larvario temprano (estadio de nauplio). Los carbohidratos representan un componente menor de huevos y nauplios, aunque probablemente son utilizados para la síntesis del exoesqueleto. Las proteínas representan el componente mayoritario tanto de huevos como de nauplios y prácticamente no son utilizados en estos estadios.

No se encontró evidencia suficiente como para señalar a alguno de los compuestos bioquímicos contenidos en los nauplios como indicador de calidad larvaria, al no encontrarse correlaciones significativas con el desempeño larvario. La composición bioquímica de huevos aparentemente resultó ser mejor indicador de calidad, al encontrarse un mayor contenidos de lípidos y carbohidratos en los huevos que produjeron postlarvas en contraste con los huevos que no eclosionaron o que no dieron lugar a postlarvas.

El tamaño del reproductor se relacionó con el número de huevos por desove, pero no se encontró ninguna relación de la calidad de los desoves con la calidad larvaria subsecuente. En términos cuantitativos de producción se comprueba la ventaja de usar los reproductores de mayor talla.

## LITERATURA CITADA

- Abi-ayad, S.-M.E.-A., C.Melard, and P.Kestemont. 1997. Effects of n-3 fatty acids in Eurasian Perch broodstock diet on egg fatty acid composition and larvae stress resistance. *Aquacult. Int.* 5: 1-168.
- Anger, K. 1988. Growth and elemental composition (C, N, H) in *Inachus dorsettensis* (Decapoda. Majidae) larvae reared in the laboratory. *Mar. Biol.* 99: 255-260.
- AQUACOP, 1977. Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon*, Fabricius in Polynesia. *Proc.World Maricul.Soc.* 8: 927-945.
- AQUACOP, G.Le Moullac, and D. Damez. 1991. Modélisation de la résistance au chocs de salinité des postlarves de *Penaeus vannamei*. *Aquat. Living Resour.* 4: 169-173.
- Armstrong, D.A., D. Chippendale, A.W. Knight and J.E. Colt. 1978. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.* 154:15-31.
- Barnes, H. and J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues. detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12: 103-118.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-253.
- Bray, W.A. and A.L. Lawrence. 1991. New concepts in seedstock production. learning to determine quality. International symposium on commercial production of shrimp larvae. Mazatlan, México. 1-16.
- Bray, W.A. and A.L. Lawrence. 1992. Reproduction of *Penaeus* Species in captivity. En. Fast A.W. and Lester L.J. (Eds.) *Marine Shrimp Culture. Principles and Practices.* Elsevier. Amsterdam. pp. 93-170.
- Bray, W.A.; A.L. Lawrence and J.L. Lester. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipids. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 41-52.
- Browdy, C.L., K. McGovern-Hopkins, A.D. Stokes, J.S.Hopkins and P.A. Sandifer. 1996. Factors affecting the reproductive performance of the Atlantic White Shrimp, *Penaeus setiferus*, in conventional an unisex tank system. *J. Appl. Aquacult.* 6: 11-25.

- Briggs M.R. 1992. A stress test for determining vigor of post-larval *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquacult. Fish. Manag.* 23: 633-637.
- Cahu, C.L., G. Cuzon and P. Quazuguel. 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A: 417-424.
- Cahu, C.L., A. Severe and P. Quazuguel. 1988. The variation of lipid content in *Penaeus indicus* during larval development. *Mariculture Comittee*, F22: 11 pp.
- Cahu, C.L. 1999. Diets for shrimp broodstock and their effect on larval quality. *Proceedings of 4th International Symposium On Aquatic Nutrition*. La Paz, B.C.S. México pp. 1-10.
- Castille, F.L., T.M. Samocha, A.L. Lawrence, H. He, P. Frelier and F. Jaenike. 1993. Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Aquaculture*. 113: 65-81.
- Cavalli, R.O., P. Lavens, and P. Sorgeloos. 1999. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture*. 179: 387-402.
- Cavalli, R.O., M.P. Scardua and W. Wasielesky Jr. 1997. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 260-267.
- Cavalli, R.O., E. Vanden Berghe, P. Lavens, T.T.N. Thuy, M. Wille and P. Sorgeloos. 2000. Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 125C: 333-343.
- Charmantier, G., M. Charmantier-Daures, N. Bouaricha, P. Thuet, D.E. Aiken and J.P. Trilles. 1988. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two Decapod Crustaceans. *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *Biol.Bull.* 175: 102-110.
- Chan, S.M., S.M. Rankin, and L.L. Keeley. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*. Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biol.Bull.* 175: 185-192.
- Chen J.C., P.C. Liu and F.H. Nan. 1991. Acute toxicity of ammonia to larvae of *Metapenaeus ensis*. *Asian Fish. Sci.* 4: 41-51.
- Chen J.C. y Y.Z. Kou. 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture* 104: 249-260.

