



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE UN EXTENSOR PARA EL
ESPERMA DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO
Penaeus (Litopenaeus) vannamei PARA SU
ALMACENAMIENTO A CORTO PLAZO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
KARINA MORALES UENO

TUTOR
HUGO HORACIO MONTALDO VALDENEGRO

COMITÉ TUTORAL
HÉCTOR CASTILLO JUÁREZ
CARMEN GUADALUPE PANIAGUA CHÁVEZ

MÉXICO D.F.

2009



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 gran amor, compañero, cómplice y amigo Gaspar, por ser parte importante en el logro de mis metas profesionales. Gracias por haber sido mi fuente de inspiración en mi deseo de proseguir con mi formación profesional.

Agradecimientos

Dr. Hugo Montaldo: Gracias por su tiempo, paciencia y experiencia académica; por mostrarme la luz en momentos de tormentosa oscuridad en el camino de la investigación y por recibirme siempre con una gran sonrisa y disposición para brindar sus conocimientos.

Dr. Héctor Castillo: Me faltan palabras para expresarle mi agradecimiento, admiración y cariño. Gracias por el apoyo brindado en cada paso del camino, por sus consejos, los momentos de enseñanza y por ser parte fundamental en mi formación desde el inicio.

Dra. Carmen Paniagua: Doy gracias a Dios por haberme permitido conocerla y por haber aceptado ser mi guía en este hermoso camino de la investigación. Es un gran ejemplo a seguir, la admiro, la respeto y la llevo en mi corazón.

Ingenieros Cesáreo Cabrera y Juan Carlos Quintana: Gracias por el financiamiento y apoyo incondicional brindado durante todas las fases del proyecto, y por la confianza depositada en mi persona.

Gracias a los miembros del Jurado, Dr. Carlos Galina, Dr. Mauricio Valencia, Dr. Alfredo Medrano y Dr. Gabriel Campos por su tiempo, atención y apoyo.

Al fantástico personal que labora en Maricultura del Pacífico, S.A. de C.V. Ha sido todo un honor el que me permitieran aprender y trabajar con Ustedes, espero tengamos oportunidad de repetirlo en el futuro.

A todos mis Profesores, quienes me inculcaron el amor hacia la Profesión y de quienes aprendí lo bueno para seguir su ejemplo y me señalaron lo malo, para mejorar día a día.

A mis familiares y amigos por ayudarme a crecer y madurar como persona y por apoyarme en todas las circunstancias posibles.

Al pueblo de México, cuya contribución tributaria hizo posible que el CONACYT me asignara la beca para llevar a cabo esta Maestría. Gracias México.

Resumen

El objetivo de este estudio fue desarrollar y evaluar un extensor para la conservación a corto plazo del espermatozoide de *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, y su uso en la inseminación artificial (IA). Con base en la integridad de la membrana celular de los espermatozoides, se evaluó la sobrevivencia espermática utilizando 3 extensores: agua de mar artificial libre de calcio (ASW), una solución balanceada de Hank con calcio (HBS2) y otra libre de calcio (HBS1), observando mejores resultados al emplear ASW. Para el análisis se usó un modelo lineal mixto y un modelo logístico que mostraron que el porcentaje (error estándar) de gametos sobrevivientes con ASW fue 91.6 (30) y que éste no fue diferente de HBS1 79.6 (31.4) ($P>0.05$), pero sí de HBS2 59.5 (30) ($P<0.05$). La sobrevivencia con ASW fue 7.5 veces mayor que HBS1 y 10 veces mayor que HBS2 ($P=0.0065$), respectivamente. Se realizaron dos experimentos para comparar la producción de nauplios con el empleo del extensor seleccionado. El primero comparó dos tratamientos: el espermatozoide de medio espermático diluido en ASW, y el espermatozoide de medio espermático sin diluir, obteniendo para ambos casos una relación de hembras inseminadas por macho de 4:1. El análisis reveló que el tratamiento utilizando medio espermático diluido con ASW produjo más nauplios, con una media (desviación estándar) de 11915 (630) que medio espermático sin diluir 2159 (1471) ($P=0.0086$); en relación a la variable binaria éxito por hembra para la obtención de nauplios, se observó que por cada hembra que produjo nauplios con el tratamiento sin extensor 4.9 lo hicieron con el tratamiento con extensor, con un éxito de 82.9% al usar el tratamiento con extensor. El segundo experimento comparó tres tratamientos: espermatozoide sin diluir de un espermático (MP), igual a MP pero agregando ASW como humectante (E1), y espermatozoide diluido de medio espermático con ASW (D1), obteniendo de esta manera relaciones macho-hembra de 1:2 (MP y E1) y de 1:4 (D1). Se observaron diferencias marginales entre los tres tratamientos (MP, D1 y E1) para el número de nauplios producidos ($P=0.0992$), obteniéndose una media (desviación estándar) de 5388 (102) para MP, 102 (129) para E1 y 21 (90) para D1. Se concluye que el uso de ASW con

medio espermátforo permitió incrementar el número de hembras inseminadas por macho, llegándose a obtener descendencia con 4 hembras diferentes del mismo macho, con un promedio (error estándar) de número hembras fertilizadas por macho de 3.43 (0.76).

Abstract

The aim of this study was to develop and evaluate an extender solution for short-term storage of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* sperm to be used in artificial insemination (AI). The sperm survival percentage was evaluated assessing sperm membrane integrity for 3 different extenders, calcium free artificial sea water (ASW), Hank's balanced solution with calcium (HBS2), and calcium free Hank's solution (HBS1), obtaining better results with ASW. Data were analyzed using mixed linear models and logistic models, showing that sperm survival percentage (standard error) using ASW was 91.6 (30), and did not differ from HBS1 79.6 (31.4) ($P>0.05$), but was different from HBS2 59.5 (30) ($P<0.05$). Sperm survival using ASW was 7.5 times larger than that of HBS1 and it was 10 times larger than HBS2 ($P=0.0065$).

To assess nauplii production using ASW extender, 2 experiments were performed. The first experiment compared two treatments: sperm from half spermatophore (1) diluted with ASW and (2) undiluted, to inseminate four females per male in both treatments. Results showed that diluted semen yielded more nauplii than undiluted semen, with a mean (standard deviation) of 11915 (630) vs. 21589 (1471), respectively ($P=0.0086$). Female success for nauplii production was 4.9 times larger for diluted than undiluted treatment with 82.9% success when ASW was used. The second experiment compared 3 treatments: undiluted sperm mass from one spermatophore (MP), same as MP but pouring ASW on it as a humectant (E1), and half sperm mass diluted on ASW (D1), to be used in two different AI male:female ratios 1:2 (MP/E1), and 1:4 (D1). Marginal differences between treatments (MP, D1 y E1) were observed for nauplii yielded ($P=0.0992$), with a mean (standard deviation) of 5388 (102) for MP, 102 (129) for E1, and 21 (90) for D1. Using half spermatophore diluted with ASW allowed us to increase the number of females inseminated per male. It was possible to obtain nauplii from four different females per male in almost 86% of the cases, with a mean (standard error) of 3.43 (0.76) fertilized females per male.

Contenido

1.	Introducción	1
2.	Revisión de Literatura	4
2.1.	Hábitat y biología	4
2.2.	Situación de la camaronicultura	4
2.3.	Suministro de postlarva para los sistemas de producción	5
2.4.	Importancia de la Inseminación Artificial	6
2.5.	Del semen y el esperma	7
2.6.	Uso de la inseminación artificial en acuicultura	7
2.1.	Manejo del germoplasma	8
3.	Material y Métodos.....	11
3.1.	Estudio preliminar.....	11
3.2.	Fase experimental.....	16
3.3.	Experimento 1. Inseminación artificial con y sin extensor utilizando medio espermatóforo	18
3.4.	Experimento 2. Inseminación artificial utilizando distintos métodos	20
4.	Resultados.....	23
4.1.	Estudio preliminar.....	23
4.2.	Experimento 1. Inseminación artificial con y sin extensor	25
4.3.	Experimento 2. Inseminación artificial utilizando distintos métodos	26
5.	Discusión	28
5.1.	Estudio preliminar	28
5.2.	Fase experimental.....	29
5.3.	Experimento 1. Inseminación artificial con y sin extensor	30
5.4.	Experimento 2. Inseminación artificial utilizando distintos métodos	31
6.	Conclusiones	33
7.	Bibliografía	34

Lista de cuadros

Cuadro 1. Composición de las soluciones seleccionadas1.....	13
Cuadro 2. Orden de asignación de los tratamientos.....	14
Cuadro 3. Número de hembras inseminadas por tratamiento y por día.....	18
Cuadro 4. Número de hembras inseminadas por tratamiento y por día.....	21
Cuadro 5. Presión osmótica (mmol/kg) de las soluciones empleadas.....	23
Cuadro 6. Gametos viables obtenidos para la selección del extensor.....	24
Cuadro 7. Resultados para obtención de gametos viables usando modelo logístico.....	24
Cuadro 8. Nauplios obtenidos para Experimento 1.....	25
Cuadro 9. Resultados para obtención de nauplios usando modelo logístico.....	25
Cuadro 10. Nauplios obtenidos para Experimento 2.....	26
Cuadro 11. Resultados para obtención de nauplios usando modelo logístico.....	26

Lista de figuras

Figura 1. Espermatozoides de <i>P. vannamei</i>	9
Figura 2. Vista de gametos.....	15
Figura 3. Detalle del tético, 4º y 5º par de periódodos plegados caudalmente.....	1

1. Introducción

El camarón blanco del Pacífico *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, es una de las especies de camarón más cultivados en el mundo y una de las más rentables (FAO, 2009). En México, la producción anual nacional total de camarón es de 132 mil toneladas, y la mayor aportación (70%) proviene del cultivo. La camaronicultura en México ha crecido a una tasa media anual aproximada de 10 por ciento en los últimos 10 años y se estima que ésta será similar para el año 2009 (SAGARPA, 2009). Esta especie presenta características favorables para el cultivo, como crecimiento rápido en diversas densidades de siembra, flexibilidad en sus requerimientos proteicos, alta tasa de sobrevivencia y tolerancia a un amplio margen de salinidad (Muncy, 1984; Mente et al., 2002; Davis et al., 2004; Araneda et al., 2008). Además, posee fertilización externa de sus huevos, masa espermática con propiedades adherentes y volumen limitado de esperma (Heitzmann et al., 1993; Yano et al., 1997). Tales particularidades han dificultado el desarrollo y la implementación de técnicas de reproducción asistida que son comunes en algunas especies acuáticas, como la preservación de gametos o el uso de extensores para la conservación a corto plazo (unos pocos días) o largo plazo (varios meses o años) (Gwo, 2000).

