

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“ UTILIDAD Y SUSTENTOS FISIOLÓGICOS DE LA PRUEBA DE ESTRÉS
A BAJA SALINIDAD COMO CRITERIO DE CALIDAD POSTLARVARIA
DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* “**

**TESIS DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A

ALMA LILIA ALVAREZ GUERRERO

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ILIE SAVA RACOTTA DIMITROV

DRA. ELENA PALACIOS MECHETNOV

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO. DICIEMBRE 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi papito, por enseñarme que siempre hay que luchar por lo que uno desea, por que cada día aprendo a ser como tu, por tu apoyo, por todo, por que nunca dejas de luchar, siempre adelante, Te quiero.

A mi mamita, por confiar en mi, por tu apoyo, por pensar primero en nosotros antes de ti, por hacerme sentir y entender las cosas como si llevaras puesto mi corazón. Te quiero.

A mi hermano Benjamín, por ser el mejor hermano de todo el universo, por tu confianza, por tus travesuras y juegos. Por enseñarme a creer en lo que uno hace. Por ser grande. Te quiero.

A Juan por todo el amor y cariño incondicional, por se parte de mi vida y de este gran sueño, nunca dejes que el niño que llevas dentro se vaya. Te quiero.

A Dios, por darme la oportunidad de descubrir día a día quien soy, gracias por estar conmigo, por escucharme en los momentos mas tristes, por dejarme saber lo que significa tener una familia como la mía. Lo mejor de la vida esta en casa.

Aquí comienza otra historia y los quiero junto a mi, como han estado hoy, mañana y siempre.

Gracias por todo el cariño y amor. Son lo mejor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la ayuda brindada al proyecto CONACYT J28160B por medio del cual se me otorgo un beca de tesis y a los proyectos IFS A/3209-1, CONACYT I35666B, SIMAC 00BCS7501.

Al Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov y a la Dra. Elena Palacios Mechetnov por la gran oportunidad que me dieron al trabajar en su equipo y por la confianza que depositaron en mi para realizar este trabajo que es mi sueño hecho realidad.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz Baja California Sur por las facilidades para la realización de este trabajo.

A Carlos y Fabiola, porque sin su ayuda no se que hubiera hecho, gracias por creer en mi y por apoyarme cuando mas necesitaba otra oportunidad para realizar mi tesis.

Al equipo del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, formado por Olivia, Angélica, Benjamín, Dulce y Miguel, por todo lo que aprendí de cada uno de ellos en todos los sentidos, por brindarme su amistad, por su forma de trabajar en equipo, por todo, mil gracias amigos.

Al laboratorio de mejoramiento genético de semillas marinas, formado por José Luis, Gabriel, Juan, Basilio, Hilario, Marcos, Enrique, Susana y Chalio por todo lo que aprendí en lo que se refiere a cultivo de moluscos y camarón y por su amistad.

Al laboratorio de Bioquímica fisiológica, Diana y Roberto por toda la ayuda brindada para la realización de este trabajo

Al laboratorio de Histoquímica formado por Carmen y Tere por todo lo que me enseñaron en técnicas de histología y por su amistad.

A mi escuela, amigos y a mis maestros de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, por todo lo que aportaron a mi vida personal y académica durante los años que estuve dentro de esta institución; por todo lo que vivimos juntos durante las practicas.

A mis amigos de Xochitla, porque me enseñaron siempre ha tener una gran sonrisa, aunque el mundo se derrumbe, porque me enseñaron que no hay que perder la capacidad de asombro en las pequeñas cosas de la vida, por su amistad y compañerismo.

A todos, por ser parte de mi vida, por su apoyo, amor y amistad.

INDICE

	PAG
Dedicatoria.....	2
Agradecimientos	3
Resumen	9
Introducción	11
Antecedentes	14
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos	
• Generales	23
• Específicos	23
Metodología	
• Desove	24
• Cultivo larvario	25
• Resistencia a la prueba de estrés a baja salinidad	27
• Estimación de la sobrevivencia	
Sobrevivencia durante el cultivo postlarvario	27
Sobrevivencia a la siembra en PL15	28
Sobrevivencia durante la precría o engorda	28
• Variables morfométricas	
Morfometría de PL15	29
Morfometría de organismos juveniles	29
Calculo del área branquial en PL15	29

- Análisis bioquímicos
 - Actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa de PL1530
- Análisis de datos32
- Resultados34
- Discusión42
- Conclusiones55
- Anexo 1.....56
- Anexo 262
- Referencias 67

INDICE DE TABLAS

	PAG
Tabla I. Comparación de distintas variables (media \pm D.S) entre organismos que sobrevivieron a la prueba de etres a baja salinidad, aplicada en PL15 a 40 distintos lotes de <i>Litopenaeus vannamei</i>	36
Tabla II. Comparación de distintas variables (media \pm D.S) entre 40 lotes que presentaron una alta o baja sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad, aplicada en PL15 de <i>Litopenaeus vannamei</i>	38
Tabla III. Correlaciones entre distintas variables (morfométricas y sobrevivencias) determinadas en PL15 y en juveniles de dos meses de <i>Litopenaeus vannamei</i>	41
Tabla IV. Prueba de estrés a baja salinidad, edad de las postlarvas y porcentaje de sobrevivencia en diferentes especies del genero <i>Penaeus</i> reportado por otros autores.	44
Tabla IV. Continuación de la tabla IV.	45

INDICE DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Diagrama de flujo del cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> y actividades realizadas para la prueba de estrés a baja salinidad en PL15.	26
Figura 2. Actividad de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (µm P/hora , eje izquierdo) y % de humedad (eje derecho) en branquias de PL15 sometidas a una salinidad experimental (0 ‰) o una salinidad control. (35 ‰)	35
Figura 3. Fotomicrografía de contraste de fases de branquias anteriores de PL15 de <i>Litopenaeus vannamei</i> . Aumento 40 X.	63
Figura 4. Fotomicrografía de contraste de fases de una branquia anterior de PL15 de <i>Litopenaeus vannamei</i> . Aumento 40 X.	64
Figura 5. Fotomicrografía de contraste de fases de una branquia posterior de PL15 de <i>Litopenaeus vannamei</i> . Aumento 40 X.	65
Figura 6. Fotomicrografía de contraste de fases de una branquia posterior de PL15 de <i>Litopenaeus vannamei</i> . Aumento 40 X.	67

RESUMEN

La selección de postlarva de camarón inadecuada o de baja calidad puede repercutir en un alto índice de mortalidad varios días después de la siembra en estanques de engorda, lo que se traduce en un bajo rendimiento. En un intento por evaluar la calidad de las postlarvas antes de la siembra, los productores utilizan una prueba de estrés que consiste en exponer a las postlarvas a una abrupta baja de salinidad; se considera que aquellos lotes que presentan una alta sobrevivencia están listos para sembrarse en los estanques de engorda. A pesar del amplio uso de dicha prueba, no existen experimentos controlados que asocien la sobrevivencia durante la prueba de estrés de salinidad con la sobrevivencia durante la siembra y se desconocen los mecanismos fisiológicos implicados en la tolerancia de los organismos a esta prueba. Por lo anterior, se evaluó la relación entre la sobrevivencia de postlarvas ante una prueba de estrés a baja salinidad en postlarvas de 15 días (PL15) de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con la sobrevivencia durante la siembra y cultivo a juveniles, así como los mecanismos de osmorregulación en distintos lotes de postlarvas provenientes de desoves individuales ($n = 40$ desoves o familias). Estos desoves mantuvieron su individualidad durante el cultivo desde nauplio hasta juveniles de 1 g., tiempo a lo largo del cual se hicieron estimaciones del porcentaje de sobrevivencia en cada estadio larvario. En PL15, los organismos fueron transferidos de una salinidad control (35 ‰) a una salinidad de 3‰ durante 45 minutos, después de lo cual se permitieron 30 minutos de recuperación a salinidad control. Se evaluó la sobrevivencia en tres replicas por lote y se tomaron muestras para morfometría de PL15 ($n = 20$ vivas y $n = 20$ muertas), para el análisis del área branquial anterior y posterior de PL15 ($n = 6$ vivas y $n = 3$ muertas) y para la actividad total de la Na^+/K^+ -ATPasa en branquias anteriores y posteriores. En estos mismo lotes, se evaluó la sobrevivencia a la siembra que fue simulada

por la transferencia de organismos a otras unidades en las cuales permanecieron en ayuno durante 10 días. Finalmente, se evaluó la sobrevivencia y el crecimiento en raceways durante dos meses. Se utilizó un análisis de correlación para evaluar si existía una relación entre sobrevivencia a la prueba de estrés con alguna variable morfométrica o fisiológica, y un análisis de varianza unifactorial entre lotes con alta y baja sobrevivencia a la prueba de estrés. Los organismos que sobrevivieron a la prueba de estrés de salinidad fueron significativamente mas grandes y presentaron una mayor área branquial anterior y posterior ($P < 0.01$). Sin embargo, cuando las áreas branquiales fueron corregidas por la longitud de cada organismo, solamente el área branquial posterior fue mayor en los lotes con alta sobrevivencia a la prueba de estrés ($P < 0.01$). Esto indica que las branquias posteriores son más importantes para la osmorregulación, de acuerdo a estudios previos en crustáceos. La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa fue mayor en los organismos sometidos a la salinidad experimental (3 ‰), en comparación con los organismos que fueron transferidos a una salinidad control (35 ‰), lo cual indica que las PL15 ya presentan una capacidad osmorreguladora. Sin embargo, los lotes que tuvieron una sobrevivencia alta a la prueba de estrés a baja salinidad no presentaron mayor actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa ($P > 0.05$), por lo que se concluye que la actividad de dicha enzima no explica las del todo las diferencias de sobrevivencia a la prueba de estrés entre lotes. Los lotes con alta sobrevivencia a la prueba de estrés aplicada en PL15 presentaron mayor sobrevivencia durante la siembra y durante el cultivo hasta juveniles de dos meses ($P < 0.01$). Esto indica que la prueba de estrés de baja salinidad si puede ser un indicador predictivo del desempeño posterior de los organismos en cultivo.

INTRODUCCIÓN

La reproducción en cautiverio de varias especies de camarón, tales como: *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus*, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, *Litopenaeus setiferus*, *Marsupenaeus japonicus*, entre otros ha sido desarrollada desde hace más de 20 años (ver revisiones de Browdy, 1992; Bray y Lawrence, 1992; Benzie, 1997; Martínez-Córdova, 1999). Esta actividad se realiza en los laboratorios de producción de postlarvas y contribuye cada vez más al abastecimiento de organismos postlarvas para las granjas de engorda en México. Sin embargo, uno de los principales problemas de este abastecimiento es una gran variabilidad en la calidad de las postlarvas que van a ser sembradas en estanques de engorda (Racotta *et al.*, en prensa).

Dicha variabilidad es una consecuencia tanto del origen de las postlarvas (dado que provienen de diferentes laboratorios o son capturados del medio natural), como de factores tales como la dieta, edad de las postlarvas al momento de la siembra, o la época del año en la que se realiza la siembra. La selección de postlarva inadecuada o de baja calidad puede repercutir en un alto índice de mortalidad varios días después de la siembra, lo que se traduce en un bajo rendimiento. Al respecto, la mayoría de los productores utilizan una prueba de estrés de salinidad para evaluar si un lote de postlarvas está listo para sembrarse en los estanques de engorda (Villalón, 1991; Clifford, 1992, Fegan, 1992; Bray y Lawrence, 1992). No obstante el amplio uso de dicha prueba, no existen sustentos claros de su utilidad real o de los mecanismos fisiológicos implicados en la tolerancia de los organismos a esta prueba (Aquacop *et al.*, 1991; Fegan, 1992; Samocha *et al.*, 1998).

Los protocolos utilizados para la exposición a la prueba de estrés a baja salinidad son distintos en los diferentes trabajos sobre el tema, en cuanto a la edad de la postlarva, el tiempo de exposición y el nivel de salinidad utilizado (Racotta *et al.*, en prensa). En la mayoría de los casos, la prueba se aplica en postlarvas de edad relativamente avanzada (de 15 días o más), dado que a edades mas avanzadas los organismos son capaces de tolerar agua dulce. Existe de hecho, una relación estrecha entre el nivel de salinidad tolerado y la edad de la postlarva (Aquacop *et al.*, 1991; Samocha *et al.*, 1998), lo cual se sustenta en un aumento en la capacidad osmorreguladora a lo largo del desarrollo postlarvario (Charmantier *et al.*, 1988). A pesar de que su utilidad real es controversial como indicador predictivo del desempeño de los organismos en la siembra y durante la engorda, esta prueba ha sido ampliamente utilizada como criterio de calidad final en estudios nutricionales a nivel de postlarva. En varios de estos estudios, las dietas que resultan en mayor crecimiento y sobrevivencia en el cultivo postlarvario, también resultan en una mayor sobrevivencia a la prueba de estrés de salinidad (Tackaert *et al.*, 1989; Rees *et al.*, 1994; Gallardo *et al.*, 1995; Kontara *et al.*, 1997; Paibulkichakul *et al.*, 1998). Sin embargo esta relación no siempre existe, dado que en otros casos no se ha reportado un efecto sobre la sobrevivencia a la prueba de estrés de salinidad a pesar de existir diferencias claras en la sobrevivencia en cultivo por efectos de la dieta (Tackaert, 1989; Rees *et al.*, 1994; Coutteau *et al.*, 1996; Wouters *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 2002a). Esta discrepancia puede deberse a la edad de la postlarva a la cual se aplica la prueba de estrés de salinidad, ya que el efecto de la dieta es mas claro a edades tempranas (postlarva de 5 a 10 días) que en edades mas avanzadas (postlarva de 15 días o más) (Tackaert, 1989; Rees *et al.*, 1994; Bonilla, 2001).