- Chen, J.C. y F.H. Nan. 1993. Effects of ammonia on oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* after prolonged exposure to ammonia. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 51:122-129.
- Chin, T.S. and J.C. Chen. 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture. 66: 247-253.
- Chu K.H. and N.N. Ovsianico-Koulikowsky. 1994. Ontogenetic changes in metabolic activity and biochemical composition in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. J. Exp.Mar.Biol.Ecol. 183: 11-26.
- Clarke, A. 1993. Egg size and egg composition in polar shrimps (caridea; decapoda). J. Exp.Mar.Biol. Ecol., 168: 191-203.
- Clarke, A., J.H Brown and L.J. Holmes. 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. London. pp. 158-193.
- Clifford, H.C.1992. Marine Shrimp pond management. a review. Technical Bulletin. American Soybean Association. pp. 2-29.
- Coutteau, P., M.R. Camara and P. Sorgeloos. 1996. The effect of different levels and sources of dietary phosphatidylcholine on the growth, survival, stress resistance and fatty acid composition of postlarval *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 147. 261-273.
- Coutteau, P., I. Geurden, M.R. Camara, P. Bergot and P. Sorgeloos. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larvae. Aquaculture. 155: 149-164.
- Crococ, P.J. and G.J. Coman. 1997. Seasonal and age variability in the reproductive performance of *Penaeus semisulcatus* broodstock. optimizing broodstock selection. Aquaculture. 155: 55-67.
- Dall, W. and D.J. Moriarty. 1985. Functional aspects of nutrition and digestion. En: Bliss, D. y L.H. Mantel (Eds). The Biology of Crustacea. Vol. 5. Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press. London. pp. 215-261
- De la Cruz, A.S., 1992. Prueba de resistencia a baja salinidad de las postlarvas de *Penaeus schmitti*. Rev. Inv. Mar. 13: 152-158.

- Dhert, P., P. Lavens, M. Duray, and P. Sorgeloos. 1990. Improved larval survival at metamorphosis of asian seabass (*Lates calcarifer*) using w3-HUFA-enriched live food. *Aquaculture*. 90: 63-74.
- Dhert, P., P. Lavens., and P. Sorgeloos. 1994. Stress evaluation. a tool for quality control of hatchery-producer shrimp and fish fry. *Aquacult. Sci.* 17: 6-10.
- Emmerson, W.D., 1980. Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 121-131.
- Fegan, D.F. 1992. Recent developments and issues in the penaeid shrimp hatchery industry. En: Wyban J. (Ed.). *Proceeding of the special session on shrimp farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge. pp. 55-70
- Fraser, A.J., 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1868-1873.
- Gallardo, P.P., E: Alfonso, G. Gaxiola, L.A. Soto and C. Rosas. 1995. Feeding schedule for *Penaeus setiferus* larvae based on diatoms (*Chaetoceros ceratosporum*), flagellates (*Tetraselmis chuii*) and *Artemia nauplii*. *Aquaculture*. 131: 239-252.
- Hansford, S.W. and G.E Marsden. 1995. Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk ablated spawners of the prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay, Australia. *J. World Aquacult. Soc.* 26: 396-405.
- Heras, H., M.R.Gonzalez-Baró and R.J. Pollero. 2000. Lipid and fatty acid composition and energy partitioning in the shrimp *Macrobrachium borelli*. *Lipids*. 35: 645-651.
- Holland, D.L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. En: Malins, D.C. and J.R Sargent. (Eds). *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press. London pp. 85-123
- Ibarra A.M., E. Palacios, C.I. Perez-Rostro, J.L. Ramirez, I.S. Racotta I.S., and R. Hernandez-Herrera. 1998. Family variance for resistance to low oxygen and low salinity of pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, postlarvae. *Aquaculture* 98. World Aquaculture Society . Las Vegas. p 260.
- Jayasankar, P. and M.S. Muthu. 1983. Toxicity of ammonia to the larvae of *Penaeus indicus*. H. Milne Edwards. *Indian J. Fish.* 30:1-12.
- Kanazawa, A., 1997. Effects of docosahexanoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish *Aquaculture*. 155: 129-134.

