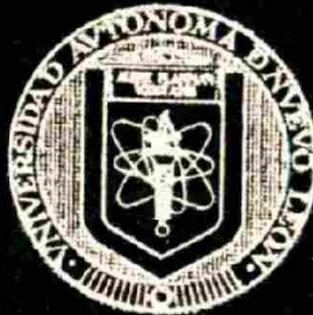


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO



FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DEL ACOCIL ROJO
Procambarus clarkii (CRUSTACEA: DECAPODA):
ESTABLECIMIENTO DEL CICLO DE MADURACION
GONADAL Y EVALUACION DE SU POTENCIAL
REPRODUCTIVO.

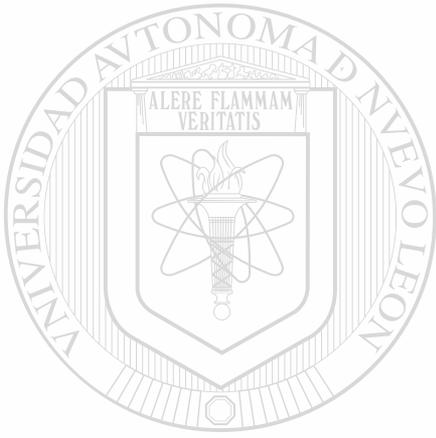
TESIS QUE PRESENTA

M.C. GABINO ADRIAN RODRIGUEZ ALMARAZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
FEBRERO DE 2001

G A R A



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANL

DE NUEVO LEÓN
BIBLIOTECAS

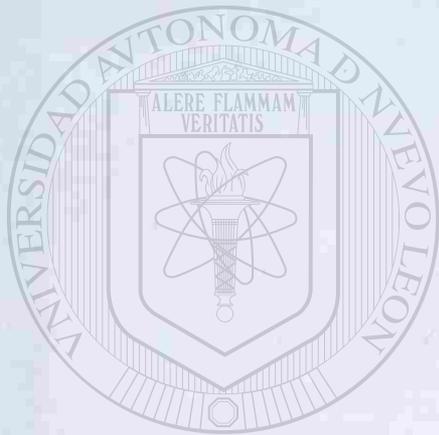
FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *ACOCIL ROJO* *Procambarus clarkii* (CRUSTÁCEA DECAPODA): ESTABLECIMIENTO DEL CICLO DE MADURACIÓN GONADAL Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL REPRODUCTIVO

TD
QL444
.M33
R62
2001
c.1

2001



1080124478



UANL

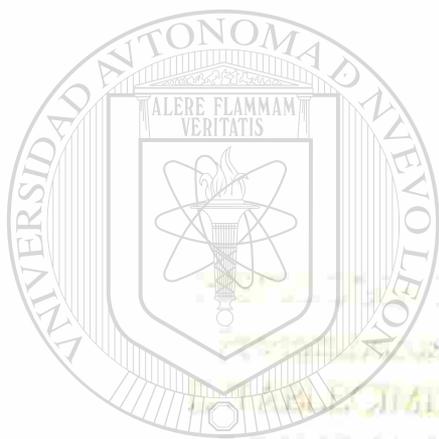
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE POSGRADOS DE INVESTIGACIÓN



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TESIS QUE PRESENTA

M. C. GABRIEL ADRIAN ROA RIVERA DE MORALES

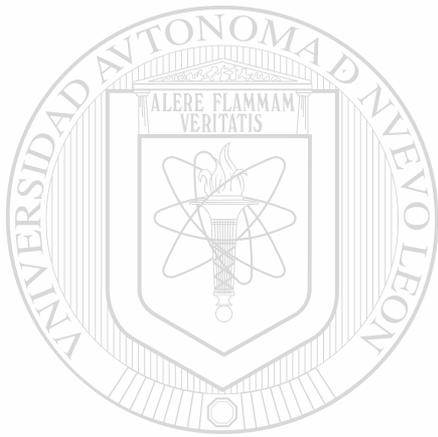
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN AGROCIENCIA

SAN NICOLÁS DE LOS RÍOS, NUEVO LEÓN, MEXICO

2015



TD
QL444
•M33
R62
2001



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DEL ACOCIL ROJO *Procambarus clarkii*
(CRUSTACEA: DECAPODA): ESTABLECIMIENTO DEL CICLO DE
MADURACION GONADAL Y EVALUACION DE SU POTENCIAL
REPRODUCTIVO**

