



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



**“ MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA TRIPSINA Y LA α -AMILASA EN
FARFANTEPENAEUS DUORARUM, DETERMINADA POR SUS HÁBITOS
ALIMENTICIOS EN SU AMBIENTE NATURAL ”**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Biología Marina)

p r e s e n t a

HERÓN ARAGÓN AXOMULCO

Directores de tesis: DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS

DR. FRANCISCO XAVIER CHIAPPA CARRARA

Comité tutorial: DR. LUIS A. SOTO GONZÁLEZ

DR. RENÉ CÁRDENAS VÁZQUEZ

DR. ALBERTO J. SÁNCHEZ MARTÍNEZ

México, D. F., Agosto 2011.



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 esposa Lulú, por todo el apoyo que me brindó para concretar mis aspiraciones académicas, a mis hijos Nahir y Katia, para quienes espero ser un buen ejemplo en sus proyectos de vida, y por supuesto, a quien debo mi existencia, Angelita.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M. con sede en Sisal, Yucatán, bajo la codirección de la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés y el Dr. Francisco Xavier Chiappa Carrara, con el apoyo financiero del proyecto CONACYT-CIENCIA BASICA (60824). Se agradece a la Dra. Leticia Arena, por su apoyo en los análisis de Biología Molecular, al M. en C. Carlos Maldonado por su ayuda en la realización de análisis enzimáticos y de Biología Molecular, a los técnicos académicos: M. en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga, M. en C. María de Carmen Galindo de Santiago, M. en C. Maribel Badillo por su apoyo en las diferentes etapas de este trabajo y al M. en C. Alfredo Gallardo y Sr. Mex por su apoyo en la logística de campo. Asimismo, se agradece el apoyo en campo de los estudiantes de Licenciatura: Sara Ortiz, Emilio Guzmán y Ana Mayela, de Maestría José Luis Bonilla y de Doctorado Mauricio Emerenciano.

Del CINVESTAV Unidad Mérida, al entonces estudiante de Doctorado Marco A. May-Kú, por sus acertados comentarios y sugerencias en la identificación taxonómica de *Farfantepenaeus duorarum*. A la Federación de Lancheros de Celestún, estando como Presidente de la Organización el Sr. Victor Nah Carmona, quien apoyó con la embarcación usada para los muestreos y, a los pescadores, Tibursio Dzib Canul y Pablo Roberto Palomino.

Asimismo, se agradece al Dr. Luis Soto, por sus valiosos comentarios que fortalecieron esta investigación, y al Biólogo Carlos Illescas, por las facilidades otorgadas en el trabajo realizado en el Laboratorio de Bentos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

ÍNDICE	PÁGINA
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	
1.1. GENERALIDADES.	13
1.2. ALIMENTACIÓN.	14
1.3. ENZIMAS DIGESTIVAS.	16
1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	18
1.5. OBJETIVOS.	19
1.6. HIPÓTESIS.	20
CAPÍTULO 2. ÁREA DE ESTUDIO.	21
CAPÍTULO 3. MÉTODOS	
3.1. SELECCIÓN DE LA ESPECIE.	24
3.2. SEDIMENTO.	27
3.3. PLANCTON.	27
3.4. MUESTREO DE <i>F. DUORARUM</i> .	28
3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	31
3.6. ELECTROFORESIS GEL-SUSTRATO.	33
3.7. CONTENIDO ESTOMACAL.	35
3.8. ANÁLISIS DE ISÓTOPOS ESTABLES $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$.	37
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	38
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	40
4.1. ESTADIOS DE MUDA.	42
4.2. PROPORCIÓN POR SEXOS.	45
4.3. VARIACIÓN DE PESO HÚMEDO DE <i>F. DUORARUM</i> .	46
4.4. VARIACIÓN DE LONGITUD CEFALOTORÁXICA DE <i>F. DUORARUM</i> .	48
4.5. ANÁLISIS DE ENZIMAS.	50
4.6. ISOFORMAS DE TRIPSINA Y α -AMILASA.	56
4.7. CONTENIDO ESTOMACAL.	58
4.8. ANÁLISIS ISOTÓPICO ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$).	61
4.9. COMPARATIVO GENERAL.	65
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	80
LITERATURA CITADA.	82

APÉNDICE 1; IMÁGENES DE CONTENIDO ESTOMACAL EN <i>F. DUORARUM</i> .	89
APÉNDICE 2; PUBLICACIÓN.	99

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1.- Estructura general del cuerpo de un camarón peneido.	13
Figura 2.- Esquema de sistema digestivo de <i>F. duorarum</i> .	17
Figura 3.- Cefalotorax de <i>F. duorarum</i> .	25
Figura 4.- Sexto segmento abdominal de <i>F. duorarum</i> .	26
Figura 5.- Télico de <i>F. duorarum</i> .	26
Figura 6.- Petasma de <i>F. duorarum</i> .	26
Figura 7.- Localización geográfica del área de muestreo en el estuario "Ría de Celestún", Yucatán.	29
Figura 8.- Frecuencias de captura de <i>F. duorarum</i> por estadios de muda durante ciclos lunares completos (N=1189).	43
Figura 9.- Frecuencias de captura de <i>F. duorarum</i> respecto a sus estadios de muda en las tres épocas del año (N=1189).	44
Figura 10.- Variación de estadios de muda <i>F. duorarum</i> respecto a su sexo en las tres épocas del año (N=1189).	45
Figura 11.- Frecuencia de captura de <i>F. duorarum</i> respecto a su sexo; a) por épocas anuales y b) captura global de las tres épocas del año (N=1189).	46
Figura 12.- Variación del peso de <i>F. duorarum</i> por época del año (N=1189).	47
Figura 13.- Variación del peso de <i>F. duorarum</i> respecto a su sexo. Capturas de las tres épocas anuales (N=1189).	48
Figura 14.- Variación de longitud cefalotorácica de <i>F. duorarum</i> en las tres épocas del año (N=1189).	49
Figura 15.- Variación de la longitud cefalotorácica de <i>F. duorarum</i> respecto a su sexo. Capturas en las tres épocas del año (N=1189).	49
Figura 16.- Actividad de la tripsina en <i>F. duorarum</i> en las tres épocas del año (N=89).	51
Figura 17.- Actividad de la tripsina en <i>F. duorarum</i> respecto a sus estadios de muda en las tres épocas del año (N=89).	52
Figura 18.- Actividad de la α -amilasa en <i>F. duorarum</i> en las tres épocas del año (N=89).	53
Figura 19.- Actividad de la α -amilasa en <i>F. duorarum</i> respecto a sus estadios de muda en las tres épocas del año (N=89).	54
Figura 20.- Razón de α -amilasa / tripsina en <i>F. duorarum</i> en las tres épocas del año (N=89).	55

Figura 21.- Isoformas de tripsina en <i>F. duorarum</i> durante las tres épocas anuales (N=89).	56
Figura 22.- Isoformas de α -amilasa en <i>F. duorarum</i> en las tres épocas anuales (N=89).	57
Figura 23.- Variación de los componentes alimenticios encontrados en <i>F. duorarum</i> en las tres épocas del año (N=124).	60
Figura 24.- Nivel trófico de <i>F. duorarum</i> en las tres épocas del año (N=124).	61
Figura 25.- $\delta^{13}\text{C}$ de <i>F. duorarum</i> en las tres épocas anuales (N=24).	62
Figura 26.- $\delta^{15}\text{N}$ de <i>F. duorarum</i> en las tres épocas anuales (N=24).	63
Figura 27.- Señal isotópica de <i>F. duorarum</i> de Celestún en tres épocas anuales (N=24) comparado con valores de referencia.	64
Figura 28.- Parámetros relacionados con la actividad de tripsina y α -amilasa en <i>F. duorarum</i> de la laguna de Celestún, en las tres épocas del año.	65
Figura 29.- Comparativo de la actividad de tripsina y α -amilasa respecto al Nivel trófico calculado en <i>F. duorarum</i> (N=89,89 y 124 respectivamente).	77

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINA
Tabla 1.- Parámetros fisicoquímicos registrados al inicio de cada muestreo de <i>F. duorarum</i> , respecto a las variaciones de marea y frecuencias de captura.	40
Tabla 2.- Frecuencias de captura de <i>F. duorarum</i> en la época de secas (abril de 2007).	41
Tabla 3.- Frecuencias de captura de <i>F. duorarum</i> en la época de lluvias (agosto de 2007).	41
Tabla 4.- Frecuencias de captura de <i>F. duorarum</i> en la época de Nortes (febrero de 2008).	42
Tabla 5.- ANDEVA de tripsina en <i>F. duorarum</i> de las tres épocas del año (N=89).	50
Tabla 6.- ANDEVA de α -amilasa en <i>F. duorarum</i> de las tres épocas del año (N=89).	53
Tabla 7.- Razón de α -amilasa/tripsina por estadio de muda de <i>F. duorarum</i> en las tres épocas del año (N=89).	55
Tabla 8.- Repleción gástrica de <i>F. duorarum</i> en las tres épocas del año (N=124).	58
Tabla 9.- Composición del contenido estomacal de <i>F. duorarum</i> juveniles colectados en un ciclo anual. Frecuencia de ocurrencia e Índice de Importancia de presas (IIMP) (N=124).	59
Tabla 10.-Isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) y valores de C y N de <i>F. duorarum</i> juveniles (N=24), sedimento, plancton y <i>H. wrightii</i> del estuario de Celestún.	62

RESUMEN

El presente trabajo hace referencia a la actividad enzimática digestiva en juveniles silvestres de *Farfantepenaeus duorarum* del estuario de Celestún, Yucatán, México, en las tres épocas del año (secas, lluvias y Nortes), de abril del 2007 a febrero del 2008, con apego a las cuatro fases lunares. La actividad de tripsina y α -amilasa, determinada en tejido fresco de hepatopáncreas, fue correlacionada con el análisis de isozimas, con el análisis de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) y con el análisis de contenido estomacal; en el que se determinó el Índice de Importancia de presas y el Nivel trófico. La modulación de la expresión enzimática en *F. duorarum* tuvo influencia significativa ($p < 0.05$) de dos factores; época del año y estadios de muda, que de manera sinérgica determinaron las variaciones. Las adaptaciones fisiológicas de *F. duorarum*, asociadas con sus estadios de muda, influyeron en la expresión enzimática, sobre todo durante la época de Nortes, con actividad máxima de tripsina de $135.7 \text{ mU mg Hp}^{-1}$ en intermuda C, y de $568.2 \text{ mU mg Hp}^{-1}$ de α -amilasa en el estadio de posmuda B2. La tripsina expresó tres isozimas en las tres épocas del año, pero su mayor actividad se observó en la época de secas, cuando la repleción gástrica estuvo al mínimo y el $\delta^{15}\text{N}$ (14‰) ubicó a los decápodos estudiados en el quinto nivel trófico, al que pertenecen los organismos carnívoros. La α -amilasa también se expresó en las tres épocas del año, pero a diferencia de la tripsina, su mayor actividad se registró en la época de Nortes, con tan solo tres isoformas. En esta época se registró la mayor repleción gástrica en los decápodos, con frecuencias de ocurrencia relevantes en Copepoda y Malacostraca, principales componentes del zooplancton y de la alimentación de *F. duorarum*, hecho que se comprobó con el IIMP de presas, coherente con la razón amilasas/proteasas.

El $\delta^{13}\text{C}$ del músculo de los camarones rosados ($\mu = -20.6\text{‰}$) hizo evidente que se alimentaron básicamente del zooplancton de origen marino, el incremento de la disponibilidad de alimento, sobre todo en la época de Nortes, originó un ajuste en el $\delta^{15}\text{N}$ (11‰) de *F. duorarum*, por lo que se le ubicó en el cuarto nivel trófico; al que corresponden los organismos generalistas oportunistas, mismo que fue concordante con el Nivel trófico calculado, en el que se advirtió una tendencia carnívora.

INTRODUCCIÓN

Los camarones peneidos constituyen uno de los recursos más comercializados en regiones subtropicales y tropicales (Dall *et al.*, 1990), y se explotan de manera artesanal o industrial en su hábitat natural, ya sea marino, salobre o de agua dulce.

En sistemas de cultivo se ha observado que los resultados de producción que se obtienen pueden modificarse, entre otros, por las variaciones ambientales, por el estado de desarrollo del organismo (ontogenia) (Le Moullac *et al.*, 1996, Gamboa, 2001), por sus cambios fisiológicos asociados a sus mudas (Vega-Villasante *et al.*, 2000), y por los requerimientos nutricionales basados en las tendencias de sus hábitos alimenticios (Gaxiola *et al.*, 2005).

El género *Penaeus* (Pérez Farfante, 1997) tiene un enorme potencial de cultivo, en la actualidad son más de 25 especies de este género que se cultivan a nivel mundial, con un incremento promedio del 12 % anual, motivo por el que ha llamado la atención de la investigación científica (Forrellat *et al.*, 2004).

Investigaciones realizadas en México, sobre las posibilidades de mejorar la producción de crustáceos decápodos en el Golfo y Caribe Mexicano, hacen referencia principalmente a *Litopenaeus vannamei*, sin embargo, desde los años setenta, especies como *L. schmitti*, *L. setiferus*, *Farfantepenaeus duorarum* y *F. aztecus*, fueron consideradas potencialmente prometedoras (López-Téllez *et al.*, 2000), razón por la cual investigadores como Caillouet (1972) estudiaron la posibilidad de cultivo de especies endémicas como *F. duorarum*.

Desde 1985, en el Centro Regional de Investigación Pesquera de Campeche, se realizaron investigaciones con *F. duorarum* en sistemas semintensivos

controlados, sus aportaciones permitieron un avance parcial en la domesticación y explotación de esta especie. Posteriormente, como consecuencia de la notable disminución en la captura del camarón rosado, acentuada hacia los años noventas, reportadas por las flotas norteamericanas, cubanas y mexicanas (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2000), surgieron investigaciones como la de Schwamborn y Criales (2000), quienes hicieron referencia de las condiciones ambientales en que esta especie se encontraba en la región de Florida, y describieron a través del análisis de contenido estomacal, los componentes de la dieta alimenticia que utiliza en áreas naturales.

Más tarde se publicaron trabajos de la distribución y abundancia de *F. duorarum* (Pérez-Castañeda *et al.*, 2001) y de modelos de mortalidad (Pérez-Castañeda *et al.*, 2003). Robblee y Hittle (2005) manifestaron la importancia de *F. duorarum* en Florida, dejaron claro que es la especie más abundante en esa región, que representa los mayores ingresos por pesquerías comparados con otras especies y que es considerado como un bioindicador del buen estado de la zona costera. Por su parte, Criales *et al.* (2006) dieron seguimiento a esta especie desde etapas postlarvarias, considerando aspectos que involucraron su reclutamiento en ambientes de transición. Sus resultados señalaron que en Florida, el crecimiento de los decápodos está determinado por las variaciones temporales y espaciales.

Sin embargo, no solo los parámetros físicos determinan el crecimiento de los organismos, también las variaciones químicas del ambiente y los ajustes metabólicos asociados con su desarrollo natural, como los estadios de muda, así como la predisposición genética de su actividad enzimática (Dall *et al.*, 1990) y las variaciones de los componentes alimenticios que dependen del mismo ecosistema. Las variaciones de la actividad enzimática digestiva, así como sus isozimas, permiten

una primera aproximación al tipo de alimentación de un organismo, puesto que existen enzimas específicas para cada uno de los posibles substratos que forman parte de su dieta alimenticia, y la variación de substratos en ambientes naturales tiene como consecuencia la regulación inmediata de su metabolismo, permitiendo con ello la asimilación eficiente de los recursos disponibles (Lovett y Felder, 1990), ya sean de origen vegetal, animal o ambos. También, a través de la relación entre enzimas, como α -amilasa/tripsina, es posible distinguir la tendencia de los hábitos alimenticios de organismos, ya sea hacia la herbivoría o a la carnivoría (Jones *et al.*, 1997).

Si bien es cierto que puede ser compleja la trama trófica en que participa un organismo, y que existen métodos que permiten tener una aproximación de los componentes alimenticios que integra en su dieta, tanto a corto como a largo plazo, es posible tener una mayor precisión si se utiliza el análisis de isótopos estables, específicamente a través de la relación $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, por ser considerados biomarcadores que hacen referencia tanto al origen de los elementos que sirvieron para integrar el músculo, como del lugar que ocupan dentro de la trama trófica (Fry, B., 1988, Wada *et al.*, 1990).

Actualmente, la ecología funcional, como punto de convergencia sinérgica entre la ecología y la fisiología, hace uso de pruebas específicas como los isótopos estables para establecer relaciones entre los componentes de un sistema, como en el trabajo referido por Schwamborn y Criales (2000), quienes estudiaron las estrategias alimenticias de *F. duorarum* en el Sur de Florida. En su trabajo determinaron los componentes dominantes en la dieta de camarones rosados juveniles, con la intención de contribuir en el desarrollo de un modelo trófico en

ecosistemas de pastos sumergidos. La relación ^{13}C ^{15}N obtenida de contenido estomacal, sirvió para corroborar los resultados que lograron al revisar los estómagos de los crustáceos.

Los análisis de isótopos estables de ^{13}C y ^{15}N son versátiles, puesto que tanto sus aplicaciones como los materiales sobre los que se pueden realizar son variados. Sin embargo, es necesario señalar que deben considerarse como una herramienta más que permite complementar otros tipos de análisis.

Los resultados de esta investigación, como producto de un trabajo multidisciplinario, pueden servir de referencia en la alimentación de crustáceos decápodos en ambientes controlados, tanto en la forma de producción a base de “alimentos funcionales” (Vega-Villasante *et al.*, 2002), como en la “acuicultura orgánica” (Villamar, 2003, Barclay, 2004), cuya propuesta de producción tiene afinidad con el presente trabajo, puesto que basa su producción en principios como: a) Usar alimentos naturales, sin incluir complementos comerciales, b) Favorecer el flujo natural de las cadenas alimenticias, incluyendo el control de posibles plagas o patógenos y c) Utilizar especies endémicas, evitando su alteración genética.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. GENERALIDADES.

Existen en el mundo alrededor de 45 especies de camarón y 17 de langostinos, sin embargo, es necesario señalar que los langostinos son en realidad camarones. El término langostino se utiliza para referirse a los camarones de mayor tamaño (Roldán *et al.*, 2002). El camarón es uno de los más valiosos productos del mar. Su ciclo de vida incluye una fase planctónica en estado de larva y postlarva, y como bentónico en sus fases juveniles y de adulto. Está formado por un caparacho conocido como exoesqueleto, que cubre el cefalotórax y el abdomen (fig. 1), denominados también como cabeza y cola, respectivamente, y alcanza una longevidad de 1 a 2 años (Pérez-Castañeda *et al.*, 2001).

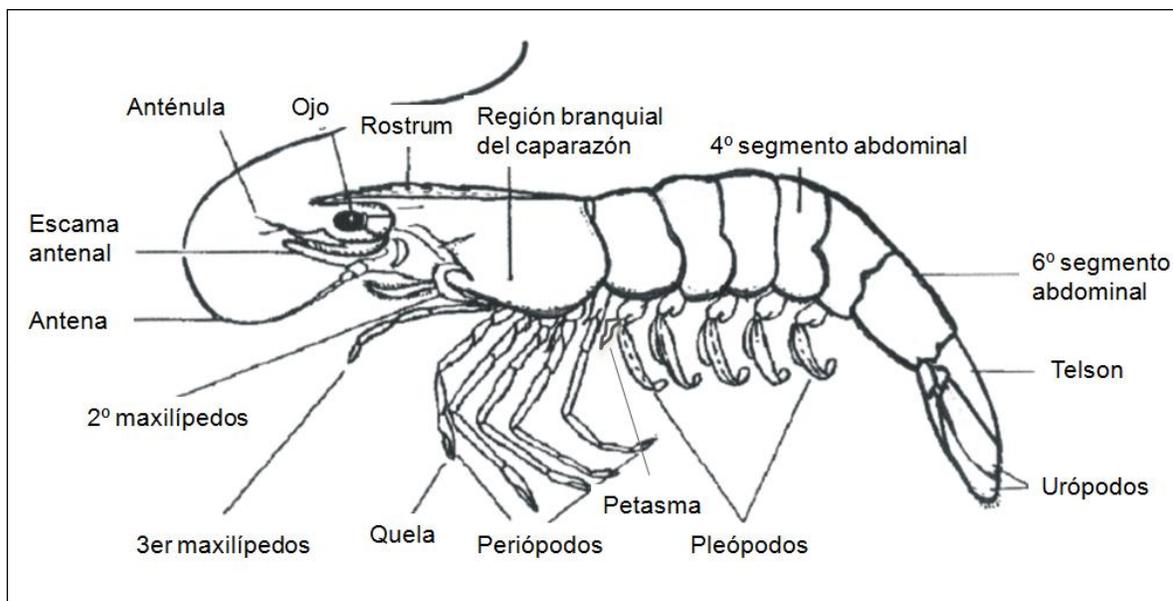


Figura 1.- Estructura general del cuerpo de un camarón peneído. (*L. vannamei*; Lee y Wickins, 1992).

Entre los crustáceos decápodos más comercializados en el Atlántico tropical de América del Norte podemos señalar a las siguientes especies: camarón blanco

(*Litopenaeus schmitti*), camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*) y el camarón rojo del Caribe (*F. brasiliensis*) (Roldán *et al.*, 2002). Sin embargo, existen otras especies como el camarón café (*F. aztecus*) y el camarón rosado (*F. notialis*) (Pérez-Castañeda *et al.*, 1999), de menor importancia comercial por su reducida abundancia.

1.2. ALIMENTACIÓN

El crecimiento normal de los camarones peneidos requiere de alimentos que varían conforme a sus etapas de desarrollo; planctónico o bentónico (Rosas *et al.*, 2002), del ambiente en que se encuentran; mar o estuario, del tipo de alimento disponible y de la preferencia en sus hábitos alimenticios (Gaxiola *et al.*, 2005).

En ambientes naturales una larva se alimenta del vitelo, al llegar a protozoa de pequeñas algas microscópicas que forman parte del fitoplancton, en la fase de mysis y post-larvas de organismos del zooplancton y, como juveniles y adultos se alimentan de pequeñas plantas y animales, detritus orgánico e inorgánico, dinoflagelados, nemátodos, foraminíferos, algas, peces, caracoles, calamares, almejas, anélidos, insectos y, en algunos casos se alimentan de otros crustáceos (Muhlia-Almazán *et al.*, 2003). Sin embargo, aunque juveniles y adultos son bentónicos, en la etapa juvenil dispone básicamente de alimentos estuarinos, y la composición de la dieta es muy distinta a la que pueden tener como adultos en ambientes marinos. De igual forma, aunque los peneidos son considerados omnívoros, el ambiente en que se encuentran puede favorecer su inclinación a la carnivoría o a la herbivoría (Forrellat *et al.*, 2004).

Estudios realizados con crustáceos decápodos, indican que existe relación entre ritmicidad lunar y el proceso del ciclo de muda (Dall *et al.*, 1990), y por consiguiente con su alimentación (Echeverría *et al.*, 2003). Entre los trabajos que se han generado en torno a la influencia de los ciclos lunares, Molina-Poveda *et al.*, 2002, señaló que cuando se dejaron de alimentar a los camarones en condiciones controladas, en los días del cambio de la fase lunar a cuarto menguante y el primer día de luna nueva, presentaron mayor crecimiento que los demás. Con esta observación sugirió la existencia de sincronía entre el metabolismo de los peneidos y las fases lunares, cuya consecuencia, en términos económicos, podría representar un ahorro importante en cultivos controlados.

Por otra parte, a pesar de que los ciclos lunares actúan sobre el metabolismo de los decápodos, es posible que no tengan la misma influencia en todas las especies, por ejemplo, Fuss y Ogren (1966), trabajaron con *F. duorarum* y señalaron que en luna llena fueron mayores los porcentajes de muda en comparación con los de luna nueva, hecho que se asoció con menor movilidad de los decápodos durante luna llena. En contraste, con *P. longirostris*, se observaron las mayores capturas durante luna llena y las menores en luna nueva (De Coursey, 1983).

Así como las fases lunares tienen relación con los ciclos de muda en los decápodos, también se tienen registros de su influencia sobre los procesos de alimentación, como señaló Dall *et al.* (1990) en *P. brasiliensis* y *P. paulensis*. En estas especies observó que el efecto del ciclo lunar sobre la ingestión de alimento se traducía en bajo consumo de alimento en luna llena, seguido de un incremento en cuarto menguante y luna nueva hasta alcanzar el máximo consumo en cuarto creciente. Por lo tanto, al observarse ajustes en el consumo de alimento, es posible

que la actividad enzimática digestiva también muestre cambios considerables, por lo que al hacer un seguimiento de la manera en que *F. duorarum* puede ser influido en su alimentación y metabolismo, se tendrá un panorama más claro de los requerimientos básicos de esta especie en condiciones naturales.

1.3. ENZIMAS DIGESTIVAS.

La actividad enzimática digestiva de crustáceos decápodos juveniles varía con la composición de los recursos disponibles en su entorno natural, así como con los cambios estacionales y ritmos circadianos que caracterizan a los estuarios donde se desarrollan (Schwamborn y Criales, 2000). Así mismo, los crustáceos decápodos muestran variaciones en los requerimientos enzimáticos porque los cambios ontogenéticos determinan los ajustes morfológicos de su sistema digestivo, y reflejan en consecuencia las variaciones en los hábitos de vida y alimenticios en larvas, postlarvas, juveniles y adultos (Le Moullac *et al.*, 1996).

Las enzimas son consideradas biocatalizadores de naturaleza proteica, gran parte de ellas se producen en la glándula digestiva (Dall *et al.*, 1990) (fig. 2), también llamada hepatopáncreas (Hp) (Van-Wormhoudt *et al.*, 1998). Todas las reacciones químicas del metabolismo celular se realizan gracias a la acción de catalizadores o enzimas y la sustancia sobre la que actúan, conocida como sustrato.

La actividad de las enzimas digestivas del hepatopáncreas puede presentar variaciones ocasionadas por ayuno, edad, tamaño del organismo, cantidad y frecuencia de alimentación, fuente y nivel de proteína en alimento, estimulantes alimenticios y el estadio de muda (Arenal *et al.*, 2002). El tipo de enzimas que sintetiza un organismo está determinado por las características de su especie, y se

clasifican como endógenas y exógenas. En procesos digestivos de *L. vannamei* se determinó la participación de enzimas endógenas como tripsina, quimotripsina, aminopeptidasa, lipasas, carbohidrasas y carbopeptidasas, y algunas consideradas exógenas como quitinasa, colagenasa y celulasa (Molina-Poveda *et al.*, 2002).

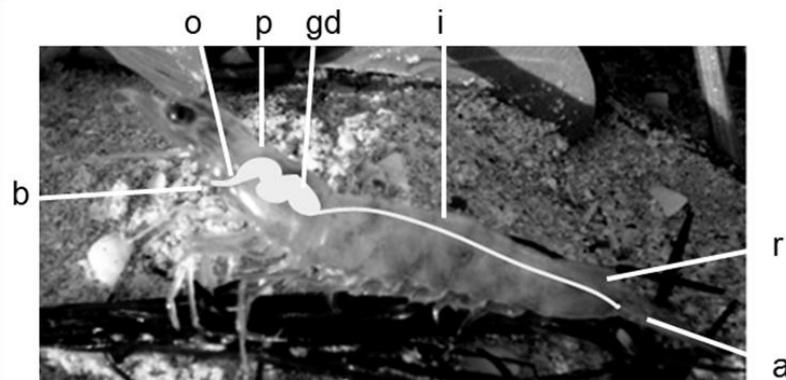


Figura 2.- Esquema de sistema digestivo de *F. duorarum*; de acuerdo con nomenclatura de Dall *et al.*, 1990; b, boca; o, oesófago; p, proventrículos; gd, glándula digestiva; i, intestino medio; r, recto; a, ano.

A pesar de que todas las enzimas cumplen una función específica, algunas de ellas son consideradas más relevantes que otras, entre ellas las lipasas (Forrellat *et al.*, 2004) por intervenir en la asimilación de los lípidos, la principal reserva energética. Otras de las enzimas sobresalientes por su participación en los procesos digestivos, consideradas como indicadores del metabolismo de carbohidratos en larvas y postlarvas de *L. schmitti* son β -glucosidasa y α -amilasa (Arenal *et al.*, 2002), entre las que normalmente se observa una correlación lineal de su actividad enzimática. Sin embargo, investigadores como Sainz *et al.* (2004) y Cara *et al.* (2004) coinciden en que la tripsina es una de las más importantes porque participa en el proceso de digestión proteica, y por consiguiente, en la asimilación y utilización de nutrientes, tanto en estados larvarios como en adultos.

La presencia de las enzimas proteinasas en el tracto digestivo, entre ellas la tripsina, intervienen hasta en un 60 % de la hidrólisis proteica de los alimentos ingeridos por los crustáceos (Galgani *et al.*, 1984, Lovett y Felder, 1990, Le Moullac *et al.*, 1996, Picos-García *et al.*, 2000). La actividad de la tripsina se complementa con la actividad de la amilasa; enzima carbohidrasa, por lo que se les considera como las enzimas más activas en especies como *L. vannamei* (Van Wormhoudt *et al.*, 1998, Gaxiola *et al.*, 2005). De igual manera, en estudios larvarios de peces (Cara *et al.*, 2004), la tripsina juega un papel fundamental y se utiliza como un indicador del status nutricional, por considerarse una enzima clave en el proceso de digestión y porque sus niveles de secreción están relacionados con la ingesta de alimento y repleción gástrica.

A través del estudio de enzimas digestivas como tripsina y la α -amilasa en decápodos es posible ampliar el conocimiento relacionado con su metabolismo, sus capacidades y preferencias alimenticias.

1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los peneidos tienen un potencial económico que llama la atención a nivel mundial, por tal motivo se han realizado en torno a ellos diversas investigaciones, tanto en ambientes naturales (Schwamborn y Criales, 2000, Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2006), como en ambientes controlados (Cruz-Suárez, 1998, Sánchez *et al.*, 2002), en aspectos relacionados con su biología, ecología y fisiología, entre otros. Gracias a dichos estudios se tiene información de los ajustes metabólicos que permiten el desarrollo de los decápodos, así como de su tendencia a la omnivoría,

aunque algunas especies son más vegetarianas y otras más carnívoras (Wikins, 1976).

De acuerdo con el estado de desarrollo y el tipo de alimento que consumen los peneidos, se han reportado variaciones en su actividad enzimática digestiva (Lovett y Felder, 1990, Molina-Poveda *et al.*, 2002, Arenal *et al.*, 2002), asociadas con la temperatura, con los ciclos de muda, con las fases lunares (Echeverría *et al.*, 2003) y con el ritmo circadiano alimenticio (Gaxiola *et al.*, 2005), sin embargo, aún existen aspectos por explorar, por ejemplo, si cambia la actividad de las enzimas digestivas conforme a los ajustes en los hábitos alimenticios de los peneidos, asociados con sus estadios de muda y la posible influencia de las épocas del año en su ambiente estuarino.

Al considerar que *Farfantepenaeus duorarum* forma parte de los camarones peneidos y que es una especie endémica del Golfo de México con potencial económico, se planteó la siguiente pregunta: ¿Cambia en *F. duorarum* la actividad de tripsina y α -amilasa, así como sus respectivas isozimas, conforme modifica sus hábitos alimenticios como consecuencia de su inclinación carnívora o herbívora, sus estadios de muda y las épocas del año en su ambiente estuarino?

1.5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en la actividad e isozimas de la tripsina y la α -amilasa, en juveniles silvestres de *Farfantepenaeus duorarum* del estuario de Celestún, Yucatán, respecto a sus estadios de muda, la época del año, su contenido estomacal y su proporción de isótopos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la actividad de tripsina y α -amilasa en *F. duorarum*, en las tres épocas contrastantes que forman al ciclo anual (secas, lluvias y Nortes).
- Establecer la presencia de posibles isozimas de las enzimas tripsina y α -amilasa, así como su relación con la actividad y la composición del contenido estomacal de *F. duorarum*.
- Identificar los componentes del contenido estomacal de *F. duorarum* silvestres.
- Determinar la composición y origen de los elementos que normalmente integran la cadena trófica en que participan los juveniles silvestres de *F. duorarum*.

1.6. HIPÓTESIS

Si en camarones peneidos la expresión de isozimas activas de tripsina y α -amilasa depende de cambios ontogenéticos, temperatura, pH y ritmos circadianos, entonces, es posible que dicha expresión tenga variaciones en *F. duorarum* silvestres de Celestún al cambiar las épocas anuales, los estadios de muda o sus hábitos alimenticios.

CAPÍTULO 2. ÁREA DE ESTUDIO

La zona estuarina de Celestún, Yucatán, se localiza en 20° 45` Norte y 90° 25` Oeste (Pech *et al*, 2007), aproximadamente a 91 km al Oeste de la capital del Estado, Mérida. El clima de la región es cálido húmedo (García, 1986), con temperatura media anual de 28.5°C y precipitación media anual de 760 mm (SARH, 1989), presenta tres épocas marcadas: secas (marzo, abril y mayo), lluvias (junio, julio, agosto, septiembre y octubre) y nortes (noviembre, diciembre, enero y febrero)(Herrera-Silveira, 1993).

El estuario de Celestún es considerado como un sitio cárstico (Herrera-Silveira *et al.*, 1998), protegido por una barrera de arena, ocupa una extensión de 22 km desde la desembocadura al mar hasta la parte más alejada, forma una laguna alargada que corre en forma paralela a la línea de costa. La principal característica batimétrica del estuario es un canal de aproximadamente 100 m de ancho y 15 km de largo (Instituto de Geofísica, 1990), que se localiza en la zona Externa y la zona de Mezcla. Su profundidad oscila entre 0.5 m y 2.50 m aproximadamente.

Las aguas salobres de este estuario son el resultado de la mezcla del agua del Golfo de México y de las aguas subterráneas que emergen en esta zona provenientes del continente, con variaciones que dependen de la época de lluvias. El gradiente de salinidad horizontal es variable, de acuerdo con Herrera-Silveira (1993) el estuario de Celestún se divide en tres zonas: Externa, Mezcla e Interna. La zona Externa; de aproximadamente 4 km a partir de la desembocadura del estuario, es la que muestra la mayor influencia marina, con salinidad mayor a 30 ups. La zona de Mezcla; de aproximadamente 11 km, es más dinámica debido a la mezcla de agua marina y de agua dulce proveniente del subsuelo, su salinidad oscila generalmente

entre 15 y 30 ups. La zona Interna; de aproximadamente 7 km, se caracteriza por ser oligohalina, con salinidades entre 5 y 12 ups, como consecuencia de la mayor influencia de aguas dulces subterráneas que se incrementan en la época de lluvias y la escasa influencia de las mareas. La columna de agua no muestra estratificación por los procesos de mezcla, determinados por la escasa profundidad y la influencia del viento.