Adicionalmente a la influencia de la dieta, existe una variabilidad individual importante en la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad que puede deberse, entre otros, a la condición fisiológica de los reproductores, mismos que originaron las postlarvas o de las postlarvas resultantes (Palacios *et al.*, 1999; Hernández-Herrera *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2002b).

Es importante señalar que se asume que la sobrevivencia a baja salinidad esta dada por la capacidad osmorreguladora de las postlarvas, aunque existe aún la interrogante si esta capacidad depende de la condición fisiológica generalizada del organismos o de mecanismos osmorregulatorios particulares (Kontara *et al.*, 1997; Bonilla, 2001), tal como se observó en trabajos donde se comparan organismos ayunados y alimentados (Palacios *et al.*, 2002b) u organismos alimentados con distintos niveles de ácidos grasos poli-insaturados (Palacios *et al.*, 2002a). Uno de los objetivos de la presente tesis es evaluar la relación entre la sobrevivencia de postlarvas ante una prueba de estrés a baja salinidad y la variación de los mecanismos de osmorregulación en distintos lotes de postlarvas provenientes de desoves individuales (familias).

Por otro lado y a pesar de lo extendido de las pruebas de estrés de salinidad, no se han realizado experimentos sistemáticos y, por ende, no existen evidencias claras que garanticen que una mayor resistencia a cambios de salinidad a nivel de postlarvas se traduzca en mejor rendimiento para la engorda. El segundo objetivo del presente trabajo es evaluar si existe una relación entre la sobrevivencia de las postlarvas a una prueba de estrés de salinidad y la sobrevivencia posterior.

ANTECEDENTES

Dado que México ocupa el segundo lugar en la camaronicultura en el continente americano (FAO, 2001), tanto para las pesquerías como para el cultivo, se han tratado de desarrollar y maximizar los sistemas de producción en cautiverio a través de estrategias enfocadas a buscar un mayor rendimiento y una mayor calidad no solo de los reproductores, sino también de las larvas.

El objetivo de los laboratorios de producción de postlarvas es producir organismos que presenten mayor sobrevivencia y alta tasa de crecimiento. En las postlarvas, su estado fisiológico o calidad se evalúa en el momento de la compra según su movilidad, color, apariencia, actividad, intervalo de tallas, sobrevivencia a pruebas de estrés, entre otros (Clifford, 1992; De la Cruz, 1992; Dhert *et al.*, 1992; Kawahigashi, 1992). También se evalúa por medio de su desempeño a lo largo del cultivo larvario y engorda posterior, tomando en cuenta: sobrevivencia, tamaño y peso, así como el tiempo que tardan en alcanzar cierta talla. En Asia, la talla es considerada como el primer criterio de evaluación de calidad postlarvaria, seguida por la examinación del hepatopancreas. En Centroamérica y América del Sur, las pruebas de estrés son consideradas el segundo mejor criterio, después de la apariencia física. En Norteamérica se utilizan todos los criterios (apariencia física, actividad alimenticia, talla, etc.) como signo de buena salud (Kawahigashi, 1992). En este sentido, la calidad postlarvaria ha llegado a ser muy relevante entre los productores de camarón, ya que muchos acuacultores están dispuestos a pagar altos precios por obtener postlarvas de buena calidad (Baumann y Jamandre, 1990).

El desarrollo de programas para obtener buena calidad postlarvaria beneficia no solamente al acuacultor quien puede mejorar sus cultivos, sino también, ayuda a los productores a identificar y evaluar los efectos de las variaciones físicas, genéticas y abióticas e implementar nuevas técnicas. Como consecuencia, se han desarrollado pruebas que permiten dilucidar la condición de las postlarvas, a menudo referida como “calidad postlarval”; dichas pruebas son conocidas como pruebas de resistencia o pruebas de estrés.

Antes de analizar en que consisten las pruebas de estrés como criterio de calidad postlarvaria, es necesario definir el fenómeno fisiológico de estrés. Bayne (1975) define la palabra estrés como una alteración medible de un estado físico (o conductual, bioquímico o citológico) que es inducido por un cambio en el ambiente y que hace que el individuo (o la población, o la comunidad) sea vulnerable a otro cambio ambiental. Las pruebas de estrés consisten en someter a las postlarvas a cambios bruscos de algún factor ambiental como salinidad, que se discutirá mas adelante, a cambios en la temperatura del agua o bien a factores que han sido propuestos recientemente, tales como bajas concentraciones de oxígeno o exposición al aire (Ibarra *et al.*, 1998), altas concentraciones de amonio (Cavalli *et al.*, 2000, Hernández-Herrera, 2001), formalina o contaminantes (Samocha *et al.*, 1998; Lignot *et al.*, 2000) entre otros. Estas pruebas están basadas en el mismo principio de exponer a los organismos a cortas, pero extremas, condiciones en las cuales la condición fisiológica de los animales determina su oportunidad de sobrevivir. Cuando los organismos son expuestos a diferentes tratamientos primero presentaran algunos cambios fisiológicos, lo cual a la larga afectara su crecimiento y sobrevivencia (Dhert *et al.*, 1992).

Para que la prueba indique la resistencia de las postlarvas a un cambio brusco se deben de cumplir los siguientes criterios: (a) fácil de estandarizar bajo condiciones de campo, (b) que emplee un número suficiente de animales para permitir hacer comparaciones, (c) que pueda ser realizada en un tiempo breve (Tackaert *et al.*, 1992).

Entre las pruebas de estrés más utilizadas se encuentra la de baja salinidad donde se diluye la concentración de sales del medio. Dependiendo de su estado de desarrollo, se utilizan diferentes concentraciones para aplicar la prueba, así se puede medir la resistencia de las postlarvas sin causar la muerte de toda la población (Hernández-Herrera, 2001). Dicha prueba consiste en exponer a una muestra representativa del total de los organismos a cierta salinidad en periodos que van desde minutos hasta horas y posteriormente se realiza el conteo de la sobrevivencia. De manera general, para postlarvas de camarón, aquellos lotes que presentan una sobrevivencia mayor al 60% se consideran con una buena calidad (Duran-Gómez *et al.*, 1991; De la Cruz, 1992; Dhert *et al.*, 1992; Samocha *et al.*, 1998), y de esta manera, la respuesta a esta prueba determina si es conveniente continuar con el cultivo a la siguiente etapa de producción.

La prueba de estrés a baja salinidad se sustenta en el ciclo de vida de los camarones peneidos.; en el medio natural, cuando los huevos eclosionan, los estadios de nauplio, zoea y mysis se desarrollan en mar abierto a salinidades alrededor de 35‰, cuando alcanzan el estadio de postlarva los camarones migran de aguas marinas a esteros o lagunas donde se encuentran con variaciones de salinidad. Una vez en estos esteros continúan su desarrollo hasta juveniles, los cuales salen de nuevo a mar abierto

para reproducirse y completar el ciclo (Martínez-Córdova, 1999). Las áreas estuarinas y lagunas en las costas del pacifico mexicano presentan un régimen hidrográfico con gran variación durante el año debido a las bien definidas estaciones de lluvia y sequía. En el golfo de California hay cuatro especies de camarones peneidos de importancia comercial: *Penaeus stylirostris* Stimpson, *Penaeus vannamei* Boone, *Penaeus californiensis* Burkenroad y *Penaeus brevirostris* Rathbun. Los sistemas estuarinos y lagunas costeras son necesarios en una parte del ciclo de vida de *P. stylirostris* y *P. vannamei*. Estos lugares promueven el crecimiento de las postlarvas, las cuales una vez alcanzado un tamaño óptimo migran hacia el mar para madurar y desovar. Por lo anterior, y al menos en el caso de estas dos especies, la prueba de estrés tiene cierto sustento en su capacidad de adaptación en la transición entre el ambiente marino y estuarino. Solamente los organismos que presenten un alto grado de eurihalinidad son capaces de vivir en áreas estuarinas por mas tiempo y, por ende, los cambios de salinidad restringen la distribución de estos organismos (Rosas *et al.*, 1999).

Sin embargo, a pesar de lo extendido de las tales pruebas de estrés de salinidad, no se han realizado experimentos sistemáticos y, por ende, no existen evidencias claras que garanticen que una mayor resistencia a cambios de salinidad a nivel de postlarvas se traduzca en mejor rendimiento para la engorda. La sobrevivencia a la prueba se debe principalmente a la capacidad osmorreguladora de los organismos y ésta depende del grado de desarrollo de la postlarva, por lo que es una forma indirecta de evaluar su condición fisiológica a cierta edad, dado que 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). La capacidad osmorregulatoria depende del intercambio activo de iones a nivel de epitelios. En un medio hiposmótico,

como se presenta en las pruebas de estrés a baja salinidad, los organismos tienden a perder iones y ganar agua como consecuencia del cambio en el gradiente osmótico entre la hemolinfa y el medio externo (Charmanier *et al.*, 1988). Para mantener su balance de iones, recurren a una captación activa de iones y una producción de amonio diluido, compensando la entrada osmótica de agua. Dado que los principales osmolitos en el agua de mar y del fluido extracelular son el Na^+ y el Cl^- , estos son los iones que se intercambian a nivel de superficie branquial (Lucu y Devescovi, 1990). En las células epiteliales de las branquias, los iones de sodio son transportados activamente desde la célula hacia el interior del organismo por medio de la bomba de sodio, que es un sistema enzimático, dependiente de ATP, que opera en las membranas celulares y es denominado como bomba Na^+/K^+ -ATPasa (Pequeux y Chapelle, 1982). Esto crea un gradiente electroquímico que permite la entrada de iones Na^+ y Cl^- desde el exterior del organismo hacia las células epiteliales. En estado estacionario, el número de iones de sodio bombeados o transportados hacia fuera de la célula es igual al número de iones sodio que se filtran hacia dentro. Hay dos factores que determinan la magnitud del gradiente de concentración de Na^+ entre el interior y el exterior celular: La velocidad de transporte activo de Na^+ y la velocidad a la que puede volver a entrar en la célula. La velocidad a la que el sodio vuelve a entrar en la célula determina la velocidad a la que tiene que trabajar la bomba para mantener una determinada relación entre el Na^+ extra e intracelular (Eckert, 1990).

Generalmente, este modelo de mecanismo de bombeo se lleva a cabo en los epitelios de los organismos, tales como las branquias y el intestino. La bomba de Na^+/K^+ -ATPasa cataliza la hidrólisis del ATP en ADP y fosfato inorgánico solo en presencia de Na^+ y de K^+ y se caracteriza por fijar ouabaina, un inhibidor específico de esta bomba.

La eliminación continua de Na^+ mediante la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa representa uno de los factores principales en el control del volumen celular.

Un número reciente de investigaciones han confirmado la importancia de la Na^+/K^+ -ATPasa en medios hiposmóticos. El cangrejo *Carcinus maenas* fue transferido a agua de mar diluida y se observó un incremento en la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa en las branquias posteriores (Lucu y Devescovi, 1999). Los camarones *Penaeus japonicus* expuestos a turbidez, incrementaron la actividad Na^+/K^+ -ATPasa como respuesta al desbalance en la presión osmótica (Lin *et al.*, 1992). Sin embargo, Gonçales *et al.* (1997) en su trabajo con *Macrobrachium olfersii*, observaron que la actividad de dicha bomba disminuyó un 35% después de que los organismos fueron aclimatados. Por lo tanto, los cambios en la actividad enzimática es una forma de adaptación de los organismos a diferentes salinidades y mantener un balance en la cantidad de Na^+ dentro y fuera del organismo (Pequeux y Chapelle, 1982; Charmantier, 1988; Wilder *et al.*, 2000).

La resistencia de los organismos a las pruebas de baja salinidad también ha sido atribuida al estatus de alimentación. Aquellos organismos alimentados con dietas que les proveen mejores resultados en su crecimiento y sobrevivencia en cultivo, generalmente presentan un mayor porcentaje de sobrevivencia ante pruebas de estrés a baja salinidad. Los primeros trabajos nutricionales en el desarrollo larvario del camarón se basaron en el enriquecimiento de la *Artemia sp.* con diferentes niveles de ácidos grasos polinsaturados (PUFA), particularmente de la serie n-3 (Tackaert *et al.*, 1992; Dhert *et al.*, 1992).