UANL

TESIS QUE PRESENTA

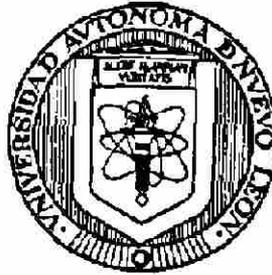
M.C. GABINO ADRIAN RODRIGUEZ ALMARAZ

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

FEBRERO 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DEL ACOCIL ROJO *Procambarus clarkii*
(CRUSTACEA: DECAPODA): ESTABLECIMIENTO DEL CICLO DE
MADURACION GONADAL Y EVALUACION DE SU POTENCIAL
REPRODUCTIVO

TESIS QUE PRESENTA
M.C. GABINO ADRIAN RODRIGUEZ ALMARAZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA

COMITÉ DOCTORAL

DR. ROBERTO EDUARDO MENDOZA ALFARO
DIRECTOR DE TESIS

DR. DENIS RICQUE MARIE
SECRETARIO

DR. REYES S. TAMEZ GUERRA
VOCAL

DRA. LUCIA ELIZABETH CRUZ SUAREZ
VOCAL

DRA. JULIA VERDE STAR
VOCAL

Agradecimientos a las Instituciones que hicieron posible la realización de esta investigación:

Al **CONACYT** a través del Programa **Cátedras Patrimoniales de Excelencia nivel II: Apoyo a Profesores e Investigadores para obtener el Doctorado**, por otorgarme una beca para la culminación de mis estudios de Doctorado.

Al Programa **SUPERA**, quien en los inicios de mis estudios de Doctorado proporcionó un apoyo parcial para este estudio.

Al Programa **PROMEP**, que igualmente otorgó un apoyo parcial para el desarrollo de esta investigación.

Al **Sistema Nacional de Investigadores-CONACYT (SNI)**, por el apoyo y estímulo recibido, al considerarme como Investigador Nacional nivel I (1999-2002).

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, al otorgarme un apoyo económico parcial para la realización de este estudio.

A la Administración de la **Facultad de Ciencias Biológicas** (1994-2000), quien a través de su Programa de Formación del Profesores apoyó el inicio y finalización de mis estudios de Doctorado.

A la **Subdirección de Estudios de Postgrado** de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., por las atenciones y facilidades prestadas a un servidor.

Agradecimientos:

Al Dr. Roberto E. Mendoza Alfaro, quién dirigió este estudio de una manera acertada a través de sus críticas y comentarios, y a la vez por enseñarme a descubrir otras áreas del conocimiento de la biología de los crustáceos.

Al Dr. Denis Ricque Marie, por sus valiosas sugerencias de la parte estadística y revisión del manuscrito.

Al Dr. Reyes S. Tamez Guerra, por su valiosa participación en el comité doctoral y comentarios durante la revisión del manuscrito. También quiero expresar mi profundo agradecimiento por su apoyo que me otorgo, al considerarme como miembro de la planta docente de la Facultad de Ciencias Biológicas, durante su gestión como Subdirector Académico.

A la Dra. Elizabeth Cruz Suárez, por sus comentarios y sugerencias para este estudio. Además, por la motivación que me dio hace años para interesarme en la producción y manejo de crustáceos.

A la Dra. Julia Verde Star, por la revisión y sugerencias hacia este trabajo, y su apoyo durante mis estudios de postgrado.

Al Dr. Roberto Mercado Hernández, por su invaluable asesoría para el manejo estadístico de los datos e interpretación de los resultados.