Para llevar a cabo la inseminación artificial (IA) a partir de alícuotas de esperma preservado, uno de los primeros pasos técnicos a resolver es el desarrollo de un método que permita la conservación del esperma, es decir, la elaboración de una solución, conocida como extensor, que permita la suspensión de las células espermáticas. Los estudios sobre el uso de extensores en el semen se iniciaron en mamíferos (Foote, 2002) y la tecnología generada se ha ido transfiriendo con el paso de los años al esperma de diversas especies acuáticas (Christensen y Tiersch, 1997; Billard et al., 2004; Szabo et al., 2005). No obstante, pocos estudios han abordado el uso de extensores en el esperma de los camarones y la mayoría de los estudios sobre el esperma en el *P. vannamei* se han centrado en su almacenamiento a corto plazo para fines de conteo (Alfaro y

Lozano, 1993; Bray y Lawrence, 1998), evaluación de su calidad (Ceballos Vázquez et al., 2003; Lezcano et al., 2004) revisión de estructuras internas (Wang, 1995) y en el desarrollo de técnicas de criopreservación (Nimrat et al., 2006).

En algunas especies de camarones (*P. vannamei*, *P. monodon*) se han realizado suspensiones del esperma con el objetivo de llevar a cabo conteo espermático (Lezcano et al., 2004; Bart et al., 2006). Después del trabajo realizado por Bray y Lawrence (1998) no se han publicado trabajos donde se utilice semen de *P. vannamei* conservado a corto plazo con propósitos distintos al de conteo espermático, a pesar de haber sugerido estos autores que el procedimiento podría asociarse con algún proceso de IA.

Por otro lado, respecto a la implementación de la técnica de IA en el *P. vannamei*, se sabe que algunos laboratorios productores de larvas en México, Colombia y Ecuador han desarrollado sus propios métodos dentro del contexto de los núcleos genéticos para producir familias de hermanos y medios hermanos, basándose en la técnica descrita por Arce et al. (2000), utilizando esperma fresco (Castillo-Juárez et al., 2007), y también se ha experimentado la fertilización *in vitro*, pero en todos estos casos de IA se ha utilizado sólo esperma fresco, sin adición de ningún tipo de extensor (Misamore y Browdy, 1997; Rojas y Alfaro, 2006).

Para el caso de *P. vannamei*, se requiere elaborar extensores que no sólo permitan la conservación a corto plazo del esperma, sino que también sirvan como diluyentes al aumentar el volumen de la muestra (para facilitar su manejo) y eviten su contaminación bacteriana y fúngica al agregársele antibióticos y antimicóticos. El volumen añadido al esperma cuando se adiciona el extensor podría permitir aumentar el número de hembras fertilizadas inseminadas por macho.

Antes de realizar la técnica de IA, es recomendable determinar la calidad del semen en una muestra de la población, pero la determinación de la calidad de semen en el *P. vannamei* es difícil. En peces, la calidad se determina por

medio de su densidad y motilidad, pero los espermatozoides del *P. vannamei* no se mueven y la capa mucosa que cubre el espermátforo dificulta su conteo y no puede ser totalmente eliminada, dado que es ésta la que permite su permanencia sobre el tégico de la hembra (Bauer y Min, 1993) lo que es necesario porque esta especie fertiliza externamente sus huevos .

En el caso de *P. vannamei*, aun no se encuentra disponible una técnica que permita obtener nauplios a partir de esperma combinado con un extensor, ni se ha medido la eficiencia de su almacenamiento con fines reproductivos a corto o largo plazo. El desarrollo de dicha tecnología facilitaría el intercambio de germoplasma entre las explotaciones, el establecimiento de bancos genéticos, la optimización de los programas de selección, obtención de mejores evaluaciones de progreso genético y la conservación de líneas genéticas seleccionadas.

Se han realizado varios intentos para conservar espermátforos de camarón, pero se han logrado pocos avances. Los espermatozoides que sobreviven al almacenamiento han sido contados y su viabilidad ha sido estimada indirectamente por medio de tinciones, pero su capacidad fertilizante no ha sido comprobada y la adherencia del esperma al tégico pudiera verse comprometida (Tave y Brown Jr, 1981; Yano et al., 1997; Bray y Lawrence, 1998; Nimrat et al., 2006).

El desarrollo de una solución extensora que permita prolongar el tiempo de almacenamiento del esperma fresco, manteniendo sus funciones incluso al ser diluido, permitiría la IA exitosa de más de dos hembras por macho. Por lo tanto, el objetivo de éste estudio fue desarrollar y evaluar una solución extensora para la conservación del esperma a corto plazo, para obtener dos dosis por cada espermátforo de *P. vannamei* para su uso en IA.

2. Revisión de Literatura

2.1 *Hábitat y biología*

Al camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) es posible encontrarlo en vida silvestre desde Sonora, México hasta Caleta La Cruz, Perú. Es una especie que habita en fondos arenosos y arcillosos; a pesar de los reportes de su captura hasta la profundidad de 80 metros, se encuentra en mayor abundancia entre los 8 y 25 metros (Martínez, 1999), aunque su distribución no es uniforme en todo el litoral.

2.2 *Situación de la camaronicultura*

Las condiciones para el cultivo de esta especie se documentaron por primera vez en 1973 en Florida, Estados Unidos, a partir de nauplios procedentes de una hembra silvestre ovada capturada en Panamá. Tras los resultados favorables obtenidos en estanques y el descubrimiento de la ablación unilateral (y nutrición adecuada) para promover la maduración en Panamá en 1976, se inició el cultivo comercial de *P. vannamei* en Centro y Sudamérica (Briggs, 2007).

La explotación pesquera de los camarones marinos ha sido uno de los rubros más importantes de la actividad pesquera en México y de 1976 a 1986 nuestro país fue el principal abastecedor de camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*) al mercado de los Estados Unidos. Más tarde, al incrementarse la demanda por parte del mercado internacional, otros países aumentaron su oferta como resultado del crecimiento de la producción obtenida de cultivos controlados. México, por su parte, fue cediendo su posición de privilegio en el mercado norteamericano ante la imposibilidad de incrementar su producción (que dependía totalmente de la captura) por encima de 70 mil toneladas, al llegar a su rendimiento máximo sostenible (Lobato, 1992).

En un intento por fortalecer al sector y recuperar la posición de liderazgo en el mercado norteamericano, en 1986 se inició en nuestro país la aplicación de una política prioritaria de fomento al desarrollo de la camaronicultura. El objetivo era incrementar la producción y reducir la sobrecarga en la captura. A partir de esa fecha la camaronicultura inició su desarrollo, de tal manera que hoy en día existen varias compañías que compiten por proveer de semilla (postlarva) a las granjas de engorda. En la camaronicultura, el término *siembra* es utilizado para referirse al traslado de los organismos en etapa larvaria, casi siempre en fase de postlarva (semilla), a los estanques de engorda.

Algunas compañías operan núcleos genéticos que cuentan con programas de mejoramiento genético y ambientes controlados con alta bioseguridad. Su finalidad es producir organismos con características productivas deseables como crecimiento rápido y altas tasas de sobrevivencia. Para lograrlo, puede ser conveniente que dichas explotaciones apliquen biotecnologías reproductivas que les permitan controlar la reproducción, por ejemplo, ovulación inducida, fertilización artificial, cuidado de los huevos fertilizados hasta su eclosión y criopreservación de gametos y embriones (Lobato, 1992; Briggs, 2007).

2.3 Suministro de postlarva para los sistemas de producción

En América Latina se utilizó postlarva silvestre de *P. vannamei* hasta finales de la década de los noventa para el suministro de organismos en cultivos extensivos en estanques. Los programas de domesticación y selección genética permitieron un suministro más consistente de postlarva. Algunas, producidas de esa manera, fueron enviadas a Hawaii en 1989, obteniéndose las líneas de producción que posteriormente condujeron a su industrialización en los Estados Unidos y en Asia (Lotz, 1992).

En laboratorios de baja inversión en México por lo general no se recurre a la IA para la producción de los nauplios. De manera que un macho transfiere a discreción sus espermátóforos en una sola hembra ubicada a su alcance, misma

que después es localizada y colocada en tanques separados para desovar (Arcos et al., 2005; Ibarra et al., 2007; Ramírez, s.f.).