La concentración anual de oxígeno disuelto varía entre 2.5 mg l-1 en la zona Interna y > 8.5 mg l-1 en la zona Externa; los valores más altos se observan durante la época de nortes. La mayor concentración de NO_3^- se observa en la zona Interna (>40 μM), y con el inicio de la época de lluvias se incrementa su concentración en toda la laguna. Durante la época de nortes se observan las mayores concentraciones de nitratos en la zona de Mezcla, y normalmente decrecen de la zona Interna hasta la zona Externa durante el ciclo anual. La concentración de PO_3^- es más alta (>9 μM) en la zona Interna y de Mezcla durante la época de nortes en comparación con el resto del año. Respecto a los SiO_3^- , se han registrado en el estuario de Celestún concentraciones entre <1 a 280 μM , las mayores concentraciones se observan entre secas y lluvias. Por consiguiente, es posible señalar que las zonas hidrológicas de Celestún se caracterizan de la siguiente forma (UNESCO, 1998): la zona Interna es de baja salinidad, altas concentraciones de nitratos y silicatos y es afectada por agua subterránea. La zona de Mezcla presenta valores intermedios de salinidad y concentraciones de fosfatos y amonio más altos que en el resto del estuario. La zona Externa del estuario es caracterizada por alta salinidad y baja concentración de nutrientes.

El fitoplancton, medido como concentración de clorofila-a, presenta las mayores concentraciones en la zona de Mezcla, sobre todo en la época de lluvias (14-28.5 mg m⁻³). La menor concentración se reporta en la zona interna durante la época de nortes (11.5 mg m⁻³). En cuanto a las macrofitas, su distribución espacial es heterogénea, en la zona Interna se observa principalmente a *Chara fibrosa* y en algunas partes mezclada con *Batophora oesterdi*. En la zona de Mezcla se observan principalmente manchones de *Halodule wrightii*. Al inicio de esta zona se mezclan con algas verdes *Chaetomorpha linum*. La zona Externa presenta manchones de *H. wrightii* dentro del estuario, y fuera de él, franjas de *Thalassia testudinum* (UNESCO, 1998). En la región de Celestún se encuentran manglar de franja (marina y lagunar) y el manglar de cuenca (ciénega baja, chaparro, de cuenca alta y de Petén) (Herrera-Silveira *et al.*, 2000).

Como reserva natural Celestún forma parte del complejo de humedales más grande del sureste de México, que representa gran importancia como hábitat de alimentación, reproducción, hibernación y refugio de poblaciones de aves acuáticas y terrestres, tanto residentes como migratorias

En el estuario de Celestún se practica la captura artesanal de camarones peneidos del género *Farfantepenaeus*, *F. duorarum*, *F. aztecus*, *F. brasilensis* y *F. notialis*, así como también de jaiba y peces de escasa importancia comercial (Defeo *et al.*, 2005).

CAPÍTULO 3. MÉTODOS

3.1. Selección de la especie.

Para realizar el presente trabajo se utilizó a *Farfantepenaeus duorarum* por ser considerada una especie endémica del Golfo de México, que representa la mayor proporción de peneidos (> 30 %) en esta zona (Robblee y Hittle, 2005) y porque su potencial económico la sitúa como una especie altamente rentable (López-Téllez *et al.*, 2000). La composición de capturas en la sonda de Campeche entre 1990 y 2003 reportaron el 73% de rosado, 12% de café, 2% de blanco, 1% de rojo, 10% de roca y 2% de sintético, aunque en términos generales estas proporciones equivalen a una quinta parte de lo que se capturaba hacia los ochentas (SAGARPA, 2006).

El camarón rosado ha sido estudiado por Pérez Farfante (1970,1971) y Pérez Farfante y Kensley (1997), quienes reportaron que se distribuye de la Bahía de Chesapeake a Florida, del Golfo de México hasta Isla Mujeres, Quintana Roo y en Bermuda.

Nombre científico: *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939).

Nombre común: Camarón rosado

Clasificación taxonómica (Pérez Farfante y Kensley, 1997).

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Superclase: Crustacea (Pennant, 1777)

Clase: Malacostraca (Latreille, 1806)

Subclase: Eumalacostraca

Superorden: Eucarida

Orden: Decapoda (Latreille, 1803)

Suborden: Dendrobranchiata (Bate, 1888)

Superfamilia: Penaeoidea (Rafinesque-Schmaltz, 1815)

Familia: Penaeidae (Rafinesque-Schmaltz, 1815)

Género: *Farfantepenaeus* (Pérez Farfante y Kensley, 1997)

Especie: *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939)

La clave de identificación taxonómica de los decápodos juveniles estudiados (Pérez Farfante y Kensley, 1997) señaló como característica relevante de *F. duorarum* el largo del rostrum, que debe coincidir con alguna parte del segundo segmento antenular, pero sin llegar a rebasarlo (fig. 3), así como el valor modal obtenido entre la quilla y el surco del sexto segmento abdominal (fig. 4), que debe ser próximo a 4.5 (ej. altura de quilla 3.2 mm, ancho de surco de 0.7 mm; $3.2/0.7 = 4.5$).

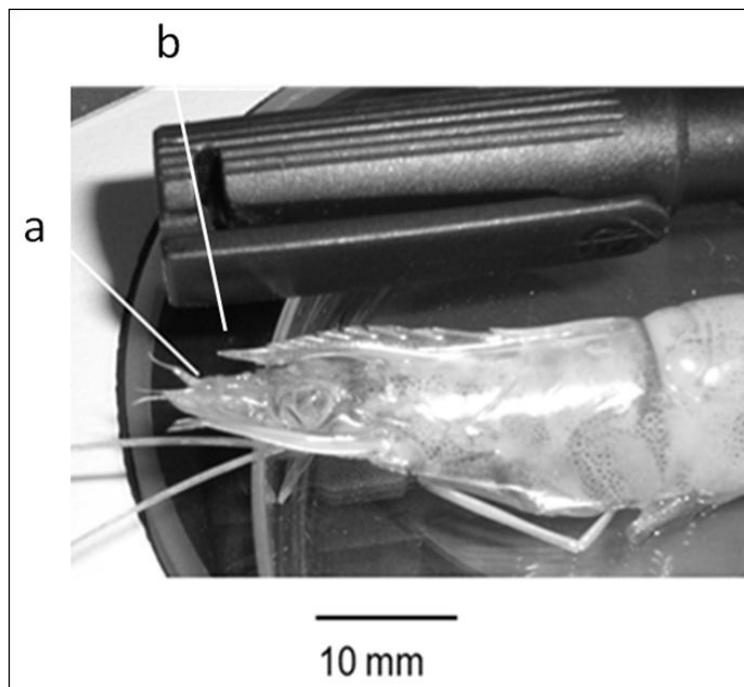


Figura 3.- Cefalotorax de *F. duorarum*. L.C.= 20 mm; a, segundo segmento antenular; b, rostrum.

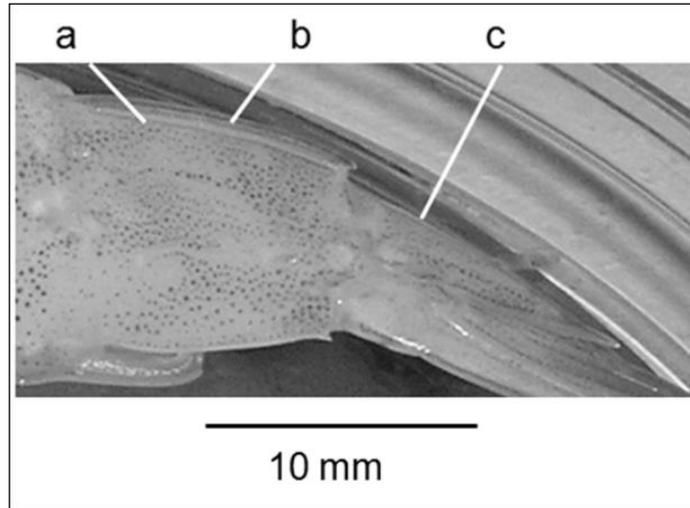


Figura 4.- Sexto segmento abdominal de *F. duorarum*. L.C.= 20 mm;
a, surco; b, quilla; c, telson.

El camarón rosado corresponde a los decápodos de télico cerrado. En organismos juveniles con L.C. > 8 mm y < 15 mm pueden identificarse claramente las estructuras sexuales en proceso de formación. En las hembras (fig. 5) llegan a cerrarse los bordes mediales (Pérez Farfante, 1971); separados por un espacio en forma de v, hasta que alcanzan una L.C. de 20 mm. En los machos (fig. 6) se observa en el primer par de pleópodos el petasma dividido en dos apéndices, que se unen generalmente cuando los decápodos son subadultos; L.C. >15 y < 20 mm (Pérez Farfante, 1970).

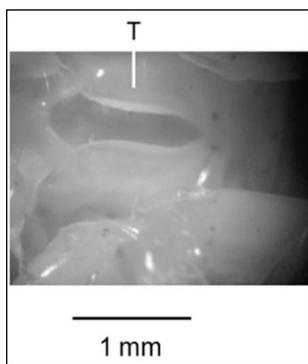


Figura 5.- Télico (T) de *F. duorarum*.
(♀, L.C.= 11 mm).

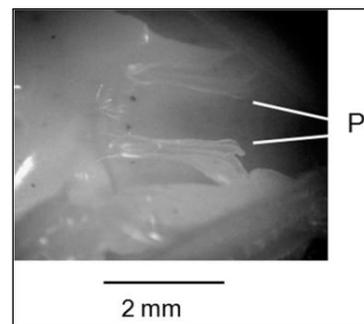


Figura 6.- Petasma (P) de *F. duorarum*.
(♂, L.C.= 14 mm).

3.2. Sedimento.

Con ayuda de una lancha con motor fuera de borda, se buscaron sitios que tuvieran pastos sumergidos, ya que en los muestreos preliminares se observó que donde había manchones de *Halodule wrightii* se tenían mayores capturas de peneidos. Localizado el sitio de muestreo se registraron las coordenadas señaladas por el GPS y se procedió a la obtención de la muestra de sedimento mediante la draga Van Veen. Se obtuvieron dos muestras de aproximadamente 100 cm³ del sedimento superficial del estuario. Cada muestra se colocó en un frasco de plástico de 150 ml, una se trató con cloruro de magnesio al 0.6 mg/l con agua del medio, durante una hora aproximadamente, posteriormente se preservó con formaldehído al 10 %, neutralizado con borax (tetraborato de sodio). La otra muestra de sedimento se preservó en congelación, sin químicos. Los frascos debidamente etiquetados fueron guardados para su posterior revisión en el laboratorio. En forma simultánea con la obtención de sedimento se obtuvieron muestras de *H. wrightii*, que fueron guardadas en bolsas de plástico debidamente etiquetadas y en hielo, posteriormente en refrigeración.

3.3. Plancton.

Se utilizó una red cónica para plancton de 500 μ m, con un diámetro de 50 cm, equipada con flujómetro tipo torpedo. La red fue colocada a estribor, a media agua, mientras la lancha avanzaba a contracorriente a baja velocidad durante media hora, con lo que se obtendría un volumen filtrado de aproximadamente 100,000 litros de agua salobre. El material colectado se dividió en dos muestras de similar tamaño, contenidas en frascos de vidrio de 750 ml, la primera muestra se preservó en hielo y después en refrigeración, sin químicos, para el análisis de isótopos estables, la

segunda muestra se preservó en formaldehído al 10 % para identificación de los organismos.

3.4. Muestreo de *F. duorarum*.

Los decápodos pertenecientes a *F. duorarum* se obtuvieron a través de capturas en cada una de las tres épocas del año (secas, lluvias y nortes), en la Ría de Celestún, Yucatán, en los años 2007 y 2008. Dichas capturas se realizaron una vez por semana, hasta cubrir un ciclo lunar (cuatro semanas) en cada época del año, entre las 18:00 y 24:00 horas, considerando que en los muestreos preliminares se observaron en este horario las mayores capturas de peneidos con los estómagos más llenos, a diferencia de los decápodos capturados en el resto del día. La planeación del muestreo fue realizado en función de las cuatro fases lunares; cuarto menguante (C.M.), luna nueva (L.N.), cuarto creciente (C.C.) y luna llena (L.L.), y conociendo el régimen de variación de mareas (González, 2007).

El procedimiento de captura se basó en muestreos preliminares a lo largo de las tres zonas definidas por Herrera-Silveira (1993). Sólo en la zona de Mezcla se obtuvieron suficientes organismos para el estudio (>30, Zar, 1996), principalmente en áreas que contenían manchones de *H. wrightii*, por consiguiente, el criterio para el muestreo (fig. 7) consideró la presencia de dicha macrofita.

Los arrastres para captura de los decápodos se realizaron a pie en sitios de escasa profundidad (≤ 1 m) y en lancha con motor fuera de borda; a mínima velocidad, en las zonas más profundas (> 1m), con el arte de pesca conocido como triángulo camaronero, con abertura de malla de 0.5 pulgadas. Cada uno de los arrastres se hizo durante 5 minutos (Vanegas, 1996) para evitar la fragmentación de

organismos, cubriendo una superficie aproximada de 272 m². Al terminar el primer arrastre y comprobar la captura de los decápodos, se midió la temperatura y salinidad del cuerpo acuático mediante una ecosonda.

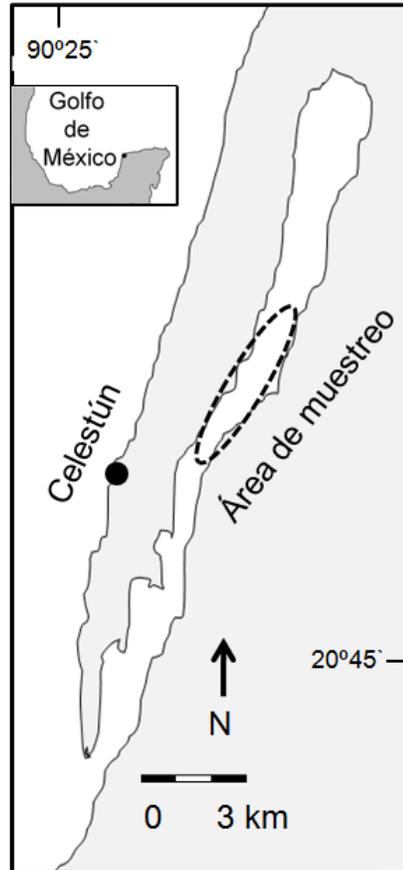


Figura 7.- Localización geográfica del área de muestreo en el estuario "Ría de Celestún", Yucatán. (A partir de imagen satelital Google Earth).

Al recuperar la red se hizo la selección de organismos, asegurando que tuvieran una longitud cefalotorácica (L.C.) mayor a 8 mm (longitud total aproximada de 35 mm), para evitar errores al hacer la clasificación taxonómica, de acuerdo con la clave para peneidos juveniles propuesta por Pérez-Farfante (1970), quien señala como juveniles a los organismos con L.C. entre 8 y 20 mm.

Para disminuir el estrés de los peneidos de *F. duorarum* capturados mientras se realizaban las disecciones, se les mantuvo en su medio natural dentro de bolsas de nylon, con abertura de malla de aproximadamente 0.25 pulgadas, con lo que se evitó la muerte de organismos al no cambiar los parámetros fisicoquímicos del agua en que se encontraban.

Mientras se realizaban los arrastres, de manera simultánea se trabajó con cada uno de los peneidos capturados. De cada decápodo se obtuvo el peso húmedo con una balanza digital marca Scout con precisión de 0.01 g. En seguida se realizó una disección rápida para extraer el hepatopáncreas y el estómago. El hepatopáncreas, colocado en un tubo eppendorf de 2 ml debidamente etiquetado, fue congelado inmediatamente en N₂ líquido y preservado en laboratorio a -80°C. El estómago, colocado en otro tubo Eppendorf de 2 ml con su respectiva etiqueta, fue tratado durante 2 horas con una solución de cloruro de magnesio (0.6 mg/l) en agua del medio y preservado en formaldehído al 10 %.

Un par de urópodos del decápodo fue preservado; en un tubo eppendorf de 0.5 ml debidamente etiquetado, con agua del medio y en hielo mientras se terminaba el trabajo de campo. Posteriormente se determinó el estadio de muda de cada uno de los decápodos (setogénesis, Chan *et al.*, 1988) con ayuda de un microscopio óptico marca Nova y la clasificación propuesta por Dall *et al.* (1990) y por el Dr. Cuzon (com. pers.). El cefalotorax y el abdomen, colocados en bosas de papel aluminio con su respectiva etiqueta, se mantuvieron en hielo, después en refrigeración a -20 °C hasta completar su análisis taxonómico, biométrico (peso, L.C. y sexo) e isotópico.

La captura de organismos dependió de las condiciones naturales, y aunque cerca de la media noche la población de *F. duorarum* disminuía drásticamente,

siempre se rebasó la muestra mínima de 30 organismos (Zar, 1996) para fines estadísticos.

El material obtenido durante los muestreos fue procesado en los laboratorios de Ecología, Bioquímica y Biología Molecular de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Yucatán, Facultad de Ciencias, UNAM, en el Laboratorio de Bentos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM y en los laboratorios de Edafología y Espectrometría de Masas del Instituto de Geología de la UNAM.

3.5) Determinación de la actividad enzimática.

Para obtener el extracto enzimático crudo, se localizaron; entre los hepatopáncreas preservados a -80°C , los que pertenecían a organismos que se encontraban en el mismo estadio de muda al momento de su captura. Se formaron grupos de 5 hepatopáncreas (hembras y machos) por estadio de muda, hasta tener la representatividad de posmuda (A, B1, B2), intermuda (C) y premuda (D0, D1', D1'', D1''' y D2) (Dall et al, 1990). Cada hepatopáncreas se analizó de manera individual después de ser pesado en una balanza analítica con precisión de 0.0001 g.

El hepatopáncreas fue homogenizado de manera individual en 500 μL de agua destilada, con un homogenizador de tejidos, y centrifugado a 14 000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante (extracto enzimático o crudo) se removió para utilizarse en la determinación específica de tripsina y α -amilasa, así como en la identificación de isozimas. La proteína total soluble se midió mediante la técnica de Bradford, 1976 y el kit de Bio Rad.

La actividad de la tripsina fue determinada de acuerdo al método de Gieger y Fritz (1988), con BAPNA 1 mM (benzoyl-arginina-paranitro-anilidina, Sigma B7632) como sustrato en TRIS 0.1 M pH 8 buffer a 4°C. El método consistió en colocar 980 μ L de buffer TRIS 0.1 M pH 8 en una cubeta de 1 ml para espectrofotómetro y 10 μ L de BAPNA 1 mM. Se tapó con papel parafilm y se mezcló antes de colocarse en el espectrofotómetro a 405 nm y calibrarse a cero. Se adicionó 10 μ L de extracto enzimático diluido 1:10 (homogenado) en agua destilada, se tapó nuevamente y se mezcló. Se volvió a colocar el vial en el espectrofotómetro para calibrarse en cero. Se tomaron las lecturas en el minuto 1 y en el minuto 2. El rango de hidrólisis del sustrato fue medido como el incremento de absorbancia usando un espectrofotómetro (modelo Spectronic 21D) a 405 nm durante 2 minutos, con el coeficiente de extinción $\epsilon_{405}=1.02 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad de tripsina correspondió a 1 mM de p-nitroanilidina liberada en un minuto

La actividad de α -amilasa fue medida de acuerdo al método modificado de Bernfeld (1955), usando 1.5 % de glucógeno (Fluka, 50573) como sustrato diluido en NaCl 0.10 mM, CaCl_2 0.01 mM, MgCl_2 0.01 mM y NaH_2PO_4 10 mM como buffer, a pH 7. De acuerdo al método se colocó 250 μ L de sustrato glucógeno 1.5% (en buffer NaH_2PO_4 10 mM pH 7) con NaCl 0.10 mM, CaCl_2 0.01 mM y MgCl_2 0.01 mM en tubos de ensayo de 10 ml, junto con 100 μ L de agua libre de pirógenos. Se adicionó cada 15 segundos 50 μ L de cada homogenado (dilución 1:10) en su respectivo tubo para su análisis. Se incubaron las muestras 10 minutos a 37°C. Se adicionó cada 15 segundos 1 ml del buffer para detener la reacción. Se incubaron a 100°C por 5 minutos la muestra y el blanco. Se adicionaron 5 ml de agua libre de

pirógenos y se colocaron por triplicado 200 μ L a cada pozo de una microplaca, por muestra y por blanco, para leer en el espectrómetro a 540 nm. El blanco se preparó con 250 μ L de glucógeno al 1.5 %, 100 μ L de agua libre de pirógenos, 1 ml de buffer (NaH_2PO_4 10 mM, pH 7) para detener la reacción y después 50 μ L de homogenado. Se hizo una curva patrón con albúmina entre 0.05 y 0.5 mg/ml. La actividad enzimática fue expresada como miligramos de maltosa liberada por minuto a 37°C, de acuerdo a Van Wormhoudt (1980).

Se analizaron 40 hepatopáncreas de organismos capturados en la época de secas, 40 de organismos de la época de lluvias y 34 de organismos capturados en la época de nortes; dado que no se capturó ningún camarón rosado en estadio A y solo fueron 4 del estadio D1 en esta época. En total se analizaron 114 hepatopáncreas de manera individual. La actividad enzimática se reportó en todos los casos como miliunidades por miligramo de hepatopáncreas ($\text{mU/mg de h.} = \text{mU mg}^{-1} \text{ Hp}$).

3.6) Electroforesis gel-sustrato.

Para la determinación de las isozimas activas específicas de la tripsina se utilizó la electroforesis en geles de poli-acrilamida con sodio-dodecil-sulfato (SDS-PAGE) (García Carreño *et al.*, 1993). El gel utilizado fue de poli-acrilamida al 12%, el cual se colocó en placas verticales de electroforesis de 20 X 20 X 0.08 cm (BioRad), con control de temperatura.

Del extracto enzimático obtenido de cada hepatopáncreas utilizado para determinar la actividad enzimática, se tomó una alícuota de 5 μ L de cada uno para hacer un concentrado (pool) de 25 μ L por estadio de muda para identificar las isozimas de tripsina y α -amilasa.

Cada concentrado de 25 μ L fue diluido en 80 μ L buffer SDS sin agentes reductores. Se aplicó una alícuota de 5 μ L de cada uno de los concentrados en los geles. También se agregó 5 μ L de un marcador molecular para identificar las distintas isozimas de tripsina. La electroforesis se realizó en una corriente constante de 15 mA por 90 min a 10⁰C. La hidrólisis proteína- sustrato se realizó de acuerdo también con Carreño *et al.* (1993), para lo cual los geles provenientes de la electroforesis anterior serán sumergidos en una solución de caseína al 2%, en un buffer TRIS-HCl, a pH 8, por 30 minutos a 5⁰C, para permitir que el sustrato (caseína) se difunda dentro del gel reduciendo la actividad de la enzima (a 5⁰C). Después de 30 minutos, la temperatura se elevará a 25⁰C, y los geles serán incubados por 90 minutos, para la digestión de proteína sustrato por las fracciones activas.

La hidrólisis proteína- sustrato se realizó al sumergir los geles provenientes de la electroforesis anterior en una solución de caseína al 2%, en un buffer TRIS-HCl, a pH 8, por 30 minutos a 5⁰C, para permitir que el sustrato (caseína) se difundiera dentro del gel reduciendo la actividad de la enzima (a 5⁰C). Después de 30 minutos, la temperatura se elevó a 25⁰C y los geles fueron incubados por 90 minutos, para la digestión de proteína sustrato por las fracciones activas.

Para la determinación de las isozimas de la α -amilasa se utilizó la técnica reportada por Arena *et al.*, 2003. En dicha técnica también se formaron concentrados de 25 μ L, utilizando 5 μ L del extracto enzimático de los organismos que correspondieron al mismo estadio de muda. Cada concentrado fue homogenizado en 500 μ L de buffer ácido Tris-fosfórico (0.06 Mol/L, pH 7) y centrifugado a 12,000 rpm (4⁰C, 20 min). Fue utilizado gel convencional de poliacrilamida al 10 % para electroforesis con buffer para corrimiento de Tris-glicina (Davis, 1964) a 250 V por 4

horas. Los geles fueron incubados en 3 % de ácido bórico por 10 minutos. Posteriormente fueron colocados en una solución de agar soluble en buffer fosfato (pH 6) e incubado por 30 minutos a 37°C. La actividad en gel fue detenida al retirar la solución de agar y adicionar una dilución de lugol (1:5) en agua ultra pura. La dilución de lugol se retiró hasta que las bandas de las isozimas se hicieron visibles. Finalmente los geles fueron fijados con una solución de ácido acético al 7.5 % y lavados con etanol al 10 %.

El análisis cuantitativo de las isozimas de tripsina y α -amilasa se realizó con ayuda de un fotodocumentador molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System BIORAD.

3.7) Contenido estomacal.

Para conocer los hábitos alimenticios del camarón rosado se hizo la revisión de contenido estomacal (Schwamborn y Criales, 2000, Sánchez *et al.*, 2002), para ello; de los estómagos preservados en formol al 10 %, se eligieron a 40; que mostraron contenido estomacal, de cada época de muestreo (secas, lluvias y nortes) y mediante un análisis cualitativo, se calculó a contra luz el porcentaje de repleción gástrica. Cada estómago fue revisado de forma individual en una caja de Petri con cuadrantes, con aproximadamente 0.25 ml de formol al 10 %. Con pinzas y agujas de disección se hizo un corte longitudinal en cada uno de los estómagos para extraer su contenido. Utilizando microscopio estereoscópico y microscopio óptico con cámara integrada (marca Velab, modelo VE-MC2 para PC) se hizo la identificación de organismos de acuerdo con Higgins y Thiel (1992).

Los organismos identificados fueron clasificados en grandes grupos taxonómicos (fig. 26) y se reportaron de acuerdo con su frecuencia de ocurrencia (F.O.) (Schwamborn y Criales, 2000), calculada con la fórmula:

$$F.O. = A / B \times 100$$

Donde *F.O.* es la frecuencia de ocurrencia, *A* es el número de estómagos con un mismo componente y *B* el número total de estómagos revisados.

El Índice de Importancia (IIMP) de cada presa se obtuvo de acuerdo con García-Rodríguez *et al.* (2011), con la fórmula:

$$IIMP_i = \frac{1}{U} \sum_{j=1}^u \frac{x_{ij}}{X_j}$$

Donde x_{ij} es el número de individuos del taxón *i* en el estómago *j*, X_j es el número total de estómagos individuales *j* a través de todos los taxa y *U* es el número de estómagos en la muestra.

La proporción de componentes alimenticios encontrados en cada estómago analizado se utilizó para calcular el nivel trófico, TL; por las siglas en inglés de Trophic Level, propuesto por Christensen y Pauly (1992):

$$TL = 1 + \sum_{j=1}^n DC_{ij} \cdot TL_j$$

Donde la composición de la dieta, DC_{ij} ; por las siglas en inglés de diet composition, es la proporción de presas *j* en la dieta del individuo *i*, TL_j es el nivel trófico de presa *j*, y *n* es el número de grupos en el sistema.

3.8) Análisis de isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$.

A partir de músculo de *F. duorarum*, sedimento del fondo estuarino, plancton y *Halodule wrightii*, se realizó el análisis isotópico de acuerdo con el método propuesto por Coplen *et al.* (2006). El proceso consistió en lo siguiente:

- a) Músculo de *F. duorarum*: Se utilizaron 24 peneidos de los que se mantuvieron en refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, identificados en estadio de intermuda (C) al momento de su captura. Mediante un corte transversal se obtuvo el segmento más prominente del abdomen de cada decápodo. Se le retiró el exoesqueleto y se lavó perfectamente con agua destilada. Se dejó secar en un horno a una temperatura de 60°C por 24 horas.
- b) Sedimento: De la muestra preservada en congelación, sin químicos, se tamizaron aproximadamente 10 g, de acuerdo con el procedimiento de Solís Weiss descrito por Granados *et al.* (2000), que consistió en lavar el sedimento al chorro de agua, a poca presión para evitar posibles daños a estructuras de organismos, utilizando dos tamices, uno sobre otro, de 0.5 y 0.27 mm respectivamente. El material contenido en el tamiz inferior (0.27 mm), contenía al microbentos y meiobentos que se requirió para el análisis. Se procuró obtener aproximadamente 4 g de sedimento húmedo. Este sedimento, junto con otra muestra sin tamizar de aproximadamente 4 g, se mantuvieron en una solución de HCl al 0.5 M, durante una hora, para eliminar carbonatos. Ambas muestras fueron lavadas 2 veces con agua destilada. Posteriormente se secaron en un horno a 60°C durante 24 horas.
- c) Plancton y *Halodule wrightii*: Aproximadamente 2 g del material preservado en refrigeración, sin químicos, fue tratado con una solución de HCl 0.5 M, durante

una hora. Se lavó en dos ocasiones con agua destilada y se dejó secar en un horno a 60°C durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas, las muestras se dejaron enfriar en un desecador. Por otra parte, los morteros y pistilos de porcelana previamente lavados con agua y fibra gruesa, enjuagados con agua destilada y finalmente con acetona, también se dejaron secar por 24 horas a 60°C. Posteriormente, cada muestra de músculo (N=24), sedimento (N=4), plancton (N=2) y *H. wrightii* (N=1), fue triturada hasta obtener un polvo fino. Evitando la contaminación entre muestras, se guardaron en tubos Eppendorf de 2 ml previamente etiquetados, asegurando muestras entre 0.1 y 0.5 g. Se mantuvieron en una bolsa de papel aluminio hasta su posterior análisis, primero en el Laboratorio de Edafología, para realizar el análisis elemental y después, en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables, ambos del Instituto de Geología, de la UNAM, para medir el $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ de acuerdo con Coplen *et al.* (2006), conforme al método de combustión tipo Dumas con Analizador Elemental acoplado al Espectrofotómetro de Masas Delta Plus XL, que tiene una precisión de 0.2 ‰.

3.9) Análisis estadístico.

En la primer parte del análisis, a partir de las frecuencias de captura de los camarones rosados respecto a sus estadios de muda y sexo, se utilizaron estadísticos básicos descriptivos.

Para describir a la muestra poblacional, respecto al peso húmedo y L.C., se utilizó un ANDEVA bifactorial de 3 X 2 (3 por estaciones del año y 2 por los sexos), cumpliendo con los supuestos que requiere el análisis; uso de variables continuas, aleatoriedad, independencia de muestras, homocedasticidad y normalidad.

Los resultados del análisis de la actividad enzimática de cada muestra, con sus respectivas 4 repeticiones, integraron una matriz de datos, que después de ser transformada utilizando \log_{10} para ajustar la recta a la normalidad y cumplir con los supuestos para el análisis, fue utilizada para el ANDEVA bifactorial de 3 x 6 (3 épocas y 6 estadios de muda) y para la prueba de Tukey para N diferentes.

También; a partir de los datos transformados con \log_{10} , se hizo el ANDEVA de una vía para detectar posibles variaciones en la expresión enzimática determinadas por el sexo ó por la longitud cefalotorácica. En todos los casos se utilizó un nivel de probabilidad de 0.05 (Zar, 1996). La prueba de Tukey para N distintas fue utilizada para identificar a los promedios significativamente diferentes dentro del conjunto de datos analizados.

Por otra parte, se obtuvo una razón matemática con la actividad de la α -amilasa entre la actividad de la tripsina, considerando la correspondencia entre estadios de muda. Dicha razón fue analizada con el ANDEVA bifactorial de 3 X 6 aplicado en la actividad de las enzimas analizadas en forma individual.

Las diferencias en frecuencias de ocurrencia de cada tipo de alimento fueron evaluadas usando la prueba de Chi-cuadrada. Las diferencias en los datos del nivel trófico fueron evaluados con ANDEVA de una vía y la prueba de Tukey, considerando las tres épocas del año definidas en el área de estudio. Así mismo, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para asociar la variación del nivel trófico con los cambios en el peso de *F. duorarum* y con la expresión de tripsina y α -amilasa. Las variaciones de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en el músculo de *F. duorarum*, en las tres épocas anuales, fueron procesadas con el ANDEVA de una vía y la prueba de Tukey para N diferentes.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

El ambiente estuarino que enmarcó el presente trabajo mostró variaciones de temperatura y salinidad (tabla 1) dentro de cada época muestreada y entre épocas. La temperatura fluctuó entre 25 y 31.7 °C, correspondientes a la época de secas y lluvias respectivamente. Las variaciones de la salinidad no mostraron una clara influencia del régimen de mareas, puesto que tanto el valor mínimo (13.1 ups) como el máximo (33.5 ups) correspondieron a la época de nortes, con influencia del pico máximo de la pleamar en descenso en ambos casos. Del mismo modo, tampoco hubo evidencia que hiciera suponer que la pleamar fuera responsable de la alta salinidad en el estuario de Celestún durante la época de lluvias, puesto que predominó la influencia del pico de la bajamar, en descenso y en ascenso, y se registraron salinidades superiores e inferiores a las 30 ups.

Tabla 1.- Parámetros fisicoquímicos registrados al inicio de cada muestreo de *F. duorarum* respecto a las variaciones de marea y frecuencias de captura.

Época	Fase lunar	Hora de inicio	T (°C)	Salinidad (ups)	Influencia de marea	N de captura
S	C. M.	19:36	29.5	33.0	Pleamar ↓	93
S	L. N.	20:02	25.0	18.0	Bajamar ↓	87
S	C. C.	20:15	29.0	29.0	Pleamar ↓	106
S	L. L.	19:00	29.5	28.0	Bajamar ↓	113
$\mu=$			28.2	27.0		Tot. 399
LL	C. M.	20:45	30.9	19.6	Bajamar ↓	84
LL	L. N.	20:30	30.0	32.8	Bajamar ↑	69
LL	C. C.	20:00	31.7	18.0	Bajamar ↓	100
LL	L. L.	20:10	30.3	17.6	Bajamar ↑	109
$\mu=$			30.7	22.0		Tot. 362
N	C. M.	20:22	26.2	13.1	Pleamar ↓	106
N	L. N.	21:48	27.1	20.6	Pleamar ↓	99
N	C. C.	19:38	26.1	31.3	Pleamar ↓	106
N	L. L.	19:25	27.8	33.5	Pleamar ↓	117
$\mu=$			26.8	24.6		Tot. 428

Para describir a la población se revisaron 1189 decápodos pertenecientes a *F. duorarum*. En las tres épocas anuales se observó que durante la fase de luna llena se lograron mayores capturas de peneidos (tabla 2 a 4) respecto a la fase de luna nueva, en la que fue necesario duplicar el trabajo para obtener una muestra representativa de los decápodos. Por otra parte, se observó que la frecuencia de captura de *F. duorarum* disminuía en forma progresiva con el paso de las horas a partir del inicio de la noche, contrario a lo que ocurrió con *F. brasiliensis*.