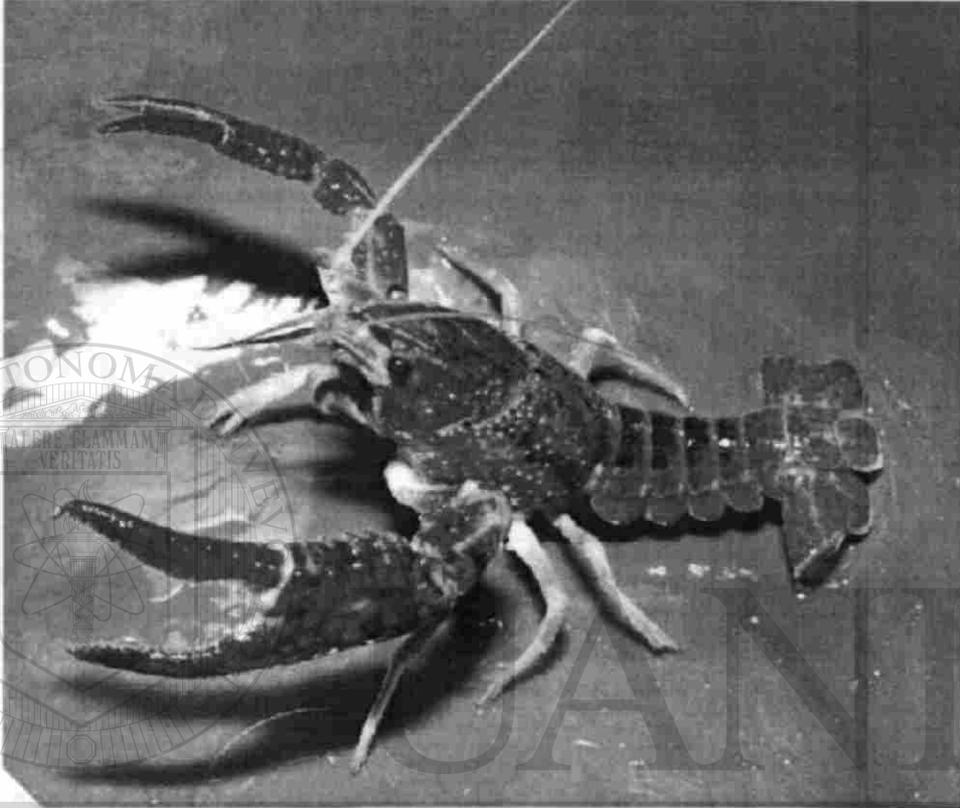
A todos mis estudiantes y tesisistas del Lab. de Artrópodos y Entomología, en particular quienes en diferentes tiempos han colaborado en los estudios sobre acociles: Isabel, Chavana, Alfredo, Alejandro, Esteban, Nancy, Carlos, Walter, Elena y Víctor.

A los miembros del grupo de Ecofisiología, quienes ayudaron y colaboraron de manera extraordinaria para este estudio.

A los compañeros profesores del laboratorio: Dra. María Luisa Rodríguez, Dr. Raúl Torres, Dr. Humberto Quiroz y Dr. Carlos Solís.

DEDICATORIA A MI FAMILIA:

Dedico esta tesis con gran amor para mi esposa Nancy, quien permanentemente ha acompañado al esfuerzo y dedicación que le di a este trabajo y a mi familia.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN *Procambarus clarkii* LIOTECAS

En recuerdo de tres grandes carcinólogos:

- Dr. Horton H. Hobbs Jr. (†)
- Dr. Alejandro Villalobos-Figueroa (†)
- Dr. Thomas E. Bowman (†)

DEDICATORIA A MI FAMILIA:

Dedico esta tesis, con gran amor para mi esposa **Rosy**, quien pacientemente ha comprendido el esfuerzo y dedicación que le di a este trabajo y a otras actividades propias que realizó como profesor de la Universidad. Ojalá y siempre seas así.

A mis tres grandes amores, que con su particular forma de ser, me han motivado para desarrollarme moralmente y profesionalmente, además por enseñarme a ser padre:

Ana Karen "Mi cangrejita"
Gabinito "El gordo"
Gabriela Elaine "Mi hediondilla"

A mis padres:

Javier Rodríguez, aunque siempre hemos estado lejos, te respeto y te quiero. Espero en dios, te de las fuerzas para recuperarte.

Josefina Almaraz "Doña Fina", una vez más te agradezco por quererme y educarme desde mi niñez hasta hoy en día.