En cambio, en algunas granjas y centros de investigación científica, donde se requiere de una estructura familiar adecuada para las evaluaciones genéticas, es decir, donde se requiere de la producción de familias de hermanos y mediohermanos paternos, si se recurre a la IA. Las hembras con la gónada madura son inseminadas depositando la masa espermática previamente extraída de los espermátóforos colectados de machos maduros, que son capaces de regenerarlos cada 10 a 15 días. La IA permite su uso extensivo, favoreciendo el uso de mejores animales en los programas de genética, no obstante, en la práctica no siempre se logra producir larvas en las dos hembras inseminadas por cada macho, lo que afecta negativamente la precisión de las evaluaciones genéticas de las familias (Arce et al., 2000; Gitterle et al., 2005; Castillo-Juárez et al., 2007).

2.4 Importancia de la Inseminación Artificial

La IA es la técnica de reproducción asistida más antigua y hasta la fecha continúa siendo la más utilizada en seres humanos y animales. La introducción de la IA en los animales de granja fue impulsada por razones sanitarias y por las aplicaciones comerciales con miras a mejorar el desempeño en el ganado durante el siglo pasado a finales de la década de los treinta. Después de la segunda guerra mundial, la criopreservación del semen facilitó su distribución y la IA continuó siendo utilizada por razones económicas, especialmente para la reproducción y mejoramiento genético del ganado de leche (Pérez y Pérez, 1985).

La cantidad y calidad de semen que producen los animales de granja es abundante y permite su dilución y la producción de varias dosis por eyaculado (Pérez y Pérez, 1985; Ruiz et al., 1998; Rath et al., 2008). En contraste, no todas las especies acuáticas que se producen en cautiverio permiten la manipulación de

su esperma, ya sea por el pequeño volumen obtenido o por particularidades inherentes a la fisiología de los gametos que dificultan su manejo (Tave y Brown Jr, 1981; Bauer y Min, 1993; Ritar y Campet, 2000). No obstante, cabe aclarar que las comparaciones entre distintas especies (terrestres y acuáticas) no pueden generalizarse ya que las técnicas de IA varían mucho de una a otra y el grado de éxito obtenido también.

En especies donde se utiliza rutinariamente la IA, como bovinos, suinos y equinos, su uso repercute en una disminución significativa en la fertilidad cuando se compara con la obtenida a partir de la monta natural. No obstante, la evaluación genética precisa de los machos reproductores lo compensa ampliamente (Pérez y Pérez, 1985; Ruiz et al., 1998).

2.5 Del semen y el esperma

En los mamíferos, semen se refiere al conjunto de espermatozoides producido en los testículos y suspendido en el plasma seminal que secretan las distintas glándulas sexuales accesorias. Para el caso de los camarones decápodos, el término más utilizado para referirse al conjunto de espermatozoides y la sustancia donde se encuentran suspendidos es esperma, ya que en éstos organismos su formación se lleva a cabo en los ductos espermáticos y no cuentan con glándulas sexuales accesorias (Alfaro y Lozano, 1993; Heitzmann et al., 1993).

2.6 Uso de la inseminación artificial en acuicultura

Desde hace muchos años se ha realizado la suspensión del esperma añadiendo un extensor en diversas especies acuáticas. La mayoría en peces de alto interés comercial, con la finalidad de hacer IA y mejoramiento genético (Lahnsteiner et al., 1998; Babiak et al., 2001; Park y Chapman, 2005). La suspensión del esperma hace posible incrementar el número de hembras apareadas por macho, agiliza el proceso de IA y facilita el transporte de germoplasma (Muchlisin et al., 2004).

Aun no se conoce con detalle el aparato reproductivo de *P. vannamei* y ciertos procesos como la maduración de los ovocitos; y la falta de un medio de cultivo que prevenga su reacción dificulta el desarrollo de métodos alternativos para la producción de nauplios, como la inseminación *in vitro*, por lo que resulta muy difícil conservar huevos maduros para su posterior inseminación tal y como ya se realiza en otras especies marinas (Okumura et al., 2002; Madsen et al., 2005; Rojas y Alfaro, 2006).

Para obtener huevos de *P. vannamei* aptos para la fertilización *in vitro* es necesario sacrificar a las hembras o invertir una considerable cantidad de tiempo y recursos haciendo un seguimiento individual de cada una, capturándola en el momento preciso del desove, proceso que produce la obtención de una fracción baja del total de sus huevos. Sin importar el método de recolección utilizado, los huevos obtenidos deben mezclarse inmediatamente con la masa espermática de los machos para lograr su fertilización. Al carecer de flagelo y sólo presentar una estructura inmóvil denominada "espina", los espermatozoides de *P. vannamei* reaccionan rápidamente al hacer contacto con el medio donde se encuentran suspendidos los huevos, lo que dificulta el proceso de inseminación *in vitro*, ya que la reacción acrosomal y eversión del contenido nuclear del espermatozoide no puede detenerse o revertirse una vez iniciada de éste modo (Rojas y Alfaro, 2006).

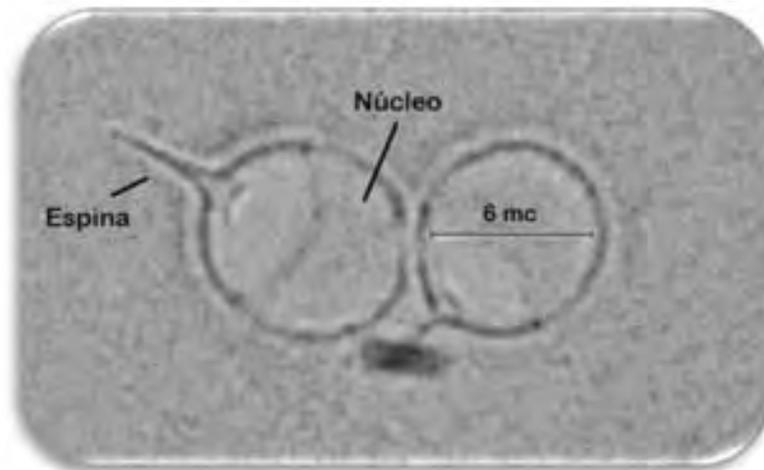
Los espermatozoides de los crustáceos carecen, entre otras estructuras, de flagelo, axonema y tallo mitocondrial (Kim et al., 2003), y sólo cuentan con una estructura principal que contiene al núcleo y un apéndice que sobresale en forma de espina (Figura 1). A pesar del avance actual en el estudio de la morfología del espermatozoide del *P. vannamei* y la descripción de sus principales estructuras, los detalles concernientes a su reacción acrosomal y activación aun se desconocen (Ceballos-Vázquez et al., 2004; Alfaro et al., 2007; Pongtippatee et al., 2007).

2.7 Manejo del germoplasma

Por el momento aun no se encuentra disponible una tecnología práctica que permita la conservación de gametos o embriones de camarón. El desarrollo de dicha tecnología facilitará intercambiar germoplasma entre las explotaciones, establecer bancos genéticos, optimizar recursos y conservar líneas genéticas seleccionadas (Arce et al., 2000).

Se han realizado varios intentos por conservar espermatóforos de camarón, pero debido a lo complejo de su estructura y sus propiedades adherentes se han logrado pocos avances ya que la fracción aglutinante que permite el mantenimiento del espermatóforo sobre la hembra termina degradándose (Tave y Brown Jr, 1981; Bray y Lawrence, 1998; Nimrat et al., 2006).

Figura 1. Espermatozoides de *P. vannamei*



En la mayoría de las granjas productoras de larvas, los reproductores se mantienen en tanques de maduración en salas interiores oscuras, con agua de mar limpia y filtrada. El alimento suministrado es casi siempre una mezcla de alimentos frescos y balanceados. Se realiza la ablación (extirpación) de un pedúnculo ocular a cada hembra, lo cual lleva a repetidos ciclos de maduración y desove. Sin embargo, varias generaciones de domesticación han conducido a que, en algunas granjas, ya no se observen diferencias importantes utilizando o no

la técnica de ablación ocular en las hembras, por lo que algunos laboratorios ya no recurren a dicho procedimiento (Quintana, Comunicación personal, 2008¹). Las hembras de entre 8 y 10 meses de edad se reproducen eficientemente, en tanto que los machos alcanzan su mayor capacidad reproductiva después de los 10 meses. Se alcanzan tasas de desove de 5–15 por ciento/noche dependiendo del origen de los reproductores. Las hembras desovan en tanques comunales o individuales (para evitar la transmisión de enfermedades). En la tarde siguiente, los nauplios saludables son atraídos mediante luz para ser atrapados y posteriormente se enjuagan con agua de mar. A continuación se desinfectan con iodo y/o formalina, se vuelven a enjuagar, se cuentan y se transfieren a tanques de mantenimiento hasta el momento de concretar su venta o se trasladan a tanques de cría donde maduran y su ciclo biológico vuelve a comenzar.

¹ Ing. Juan Carlos Quintana Casares. Director de Producción. Maricultura del Pacífico, SA de CV.

3. Material y Métodos

El trabajo de investigación consistió de un estudio preliminar que permitió la identificación del extensor a utilizar y una fase experimental que constó de dos experimentos donde se exploraron distintas técnicas de IA, realizados durante años consecutivos.

3.1. Estudio preliminar

El estudio preliminar tuvo como objetivos: conocer la presión osmótica de la hemolinfa de los organismos utilizados, ajustar la presión osmótica de los extensores candidatos con respecto a la de dicha hemolinfa, y analizar el efecto de varios extensores sobre la viabilidad de los gametos (medida sobre la base de la integridad de la membrana celular espermática), con la finalidad de seleccionar el más adecuado.