Tabla 2.- Frecuencias de captura de *F. duorarum* en la época de secas (abril de 2007).

ESTADIOS DE MUDA										
MUESTREO	F. LUNAR	A	B1	B2	C	D0	D1`	D1``	D1````	TOTAL
1	MENG. 	4	14	1	0	24	18	18	14	93
2	NUEVA 	0	25	13	24	27	6	2	0	87
3	CREC. 	0	0	0	1	47	51	7	0	106
4	LLENA 	3	0	0	4	65	34	6	1	113
TOTAL		7	39	14	29	153	109	33	15	399

Tabla 3.- Frecuencias de captura de *F. duorarum* en la época de lluvias (agosto de 2007).

ESTADIOS DE MUDA											
MUESTREO	F. LUNAR	A	B1	B2	C	D0	D1`	D1``	D1````	D2	TOTAL
1	MENG. 	2	0	1	16	29	21	12	1	2	84
2	NUEVA 	0	0	7	16	23	14	6	1	2	69
3	CREC. 	5	0	4	11	30	18	12	13	7	100
4	LLENA 	5	3	0	13	29	27	23	4	5	109
TOTAL		12	3	12	56	111	80	53	19	16	362

Tabla 4.- Frecuencias de captura de *F. duorarum* en la época de Nortes (febrero de 2008).

		ESTADIOS DE MUDA									
MUESTREO	F. LUNAR	A	B1	B2	C	D0	D1`	D1``	D1```	D2	TOTAL
1	MENG. 	0	0	0	32	25	20	25	3	1	106
2	NUEVA 	0	5	6	33	30	5	19	1	0	99
3	CREC. 	0	1	1	60	36	6	2	0	0	106
4	LLENA 	1	3	1	28	68	14	2	0	0	117
TOTAL		1	9	8	153	159	45	48	4	1	428

4.1) ESTADIOS DE MUDA

De acuerdo con las variaciones de las fases lunares se observó que de los camarones rosados que se capturaron durante la época de secas (fig. 8a), el 66% se encontraron en estadios de premuda (D0 y D1`). En dichos estadios, las mayores frecuencias de captura correspondieron al cuarto creciente y luna llena (197 organismos), las menores, al cuarto menguante y luna nueva (75 organismos). Del total de la época de secas, el mayor porcentaje de los organismos capturados (28%) se obtuvo en luna llena, y el menor (22%) en luna nueva.

Durante la época de lluvias (fig. 8b), el 83% de la muestra poblacional se encontró en estadio de intermuda (C) y premuda (D0, D1` y D1``). Del total de capturas de esta época, el mayor porcentaje (30%) se obtuvo durante luna llena y el menor (19%) en luna nueva.

En la época de nortes (fig. 8c), el 73% de los organismos capturados estuvieron distribuidos en dos estadios de muda, correspondientes a intermuda (C) y premuda (D0). De las capturas en esta época; al igual que en las dos épocas

anteriores, el mayor porcentaje (27%) se obtuvo en luna llena y el menor (23%) en luna nueva.

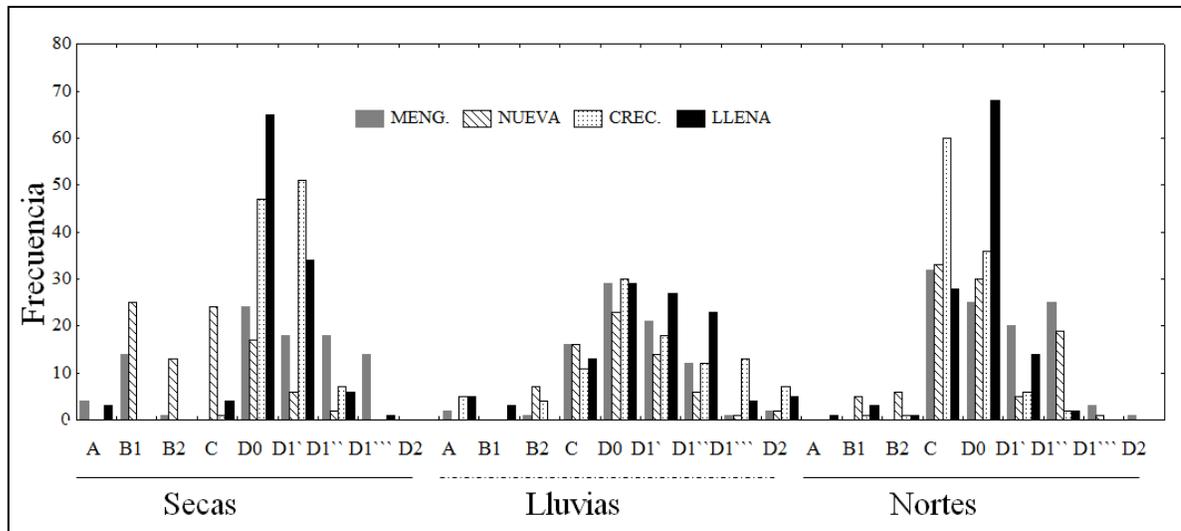


Figura 8.- Frecuencias de captura de *F. duorarum* por estadios de muda durante ciclos lunares completos (N=1189).

No todos los estadios de muda estuvieron representados, por al menos 5 organismos, en cada una de las tres épocas del año que integraron la presente investigación (fig. 9), como ocurrió en estadios de premuda tardía D2 de la época de secas, posmuda B1 de la época de lluvias y los estadios correspondientes a posmuda A y premuda D1''' y D2 de la época de nortes, por lo que se descartaron para el análisis estadístico. Los estadios de muda que se utilizaron para dicho análisis fueron: posmuda B2, intermuda (C) y premuda (D0, D1' y D1'').

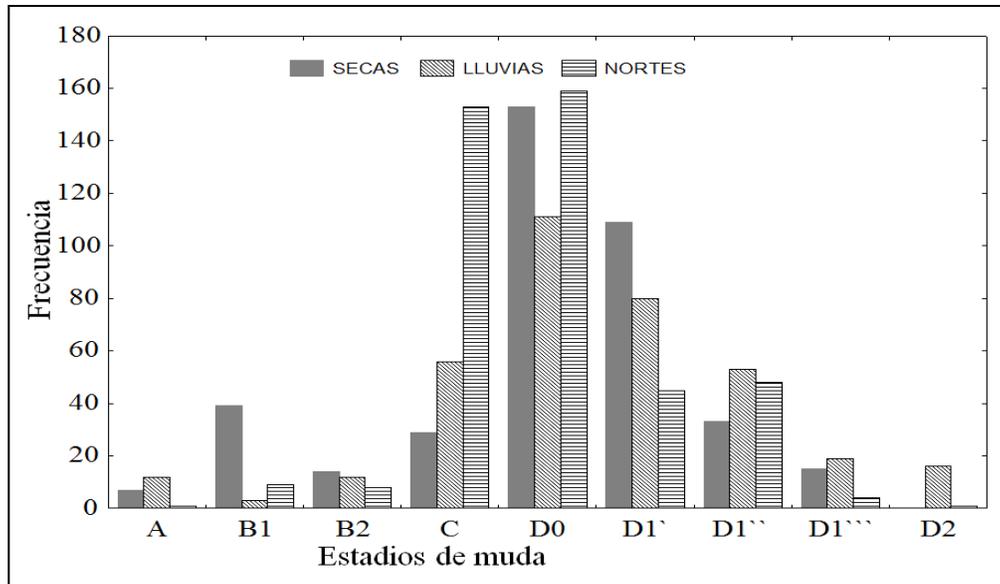


Figura 9.- Frecuencias de captura de *F. duorarum* respecto a sus estadios de muda en las tres épocas del año (N= 1189).

Mediante un análisis básico de distribución de frecuencias de los estadios de muda de los decápodos estudiados respecto a su sexo (fig. 10), se observó que en la época de secas la mayoría de los organismos, tanto hembras como machos, se encontraban en premuda temprana (D0 y D1'). En la época de lluvias, las mayores frecuencias de captura en las hembras correspondieron nuevamente a los estadios de premuda temprana (D0 y D1'), mientras que en los machos, los estadios de intermuda (C) y premuda (D0 hasta D1'') fueron relevantes. Para la época de nortes, las mayores frecuencias de decápodos capturados, en ambos sexos, se observaron en los estadios de intermuda (C) y premuda temprana (D0).

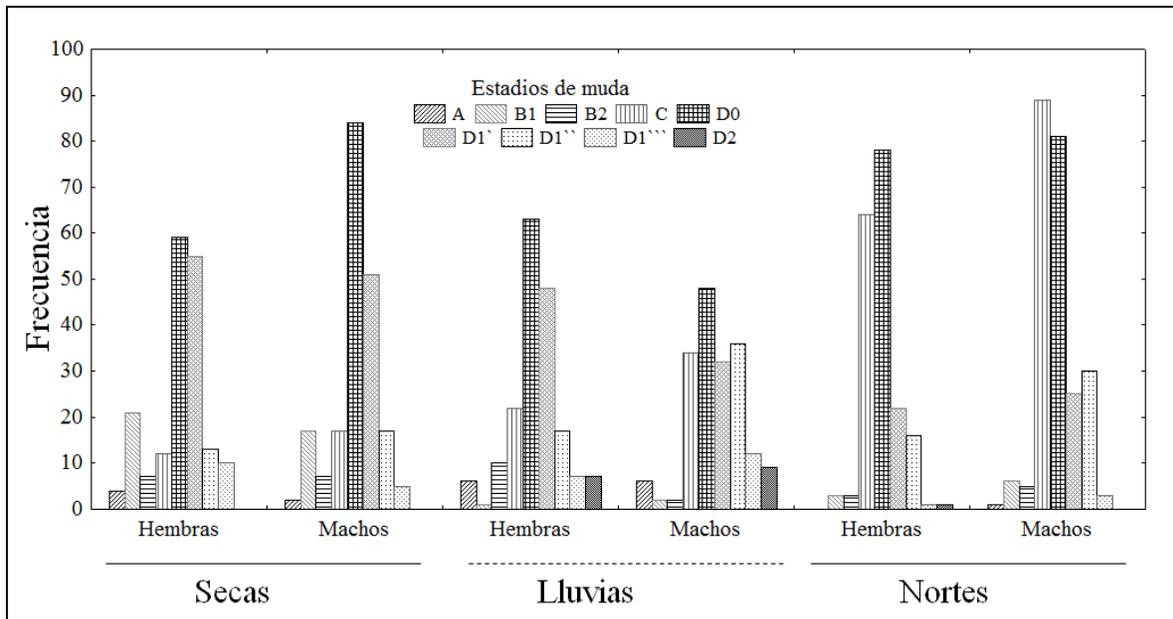


Figura 10.- Variación de estadios de muda de *F. duorarum* respecto a su sexo (N=1189).

4.2) PROPORCIÓN POR SEXOS

El análisis de distribución de frecuencias (fig. 11a), reflejó que en la época de secas la frecuencia de captura de hembras respecto a machos fue similar, 0.9:1 respectivamente, con una diferencia del 5 %, siendo los machos los más abundantes. Durante la época de lluvias, la frecuencia de captura fue homogénea entre hembras y machos, con una proporción de 1:1, y para la época nortes, la frecuencia de captura de hembras fue menor que la de los machos, 0.7:1 respectivamente, los machos predominaron con una diferencia del 12 %.

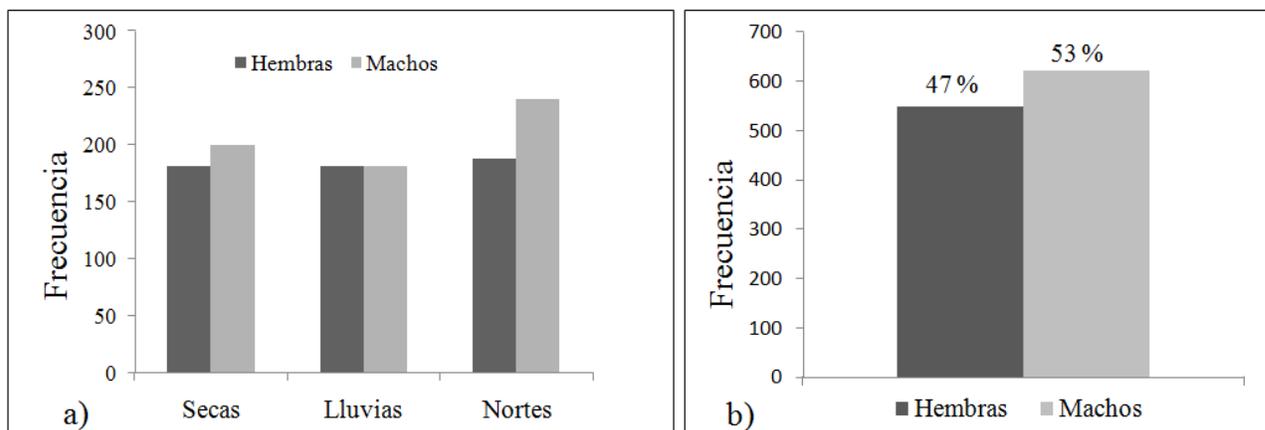


Figura 11.- Frecuencia de captura de *F. duorarum* respecto al sexo; a) por épocas anuales y b) captura global de las tres épocas del año (N= 1189).

De acuerdo a la frecuencia de captura global (fig. 11b), se capturaron menos hembras que machos, 0.88:1 respectivamente. Las hembras representaron el 47 % de los organismos capturados, los machos el 53 %.

4.3) VARIACIÓN DEL PESO HÚMEDO DE *F. duorarum*.

Los registros del peso húmedo de *F. duorarum*, en cada uno de los muestreos realizados (fig. 12), señalaron que los camarones rosados más pesados fueron capturados durante la época de lluvias ($\mu=4.69$ g \pm 0.11 E.E.; error estándar), mientras que los más ligeros en la época de secas ($\mu=3.79$ g \pm 0.08 E.E.) y en la época de nortes ($\mu=3.79$ g \pm 0.06 E.E.). El análisis de varianza señaló que el peso de *F. duorarum* sí tenía diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre dos grupos, uno formado por las épocas de secas y de nortes y otro formado por la época de lluvias.

Los muestreos semanales permitieron estimar las variaciones en el crecimiento de *F. duorarum* sólo durante la época de secas, en la que el incremento de peso fue progresivo entre cada una de las semanas de muestreo, y en promedio

se registró un crecimiento semanal de $0.97 \text{ g} \pm 0.08 \text{ E.E.}$ En las épocas de lluvias y nortes no todos los promedios del peso semanal, de las muestras poblacionales, mostraron incremento de una semana para otra.

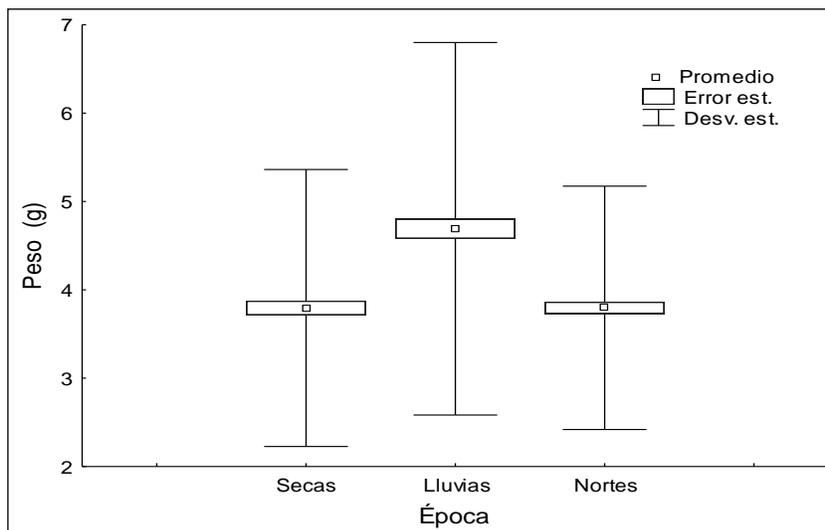


Figura 12.- Variación del peso de *F. duorarum* por época del año (N=1189).

El peso de *F. duorarum* fue variable respecto al sexo (fig. 13). Las hembras mostraron mayor variación, con un peso mínimo de 2.2 g, un máximo de 6.2 g y una media muestral (μ) de $4.2 \text{ g} \pm 0.08 \text{ E.E.}$ Los machos registraron un peso mínimo de 2.3 g, un máximo de 5.5 g y $\mu = 3.9 \text{ g} \pm 0.06 \text{ E.E.}$ El análisis de varianza señaló que sí existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los pesos promedio de hembras y machos utilizados en este trabajo de investigación.

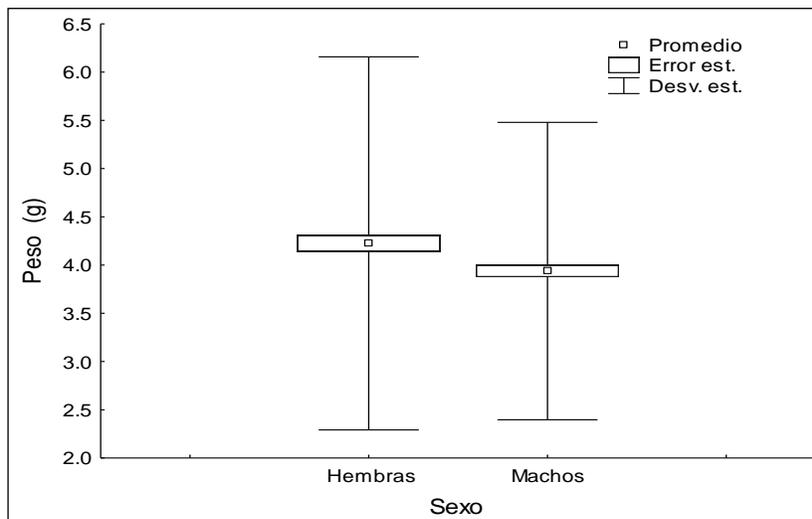


Figura 13.- Variación del peso de *F. duorarum* respecto a su sexo. Capturas de las tres épocas anuales (N=1189).

4.4) VARIACIÓN DE LONGITUD CEFALOTORÁXICA (L. C.) DE *F. duorarum*.

La L. C. promedio registrada durante la época de secas (fig. 14) fue $\mu = 15.23$ mm \pm 0.1 E.E., durante la época de lluvias; con los organismos de mayor tamaño, $\mu = 17.57$ mm \pm 0.1 E.E., y en la época de nortes $\mu = 16.6$ mm \pm 0.1 E.E. Con el ANDEVA bifactorial se detectó la formación de tres grupos, el primero con los machos y hembras de la época de secas, el segundo, con machos y hembras de la época de lluvias junto con los machos de la época de nortes, y el tercer grupo formado por las hembras de la época de nortes. Las L.C. de los tres grupos formados tuvieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

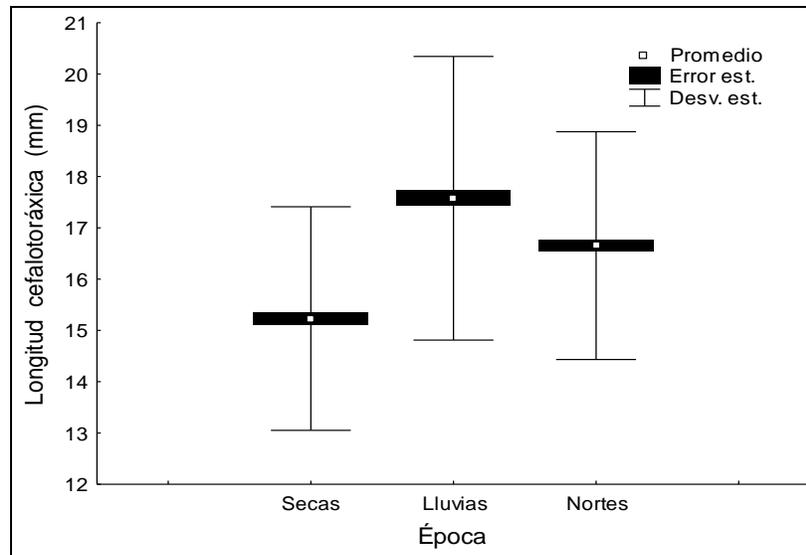


Figura 14.- Variación de longitud cefalotorácica (L.C.) de *F. duorarum* en las tres épocas anuales (N= 1189).

La L.C. de *F. duorarum* mostró variaciones de acuerdo con el sexo (fig. 15). La L.C. de las hembras fue 3 % mayor que la de los machos. El registro global de captura, con información de las tres épocas del año, hizo evidente que las hembras con $\mu = 16.7 \text{ mm} \pm 0.1 \text{ E.E.}$ y los machos con $\mu = 16.2 \text{ mm} \pm 0.1 \text{ E.E.}$, tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

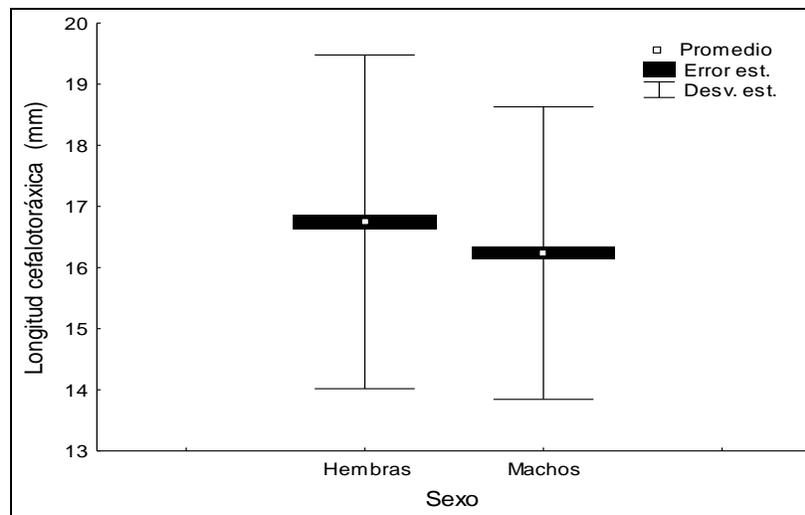


Figura 15.- Variación de la longitud cefalotorácica de *F. duorarum* respecto a su sexo. Capturas en las tres épocas anuales (N=1189).

4.5) ANÁLISIS DE ENZIMAS

El análisis estadístico de la actividad enzimática sólo consideró a los estadios que estuvieron representados en las tres épocas de muestreo, de tal manera que la muestra poblacional comprendió desde el estadio B2 hasta el estadio D1``. Los resultados de los estadios de posmuda A y B1, así como el de premuda tardía D2 no fueron considerados para este análisis.

4.5.1) TRIPSINA

El ANDEVA bifactorial dio como resultado la interacción entre el factor época del año y el factor estadios de muda (tabla 5). Dicha interacción hizo evidente que por sí mismo, el factor época del año tuvo influencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) sobre la actividad de la tripsina, como ocurrió también con los estadios de muda de *F. duorarum*. La influencia de un factor sobre el otro generó un efecto sinérgico sobre la expresión de esta proteasa.

Tabla 5.- ANDEVA de tripsina en *F. duorarum* de las tres épocas del año (N=89).

EFFECTO	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Medias cuadráticas	F	P
Intercepto	584.1668	1	584.1668	19700.30	0.000000
ÉPOCA	1.2978	2	0.6489	21.88	0.000000
ESTADIO	2.2754	5	0.4551	15.35	0.000000
ÉPOCA*ESTADIO	2.1781	10	0.2178	7.35	0.000000
Error	2.1053	71	0.0297		

La tripsina en *F. duorarum* mostró la mayor actividad durante la época de secas con $\mu=53.9$ mU/mg de h. ± 3.7 E.E, durante nortes la actividad fue de $\mu=32.5$

mU/mg de h. \pm 2.3 E.E. y, la menor actividad durante la época de lluvias, con $\mu=28.2$ mU/mg de h. \pm 1.9 E.E. (fig. 16).

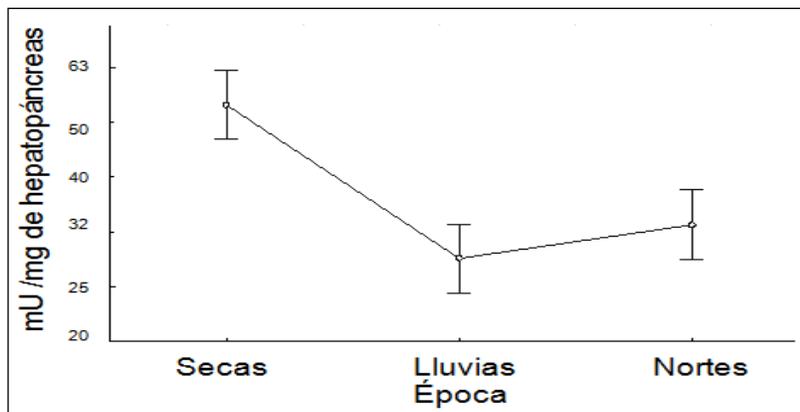


Figura 16.- Actividad de la tripsina en *F. duorarum* en las tres épocas del año (N=89). Promedio \pm error estándar.

La prueba de Tukey para N diferentes señaló dos grupos homogéneos, uno formado por la actividad de la tripsina en la época de secas y otro por la actividad de dicha enzima durante las épocas de lluvias y nortes. La diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En cuanto a la variación de la actividad de la tripsina respecto a los estadios de muda (fig. 17), se observó la mayor actividad en el estadio de intermuda (C) de la época de nortes con $\mu=135.7$ mU/mg de h. \pm 19.3 E.E., seguida por el estadio de posmuda B2 de la misma época con $\mu=87.2$ mU/mg de h. \pm 12.2 E.E. La actividad enzimática en el estadio C mencionado, tuvo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto a los demás, considerando a los estadios de la época de nortes, secas y lluvias.

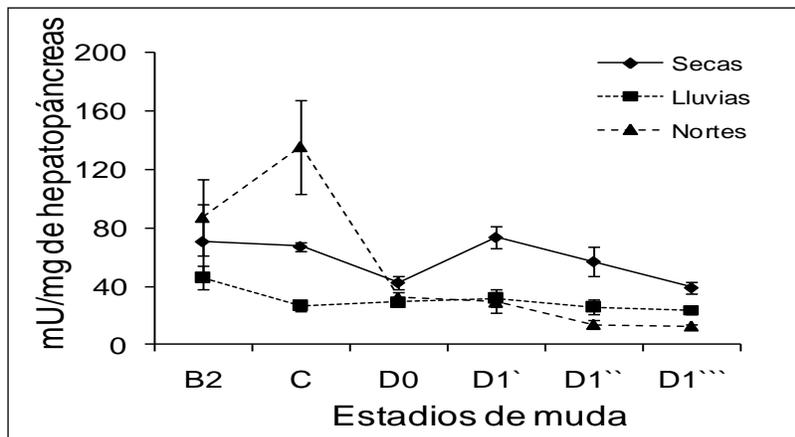


Figura 17.- Actividad de la tripsina en *F. duorarum* respecto a sus estadios de muda en las tres épocas del año (N=89). Promedio \pm error estándar.

Las menores actividades de la tripsina se registraron también en la época de nortes, en los estadios de premuda D1'' con $\mu=13.9$ mU/mg de h. \pm 2.0 E.E. y D1''' con $\mu=12.8$ mU/mg de h. \pm 2.2 E.E. De acuerdo con la prueba de significancia de Tukey, los dos estadios señalados tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las actividades de tripsina registradas en el resto de los estadios de muda de la época de nortes.

Durante la época de secas no hubo diferencias significativas de la actividad de la tripsina asociadas con los estadios de muda ($p > 0.05$), tampoco durante la época de lluvias.

4.5.2) α -AMILASA

El ANDEVA de la α -amilasa en *F. duorarum* (tabla 6) hizo evidente que tanto el factor época del año como el factor estadio de muda influyeron significativamente ($p < 0.05$) sobre su expresión. En conjunto, ambos factores ejercieron un efecto sinérgico sobre la actividad de dicha carbohidrasa ($p < 0.05$).

Tabla 6.- ANDEVA de α -amilasa en *F. duorarum* de tres épocas del año (N=89).

EFEECTO	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Medias cuadráticas	F	P
Intercepto	871.7036	1	871.7036	40904.67	0.000000
ÉPOCA	1.0735	2	0.5367	25.19	0.000000
ESTADIO	0.4372	5	0.0874	4.10	0.002674
ÉPOCA*ESTADIO	0.5337	10	0.0534	2.50	0.013041
Error	1.3852	65	0.0213		

La actividad de la α -amilasa mostró variaciones ascendentes a partir de la época de secas (fig. 18). En la época de secas registró la menor actividad, con $\mu=146.2$ mU/mg de h. ± 10.2 E.E., en la época de lluvias su actividad fue de $\mu=243.6$ mU/mg de h. ± 14.5 E.E. y, su máxima actividad se registró en la época de nortes con $\mu=283.4$ mU/mg de h. ± 17.2 E.E.

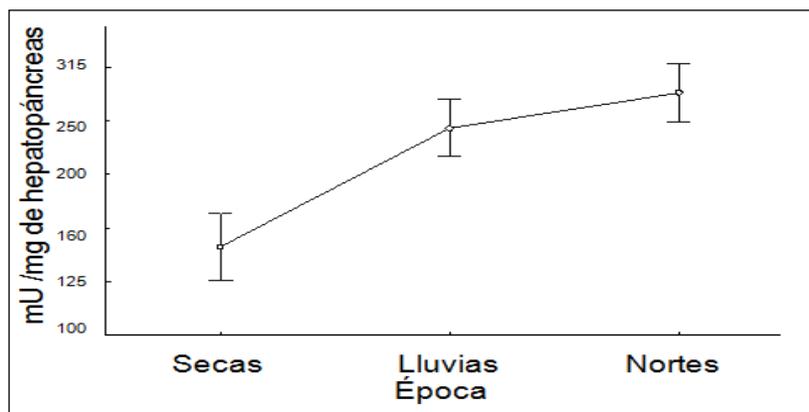


Figura 18.- Actividad de la α -amilasa en *F. duorarum* en las tres épocas del año (N=89). Promedio \pm error estándar.

Los resultados del ANDEVA bifactorial y la prueba de Tukey para N diferentes señalaron la formación de dos grupos homogéneos, uno integrado por la actividad de la α -amilasa en la época de secas y otro por la actividad de dicha enzima durante las épocas de lluvias y nortes. La diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Al comparar la actividad de la α -amilasa entre los distintos estadios de muda de *F. duorarum* (fig. 19), se pudo observar que la mayor actividad enzimática se registró durante la época de nortes, en el estadio de posmuda B2, con $\mu=568.2$ mU/mg de h. ± 50.7 E.E. y en el estadio de intermuda C, con $\mu=457.4$ mU/mg de h. ± 50.7 E.E. La actividad enzimática de los dos estadios señalados mostró diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) sólo respecto a los estadios de premuda (D0, D1', D1'' y D1''') de la época de secas.

La actividad de la α -amilasa no mostró diferencias significativas entre los demás estadios de muda ($p> 0.05$), aún considerando la influencia de las tres épocas del año.

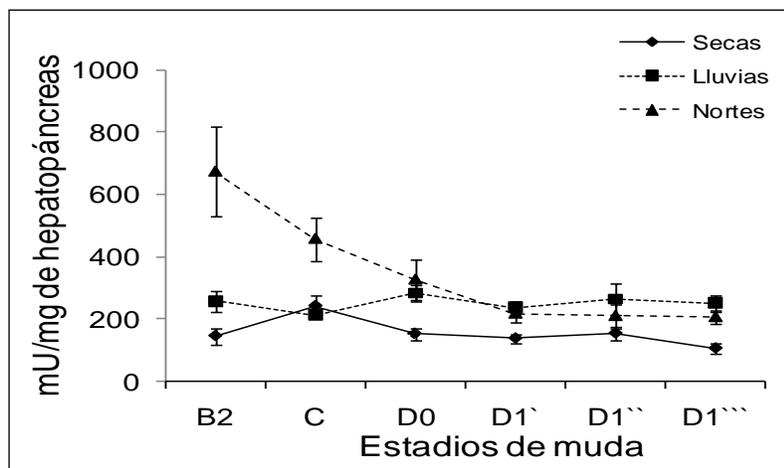


Figura 19.- Actividad de la α -amilasa en *F. duorarum* respecto a sus estadios de muda en las tres épocas del año (N=89). Promedio \pm error estándar.

Al correlacionar la actividad enzimática se obtuvo una razón de proporcionalidad determinada por α -amilasa/ tripsina (fig. 20). El valor más bajo correspondió a la época de secas (2.8 ± 0.84 E.E.). Durante la época de lluvias se incrementó dicha razón (9.3 ± 0.71 E.E.) y, para la época de nortes se observó el mayor valor (10.7 ± 0.73 E.E.). El ANDEVA bifactorial y la prueba de Tukey

mostraron la formación de dos grupos; uno referido por la época de secas y el otro por las épocas de lluvias y nortes. Entre ambos grupos hubo diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

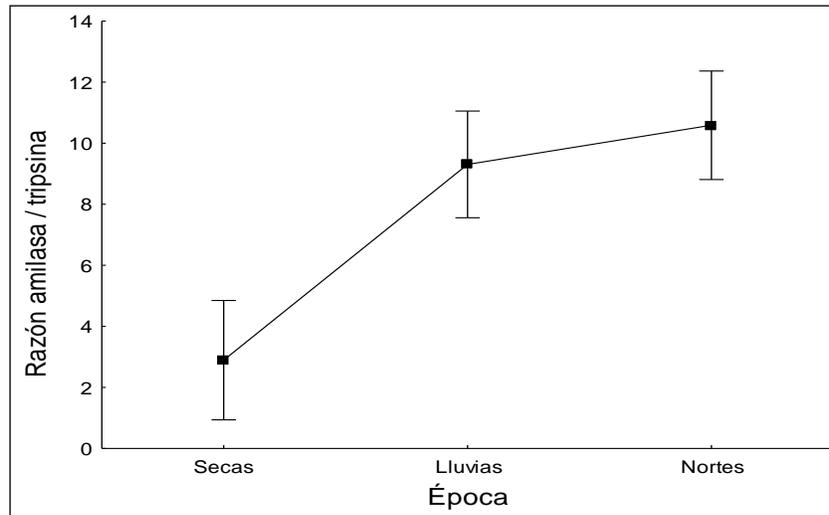


Figura 20.- Razón de α -amilasa / tripsina en *F. duorarum* en las tres épocas del año (N=89). Promedio \pm error estándar.