A mis hermanos:

Aunque siempre, han sido de distinta forma de actuar y pensar, a todos los quiero y los respeto: **Laura, Miriam, Javier, David y Fina.**

Como un recuerdo especial quiero dedicar esta tesis a mi abuelita:

Ana María (†)

INDICE

INDICE DE TABLAS	i
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	viii
CAPITULO 1. - INTRODUCCION GENERAL	
1.1 INTRODUCCION	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 <i>Objetivo general de este estudio</i>	3
1.2.2 <i>Objetivos particulares de cada capítulo</i>	3
1.3 HIPOTESIS	4
1.4 ANTECEDENTES GENERALES	4
1.4.1 <i>Distribución de Procambarus clarkii</i>	5
1.4.2 <i>Estado actual de las especies nativas</i>	6
1.4.3 <i>Ecología e impacto de los acociles en los ecosistemas</i>	6
1.4.3.1 <i>Hábitat</i>	6
1.4.3.2 <i>Madrigueras</i>	7
1.4.3.3 <i>Hábitos alimenticios y papel politrófico</i>	8
1.4.3.4 <i>Cambios o modificación del hábitat por la presencia de acociles</i>	9
1.4.3.5 <i>Calidad del agua en ambientes naturales y de cultivo</i>	10
1.4.4 <i>Biología reproductiva</i>	11
1.4.4.1 <i>Dimorfismo sexual</i>	11
1.4.4.2 <i>Maduración sexual</i>	12
1.4.4.3 <i>Cortejo y cópula</i>	13
1.4.4.4 <i>Desove e Incubación</i>	14
1.4.4.5 <i>Fecundidad</i>	16
1.4.5 <i>Crecimiento</i>	17
1.4.6 <i>Importancia de los acociles</i>	19
1.4.6.1 <i>Producción de acociles en áreas naturales y de cultivo</i>	19
1.4.6.2 <i>Nutrición</i>	20
1.4.6.3 <i>Especies exóticas</i>	21

1.4.6.4	Mercado y uso actual de las especies nativas y exóticas	22
---------	---	----

CAPITULO 2.- ANALISIS DE LA FECUNDIDAD EN HEMBRAS DE *Procambarus clarkii*

2.1	INTRODUCCION	23
2.2	ANTECEDENTES	23
2.2.1	<i>Estrategias y factores ambientales que influyen en la producción de huevo en Acociles</i>	23
2.2.2	<i>Pérdida de huevecillos</i>	24
2.2.3	<i>Potencial reproductivo y reproducción realizada</i>	27
2.2.4	<i>Producción actual y eficiencia reproductiva</i>	29
2.2.5	<i>Métodos para evaluar la fecundidad en crustáceos</i>	30
2.3	METODOLOGIA	33
2.3.1	<i>Diseño experimental</i>	33
2.3.2	<i>Recolección y acondicionamiento de las hembras en laboratorio</i>	33
2.3.3	<i>Datos biométricos de las hembras</i>	35
2.3.4	<i>Métodos para describir la fecundidad</i>	35
2.4	RESULTADOS	37
2.4.1	<i>Datos de talla (LC) y peso (PT) de las hembras</i>	37
2.4.2	<i>Potencial reproductivo</i>	39
2.4.2.1	Valores del número de ovocitos por estadio gonadal	39
2.4.2.2	Análisis estadísticos del número de ovocitos en función a las variables morfológicas	40
2.4.2.3	Valores estimados del número de ovocitos por talla (LC) y peso (PT).....	44
2.4.3	<i>Reproducción realizada y reproducción actual</i>	46
2.4.3.1	Valores del número de huevecillos llevados por las hembras por fases de desarrollo embrionario	46
2.4.3.2	Análisis estadístico del número de huevecillos en función a las variables morfológicas	47
2.4.3.3	Valores estimados del número de huevecillos por talla (LC).....	50

2.4.3.4	Comparación de las regresiones entre Potencial Reproductivo y Reproducción Realizada	51
2.5	DISCUSION	57
2.6	CONCLUSION	63

CAPITULO 3.- ESTUDIO HISTOQUIMICO DEL OVARIO E INDICES SOMATICOS INVOLUCRADOS EN EL CICLO DE MADURACION GONADAL DE *Procambarus clarkii*