Dicho estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en Baja California. Los organismos utilizados provenían de la línea de producción comercial de la empresa Maricultura del Pacífico S.A. de C.V., de su laboratorio ubicado en los Pozos, Sinaloa. Su dieta consistió de una mezcla enriquecida compuesta por poliqueto, calamar, mejillón, paprika, alimento comercial en pellet, artemia y krill. Se utilizaron 50 machos sexualmente maduros y con 10 meses de edad, mismos que fueron trasladados vía aérea/terrestre. A su llegada se inició un proceso gradual de aclimatación, mismo que concluyó al igualar, en el lugar de recepción, las condiciones ambientales reportadas en su sitio de origen, proceso que se completó en 24 horas.

Los valores promedio para las características del agua a la llegada de los organismos al CICESE fueron: temperatura 17° C, salinidad 24 ppm y saturación de oxígeno 18 mg/L. Un organismo llegó muerto y tres letárgicos. Al término del proceso de aclimatación los parámetros de las características del agua se

igualaron a los reportados en su sitio de origen, registrando temperatura de 25.5° C, salinidad de 33.1 ppm y saturación de oxígeno de 6 mg/L. Durante los primeros cinco días murieron 30 camarones. Los estudios fueron realizados empleando camarones en aparente buen estado de salud.

Como primer paso, se revisó la presión osmótica de la hemolinfa, ya que ésta varía en respuesta a diversos factores, como la edad de los organismos, temperatura, alimentación, salinidad, entre otras (Bücker et al., 2006). Dado que no se encontraron en la literatura valores de referencia para la presión osmótica de los organismos con características similares a los utilizados en el presente estudio (sexualmente maduros, alimentados con dieta enriquecida, salinidad y temperatura referidas anteriormente), se procedió a realizar su medición en 10 camarones tomados al azar. El peso y longitud promedio (DE) de los organismos fue de 42.6 (3.3) g, y 17.3 (0.5) cm, respectivamente.

La hemolinfa se obtuvo puncionando la membrana abdominal con ayuda de una pipeta estéril. Esta región fue secada antes con papel absorbente para prevenir la contaminación de la muestra con agua de mar. Se extrajo 10 µL de hemolinfa de cada camarón, que inmediatamente fue analizada utilizando un osmómetro de vapor Wescor 5500, previamente calibrado.

Una vez obtenida la información sobre la presión osmótica de la hemolinfa, fue posible calcular la presión osmótica de los extensores a un valor ligeramente inferior al registrado para la hemolinfa de los organismos utilizados. Esto fue así ya que la literatura recomienda que la presión osmótica de los extensores sea ligeramente inferior al de la hemolinfa para preservar la integridad de la membrana de los gametos (Tiersch y Mazik, 2000).

Los extensores fueron seleccionados a partir de una revisión bibliográfica, eligiéndose (a) uno de los más utilizados en acuicultura (HBS2, solución salina balanceada de Hank) (Christensen y Tiersch, 1997), (b) una variante del anterior sin calcio (HBS1) considerando que este ion pudiera ser el responsable de

desencadenar el proceso de capacitación acrosomal en el esperma del camarón, tal como se ha constatado en otras especies acuáticas (Tiersch y Mazik, 2000), y (c) un extensor diseñado específicamente para realizar el conteo espermático en *P. vannamei* (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987), el cual se modificó ajustando su presión osmótica y adicionando con 20µL de antimicótico y antimicrobiano, Sigma A7292, (ASW), considerando que su adición mejora la viabilidad de los gametos en otras especies acuáticas y dado que existe la posibilidad de contaminación bacteriana en el esperma de decápodos durante su almacenamiento (Billard et al., 2004; Babiak et al., 2006; Nimrat et al., 2006; Nimrat et al., 2008).

Con la finalidad de elegir al extensor más adecuado, se elaboraron los 3 extensores mencionados preparando dos repeticiones con 100 mL de cada solución seleccionada (Cuadro 1): HBS1, HBS2 y ASW, se almacenaron en frascos estériles de 50 mL, conservándose en refrigeración a 4° C hasta el momento de revisar su presión osmótica.

Cuadro 1. Composición química de las soluciones seleccionadas¹

<u>HBS1</u>		<u>HBS2</u>		<u>ASW</u>	
Componente	Cantidad (g)	Componente	Cantidad (g)	Componente	Cantidad (g)
NaCl	2.200	NaCl	2.160	NaCl	2.125
KCl	0.110	KCl	0.108	KCl	0.110
MgSO ₄	0.055	CaCl ₂ •2H ₂ O	0.043	H ₃ BO ₃	0.052
Na ₂ HPO ₄	0.017	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.054	NaOH	0.019
KH ₂ PO ₄	0.008	Na ₂ HPO ₄	0.016	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.484
NaHCO ₃	0.047	KH ₂ PO ₄	0.016	Antimicótico y antimicrobiano ²	20 µL ²
C ₆ H ₁₂ O ₆	0.275	NaHCO ₃	0.094		
		C ₆ H ₁₂ O ₆	0.270		

¹pH ajustado a 7.4 utilizando 1 N HCl

²[10,000 U Penicilina, 10 mg Estreptomina, 25 µg Anfotericina B]

La presión osmótica de los extensores se revisó utilizando un osmómetro de presión de vapor Wescor 5500 previamente calibrado. Al momento de tomar las mediciones todos los extensores tenían la misma temperatura (20° C). Una vez

registradas las mediciones, los extensores se separaron en 15 alícuotas de 1.8 mL, 2 alícuotas de 14 mL y una de 40 mL y se congelaron hasta el momento de ser utilizados.

Finalmente, con el objetivo de seleccionar un extensor para la realización de los experimentos, se analizó el efecto de los 3 extensores (tratamientos) sobre la viabilidad de los gametos. Cada tratamiento se evaluó con 6 espermatozoides (repeticiones) seleccionados al azar, midiendo como variable de respuesta el porcentaje de espermatozoides viables observados (sobre la base de la permeabilidad espermática). Para ello se utilizaron 18 espermatozoides procedentes de 9 machos reproductores, formándose 3 grupos (uno para cada extensor candidato). La intención original era realizar todos los estudios en un lapso de 2 días, sin embargo, el traslado de los organismos influyó negativamente en su salud, elevando la mortalidad, por lo cual se debió prolongar un día más el tiempo requerido para su realización, lo que repercutió en el desbalance de la estructura del estudio, la cual se muestra en el Cuadro 2.

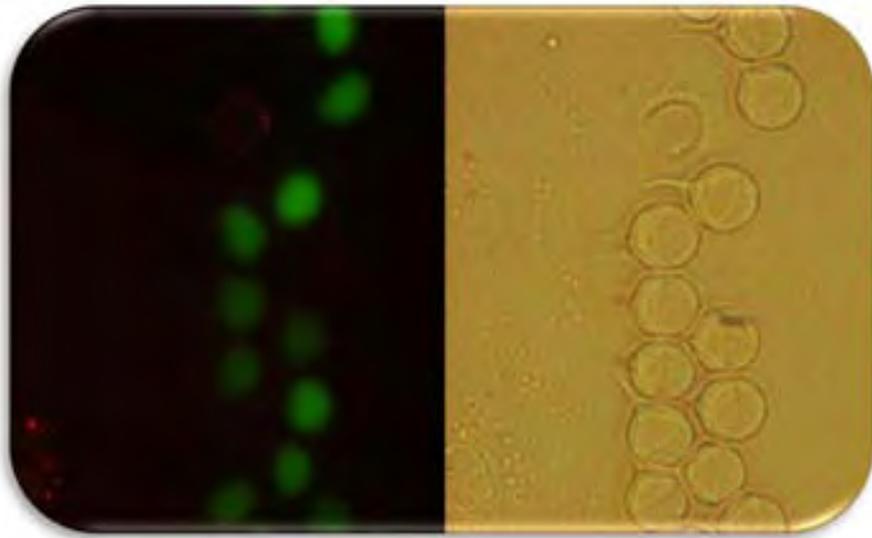
Cuadro 2. Orden de asignación de los tratamientos

Macho	Día 1	Macho	Día 2	Macho	Día 3
1	1. ASW	4	7. HBS1	7	13. ASW
1	2. HBS1	4	8. HBS2	7	14. ASW
2	3. HBS1	5	9. HBS2	8	15. HBS2
2	4. HBS1	5	10. HBS2	8	16. HBS2
3	5. ASW	6	11. ASW	9	17. HBS1
3	6. ASW	6	12. HBS2	9	18. HBS1

Para determinar la viabilidad espermática de los extensores, cada espermatozoides obtenido al azar fue mezclado con 500 μ L de uno de los 3 extensores posibles durante 30 segundos, utilizando para ello un homogenizador de tejidos. La masa espermática suspendida fue teñida utilizando el kit dual de tinción fluorescente Live-Dead Sperm Viability Kit® (Molecular Probes, Eugene, OR).

Una vez teñidas las muestras, se almacenaron en una cámara oscura durante 12 horas. Cada 3 horas se montó sobre un portaobjetos una pequeña porción de éstas, evitando exponerlas a la luz durante el proceso, y se observaron en el microscopio de fluorescencia (Nikon Elipse 80i), utilizando un filtro de luz azul que permitió identificar a las células viables teñidas en verde y las no viables en rojo (Figura 2). Tras analizar el número de gametos vivos obtenidos en cada tratamiento utilizando un modelo mixto con el tratamiento como efecto fijo y con día y macho anidado en día como efectos aleatorios, se eligió el extensor que conservó, a través del tiempo, la mayor cantidad de células viables. Se eligió ASW como el extensor para llevar a cabo los experimentos posteriores dado que mostró tener el mayor porcentaje de viabilidad (ver sección de resultados).