La razón matemática que relacionó a las dos enzimas estudiadas mostró variaciones respecto a los estadios de muda de *F. duorarum* (tabla 7). Durante la época de secas se registró la razón más baja en el estadio de premuda (D_1'), con un valor de 1.9 ± 0.2 , la más alta en intermuda (C) y premuda (D_0) con un valor de 3.6 ± 0.5 . En la época de lluvias la razón menor se registró en el estadio de posmuda (B_2) con un valor de 6.1 ± 1 , la mayor en premuda (D_1'') con una razón de 12 ± 3 . Durante la época de nortes, el menor valor de la razón de proporción correspondió al estadio de intermuda (C), con 4.3 ± 1.4 y el mayor al estadio de premuda (D_1'') con un valor de 19 ± 5 .

Tabla 7.- Razón de α -amilasa / tripsina por estadio de muda de *F. duorarum* en las tres épocas del año (N=89). Promedio \pm error estándar.

Época	B_2	C	D_0	D_1'	D_1''	D_1'''
Secas	2.3 ± 1.6	3.6 ± 0.5	3.6 ± 0.4	1.9 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.2
Lluvias	6.1 ± 1.0	8.9 ± 1.8	9.8 ± 0.7	8.3 ± 1.4	12.0 ± 3.0	11.0 ± 2.0
Nortes	7.9 ± 2.5	4.3 ± 1.4	9.9 ± 1.1	8.6 ± 1.6	19.0 ± 5.0	16.0 ± 2.0

4.6) ISOFORMAS DE TRIPSINA Y α -AMILASA.

Las enzimas estudiadas en este trabajo (tripsina y α -amilasa) mostraron variaciones en su actividad y en las isoformas con las que se expresa. Los geles de policrilamida revelaron 3 isoformas para tripsina a lo largo de un ciclo anual (fig. 21). El gel que contenía a la tripsina de la época de secas mostró la mayor expresión y, en la mayoría de los estadios se observaron los tres genes que la identifican. De acuerdo con su peso molecular, la primera isoforma se localizó hacia los 19.4 kDa, la segunda en 20.7 kDa y la tercera en 22 kDa. En el gel que representó la expresión de la tripsina en la época de lluvias sólo se observó un alelo funcional en los estadios de posmuda (A y B1), que corresponde a 19.4 kDa, en los demás estadios se observaron tres isoformas de la familia de genes de tripsina. Durante la época de nortes, de manera invariable se observó en todos los estadios la presencia de las dos primeras isoformas de tripsina (19.4 y 20.7 kDa).

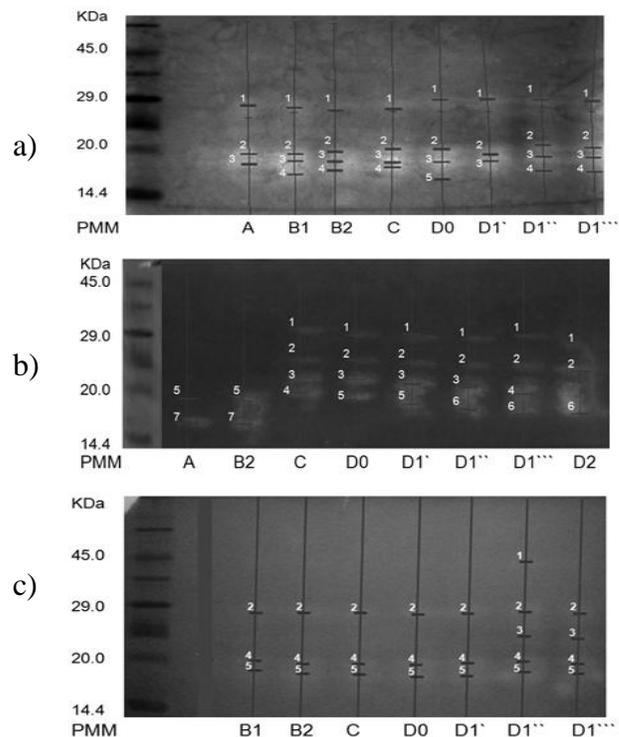


Figura 21.- Isoformas de tripsina en *F. duorarum* durante las tres épocas anuales; a) secas, b) lluvias y c) Nortes. PMM (peso molecular del marcador que identifica a tripsina en 19.4, 20.7 y 22.0 kDa).

De manera complementaria se detectó a otra de las proteasas, la quimotripsina, en bandas localizadas entre 24 y 36 kDa. Aunque su presencia fue percibida en las tres épocas del año, fue más notoria durante la temporada de secas.

En los geles que correspondieron a la α -amilasa se observó un patrón de bandas que coinciden con las que se han reportado anteriormente en la literatura (Van Wormhoudt, 2003) (fig. 22), a través de dos sistemas, el sistema I integrado por tres alelos y el sistema II integrado por cinco. A lo largo del año hubo una variación entre 3 y 7 isoformas de α -amilasa en *F. duorarum*. Durante la época de secas se observaron en promedio 5 isozimas. En la época de lluvias se observaron a la mayoría de los 7 alelos que identifican α -amilasa en prácticamente todos los estadios de muda del camarón rosado. En el gel correspondiente a la época de nortes se observaron sólo 3 isozimas, con excepción del estadio de premuda (D1') que presentó 6 isozimas y del estadio de posmuda (A) que no estuvo representado.

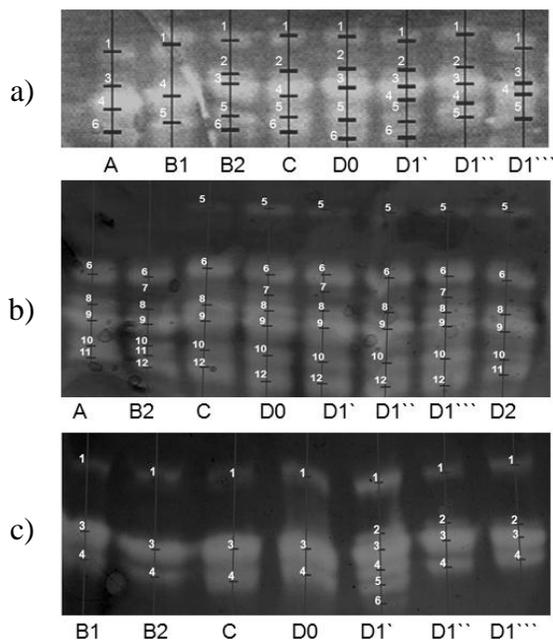


Figura 22.- Isoformas de α -amilasa en *F. duorarum* en las tres épocas anuales; a) secas, b) lluvias y c) Nortes.

4.7) CONTENIDO ESTOMACAL

Al revisar el contenido estomacal de muestras de *F. duorarum*, se observó que de los colorantes que se utilizaron para teñir tejido vivo, tripano azul y azul de metileno, el primero de ellos dio mejores resultados, en una concentración de 0.001%.

Fueron revisados 124 estómagos de *F. duorarum*, de los cuales 40 correspondieron a la época de secas, 40 a la época de lluvias y 44 a la época de nortes. De la época de secas, el 85 % de los estómagos revisados tuvieron una repleción gástrica entre el 5 y el 30 % (tabla 8). De la época de lluvias, la mayoría de los estómagos revisados (42.5 %) también tuvieron una repleción gástrica entre el 5 y el 30%, mientras que de los estómagos que correspondieron a la época de nortes, la mayoría (50 %) mostraron una repleción gástrica entre el 65 y el 100 %.

Tabla 8.- Repleción gástrica de *F. duorarum* en las tres épocas del año (N=124).

Lleno de estómago (%)	Estómagos revisados (%)		
	Secas	Lluvias	Nortes
0 a < 5	2.5	0.0	0.0
5 a 30	85.0	42.5	20.4
35 a 60	12.5	30.0	29.5
65 a 100	0.0	27.5	50.0

La revisión del contenido estomacal de *F. duorarum* (tabla 9) permitió distinguir como relevantes (apéndice 1) ; en orden de mayor a menor importancia determinada por la frecuencia de ocurrencia (F.O.) a los copépodos, con su máxima F.O. en Nortes (77.2 %), a los anfípodos, con la máxima F.O. en Nortes (65.9 %), a los dípteros con la máxima F.O. en lluvias (32.5 %), a los cladóceros con la máxima

F.O. en Nortes (22.7 %) y fragmentos vegetales de *H. wrightii*, con su máxima F.O. en lluvias (27.5 %).

Tabla 9.- Composición del contenido estomacal de *F. duorarum* juveniles colectados en un ciclo anual. Frecuencia de ocurrencia e Índice de Importancia de presas (IIMP) (N= 124). a; Schwamborn y Criales, 2000. (*F. duorarum*) b; Sánchez *et al.*, 2002. (*L. schmitti*) * (% de volumen).

Tipo de alimento		OCURRENCIA (%)			IIMP (%)	Referencias relacionadas
		SECAS	LLUVIAS	NORTES		
Malacostraca	Amphipoda	7.50	47.50	65.90	19.69	a,b
	Isopoda	0.00	22.50	9.00	1.47	
	Decapoda	2.50	5.00	2.20	1.30	b
Brachiopoda	Anostracoda	0.00	0.00	4.50	0.25	
	Cladocera	7.50	2.50	22.70	5.14	
Copepoda		12.50	50.00	77.20	29.34	a,b
Ostracoda		5.00	32.50	6.80	7.83	a
Pterygota	Diptera	0.00	32.50	22.70	10.26	
Opisthobranchia	Gastropoda	2.50	0.00	0.00	0.74	a
Granuloreticulosa	Foraminifera	0.00	52.50	0.00	5.65	a
Acari	Halacaroida	0.00	0.00	4.50	0.37	
Nematoda		7.50	2.50	29.50	9.60	a
Annelida	Oligochaeta	0.00	2.50	9.00	0.82	
	Polychaeta	0.00	7.50	9.00	1.02	a,b
<i>Halodule wrightii</i>		2.50	27.50	13.60	6.52	
Tejido animal amorfo*		79.00	55.00	64.00		
Detritus vegetal*		8.00	7.00	7.00		
Arenas*		11.00	19.00	13.00		

De acuerdo con las frecuencias de ocurrencias y el IIMP (tabla 9), Amphipoda (19.6%) y Copepoda (29.3%) fueron presas importantes de *F. duorarum* durante todo el período de muestreo ($\chi^2=30.5$ y $\chi^2=35.3$, respectivamente, $\alpha=0.05$) y estuvieron asociadas con las tres estaciones. Nematoda ($\chi^2=14.8$) fue relevante en dos estaciones, secas y lluvias, Ostracoda ($\chi^2=15.6$) en secas y Nortes, y Diptera ($\chi^2=1.5$) en época de lluvias.

Al agrupar los componentes alimenticios; encontrados en *F. duorarum*, a nivel subclase (fig. 23), sobresalieron Malacostraca y Copepoda, sobre todo en la época de Nortes (21.3% y 21.4% respectivamente).

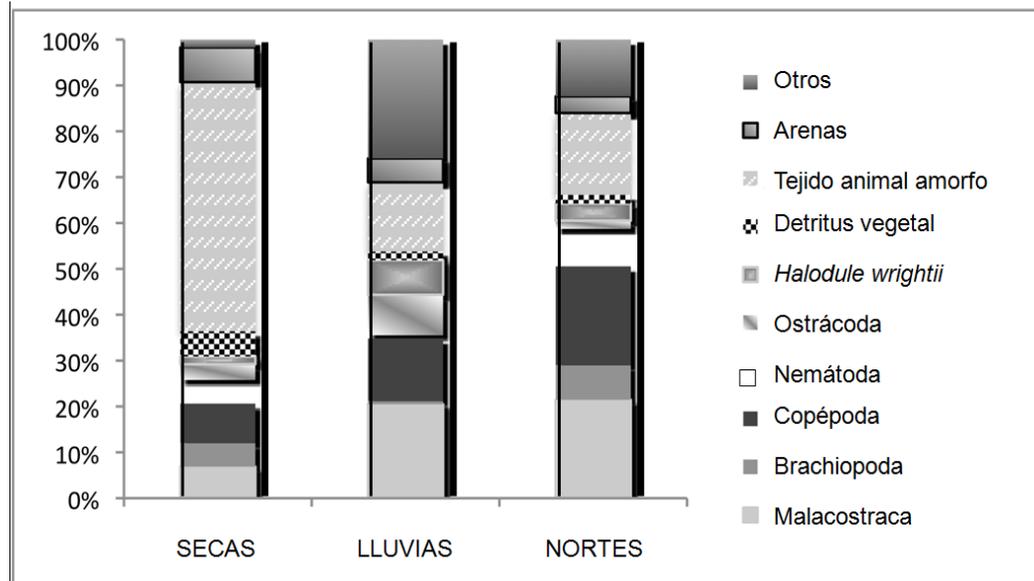


Figura 23.- Variación de los componentes alimenticios encontrados en *F. duorarum* en las tres épocas del año (N=124).

El tejido animal amorfo quedó registrado con el mayor porcentaje en época de secas (79%) respecto al total de los componentes alimenticios. El detritus vegetal en el contenido estomacal representó entre el 7% y 8% en las tres estaciones del año, compuesto por algas filamentosas y diatomeas. *Halodule wrightii* representó 2.5% en la época de secas, 27.5% en la época de lluvias y 13.6% en la época de Nortes.

Con el ANDEVA y la prueba de Tukey se observaron diferencias significativas en el nivel trófico de *F. duorarum* en las tres épocas del año (fig. 24). Durante la época de secas predominó una dieta carnívora, mientras que durante las épocas de lluvias y Nortes se observó una dieta omnívora.

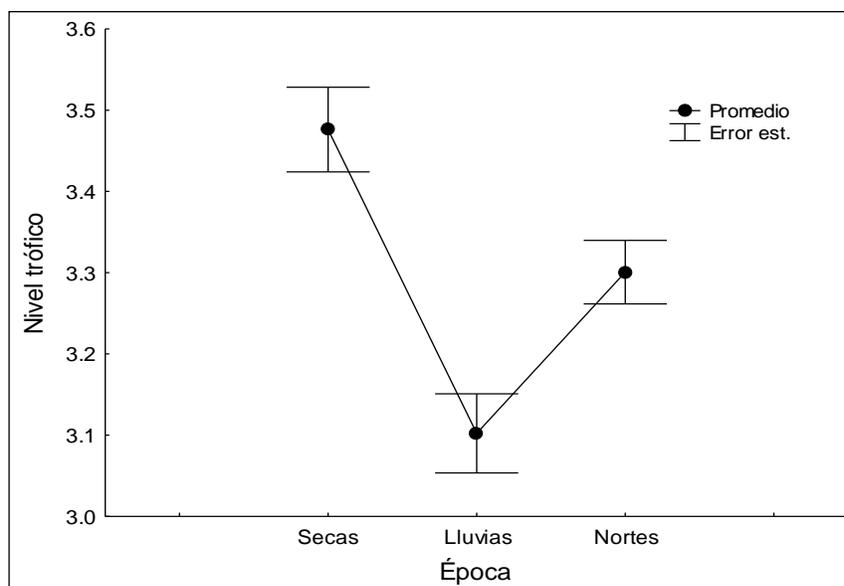


Figura 24.- Nivel trófico de *F. duorarum* en las tres épocas del año (N=124).

El coeficiente de correlación de Pearson indicó que la variación del nivel trófico de *F. duorarum* no estaba relacionada con la variación de su peso ($R^2=0.003$, $p > 0.05$), pero, sí estaba directamente relacionada con la variación de la actividad de la tripsina ($R^2=0.95$) e inversamente con la actividad de la α -amilasa ($R^2= -0.67$).

4.8) ANÁLISIS ISOTÓPICO ($\delta^{13}\text{C}$ Y $\delta^{15}\text{N}$).

El análisis elemental indicó que el músculo de los juveniles de *F. duorarum* tuvo el menor porcentaje de carbono durante la época de lluvias (43.8 % \pm 0.9 E.E.), el mayor, durante la época de Nortes (45.1 % \pm 0.3 E.E.) (tabla 10). Haciendo un comparativo entre los porcentajes mencionados y los porcentajes observados en el sedimento, el plancton y *H. wrightii*, el valor más próximo al registrado en los decápodos corresponde a la macrofita (36.2 %).

El análisis elemental del nitrógeno mostró que en la época de lluvias se tuvo el menor porcentaje de este elemento (9.6 % \pm 0.3 E.E.), el mayor porcentaje se registró durante la época de secas (14.9 % \pm 0.1 E.E.). Los porcentajes de los demás

componentes analizados (sedimento, plancton y *H. wrightii*) fueron mucho menores que el valor correspondiente al músculo de *F. duorarum*.

Tabla 10.- Isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) y valores de C y N de *F. duorarum* juveniles (N=24), sedimento, plancton y *H. wrightii* del estuario de Celestún . * ; ≥ 0.27 mm.

Época	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)	% N	%C
Secas	14.21 \pm 0.7	-21.64 \pm 0.5	14.92 \pm 0.14	44.88 \pm 0.40
Lluvias	12.40 \pm 0.4	-18.20 \pm 0.3	9.69 \pm 0.32	43.87 \pm 0.99
Nortes	11.86 \pm 0.5	-23.06 \pm 0.4	14.32 \pm 0.14	45.10 \pm 0.39
Productividad				
Sedimento*				
Secas	8.86	-8.04	0.33	13.70
Lluvias	9.04	-7.58	0.37	13.57
Nortes	8.51	-7.22	0.30	13.28
Plancton*				
<i>Halodule wrightii</i>	5.58	-20.28	1.80	36.20

El $\delta^{13}\text{C}$ correspondiente al músculo de *F. duorarum* mostró variaciones a lo largo del año. El ANDEVA de una vía señaló que la época del año sí influye significativamente ($p < 0.05$) en el $\delta^{13}\text{C}$ (fig. 25). La prueba de Tukey para N diferentes confirmó dos grupos homogéneos, uno integrado por los datos de la época de secas ($\mu = -21.6$ ‰ $^{13}\text{C} \pm 0.5$ E.E.) y la época de Nortes ($\mu = -23.0$ ‰ $^{13}\text{C} \pm 0.4$ E.E.) y otro por los datos de la época de lluvias ($\mu = -18.2$ ‰ $^{13}\text{C} \pm 0.3$ E.E.).

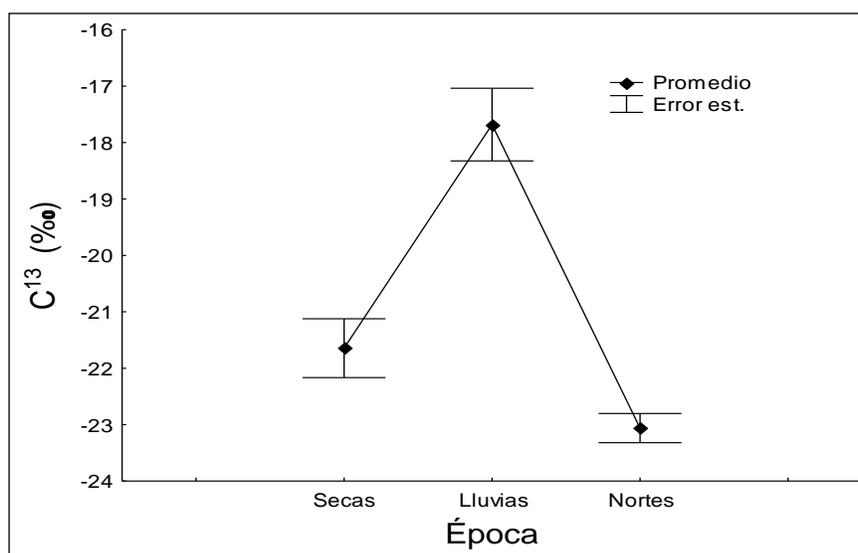


Figura 25.- $\delta^{13}\text{C}$ de *F. duorarum* en las tres épocas anuales (N=24).

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de *F. duorarum* quedaron ubicados entre -14 y -24 ‰, rango al que corresponden el fitoplancton y zooplancton marino reportados en la literatura (fig. 27). De las muestras de plancton, la realizada en la zona de mezcla del estuario de Celestún, durante la bajamar, registró un $\delta^{13}\text{C}$ de -10.7 ‰, mientras que la muestra de plancton capturado durante la pleamar, en la misma área, tuvo un $\delta^{13}\text{C}$ de -18.43 ‰. La muestra de *H. wrightii* de la misma zona registró un $\delta^{13}\text{C}$ de -20.2 ‰. El sedimento de Celestún, de las tres épocas del año, registró una señal isotópica ($\mu = -7.6 \text{ ‰ } \delta^{13}\text{C} \pm 0.1 \text{ E.E.}$) alejada de la registrada en el músculo de *F. duorarum* ($\mu = -20.9 \text{ ‰ } \delta^{13}\text{C} \pm 0.4 \text{ E.E.}$).

El $\delta^{15}\text{N}$ del músculo de *F. duorarum* también mostró variaciones a lo largo del año, pero, con el ANDEVA de una vía se determinó que la época del año no tuvo influencia significativa ($p > 0.05$) sobre sus variaciones (fig. 26). La prueba de Tukey para N diferentes no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos de datos analizados. En la época de secas se registró $\mu = 14.2 \text{ ‰ } ^{15}\text{N} \pm 0.7 \text{ E.E.}$, en la época de lluvias $\mu = 12.4 \text{ ‰ } ^{15}\text{N} \pm 0.4 \text{ E.E.}$ y en la época de Nortes $\mu = 11.8 \text{ ‰ } ^{15}\text{N} \pm 0.5 \text{ E.E.}$

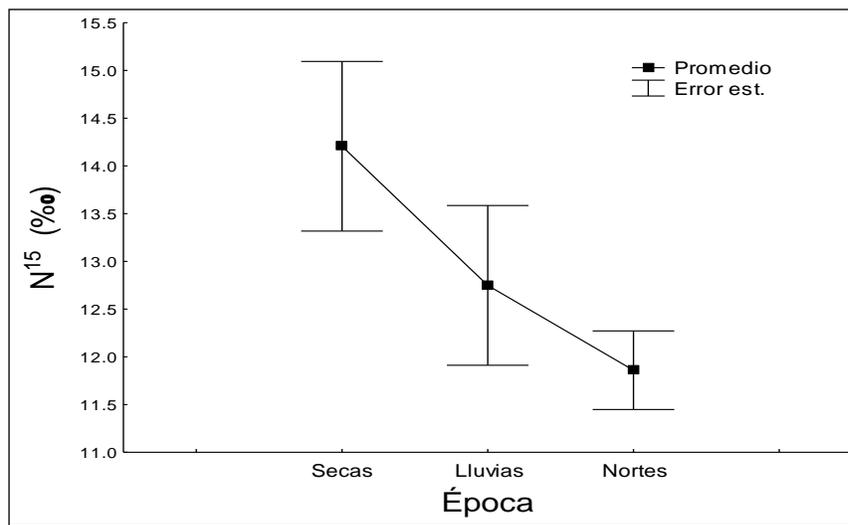


Figura 26.- $\delta^{15}\text{N}$ de *F. duorarum* en las tres épocas anuales (N=24).

La media poblacional del $\delta^{15}\text{N}$ de *F. duorarum* durante la época de secas (14.2 ‰) correspondió al nivel trófico 5 (fig. 27), de acuerdo con la clasificación de Fry (1998). La $\mu = 12.4$ ‰ ^{15}N de la época de lluvias correspondió al nivel trófico 4, al igual que la $\mu = 11.8$ ‰ ^{15}N de la época de nortes.

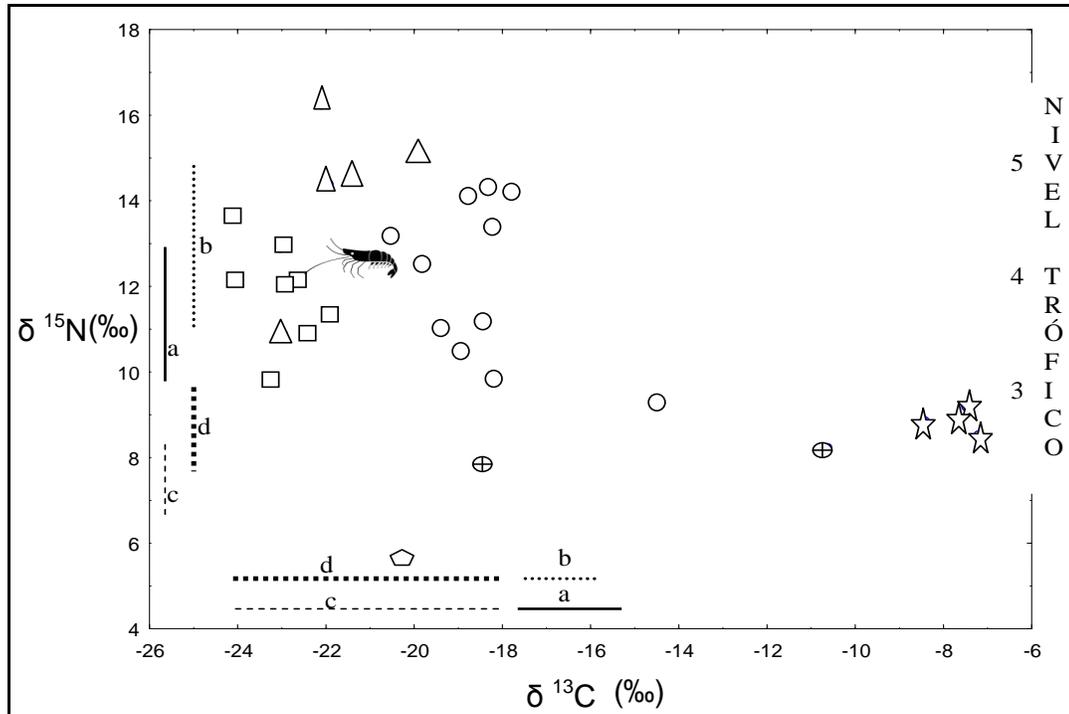


Figura 27. Señal isotópica de *F. duorarum* de Celestún en tres épocas anuales. (N=24) $\mu =$ , secas (Δ), lluvias (\circ) y nortes (\square). Plancton (\oplus), sedimento (\star), *Halodule wrightii* (\diamond). Valores de referencia: organismos generalistas oportunistas (a), carnívoros (b), fitoplancton marino (c) y zooplancton marino (d), reportados por Fry (1988), Wada *et al.* (1990), Revelles *et al.* (2007) y García (2006).

4.9) COMPARATIVO GENERAL

De acuerdo con los diferentes análisis realizados en juveniles silvestres de *F. duorarum*, es posible señalar que su actividad enzimática digestiva, correspondiente a tripsina y α -amilasa, está asociada con sus ajustes metabólicos y fisiológicos ocasionados por las variaciones ambientales propias de la región de Celestún a lo largo del año (fig. 28).

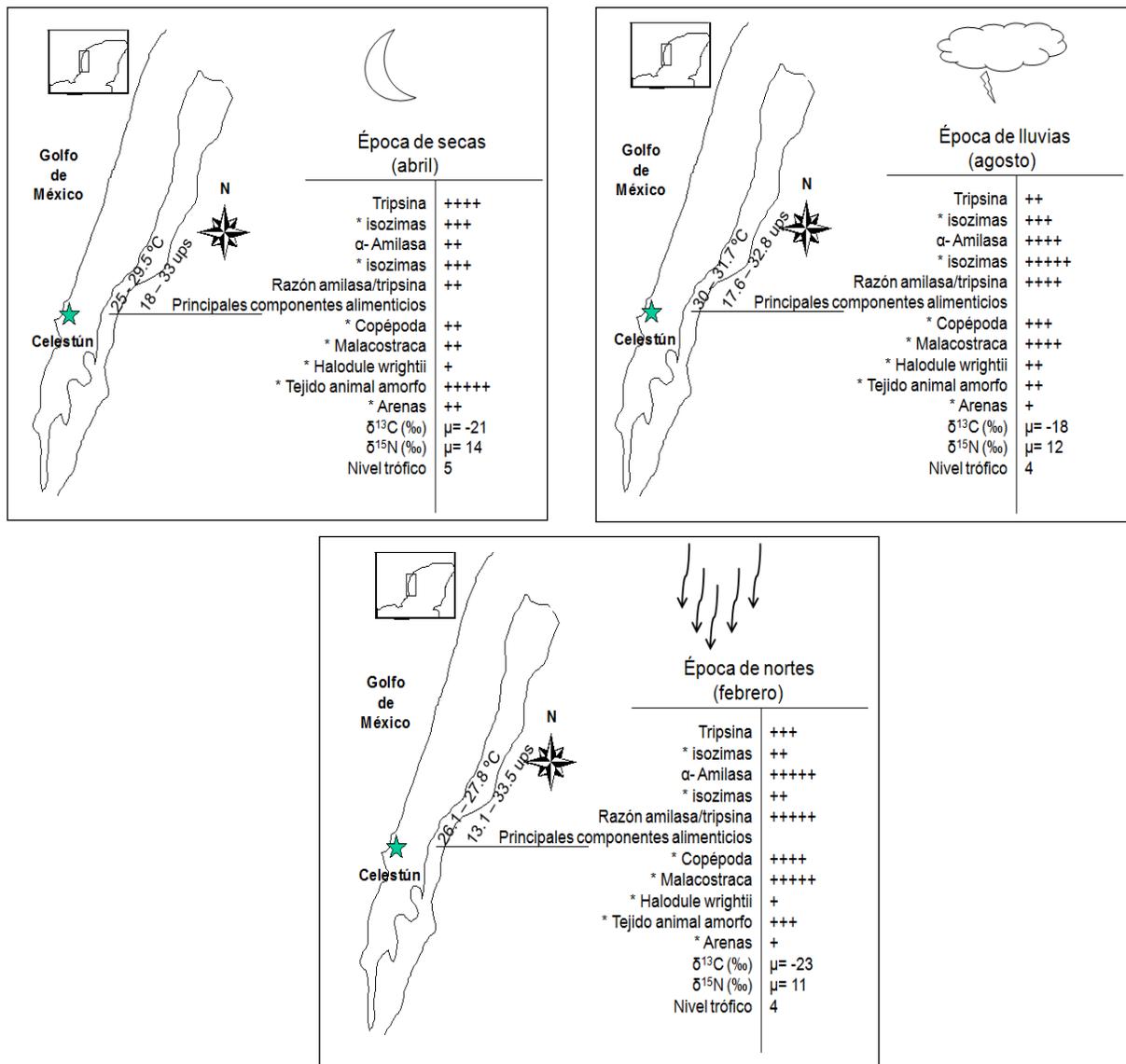


Figura 28.- Parámetros relacionados con la actividad de tripsina y α -amilasa en *F. duorarum* de la Laguna de Celestún, en las tres épocas del año. (+, presente; ++, en baja proporción; +++, abundante; \geq ++++, muy abundante).

Las variaciones de los principales factores considerados en el presente trabajo mostraron valores ascendentes a partir de la época de secas, hasta llegar a su máximo en la época de Nortes, como ocurrió con la actividad de la α -amilasa, con la razón α -amilasa/tripsina, con la repleción gástrica y con la frecuencia de ocurrencia (F.O.) de las subclases más representadas (Copepoda y Malacostraca) en el tracto digestivo de *F. duorarum*. En forma contraria, mostraron valores descendentes; a partir de la época de secas, la actividad de la tripsina, la frecuencia de ocurrencia del tejido animal amorfo, del detritus vegetal, de las arenas y del nivel trófico en el que se clasifica a los decápodos estudiados.

La época de secas tuvo variaciones de temperatura de 4.5°C y variaciones de salinidad de 15 ups entre el valor más bajo y más alto. La actividad de la tripsina se registró en el hepatopáncreas de *F. duorarum* en las tres épocas del año, sin embargo, fue más evidente durante la época de secas, en la que se expresó mediante 3 isozimas. La α -amilasa también tuvo actividad durante todo el año, su menor actividad se registró durante la época de secas a través de 5 isozimas. A esta época correspondió la menor razón entre carbohidrasas y proteinasas (2.8 \pm 0.8). La mayor actividad de la tripsina durante la época de secas quedó asociada con bajas F.O. de organismos pertenecientes a Copepoda y Malacostraca, así como con la mayor frecuencia de ocurrencia del detritus vegetal (2%); que coincidió con el valor más alto del N (14.9%) determinado en músculo de *F. duorarum*, y con la mayor F.O. de tejido animal amorfo. El análisis del $\delta^{13}\text{C}$ de la época de secas (-21‰) ubicó a *F. duorarum* como un organismo que se alimentó principalmente de plancton marino. El $\delta^{15}\text{N}$ de los decápodos estudiados los ubicó en el quinto nivel trófico, al que corresponden los organismos carnívoros.

Con el análisis estadístico se comprobó que tanto la actividad de la tripsina como la actividad de α -amilasa tienen 2 formas de expresarse a lo largo del año, en donde contrasta la expresión enzimática de la época de secas respecto a la expresión correspondiente a la época de lluvias junto con la época de Nortes.

La época de Nortes fue más estable en la temperatura del agua de la Laguna de Celestún, con variaciones de 1.7°C. En cambio, en la misma época, la salinidad presentó una variación de 20.4 ups entre el valor mínimo y máximo. La tripsina mostró una actividad menor que la registrada en la época de secas, expresada a través de 2 isozimas. También en Nortes se registró la mayor actividad de la α -amilasa, y por consiguiente, la mayor razón (10.7 \pm 0.7) entre carbohidrasas y proteasas. La actividad enzimática en esta época quedó asociada con la mayor repleción gástrica de *F. duorarum* y el mayor consumo de Copepoda y Malacostraca, así como de porcentajes menores de detritus vegetal en comparación con los registrados en la época de secas. El análisis de $\delta^{13}\text{C}$ de la época de Nortes (-23‰) hizo evidente que el músculo de *F. duorarum* tenía una señal isotópica próxima a la que presentó el plancton (-18.4‰) y próxima a la señal de *H. wrightii* (-20.2‰) de Celestún. Finalmente, el análisis del $\delta^{15}\text{N}$ correspondiente a esta misma época, con un valor de 11.8‰, refirió a *F. duorarum* como un organismo generalista oportunista que pertenece al cuarto nivel trófico, aunque de acuerdo con Christensen y Pauly (1992), *F. duorarum* se ubicaría entre los niveles tróficos 3 y 4 a lo largo del año.