- Kontara, E., P. Coutteau, and P. Sorgeloos. 1997. Effect of dietary phospholipids for an incorporation of n-3 highly unsaturated fatty acids in postlarval *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*. 158: 305-320.
- Kraeuter, J.N., M. Castagna and R. Van Dessel. 1982. Egg size and larval survival of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 56: 3-8.
- Laing I. and N.H. Earl. 1998. The lipid content, spatfall and subsequent growth of early and late settling hatchery-reared Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, larvae. *Aquacult. Res.* 29: 19-25.
- Lavens P. and P. Sorgeloos. 1991. Variation in egg and larval quality in various fish and crustacean species. Larvi'91 Fish & crustacean larviculture sympos. En: Lavens, P., P. Sorgeloos, E. Jaspers y F.Ollevier (Eds.) 1991. European Aquaculture Society. Special Publication No. 15: 221-222.
- Lavens P., S. Piyatititivorakul, P. Menasveta, and P. Sorgeloos 1991. HUFA levels in eggs of wild and culture broodstock of *Macrobrachium rosenbergii*. Larvi'91 Fish & crustacean larviculture sympos. En: Lavens, P., P.Sorgeloos, E.Jaspers y F.Ollevier (Eds.) 1991. European Aquaculture Society. Special Publication No. 15. pp. 260-263.
- Lehninger, A.L ,1988. Bioquímica. Omega. 4a. edición. Barcelona. 1324 pp.
- Lin, H.P., P. Thuet, J.P. Trilles. R. Mounet-Guillaume and G. Charmantier. 1993. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Mar.Biol.* 117: 591-598.
- Lovrich, G.A. and P. Ouellet. 1994. Patterns of growth and triacylglycerol content in snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura. Majidae) zoeal stages reared in the laboratory. *Mar.Biol.* 120: 585-591.
- Mashiko K., 1987. Relationships between egg size and incubation time among the population of two freshwater prawns. *Ecol. Res.* 2: 97-99.
- Menasveta, P., S. Sangpradub. S. Piyatititivorakul and A.W. Fast. 1994. Effect of broodstock size and source on ovarian maturation and spawning of *Penaeus monodon* Fabricius from the Gulf of Thailand. *J. World Aquacul. Soc.*, 25:41-49.
- Merchie, G., E. Kontara, P. Lavens, R. Robles., K. Kurmaly and P. Sorgeloos. 1998. Effect of vitamin C and astaxantin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquacult. Res.* 29: 579-585.

- Mourente, G., A. Medina, S. Gonzalez and A. Rodriguez. 1995. Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture*. 130: 187-199.
- Ostrensky A. and W, Wasielesky. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Sao Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*. 132: 339-347
- Ottogalli, L., C. Galine and D. Goxe. 1988. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia. *J.Aqua.Trop.* 3: 111-125.
- Ouellet, P., C.T. Taggart and K.T. Frank. 1992. Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 40: 368-378.
- Paibulkichakul, C., S. Piyatiratitivorakul, P. Kittakoop, V. Viyakarn, A.W. Fast and P. Menasveta. 1998. Optimal dietary levels of lecithin and cholesterol for black tiger prawn *Penaeus monodon* larvae and postlarvae. *Aquaculture*. 167: 273-281.
- Palacios, E., A.M. Ibarra, J.L. Ramirez, J. Portillo and I.S. Racotta. 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in white pacific shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquacult. Res.* 29: 183-189.
- Palacios, E., C.I. Pérez-Rostro, J.L. Ramírez, A.M. Ibarra and I.S. Racotta. 1999a. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. *Aquaculture*, 171: 209-221.
- Palacios, E., I.S. Racotta and APSA, 1999b. Spawning frequency analysis of wild and pond-reared of White Pacific shrimp *Penaeus vannamei* broodstock under large-scale hatchery conditions. *J. World Aquac. Soc.* 30: 180-191.
- Palacios, E., A.M. Ibarra and I.S. Racotta, 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 185: 353-371.
- Palacios, E., I.S. Racotta, Y. Marty and J-F. Samain. 2001. Lipid composition during embryogenesis and early larval development in shrimp (*Penaeus vannamei*). *Larvii 2001* (en prensa)
- Palacios, E., Racotta, I.S, Heras H., Marty Y., Moal J. and Samain J.F. 2001. Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquac.Int.* (Sometido).