Figura 2. Vista de gametos



Gametos observados con microscopio (aumento 100x) fluorescencia y filtro azul (izquierda), misma vista utilizando luz visible (derecha) constatando integridad en la membrana.

3.2. Fase experimental

Los objetivos de la fase experimental fueron:

- a) Estandarizar el tamaño de la gota espermática a utilizar en los experimentos.
- b) Realizar dos experimentos para comparar la producción de nauplios. El primero comparó dos tratamientos: el esperma de medio espermatóforo diluido en ASW (1), y el esperma de medio espermatóforo sin diluir (2), obteniendo para ambos casos una relación macho-hembra de 1:4. El segundo comparó tres tratamientos: esperma sin diluir de un espermatóforo (MP), igual a MP pero agregando ASW como humectante (E1), y esperma diluido de medio espermatóforo con ASW (D1), obteniendo de ésta manera relaciones macho-hembra de 1:2 (MP y E1) y 1:4 (D1).

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Núcleo Genético de la empresa Maricultura del Pacífico, en los Pozos, Sinaloa.

Se comenzó por constatar que las características volumétricas de los espermatóforos y gotas seminales fueran similares a las observadas en los estudios preliminares realizados en el CICESE, dado que los organismos procedían de un área de producción diferente. Los organismos utilizados provenían de una población contenida en el mismo estanque ($n= 100$). Se seleccionaron 30 machos al azar, que al momento de ser utilizados tenían 10 meses de edad y peso de 40g.

Se procedió a clasificar el tamaño de la gota espermática. Las diferencias en el manejo y ambiente de los lugares donde se realizaron los estudios y experimentos repercutieron en ligeras variaciones en el tamaño de los espermatóforos, a pesar de que los organismos en ambos sitios registraron la misma talla y peso. Tales variaciones en el tamaño de los espermatóforos repercutían en el volumen espermático obtenido de cada uno de ellos; dicho volumen debía de ser estandarizado ya que el procedimiento de suspensión del

esperma requería de la adición de una cantidad constante de extensor para identificar el factor de dilución utilizado.

Los espermátóforos se obtuvieron manualmente según la técnica descrita por Leung et al. (1987). Después se procedió a separar el esperma del resto de la estructura presionando la región anterior del espermátóforo entre los dedos índice y pulgar, tomando la gota de esperma con ayuda de fórceps curvos.

La consistencia viscosa del esperma, dificultad para su manejo, y pequeño volumen ($<25\mu\text{L}$) no permitió el uso de instrumentos volumétricos para su medición, por lo que se empleó un método comparativo observacional para calcular el volumen de la gota espermática. Para ello se colocó una gota de esperma sobre una superficie nivelada, lisa e impermeable; se calibraron varias micropipetas de 5, 10, 15, 20 y 25 μL y se añadieron varias gotas con volumen conocido de agua, cercanas a la periferia de la gota de esperma, cuidando de no dispersarlas ni hacer contacto entre ellas. El volumen de la gota espermática fue calculado comparándolo con el volumen conocido de las distintas gotas de agua que la circundaban.

Las gotas espermáticas obtenidas de cada espermátóforo se clasificaron en función a su volumen aproximado como pequeña (5 μL), mediana (10 μL) o grande (20 a 25 μL), observándose, de manera visual, una relación positiva entre el tamaño de los espermátóforos y el peso de los machos. Dado que la mayoría de las gotas espermáticas correspondían a la clasificación de mediana, se utilizaron sólo estas para la realización de los experimentos.

Una vez elegido el volumen de la gota espermática a utilizar, se procedió a explorar diferentes diluciones, seleccionando aquella que mantuvo la consistencia viscosa que garantizara su adherencia al tético en volumen suficiente para dividirlo manualmente en dos partes iguales y permitiera la obtención de descendencia viable.

La dilución máxima obtenida fue de 1:2 (10 μ L de esperma : 20 μ L de ASW), lo que permitió inseminar utilizando medio espermátforo por hembra, es decir, una relación macho-hembra 1:4.

3.3. Experimento 1. Inseminación artificial con y sin extensor utilizando medio espermátforo

El objetivo de éste estudio fue evaluar la solución extensora para la conservación del esperma a corto plazo, comparando dos tratamientos, (1) IA con extensor y (2) sin extensor, obteniendo para ambos casos una relación macho-hembra de 1:4.

Para llevar a cabo la IA, cada gota espermática fue dividida en dos partes iguales, utilizando cada mitad en una hembra diferente, obteniendo de esta manera una relación macho:hembra de 1:4 para ambos tratamientos.

Se diseñó un experimento (Cuadro 3) utilizando 104 hembras y 26 machos (52 espermátforos). Para el tratamiento con extensor, el esperma fue recolectado 4 horas antes de iniciar la IA. Una vez obtenido se trasladó a un microtubo estéril con capacidad de 3 mL y se adicionaron 20 μ L de ASW, almacenándose a 23° C lejos de la luz hasta el momento de ser utilizado. Para el tratamiento sin extensor, las muestras fueron obtenidas y divididas justo antes de inseminar a la hembra.

Cuadro 3. Número de hembras inseminadas por tratamiento y por día

Tratamientos de IA	Día			Número de Hembras	Número de Machos
	1	2	3		
(1) Medio espermátforo con extensor (20 μ L)	16	20	20	56	14
(2) Medio espermátforo sin extensor	16	20	12	48	12
Totales	32	40	32	104	26

El proceso para la selección e inseminación fue estandarizado, seleccionándose hembras en fase IV o V de desarrollo ovárico y machos con espermatozoides maduros no melanizados (Bell y Lightner, 1988; Diamond et al., 2008). Los espermatozoides se obtuvieron manualmente según la técnica descrita por Leung et al. (1987).

El espermatozoide fue separado del resto de la estructura presionando la región anterior del espermatozoide entre los dedos índice y pulgar, tomando la gota de espermatozoide con ayuda de fórceps curvos y la técnica de IA utilizada se basó en la descrita por Arce et al. (2000). Ésta consistió en exponer el tégico de la hembra plegando el cuarto y quinto par de periópodos en dirección caudal, en tanto los primeros tres pares se sujetaron firmemente contra la superficie del cefalotórax. Se retiró el exceso de agua del tégico, donde se colocó la parte proporcional correspondiente de la gota espermática (Figura 3). El cuarto y quinto par de periópodos se regresaron cuidadosamente a su posición original, para asegurar la permanencia del espermatozoide, y la hembra fue trasladada para su desove a un tanque de 200 L con agua de mar a una temperatura de 28° C adicionada con 8 ppm de EDTA. Para evitar estresar a los organismos, cada proceso de inseminación y traslado al tanque se efectuó en menos de un minuto.

Figura 3. Detalle del tégico, 4° y 5° par de periópodos plegados caudalmente.



Las hembras fueron retiradas de sus tanques individuales de desove y trasladadas de vuelta a los tanques de maduración de origen 6 horas después de haber sido inseminadas. Una vez retiradas, se introdujo en cada tanque una piedra de aireación, incubándose los huevos durante 12 horas, después de lo cual, se cosecharon los nauplios y los huevos sin eclosionar. El número de nauplios producidos por hembra se estimó después de concentrar el desove del tanque (200 L) en una cubeta de 15 L. Para estimar el número de nauplios en cada desove, se introdujeron 2 piedras de aireación en la cubeta para homogenizar el contenido, se retiraron e inmediatamente se tomó la muestra utilizando una pipeta de cristal de 1 mL. El conteo de nauplios se realizó al observar los organismos vivos dentro de la pipeta a contraluz. Se realizaron 3 conteos por cubeta, homogenizando el contenido cada vez, y extrapolarlo el promedio de ellas a 15 L.

Dado que la aleatorización de los experimentos no tuvo restricciones, el efecto de macho pudo haber quedado confundido con el efecto del tratamiento. La variable número de nauplios obtenidos por hembra no se distribuyó normalmente (Shapiro-Wilk, $W=0.8113$, $P<0.0001$) y visualmente mostró una alta asimetría, por lo que se procedió a realizar la transformación de Box Cox y se analizó utilizando un modelo lineal mixto con el tratamiento como efecto fijo y con día, y macho anidado en día, como efectos aleatorios.

Se analizó también la variable binaria éxito/fracaso (1/0) en la obtención de nauplios por hembra utilizando un modelo logístico que incluyó el efecto de tratamiento, y el día de medición como covariable.

3.4. Experimento 2. Inseminación artificial utilizando distintos métodos

El objetivo del experimento fue comparar tres tratamientos: (MP) método utilizado en la empresa usando esperma sin diluir de un espermátforo, utilizando agua de mar como agente humectante, (E1) igual a MP pero sustituyendo el

agente humectante con ASW y (D1) espermatozoides de medio espermatozoides diluido en ASW. Para ello se diseñó un experimento (Cuadro 4) utilizando 40 hembras y 14 machos.

En la empresa se utiliza desde hace varios años una variante de la técnica de IA descrita por Arce et al. (2000). La modificación consiste en adicionar una gota de agua de mar a la gota de espermatozoides para facilitar su uso y evitar su deshidratación durante el manejo, el análisis de un periodo de 5 días durante el ciclo de producción en el Núcleo Genético en el 2008, el número de nauplios promedio (desviación estándar) fue de 183,026 (40650), no obstante, únicamente se seleccionan para la fase de reproducción desoves con un conteo igual o superior a 95,000, lo que representa una eficiencia del 10%.