DISCUSIÓN

Los juveniles de *F. duorarum* del estuario de Celestún presentaron ajustes metabólicos y fisiológicos que estuvieron asociados con cada una de las épocas del año que caracterizan esta región, descritas por Herrera-Silveira (1993) como época de secas, época de lluvias y época de Nortes. Las adaptaciones bioquímicas para digestión y asimilación de alimento en *F. duorarum* silvestres estuvieron relacionadas con la cantidad y calidad de alimento disponible, puesto que como señaló Tapia-González *et al.* (2008), la productividad de la laguna de Celestún es afectada por el movimiento de nutrientes relacionados con los acuíferos, vientos, temperatura y salinidad durante las tres épocas del año, que a su vez, se correlacionan con los cambios en la diversidad bentónica (Pech *et al.*, 2007).

En época de secas, como reportó Tapia-González *et al.* (2008), la condición ambiental de la laguna de Celestún presentó baja productividad primaria, misma que se vio reflejada en la baja repleción gástrica de los decápodos estudiados. La baja frecuencia de ocurrencia de presas pudo haber sido el motivo de la máxima actividad de la tripsina, puesto que de acuerdo con Lovett y Felder (1990) y Chong *et al.* (2002), altas actividades enzimáticas reflejan un mayor esfuerzo metabólico para optimizar los recursos cuando son escasos, razón que explicaría la expresión de las 3 isozimas de la tripsina en sus formas a, b y c (fig. 21), a diferencia de las 5 isoformas reportadas para *L. vannamei* (Klein *et al.*, 1996). A pesar de que las 3 isoformas fueron observadas en dos épocas del año, fueron más notorias; en los geles de policrilamida, las correspondientes a la época de secas, hecho que podría estar relacionado con una mayor actividad en los procesos digestivos. Así mismo, en esta época fue evidente la presencia de la quimotripsina, localizada entre 24 y 29

kDa, que normalmente forma parte de los procesos de hidrólisis multifacéticos derivados del consumo de alimento en los decápodos (Lovett y Felder, 1990; Le Moullac *et al.*, 1996).

En cambio, con la α -amilasa de la época de secas ocurrió lo contrario, se observó la menor actividad de las tres épocas del año, asociadas con la expresión de cinco isozimas (fig. 22), también llamadas moléculas homólogas (Muhlía-Almazán *et al.*, 2003) ó parálogas (Southan, 2000), lo que sugirió la presencia de las cantidades de carbohidratos que normalmente ingiere *F. duorarum*, a pesar de que en esta época se registraron los menores valores del florecimiento de fitoplancton (Hernández-Guevara *et al.*, 2008). Con el inicio de la época de lluvias se incrementó la productividad en la zona mencionada (Tapia González *et al.*, 2008) y la repleción gástrica. Se incrementó la actividad de α -amilasa; pero la actividad de la tripsina se mantuvo baja. Sólo en la época de Nortes se observó un pico de máxima actividad enzimática; aunque con el menor número de moléculas homólogas, tanto para tripsina (2) como para α -amilasa (3), y correspondió al estadio de intermuda C (135.7 mU mgHp⁻¹) y posmuda B2 (568.2 mU mgHp⁻¹) respectivamente, situación que pudo reflejar el potencial enzimático de los decápodos al encontrarse en estadios que les permiten un óptimo consumo de alimentos; tanto de origen vegetal como de origen animal.

Antes y después de la ecdisis, los estómagos de los camarones rosados analizados estuvieron vacíos, debido a la imposibilidad de utilizar sus estructuras bucales, porque al igual que su exoesqueleto, están formadas de quitina y las muda como parte de su crecimiento (Vega-Villasante *et al.*, 2000). Cuando los decápodos están próximos a mudar suspenden su alimentación (Le Moullac *et al.*, 1996, Molina-

Poveda, 2002), y hasta que se endurecen sus nuevas estructuras pueden consumir nuevamente el alimento. Esto explicó la disminución de la actividad enzimática tanto en premuda tardía (D_1''') como en posmuda (A y B). Con la estabilidad en tejidos y en la capacidad metabólica que alcanza *F. duorarum* en intermuda (C), se observó que la actividad enzimática se incrementó tanto en tripsina como en α -amilasa (fig. 17 y 19), especialmente durante la época de secas y la época de Nortes. Por consiguiente, es posible señalar que los cambios estacionales modificaron los parámetros fisicoquímicos del ambiente, y en consecuencia, la composición de nutrientes que originaron el régimen alimenticio (Van Wormhoudt *et al.*, 1998) de los decápodos estudiados, así como la variación en su expresión enzimática, asociada también con sus estadios de muda.

Los organismos capturados que se encontraron desde el estadio de intermuda (C) hasta el estadio de premuda (D_1''), presentaron estómagos con alto porcentaje de repleción gástrica al iniciar la noche, con lo que se confirmó que *F. duorarum* es de hábitos alimenticios nocturnos (Duarte *et al.*, 2006). Así mismo, las diferentes fases lunares tuvieron efecto sobre los decápodos, como se ha reportado en peneidos como *Parapenaeus longirostris* (De Coursey, 1983), que resultan afectados en su movilidad y sus hábitos alimenticios, aspectos que sin duda alguna están asociados con su ciclo de muda y con la posibilidad de capturar a sus presas, sobre todo durante luna llena; tiempo en el que se registraron mayores capturas para esta investigación, y aunque hubo representación de todos los estadios de muda, la proporción de D_0 siempre fue más alta, puesto que es el estadio de mayor duración en peneidos juveniles; de 5 días en promedio (Dall *et al.*, 1990).

La frecuencia de ocurrencia (F.O.) de las presas identificadas en el contenido estomacal de *F. duorarum* cambiaron de acuerdo con la variación de la comunidad bentónica del estuario de Celestún reportada en las tres épocas del año (Pech *et al.*, 2007), en la que los crustáceos son el grupo más importante. La comunidad bentónica, al igual que los camarones rosados, incrementaron su abundancia entre la época de secas y la época de Nortes. En el contenido estomacal de *F. duorarum* sobresalieron con su F.O. los copépodos, anfípodos, isópodos y nemátodos (tabla 9), grupos que han servido para caracterizarlo con tendencia a la carnivoría (Schwamborn y Criales, 2000) y para definir su nivel trófico entre 3 y 4 (fig. 24), de acuerdo con Christensen y Pauly (1992). El IIMP mostró que las principales presas que consumen los camarones rosados son copépodos y anfípodos, razón por la que *F. duorarum* ha sido señalado como el principal depredador de anfípodos (Corona *et al.*, 2000), junto con peces que buscan alimento en áreas asociadas con pastos sumergidos (Thijs, C. y Thiel, M., 2006). Durante la época de lluvias y la época de Nortes fue notoria la F.O. de los dípteros en el contenido estomacal de los camarones rosados, lo que sugiere que también consumen organismos suspendidos en la capa superficial del agua salobre (Brusca *et al.*, 2003) cuando las condiciones ambientales favorecen la proliferación de este recurso.

Los hábitos alimenticios de los decápodos estudiados se fueron adecuando con las variaciones de los factores abióticos, tales como la temperatura y la intensidad de luz, que al cambiar el nivel de productividad natural; de acuerdo con la Ley de van't Hoff, también modifican la actividad de las enzimas digestivas en *F. duorarum*. Al comparar la tripsina de las tres épocas del año se observó que la mayor actividad se registró durante la época de secas, mientras que la mayor actividad de

la α -amilasa se registró en la época de Nortes, con un incremento del 193% respecto a la actividad registrada en la época de secas. La alta actividad de la tripsina en la época de secas quedó asociada con la baja contribución de nutrientes provenientes del continente y con la escasa remoción de sedimentos, que resultó insuficiente para activar la cadena trófica en que están inmersos los camarones rosados (López-González *et al.*, 2006), razón que explica la necesidad de aprovechar al máximo los escasos recursos disponibles en el estuario, puesto que altas actividades de las enzimas digestivas en organismos adultos pueden compensar la escasez de alimentos y las limitantes impuestas por las bajas temperaturas (Saborowski *et al.*, 2006). Por el contrario, cuando se tiene una baja expresión enzimática se asume que la enzima es tan eficiente que con poca actividad es capaz de actuar sobre substratos abundantes, de tal manera que su actividad basal es suficiente para participar en procesos digestivos en condiciones normales (Buchholz y Saborowski, 2000), como se ha demostrado en postlarvas de *L. vannamei*, que al cambiar sus hábitos alimenticios de herbívoros a carnívoros disminuyen la actividad de la tripsina al tener a su disposición principalmente proteína animal (Isiordia-Pérez *et al.*, 2006).

Si bien es cierto que durante la época de lluvias se registró la mayor temperatura del agua ($\mu=30.7^{\circ}\text{C}$), y que debió corresponder a esta época la mayor actividad de tripsina por acercarse más a su rango óptimo de actividad de $40\text{-}70^{\circ}\text{C}$ (Le Moullac, 1994; Sainz *et al.*, 2004), no fue así, probablemente porque la salinidad que prevalecía en esta época (22 ups) no correspondió al rango óptimo requerido. En cambio, la combinación de 28.2°C and 27 ups registrada durante la época de secas favoreció la mejor expresión de esta enzima. De hecho, los cambios constantes en el ambiente y el desarrollo de organismos en su hábitat natural son el reflejo de tales

variaciones de temperatura y salinidad, mismas que también parecen afectar la actividad enzimática (Alpuche *et al.*, 2005). El efecto de la temperatura es relevante en la actividad específica de la tripsina porque los animales reducen su alimentación debido al descenso en el nivel metabólico. Este fenómeno fue descrito en *L. stylirostris*, cuando compararon animales muestreados en época fría contra animales muestreados en época cálida (Wabete, 2006).

La expresión de la α -amilasa fue diferente a la de tripsina (fig. 18). Durante todo el año estuvo presente en los procesos digestivos de *F. duorarum*, lo que indicó la presencia constante de almidones en los componentes alimenticios. La actividad de esta enzima fue en ascenso a partir de su menor actividad registrada en la época de secas ($\mu=146.2$ mU/mg de h.), lo cual sugiere que en esta época los decápodos consumían alimentos de origen vegetal, sin ser estos últimos un recurso limitante, puesto que cuando una enzima funciona sobre un substrato que se encuentra presente en cantidades suficientes, no se requiere la expresión de la enzima en grandes proporciones (Harris *et al.* (1986). La tendencia ascendente de la actividad de α -amilasa llegó a un máximo en la época de Nortes ($\mu= 283.4$ mU/mg de h.). En dicha época, el consumo alimenticio estuvo orientado hacia los componentes del zooplancton y del meiobentos; como copépodos y anfípodos, mismos que incrementaron su proporción en el ambiente como consecuencia del aumento del fitoplancton (Hernández-Guevara *et al.*, 2008), que respondió a las variaciones ambientales características de esta época (López-González *et al.*, 2006), y aunque hubo consumo de fitoplancton; debido a los procesos de filtración de agua por el metabolismo natural de los decápodos, y consumo de macrofitas (*H. wrightii*), su escases pudo haber sido el detonador del mecanismo compensatorio (Harris *et al.*,

1986), que a través de un incremento de actividad de α -amilasa, optimizó el proceso de hidrólisis de almidones que ingiere *F. duorarum* como principal reserva energética, aunque los decápodos no asimilan fácilmente los carbohidratos (Cruz-Suárez, 1998). Lovett y Felder (1990) señalaron que en postlarvas de *L. setiferus*, alimentadas básicamente con artemia, se observaron incrementos substanciales de la actividad de la α -amilasa como respuesta a los bajos niveles de carbohidratos incluidos en la dieta suministrada. La actividad de la α -amilasa se incrementa cuando el substrato sobre el que actúa es limitante (Harris et al., 1986). Aunque durante la época de Nortes había un importante desarrollo de fitoplancton en el estuario, sirvió principalmente para el aumento del zooplancton; que llega a estar constituido hasta en un 90% por copépodos (Balech, 1977), considerados los principales consumidores del fitoplancton, y no para alimentación de *F. duorarum*, puesto que durante Nortes se observó un incremento de F.O. de copépodos y anfípodos en el contenido estomacal de los camarones rosados, por lo tanto, resulta claro que el $\delta^{13}\text{C}$ de *F. duorarum* (-18 a -23 ‰) (fig. 27) debe ser próximo al $\delta^{13}\text{C}$ de los copépodos (-20.8‰, Fry, 1988); al ser éstos uno de los principales componentes en su dieta alimenticia, del plancton (-18.4‰) y de *H. wrightii* (-20.2‰), que sirvió de refugio tanto para los decápodos estudiados (Sánchez, 1997) como para las subclases; Copepoda y Malacostraca, que formaron parte importante en su dieta alimenticia (tabla 9). Ambas subclases han estado presentes, de manera relevante, en el consumo alimenticio que definió a *F. duorarum* (Schwamborn y Criales, 2000) y a *L. schmitti* (Sánchez et al., 2002) como especies con tendencias a la carnivoría.

Los tejidos vegetales fueron escasos, representados básicamente por fragmentos de *H. wrightii*, localizado en el tracto digestivo de *F. duorarum* en forma

esporádica, mientras que los componentes del fitoplancton no pudieron ser registrados porque no se fijan en músculo como ^{13}C , sino que pasan a ser las principales reservas energéticas que aportan glucosa; recurso primario de energía usado por el hepatopáncreas cuando escasea el alimento (Sánchez-Paz *et al.*, 2007), y se pierde en respiración o en la energía que se invierte en mecanismos de escape de sus depredadores.

Al comparar la baja F.O. de *Halodule wrightii* en *F. duorarum* de Celestún con las proporciones de *Halodule sp.* que señaló Anderes (1983) como muy abundantes en *F. notialis* y *L. schmitti*; considerados epibentófagos y oportunistas en ambientes naturales, se sugiere que el bajo consumo de *H. wrightii* es probablemente el reflejo de la alta disponibilidad de alimento animal en el estuario de Celestún, sobre todo en la época de Nortes.

La actividad enzimática estuvo determinada por el factor época del año y el factor estadio de muda. Ambos factores marcaron diferencias significativas ($p < 0.05$) y tuvieron un efecto sinérgico sobre dicha actividad, tanto en el caso de la tripsina como de la α -amilasa. En especial, durante la época de Nortes se encontró presente el componente o componentes que desencadenaron la actividad de la α -amilasa, posiblemente escaso alimento de origen vegetal o la combinación de la temperatura y la salinidad óptimas, puesto que las enzimas aparentemente actúan a diferentes temperaturas y el cloruro de sodio funciona como un activador de la α -amilasa (Alpuche *et al.*, 2005). La mayor actividad de la α -amilasa, expresada por el menor número de moléculas homólogas (3), fue asociada con temperaturas ambientes de $\mu = 26.8$ °C y salinidades próximas a las $\mu = 24.6$ ups, en las que vive *F. duorarum* durante la época de Nortes, y no con temperatura y salinidad de 28.2 °C y 27.0 ups

como se observó en la época de secas, cuyos valores son más próximos a la temperatura óptima de reacción de la α -amilasa (37 a 40 °C; Bernfield, 1955; Gaxiola, 2005), de tal manera que la temperatura y la salinidad pueden ser factores importantes que influyen en la expresión enzimática en los decápodos. La presencia de enzimas activas que digieren productos vegetales indican que *F. duorarum* no es un estricto carnívoro, y que podría metabolizar energía de varios recursos tróficos, incluyendo detritus vegetal (Brêthes *et al.*, 1994).

Si bien es cierto que la tripsina y la α -amilasa son complementarias y que participan en un 60 % de los procesos digestivos (Lovett y Felder, 1990), también es cierto que la regulación de su actividad está relacionada con el origen de los componentes de la dieta (Chong *et al.*, 2001; Buillon *et al.*, 2002) y con cambios ontogenéticos, como señala Jones *et al.* (1997), quien comprobó que en larvas de crustáceos, con hábitos alimenticios carnívoros, se tienen bajos niveles de tripsina porque su actividad se compensa con largos tiempos de retención de alimentos en el tracto digestivo, con la selección de presas que proporcionan altos niveles de energía y con la alta digestibilidad de las mismas. A diferencia de lo que ocurre con especies herbívoras como los copépodos y peneidos en estado postlarvario, quienes se alimentan de microalgas y muestran los más altos niveles de tripsina, incluso más que especies omnívoras como la artemia. Por su parte Hofer (1982), comprobó también que en organismos herbívoros se registra alta actividad de la tripsina, incluso mayor que la que se observa en organismos carnívoros, por consiguiente, las variaciones en la actividad de la tripsina puede ser un buen indicador de los cambios en la dieta de un organismo y de su ubicación en el nivel trófico (Lovett y Felder, 1990), sin embargo, en el presente trabajo, la variación en la actividad de tripsina fue

similar a la variación en el nivel trófico (fig. 29), lo que sugiere que *F. duorarum* consumió proteína como principal recurso energético (Cuzon *et al.*, 1980; Barclay *et al.*, 1983) durante la época de secas, mientras que, su alimentación durante las épocas de lluvias y Nortes tendió más hacia la omnivoría.

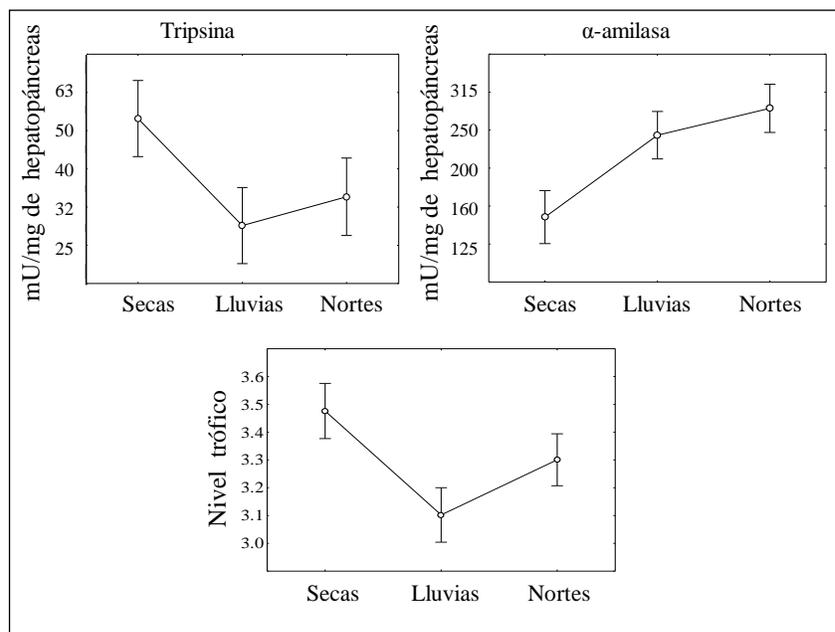


Figura 29.- Comparativo de la actividad de tripsina y α -amilasa respecto al Nivel trófico calculado en *F. duorarum* (N=89, 89 y 124 respectivamente). Promedio \pm error estándar.

Otra de las especies que ha sido catalogada con tendencias a la carnivoría es *Litopenaeus schmitti*, y de acuerdo con Carrillo-Farnés *et al.* (1995), organismos adultos de *L. schmitti* en su ambiente natural marino, mostraron actividad de la α -amilasa (4.18 U/mg de proteína) 9.7 veces mayor que la actividad de la tripsina (0.43 U/mg de proteína). De acuerdo con Jones *et al.* (1997), 9.7 representa una razón alta, que se asocia con organismos con tendencias a la carnivoría. En forma similar, si se expresa la actividad enzimática de *F. duorarum* del estuario de Celestún, en función de la razón entre amilasas y proteasas (A/P) ó amilasa/tripsina (A/T), se tiene

para la época de secas una razón de 2.8 ± 0.8 , para lluvias de 9.3 ± 0.7 y para la época de Nortes de 10.7 ± 0.7 , lo que sugiere que los decápodos estudiados modulan su actividad enzimática en función de las características ambientales de cada época del año. Mostraron tendencias a la carnivoría en las tres épocas anuales, sin embargo, en la época de Nortes fue más clara dicha tendencia, y coincidió con el incremento de meiofauna observada en el contenido estomacal. Así mismo, las pruebas de $\delta^{15}\text{N}$ confirmaron la preferencia en el consumo de proteína en lugar de carbohidratos. El corrimiento en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en las tres épocas del año (fig. 27) llevaron a *F. duorarum* de un organismo carnívoro en la época de secas (nivel 5), a un organismo generalista oportunista en las épocas de lluvias y Nortes (nivel 4; Fry, 1988), hecho que concuerda con el nivel trófico calculado (fig. 24).

El presente estudio también reveló más de un período de reclutamiento. La evidencia fue la presencia de camarones de diferentes tallas en las tres épocas del año, lo que permite sugerir que las postlarvas de camarones que migraron de mar abierto, desde las áreas de pesquerías hasta la costa, entraron a la laguna de Celestún y encontraron un biotopo apropiado para su nutrición y protección de depredadores. Meses después, su registro de $\delta^{13}\text{C}$ (≈ -23 ‰) se aproximó al de *Halodule wrighti* (-20.2 ‰) y al del plancton (-18.4 ‰), y difirió notablemente del valor correspondiente al sedimento (≈ -7 ‰), con lo cual se evidencia que *F. duorarum* se alimentan principalmente de organismos que se encuentran en la columna de agua; flotando o adheridos a los pastos sumergidos, y no de los elementos que forman el sedimento estuarino, puesto que al igual que otros peneidos, no toma a sus presas del detritus (Primavera, 1996; Macia, 2004).

Las tallas más grandes fueron observadas en la época de lluvias (L.C. $\mu=17.57$ mm), hecho que podría estar relacionado con la migración hacia el mar de camarones subadultos, desde áreas que normalmente tienen vegetación sumergida de macrofitas, principalmente *Halodule wrightii*, donde normalmente habitan los decápodos juveniles.

En época de Nortes los vientos producen corrientes marinas que facilitan la entrada de camarones a las áreas costeras de Yucatán (Defeo *et al.*, 2005), por consiguiente, esta época pudiera ser considerada como un período del año con decápodos sedentarios que viven entre los pastos sumergidos. Durante las otras épocas del año el $\delta^{13}\text{C}$ fue diferente y podría representar un cambio en la población (de sedentarios a nómadas), con organismos que migran de un lugar a otro dentro de la laguna de Celestún, ocupando principalmente la zona de mezcla (Herrera-Silveira, 1993). Al mismo tiempo, el registro de $\delta^{13}\text{C}$ en músculo de *F. duorarum* evidenció el origen de sus recursos alimenticios; asociados principalmente con aguas marinas y otros con aguas salobres que caracterizan la laguna de Celestún (Herrera Silveira *et al.*, 1999; Pech *et al.*, 2007). Con este hecho queda clara la necesidad de proteger las áreas naturales de las que dependen especies nativas como *F. duorarum*.

CONCLUSIONES

La acumulación de las reservas orgánicas que requieren los juveniles de *F. duorarum* para continuar con su crecimiento, a través de mudas sucesivas, se correlacionó con la activación de enzimas hepatopancreáticas, tales como tripsina y α -amilasa. Ambas enzimas mostraron variaciones importantes a través del periodo anual de observaciones para este estudio. La actividad de cada una dependió del tipo de alimento disponible en el área de refugio para los decápodos, sus gráficas mostraron similitud entre la variación anual de la tripsina y la correspondiente al Nivel trófico, en la que se observó que a pesar de los ajustes en la dieta alimenticia, *F. duorarum* siempre estuvo en el rango que corresponde a los organismos que ingieren importantes cantidades de proteínas. La escasa composición de recursos alimenticios para *F. duorarum* en la época de secas fue contrastante con la abundancia observada durante la época de Nortes, sin embargo, la actividad de la tripsina dejó claro que el consumo de proteínas es el recurso principal a lo largo de todo el año, mientras que la α -amilasa se expresó en los procesos digestivos como parte de un mecanismo compensatorio al momento de la ingesta de carbohidratos; que dan origen a la glucosa utilizada por el hepatopáncreas como principal recurso energético, y que por cierto, fueron escasos en la dieta alimenticia de *F. duorarum* en las tres épocas del año, sobre todo durante la época de Nortes, en la que sobresalió el consumo de Copepoda y Malacostraca, subclases asociadas con las aguas marinas que penetran en la laguna de Celestún. El consumo de ambas subclases fue confirmado con los análisis del $\delta^{13}\text{C}$ y del $\delta^{15}\text{N}$. Los resultados de dichos análisis fueron coherentes con el IIMP de presas y con el Nivel trófico calculado, por lo que

se ubicó a *F. duorarum* entre los organismos omnívoros con tendencias a la carnivoría, capaces de responder favorablemente a las variaciones de recursos alimenticios de cada época del año, mediante la modulación de su expresión enzimática, que a su vez, depende de las variaciones fisiológicas asociadas con sus períodos cíclicos de ecdisis.

Por último, es necesario señalar que la disponibilidad de recursos que puede tener *F. duorarum* en la laguna de Celestún, depende en gran parte, de las condiciones ambientales que prevalecen en esta zona, en la cual, la entrada del agua marina es fundamental, tanto por el acarreo de especies de importancia comercial; como los peneidos, como de los organismos que serán aprovechados en su alimentación; como los copépodos.

LITERATURA CITADA

- Alpuche, J., Pereyra, A. y Agundis, C., 2005. Respuestas bioquímicas de camarones marinos a factores ambientales. Veterinaria Organización S. L., España. VI(5). Pp.10 Revista Electrónica de Veterinaria REDVET - ISSN 1695-7504. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
- Anderes, B.L., 1983. Efecto alimentario de los camarones rosado y blanco (*Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*) en la Ensenada de la Broa. Revista Cubana Investigación Pesquera. 8(1):51-64.
- Arena, L., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, C. Soyez, A. van Wormhoudt, and C. Rosas. 2003. Physiological and genetic variations in domesticated and wild populations of *Litopenaeus vannamei* fed with different carbohydrates levels. Journal of Shellfish Research 22: 269-279.
- Arenal F., Espinosa A., García C., Arenal A., Fajardo J., Cabrera E. y Pimentel E., 2002. Estudio de la actividad enzimática de β -galactosidasa en la ontogenia del Camarón *Litopenaeus schmitti* (Crustácea: Decápoda). I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Pp. 898-905.
- Balech, E. 1977. Introducción al Fitoplancton Marino. Ed. Univ. de Buenos Aires, Argentina. 211 pp.
- Barclay, M. C., Dall, W., Smith, D. M. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. Journal Experimental Marine Biology and Ecology. 68: 229–244.
- Barclay, E., 2004. Faces of Globalization. Edited by T. K. Maloy. United Press International.
- Bernfeld B (1955) Sur une méthode de dosage des amylases, In: Colowick, S.P., Kaplan N.O., (Eds) Methods in enzymology. Academic Press NY, pp 149-154.
- Brêthes, J. C., Parent, B. and Pellerin, J. 1994. Enzymatic Activity as an Index of Trophic Resource Utilization by the Snow Crab *Chionoectes opilio* (O. Fabricius). Journal of Crustacean Biology. 14:220-225.
- Bouillon, S., Raman, A. V., Dauby, P. and Dehairs, F., 2002. Carbon and Nitrogen Stable Isotope Ratios of Subtidal Benthic Invertebrates in an Estuarine Mangrove Ecosystem (Andhra Pradesh, India). Estuarine, Coastal and Shelf Science. 54:901–913.
- , N. Koedam, A. V. Raman, and F. Dehairs. 2002b. Primary producers sustaining macro-invertebrate communities in intertidal mangrove forests. Oecologia. 130: 441-448.
- Buchholz, F. y Saborowski, R., 2000. Metabolic and enzymatic adaptations in northern krill, *Meganyctiphanes nervegica*, and Antarctic krill, *Euphasia superb.* Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences [Can. Journal Fisheries Aquatic Science]. Vol. 57: 115-129.
- Burkenroad, M. D. 1936. A new species of *Penaeus* from the American Atlantic. Anais de Academia Brasileira de Ciencias, Rio de Janiero 8: 315-318.
- . 1939. Further observations on Penaeidae on the northern Gulf of Mexico. Bulletin of the Bingham Oceanographic Collection 6(6): 1-62.
- Cara, B., Moyano F. J., Zambonino J. L. y Fauvel Ch., 2004. Actividad Tripsina y quimotripsina como indicadores de condición larvaria: estudio de restricción

- alimentaria y calidad de puesta. Comunicación Científica. III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 547-556.
- Carrillo-Farnés, O., Forrellat, B. A., González, V. R., 1995. Procedimiento de obtención de hepatopancreatina de camarón. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Pp 6.
- Casillas-Hernández, R., Magallón, F., Portillo, G., Carrillo, O., Nolasco, H. y Vega-Villasante, F., 2002. La actividad de proteasa, amilasa y lipasa durante los estadios de muda del camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. Rev. Investigación Marina. 23(1):35-40.
- Chan, S.M., Rankin S.M., Keeley, L.L., 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and haemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. Biology Bulletin. 175:185-192.
- Chong, V. C., Low, C. V. and Ichikawa, T., 2001. Contribution of mangrove detritus to juvenile prawn nutrition: a dual stable isotope study in a Malaysian mangrove forest. Marine Biology. 138: 77-86.
- Chong, A., Hashim, R., Chow-Yang, L. y Ali, A., 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish. Aquaculture. 203:321–333.
- Christensen, V., and D. Pauly. 1992. ECOPATH II - A software for balancing steady-state ecosystem models and calculating network characteristics. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam Ecological Modeling 61: 169-185.
- Coplen, T.B., Brand W.A., Gehre M., Gröning M., Meijer H.A.J., Toman B. and Verkouteren R.M., 2006. New Guidelines for $\delta^{13}\text{C}$ Measurements. Analls Chemistry. 78:2221-2438.
- Corona, A., Soto, L.A. & Sánchez, A.J., 2000. Epibenthic amphipod abundance and predation efficiency of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) in habitats with different physical complexity in a tropical estuarine system. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 253: 33–48.
- Cruz-Suárez, L. E., 1998. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Programa de Maricultura. Avances en Nutrición Acuícola III.
- Cruz-Suárez L. E., Ricque M. D., Tapia S. M., Marín Z. L. F., Guajardo B. C., Nieto L. M. Y Salinas M. A., 2002. Historia y Estatus Actual de la Digestibilidad y Algunas Características Físico-químicas de los Alimentos Comerciales para Camarón Usados en México. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún Quintana Roo. Pp 22.
- Cuzon, G., Cahu, C., Aldrin, J. F., Messenger, J. L., Stephan, G., Mevel, M., 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. Procediment World Mariculture Society. 11: 410–423.
- Dall, W., Hill, B. J., Rothlisberg, P. C. y Staples, D. J., 1990. The biology of the Penaeidae. In Advances in Marine Biology (Blaxter, J. H. S. & Southward, A. J., eds.). 27:1-489.
- De Coursey, P. J., 1983. Biological timing. En: The Biology of crustacean. Vol. 7 (eds. Verberg F. & Verberg W.) Academic press, New York, pp: 107-162.

- Defeo, O., Hernández M.A., Pérez-Castañeda, R. y Cabrera, J.L., 2005. Pautas para el manejo de la pesquería de jaiba y camarón en un área natural protegida: el caso de la Ría de Celestún, Yucatán-Campeche. Cinvestav Unidad Mérida. Pp. 78.
- Duarte, L.O., Gómez, C.P., Manjarrés, M.L., García, C.B., Escobar, F.D., Altamar, J., Viaña, J. E., Tejada, K., Sánchez, J. y Cuello, F., 2006. Variabilidad circadiana de la tasa de captura y la estructura de tallas en camarones e ictiofauna acompañante en la pesquería de arrastre del Mar Caribe de Colombia. Investigaciones Marinas Valparaíso. 34(1): 23-42.
- Christensen, V. and Pauly, D., 1992. ECOPATH II - a software for balancing steady-state ecosystem models and calculating network characteristics. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam Ecological Modelling. 61:169-185.
- Echeverría, F., Otero, V., Cornejo, F., y Rodríguez, J., 2003. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas – CENAIM. Contribuciones del CENAIM durante el VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.
- Forrellat, B. A., del Monte M. A., Estévez L. T., Boburg C.B., Nolasco S. H., Carrillo F. O., 2004. Caracterización de lipasas en tres especies de camarones peneidos. Su importancia en la digestión. III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Pp. 767-776.
- Fry, B., 1988. Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. Limnology Oceanography. 33(5):1182-1190.
- Furuya, V., Hayashi, C., Furuya, W. and Sakaguti, E., 2002. Replacement rates of carbón stable isotope (^{13}C) in muscle tissue of pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). Zootecnia Tropical, 20(4):461-472.
- Gamboa-Delgado, J., 2001. Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia. Tesis de Magíster en Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Ecuador.
- _____, C. Molina-Poveda, and Ch. Cahu. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. Aquaculture Research 34: 1403-1411.
- García-Carreño, F. L., L. E. Dimes, and N. F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous inhibitors. Annals Biochemistry 214: 65-6
- , Navarrete M. A., Hernández C. P., Ezquerro J. M., Serviere E., y Maeda A., 1998. Tecnología Enzimática en Acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola III.
- García-Carreño, F. y Navarrete M. A., 2005. Bioquímica postmortem y propiedades funcionales en camarones obtenidos en presencia de moduladores exógenos para la manipulación de la fisiología para producir organismos con propiedades especiales. XXIX Premio Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos 2005. Pp. 1-11.
- García, E., 1986. Apuntes de Climatología. Talleres de Offset Larios, S. A. México, D. F. 155 pp.
- García-Rodríguez, F. J. and De La Cruz-Agüero, J., 2011. A Comparison of Indexes for Prey Importance Inferred from Otoliths and Cephalopod Beaks Recovered from Pinniped Scats. Journal of Fisheries and Aquatic Science 6(2):186-193.