- Rees, J.F., K. Cure, S. Piyatiratitivorakul, P. Sorgeloos and P. Menasveta. 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae. an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*. 122: 193-207.
- Regnault, M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh water crustacea. *Biol. Rev.* 62: 1-24.
- Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, L. Arena, P. Lemaire, C. Soyez and Van Wormhoudt, 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249: 181-198.
- Rosenberry, R. 1998. World Shrimp Farming. Annual report shrimp news international. San Diego, CA. 218 pp.
- Samocha, T.M., Guajardo H, Lawrence A.D., Calstille F, Speed Miachael, and C. Melard. 1998. A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*, 165: 233-242.
- Sargent, J.R., 1995. Origins and function of egg lipids. nutritional implications. En: Bromage, N. R. and Robert, R. J.(Eds.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science. Cambridge, G.B. pp. 353-372
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman and Company. New York. 859 pp.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by phenol-hypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.* 14:799-801.
- Stephan, C.E. 1977. Methods for Calculating an LC50. En: Mayer, F.L. and J.L. Hamelink *American Society for Testing and Materials (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, (Eds.). ASTM STP 534, Philadelphia. p. 65-84
- Stryer, L. 1990. *Bioquímica*. Reverte. 5a Edición. Venezuela. p. 976.
- Tackaert W, P. Abelin, P. Dhert, P. Leger, D. Grymnope, R. Bombeo and P. Sorgeloos. 1989. Stress resistance in postlarval penaeid shrimp reared under different feeding procedures. *Aquaculture* 89: 1-14.
- Tackaert, W., M.R. Camara and P. Sorgeloos. 1991. The effect of dietary phosphatidylcholine in postlarval penaeid shrimp. II Preliminary culture results. En: Lavens, P, P. Sorgeloos, E. Jaspers and E. Ollevier (Eds). *Larvi '91 Fish & Crustacean Larviculture Symposium*. Ghent, Belgium, European Aquaculture Society. Special Publication No. 15 p 77-79

- 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. 84 pp.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11: 256-265.
- Villalón, J.R., 1991. Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp. Texas A&M University, Sea Grant Program. Galveston 103 pp
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexanoic acid in marine larval fish. *J. World Aquac. Soc.* 24: 152-161.
- Wickins, J.F., T.W. Beard and A.R. Child. 1995. Maximizing lobster, *Homarus gammarus* (L.), egg and larval viability. *Aquacult. Res.* 26: 379-392.
- Wouters, R., A. Vanhauwaert, E. Naessens, A. Pedrazzoli and P. Lavens. 1997. The effect of dietary n-3 HUFA and 22.6n-3/20.5n-3 ratio on white shrimp larvae and postlarvae. *Aquacult. Int.*, 5: 113-126.
- Wouters, R., L. Gomez, P. Lavens and J. Calderon. 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock. its effect on reproductive performance and larval quality. *J.Shellfish Res.*, 18: 651-656.

**ANEXO.**  
**Tablas de correlación.**

**Tabla I-A. Coeficientes de correlación de las variables morfométricas con las variables bioquímicas, en la remesa de 1999.**

	Diam. De huevo	Long. Nauplio	Long. Zoea	
<b>En Huevo</b>	Triglicéridos	-0.1563	-0.6384*	0.1439
	Glucosa	-0.2104	-0.0704	0.1543
	Lípidos tot.	-0.3488	0.2052	0.3381
	Carbohidratos tot.	-0.2735	0.3114	0.2821
	Proteínas	0.2405	-0.0187	-0.2240
<b>En nauplio</b>	Triglicéridos	0.2995	-0.4710	0.6976*
	Glucosa	-0.0080	-0.3974	0.3947
	Lípidos tot.	-0.0539	-0.0145	0.3050
	Carbohidratos tot.	-0.3872	0.0418	0.1348
	Proteínas	0.5561*	-0.0226	0.3725
	TG x Long. Nauplio	0.2161	-0.1923	0.7430*

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla II-A. Coeficientes de correlación entre distintas variables de producción a nivel de cultivo larvario y a nivel de desove, en la remesa de 1999.**

	Sup. zoea	Sup. Mysis	Sup. PL 1	Sup.Rel. a zoea	Sup.Rel. a Mysis
Supervivencia a Mysis	0.844*				
Supervivencia a PL 1	0.785*	0.834*			
Sup. Relativa a Mysis	0.117	0.426	0.446	0.119	
Sup. Relativa a PL	-0.026	-0.208	0.222	-0.026	0.265

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla III-A. Coeficientes de correlación entre producción a nivel de desove y cultivo larvario en la remesa de 1999.**

	Sup. Zoea	Sup Mysis	Sup. PL 1	Sup.Rel. a Mysis	Sup. Rel. a PL
No. De Huevos	0.243	0.055	0.103	-0.247	-0.010
No. De Nauplios	0.612*	0.667*	0.642*	0.349	0.031
%Eclósión	0.387	0.551*	0.501*	0.444	0.055
% Fertilización	0.278	0.217	0.101	-0.003	-0.079

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla IV-A Coeficientes de correlación entre Supervivencia a pruebas de estrés y producción en cultivo larvario, en la remesa de 1999.**