Algunos estudios han encontrado que cuando aumentan los niveles de PUFA n-3 en la dieta, incrementa el porcentaje de sobrevivencia en cultivo (Durán-Gomez *et al.*, 1991; Rees *et al.*, 1994; Coutteau *et al.*, 1997; Kontara *et al.*, 1997), el crecimiento (Rees *et al.*, 1994) y la sobrevivencia a pruebas de estrés a baja salinidad (Charmantier *et al.*, 1988; Tackert *et al.*, 1992; Rees *et al.*, 1994; Samocha *et al.*, 1998). Por otro lado, en estudios realizados en crustáceos sometidos a medios hiposmóticos o hiperosmóticos y donde se determinó su resistencia a alta o baja salinidad, se concluyó que los fosfolípidos tienen un papel importante en la tolerancia a las pruebas de estrés de salinidad, ya sea por afectar la condición fisiológica general o por el papel específico de los lípidos membranales en el transporte iónico y actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa (Chapelle y Zwingelstein, 1984; Rees *et al.*, 1994; Kontara *et al.*, 1997; Bonilla, 2001).

JUSTIFICACIÓN

Existe una gran variabilidad en la calidad de las postlarvas utilizadas para la siembra en estanques de engorda por lo cual es necesario contar con criterios confiables que permitan establecer la calidad relativa y decidir que lotes se siembran. Uno de los criterios comúnmente utilizados a nivel experimental y de producción para evaluar dicha calidad es la prueba de estrés a baja salinidad que consiste en transferir abruptamente a los organismos a bajas salinidades, generalmente agua dulce, y evaluar la sobrevivencia al cabo de cierto tiempo (de 30 minutos a 1 hora). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios sistemáticos que evalúen la utilidad real de dicha prueba como indicador predictivo de la sobrevivencia a la siembra en estanques o del desempeño de los organismos (crecimiento y sobrevivencia) durante la engorda.

Por otro lado, tampoco están claros los fundamentos fisiológicos sobre los que se basa esta prueba, así como la razón de la variabilidad individual en la sobrevivencia durante dicha prueba. Por lo anterior, es necesario analizar más a fondo los posibles mecanismos fisiológicos relacionados con la tolerancia a bajas salinidades.

HIPÓTESIS

Existen variaciones entre distintos lotes de desoves que repercuten en la sobrevivencia y en el crecimiento a nivel de postlarvas cultivadas en condiciones semejantes.

La sobrevivencia de las postlarvas de camarón sometidas a una prueba de baja salinidad, es el resultado de variaciones en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.

Asimismo, las postlarvas que presentan una mayor área branquial son más resistentes a la prueba de estrés de baja salinidad.

Las postlarvas con mecanismos de osmorregulación más desarrollados (mayor actividad de Na^+/K^+ -ATPasa y mayor área branquial) son capaces de tolerar mayores variaciones de salinidad durante la siembra y cultivo temprano, lo cual repercute en su sobrevivencia.

OBJETIVOS GENERALES

Establecer la relación entre la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad de postlarvas de camarón y el desempeño de los organismos en la siembra y en la engorda.

Analizar algunos de los fundamentos fisiológicos de una mayor sobrevivencia a la prueba de estrés de baja salinidad en postlarvas de camarón.

Objetivos específicos

1. Determinar si existe alguna relación entre la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad en estadio de postlarva, con la sobrevivencia y desempeño general a juveniles.
2. Analizar si la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa se encuentra relacionada con la sobrevivencia de las postlarvas durante la prueba de estrés de salinidad.
3. Determinar si existe una relación entre la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad con el área total ocupada por branquias anteriores y posteriores.
4. Determinar la relación entre la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad, con la longitud y el peso de las postlarvas.

METODOLOGÍA

Desove.

Se obtuvieron 40 desoves (lotes o familias genéticas) a partir de reproductores de aproximadamente 35 ± 5 g que fueron transferidos de estanques supralitorales al área de Biología Reproductiva de Especies Marinas (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste), en donde se mantuvieron en tanques de 12 m^2 rectangulares y 6 m^2 circulares fabricados de lona negra de plástico y una base tubular, con una densidad de 15 organismos/ m^2 , en proporción 1:1 machos y hembras. Diariamente en cada tanque se mantuvo un recambio continuo de agua de 300%, una temperatura de 28°C y salinidad de 37‰. Después de un periodo de aclimatación de 15 días, se siguieron las condiciones generales de ablación del tallo ocular con marcaje individual y maduración basadas en las utilizadas por empresas comerciales y que han sido especificadas en trabajos previos (Arcos *et al.*, en prensa).

Diariamente durante un mes, se revisaron al atardecer las tinas para identificar hembras maduras y apareadas. Dichas hembras fueron transferidas a cubos individuales de desove de 160 L, donde se registro el código numérico de cada hembra permitiendo así un seguimiento de los desoves individuales.

Una vez ocurrida la eclosión, los nauplios fueron cosechados y sembrados para el cultivo larvario, conservando la identidad individual por desove que se mantuvo a lo largo de toda la etapa larvaria, postlarvaria y hasta juveniles de 1 g en condiciones previamente descritas (Pérez-Rostro *et al.*, 1999).

Cultivo larvario.

Las larvas de cada desove fueron cultivadas en tanques circulares de 100 L de capacidad, cada tanque con una densidad inicial de 120 nauplios/L, con una temperatura y salinidad de 28°C y 35‰ respectivamente. Durante el cultivo larvario se hicieron estimaciones del porcentaje de sobrevivencia de cada estadio larval (Zoea y Mysis) y postlarva 1 y postlarva 15 (Palacios *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 1999). La alimentación consistió de nauplios de *Artemia sp.* y una mezcla de microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *Thalassiosira pseudomona* y *Dunaliella*. La cantidad de alimento fue ajustada de acuerdo a cada estadio larval. Al llegar a postlarva 1 (PL1) se estimó la sobrevivencia y la densidad fue ajustada a 20 PL/L. A partir de esta etapa, la alimentación consistió en nauplios de *Artemia sp.* y alimento peletizado (PIASA) con 40% de proteína. La proporción de dicha alimentación se fue modificando en relación a la edad de las postlarvas. Cuando las postlarvas tenían 15 días de cultivo (PL15), se procedió al conteo en cada tanque de cultivo, para estimar el porcentaje de sobrevivencia. Posteriormente las postlarvas fueron trasladadas a los tanques de precría (Figura 1).

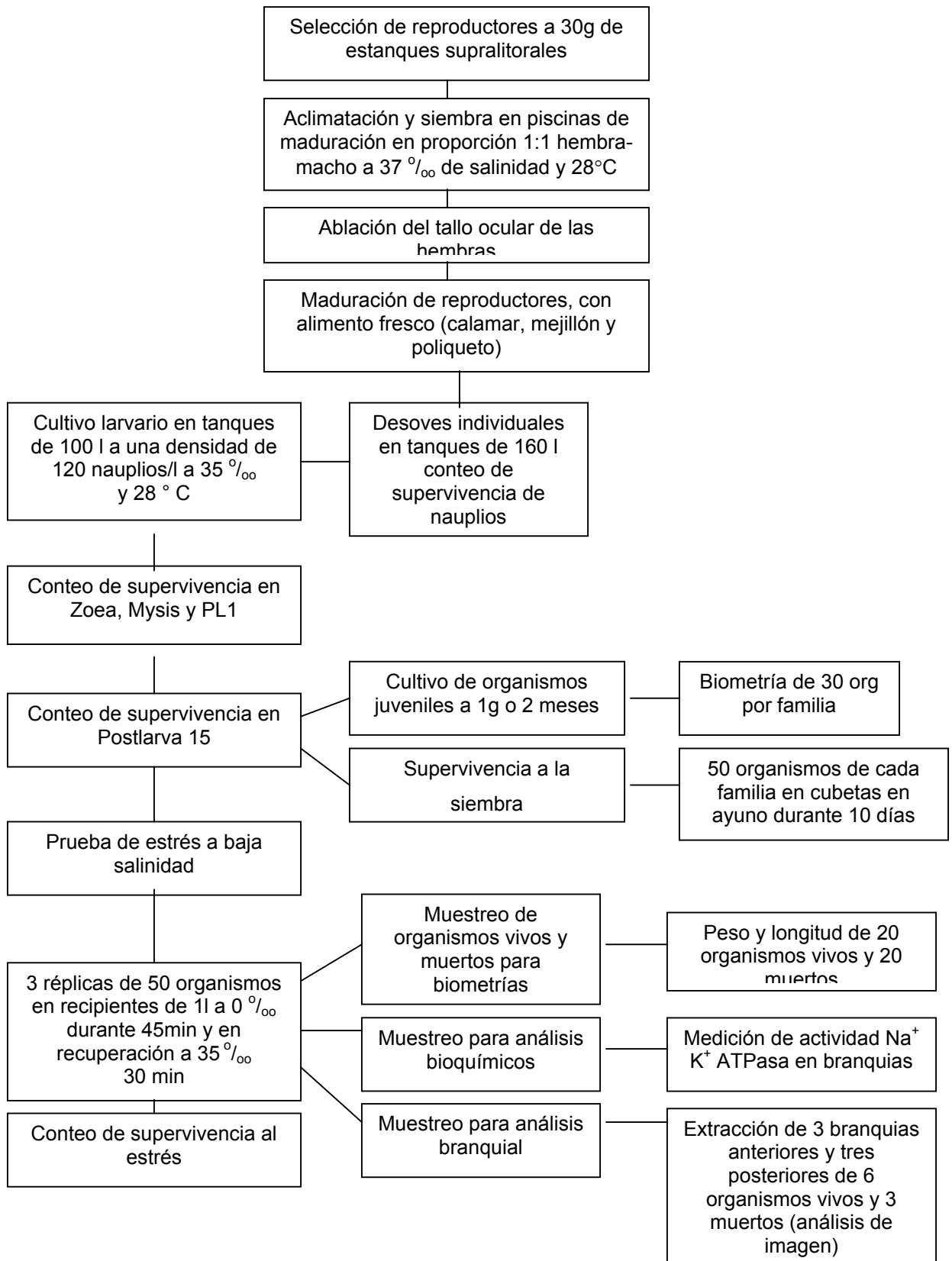


Figura 1. Diagrama de flujo del cultivo de *Litopeaeus vannamei* y actividades realizadas para la prueba de estrés a baja salinidad en PL15.

Resistencia a la prueba de estrés a baja salinidad.

Las PL15, provenientes de desoves independientes fueron sometidas a una prueba de estrés a baja salinidad, que consistió en transferir abruptamente de 35‰ a agua de la llave (aproximadamente 2‰ de salinidad, pero que para términos prácticos se maneja como 0‰ en resultados y discusión). Para esto se tomaron tres replicas por lote, cada una con 50 individuos aproximadamente que fueron colocados en recipientes de 1 L de capacidad con agua de la llave por 45 minutos, transcurrido este lapso fueron trasladadas a una salinidad de 35‰, durante 30 minutos para su recuperación (Bonilla, 2001). Posteriormente se realizó el conteo de sobrevivencia. Los organismos que presentaron alguna respuesta como el cerrar los pedúnculos oculares o algún movimiento eran considerados como vivos, los que no presentaron ninguna respuesta al estímulo con una pipeta de plástico eran considerados como muertos (Palacios *et al.*, 1999). Terminada la prueba de estrés a baja salinidad se tomaron muestras para bioquímica, morfometría y área branquial (Figura 1).

Estimación de sobrevivencia

Sobrevivencia durante el cultivo postlarvario.

Se estimó la sobrevivencia a los estadios PL1 y PL15 tomando tres alícuotas y contando los organismos que en ella se encontraron, obteniendo una media y posteriormente el número total de organismos.

Sobrevivencia a la siembra en PL15.

De cada desove individual , se tomaron 50 PL15 que se colocaron en cubetas de 14 L de capacidad con luz de malla de 500 μm . Dichos organismos se mantuvieron en ayuno durante 10 días, durante los cuales diariamente se estimó la sobrevivencia contando el número de organismos que presentaron movimiento. Los organismos que no reaccionaron a un estímulo fueron eliminados de la cubeta. Se decidió utilizar este protocolo dado que normalmente las postlarvas durante la siembra en estanques tardan varios días en consumir alimento. Por otro lado, en experimentos preliminares en donde se simula la siembra en estanques con cubetas, la mortalidad obtenida fue mínima (Racotta, com. Pers.)

Sobrevivencia durante la precría o engorda.

Una vez estimado el número total de las PL15 de cada lote, los organismos fueron trasladados a tanques rectangulares de precría de 1 m² fabricados de cemento y adaptados con aireación constante y flujo continuo de agua. Transcurridos dos meses, durante los cuales los juveniles alcanzaron un peso aproximado de 1 g, se estimó la sobrevivencia contando todos los organismos que se encontraron dentro del tanque.

Variables morfométricas.

Morfometría de PL15.

Para las mediciones de las variables morfométricas se mezclaron las PL15 provenientes de las tres replicas para la prueba de estrés a baja salinidad. A partir de dicha mezcla, se muestrearon 20 PL15 muertas y 20 PL15 vivas, las cuales fueron fijadas en formol al 4%. A cada postlarva se le midió la longitud por medio de una regleta del microscopio estereoscopio con aumento de 0.7X tomando como referencia desde la punta del rostro hasta la punta del telson. Posteriormente cada larva fue pesada en una balanza analítica (± 0.0001 g).

Morfometría de organismos juveniles.