Habiéndose planteado en el primer experimento la hipótesis de que el calcio contenido en el agua pudiera propiciar la activación acrosomal y con la finalidad de incorporar un método que permitiera aumentar el número de nauplios producidos en la empresa. Se incluyó una variante que sustituyó la gota de agua de mar utilizada como agente humectante, con la misma cantidad de solución libre de calcio (ASW).

Cuadro 4. Número de hembras inseminadas por tratamiento y por día

Tratamientos de IA	Día			Número de Hembras	Número de Machos
	1	2	3		
MP – Un espermatozoides por hembra, método usado por la empresa	4	4	2	10	5
E1 – Un espermatozoides por hembra, ASW como humectante	4	4	4	12	6
D1 – Medio espermatozoides por hembra, 20 µL ASW	4	4	4	12	3
Totales	12	12	10	34	14

Para el tratamiento D1, el espermatozoides fue recolectado 4 horas antes de iniciar la IA. Una vez obtenido se trasladó a un microtubo estéril con capacidad de 3 mL y se adicionaron 20 µL del extensor, almacenándose a 23° C lejos de la luz hasta el

momento de ser utilizado. Para los tratamientos MP y E1, las muestras se obtuvieron y mezclaron con su respectiva gota de humectante justo antes de inseminar a la hembra.

Las técnicas utilizadas para la obtención de los espermátóforos y gotas seminales fueron las mismas que las referidas en el Experimento 1.

Se utilizó medio espermátóforo para la inseminación de cada hembra en los tratamientos MP y E1, dejando para ambos tratamientos una relación macho:hembra de 1:2, en tanto que para el tratamiento D1 se utilizó medio espermátóforo por hembra, con una relación de 1:4.

Los procedimientos utilizados para llevar a cabo la IA, el desove y los conteos de nauplios fueron los mismos que los descritos en el Experimento 1 para todos los tratamientos.

Nuevamente, dado que la aleatorización de los experimentos no tuvo restricciones, el efecto de macho pudo haber quedado confundido con el efecto del tratamiento, por lo que se procedió a analizar la variable número de nauplios obtenidos (transformada con Box Cox) utilizando un modelo lineal mixto con el tratamiento como efecto fijo y con día, y macho anidado en día, como efectos aleatorios.

Se analizó también la variable binaria éxito/fracaso (1/0) en la obtención de nauplios por hembra utilizando un modelo logístico con el efecto de tratamiento y con día de medición como covariable.

4. Resultados

4.1 Estudio preliminar

El valor promedio para la presión osmótica de la hemolinfa en organismos reproductores alimentados con dieta enriquecida (819.6 ± 9.9 mmol/kg) fue cercano al reportado en la literatura (825 ± 9 mmol/kg) para juveniles de la misma especie mantenidos exclusivamente con pellet comercial y en condiciones similares de temperatura y salinidad (Bücker et al., 2006). Ello sugiere que el tipo de alimentación, edad y madurez sexual no influye tanto en los valores de presión osmótica de la hemolinfa en el *P. vannamei* como lo hacen las variaciones en salinidad y temperatura del agua.

Los extensores elaborados registraron valores de presión osmótica ligeramente menores al obtenido en la hemolinfa (Cuadro 5), considerándose aceptables para su uso.

Cuadro 5. Presión osmótica (mmol/kg) de las soluciones empleadas

Soluciones	1ª Lectura	2ª Lectura	Promedio
HBS1	732	757	744.5
HBS1	766	786	776
HBS2	747	767	757
HBS2	780	786	783
ASW	717	737	727
ASW	772	788	780

Nota: Se realizaron dos repeticiones para cada solución

Para seleccionar el extensor a utilizar en los experimentos, se analizó la variable número total de espermatozoides viables (i.e., con membrana celular intacta) por espermátforo conservado de cada uno de los extensores. El análisis del modelo mixto reveló que el tipo de tratamiento determinó diferencias para el número de espermatozoides viables ($P=0.0065$). La comparación de las medias mínimo cuadráticas del porcentaje de espermatozoides vivos reveló que el

tratamiento ASW no fue diferente de HBS1 pero si de HBS2; no observándose diferencias entre HBS1 y HBS2 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de gametos viables obtenidos para la selección del extensor

Tratamientos	Medias Mínimo Cuadráticas (%) transformación Box Cox	Error estándar	Valores en la escala original utilizando la ecuación ¹	
			Medias Mínimo Cuadráticas (%)	Error estándar
ASW	62.1 _a	6.64	91.58	29.95
HBS1	46.9 _{ab}	7.27	79.59	31.35
HBS2	26.2 _b	6.64	59.49	29.95

¹ Box Cox = (% Espermatozoides vivos²-1)/ 135.026440359839

* Tratamientos con distintas literales son estadísticamente diferentes (P<0.05)

El modelo logístico mostró que por cada gameto viable observado en con el tratamiento HBS1, se observaron 7.5 con ASW; por cada gameto viable observado con HBS2, se observaron 10.0 con ASW; y por cada gameto viable observado con HBS2, se observaron 1.3 con HBSS, por lo que se decidió usar ASW como el extensor de elección (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados para obtención de gametos viables usando modelo logístico

Tratamientos	Razón de momios del modelo logístico
ASW vs HBS1	7.5
ASW vs HBS2	10.0
HBS1 vs HBS2	1.3
Intervalo de Confianza 95% del intercepto, -1.39 a 0.92	

4.2 Experimento 1. Inseminación artificial con y sin extensor

El modelo mixto mostró que el efecto de tratamiento afectó el número de nauplios obtenidos por hembra ($P=0.0086$) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Número de nauplios obtenidos (Experimento 1)

Tratamiento	Número de Hembras	Media con transformación Box-Cox* (Desviación estándar)	Valores en la escala original utilizando la ecuación ¹
			Media (Desviación estándar)
(1) Medio espermátóforo con extensor (20 μ L)	56	6317 _a (3002.5)	11914.69 (629.9)
(2) Medio espermátóforo sin extensor	48	4159 _b (3767.6)	2158.87 (1470.8)

¹ Box Cox = (Número de nauplios^{0.2}-1)/ 0.000876155282420443

* Tratamientos con distintas literales son estadísticamente diferentes ($P<0.05$).

El modelo logístico mostró que por cada hembra inseminada con medio espermátóforo sin extensor que produjo nauplios, 4.9 lo hicieron al ser inseminadas con medio espermátóforo adicionado con ASW ($P=0.0009$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados para obtención de nauplios usando modelo logístico

Tratamientos	Razón de momios del Modelo Logístico	% de éxito
(1) vs (2)	4.9	82.9

Intervalo de Confianza 95%, -1.562604 a -0.6117988

En lo que respecta al número de hembras fertilizadas por macho, se observaron mejores resultados al utilizar el tratamiento que incluyó la adición de ASW, obteniéndose nauplios en 48 hembras usando 14 machos (i.e., una media de 3.43 hembras por macho) contra el tratamiento sin ASW en el que se obtuvieron nauplios en 28 hembras usando 12 machos (i.e., una media de 2.33 hembras por macho).

4.3 Experimento 2. Inseminación artificial utilizando distintos métodos

El análisis reveló que el efecto de tratamiento tuvo sólo un efecto marginal ($P=0.0992$) sobre el número de nauplios obtenidos por hembra (Cuadro 10).

Cuadro 10. Número de nauplios obtenidos (Experimento 2)

Tratamiento	Número de Hembras	Media con transformación Box-Cox* (Desviación estándar)	% de éxito	Valores en la escala original utilizando la ecuación ¹
				Media (Desviación estándar)
MP – Un espermátforo por hembra, método usado por la empresa	10	3695 _a (1988.4)	1.6	5387.93 (101.9)
E1 – Un espermátforo por hembra, ASW como humectante	12	1990 _a (2089.6)	1	102.24 (128.9)
D1 – Medio espermátforo por hembra, 20 μ L ASW	12	1303 _a (1933)	1.3	20.69 (89.6)

¹ Box Cox = $\text{Log}[\text{Número de nauplios}] \times 430.055415170569$

* Tratamientos con distintas literales son estadísticamente diferentes ($P<0.05$).

El modelo logístico mostró que por cada hembra inseminada con D1 que produjo nauplios, 2 lo hicieron al ser inseminadas con E1; por cada hembra inseminada con D1 que produjo nauplios, 8.0 lo hicieron al ser inseminadas con MP; y por cada hembra inseminada con E1 que produjo nauplios, 4.0 lo hicieron al ser inseminadas con MP (Cuadro 11). Sin embargo, estas diferencias entre los tratamientos fueron sólo marginalmente significativas ($P=0.0782$).

Cuadro 11. Resultados para obtención de nauplios usando modelo logístico

Tratamientos	Razón de momios del modelo logístico
E1 vs D1	0.50
MP vs D1	0.13
MP vs E1	0.25

Intervalo de Confianza 95% del intercepto, -1.0389609 a 0.50932809

En lo que respecta al número de hembras fertilizadas por macho se observó en el tratamiento D1 que de los 3 machos utilizados, 2 lograron obtener descendencia con 2 hembras y uno de ellos no produjo descendencia con ninguna utilizando una relación de 1:4; para el tratamiento E1, de los 6 machos

utilizados, 2 lograron obtener descendencia con 1 hembra, 2 lograron obtener descendencia con 2 hembras y 2 más no produjeron descendencia con ninguna utilizando una relación de 1:2; y para el tratamiento MP, de los 5 machos utilizados, 2 lograron obtener descendencia con 1 hembra y 3 lograron obtener descendencia con 2 hembras usando una relación de 1:2.