- Gaxiola, G., Pedroza R., Gómez L., López N. Y García T., 1998. Algunos aspectos de la nutrición del camarón blanco (*Penaeus setiferus*) y el camarón rosado (*P. duorarum*) del Golfo de México. *Avances en Nutrición Acuícola* III.
- , Cuzon G., García T., Taboada G., Brito R., Chimal M. E., Paredes A., Soto L., Rosas C. and Wormhoudt A., 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Comparative Biochemistry and Physiology*. ELSEVIER.
- , G. Cuzon, H. Ceccaldi. 2009. Digestive physiology in crustacea. In, G. Broudy and D. E. Jory (eds.), *The Rising Tide, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, 2009 ISBN 978-1-888807-08-0, Baton Rouge Louisiana, USA.
- Geiger, R., and H. Fritz. 1988. Trypsin, pp. 119-129. In, H. U. Bergmeyer and M. Grab (eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 5. Chemie Verlag, Weinheim. Academic Press, New York.
- Granados Barba, A., Solís W. V., Bernal R. R. G., 2000. *Métodos de Muestreo en la Investigación Oceanográfica*. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 448 pp.
- Harris, R., Samain, J., Moal, J., Martin, V., and Poulet, S., 1986. Effects of algal diet on digestive enzyme activity in *Calanus heigolandicus*. *Marine Biology* 90:353-361.
- Hernández-Guevara, N.A., Ardisson, P.L. and Pech, D. 2008. Temporal trends in benthic Macrofauna composition in response to seasonal variation in a tropical coastal lagoon, Celestun, Gulf of Mexico. *Marine and Freshwater Research*, 59:772-779.
- Herrera-Silveira, J. A., 1993. *Ecología de los productores primarios en la laguna de Celestún, Yucatán, México*. Patrones de variación espacial y temporal. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- & Ramírez-Ramírez, J. 1998. Salinity and nutrients in the coastal lagoons of Yucatan, Mexico. *Verh. Internat. Verein. Limnology*. 26:1473-1478.
- , 1999. Patrones de variación espacial y temporal de la biodiversidad fitoplanctónica de los cenotes abiertos de Yucatán. Informe final del proyecto M011. Cinvestav Unidad Mérida. Pp. 58.
- , Ramírez, J. and Zaldivar, A. 2000. Structure and soil salinity of two mangroves forests of Yucatan, SE Mexico. *Verh. International Verein. Limnology*. Pp. 1707-1710.
- Higgins, R. and Thiel, H. 1992. *Introduction to the study of meiofauna*. Washington, D. C. 488 pp.
- Hofer, R. 1982. Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid. *Camp. Biochemistry Physiology*. 72(1): 55-63.
- Isiordia-Pérez, E., Puello-Cruz, A.D., Abramo, L. and González-Vega, H. 2006. Evaluación de la actividad enzimática y contenido de proteína en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* alimentadas con diferentes dietas. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. Vol. VII (04):1695-7504.
- Jones, D.A., Kumlu, M., Le Vay, L. and Fletcher, D.J. 1997. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *Aquaculture* 155:285-295.

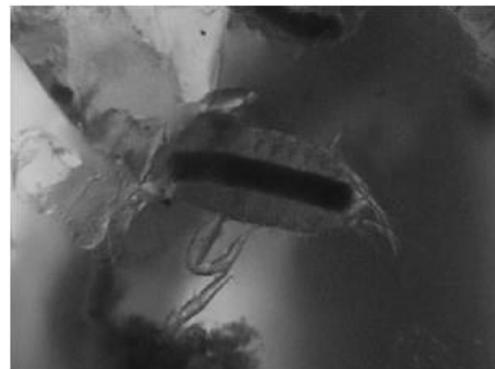
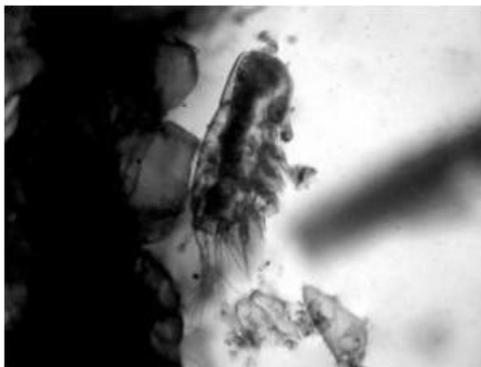
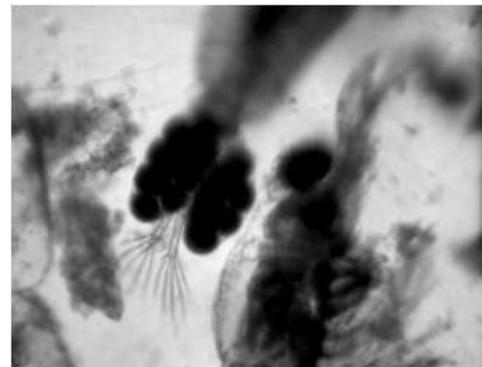
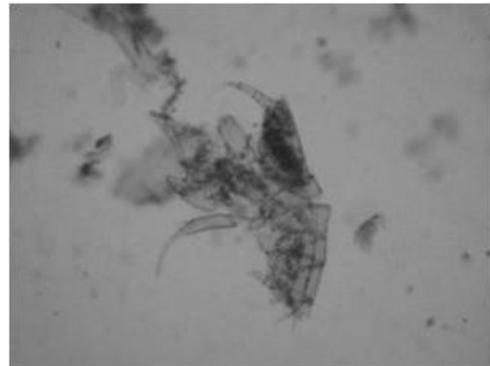
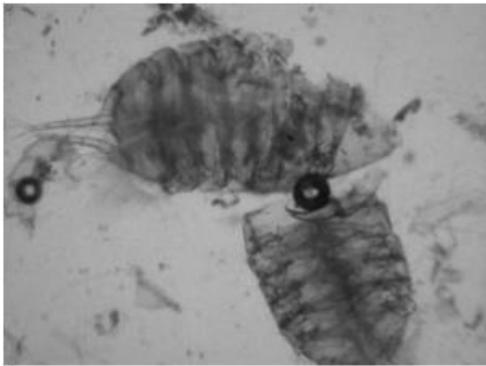
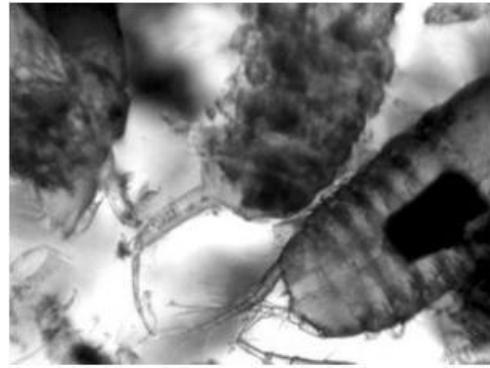
- Klein, B., Moullac, L.G., Sellos, D. and Van Wormhout, A., 1996. Molecular Cloning and Sequencing of Trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in Assessing Gene Expression during the Moulting Cycle. *Journal Biochemistry. Cell Biol.* 28(5):551-563.
- Lee, D., and Wickins, J., 1992. Crustacean farming. Oxford. Great Britain. 392 pp.
- Le Moullac, G., Van Wormhout, A., Aquacop. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea Decapoda). *Aquatic Living Resources.* 7(3):203-210.
- , Klein, B., Sellos, D., and Van Wormhout, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 208:107-125.
- Lovett, D.L., and Felder, D.L., 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biology Bulletin.* 178:144–159.
- Lucas, H. 1846. Crustacés, Arachnides, Myriapodes et Hexapodes. Exploration scientifique de l'Algérie pendant les années 1840, 1841, 1842. Sciences physiques, Zoologie 2. Histoire Naturelle des Animaux Articulés, part 1: 1-403, plates 1-8.
- Macia, A., 2004. Primary Carbon Sources for Juvenile Penaeid Shrimps in a Mangrove-Fringed Bay of Inhaca Island, Mozambique: A Dual Carbon and Nitrogen Isotope Analysis. *Journal Marine Science.* 3(2):151–161.
- Milne Edwards, H. 1837. Histoire naturelle des Crustacés, comprenant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux. Librairie Encyclopédique de Roret. Vol. 2. Paris: Librairie Encyclopédique de Roret.
- Molina-Poveda, C., Escobar, V., Gamboa-Delgado, J., Cadena, E., Orellana, F. y Piña, P., 2002. Estrategia de alimentación de acuerdo a la demanda fisiológica del juvenil de *Litopenaeus vannamei* (Boone). In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre de 2002. Cancún Quintana Roo, México.
- Pech, D., Ardisson P.L, and Hernández-Guevara, N., 2007. Benthic community response to habitat variation: A case of study from a natural protected area, the Celestun coastal lagoon. *Cont. Shelf Research.* 27:2523–2533.
- Pérez-Castañeda, R., and Defeo, O., 2001. Population Variability of Four Sympatric Penaeid Shrimps (*Farfantepenaeus spp.*) in a Tropical Coastal Lagoon of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 52: 631-641.
- Pérez-Castañeda, R. y Herrera-Dorantes, M. T. 1999. Primer registro del camarón *Farfantepenaeus notialis* (Pérez-Farfante, 1967) en lagunas costeras del Golfo de México. *Oceánides.* 14(2):133-136.
- Pérez-Farfante, I., 1970. Diagnostic characters of juveniles of the shrimps *Penaeus aztecus aztecus*, *P. duorarum duorarum* and *P. brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). U. S. Fish Wildlife Service, Special Scientific Report, Fisheries. 599:26 pp.

- Picos-García, C., García-Carreño, F. L., y Serviere-Zaragoza, E., 2000. Digestive proteases in juvenile mexican green abalone, *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 181:157-170.
- Primavera, J. H., 1996. Stable carbon and nitrogen isotope ratios of penaeid juveniles and primary producers in a riverine mangrove in Guimaras, Philippines. *Bulletin of MAJUNE Science*. 58(3):675-683.
- Robblee, M. B. And Hittle C., 2005. Empirical Studies In Support Of A Pink Shrimp, *Farfantepenaeus duorarum*, Simulation Model For Florida Bay. Science for a changing world. Department of the Interior, U.S. Geological Survey.
- Rodriguez, A., L. Le Vay, G. Mourente, D. A. Jones. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology* 118: 45-51.
- Roldán, L. D. y Salazar, S. M., 2002. La Cadena de Camarón de Cultivo en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. 16Pp.
- Rosas, C., Pascual C., López N. Y Sánchez, A., 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún Quintana Roo.
- Saborowski, R., Thatje, S., Calcagno, J.A., Lovrich, G.A. and Anger, K., 2006. Digestive enzymes in the ontogenetic stages of the southern king crab, *Lithodes santolla*. *Marine Biology*. 149: 865–873.
- SAGARPA, 2006. DIARIO OFICIAL DE TAMAULIPAS (Segunda Sección) (Viernes 25 de agosto).
- Sainz, J. C., García C. F., Sierra, B. A. and Hernández, C. P., 2004. Trypsin Síntesis and Storage as Zymogen in the Midgut Gland of the Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*. 24(2):266-273.
- Sánchez, A. J. 1997. Habitat preference of *Penaeus duorarum* Burkenroad (Crustacea: Decapoda) in a tropical coastal lagoon, southwest Gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 217(1):107–117.
- Sánchez, A., Bárbaro, J., Delgado, G. y Pérez, L., 2002. Evaluación del alimento natural epibentónico en estanques de tierra teniendo en cuenta la densidad de camarones en cultivo. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Pp. 567-572.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazan, A., Yepiz-Plascencia, G., 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 340:184-193.
- , ———, A. Muhlia-Almazan, N. Y. Hernandez-Saavedra, and G. Yepiz-Plascencia. 2003. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 292: 1– 17.
- Schwamborn, R. and Criales, M.M., 2000. Feeding strategy and daily ration of juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*) in a South Florida seagrass bed. *Marine Biology*. 137:139-147.
- Simões, S. M., R. C. Costa, A. Fransozo, and A. L. Castilho. 2010. Diel variation in abundance and size of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea,

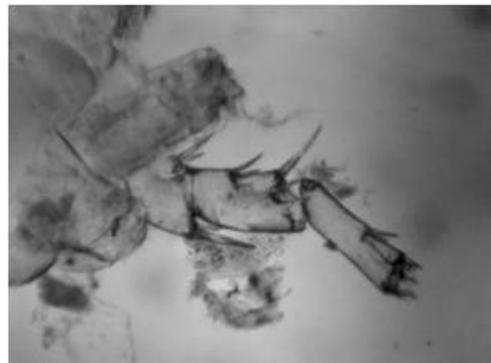
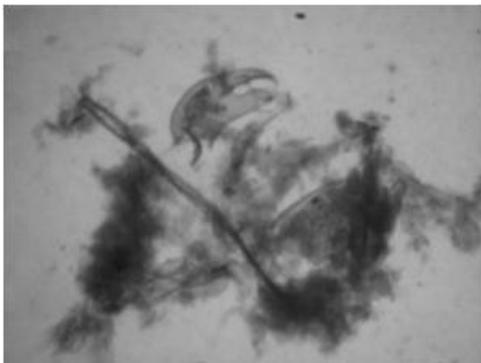
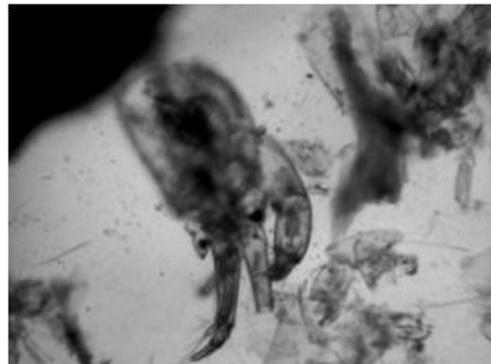
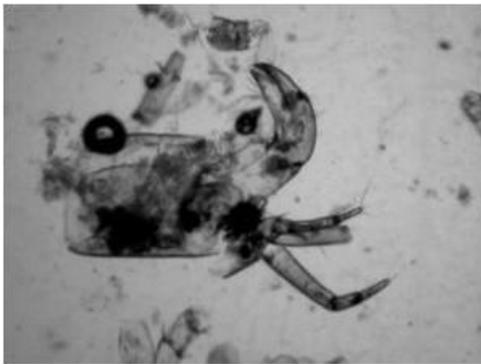
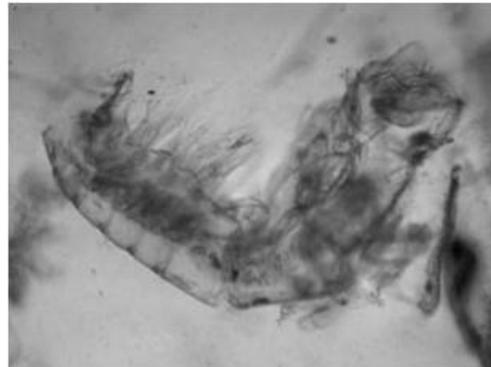
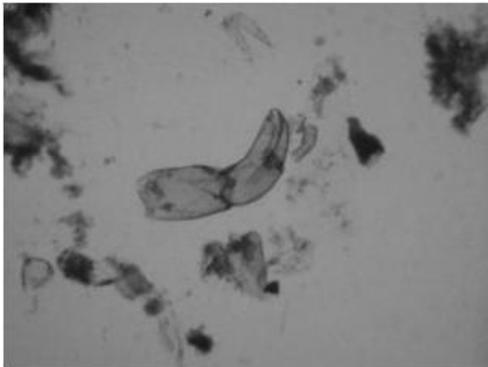
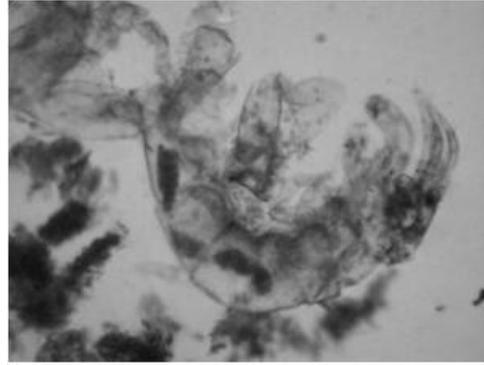
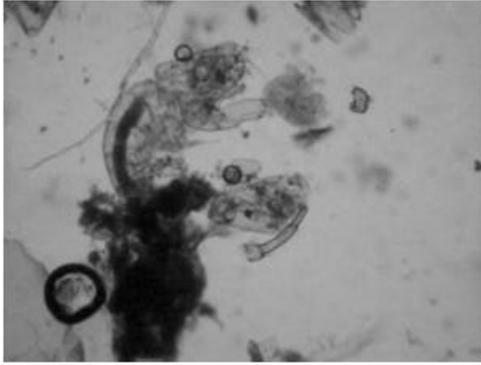
- Penaeoidea) in the Ubatuba region, Southeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82: 369-378.
- Stimpson, W. 1871. Notes of northern American Crustacea in the museum of the Smithsonian Institution. No. III. *Annals of the New York Lyceum* 10: 92-136.
- Tapia-González, F., Herrera-Silveira, J.A. and Aguirre-Macedo, M., 2008. Water quality variability and eutrophic trends in karstic tropical coastal lagoons of the Yucatán Peninsula. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76:418-430.
- Thijs, C. and Thiel, M., 2006. Multiple predator effects in an intertidal food web. *Journal of Animal Ecology*. 75:25-32.
- UNESCO, 1998. *CARICOMP* – Caribbean coral reef, seagrass and mangrove sites. Coastal region and small island papers 3, UNESCO, Paris, xiv + 347 pp.
- Van Wormhoudt, A., 1980. Regulation d'activité de l' α amylase à différentes températures d'adaptation et en fonction de l'ablation des pédoncules oculaires et du stade de mue chez *Palaemon serratus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 8:193-203.
- , Le Moullac, G., Klein, B. y Sellos, D., 1998. Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda): adaptación a la composición del régimen alimenticio. *Avances en Nutrición Acuícola III*.
- and Sellos, D., 2003. Highly variable polymorphism of the alpha-amylase gene family in *Litopenaeus vannamei* (Crustacea Decapoda) *Journal of molecular evolution*. 57(6):659-71.
- Vanegas, C., 1996. Efectos subletales del cadmio y zinc en *Penaeus setiferus*. Tesis de Doctorado (Doctorado en Ciencias, Biología). Facultad de Ciencias UNAM. 118 pp.
- Vega-Villasante, F., Nolasco-Soria, H., Civera-Cerecedo, R., González-Valdés, R., and Oliva-Suárez, M., 2000. Alternativa para la alimentación del Camarón en cultivo: el manejo de la muda. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Vega-Villasante, F., Flores T. A., Carrillo F. O., 2002. Alimentos funcionales en la nutrición del camarón: ¿el futuro? I Congreso Iberoamericano Virtual en Acuicultura. Pp. 891-897.
- Villamar, O. C. A., 2003. Manual de procedimiento técnico para la cría de camarón orgánico. II Congreso Internacional Virtual de Acuicultura. Pp. 559-574
- Wabete, N., 2006. Etude écophysiological du métabolisme respiratoire et nutritionnel chez la crevette *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Thèse Univ. Bordeaux I. Ecole doct. Sci. Viv., géosci. Science environnement. 173pp.
- Zar, J., 1996. *Biostatistical Análisis*. Prentice Hall. N. Y. 663 pp.

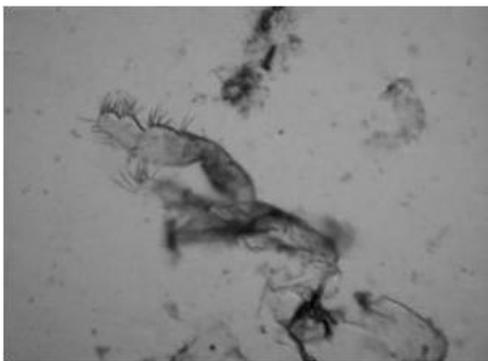
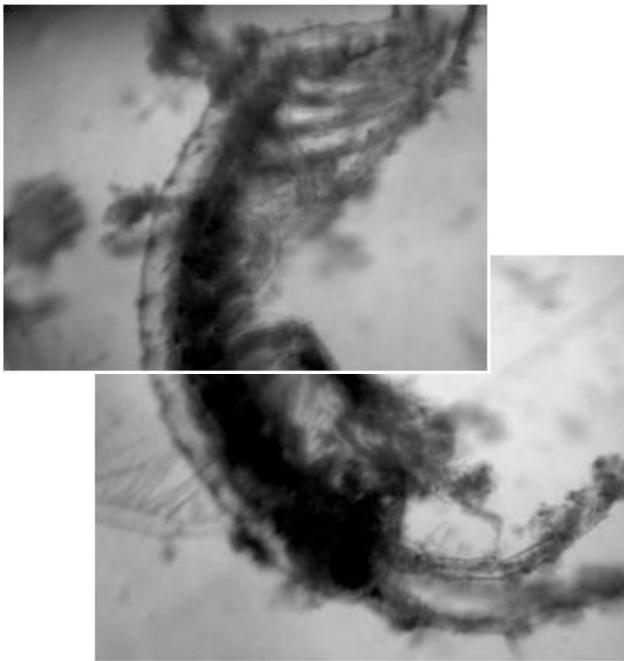
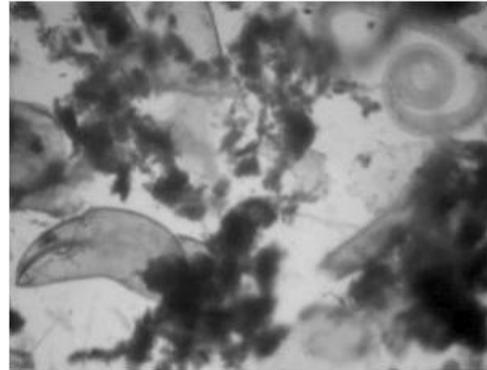
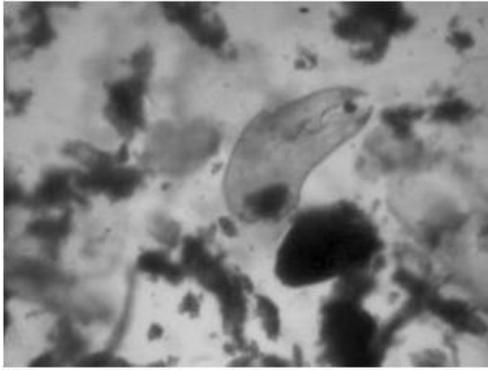
Apéndice 1; Imágenes de contenido estomacal en *Farfantepenaeus duorarum* del estuario de Celestún, Yucatán. (10X y 40X).

Copéodos

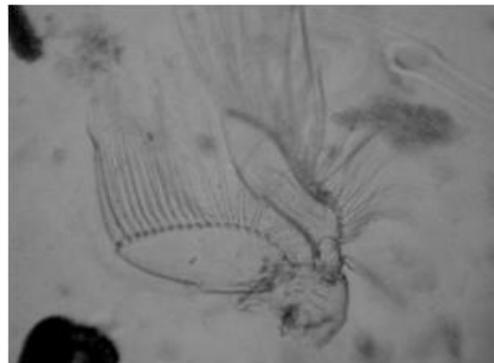
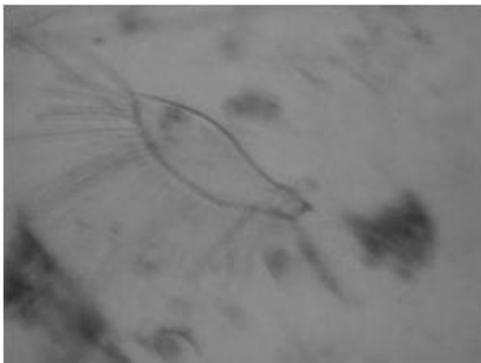
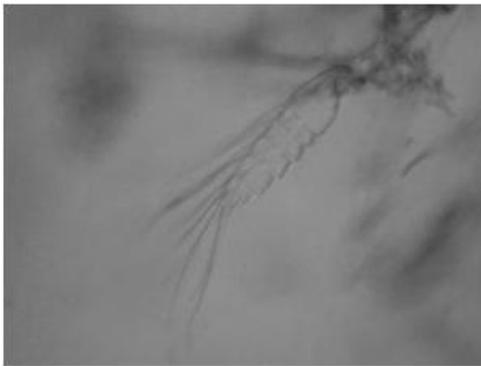
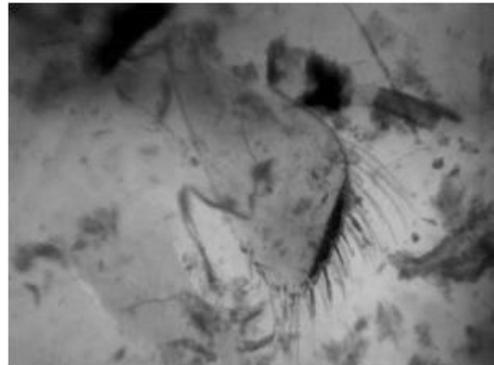
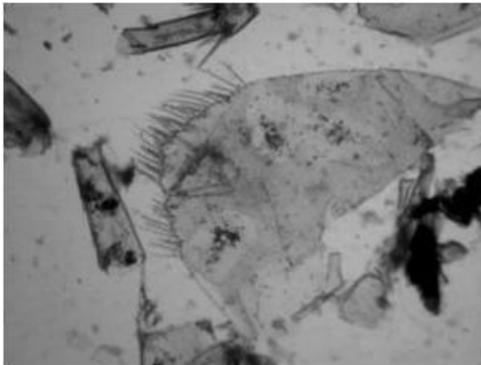
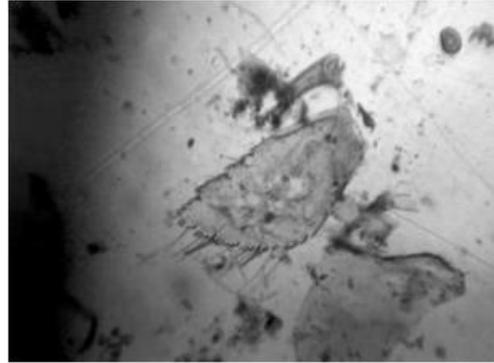
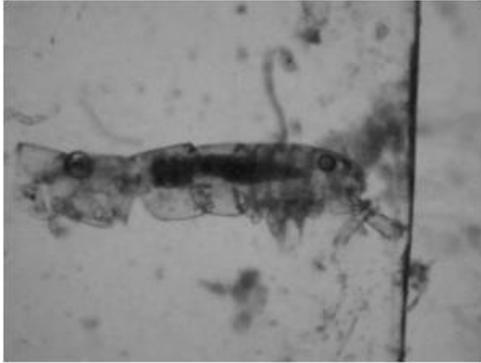


Anfípodos

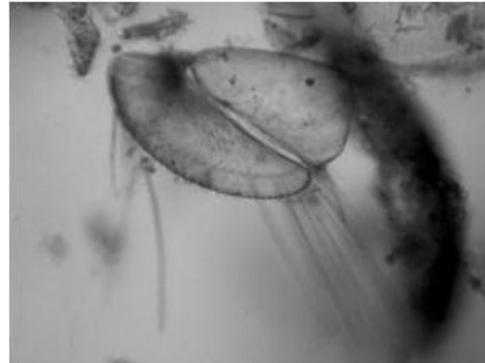
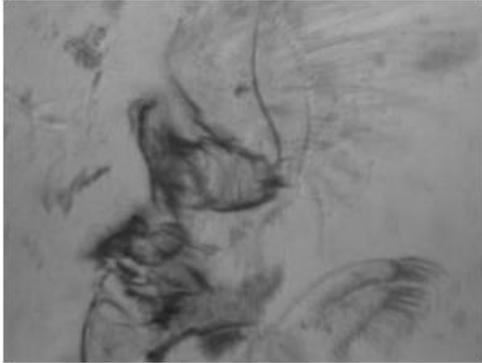




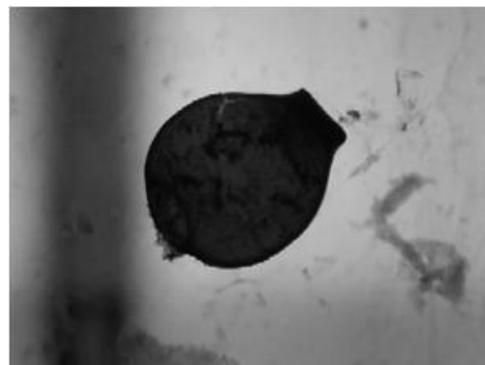
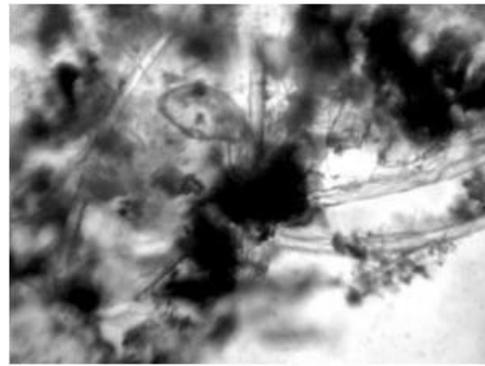
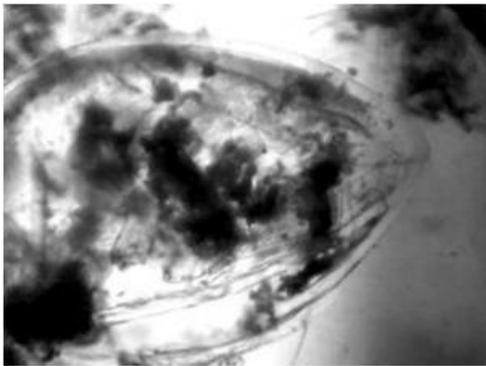
Isópodos

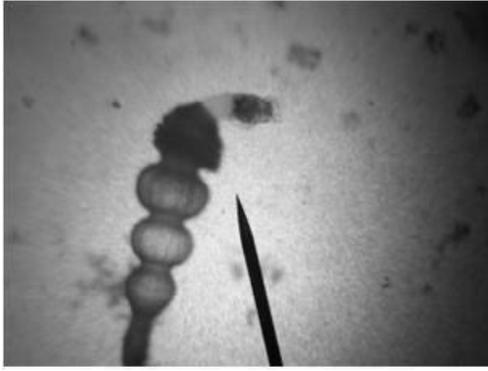


Isópodos (continúa)

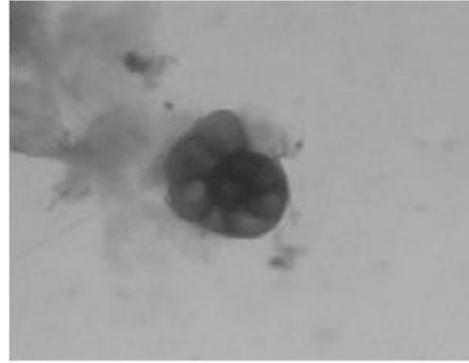


Ostrácodos





Gasterópodo

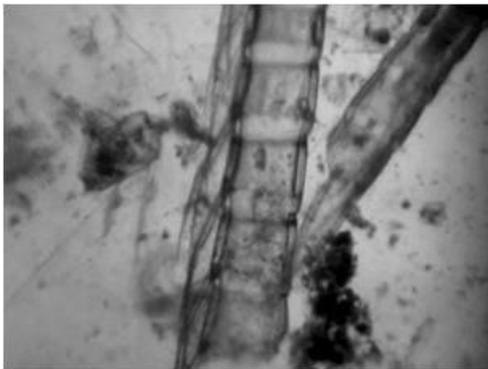
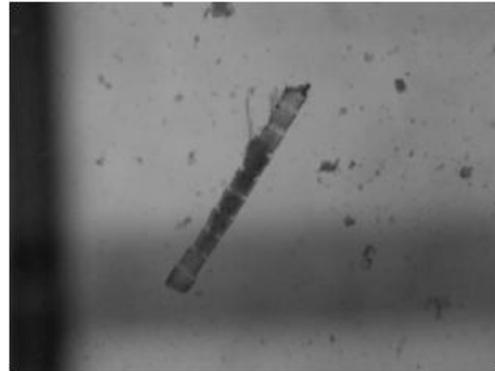
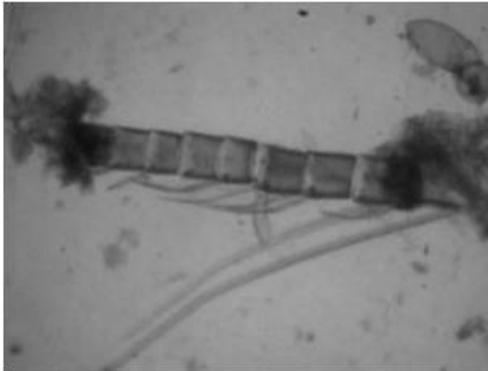


Foraminífero

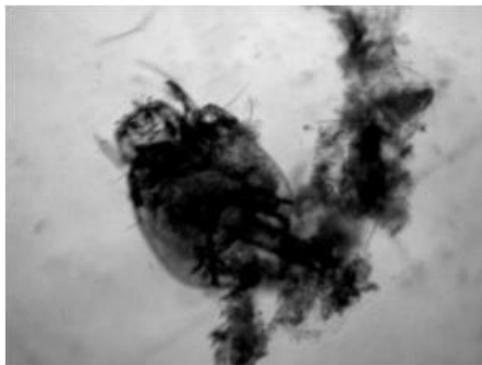
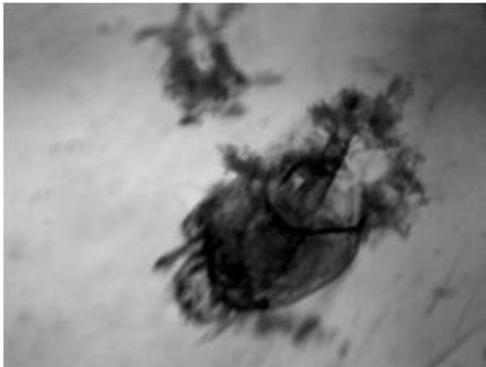
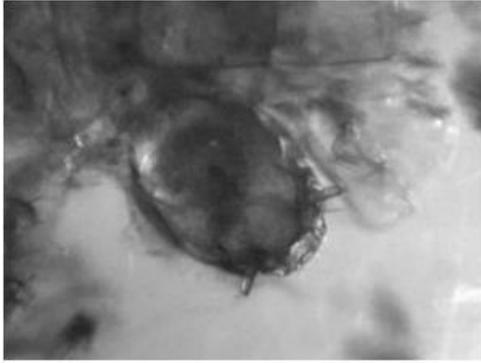


Fragmento de larva de
poliqueto

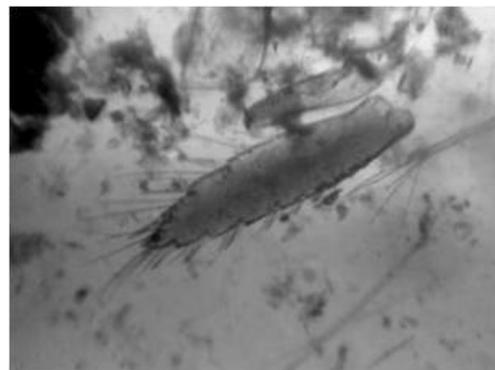
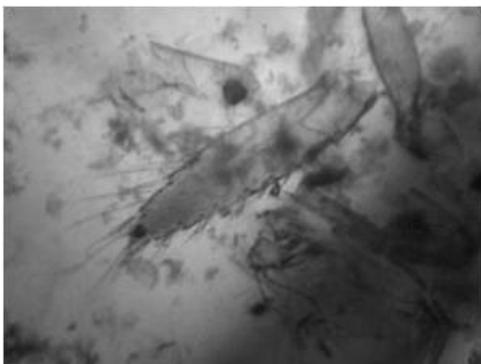
Dípteros