Transcurrido dos meses y cuando los organismos alcanzaron el peso aproximado de 1 g, se tomaron al azar 30 organismos juveniles de los tanques de precría, en cada uno se midió la longitud por medio de un vernier digital (± 0.01 mm) y cada uno se peso con una balanza semianálitica (± 0.01 g). Posteriormente los camarones fueron regresados a su tanque de cultivo.

Cálculo del área branquial de PL15

Los mismos organismos muestreados para morfometría fueron utilizados para el análisis del área branquial ($n = 6$ para PL15 vivas y $n = 3$ para PL15 muertas). Con ayuda de un microscopio estereoscópico se removió el exoesqueleto del cefalotórax de 9

organismos por desove ($n = 6$ vivos y $n = 3$ muertos durante la prueba de estrés a baja salinidad) separando tres pares de branquias anteriores y tres pares de branquias posteriores. Las branquias fueron colocadas en un portaobjetos y se obtuvo la imagen con un microscopio óptico (Olympus BX-41) con aumento de 40X en contraste de fases, una cámara digital (Media Cybernetics modelo Cool-Snap procolor) con resolución de 1390 x 1040 píxeles y una computadora (Dell Pentium 3), utilizando el paquete Image-Pro Plus. Las imágenes obtenidas de las branquias se utilizaron para calcular el área branquial, usando el analizador de imágenes (SigmaScan Pro5).

Análisis bioquímicos.

Actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa de PL15.

Al término de la prueba de estrés a baja salinidad, se tomó una muestra de 50 organismos de PL15 por desove de organismos que fueron mantenidos a la salinidad de cultivo de 35‰ (salinidad control) y otra muestra de 50 organismos PL15 por desove de organismos sometidas a agua de la llave o aproximadamente 0‰ (salinidad experimental) y dichas muestras fueron congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inmediatamente después de la prueba.

A partir de las muestras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con ayuda de un microscopio estereoscopio se removió el exoesqueleto del cefalotórax evitando romper el hepatopáncreas y el ganglio cerebral para evitar la contaminación de las branquias por enzimas proteolíticas. Posteriormente se extrajeron las branquias anteriores y

posteriores de aproximadamente 50 PL15 (hasta alcanzar de 10 a 20 mg de peso húmedo) y dichas branquias se mantuvieron congeladas a -70°C .

Posteriormente, las branquias se liofilizaron durante 24 horas y se pesaron en una balanza analítica (± 0.0001 g) para obtener el peso seco de las branquias. Las branquias se trituraron con una espátula y se suspendieron en 0.5 ml de buffer de homogenización que contenía una mezcla de sacarosa y EDTA (Anexo 1). Posteriormente se prepararon dos series de tubos (medio +K y medio -K/oabaina) con 100 μl respectivamente a una temperatura de 4°C . A las series de tubos se le agregó 300 μl de medio +K y medio -K respectivamente. Cada serie de tubos se incubo en un baño termostático a 28°C por 5 minutos. Transcurrido este periodo a ambas series se le agregó 100 μl de ATP/Mg e incubo exactamente 15 minutos cada muestra. Al cabo de 15 minutos se agregaron 200 μl de reactivo de vanadomolibdato y se colocaron en baño de hielo para detener la reacción y posteriormente se centrifugaron a 3600 rpm a 4°C durante 10 minutos, a continuación se midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro (Aquamatic, Spectronic unicam) en una cubeta de cuarzo de 0.5 ml utilizando como blanco 200 μl de reactivo de vanadomolibdato y 500 μl de agua desionizada. Para calcular su concentración se realizó una curva patrón partiendo de concentraciones de 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/ml de fósforo. La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se determinó como actividad total (μMP liberado/g x hora) por liberación diferencial de fosfato entre dos medios (medio +K y medio -K) en presencia o ausencia de oabaina (un inhibidor específico de dicha enzima).

ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron análisis de correlaciones entre las sobrevivencias durante el cultivo a los diferentes estadios (PL15, siembra y juveniles hasta 2 meses de edad o alcanzar 1g de peso), la sobrevivencia a la prueba al estrés de baja salinidad, las variables morfométricas (Peso y longitud de PL15 y juveniles), el área branquial anterior y posterior de PL15, la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, el porcentaje de humedad en branquias de organismos expuestos a salinidad control y experimental.

Por otro lado, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial para comparar las sobrevivencias durante el cultivo de los diferentes estadios (PL15, siembra y juveniles hasta 2 meses de edad o alcanzar 1g de peso), las variables morfométricas (Peso y longitud de PL15 y juveniles), el área branquial anterior y posterior de PL15, la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, el porcentaje de humedad en branquias de organismos expuestos a salinidad control y experimental, entre desoves con alta y baja sobrevivencia a la prueba de estrés de salinidad (factor fijo: alta vs. baja sobrevivencia) y en relación a la sobrevivencia de los organismos de distintos desoves (factor fijo: PL15 vivas vs. muertas).

Para comparar la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en organismos sometidos a salinidad control y experimental se realizó una prueba de t para varianzas iguales. Para comparar el porcentaje de humedad en branquias de PL15 sometidas a salinidad control y experimental se realizó una prueba de t para varianzas desiguales.

Los datos calculados como porcentaje se normalizaran por medio de una transformación a arcoseno para realizar los análisis estadísticos (Sokal y Rohlf, 1981; Castille *et al.*, 1993), pero los datos en los resultados se presentan sin transformación. La significancia fue fijada a $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete Statistica v.5.5.

RESULTADOS

La comparación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en organismos sometidos a una salinidad control (35‰) o a una salinidad experimental (agua dulce 0‰), se realizó por medio de una prueba de t para varianzas iguales. Los resultados se muestran en la figura 2, donde se observa que la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa fue activada significativamente en los organismos sometidos a la salinidad experimental (0‰), en comparación con los organismos que fueron transferidos a una salinidad igual a la del cultivo (35‰).

El porcentaje de humedad en las branquias de PL15 sometidos a la salinidad experimental (0‰) o control (35‰) también se comparó por medio de una t para varianzas desiguales y los resultados se muestran en la figura 2. Se observó una ganancia de agua (mayor porcentaje de humedad) en branquias de PL15 sometidas a 0‰; sin embargo, dicho efecto no fue significativamente diferente.

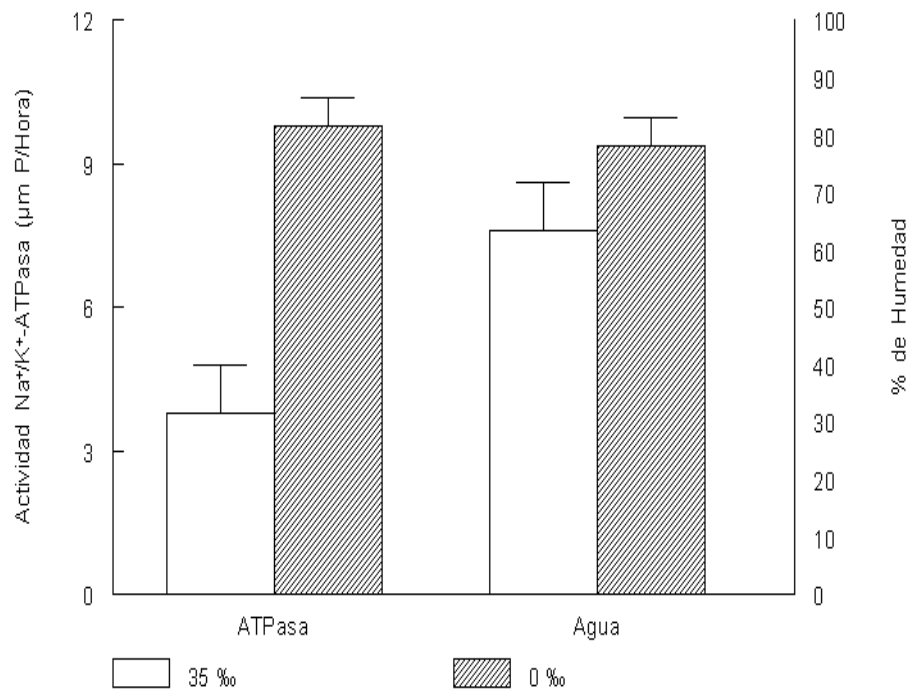


Figura 2. Actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa (μm P/hora; eje izquierdo) y % de humedad (eje derecho) en branquias de PL15 sometidas a una salinidad experimental (0‰) o a una salinidad control (35‰).

En la Tabla I se comparan algunas variables morfométricas en función de si los organismos sobrevivieron o no a la prueba de estrés a baja salinidad aplicada en PL15. Los organismos que sobrevivieron a la prueba de estrés de salinidad fueron significativamente mas grandes y presentaron una mayor área branquial tanto de las branquias anteriores como de las posteriores ($P < 0.01$). Dicho efecto se mantuvo cuando el área branquial se estimó corrigiendo por la longitud de los organismos PL15 ($P < 0.05$), dado que hay una relación entre área branquial y tamaño del organismo (ver mas adelante).

TABLA I. Comparación de distintas variables (media \pm D.S) entre organismos que sobrevivieron a la prueba de estrés a baja salinidad, aplicada en PL15 a 40 distintos lotes de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados fueron analizados por medio de un ANOVA unifactorial usando la condición de organismos vivos o muertos como variable independiente.

	Organismos vivos	Organismos muertos	P
Longitud PL15 (mm)	10.6 \pm 1,6	8.9 \pm 2.9	<0.001
Peso PL15 (mg)	8.6 \pm 3.8	5.9 \pm 2.9	<0.001
Área branquial anterior (μm^2)	146,782 \pm 65,286	109,230 \pm 55,139	<0.001
Área/Longitud branquial anterior	13,581 \pm 4,676	11,945 \pm 4,867	=0.037
Área branquial posterior(μm^2)	161,784 \pm 65,037	123,553 \pm 56,303	<0.001
Área/Longitud branquial posterior	14,884 \pm 4,765	13,270 \pm 4,430	=0.035

Esto se confirma con los resultados obtenidos en la Tabla II, donde se comparan estas variables en lotes de PL15 con alta (69.1 ± 8.7) y baja (35.3 ± 15.1) sobrevivencia durante la prueba de estrés a baja salinidad aplicada en PL15. Los lotes que presentaron una alta sobrevivencia a la prueba de estrés de salinidad fueron significativamente mas grandes, tanto en peso como en longitud ($P < 0.01$) y presentaron una mayor área branquial, tanto de las branquias anteriores como de las posteriores ($P < 0.01$). Sin embargo, cuando el área branquial fue corregida en relación a la longitud de los organismos, la diferencia del área branquial entre alta y baja sobrevivencia solamente se observó en las branquias posteriores ($P < 0.05$).

Cabe resaltar que los lotes con una alta sobrevivencia a la prueba de estrés aplicada en PL15 no tuvieron una menor sobrevivencia durante el cultivo larvario hasta PL15 ($P < 0.01$). Sin embargo, los lotes con alta sobrevivencia a la prueba de estrés aplicada en PL15 presentaron mayor sobrevivencia durante la siembra y durante el cultivo hasta juveniles de dos meses ($P < 0.01$). Sin embargo, los lotes de juveniles de dos meses que presentaron una alta sobrevivencia durante la prueba de estrés de salinidad no presentaron diferencias en peso o longitud en comparación con lotes con una baja sobrevivencia durante dicha prueba.

Los organismos provenientes de lotes que presentaron una sobrevivencia alta a la prueba de estrés a baja salinidad presentaron una mayor actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa basal (35‰) pero esta no fue significativa, así como tampoco fue significativa la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa a 0‰ ($P > 0.05$). Tampoco se observaron diferencias en el porcentaje de humedad entre ambos grupos.

TABLA II. Comparación de distintas variables (media \pm D.S) entre 40 lotes que presentaron una alta o una baja sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad, aplicada en PL15 de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados fueron analizados por medio de un ANOVA unifactorial, usando como variable independiente la sobrevivencia alta (69.1 \pm 8.7) o baja (35.3 \pm 15.1).

	Alta Sobrevivencia	Baja Sobrevivencia	P
Sobrevivencia en cultivo PL15 (%)	70.68 \pm 14.13	77.27 \pm 13.31	<0.001
Sobrevivencia PL15 en siembra (%)	81.06 \pm 12.40	75.15 \pm 21.98	<0.001
Sobrevivencia a cultivo de juveniles (%)	70.86 \pm 23.55	63.03 \pm 19.78	<0.001
Peso PL15 (mg)	8.70 \pm 3.53	7.75 \pm 3.53	<0.001
Longitud PL15 (mm)	10.88 \pm 1.43	10.12 \pm 1.62	<0.001
Peso juveniles (g)	0.48 \pm 0.14	0.41 \pm 0.10	=0.141
Longitud juveniles (mm)	34.96 \pm 3.57	37.05 \pm 2.71	=0.072
Área branquias anteriores (μm^2)	144,768 \pm 66,540	134,021 \pm 62,185	=0.023
Área/Long branquias anteriores	13,185 \pm 5,404	13,008 \pm 4,964	=0.648
Área branquias posteriores (μm^2)	167,435 \pm 73,747	147,038 \pm 59,497	<0.001
Área/Long branquias posteriores	14,881 \pm 5,539	14,124 \pm 4,429	=0.046
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa Basal ($\mu\text{M P/ Hora}$)	4.84 \pm 4.30	3.10 \pm 2.83	=0.182
Humedad 35‰ (%)	82.26 \pm 11.01	81.06 \pm 12.06	=0.777
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa a 0 ($\mu\text{M P/Hora}$)	8.88 \pm 9.50	5.46 \pm 5.58	=0.266
Humedad 0‰ (%)	77.33 \pm 12.63	78.43 \pm 10.46	=0.789

Los resultados de las correlaciones realizadas entre las variables obtenidas en los estadios de PL15 y de juveniles de dos meses, se muestran en la Tabla III. Se observa que la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad esta significativamente correlacionada con la longitud y el peso de las PL15 vivas ($r = 0.60$, $P < 0.001$; $r = 0.42$, $P < 0.01$; respectivamente), así como con el área de branquias posteriores ($r = 0.41$, $P < 0.01$). Sin embargo, la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad no está correlacionada significativamente con la actividad de de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa, la sobrevivencia de PL15 a la siembra o a la sobrevivencia de juveniles de dos meses , o a la longitud y peso de juveniles de dos meses.