5. Discusión

5.1 Estudio preliminar

La sobrevivencia de los espermatozoides en otras especies puede constatarse al evaluar su motilidad, pero tal criterio no es aplicable para la evaluación de esperma en camarones, por ello se recurrió al método indirecto de tinción de los gametos.

Utilizando el extensor ASW, se conservaron más gametos viables (con membrana celular intacta) que con HBS1 y HBS2. Los resultados del presente estudio indican que el kit de tinción fluorescente utilizado pudiera ser apropiado para determinar la viabilidad de los espermatozoides del camarón blanco del Pacífico.

Sin embargo, éste no fue el único criterio utilizado para la selección del extensor. En general se usan dos métodos para el desarrollo de extensores: (1) Fórmulas complejas que imitan la composición del plasma seminal; y (2) soluciones fisiológicas salinas con fórmulas simples. En el caso de las fórmulas complejas, el costo de fabricación puede ser elevado y su preparación requerir de mucho tiempo. Es por ello que se recomienda, cuando es posible, el uso de fórmulas simples (Tiersch y Mazik, 2000). Además, se ha reportado que el uso de extensores complejos no incrementa significativamente la sobrevivencia de los espermatozoides (Billard et al., 2004). El extensor utilizado en el presente estudio es de elaboración sencilla y contiene pocos ingredientes, por lo que se cataloga como simple.

Uno de los indicadores que se toman en cuenta para la comprobación de la capacidad fertilizante en crustáceos, es la proporción de semen preservado capaz de producir embriones vivos, misma que se utiliza para medir la variabilidad entre los espermátóforos preservados. En estudios previos, se han usado distintas tinciones para la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides de *P.*

vannamei, como azul tripan (Leung-Trujillo y Lawrence, 1991), yoduro de propidio (Lezcano et al., 2004) y naranja de acridina (Wang, 1995), pero en ninguno de ellos se había constatado directamente la capacidad de los espermatozoides para producir nauplios.

Se supone que un alto número de espermatozoides conservados vivos durante el periodo de almacenamiento producirá un porcentaje de fertilización alto. Pero en el caso del *P. vannamei*, se debe tomar en cuenta que la fertilización es externa, y que los espermatozoides en principio bien conservados pudieran reaccionar tempranamente o la masa aglutinante podría no mantenerse el tiempo suficiente sobre el tético para llevar a cabo la fertilización de los huevos, al afectarse, en el proceso de almacenamiento, su capacidad adherente.

Por lo tanto, una alta tasa de sobrevivencia de los gametos no garantiza una alta capacidad de fertilización y el mejor criterio para evaluar la capacidad fertilizante en esperma preservado es la comprobación directa determinada por la cantidad de descendencia viable obtenida en IA o fertilización *in vitro* (Akarasanon et al., 2004).

5.2 Fase experimental

Antes de constatar *in vivo* la capacidad fertilizadora del esperma preservado en ASW, se procedió a homogenizar el semen con base en su volumen, de tal manera que no se presentaran variaciones para el factor de dilución. Una vez seleccionadas las características volumétricas del esperma a utilizar, fue posible determinar la dilución adecuada y estandarizar la técnica para los estudios posteriores. El observar las características volumétricas del esperma de los organismos utilizados en el Núcleo Genético, para que éstas fueran similares a las observadas en los organismos utilizados en los estudios previos llevados a cabo en el CICESE, permitió constatar que el volumen de la gota espermática de los organismos mostraban variaciones importantes que pudieran repercutir en los

resultados si no se hubiese estandarizado el tamaño de la gota espermática seleccionada.

Estandarizar el tamaño de las gotas espermáticas utilizadas y la cantidad de extensor añadido (20 μ L) resultó útil en términos de control experimental y para hacer posible repetir la técnica de dilución. Sin embargo, dicho proceso añade un posible sesgo y reduce por lo tanto la validez externa del estudio, limitando la extrapolación de las conclusiones a toda la población de machos. Se requiere de estudios posteriores que exploren otras posibilidades de dilución ya que los resultados obtenidos para la suspensión de la gota espermática se basan en aquellas clasificadas como medianas.

5.3 Experimento 1. Inseminación artificial con y sin extensor

La capacidad de fertilización es el indicador más importante para la evaluación de la calidad del esperma en todos los organismos vivientes, y es considerada la prueba más concluyente para determinar la calidad espermática (Liu et al., 2006). Hasta ahora, no se había evaluado ningún otro método de preservación espermática a corto o largo plazo en el *P. vannamei* en cuanto a su capacidad de fertilización *in vivo* o *in vitro* y sólo se había probado su viabilidad mediante el uso de métodos indirectos, particularmente utilizando tinciones (Bray y Lawrence, 1998; Lezcano et al., 2004; Cabrita et al., 2009).

El uso de la técnica de IA descrita combinada con el extensor ASW podría ayudar a reducir el tiempo requerido para la producción de familias y aumentar el número de familias de medios hermanos paternos contemporáneas empleadas en las evaluaciones genéticas, donde las estructuras actuales de dos hembras apareadas por cada macho dificultan la estimación de parámetros genéticos y por ende la selección, dado que en muchos casos quedan machos produciendo hijos con una sola hembra.

Basados en el número promedio (error estándar) en valor de la escala original utilizando la ecuación Box Cox de gametos viables obtenidos inseminando utilizando el extensor 11915 (5.4), los espermatozoides conservados son capaces de mantener su capacidad para fertilizar utilizando el método de dilución y almacenamiento. La conservación a 23° C utilizando el extensor citado fue un procedimiento con resultados satisfactorios para la conservación del esperma en el corto plazo (4h). Se ha demostrado en otras especies acuáticas que el enfriamiento del esperma reduce la tasa metabólica de los gametos, estabiliza la viabilidad, disminuye el crecimiento bacteriano y es un procedimiento común al que se recurre para conservar el esperma. En este caso el enfriamiento consistió en reducir la temperatura sólo unos pocos grados (de 28 a 23° C) con buenos resultados. Sería interesante explorar variaciones a este protocolo con temperaturas de almacenamiento menores.

Se ha encontrado que camarones vivos y secciones de carapacho que contengan espermátóforos provenientes de organismos con más de 36 horas de fallecidos pueden utilizarse como vehículo para transportar eficientemente los gametos y este proceso de transporte se ha utilizado en evaluaciones espermáticas, ya que permite transportar secciones localizadas de tejido en vez de camarones vivos (Bray y Lawrence, 1998). Estos investigadores sugirieron que los espermátóforos preservados en el corto plazo utilizando agua de mar artificial pudieran ser viables y, por lo tanto, útiles para su uso en la IA o fertilización *in vitro*, hipótesis que ahora corrobora el presente estudio.

5.4 Experimento 2. Inseminación artificial utilizando distintos métodos

Al comparar el número de nauplios producidos con los tratamientos MP, E1 y D1, se observaron diferencias marginalmente significativas ($P=0.0992$), lo que indica que aparentemente cualquiera de los tratamientos puede ser útil para la obtención de nauplios, sin embargo, dado que el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño es posible que el experimento no contara con potencia suficiente para encontrar diferencias entre los tratamientos.

Por otro lado, contrario a la hipótesis planteada de que utilizar ASW en vez de agua de mar pudiera aumentar el número de nauplios obtenidos al evitar la capacitación acrosomal por efecto del ion calcio sobre los espermatozoides, el análisis del modelo mixto reveló que el tratamiento E1 no fue diferente de MP ($P>0.05$) observando en la media (error estándar) en valor de la escala original utilizando la ecuación Box Cox de 5388 (5.5) para MP y 102 (4.4) para E1. Sin embargo, el modelo logístico mostró que fue casi 4 veces más probable obtener nauplios utilizando MP que E1 ($P=0.0782$), aunque las razones de ello no pudieron ser determinadas con los experimentos realizados.

Los resultados obtenidos son alentadores, puesto que a pesar de obtenerse un número bajo de nauplios por hembra, por primera vez se documenta descendencia viable en el *P. vannamei* utilizando espermatozoides conservados en el corto plazo, con relación macho-hembra de 1:4 con un promedio (e.e) de 3.43 (0.76) hembras fertilizadas por macho (i.e., una eficiencia de 85.7%). La implementación de la técnica de IA utilizando semen preservado en ASW puede ser considerada como una alternativa en casos específicos, cuando por razones técnicas o sanitarias sea necesario utilizar semen diluido y preservado a corto plazo, considerando que el porcentaje de éxito en la obtención del número de nauplios se verá disminuido. También pudiera resultar ser un método práctico para la obtención de un mayor número de familias de medios hermanos contemporáneos en el campo de la investigación, particularmente en el mejoramiento genético.

6. Conclusiones

Tras comparar el porcentaje de viabilidad de los gametos utilizando el kit de tinción en los 3 extensores seleccionados, se observó que ASW aparentemente mantuvo un mayor número de espermatozoides viables durante las 12 horas de almacenamiento a temperatura ambiente.

Se constató que es posible obtener nauplios utilizando una relación macho-hembra de 1:4 con y sin la adición del extensor ASW. Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados utilizando el extensor (8 machos de un total de 14, obteniendo nauplios con 4 hembras cada uno) comparado con el tratamiento donde no se utilizó el extensor (2 machos de un total de 12 obteniendo nauplios con 4 hembras), mismos que pudieron constatarse al analizar el número de gametos que permanecieron viables durante la conservación y el número de nauplios producidos por hembra, sino también al analizar la variable binaria éxito/fracaso (1/0) en la obtención de nauplios por hembra.