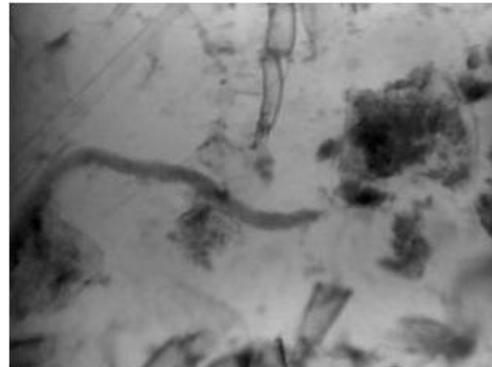
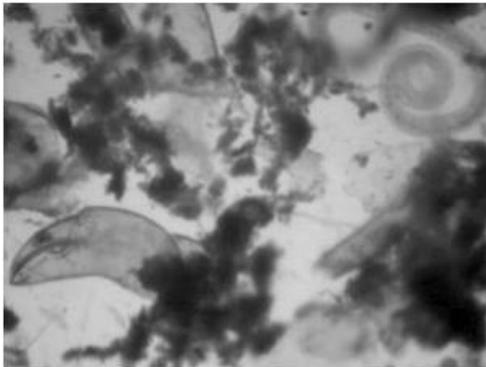
Cabezas de **dípteros** (quironómidos)



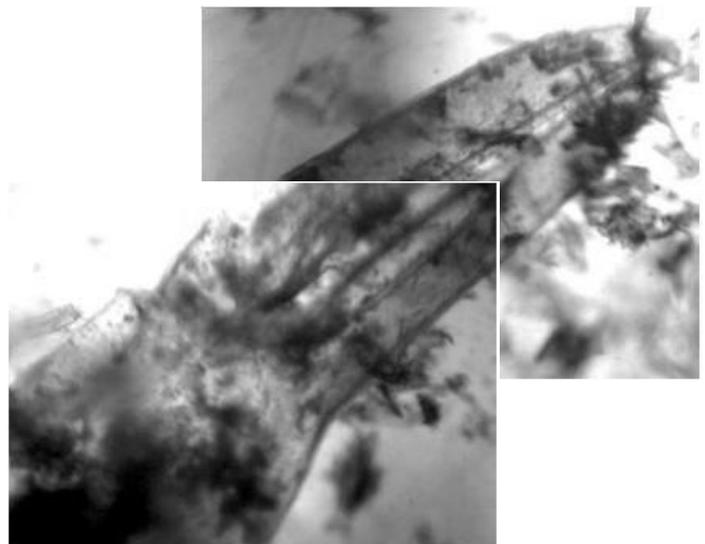
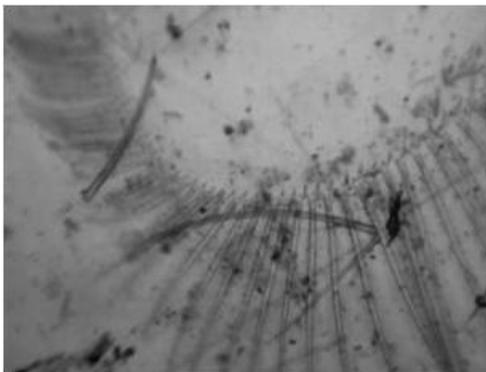
Cirolánidos



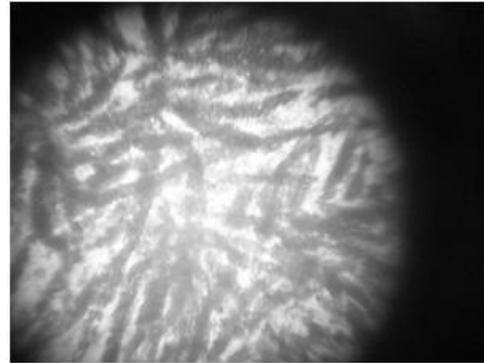
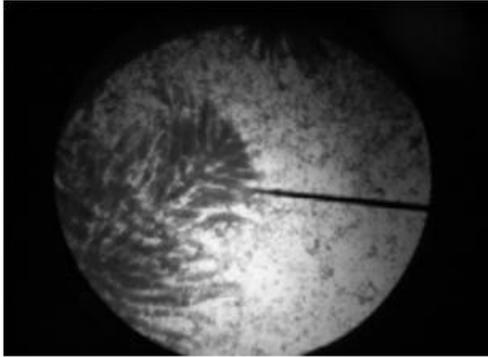
Nemátodos



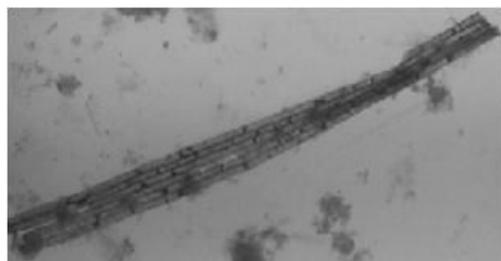
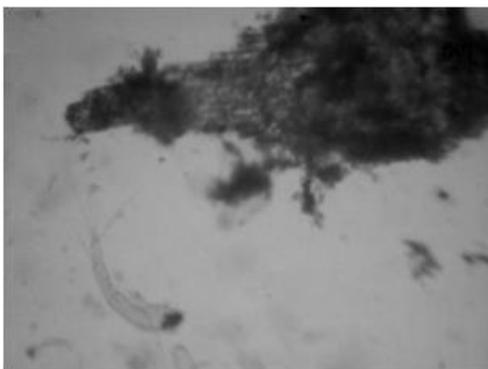
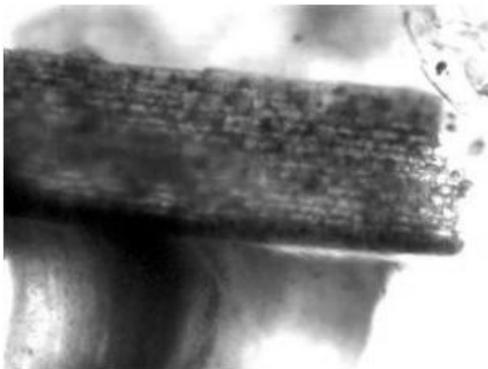
Urópodo y quela de **decápodo**



Algas



Halodule wrightii



APÉNDICE 2; PUBLICACIÓN

Se envió un artículo a la revista Journal of Crustacean Biology en agosto de 2010. Fue aceptado para publicación el 16 de mayo de 2011.

ARAGÓN-AXOMULCO ET AL.: *FARFANTEPENAEUS* ENZYME VARIABILITY

SEASONAL VARIABILITY IN TRYPSIN AND α -AMYLASE ACTIVITIES CAUSED BY
THE MOLTING CYCLE AND FEEDING HABITS OF JUVENILE PINK SHRIMP

Farfantepenaeus duorarum (Burkenroad, 1939).

Herón Aragón-Axomulco, Xavier Chiappa-Carrara, Luis Soto, Gerard Cuzon, Carlos
Maldonado, René Cárdenas, Leticia Arena and Gabriela Gaxiola.

(HAA) Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de
México.

(XCC) Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México.

(LS) Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

(GC) Ifremer, Centre du Pacifique, BP 7004, Taravao, 98719 Tahiti.

(CM) Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de
México.

(RC) Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

(LA) Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México.

(GG) Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Puerto de Abrigo S/N, Sisal, Hunucmá, Yucatán 97355 México. e-mail: mggc@ciencias.unam.mx

ABSTRACT

In view of the relationship between shifts in diet composition and the activity of digestive enzymes in penaeid shrimp, the present study focused on the analysis of digestive trypsin and α -amylase activities of wild *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) juveniles and their changes in phenotypic expression, during the molt cycle as endogenous factor and their changes due to different feeding regimes (exogenous factor) in relation with $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signature as an index of food assimilation induced by the seasonal availability of food items in the nursery area. Wild juveniles of *F. duorarum* were captured from April 2007 to February 2008 in the Celestun coastal lagoon, Yucatan, Mexico. Samplings were carried out considering all quarters of the lunar cycle and in each of the recognized seasons for this region: dry, rainy, and the Nortes (North Wind). Copepods and amphipods were the main source of food for *F. duorarum* juveniles. Values of $\delta^{13}\text{C}$ in the muscular tissue were near -20‰ hence the feeding regime of *F. duorarum* in the lagoon was composed by material of marine origin. Isotopic signature differences were found between the three annual seasons. It is an opportunist generalist organism that is located in the fourth trophic level. The digestive enzymatic activities of both trypsin and α -amylase in fresh hepatopancreas tissue showed an interaction between season and molt stages ($p < 0.05$).

Activity of the trypsin was highest during the Nortes at molt stage C (140 mU mg⁻¹ HP) and activity of α -amylase was higher in the Nortes at stage B2 (674 mU mg⁻¹ HP). The amylase/trypsin ratio also showed significant interaction between season and molt stages ($p < 0.05$), with higher values in premolt stages during the rainy and Nortes seasons. Isoforms of

these digestive enzymes differed in expression according to the molt stage and also to the season with expression generally being greater at molt stage C.

KEY WORDS: coastal lagoons, digestive enzymes, *Farfantepenaeus duorarum*, feeding habits, pink shrimp

DOI:

INTRODUCTION

The distribution of postlarvae and juvenile penaeid shrimp has been associated with estuarine vegetation due to lower predation from juvenile fishes as well as to food availability, and *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) is not the exception (Sanchez, 1997). Juvenile shrimp recruited into tropical nursery grounds consume various food sources depending on their seasonal availability, location and the rate at which such materials reach the bottom, that changes during the year (Pech et al., 2007). The feeding habits of shrimp juveniles will match those of an omnivorous or a carnivorous regimen. Gaxiola et al. (2005) showed that assimilated food produces a rapid growth rate around 1 mg day⁻¹ in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

In decapod crustaceans a close relationship between molt cycle and the lunar phases has been shown (Dall et al., 1990). There is a synchrony between molt cycle and moon cycle observed in *L. vannamei* raised in earthen ponds, with 50% of shrimp population in postmolt stages during waning moon; a molting peak in new moon phase occurred after 5 days of low and high tide (Molina-Poveda et al., 2002).

Another relevant aspect related to shrimp growth is the digestive enzymatic capacity to breakdown nutrients, store energy reserves, and assimilate food items from organisms of both planktonic and benthic origin, available at different shrimp life stages. The study of such enzymatic activity is essential to establish the functioning of the shrimp digestive system in

relation to food requirements (Le Moullac et al., 1996), to the origin of the components of the diet (Chong et al., 2001; Buillon et al., 2002a), and ontogeny (Gamboa-Delgado et al., 2003).

Digestive enzymes are substrate specific. In carbohydrate digestion of both larvae and postlarvae of *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936), α -amylase and α -glucosidase maintained a linear correlation in their specific enzymatic activity (Arena et al., 2003). In protein digestion, trypsin is active in nutrient assimilation throughout the shrimp life cycle (Sainz et al., 2004; Cara et al., 2004) and its regulation is linked with available resources (Sanchez-Paz et al., 2007). However, the physiological conditions at different stages of the molt cycle influence significantly the digestive enzymatic activity of penaeid shrimp (Klein et al., 1996; Sanchez-Paz et al., 2003). Just prior to ecdysis, decapod crustaceans cease their feeding activity causing a general reduction in their metabolic level (Dall et al., 1990). At this critical stage, the digestive enzymatic activity is almost shut down. As shown by Casillas-Hernandez et al. (2002) enzymatic activity in the hepatopancreas during premolt and postmolt stages of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1871) was negligible. However, there is little data about digestive enzymatic process, particularly on individuals undergoing critical molt cycle stages.

The pink shrimp *F. duorarum* is known for its omnivorous feeding behavior in the juvenile phase although it shifts to carnivory as adult. Even if data on the stomach contents of this native species are available (Schwamborn and Criales, 2000), their digestive capacity in the wild did not serve to identify the juveniles feeding habits up to now. It is hypothesized that digestive enzymes activities will be modified as a result of transcription or translation according to seasonal food availability and molt stages under lunar cycle. In view of the relation between shift in diet composition (Perez-Farfante, 1970) and activity of the digestive enzymes in penaeid shrimp (Gamboa-Delgado et al., 2003; Sanchez-Paz et al., 2003), the present study focused on the analysis of trypsin and α -amylase activities and changes in phenotypic expression during the molt cycle (endogenous factor) of *F. duorarum* juveniles. Variations were also examined with

feeding regimes or changes in isotopic signature ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) as an index of food assimilation induced by season availability of food items in the nursery area (Buillon et al., 2002a; Macia, 2004).

MATERIAL AND METHODS

The tropical coastal lagoon of Celestun belongs to the biosphere reserve "Ria de Celestun" in Yucatan, which extends along the Gulf of Mexico at 20°45' N and 90°25' W (Pech et al., 2007). Herrera-Silveira et al. (1998) described this lagoon as a karstic site in which the input of freshwater from groundwater discharges varies according to the rain regime (Fig.1). According to the hydrological conditions of the lagoon, Herrera-Silveira (1993) recognized three zones: seaward, middle and inner, and the climatic regime of the region determines three seasons: dry (March-May), rainy (June-October) and the Nortes (November-February).

Samplings were made in the middle zone of the lagoon (Fig. 1) during night hours (between 19 and 23 hours), when decapods are most active and least vulnerable to potential predators (Dall et al., 1990; Simões et al., 2010) and because we observed, from samples taken in preliminary catches, that decapods were associated with seagrass and the stomach fullness was always higher during the night than during the day. A total of 1189 juvenile *F. duorarum* (mean cephalothoracic length (CL) of 16.4 ± 2.5 mm and weight of 4.07 ± 1.7 g) were collected from April 2007 to February 2008 during the dry (N=399), rainy (N=362), and Nortes (N=428) seasons. The total catch was preserved for different analysis and molt stage of each specimen was assessed through the observation of the setal development of the uropod (Dall et al., 1990). Within each sampling period, organisms were collected weekly in each phase of the lunar cycle, using a local fishing gear formed by a conical net with a mesh size of 1/2 inch, attached to a triangle made with sticks of mangrove about 2 m long. Each vertex of the triangle is tied to a rope of approximately 4 m long allowing the fishing gear to be towed by foot for five minutes, covering

270 m² each time. Temperature, salinity, and dissolved oxygen concentrations were measured with a YSI-556 multi parameters (YSI Incorporated, 1700/1725 Brannum Lane, Yellow Springs, OH 45387 USA). Sediment was obtained with a van Veen dredge. Two samples of 100 cm³ of the surface material of the lagoon bottom were collected. One of the samples was placed in a 150 mL plastic bottle and 0.6 mg L⁻¹ MgCl₂ diluted in the water obtained from the lagoon was added. After one hour, a solution of 10% formalin neutralized with sodium tetraborate was added to preserve the meiobenthos samples. The other sample was placed on ice until preparation for isotope analysis.

Circular surface plankton tows were taken at each sampling station with a 0.5 m diameter net with 500 μ m mesh, equipped with a flow meter to measure the volume of water sampled. Samples were divided in two parts, one preserved on ice without any chemical treatment until preparation for isotope analysis. The other was preserved in 10% buffered formalin solution and used for species identification.

Stomach Contents Analysis

The digestive tract was dissected from individuals while in the field. The foregut of 124 specimens was extracted and kept in a 0.6 mg MgCl₂ L⁻¹ solution and preserved in 10 % formalin solution for further stomach contents analysis. Prey items from each stomach were examined under the microscope and identified according to prey types found in plankton and sediment samples collected at the same time. The Index of Importance (IIMP) of each prey was obtained following Garcia-Rodriguez et al. (2011):

$$IIMP_i = \frac{1}{U} \sum_{j=1}^u \frac{x_{ij}}{X_j}$$

Where x_{ij} is the number of individuals of taxon i in stomach j , X_j is the total number of

individual stomach j across all taxa and U is the number of stomachs in the sample.

The number of food components found in each stomach was also used to calculate the Trophic Level (TL) following Christensen and Pauly (1992):

$$TL = 1 + \sum_{j=1}^n DC_{ij} \cdot TL_j$$

Where the diet composition (DC_{ij}) is the proportion of prey j in the diet of individual i , TL_j is the trophic level of prey j , and n is the number of groups in the system.

Stable Isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) Analysis

Isotope analysis of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ was performed according to Coplen et al. (2006) on muscles of *F. duorarum* ($N = 24$), estuarine bottom sediment ($N = 4$), plankton $\geq 500 \mu\text{m}$ ($N = 2$) and the sea grass *Halodule wrightii* ($N = 1$). The samples were prepared as follows:

1) Only muscle tissue of *F. duorarum* in intermolt stage C was used to avoid water contents variations. The exoskeleton was removed and the muscular tissue washed with distilled water, then dried for 24 hours in an oven at 60°C . 2) Sediment: 10 g of the frozen preserved sample were screened through a $270 \mu\text{m}$ mesh to remove inorganic detritus. Four grams of wet sediment were obtained. Ten more grams of the sample, without sifting, remained in a 0.5N HCl solution for one hour to remove carbonates. Both samples were washed twice with distilled water then placed in an oven to be dried at 60°C for 24 hours.

3) Plankton and *H. wrightii*: The material collected was treated with 0.5M HCl solution for one hour. Then it was washed twice with distilled water and left to dry in an oven at 60°C for 24 hours and cooled in a desiccator. Subsequently, each sample of muscle, sediment, plankton and *H. wrightii*, was crushed into a fine powder in a mortar previously washed with water and Ingrain,

rinsed with distilled water and acetone, and dried for 24 hours at 60 °C. Samples were stored in 2 ml Eppendorf tubes previously labeled and kept in a foil bag.

Elemental analysis was carried out in the Laboratory of Soil Science, and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were obtained in the Mass Spectrometry Laboratory, both at the Institute of Geology (UNAM), using a Dumas combustion elemental analyzer coupled to a Delta Plus Mass Spectrophotometer XL, which has an accuracy of 0.2 ‰.

Analysis of Enzymatic Activity

Immediately after capture, 89 hepatopancreas (HP) dissected from individuals in different molting stages (five HP of each molt stage) were individually kept in small vials initially preserved in liquid nitrogen, and later maintained in the laboratory at -80° C until analysis. Each HP was homogenized in 500 μL of distilled water, with a tissue homogenizer, centrifuged at 14000 rpm at 4° C during 20 minutes and the supernatant was removed for further enzyme analysis.

Trypsin activity was determined according to Gieger and Fritz (1988), with 100 mM BAPNA (benzoyl-arginin-paranitro-anilide, Sigma B7632) as substrate in TRIS 0.1 M pH 8 buffer at 4 °C. The hydrolysis rate of substrate was measured as absorbance increment using a spectrophotometer (Spectronic model 21D) at 405 nm during two minutes, with the extinction coefficient $\epsilon_{405} = 1.02 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A unit was defined as 1mM of p-nitroanilidine released in one minute.

The α -amylase activity was measured according to a modification of Bernfeld's method (1955), using 1.5% glycogen (Fluka, 50573) as substrate diluted in a 2.5 mM MnCl_2 , 10 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, at pH 7. Enzymatic activity was expressed as milligrams of maltose liberated per min at 37° C, according to van Wormhoudt (1980).

The specific isozymes of trypsin and chymotrypsin were determined by electrophoresis polyacrylamide gel with sodium dodecil-sulfate (SDS-PAGE) (Garcia-Carreño et al., 1993). The α -amylase isozymes were determined by a method previously described by Arena et al. (2003). The HPs of individuals in each molting stage were pooled and homogenized in 500 μ l of Tris-phosphoric acid buffer (0.06 mol L⁻¹, pH 7) and centrifuged at 14000 rpm (4°C, 20 min). Conventional 10% vertical polyacrylamide gel electrophoresis was used with Tris-glycine as the running buffer and separation was carried out for 4 h at a constant voltage of 250 V. Gels were then incubated in 3% boric acid for 10 minutes. Subsequently, gels were placed in a 1% starch solution-with buffer phosphate (pH 6) and incubated for 30 min at 37° C.

Activity in gels was revealed by removal of the starch solution from agar and adding lugol diluted in ultra-pure water (1:5 proportion). They were maintained in this state until bands became visible, at which point lugol was removed; gels fixed with a 7.5% acetic acid solution were washed with ethanol 10%.

Statistical Analysis

Differences in frequency of occurrence of each food type were evaluated using a Chi-square test. One-way ANOVA and Tukey multiple range test were performed to test differences of trophic level data considering the three climatic seasons. We computed a Pearson's correlation coefficient to associate the variation of the trophic level with changes in the weight of *F. duorarum* and the expression of trypsin and α -amylase. For digestive enzymes activity a bifactorial ANOVA of 3 x 6 (3 seasons and 6 molt stages) of the Log₁₀ transformed data was used to analyze the interactions among factors. When differences were found, a Tukey multiple test was used. In all cases a probability level (α) of 0.05 was used (Zar, 1996).

RESULTS

The effect of season on surface water temperature was notable between the rainy season (mean 30.7 °C) and the Nortes (mean 26.8 °C). Salinity values were highest during dry season (27 psu) and were lowered by the input of fresh water in the rainy season (22 psu) (Table 1). Juvenile *F. duorarum* in premolt stage D₀ comprised the majority of the captured shrimp (35.5%), followed by those in intermolt stage C (20%), and premolt stage D_{1'} (19.6%). Molt stages C and D₀ are the ones of the largest duration and while in these stages, shrimp display an active feeding behavior. During the last premolt (D_{1''}, 11.2%; D_{1'''}, 3.1%) and early postmolt stages (A, 1.6%; B₁, 4.25%) organisms do not feed, burrow and therefore are more difficult to capture (Fig. 2).

Stomach Contents

During dry, rainy and the Nortes seasons, 17.3%, 46.6%, and 63.9% of the 124 stomachs analyzed were full. A total of 16 taxa were identified in the stomach contents and this number increased between the dry (7 taxa), rainy (11 taxa), and the Nortes (12 taxa) seasons. The percentage of the amorphous animal tissue diminished in the rainy and the Nortes seasons. According to the frequencies of occurrence and the IIMP (Table 2), Amphipoda and Copepoda were important preys of *F. duorarum* during the whole sampling period ($\chi^2 = 30.5$ and $\chi^2 = 35.3$, respectively, $\alpha = 0.05$) and were associated with all three seasons. Nematoda ($\chi^2 = 14.8$) was notable in two seasons, dry and rainy, Ostracoda ($\chi^2 = 15.6$) in dry and the Nortes and Diptera ($\chi^2 = 1.5$) in rainy season.

Vegetal detritus in the stomach contents represented between 7% and 8% in all three seasons. Filamentous algae, diatoms, and the sea grass *H. wrightii* could be identified. This sea grass represented 2.5% in the dry season, 27.5% in the rainy season, and 13.6% in the Nortes season (Table 2, Fig 3). Significant differences ($p < 0.05$) were found in the trophic level of *F.*

duorarum across the seasons and a carnivore diet dominated during the dry season while an omnivore diet was found in the rainy and the Nortes seasons (Fig. 4).

Regression analysis indicated that the variation of the trophic level of *F. duorarum* was not related to its weight variation ($R^2 = 0.003$, $p > 0.05$), but was directly related to the variation of trypsin ($R^2 = 0.95$, $p < 0.05$) and inversely to α -amylase ($R^2 = -0.67$, $p < 0.05$) activities.

Stable Isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$)

Isotopic signatures of shrimp muscle tissue showed seasonal differences. Higher values of $\delta^{13}\text{C}$ were found during dry and the Nortes seasons and were similar to those found for the *H. wrighti* samples. The $\delta^{13}\text{C}$ isotopic signature of the shrimp tissue captured in the rainy season was similar to the values obtained in the plankton samples. The lowest $\delta^{13}\text{C}$ value was observed in sediment (Table 3). The highest $\delta^{15}\text{N}$ values were found in shrimp tissue during the dry season and the lowest in the Nortes. Values from sediment, plankton and *H. wrighti* were lower than shrimp tissue values (Table 3).

Digestive Enzyme Activity

A significant interaction ($p < 0.05$) between season and molt stage was found for trypsin activity in juvenile shrimp's HPs (Fig. 5). In the dry and rainy seasons, trypsin activity did not change during the various molt stages. In contrast, in the Nortes season trypsin activity was significantly lower while organisms were in molt stage D_0 decreasing steadily until ecdysis ($p < 0.05$).

The α -amylase activity also exhibited a significant seasonal variation ($p < 0.05$), particularly in the dry season. During the Nortes season, the α -amylase activity reached values of 674 and 457 mU mg^{-1} HP at molt stages B_2 and C, respectively (Fig. 6).

The amylase:trypsin ratio (A/T) calculated for the three seasons and 6 molt stages had the lower value in the dry season and reached the higher values in the Nortes season, especially while organisms were in late premolt stages (Table 4). Trypsin and α -amylase analyses were not possible for molt stages A, B₁ and D₂ since organisms in these stages were not present in the sampling of all three seasons.

Trypsin and α -amylase Isoforms

Polyacrylamide gels revealed three trypsin isoforms during a complete molt cycle. The gel that contained trypsin from shrimp captured in the rainy season showed the main expression during a molt cycle. Three genes were identified. Molecular weight indicated a first isoform localized at 19.4 kDa, a second one at 20.7 kDa and a third one at 22 kDa. Gels analysis showed trypsin expression in the rainy season, with a unique functional gene at 19.4 kDa observed in postmolt stages A and B₁. Other stages of the molt cycle displayed all three of the identified isoforms. During the Nortes, the presence of two trypsin isoforms, at 19.4 kDa and 20.7 kDa, was observed throughout the molt cycle (Fig. 7). Another protease, chymotrypsin, was observed in bands located between 24 kDa and 36 kDa. Although its presence could be identified in the three seasons, it was more noticeable during the dry season (Fig. 7).

There is a seasonal change in the expression of α -amylase. This enzyme is a complex of two systems that are differentially expressed. If system I can be expressed by three alleles, then system II possessed 5 or 6 alleles. System I was represented by only one allele in juvenile shrimp sampled in each season. System II was expressed by 3-4 alleles in the dry season and 5-6 alleles in the rainy season throughout the molt cycle. In the Nortes season, system II was expressed by fewer alleles, except in premolt stage D1' with 6 alleles; postmolt stage A was not present (Fig. 8).

DISCUSSION

Our results show that juveniles of *F. duorarum* in the wild displayed biochemical adaptations for the digestion and assimilation of food. The environmental conditions of Celestun are strongly affected by the seasonal cycle dominated by wind, temperature, and rainfall regimes, which in turn modified the nutrient input that is correlated with changes in benthic diversity (Pech et al., 2007). During the dry season, Celestun lagoon displays low primary and secondary production (Tapia-Gonzalez et al., 2008), which is reflected in the stomach contents of sampled *F. duorarum* at this time of the year. Low prey occurrence and low stomach fullness coincided with low HP's trypsin and α -amylase activities as well as high isozyme expression for both enzymes. As the lagoon productivity increases in the rainy season (Tapia-Gonzalez et al., 2008), the stomach fullness also increased, but digestive enzymes activities remained low. A peak of activity appeared during the Nortes that fitted with the lowest isozyme expression of the digestive enzymes. At this time of the year, organisms showed a peak of activity for both enzymes in post and intermolt stages when feeding intensity was high.

The occurrence of prey in the benthic community of the Celestun lagoon changed according to season (Pech et al., 2007) and shrimp stomach contents reflected this trend. High crustacean abundance was observed during the Nortes and dry seasons both in the benthic community and in the stomach contents of juvenile shrimp. Copepods and amphipods, together with ostracodes and nematodes, dominated the shrimp's stomach contents (Table 2) and were important to define their trophic level. The main prey types upon which *F. duorarum* feeds, mainly copepods and amphipods, allowed classifying this species as carnivorous, as Schwamborn et al. (2000) and Sanchez et al. (2002) also reported. *Farfantepenaeus duorarum* had a diet composed by planktonic organisms of marine origin, such as other penaeids (Dall et al., 1990) rather than prey picked out from detritus (Primavera, 1996; Macia, 2004). The feeding habits of this species changed with prey availability, controlled by abiotic factors (temperature and light

intensity) that modify both the ecosystem productivity and the digestive enzymes activities in shrimp's HPs (Alpuche et al., 2005). As in *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), the molt cycle, which is controlled by lunar phases, affected the feeding behavior of *F. duorarum* juveniles (de Coursey, 1983). The analysis of weekly sampling allowed observe the molt stages distribution along the lunar cycle with a predominance of intermolt stages C, which has the longest time span (Fig. 2). Organisms in molt stages close to ecdysis had empty stomachs since shrimp are unable to use mouth structures formed by chitin, hence restraining the possibilities of food intake while the exoskeleton has not hardened up (Le Moullac et al., 1996, Vega-Villasante et al., 2000; Molina-Poveda, 2002). When in late premolt D₁ and postmolt A and B, we observed a drop in enzymatic activity. During the phase of tegument stability in intermolt C (Sanchez-Paz et al., 2007), trypsin (Fig. 5) and α -amylase (Fig. 6) activities increased especially during the Nortes. Seasonal patterns modified the physicochemical parameters of the lagoon environment and the availability of prey so shrimps switched their feeding habits to maximize ingestion. During the rainy season, the lowest values of the enzyme activity can be related to a sudden stressful habitat (high water temperature) that led to a scanty mobility of shrimp. Highest mean temperature (30.7 °C) measured during this season can have an impact on trypsin activity even if its maximum between 40-70°C (Le Moullac et al., 1994; Sainz et al., 2004) but salinity was below the optimum for the species (22 psu). Trypsin activity reached a maximum during Nortes season, with a 148% increase compared to the value obtained during the dry season (Fig. 5). Changes in the environment are mirrored by variations in enzyme activity that enhanced survival in such a habitat. When a higher load of nutrients was present in the lagoon (Pech et al., 2007), the highest α -amylase activity was measured. Trypsin and α -amylase were complementary (Lovett y Felder, 1990; van Wormhoudt et al., 1998) and accounted for 60% of the digestive process. Variation in trypsin activity was similar to variations in trophic level (Fig. 9) suggesting that *F. duorarum* consumes protein as the main energy resource in the dry season (Cuzon et al., 1980; Barclay et

al., 1983). Drop in trypsin activity observed in the rainy season could be a strategy to avoid the energetic use of protein, obtaining energy from glucose that is the primary source of energy used by the hepatopancreas during food scarcity events (Sanchez-Paz et al., 2007). The lowest expression of α -amylase activity during dry season could be the result of environmental stress. During the rainy season begins the removal of nutrients deposited in the estuarine soil, reactivating the food chain (Pech et al., 2007). While consuming protein sources, we observed that *F. duorarum* increased the consumption of carbohydrates reaching a peak during the Nortes. The presence of active enzymes digesting vegetal products indicates that *F. duorarum* is not a strict carnivore but is able to metabolize energy from various trophic sources, including vegetal detritus (Brethes et al., 1994).

As described for *L. stylirostris* (Wabete, 2006), shrimp reduced food intake at low temperatures due to a decrease in the metabolic activity that takes place in the cold season. α -amylase is expected to decrease in a lack-of-food event and accordingly, low values (120 mU mg⁻¹) were found during the dry season while trypsin activity showed an opposite trend.

A/P or A/T ratios give an indication on the level of herbivory or carnivory at each time of the year (Rodriguez et al., 1994; Gaxiola et al., 2009). This ratio was used to classify *Homarus americanus* Milne Edwards, 1837 as more herbivorous than penaeids (Jones et al., 1997). It was possible to identify the sequence of carnivore-herbivore shifts during the molt cycle both in the rainy and the Nortes seasons, and annual changes in the values of $\delta^{15}\text{N}$ allowed to classify *F. duorarum* as a carnivore in the dry season (trophic level 5), as an opportunistic generalist during rainy season and the Nortes (trophic level 4), which is the trophic level also given by Christensen and Pauly (1992) (Fig. 4). During these seasons there was an increase in the vegetal material available for shrimp intake (Table 3) observed as the increase in A/P ratio. In intermolt stage D₀ cells of HP produce hemocyanin and its increase at premolt stages prefigured a decrease in trypsin rather than an increase in amylase activity. The expression of enzymatic activity of *F.*

duorarum examined by polyacrylamide gels (Figs. 7, 8) showed three bands next to 20 kDa in the specific case of trypsin that can be referred to the forms a, b and c, in contrast to five isoforms reported for *L. vannamei* (Klein et al., 1996). The presence of chymotrypsin was evidenced by the band located between 24 and 29 kDa. This enzyme is needed to complete the hydrolysis processes of a variety of materials usually consumed by crustaceans (Lovett and Felder, 1990; Brethes et al., 1994; Le Moullac et al., 1996).

Band patterns of α -amylase were similar to those reported by van Wormhoudt et al. (2003), showing system I formed by three alleles and system II formed by five. Low values of α -amylase expression, with five isozymes, were found in the Nortes season. At this time, a low value of the A/P ratio (2.8 ± 0.8) was also found. On the other hand, high values of α -amylase activity, with a high A/P ratio (10.7 ± 0.7), were found during the Nortes when gastric repletion reached a maximum and IIMP values showed the importance of copepods and amphipods in the diet, while vegetal detritus was present in low percentages. Variation of $\delta^{13}\text{C}$ values from -18‰ (in the rainy season, with an observed carnivore diet), -21‰ (in the dry season and omnivory) to -24‰ (Nortes) were observed in shrimp muscle. The shift towards herbivory can also be inferred based on the stomach contents analysis that showed greater values of occurrences of *Halodule* with a $\delta^{13}\text{C}$ value at -23‰ . Other phytobenthic materials were found in the stomachs but $\delta^{13}\text{C}$ values for sediment and plankton were -7‰ and -18‰ respectively. *Farfantepenaeus duorarum* was usually associated with *H. wrightii*, in the Nortes when winds produce water currents that facilitate the presence of shrimp in the lagoon enhancing the importance of sea grass habitats during this time of the year. Marine or continental influences (Pech et al., 2007; Herrera Silveira et al., 1999) had an impact on the taxa available and the isotopic signatures of shrimp tissue that indicate the origin of food sources at each time of the year. In general, mangrove-derived organic matter was not the principal source of the food used by *F. duorarum*

(Bouillon et al., 2002). The understanding of the dynamics of the shrimp's habitat would contribute to a better protection of this resource in the future.

The results obtained in the present study showed that juvenile *F. duorarum* display different biochemical adaptations for food digestion and assimilation in the wild. There is a synergistic effect of molt stages and seasonal variations of food availability on trypsin and α -amylase activities measured in juvenile *F. duorarum*. Phenotypic expression was a consequence of the variation of the feeding habits related to molting.