La actividad de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa analizada en PL15 sometidas a la salinidad control (35‰) está significativamente correlacionada con el área ocupada por las branquias posteriores de las PL15 ($r = 36$; $P = 0.05$), pero la correlación no fue significativa en branquias anteriores ($r = 30$; $P = 0.10$) (Figuras 3 y 4, Anexo 2). Por otro lado, la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa analizada en PL15 sometidas a la salinidad experimental (0 ‰) está correlacionada significativamente con el tamaño ($r = 0.36$; $P = 0.04$) y peso ($r = 0.35$; $P = 0.05$) de los juveniles de dos meses. Sin embargo, la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa no está correlacionada significativamente con ninguna de las sobrevivencias medidas en el presente trabajo, así como tampoco con el peso o longitud de PL15.

Además de la correlación con ATPasa ya mencionada, el área branquial posterior (Figura 5 y 6, Anexo 2), se correlacionó significativamente con la longitud de PL15 ($r = 0.58$; $P < 0.01$) y con la sobrevivencia a PL15 ($r = 0.51$, $P < 0.01$).

El porcentaje de humedad a la salinidad control (35‰) se correlacionó significativamente ($r = 0.47$, $P < 0.01$) con el porcentaje de humedad en los mismos lotes expuestos a la prueba de estrés de salinidad (0‰). Sin embargo, no se observó este tipo de relación en el caso de la ATPasa.

Con respecto a las sobrevivencias registradas durante el cultivo larvario, postlarvario y durante la siembra de juveniles, no se encontraron correlaciones significativas entre la sobrevivencia durante el cultivo larvario hasta el estadio de PL15 con ninguna variable, a excepción de la longitud de juveniles ($r = 0.35$; $P = 0.02$) y la sobrevivencia en cultivo desde PL15 hasta juveniles ($r = 0.35$; $P = 0.02$). La sobrevivencia a la siembra en PL15 no está correlacionada significativamente con ninguna de las variables de estudio. Por otro lado, la sobrevivencia de organismos hasta el estadio de juveniles está correlacionada con el peso de los juveniles ($r = 0.40$; $P = 0.015$).

Como era de esperarse, el peso de los organismos se correlacionó significativamente con la longitud tanto en PL15 ($r = 0.72$; $P < 0.001$) como en juveniles de dos meses ($r = 0.82$; $P = 0.015$). Sin embargo, la longitud y peso de PL15 no se correlacionó significativamente con la longitud y peso de juveniles de dos meses.

TABLA III: Correlaciones entre distintas variables (morfométricas y sobrevivencias) determinadas en PL15 y en juveniles de dos meses de *Litopenaeus vannamei*. Los valores de sobrevivencias (%) fueron normalizados por medio de arcosenos para el análisis estadístico. Solamente se muestran los valores de r; los valores significativos ($P < 0.05$) están marcados en negritas.

	Super. PL 15 a estrés	ATPasa 35‰	ATPasa 0‰	Área Branq. anter.	Área Branq. post.	% humed. a 35‰	% humed. a 0‰	Super. PL15 cultivo	Super. PL15 a siembra	Super. hasta juvenil	Long. PL15	Peso PL15	Long. juvenil	Peso juvenil
Sobrevivencia PL15 a estrés	-													
ATPasa 35‰	0.15	-												
ATPasa 0‰	0.11	0.14	-											
Área branquias anteriores	0.04	0.30	0.12	-										
Área branquias posteriores	0.41	0.36	0.01	0.14	-									
% humedad a 35‰	0.02	0.02	0.08	0.09	0.25	-								
% humedad a 0‰	0.11	0.01	0.15	0.02	0.25	0.47	-							
Sobrevivencia. PL15 en cultivo	0.02	0.04	0.21	0.51	0.33	0.01	0.12	-						
Sobrevivencia PL15 siembra	0.12	0.24	0.09	0.30	0.20	0.10	0.04	0.06	-					
Sobrevivencia a juveniles	0.09	0.04	0.05	0.33	0.21	0.13	0.18	0.35	0.23	-				
Longitud PL15	0.60	0.09	0.02	0.23	0.58	0.11	0.17	0.21	0.04	0.16	-			
Peso PL15	0.42	0.09	0.05	0.19	0.22	0.02	0.23	0.13	0.30	0.16	0.72	-		
Longitud juveniles	0.12	0.19	0.36	0.22	0.13	0.15	0.23	0.35	0.01	0.19	0.24	0.39	-	
Peso juveniles	0.13	0.02	0.35	0.12	0.04	0.30	0.33	0.19	0.00	0.40	0.16	0.01	0.82	-

Super. = Sobrevivencia (%); Long. = Longitud (mm); Peso de PL15 (mg), peso de juveniles (g); Área branquial (μm^2); ATPasa = Na^+/K^+ -ATPasa ($\mu\text{M P/ Hora}$).

DISCUSIÓN

El uso de pruebas de estrés como un método para determinar la calidad postlarvaria es ampliamente utilizada en las granjas camaronícolas y en investigación. En las pruebas de estrés se exponen los lotes de postlarvas de camarón a un cambio externo brusco y se determina la sobrevivencia para estimar la condición fisiológica de las postlarvas. La teoría supone que los lotes de camarón que tienen baja sobrevivencia o que no sobreviven a la prueba de estrés presentarían una capacidad reducida para resistir otros tipos de estrés, tales como la siembra y/o cultivo posterior. Las pruebas de estrés son también ampliamente utilizadas para diferenciar entre los lotes de camarones sometidos a distintos tratamientos en estudios experimentales. Además de la sobrevivencia de los organismos a las pruebas de estrés, otro parámetro frecuentemente usado para estimar la condición fisiológica es la talla de los organismos.

La prueba de estrés más ampliamente utilizada consiste en exponer de forma brusca y durante cierto tiempo a las postlarvas a un ambiente con una salinidad diluida con respecto a la salinidad del medio de cultivo. Existe una amplia gama de trabajos donde se describe el uso de la prueba de estrés a baja salinidad aplicada en distintas especies de peneidos (*Penaeus vannamei*, *P. monodon* y *P. japonicus*), en distintas edades o estadios de postlarva y a diferentes niveles de salinidad (Tabla IV). Como se observa en la tabla, la especie no parece ser determinante en los resultados de sobrevivencia a la prueba de estrés. Por otro lado, se puede apreciar que no existe una estandarización en cuanto al tiempo de exposición a la prueba de estrés de salinidad. La definición del tiempo de exposición se lleva a cabo en relación a los criterios de cada investigador de acuerdo al objetivo de su estudio. Hernández-Herrera (2001) concluye que el tiempo de exposición y la dilución del agua dependen del desarrollo de las que el

tiempo de exposición y la dilución del agua dependen del desarrollo de las postlarvas, siendo el objetivo determinar su resistencia al estrés sin causarles la muerte. Samocha *et al.* (1998) sugieren que en función de la edad de las postlarvas debe usarse una determinada salinidad para la prueba de estrés y en los manuales técnicos se recomiendan ciertos niveles y tiempo para una edad específica (Villalón, 1991; Clifford, 1992; Samocha *et al.*, 1998).

TABLA IV. Prueba de estrés a baja salinidad, edad de las postlarvas y porcentaje de sobrevivencia en diferentes especies del genero *Penaeus* reportado por otros autores.

(Modificado de Hernández-Herrera, 2001; Racotta *et al.*, en prensa).

<i>Penaeus vannamei</i>					
EDAD	PRUEBA DE ESTRÉS Y CONDICION	SALINIDAD	EXPOSICION	SUPERV (%)	REFERENCIA
PL1-PL2	Salinidad LC ₅₀	16.8 ppm	2 horas	50 %	Samocha <i>et al.</i> , 1998
PL1-PL2	Salinidad con recuperación-agua marina	18 ppm	30 minutos	60.7-88.6 %	Hernández-Herrera, 2001
PL2	Salinidad	20 ppm	2 horas	<5 %	AQUACOP, 1991
PL5	salinidad LC ₅₀	8.3 ppm	2 horas	50 %	Samocha <i>et al.</i> , 1998
PL5	Salinidad	20 ppm	2 horas	40 %	AQUACOP, 1991
PL5	Salinidad	20 ppm	2 horas	40 %	AQUACOP, 1991
PL8	Salinidad	16 ppm	24 horas	92.8 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL8	Salinidad	8 ppm	24 horas	18.8 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL8	Salinidad	4 ppm	24 horas	8.2 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL8	Salinidad	2 ppm	24 horas	1.7 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL8	Salinidad	16 ppm	24 horas	92.8 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL8	Salinidad	8 ppm	24 horas	18.8 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL8	Salinidad	4 ppm	24 horas	8.2 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL8	Salinidad	2 ppm	24 horas	1.7 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL10	Salinidad	10 ppm	2 horas	25 %	AQUACOP, 1991
PL15	Salinidad	5 ppm	2 horas	70 %	AQUACOP, 1991
PL15	Salinidad con 15 días de ablación	0 ppm	30 minutos	89.2 %	Palacios <i>et al.</i> , 1999
PL15	Salinidad con 45 días de ablación	0 ppm	30 minutos	68.3 %	Palacios <i>et al.</i> , 1999
PL15	Salinidad con 75 días de ablación	0 ppm	30 minutos	38.7 %	Palacios <i>et al.</i> , 1999
PL18	Salinidad con agua desionizada y dieta de fosfolípidos	0 ppm	1 hora	85.8 %	Coutteau <i>et al.</i> , 1996
PL20	Salinidad	2 ppm	2 horas	>90%	AQUACOP, 1991
PL20	Salinidad con recuperación agua de mar	0 ppm	30 minutos	42.8 –63.7 %	Hernandez-Herrera, 2001
PL21	Salinidad org ayunados	0 ppm	30 minutos	78.62 %	Bonilla, 2001
PL21	Salinidad org. alimentados	0 ppm	30 minutos	85.84 %	Bonilla, 2001
PL22	Salinidad	16 ppm	24 horas	97.8 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL22	Salinidad	8 ppm	24 horas	83.3 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL22	Salinidad	4 ppm	24 horas	63.4 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL22	Salinidad	2 ppm	24 horas	40.2 %	Ogle <i>et al.</i> , 1992
PL23	Salinidad con agua desionizada y dieta de fosfolípidos	0 ppm	1 hora	90 %	Coutteau <i>et al.</i> , 1996
PL41	Salinidad con agua desionizada y dieta de fosfolípidos	0 ppm	1 hora	90 %	Coutteau <i>et al.</i> , 1996

Tabla IV. Continuación.

<i>Penaeus monodon</i>					
EDAD	PRUEBA DE ESTRÉS Y CONDICION	SALINIDAD	EXPOSICION	SUPERV (%)	REFERENCIA
PL10	Salinidad con dieta de n-3HUFA	14 ppm	30 minutos	40-90 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989
PL10	Salinidad con dieta de n-3HUFA	14 ppm	60 minutos	20-60 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989
PL10	Salinidad con dieta de n-3HUFA	7 ppm	30 minutos	5-35 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989
PL10	Salinidad con dieta de n-3HUFA	7 ppm	60 minutos	0-23.5 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989
PL10	Salinidad (control), Sin dieta	10 ppm	2 horas	23 %	Rees <i>et al.</i> , 1994
PL10	Salinidad con Artemia enriquecida	10 ppm	2 horas	56-90 %	Rees <i>et al.</i> , 1994
PL10	Salinidad con Artemia enriquecida	0 ppm	2 horas	0 %	Rees <i>et al.</i> , 1994
PL15	Salinidad con respecto a la dieta	14 ppm	30 minutos	90-100 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989
PL15	Salinidad con respecto a la dieta	14 ppm	60 minutos	90-95 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989
PL15	Salinidad con respecto a la dieta	0 ppm	30 minutos	50-80 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989
PL15	Salinidad con respecto a la dieta	0 ppm	60 minutos	0-20 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989
PL15	Salinidad con Artemia enriquecida	10 ppm	2 horas	100 %	Rees <i>et al.</i> , 1994
PL15	Salinidad con Artemia enriquecida	0 ppm	2 horas	0 %	Rees <i>et al.</i> , 1994

Tabla IV. Continuación.