Se concluye que al mezclar medio espermatóforo con ASW para su uso en IA se obtiene mayor cantidad de nauplios por hembra, y también se mejora la tasa de éxito para la producción de descendencia, comparada con esa misma cantidad de espermátóforos sin extensor.

En contraste, utilizando el método de IA con el método MP, consistente en el uso de un espermatóforo, agua de mar como agente humectante y relación macho-hembra 1:2 se obtuvo un número de nauplios significativamente mayor que utilizando el método D1, consistente en el uso de medio espermatóforo preservado en extensor durante 4 horas antes de su uso. No obstante, obtener un número menor de nauplios al aumentar la relación macho-hembra de 1:2 a 1:4 y utilizar esperma preservado, era un resultado esperado.

El perfeccionamiento de la técnica de dilución descrita y el análisis costo-beneficio de la misma proveerá de la información necesaria para el uso de esperma de camarón preservado a corto plazo.

1. Bibliografía

- Akarasanon, K., Damrongphol, P., Poolsanguan, W., 2004. Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35, 1415-1420.
- Alfaro, J., Lozano, X., 1993. Development and Deterioration of Spermatophores in Pond-Reared *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 522-529.
- Alfaro, J., Ulate, K., Vargas, M., 2007. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture* 270, 436-442.
- Araneda, M., Pérez, E.P., Gasca-Leyva, E., 2008. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state based on length and weight. *Aquaculture* 283, 13-18.
- Arce, S.M., Moss, S.M., Argue, B.J., 2000. Artificial insemination and spawning of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: implications for a selective breeding program. UJNR Technical Report 28, 5-7.
- Arcos, F.G., Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 2005. Larval quality in relation to consecutive spawnings in white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* 36, 890-897.
- Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J., Demianowicz, W., 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 56, 177-192.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfson, G., Johnsen, S., 2006. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. I: optimizing the protocol. *Theriogenology* 66, 2025-2035.
- Bart, A.N., Choosuk, S., Thakur, D.P., 2006. Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research* 37, 523-528.
- Bauer, R.T., Min, L.J., 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): Formation in the male reproductive tract and disposition in the inseminated female. *Biol. Bull*, 174- 185.
- Bell, T.A., Lightner, D.V., 1988. Manual de histología del camarón penaeido normal. Allen Press, Inc., Lawrence, Kansas. USA, 120 pp.
- Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture* 236, 1-9.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., 1998. Male viability determinations in *Penaeus vannamei*: evaluation of short-term storage of spermatophores up to 36 h and comparison of Ca-free saline and seawater as sperm homogenate media. *Aquaculture* 160, 63-67.
- Briggs, M., 2007. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*, FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. . FAO, Rome.

- Bückle, L.F., Barón, B., Hernández, M., 2006. Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. *Rev. Biol. Trop.* 54, 745-753.
- Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P., 2009. Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species. CRC Press, Boca Ratón, FL, 571 pp.
- Castillo-Juárez, H., Casares, J.C.Q., Campos-Montes, G., Villela, C.C., Ortega, A.M., Montaldo, H.H., 2007. Heritability for body weight at harvest size in the Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, from a multi-environment experiment using univariate and multivariate animal models. *Aquaculture* 273, 42-49.
- Ceballos-Vázquez, B.P., Aparicio-Simón, B., Palacios, E., Racotta, I.S., 2004. Sperm quality over consecutive spermatophore regenerations in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 35, 178-188.
- Ceballos Vázquez, B.P., Rosas, C., Racotta, I.S., 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 228, 141-151.
- Christensen, J.M., Tiersch, T.R., 1997. Cryopreservation of channel catfish spermatozoa: Effect of cryoprotectant, straw size, and formulation of extender. *Theriogenology* 47, 639-645.
- Davis, D.A., Samocha, T.M., Boyd, C.E., 2004. Acclimating pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to inland, low-salinity waters. SRAC Publication 2601, 1-8.
- Diamond, S., Powell, A., Shields, R.J., Rowley, A.F., 2008. Is spermatophore melanisation in captive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) a result of an auto-immune response? *Aquaculture* 285, 14-18.
- FAO, 2009. Visión general del sector acuícola nacional. México
- Foote, R.H., 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. Anim Sci.* 80, 1-10.
- Gitterle, T., Rye, M., Salte, R., Cock, J., Johansen, H., Lozano, C., Suárez, J.A., Gjerde, B., 2005. Genetic (co)variation in harvest body weight and survival in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* under standard commercial conditions. *Aquaculture* 243, 83-92.
- Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research* 31, 259-271.
- Heitzmann, J.C., Diter, A., Aquacop, 1993. Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931: dependence on the intermolt cycle. *Aquaculture* 116, 91-98.
- Ibarra, A.M., Racotta, I.S., Arcos, F.G., Palacios, E., 2007. Progress on the genetics of reproductive performance in penaeid shrimp. *Aquaculture* 268, 23-43.
- Kim, D.H., Jo, Q., Choi, J.H., Yun, S.J., Oh, T.Y., Kim, B.K., Han, C.-H., 2003. Sperm structure of the pandalid shrimp *Pandalopsis japonica* (decapoda, pandalidae). *Journal of Crustacean Biology* 23, 23-32.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1998. An efficient method for cryopreservation of testicular sperm from the Northern pike, *Esox lucius* L. *Aquaculture Research* 29, 341-347.

- Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 65, 363-370.
- Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1991. Spermatophore Generation Times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei*, and *P. stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society* 22, 244-251.
- Lezcano, M., Granja, C., Salazar, M., 2004. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology* 48, 349-356.
- Liu, Q.H., Li, J., Xiao, Z.Z., Ding, F.H., Yu, D.D., Xu, X.Z., 2006. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 10, 1-6.
- Lobato, G.P., 1992. Estudio socioeconómico del cultivo de camarón realizado por sociedades cooperativas. FAO.
- Lotz, J.M., 1992. Developing specific pathogen-free (SPF) animal populations for aquaculture: A case study for IHHN virus of Penaeid shrimp, Proceedings of a workshop, Honolulu, Hawaii, pp. 392.
- Madsen, L., Møller, J.D., Dalsgaard, I., 2005. Flavobacterium psychrophilum in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment. *Journal of Fish Diseases* 28, 39-47.
- Martínez, C.L.R., 1999. Cultivo de camarones peneidos - principios y prácticas. AGT Editor, S.A., México D.F., 283 pp.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I., Sorgeloos, P., 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *J Exp Biol* 205, 3107-3122.
- Misamore, M., Browdy, C.L., 1997. Evaluating hybridization potential between *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* through natural mating, artificial insemination and in vitro fertilization. *Aquaculture* 150, 1-10.
- Muchlisin, Z.A., Hashim, R., Chong, A.S., 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology* 62, 25-34.
- Muncy, R.J., 1984. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates. (South Atlantic)-white shrimp. In: Serv., U.S.F.W. (Ed.). U.S. Army Corps of Engineers, pp. 19.
- Nimrat, S., Bart, A.N., Keatsaksit, A., Vuthiphandchai, V., 2008. Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage, *Aquaculture*, pp. 247-253.
- Nimrat, S., Siriboonlamom, S., Zhang, S., Xu, Y., Vuthiphandchai, V., 2006. Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. *Aquaculture* 261, 944-951.
- Okumura, S., Okamoto, K., Oomori, R., Nakazono, A., 2002. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Aquaculture* 206, 165-173.

- Park, C., Chapman, F.A., 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. *North American Journal of Aquaculture* 67, 52-57.
- Pérez, y.P.F., Pérez, G.J.F., 1985. Reproducción animal: Inseminación artificial y trasplante de embriones. Editorial científico-médica, 900 pp.
- Pongtippatee, P., Vanichviriyakit, R., Chavadej, J., Plodpai, P., Pratoomchart, B., Sobhon, P., Withyachumnarnkul, B., 2007. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research* 38, 1635-1644.
- Ramírez, Z.J.R., s.f. Estudio de camaronicultura en el estado de Sinaloa. Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, pp. 49.
- Rath, D., Schuberth, H., Coy, P., Taylor, U., 2008. Sperm interactions from insemination to fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 2-11.
- Ritar, A.J., Campet, M., 2000. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris lineata*). *Theriogenology* 54, 467-480.
- Rojas, E., Alfaro, J., 2006. *In vitro* manipulation of egg activation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus*. Universidad Nacional, Puntarenas, Costa Rica, pp. 20.
- Ruiz, M.E., Rivera, B., Ruiz, A., 1998. Reproducción animal: Métodos de estudio en sistemas. IICA, San José, Costa Rica, 367 pp.
- SAGARPA, 2009. El sector pesquero estima crecer 10 por ciento en 2009: ACJ, México.
- Szabo, G., Muller, T., Bercsenyi, M., Urbanyi, B., Kucska, I.B., Horvath, A., 2005. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. Short communication. *Acta Biol Hung* 56, 173-175.
- Tave, D., Brown Jr, A., 1981. A new device to help facilitate manual spermatophore transfer in penaeid shrimp. *Aquaculture* 25, 299-301.
- Tiersch, T.R., Mazik, P.M., 2000. Cryopreservation in Aquatic Species. *World Aquaculture Society*, Luisiana, EU, 439 pp.
- Wang, Q., 1995. Egg water induced reaccion and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: Dietary effects on sperm quality. *Journal of the World Aquaculture Society* 26, 261-271.
- Yano, I., Kanna, R.A., Oayama, R.N., Wyban, J.A., 1997. Mating behavior in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Marine Biology* 97, 171-175.