	S zoea	S Mysis	S PL1	Sup.Rel. a zoea	Sup.Rel. a Mysis	Sup.Rel. a PL1
Supervivencia a salinidad	-0.355	-0.335	-0.153	-0.354	0.069	0.209
Supervivencia al amonio	-0.099	0.026	0.017	-0.102	0.271	0.243

**Tabla V-A. Coeficientes de correlación entre supervivencias a pruebas de estrés y composición bioquímica de huevos y nauplios, en la remesa de 1999.**

		Supervivencia a baja salinidad	Supervivencia al amonio
En Huevo	Triglicéridos	-0.185	0.014
	Glucosa	-0.086	0.231
	Lípidos tot.	0.092	0.481 *
	Carbohidratos tot.	0.161	0.496 *
	Proteínas	-0.553 *	-0.408
En nauplio	Triglicéridos	-0.353	-0.228
	Glucosa	-0.028	-0.210
	Lípidos tot.	0.018	0.059
	Carbohidratos tot.	0.079	0.210
	Proteínas	-0.471	-0.221

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla VI-A. Supervivencia a pruebas de estrés y producción a nivel de desove, en la remesa de 1999.**

	Supervivencia a baja salinidad	Supervivencia al amonio
Número de Huevo	-0.003	-0.293
Número de Nauplio	-0.445	-0.139
% de Eclosión	-0.549 *	0.004
% de Fertilización.	-0.451	-0.366

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla VII-A. Coeficientes de correlación entre las distintas variables morfométricas analizadas, en la primera remesa del 2000.**

Estadio	Longitud de Nauplio	Longitud de Zoea
Longitud de Zoea	0.335 *	
Longitud de Mysis	0.385 *	0.764 *

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla VIII-A. Coeficientes de correlación entre distintas variables de producción a nivel de cultivo larvario, en la primera remesa del 2000.**

	Sup. Zoea	Sup. Mysis	Sup. PL 1	Sup.Rel. a Mysis
Supervivencia a Mysis	0.701 *			
Supervivencia a PL 1	0.727 *	0.810 *		
Sup.Relativa a Mysis	-0.057	0.348 *	0.366 *	
Sup.Relativa a PL	0.274	-0.131	0.394 *	-0.031

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla IX-A. Coeficientes de correlación entre distintas variables de producción a nivel de cultivo larvario , en la segunda remesa del 2000.**

	Sup. Zoea	Sup. Mysis	Sup. PL 1	Sup. de PL1 a PL20	Sup.Rel. a Mysis
Supervivencia a Mysis	0.794*				
Supervivencia a PL 1	0.733*	0.960*			
Supervivencia de PL1 a PL20	-0.122	-0.046	-0.062		
Sup.Relativa a Mysis	0.302	0.658*	0.692*	-0.127	
Sup.Relativa a PL	-0.009	0.090	0.328	-0.063	0.318
TG x Long. Nauplio	-0.349*	-0.286	-0.294	-0.395*	-0.077

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla X-A. Coeficientes de correlación entre distintas variables de producción a nivel de cultivo larvario y la composición bioquímica de los nauplios, en la segunda remesa del 2000.**

	Sup. zoea	Sup. Mysis	Sup. PL1	Sup. de PL1 a PL20	Sup.Rel. a Mysis	Sup.Rel. a PL1
Triglicéridos	-0.295	-0.253	-0.265	-0.335*	-0.036	-0.036
Glucosa	-0.088	-0.090	-0.126	-0.266	-0.066	-0.066
Lípidos tot.	-0.336*	-0.373*	-0.330*	-0.425*	0.132	0.132
Carbohidratos tot.	-0.295	-0.226	-0.175	-0.120	0.227	0.227
Proteínas	-0.306	-0.466*	-0.385*	-0.170	0.154	0.154
Carotenoides	-0.017	-0.032	-0.046	0.037	-0.062	-0.062

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla XI-A. Coeficientes de correlación entre las variables de producción y la supervivencia a las pruebas de estrés, en la segunda remesa del 2000.**

	Sup. zoea	Sup. Mysis	Sup. PL1	Sup. de PL1 a PL20	Sup.Rel. a Mysis	Sup.Rel. a PL1
Salinidad PL2	-0.229	-0.320	-0.256	0.451*	-0.296	0.297
Salinidad PL20	-0.436*	-0.641*	-0.593*	0.248	-0.504*	-0.045
Amonio zoea II	0.865*	0.682*	0.594*	-0.168	0.339	-0.163

Los asteriscos denotan una correlación estadísticamente significativa.