<i>Penaeus japonicus</i>					
EDAD	PRUEBA DE ESTRÉS Y CONDICION	SALINIDAD	EXPOSICION	SUPERV (%)	REFERENCIA
PL10	Salinidad con dieta de n-3HUFA	14 ppm	30 minutos	40-90 %	Tackaert <i>et al.</i> , 1989

Un efecto que salta a la vista al analizar los experimentos resumidos en la tabla es el efecto de la edad, ya que conforme aumenta la edad de las postlarvas, la sobrevivencia al estrés de salinidad aumenta (Charmantier *et al.*, 1988; AQUACOP *et al.*, 1991; Dhert *et al.*, 1994; Rees *et al.*, 1994; Samocha *et al.*, 1998). Es necesario resaltar que los estadios larvarios no son sometidos a la prueba de estrés de salinidad dado que al inicio de su ciclo de vida (Nauplio, Mysis y Zoea) los camarones son osmoconformadores, ya que la capacidad osmorregulatoria es aún deficiente. Esto se debe a que las branquias, que son las principales estructuras que realizan la osmorregulación no están completamente desarrolladas, ya sea en relación a la falta de ramificación y por ende, el área de intercambio no es suficiente para compensar un cambio osmótico (Rees *et al.*, 1994), o por no tener la maquinaria enzimática necesaria para intercambiar iones con el medio ambiente (Bouaricha *et al.*, 1991). Sin embargo, las postlarvas ya presentan regulación osmótica, lo cual coincide con su entrada en los esteros, que se caracterizan entre otras cosas, por tener salinidades fluctuantes. Por ende, a partir del estadio de postlarva los productores utilizan salinidades cada vez mas bajas, hasta alcanzar niveles de casi 0‰ (agua dulce o de la llave) para las pruebas de estrés en PL15. Charmantier *et al.* (1988) concluyen que la capacidad osmorreguladora incrementa a partir de estadios de PL5-PL6 y llega a un máximo entre PL10-PL15. Por consiguiente, la resistencia a bajas salinidades en larvas y postlarvas tempranas depende de su capacidad para tolerar cambios en la salinidad (osmoconformadores) mientras que en postlarvas de edad mas avanzada dependerá de su capacidad osmorreguladora. Como consecuencia, para realizar una prueba de estrés a baja salinidad, a las postlarvas de edades tempranas (PL1-PL5) se les somete a salinidades entre 15‰ a 20‰ (AQUACOP *et al.*, 1991; Tackaert *et al.*, 1992; Samocha *et al.*, 1998; Hernández-Herrera, 2001) mientras que de PL10 en adelante se exponen a salinidades

mas bajas que van de 0‰ a 10‰ (AQUACOP *et al.*, 1991; Ogle *et al.*, 1992; Rees *et al.*, 1994; Kontara *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 1999; Bonilla, 2001). La metodología utilizada en el presente trabajo concuerda con lo anterior, ya que las PL15 utilizadas fueron sujetas a un estrés de baja salinidad usando agua de la llave, que en el CIBNOR tiene una salinidad menor a 3‰

En algunos trabajos, tales como Tackaert *et al.* (1992), De la Cruz *et al.* (1992), Gallardo *et al.* (1995), Coutteau *et al.* (1996), Palacios *et al.* (1999), Hernández-Herrera (2001), Bonilla (2001) y este estudio, después de someter a las postlarvas a la prueba de estrés a baja salinidad se ha optado por ponerlas en “recuperación”, es decir, en la salinidad original durante unos minutos antes de determinar su sobrevivencia. El objetivo de dicha recuperación, es diferenciar con más claridad entre los organismos muertos y vivos, pues algunos organismos que están vivos pueden permanecer inmóviles a bajas salinidades para ahorrar energía y en consecuencia, considerarse como muertos. Estos organismos generalmente se vuelven a mover después de un tiempo de recuperación. Por ende, el tiempo de recuperación disminuye errores al contar los organismos y mejora el cálculo de la sobrevivencia, lo cual fue demostrado en un trabajo previo (Bonilla, 2001).

Es importante señalar que además de la edad y tiempo de exposición, la sobrevivencia de las postlarvas de camarón a una prueba de estrés de salinidad, tanto si solo la toleran (osmoconformación) o ya osmorregulan, está influenciadas por la condición fisiológica, a su vez afectada por la alimentación (Tackaert *et al.*, 1989; Rees *et al.*, 1994; Coutteau *et al.*, 1996; Kontara *et al.*, 1997; Bonilla, 2001), información genética (Ibarra *et al.*, 1999), condición de los reproductores (Palacios *et al.*, 1999) y

factores fisicoquímicos durante el cultivo de los diferentes lotes de camarón a nivel laboratorio. Es necesario recalcar que en el presente trabajo, las pruebas de estrés a baja salinidad se realizaron con lotes de PL15 cultivados en condiciones similares de alimentación y condiciones fisicoquímicas (Suárez, 2003). Esto nos permitió disminuir la variabilidad resultante de factores externos o ambientales durante la evaluación de la sobrevivencia a las pruebas de estrés a baja salinidad. De esta manera, aunque las condiciones ambientales sean homogéneas se observan diferencias entre los lotes de desoves que muy probablemente se deban a la información genética distinta entre desoves (i.e. maquinaria enzimática, área branquial, etc.) y a la condición de los reproductores. Al respecto, Palacios *et al.* (1999) concluyen que la condición fisiológica de los reproductores se deteriora con el tiempo transcurrido después de la ablación del tallo ocular (ciclo de producción). Al inicio del ciclo de producción, las postarvas producidas presentan una mayor sobrevivencia a la prueba de estrés de salinidad, mientras que al final del ciclo los reproductores aparentemente agotaron su reserva bioquímica o no son capaces de transferir las suficientes reservas para asegurar una buena calidad larvaria, lo cual también se refleja en una menor sobrevivencia a la prueba de estrés de salinidad.

Se ha sugerido que la sobrevivencia a la prueba se debe principalmente a la capacidad osmorreguladora de los organismos (Charmantier *et al.*, 1988; Aquacop, 1991; Rees *et al.*, 1994; Palacios *et al.*, 1999; Racotta *et al.*, en prensa) y ésta depende del grado de desarrollo de la postlarva, por lo que la sobrevivencia es una forma indirecta de evaluar la edad y/o crecimiento de las postlarvas. La capacidad de osmorregulación esta dada por la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, que es uno de los mecanismos más importantes para mantener el balance iónico cuando una postlarva es sometida a

cambios de salinidad. Por ende, esperaríamos que las postlarvas con mayor actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa presenten mayor sobrevivencia ante cambios en la salinidad del medio. En el presente trabajo, para conocer si la actividad osmorreguladora, determinada por la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, se activaba durante la prueba de estrés, primero se comparó la actividad de dicha enzima en distintos lotes de PL15 sometidos a una baja salinidad (agua de la llave, entre 0 y 2‰) o a una salinidad control (salinidad de cultivo, 35‰). Se observó que las PL15 sometidas a una baja salinidad (0‰) presentaban una significativamente mayor actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en comparación con aquellas sometidas a la salinidad de cultivo o control (35‰) ($P = 0.02$, Figura 2). Estos resultados confirman estudios recientes sobre la activación de esta enzima en postlarvas de camarones peneidos (Bonilla, 2001; Racotta *et al.*, en prensa), y que ha sido ampliamente estudiada en crustáceos sometidos a cambios de salinidad en el medio. Adultos del cangrejo *Carcinus maenas* fueron transferido a agua de mar diluida y se observó un incremento en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa de las branquias posteriores (Lucu y Devescovi, 1999). Camarones juveniles (*Penaeus japonicus*) expuestos a la turbidez, incrementaron la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa como una respuesta al desbalance en la presión osmótica por acumulación de sedimento en las branquias (Lin *et al.*, 1992). Sin embargo, Gonçalves *et al.* (1997) en su trabajo con *Macrobrachium olfersii*, observaron que la actividad de dicha bomba decreció un 35% después de que los organismos fueron aclimatados. Además del tiempo de aclimatación, la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa varía en relación a la edad, como concluyó Bouaricha *et al.* (1991), quienes mencionan que la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa es variable en los diferentes estadios y se incrementa en la transición de Mysis a PL, aunque no evaluó la respuesta a medios diluidos. Los cambios en la actividad enzimática es una forma de adaptación de los organismos a diferentes salinidades, para así mantener un balance en

la cantidad de Na^+ dentro y fuera del organismo (Pequeux y Chapelle, 1982; Charmantier *et al.*, 1988; Wilder *et al.*, 2000;). Un balance adecuado permite a los organismos mantener la homeostasis en las células, para que estas sigan funcionando de forma adecuada. Si el organismo no puede mantener dicho balance, esperaríamos que la sobrevivencia estuviera afectada.

En segundo termino, para conocer si la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se encontraba correlacionada con la sobrevivencia a la prueba de estrés, se comparó la actividad de dicha enzima en lotes de PL15 que tuvieron una alta sobrevivencia en comparación con lotes con baja sobrevivencia antes (actividad basal) y después de una prueba de estrés (activación enzimática). Aunque la actividad de dicha enzima fue mayor en las PL15 con mayor sobrevivencia, dicho efecto no alcanzo a ser significativamente diferente (Tabla II). Por otro lado, tampoco hubo una correlación significativa entre sobrevivencia a la prueba de estrés y actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa ya sea en condiciones basales (35‰) o por activación a baja salinidad (0‰). En estudios relacionados en lo cuales el objetivo era analizar en que medida la actividad de esta enzima podía explicar diferencias en la sobrevivencia al estrés en distintas condiciones de alimentación, tampoco se pudo observar una relación directa. Concretamente, la influencia de enriquecimiento de *Artemia* con ácidos grasos altamente insaturados no pudo ser explicada del todo por una influencia directa sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa (Palacios *et al.*, 2002a). En otro estudio, se observó que postlarvas ayunadas tenía una mejor sobrevivencia a la prueba de estrés de salinidad y, sin embargo, esto no se podía explicar por un activación menos eficiente de la Na^+/K^+ -ATPasa (Palacios *et al.*, 2002b).

Además de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, se ha sugerido que la superficie branquial también puede jugar un papel importante en la capacidad osmorregulatoria y por ende en la sobrevivencia a la prueba de estrés por baja salinidad (Rees *et al.*, 1994; Palacios *et al.*, 1999). Bonilla (2001) observó una mayor superficie branquial en PL21 de *Litopenaeus vannamei* que presentaron una alta sobrevivencia comparado con las que presentaron una baja sobrevivencia. En el presente trabajo también se observó esta relación entre las que presentaron alta sobrevivencia ($P = 0.05$, Tabla II), lo cual indica que la capacidad osmorregulatoria es más eficiente por tener una mayor superficie de contacto para el intercambio de iones. Otros resultados que confirman la importancia de esta característica morfológica fueron una mayor área branquial en los organismos que sobrevivieron a la prueba de estrés en comparación con los que se murieron (Tabla I) y una correlación significativa entre área branquial posterior y la sobrevivencia al estrés de salinidad (Tabla III). Una mayor área branquial implicaría una mayor superficie de intercambio de iones, tal como ya se mencionó, pero también un mayor número de bombas de Na^+/K^+ -ATPasa. Por lo anterior es importante analizar no sólo la actividad de esta enzima por unidad de branquia (gramos de tejido o mg de proteína) sino en conjunto con el área branquial total. El análisis conjunto de ambas variables también permitió un mejor entendimiento sobre la importancia de la capacidad osmorregulatoria en la influencia de ácidos grasos sobre la sobrevivencia a la prueba de estrés baja salinidad (Palacios *et al.*, 2002a).

En realidad son las branquias posteriores las que están especializadas en la osmorregulación (Holliday, 1985; Siebers *et al.*, 1985; Thuet *et al.*, 1988; Péqueux, 1995), mientras que las anteriores son usadas principalmente para el intercambio de gases (Henry y Cameron, 1983). Esto es confirmado con el análisis de correlación, dado

que se obtiene una correlación positiva entre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa basal o la sobrevivencia al estrés por baja salinidad únicamente con el área de branquias posteriores pero no de anteriores (Tabla III). Por otro lado, al analizar el área branquial/longitud, las branquias posteriores son mas grandes en las PL15 con alta sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad ($P = 0.05$), pero no hubo diferencia para branquias anteriores. Dado que el área braquial posterior se correlacionó significativamente con la longitud de las postlarvas, es importante señalar que la corrección por longitud se realizó para poder eliminar el efecto del tamaño de las postlarvas que se discutirá mas adelante. De esta manera los efectos significativos obtenidos a nivel de área/longitud se deben exclusivamente al área misma y no al tamaño de los organismos.