The accumulation of organic reserves to meet the energy demand required at each stage of the molting cycle of juvenile *F. duorarum* correlated well with the expression of hepatopancreatic enzymes such as trypsin and α -amylase. Both enzymes displayed a significant variability throughout an annual period of observations in this study. However, their activity was apparently triggered by the nature of the food available in the shrimp's nursery area. Higher activity of trypsin was observed in the dry season, compared to rainy season, when values of gastric repletion reached a minimum but the occurrence of vegetal material in the stomachs reached its maximum (2%) in coincidence with the highest value of the index of trophic level and $\delta^{15}\text{N}$ (14‰). At this time of the year, shrimps can be ranked in the fifth trophic level. $\delta^{13}\text{C}$ value of -20.6‰ suggested that juvenile *F. duorarum* grazed all the year on marine zooplankton eating Copepoda and Amphipoda associated with nursery where *H. wrightii* was present.

In the rainy season, the isotopic signature of $\delta^{13}\text{C}$ indicated that shrimp consumed materials of littoral or land origin, consistent with the drag of organic matter due to the rain. During Nortes, the isotopic signature of nitrogen was low enough (11‰) to position juveniles of *F. duorarum* in the fourth trophic level, as a general opportunistic feeder. At this time of the year, $\delta^{13}\text{C}$ values were close to the value for *H. wrightii*. This plant served as a refuge habitat as currents in the lagoon increased due to high northerly winds.

The limited composition of food resources for *F. duorarum* in the dry season, contrasted with an abundance noticed during the Nortes. However, the trypsin activity made it clear that protein utilization is the main nutrient during the three seasons. α -amylase was expressed in digestive process as part of a compensatory mechanism with carbohydrates intake during the three seasons, although vegetal material was scarce in the diet of *F. duorarum*. A modulation of enzymatic expression in *F. duorarum* was subjected to the type and abundance of food components available along the year but physiological changes associated with ecdysis acted upon enzymes expression as well.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank CONACyT Ciencia Básica 60824 for financial support. We also thank Maribel Badillo for support in the field and her technical support in the laboratory; to Alfredo Gallardo who coordinated the field logistics; to Carmen Galindo who made helpful comments on the manuscript and reviewed the statistical analysis; to Ariadna Sanchez who assisted with the biochemical analysis. To the students who participated in the fieldwork: Sara Ortiz, Emilio Guzmán, Ana Mayela, José Luis Bonilla, and Mauricio Emerenciano.

The help of the Asociación de Lancheros de Celestún was invaluable to capture the shrimps.

REFERENCES

- Alpuche, J., A. Pereyra, and C. Agundis. 2005. Respuestas bioquímicas de camarones marinos a factores ambientales. Veterinaria Organización S. L., España. VI. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET-ISSN 5: 1695-7504.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
- Arena, L., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, C. Soyez, A. van Wormhoudt, and C. Rosas. 2003. Physiological and genetic variations in domesticated and wild populations of *Litopenaeus*

- vannamei* fed with different carbohydrates levels. *Journal of Shellfish Research* 22: 269-279.
- Barclay, M. C., W. Dall, and D. M. Smith. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 68: 229-244.
- Bernfeld, B. 1955. Sur une méthode de dosage des amylases, pp 149-154. In, S. P. Colowick, and N. O. Kaplan, (ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York.
- Boone, L. 1931. A collection of anomuran and macruran Crustacea from the Bay of Panama and the fresh waters of the Canal Zone. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 63(2): 137-189.
- Brêthes, J. C., B. Parent, and J. Pellerin. 1994. Enzymatic activity as an index of trophic resource utilization by the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *Journal of Crustacean Biology* 14: 220-225.
- Bouillon, S., A. V. Raman, P. Dauby, and F. Dehairs. 2002a. Carbon and Nitrogen stable isotope ratios of subtidal benthic invertebrates in an estuarine mangrove ecosystem (Andhra Pradesh, India). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 54: 901-913.
- , N. Koedam, A. V. Raman, and F. Dehairs. 2002b. Primary producers sustaining macro-invertebrate communities in intertidal mangrove forests. *Oecologia*. 130: 441-448.
- Burkenroad, M. D. 1936. A new species of *Penaeus* from the American Atlantic. *Anais de Academia Brasileira de Ciencias, Rio de Janeiro* 8: 315-318.
- . 1939. Further observations on Penaeidae on the northern Gulf of Mexico. *Bulletin of the Bingham Oceanographic Collection* 6(6): 1-62.
- Cara, B., F. J. Moyano, J. L. Zambonino, and C. Fauvel. 2004. Actividad tripsina y quimotripsina como indicadores de condición larvaria: estudio de restricción alimentaria y calidad de

- puesta. Conferencias Científica, III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 547-556.
- Carrillo-Farnes, O., B. A. Forrellat, V. R. Gonzalez. 1995. Procedimiento de obtención de hepatopancreatina de camarón. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial 6 pp.
- Casillas-Hernandez, R., F. Magallon, G. Portillo, O. Carrillo, H. Nolasco, and F. Vega-Villasante. 2002. La actividad de proteasa, amilasa y lipasa durante los estadios de muda del camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. Revista de Investigaciones Marinas 23: 35-40.
- Chong, V. C., C. V. Low, and T. Ichikawa. 2001. Contribution of mangrove detritus to juvenile prawn nutrition: a dual stable isotope study in a Malaysian mangrove forest. Marine Biology 138: 77-86.
- Christensen, V., and D. Pauly. 1992. ECOPATH II - A software for balancing steady-state ecosystem models and calculating network characteristics. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam Ecological Modeling 61: 169-185.
- Coplen, T. B., W. A. Brand, M. Gehre, M. Gröning, H. A. J. Meijer, B. Toman, and R. M. Verkouteren. 2006. New guidelines for $\delta^{13}\text{C}$ measurements. Annals Chemistry 78: 2438-2221.
- Cuzon, G., C. Cahu, J. F. Aldrin, J. L. Messenger, G. Stephan, and M. Mevel. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. Procediment World Mariculture Society 11: 410-423.
- Dall, W., B. J. Hill, P. C. Rothlisberg, and D. J. Staples. 1990. The Biology of the Penaeidae. In, J. H. S. Blaxter and A. J. Southward (eds.), Advances in Marine Biology 27: 1-489.
- de Coursey, P. J. 1983. Biological timing, pp. 107-162. In, F. J. Vernberg and W. B. Vernberg (ed.), The Biology of Crustacea. Vol. 7 Academic Press, New York.
- Forrellat, B. A., M. A. del Monte, L. T. Estévez, C. B. Boburg, S. H. Nolasco, and F. O. Carrillo. 2004. Caracterización de lipasas en tres especies de camarones peneidos. Su importancia en la digestión. III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura: 767-776.

- Fry, B. 1988. Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnology Oceanography* 33: 1182-1190.
- Gamboa-Delgado, J., C. Molina-Poveda, and Ch. Cahu. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research* 34: 1403-1411.
- García-Carreño, F. L., L. E. Dimes, and N. F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous inhibitors. *Annals Biochemistry* 214: 65-69.
- García-Rodríguez, F. J., and J. De La Cruz-Agüero. 2011. A Comparison of indexes for prey importance inferred from otoliths and cephalopod beaks recovered from pinniped scats. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 6: 186-193.
- Gaxiola, G., G. Cuzon, H. Ceccaldi. 2009. Digestive physiology in crustacea. In, G. Broudy and D. E. Jory (eds.), *The Rising Tide, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, 2009 ISBN 978-1-888807-08-0, Baton Rouge Louisiana, USA.
- , ———, T. Garcia, G. Taboada, R. Brito, M. E. Chimal, A. Paredes, L. Soto, C. Rosas, and A. van Wormhoudt. 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Comparative Biochemistry and Physiology* 140: 29-39.
- Geiger, R., and H. Fritz. 1988. Trypsin, pp. 119-129. In, H. U. Bergmeyer and M. Grab (eds.), *Methods of Enzymatic Analysis, Vol 5*. Chemie Verlag, Weinheim. Academic Press, New York.
- Hernandez-Guevara, N. A., P. L. Ardisson, and D. Pech. 2008. Temporal trends in benthic macrofauna composition in response to seasonal variation in a tropical coastal lagoon, Celestun, Gulf of Mexico. *Marine and Freshwater Research* 59: 772-779.

- Herrera-Silveira, J. A. 1993. Ecología de los productores primarios en la Laguna de Celestún, México. Patrones de variación espacial y temporal. Ph.D. Diss., Univ. Barcelona.
- , and J. Ramirez-Ramirez. 1998. Salinity and nutrients in the coastal lagoons of Yucatan, Mexico. *Verh. International. Verein. Limnology* 26: 1473-1478.
- , M. Martin, and V. Diaz-Arce. 1999. Phytoplankton variations in four coastal lagoons, Yucatan, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 47: 47-56.
- Jones, D. A., M. Kumlu, L. Le Vay, and D. J. Fletcher. 1997. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *Aquaculture* 155: 285-295.
- Klein, B., L. G. Moullac, D. Sellos, and A. Van Wormhout. 1996. Molecular Cloning and Sequencing of Trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in Assessing Gene Expression during the Moulting Cycle. *Journal of Biochemistry and Cell Biology* 28: 551-563.
- Le Moullac, G., and A. van Wormhout. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquatic Living Resources* 7(3): 203-210.
- , B. Klein, D. Sellos, and A. van Wormhout. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 208: 107-125.
- Lovett, D. L., and D. L. Felder. 1990. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biology Bulletin* 178: 160-174.
- Lucas, H. 1846. Crustacés, Arachnides, Myriapodes et Hexapodes. *Exploration scientifique de l'Algérie pendant les années 1840, 1841, 1842. Sciences physiques, Zoologie* 2. Histoire Naturelle des Animaux Articulés, part 1: 1-403, plates 1-8.

- Macia, A. 2004. Primary Carbon sources for juvenile penaeid shrimps in a mangrove fringed bay of Inhaca Island, Mozambique: A dual Carbon and Nitrogen isotope analysis. *Journal Marine Science* 3: 151-161.
- Milne Edwards, H. 1837. Histoire naturelle des Crustacés, comprenant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux. Librairie Encyclopédique de Roret. Vol. 2. Paris: Librairie Encyclopédique de Roret.
- Molina-Poveda, C., V. Escobar, J. Gamboa-Delgado, E. Cadena, F. Orellana, and P. Piña. 2002. Estrategia de alimentación de acuerdo a la demanda fisiológica del juvenil de *Litopenaeus vannamei* (Boone), pp. 98-113. In, L. E. Cruz-Suarez, M. D. Rique, M. G. Nieto López, N. Simoes, and G. Gaxiola. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, Cancún, Quintana Roo, del 3 al 6 de septiembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Pech, D., P. L. Ardisson, and N. Hernandez-Guevara. 2007. Benthic community response to habitat variation: A case of study from a natural protected area, the Celestun coastal lagoon. *Continental Shellfish Research* 27: 2523-2533.
- Perez-Castañeda, R., and O. Defeo. 2001. Population variability of four sympatric penaeid shrimps (*Farfantepenaeus* spp.) in a tropical coastal lagoon of Mexico. *Estuary Coastal Shellfish Science* 52: 631-641.
- Perez-Farfante, I. 1970. Diagnostic characters of juveniles of the shrimps *Penaeus aztecus aztecus*, *P. duorarum duorarum* and *P. brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). U. S. Fish Wildlife Service, Special Scientific Report of Fisheries, 26 pp.
- Primavera, J. H. 1996. Stable carbon and nitrogen isotope ratios of penaeid juveniles and primary producers in a riverine mangrove in Guimaras, Philippines. *Bulletin of MAJUNE Science* 58: 675-683.

- Rodriguez, A., L. Le Vay, G. Mourente, D. A. Jones. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology* 118: 45-51.
- Sainz, J.C., C. F. García, B. A. Sierra, and C. P. Hernandez. 2004. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology* 24: 266-273.
- Sanchez, A. J. 1997. Habitat preference of *Penaeus duorarum* Burkenroad (Crustacea: Decapoda) in a tropical coastal lagoon, southwest Gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 217: 107-117.
- , J. Barbaro, G. Delgado, and L. Perez. 2002. Evaluación del alimento natural epibentónico en estanques de tierra teniendo en cuenta la densidad de camarones en cultivo. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura: 567-572.
- Sanchez-Paz, A., F. Garcia-Carreño, J. Hernandez-Lopez, A. Muhlia-Almazan, G. Yepiz- Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 340: 184-193.
- , ———, A. Muhlia-Almazan, N. Y. Hernandez-Saavedra, and G. Yepiz-Plascencia. 2003. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 292: 1- 17.
- Schwamborn, R., and M. Criales. 2000. Feeding strategy and daily ration of juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*) in a South Florida seagrass bed. *Marine Biology*. 137:139-147.

- Simões, S. M., R. C. Costa, A. Fransozo, and A. L. Castilho. 2010. Diel variation in abundance and size of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Penaeoidea) in the Ubatuba region, Southeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82: 369-378.
- Stimpson, W. 1871. Notes of northern American Crustacea in the museum of the Smithsonian Institution. No. III. *Annals of the New York Lyceum* 10: 92-136.
- Tapia-Gonzalez, F., J. A. Herrera-Silveira, and M. Aguirre-Macedo. 2008. Water quality variability and eutrophic trends in karstic tropical coastal lagoons of the Yucatan Peninsula. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76: 418-430.
- van Wormhoudt, A. 1980. Regulation d'activité de l' α amylase à différentes températures d'adaptation et en fonction de l'ablation des pédoncules oculaires et du stade de mue chez *Palaemon serratus*. *Biochemistry Systematic Ecology* 8: 193-203.
- , and D. Sellos. 2003. Highly variable polymorphism of the alpha-amylase gene family in *Litopenaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Molecular Evolution* 57(6): 659-71.
- , G. Le Moullac, B. Klein, and D. Sellos. 1998. Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda): adaptación a la composición del régimen alimenticio. In, L. E. Cruz-Suarez, M. D. Rique, M. G. Nieto López, and R. Civera (ed.), *Avances en Nutrición Acuícola. III Memorias del III Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, La Paz, Baja California Sur, del 3 al 6 de noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.*
- Vega-Villasante F, H. Nolasco-Soria, R. Civera-Cerecedo, R. Gonzalez-Valdes, and M. Oliva-Suarez. 2000. Alternativa para la alimentación del Camarón en cultivo: el manejo de la muda, pp 313-320. In, L. E. Cruz-Suarez, M. D. Rique, M. G. Nieto Lopez, and M. Olvera (eds.), *Avances en Nutrición Acuícola. V Memorias del V Simposio Internacional de Nutrición*

Acuícola, Telchac, Yucatán, del 3 al 6 de noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Wabete, N. 2006. Etude écophysiological du métabolisme respiratoire et nutritionnel chez la crevette *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Thèse Univ. Bordeaux I. Ecole Doctoral Science Vivants, Géoscience Science Environmental 173 pp.

Zar, J. 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New York. 663 pp.

RECEIVED: 19 August 2010

ACCEPTED: 16 May 2011

Captions to figures

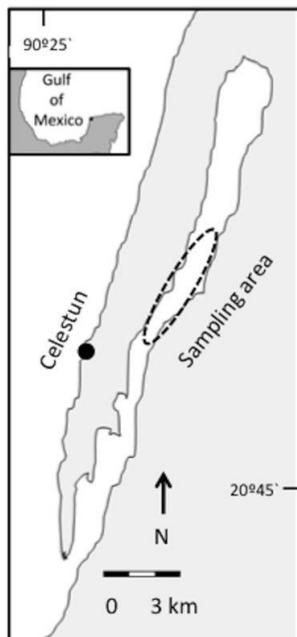


Fig. 1. Geographic position of Celestun lagoon and sampling area.

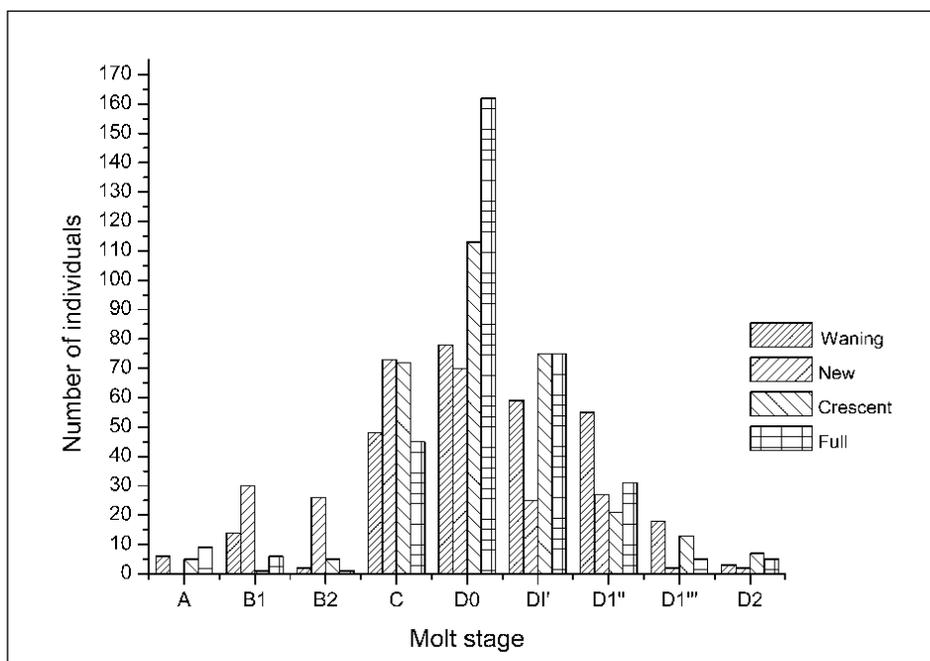


Fig 2. Distribution of the number of juvenile *Farfantepenaeus duorarum* per molt stage and moon phase (N=1189).

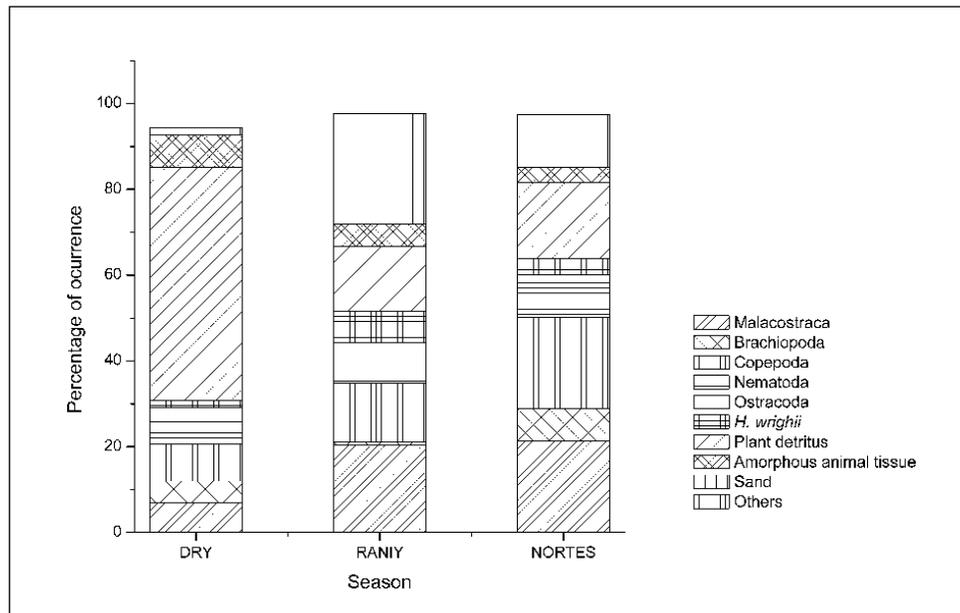


Fig. 3. Composition of the diet of *Farfantepenaeus duorarum* in dry, rainy and Nortes seasons (N=124).

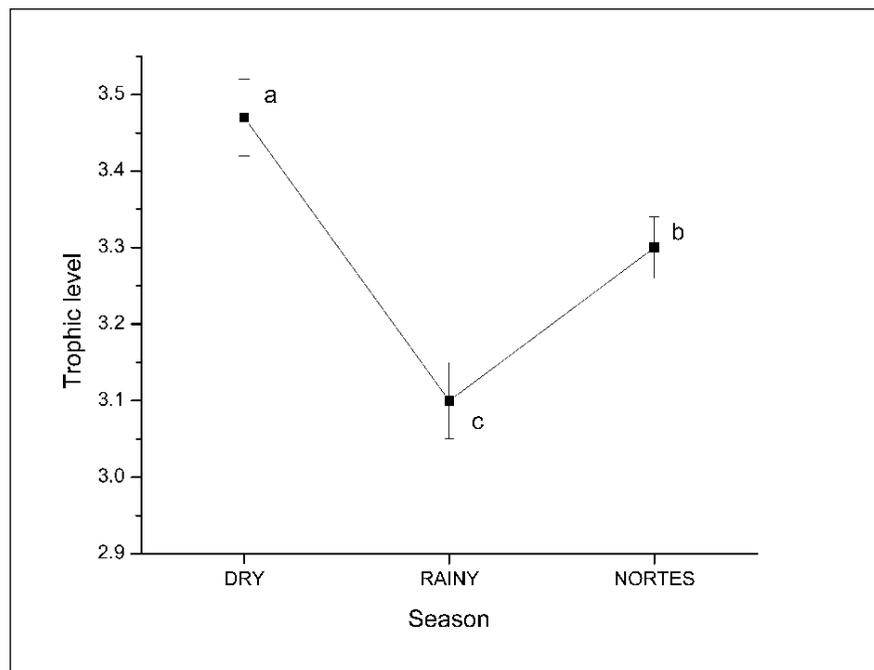


Fig 4. Variation of trophic level calculated in *Farfantepenaeus duorarum* (N=124).

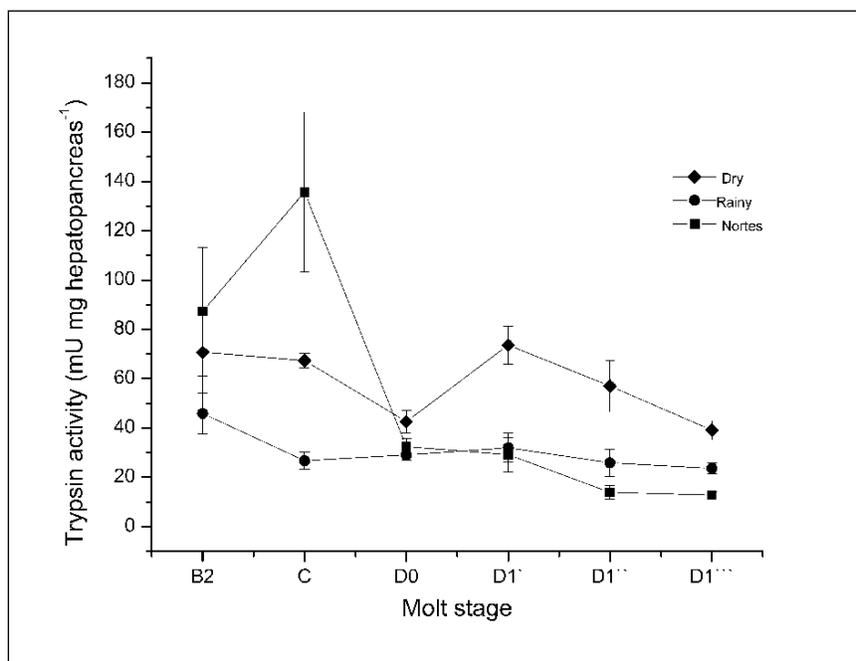


Fig 5. Trypsin activity (mU mg^{-1} hepatopancreas) of *Farfantepenaeus duorarum* juveniles during an annual cycle. Interaction between molt stages and annual seasons (N=89).

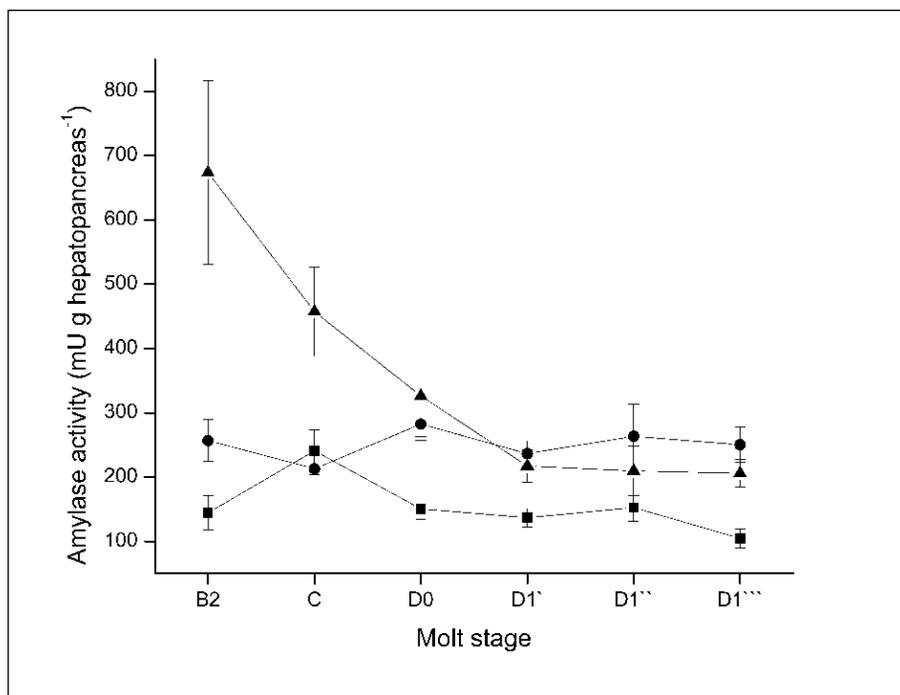


Fig 6. α -amylase activity (mU mg^{-1} hepatopancreas) of *Farfantepenaeus duorarum* sampled during the three main seasons. Interaction between molt stages and annual seasons (N=89).

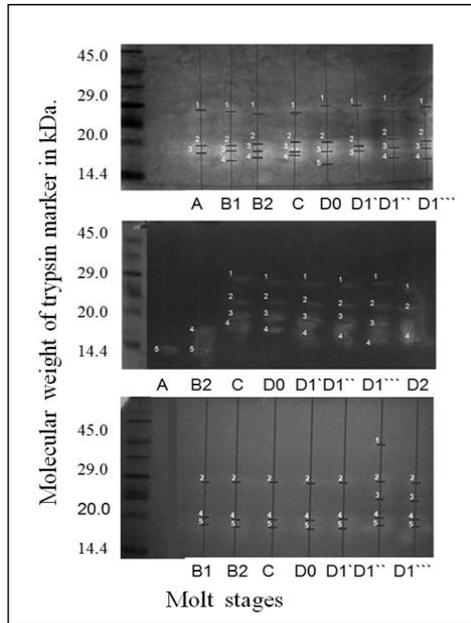


Fig.7. Trypsin isoforms of *Farfantepenaeus duorarum* during the three determined sampling period from April 2007 to February 2008. MWM: molecular weight of marker that identify trypsin in 19.4, 20.7 and 22.0 kDa (N=89).

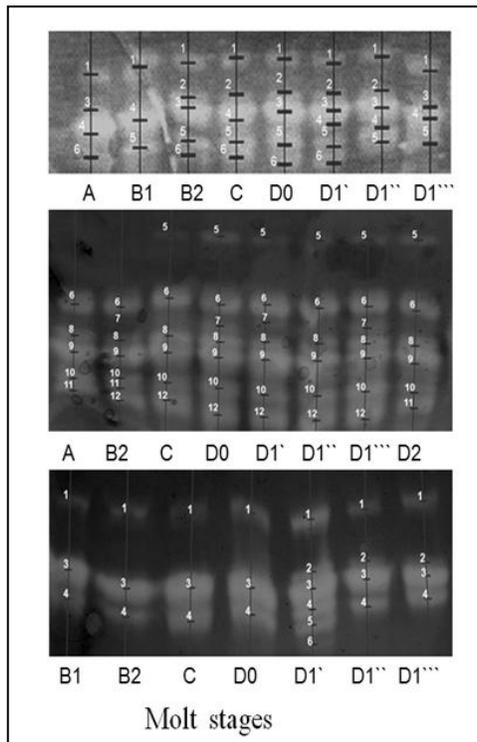


Fig.8. α -amylase isoforms of *Farfantepenaeus duorarum* during the three determined sampling period from April 2007 to February 2008 (N=89).

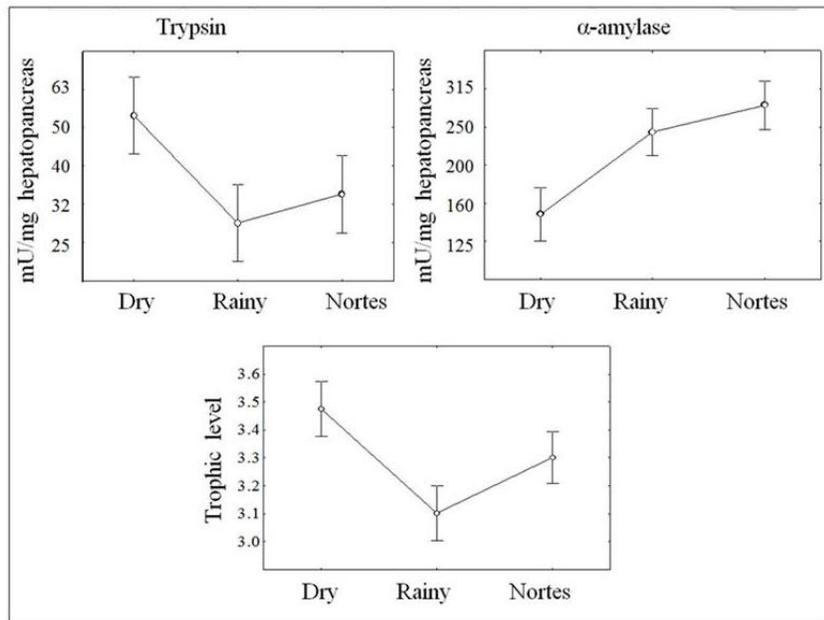


Fig. 9. Seasonal variation of trypsin (N=89), α -amylase (N=89) and trophic level (N=124) of *Farfantepenaeus duorarum*.

Table 1. Parameters monitored at the beginning of each sampling. (Moon phases: 1/4= waning, 2/4= new, 3/4= crescent and 4/4= full).

Annual season	Moon phase	Start hour	T°C	Salinity (ups)
Dry	1/4	19:36	29.5	33.0
Dry	2/4	20:02	25.0	18.0
Dry	3/4	20:15	29.0	29.0
Dry	4/4	19:00	29.5	28.0
	Mean=		28.2	27.0
Rain	1/4	20:10	30.3	17.6
Rain	2/4	20:45	30.9	19.6
Rain	3/4	20:30	30.0	32.8
Rain	4/4	20:00	31.7	18.0
	Mean=		30.7	22.0
N	1/4	20:22	26.2	13.1
N	2/4	19:48	27.1	20.6
N	3/4	19:38	26.1	31.3
N	4/4	19:25	27.8	33.5
	Mean=		26.8	24.6

Table 2. Food composition in stomach of juveniles *Farfantepenaeus duorarum* collected in each season. Frequency of occurrence (%) and Index of Importance (IIMP) of prey (N=124). *(% of volume); a= Schwaborn and Criales, 2000. (*F. duorarum*); b= Sánchez et al., 2002. (*L. schmitti*).

Food type		OCURRENCE			IIMP	References related
		DRY	RAINY	NORTES		
Malacostraca	Amphipoda	7.50	47.50	65.90	19.69	a,b
	Isopoda	0.00	22.50	9.00	1.47	
	Decapoda	2.50	5.00	2.20	1.30	b
Brachiopoda	Anostracoda	0.00	0.00	4.50	0.25	
	Cladocera	7.50	2.50	22.70	5.14	
Copepoda		12.50	50.00	77.20	29.34	a,b
Ostracoda		5.00	32.50	6.80	7.83	a
Pterygota	Diptera	0.00	32.50	22.70	10.26	
Opisthobranchia	Gastropoda	2.50	0.00	0.00	0.74	a
Granuloreticulosa	Foraminifera	0.00	52.50	0.00	5.65	a
Acari	Halacaroida	0.00	0.00	4.50	0.37	
Nematoda		7.50	2.50	29.50	9.60	a
Annelida	Oligochaeta	0.00	2.50	9.00	0.82	
	Polychaeta	0.00	7.50	9.00	1.02	a,b
<i>Halodule wrightii</i>		2.50	27.50	13.60	6.52	
Amorphous animal tissue*		79.00	55.00	64.00		
Plant detritus*		8.00	7.00	7.00		
Sand*		11.00	19.00	13.00		

Table 3. Stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$), C and N values of juveniles of *Farfantepenaeus duorarum*, sediment, plankton and *Halodule wrightii* from Celestun lagoon (N=31). * ($\geq 500 \mu\text{m}$).

Season		$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)	% N	%C
Productivity	Dry	14.21 \pm 1.99	-21.64 \pm 1.17	14.92 \pm 0.14	44.88 \pm 0.4
	Rainy	12.75 \pm 2.05	-17.68 \pm 1.58	9.69 \pm 0.32	43.87 \pm 0.99
	Nortes	11.86 \pm 1.16	-23.06 \pm 0.73	14.32 \pm 0.14	45.10 \pm 0.39
	Sediment *				
	Dry	8.86	-8.04	0.33	13.7
	Rainy	9.04	-7.58	0.37	13.57
	Nortes	8.51	-7.22	0.30	13.28
	Plankton *				
	Rainy	8.22	-10.63	0.85	16.26
	Nortes	7.68	-18.43	5.06	34.44
	<i>Halodule wrightii</i>	5.58	-20.28	1.8	36.2

Table 4. Ratio amylase/trypsin for the identification of the level of herbivory in different molt stages of *Farfantepenaeus duorarum* (N=178). (Mean \pm Standard Error).

Annual season	B ₂	C	D ₀	D ₁	D ₁ '	D ₁ '''
Dry	2.3 \pm 1.6	3.6 \pm 0.5	3.6 \pm 0.4	1.9 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2
Rain	6.1 \pm 1.0	8.9 \pm 1.8	9.8 \pm 0.7	8.3 \pm 1.4	12.0 \pm 3.0	11.0 \pm 2.0
Nortes	7.9 \pm 2.5	4.3 \pm 1.4	9.9 \pm 1.1	8.6 \pm 1.6	19.0 \pm 5.0	16.0 \pm 2.0