Además de las variaciones para aplicar la prueba de estrés de salinidad en postlarvas de camarón que se observan entre distintos estudios, hasta la fecha la utilidad de dicha prueba en términos de su relación con el desempeño en cultivo (crecimiento y sobrevivencia en engorda) no ha sido claramente demostrada (AQUACOP *et al.*, 1991; Fegan, 1992; Samocha *et al.*, 1998). Esto se contrapone con la propuesta de usar la prueba de estrés de salinidad para decidir si las postlarvas están listas para la siembra (Clifford, 1992; Fegan, 1992). Uno de los trabajos en los que se consideró dicho punto fue el de AQUACOP *et al.* (1991), quienes mencionan que postlarvas de *Penaeus monodon* que sobrevivieron a la prueba de estrés de salinidad presentaron mejor crecimiento durante el cultivo en estanques, aunque en su investigación no presentaron un análisis estadístico para dar peso a dicha aseveración. Pérez-Rostro *et al.* (1999) mencionan que en el laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR (mismo donde se realizo el presente trabajo) no se ha podido obtener una correlación entre la

sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad en postlarvas y el desempeño de los organismos en las sobrevivencias durante la siembra y engorda. En el presente trabajo, la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad en PL15 de *Litopenaeus vannamei* no se correlacionó significativamente con la sobrevivencia de PL15 a la siembra o con la sobrevivencia durante cultivo hasta juveniles (engorda) (Tabla III). Sin embargo, cuando los datos fueron analizados en relación a los lotes de PL15 con alta y baja sobrevivencia a la prueba de estrés, se observó que los lotes con alta sobrevivencia presentaban una mayor sobrevivencia a la siembra (81% vs. 75%) y durante la engorda (71% vs. 63%; Tabla II). En condiciones comerciales, la postlarvas con baja sobrevivencia a la prueba de estrés se dejan en los tanques de cultivo larvario hasta que pasen varios días para ser trasladadas a la siembra. Como se discutió anteriormente, dado el incremento de la capacidad osmorregulatoria con la edad, dichas postlarvas podrían llegar a incrementar su desempeño.

Cabe resaltar que a nivel experimental, la prueba de estrés de salinidad si ha sido usada como un indicador predictivo del desempeño de las postlarvas durante el cultivo en condiciones controladas. Por ejemplo, se ha reportado que existe una correlación entre la tolerancia al estrés de salinidad en estadios de postlarva tempranos (PL2 o PL10) y la sobrevivencia a estadios posteriores de postlarvas (Rees *et al.*, 1994; Hernández-Herrera, 2001). Sin embargo, cabe resaltar que los lotes de las PL15 que tuvieron una alta sobrevivencia a la prueba de estrés tuvieron menor sobrevivencia durante el cultivo larvario hasta PL15. Este tipo de relación ya había sido observada anteriormente por Hernández-Herrera (2001), quien encontró una correlación negativa entre la prueba de estrés de salinidad en PL20 y la sobrevivencia en cultivo de nauplio a PL1. Una posible explicación es el efecto de densidad de cultivo hasta PL15.

El efecto de densidad tiene un efecto negativo en la sobrevivencia de las larvas durante el cultivo, ya que varios autores mencionan que una alta densidad produce competencia por espacio y alimento y los desechos de los camarones tienen efectos negativos al interactuar con los factores ambientales (oxígeno disuelto, amonio, pH, nitritos) (Hopkins *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1996; Palomino *et al.*, 2001). La competencia y los ajustes por los que tiene que pasar los organismos pueden incluir mecanismos asociados con el metabolismo energético del camarón y pueden interferir con el crecimiento de los animales (Rosas *et al.*, 1999). Como consecuencia, las larvas y postlarvas no crecen y tienen una alta mortalidad. Si en un lote de organismos cultivados a altas densidades la mayor parte muere, la densidad disminuye y los organismos restantes pueden crecer más. Esto se confirma en el presente trabajo, donde la sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad de las PL15 estuvo correlacionada significativamente con las variables morfométricas de PL15; las que tuvieron mayor sobrevivencia a la prueba de estrés presentaron una longitud mayor. Esto también se ha observado en estudios previos como los de Palacios *et al.* (1999) y Racotta *et al.* (en prensa) donde las postlarvas de mayor tamaño son más resistentes a la prueba de estrés. Cabe resaltar que los lotes de organismos tenían la misma edad, por lo que el efecto positivo de tamaño no es comparable al efecto de una mayor capacidad osmorregulatoria en organismos de mayor edad, considerado antes. Otra posible explicación es la presentada por Palacios *et al.* (1999), quienes mencionan que los organismos más grandes tienen mayor sobrevivencia por presentar mayor desarrollo en el área branquial, lo cual ya se discutió anteriormente.

CONCLUSIONES

- Las postlarvas de camarón de edad de 15 días expuestas a un estrés de baja salinidad (0‰) incrementaron la actividad total de la Na^+/K^+ -ATPasa activa. Esto indica que las postlarvas de 15 días de edad ya presentan capacidad osmorreguladora. Sin embargo, la actividad de esta enzima no explica la diferencia de sobrevivencia entre lotes a la prueba de estrés de baja salinidad
- Las postlarvas mas grandes presentan una mayor área branquial, y por ende sobreviven mejor a la prueba de estrés, aunque la sobrevivencia a la prueba de estrés tiene una relación con el área branquial independientemente del tamaño de los organismos.
- Se observa que el efecto de densidad que se presenta en los diferentes estadios influye en los resultados de las sobrevivencias ante la prueba de estrés, probablemente por afectar el crecimiento de los organismos.
- Los lotes con alta sobrevivencia a la prueba de estrés a baja salinidad tuvieron valores más altos de sobrevivencias a la siembra y engorda, aunque las correlaciones entre estas variables no fueron significativas.
- Estos resultados indican que la prueba de estrés de baja salinidad si puede ser un indicador predictivo del desempeño posterior de los organismos en cultivo.

ANEXO 1

Actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa (Método modificado de Holliday, 1985).

Soluciones

Buffer de Homogenización: 250 mM sacarosa, 6 mM EDTA, 50 mM Buffer Tris a pH 7.2. Nota: Dado el pH ácido que le confiere el EDTA a la solución, sólo se usó Trizma base (sin Tris.HCl) para obtener el pH final de 7.2.

- 1) Medio de Incubación + K: 167 mM NaCl (1.948 g), 50 mM KCl (0.744 g), 30 mM Buffer Tris (Trizma base + Tris.HCl) a pH 7.2.
- 2) Medio de Incubación -K: 217 mM NaCl, 30 mM Buffer Tris (Trizma base + Tris.HCl) a pH 7.2, 1.67 mM Oabaina.
- 3) Solución ATP/Mg: 25 mM Na_2ATP , 50 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- 4) Reactivo de Vanadomolibdato. 8 mM Metavanadato de amonio, 3.2 mM Molibdato de amonio en ácido perclórico al 22.5% (v/v)

Por problemas de solubilidad, este reactivo se prepara por partes de siguiente manera:

Solución A: 45 ml de Ácido perclórico y aforar a 100 ml con agua desnionizada.

Solución B: 0.2 g Metavanadato de amonio y aforar a 50 ml con agua desionizada tibia.

Solución C: 0.8 g Molibdato de amonio y aforar a 50 ml con agua desionizada.

Las soluciones se mezclan en el siguiente orden: Preparar la solución C, e inmediatamente agregar la solución B, una vez disueltas estas dos soluciones, se le agrega lentamente la solución A en agitación.

Procedimiento.

- Preparación del homogenizado.

Disección de las branquias anteriores y posteriores en frío, (hasta alcanzar 10 a 20 mg de peso húmedo) removiendo el exoesqueleto del cefalotórax evitando romper el hepatopáncreas y el ganglio cerebral para evitar la contaminación por la presencia de enzimas proteolíticas. Almacenar las branquias a una temperatura de -70°C para minimizar la pérdida de actividad enzimática.

Liofilizar las branquias durante 24 horas, posteriormente triturarlas con una espátula.

- Actividad Na^+/K^+ -ATPasa.

. A cada muestra añadir 0.5 ml de buffer de homogenización y agitar en vortex.

. Por cada muestra homogenizada se preparan dos tubos para los dos medios de incubación, añadiendo 100 μl del homogenizado a una temperatura de 4°C .

. A la primera y segunda serie de tubos agregar 300 μl del medio +K y 300 μl del medio -K respectivamente.

. Colocar las series de tubos en un baño termorregulado a 28°C por 5 minutos.

. Iniciar la reacción agregando a ambas series 100 μl de ATP/Mg e incubar exactamente 15 minutos cada muestra.

- . Detener la reacción agregando a ambas series 200 μl de reactivo de vanadomolibdato y poner en baño de hielo.
- . Centrifugar a 3600 rpm a 4°C durante 10 minutos.
- . Utilizar como blanco 200 μl de reactivo de vanadomolibdato y 500 μl de agua desionizada.
- . Leer absorbancia a 415 nm.

Calculos.

Para calcular su concentración se realiza una curva patrón de fósforo partiendo de concentraciones de 0.2062, 0.4125, 0.825, 1.65, 2.3, 4.6, 9.2, 18.4 $\times 10^{-2}$ μM de fósforo.

La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se determino como actividad total (AT) (μM P liberado/g x hora)

$$\text{AT} = \text{dif} (-\text{K}/+\text{K}) \times 4 \times 5 / \text{PCT} \times \text{Pm}.$$

Donde:

$\text{dif} (-\text{K}/+\text{K})$ = Diferencia de absorbancia entre los dos medios de incubación.

PCT = Pendiente de la curva tipo de fósforo

Pm = Peso de la muestra.

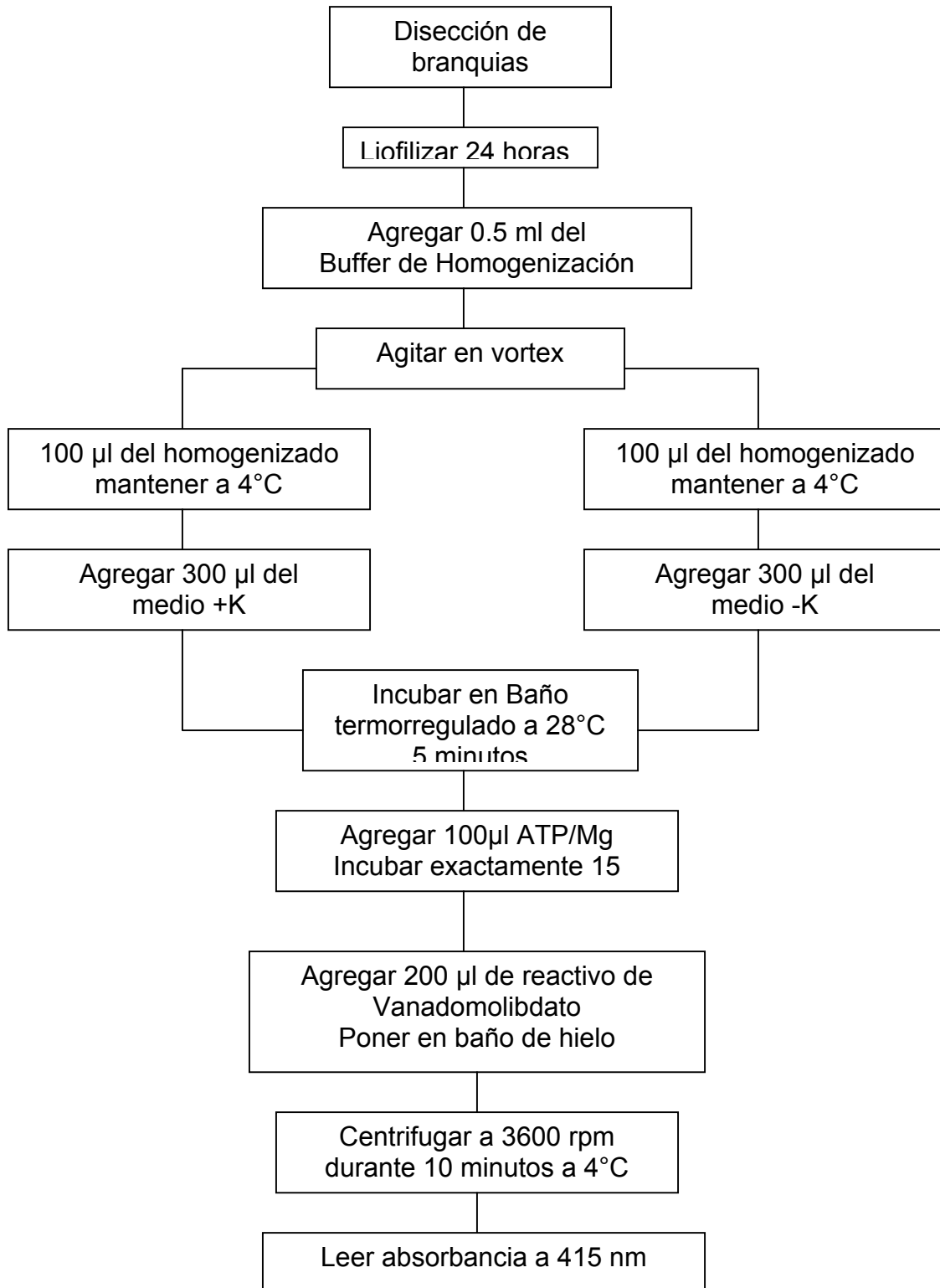
El factor 4 es para extrapolar la actividad a 1 hora, considerando que se incubo durante 15 minutos.

El factor 5 se multiplico debido a que se utilizaron 100 μl de un homogenizado total de 0.5 ml.

Fundamentos.

La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se mide como la diferencia del fosfato liberado en un medio con $+\text{K}$ y otro en ausencia de este ion $-\text{K}$. La ouabaina es un inhibidor específico de la actividad de la bomba que se adiciona al medio $-\text{K}$. El ATP actúa como el sustrato y el ion Mg^{2+} como cofactor de la bomba. El reactivo de vanadomolibdato detiene la actividad de la ATPasa por ser un ácido y reacciona con el fósforo liberado.

Procedimiento



ANEXO 2



Figura 3. Fotomicrografía de contraste de fases de branquias anteriores de PL15 de *Litopenaeus vannamei*. Aumento 40 X.



Figura 4. Fotomicrografía de contraste de fases de una branquia anterior de PL15 de *Litopenaeus vannamei*. Aumento 40 X.



Figura 5. Fotomicrografía de contraste de fases de una branquia posterior de PL15 de *Litopenaeus vannamei*. Aumento 40 X.



Figura 6. Fotomicrografía de contraste de fases de una branquia posterior de PL15 de *Litopenaeus vannamei*. Aumento 40 X.

REFERENCIAS

- Arcos, F., Ibarra, A.M, Vazquez-Boucard, C., Palacios, E., Racotta, I.S. . En prensa.
Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp
Litopenaeus vannamei: egg quality and female physiological condition.
Aquaculture.
- Aquacop, Le Moullac, G. and Damez, D., 1991. Modélisation de la résistance au chocs de
salinité des postlarves de *Penaeus vannamei*. Aquat. Living Resour. 4, 169-173.
- Baumann, R.G.H. and D. Jamandre.1990. A practical method for determining quality of
Penaeus monodon (Fabricius) fry for stocking in grow out ponds. Proceedings of
the Aquatech conference Technical and economic aspects of shrimp farming. Publ.
INFOFISH. Kuala Lumpur.
- Bayne, B.L., 1975. Aspects of physiological condition in *Mytilus edulis* L., with respect of
the effects of oxygen tension and salinity. Proc. Ninth Eur. Mar. Biol., 213-238.
- Benzie, J.A.H., 1997. A review of the effect of genetics and environment on the
maturation and larval quality of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*.
Aquaculture 155, 69-85.

- Bonilla. 2001. Pruebas de estrés de baja salinidad en postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*: Relación con mecanismos de osmorregulación y asociación con la condición fisiológica. Tesis Maestría. CIBNOR.
- Bouaricha, N., Thuet, P., Charmantier-Daures, M. and Trilles, J.P. 1991. Na⁺-K ATPase and carbonic anhydrase activities in larvae, postlarvae and adults of the shrimp *Penaeus japonicus* (Decapoda, Penaeidea). *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A: 433-437.
- Bray, W.A. and Lawrence, A.L., 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: Fast, A.W. and Lester, J.L., (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, Amsterdam, pp. 93-170.
- Browdy, C. L., 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspective on controlled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In: Wyban, J., (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, World Aquaculture Society, Baton Rouge. pp 22-51.
- Castille, F.L., Samocha, T.M., Lawrence, A.L., Frelie, P., Jaenike, F. 1993. Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931). *Aquaculture*. 113:65-81.

- Cavalli, R.O., E. Vanden Berghe, P. Lavens, T.T.N. Thy, M. Wille and P. Sorgeloos. 2000. Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobranchium rosenbergii*. *Comp. Biochem Physiol* 125C:333-343.
- Chapelle, S., Zwingelstein, G. 1984. Phospholipid composition and metabolism of crustacean gills as related to changes in environmental salinities: relationship between Na⁺/K⁺-ATPase activity and phospholipids. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B(2): 363-372.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Bouaricha, N., Thuet, P., Aiken, D.E. and Trilles, J.P., 1988. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two Decapod Crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *Biol. Bull.* 175, 102-110.
- Clifford, H. C., 1992. Marine shrimp pond management: a review. In: Wyban, J., (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, World Aquaculture Society, Baton Rouge*, pp 110-137.
- Coutteau, P., Camara, M.R. and Sorgeloos, P., 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., Geurden, I., Camara, M. R., Bergot, P., Sorgeloos, P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larvae. *Aquaculture*, 155: 149-164.

De la Cruz, A.S.1992. Prueba de resistencia a baja salinidad de postlarvas de *Penaeus shmitti*, *Rev. Inv. Mar.*, 13:152-158

Dhert, P., Laurens, P., Sorgeloos, P. 1992. Stress evaluations a tool for quality control of hatchery-produced shrimp and fish fry. *Aquaculture Europe*. 17: 6-10.

Duran-Gómez, R., Rodríguez, J.M., and Morales, J., 1991. Stress-test:a practical tool to control postlarval shrimp quality. En: Lavens, P, Sorgeloos, P., Jaspers, E., and Ollevier, E. (Editores), *Larvi 91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium* Ghent, Belgium, pp. 358-360.

Eckert, R. 1990. *Fisiología animal: Mecanismos y adaptaciones*. 3ª. Edición. Interamericana, México. 680 pp.

FAO (2001) *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca*. Pacífico Centro-Oriental, vol. I, 156-163.

Fegan, D. F., 1992. Recent developments and issues in the Penaeid shrimp hatchery industry. In: Wyban, J., (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 55-70.

Gallardo, P.P., Alfonso, E., Gaxiola, G., Soto, L.A. and Rosas, C., 1995. Feeding schedule for *Penaeus setiferus* larvae based on diatoms (*Chaetoceros ceratosporum*), flagellates (*Tetraselmis chuii*) and *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 131, 239-252.

Gonçcalves, A. L., McNamara, J. C., Ribeiro, W. T. 1997. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na⁺/K⁺-ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Weigmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 215: 81-91.

Henry, R.P., Cameron, J.W. 1983. The role of carbonic anhydrase in respiration, ion regulation, and acid-base balance in the aquatic crab *Callinectes sapidus* and the terrestrial crab *Gecarcinus lateralis*. *J. Exp. Biol.*, 103: 205-223.

Hernández-Herrera, R., Perez-Rostro, C. I., Arcos, F., Ramírez, J. L., Ibarra, A. M., Palacios, E., and Racotta, I. S., 2001. Predictive criteria of shrimp larval quality: an experimental approach. In: Hendry, C.I., Van Stappen, G., Wille, M. and Sorgeloos, P., (Eds), *Larvi 2001 Fish & Crustacean Larviculture Symposium*, Ghent, Belgium. pp. 242-245.

Hernandez-Herrera, R. 2001. Indicadores bioquímicos-fisiológicos de calidad larvaria y postlarvaria de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis Maestría. CIBNOR, 96 pp.

Holliday, C.W. 1985. Salinity-induced changes in gill Na,K-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. J.Exp.Zool., 233: 199-208.

Hopkins, J.S., Sandifer, P.A., Browdy, C.L., Holloway, D.J. 1993. Comparison of exchange and no-exchange water management strategies for the intensive pond culture of marine shrimp. Journal of Shellfish Research. 15:441-445.

Ibarra, A. M., Palacios, E., Perez-Rostro, C. I., Ramírez, J. L., Hernández-Herrera, R., and Racotta, I. S., 1998. Effect of family variance for resistance to low oxygen and low salinity of pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, postlarvae.

Ibarra, A. M., Ramírez, J. L., Ruiz, C. A., Cruz, P., Avila, S. 1999. Realized heritabilities and genetic correlation after dual selection for total weight and shell width in catarina scallop (*Arcopecten ventricosus*). Aquaculture, 175(3-4):227-241.

Kontara, E., Coutteau, P. and Sorgeloos, P., 1997. Effect of dietary phospholipids for an incorporation of n-3 highly unsaturated fatty acids in postlarval *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture 158, 305-320.

Kawahigashi, D. 1992. A survey of commercial maturation technology in the western hemisphere. Wyban, J. (Editor). Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA. 55-70 p.

- Lignot, J.H., Spanings-Pierrot. C., Charmantier, G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect to stress in crustaceans. *Aquaculture*, 191:209-245.
- Lin, Hui-Peng., Charmantier, G., Thuet, P., Trilles, Jean-Paul. 1992. Effects of turbidity on survival, osmoregulation and gill Na^+/K^+ -ATPase in juvenile shrimp *Penaeus japonicus*. *Marine Ecology Progress Series*. 90: 31-37.
- Lucu, C., Devescovi, M. 1999. Osmoregulation and branchial Na^+/K^+ -ATPase in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to dilute seawater. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 234: 291-304.
- Martinez-Cordova, L.R. 1999. Cultivo de camarones peneidos: principios y practicas. AGT Editores, México. 100 pp.
- Ogle, J. T., Beugez, K., Lotz, J. M. 1992. Effects of salinity on survival and growth of postlarval *Peneus vannamei*. *Gulf Research Reports*. 8(4): 415-421.
- Paibulkichakul, C., Piyatiratitivorakul, S., Kittakoop, P., Viyakarn, V., Fast, A.W. and Menasveta, P., 1998. Optimal dietary levels of lecithin and cholesterol for black tiger prawn *Penaeus monodon* larvae and postlarvae. *Aquaculture* 167, 273-281.

- Palomino, G., Contreras, F., Sánchez, A., Rosas, C. 2001. Density and water exchange dependent growth and survival of *Litopenaeus setiferus* Postlarvae. Journal of the World Aquaculture Society. 32(2):167-176.
- Palacios, E., Pérez-Rostro, C.I., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M. and Racotta, I.S., 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival, and growth. Aquaculture 171, 209-221.
- Palacios, E., Bonilla, A., Pérez, A., and Racotta, I.S., 2002a. Effect of different levels of PUFA on osmoregulatory mechanisms in *Penaeus vannamei* postlarvae. World Aquaculture 2002, Beijing, China p. 578
- Palacios, E., Bonilla, A. Luna, D. and Racotta, I.S., 2002b. Survival to a salinity stress test and osmoregulatory responses in fasted and fed *Penaeus vannamei* postlarvae. World Aquaculture 2002, Beijing, China p. 577
- Pérez-Rostro, C. I., Ramírez, J. L., Ibarra, A. M. 1999. Maternal and cage effects on genetic parameter estimation for Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Aquaculture Research. 30(9): 681-693.
- Pequeux, A., Chapelle, S. 1982. (Na⁺/K⁺)-ATPase activity and phospholipid in two euryhaline crabs as related to changes in the environmental salinity. Marine Biology Letters. 3: 43-52.

- Pequeux, A. 1995. Ultrastructure of the branchial epithelium of the green crab *Carcinus maenas* as a function of the salinity of the environment. 3rd annual meeting of the Societe de Biologie Cellulaire de France, Toulouse, France. Biol. Cell. 54(3).
- Racotta, I. S., Palacios, E., and Ibarra, A. M., en prensa. Shrimp larval quality as a function of broodstock condition: A review. Aquaculture.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Hernández-Herrera, R., Bonilla, A., Perez-Rostro, C.I., Ramírez, J.L., en prensa. Criteria for assessing larval and postlarval quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931).
- Ramírez, J. L., Ávila, S. and Ibarra, A. M. 1999. Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of a continuous, low-food concentration, agricultural drip system. Aquat. Eng., 20: 175-189.
- Rees, J.F., Cure, K., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P. and Menasveta, P., 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. Aquaculture 122, 193-207.
- Rosas, C., Ocampo, L., Gaxiola, G., Sánchez, A. and Soto, L.A., 1999. Effect of salinity on survival, growth, and oxygen consumption of postlarvae (PL10-PL21) of *Litopenaeus setiferus*. Journal of crustacean biology. 19(2):244-251.

- Samocha, T.M., Guajardo, H., Lawrence, A.L., Castille, F.L., Speed, M., Mckee, D.A. and Page, K.I., 1998. A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture* 165, 233-242.
- Siebers, D., Winkler, A., Lucu, C., Thedends, G., Weichart, D. 1985. Na-K-ATPase generates an active transport potencial in the gills of the hyperregulating shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.*, 87:185-192.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1981. *Biometry the principles and practice of statistics in biological research*. W. F. Freeman and Company. New York. 859 pp.
- Suárez, J. M. 2003. Evaluación de la interacción genotipo-medio ambiente en el crecimiento de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 99 pp.
- Tackaert, W., Abelin, P., Dhert, P., Léger, P., Grymonpré, D., Bombeo, R., and Sorgeloos, P., 1989. Stress resistance in postlarval penaeid shrimp reared under different feeding procedures. *J. World Aquacult. Soc.* 20, 74A.
- Thuet, P., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G. 1988. Relation entre osmoregulation et activités d'ATPase Na⁺K⁺ et d'anhydrase carbonique chez larves et postlarves de *Homarus gammarus* (L.) (Crustacea: Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 115:249-261.

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

Wilder, M. N., Thi Thanh Huong, D., Atmomarsono, M., Thi Thanh Hien, T., Quoc Phu, T., Yang, Wei-Jun. 2000. Characterization of Na^+/K^+ -ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. 125: 377-388.

Williams, A.S., Davis, D.A., Arnold, C.R., 1996. Density-dependent growth and survival of *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* in a semi-closed recirculation system. Journal of the World Aquaculture Society. 27:107-112.

Wouters, R., Vanhauwaert, A., Naessens, E., Pedrazzoli, A. and Lavens, P., 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.