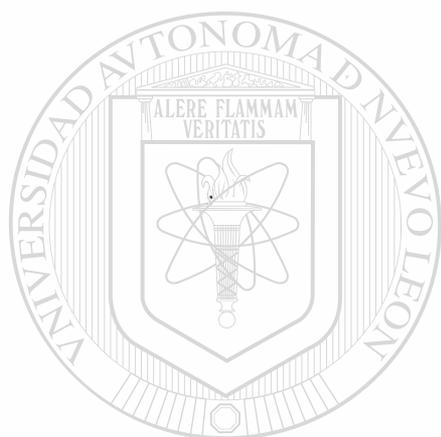
3.1	ANTECEDENTES	64
3.1.1	<i>Anatomía y descripción de los ovarios en crustáceos decápodos</i>	64
3.1.2	<i>Clasificación de las gónadas de acuerdo a sus características morfológicas e histoquímicas</i>	65
3.1.3	<i>Estudio sobre histología gonadal en crustáceos decápodos</i>	68
3.1.4	<i>Indices Gonadosomáticos</i>	70
3.1.5	<i>Indices Hepatosomáticos</i>	73
3.2	METODOLOGIA	76
3.2.1	<i>Colecta del material biológico</i>	76
3.2.2	<i>Acondicionamiento de los especímenes en laboratorio</i>	76
3.2.3	<i>Biometría</i>	77
3.2.4	<i>Estado de muda</i>	77
3.2.5	<i>Disección</i>	77
3.2.6	<i>Técnicas histológicas</i>	78
3.2.6.1	Histología para caracterización morfométrica de los ovocitos mediante la Técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina (H y E)	78
3.2.6.2	Histoquímica para la determinación de glicoproteínas, con la técnica de Acido Periódico- Reacción de Schiff (PAS)	79
3.2.6.3	Histoquímica para determinar la presencia de lípidos mediante la técnica de Black Sudan B (BSB)	79
3.2.7	<i>Indices gonadosomáticos</i>	80
3.2.8	<i>Indices Hepatosomáticos</i>	81
3.2.9	<i>Análisis estadísticos</i>	81

3.3 RESULTADOS	83
3.3.1 Clasificación de las gónadas	83
3.3.2 Estado de la muda	85
3.3.3 Datos morfométricos (LC y PT)	86
3.3.4 Peso del ovario	87
3.3.5 Índices gonadosomáticos	89
3.3.5.1 IGS por estadio gonadal	89
3.3.5.2 IGS mensual	90
3.3.6 Índice Gonadal Relativo (IGR)	92
3.3.7 Color y Peso del Hepatopáncreas	93
3.3.8 Índices Hepatosomáticos (IHS)	97
3.3.8.1 Índices Hepatosomáticos por estadio gonadal	97
3.3.8.2 Índices Hepatosomáticos mensuales	98
3.3.9 Comparación y relación de los IGS e IHS por mes y estadio gonadal	99
3.3.10 Histología gonadal	101
3.3.11 Descripción histológica de las gónadas mediante la técnica de H y E	101
3.3.12 Características histoquímicas de los ovocitos	112
3.3.11.1. Observación de glicoproteínas	112
3.3.11.2. Observación de lípidos	113
3.3.11.3. Comparación de las técnicas de PAS y BSB	113
3.4 DISCUSIONES	115
3.4.1 Caracterización de las gónadas	115
3.4.2 Muda	117
3.4.3 Datos morfométricos	118
3.4.4 Peso ovárico	120
3.4.5 Índices Gonadales	122
3.4.5.1 Índice Gonadosomático (IGS)	122
3.4.5.2 Índice Gonadal Relativo (IGR)	125
3.4.6 Peso hepatopáncreas	125

3.4.7	Indices Hepatosomáticos (IHS)	126
3.4.8	Relación de IGS e IHS	127
3.4.9	Histología Gonadal	128
3.4.9.1	Células foliculares (CF)	128
3.4.9.2	Diámetro de ovocitos	128
3.4.9.3	Diámetro de los núcleos	129
3.4.9.4	Forma de los ovocitos	130
3.4.9.5	Número de nucléolos	130
3.4.9.6	Presencia de vacuola y zona perinuclear	130
3.4.9.7	Espacios citoplasmáticos	131
3.4.10	Técnicas histoquímicas	131
3.4.10.1	Determinación de glicoproteínas por la técnica de PAS	132
3.4.10.2	Determinación de lípidos por la técnica de BSB	133
3.5	CONCLUSIONES	134
CAPITULO 4.- PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA VITELOGENINA PLASMATICA Y VITELINA OVARICA DEL ACOCIL ROJO <i>Procambarus clarkii</i>		
4.1	INTRODUCCION	135
4.2	ANTECEDENTES	135
4.2.1	Recrudescimiento gonadal	135
4.2.2	Vitelogénesis	136
4.2.3	Tipos de vitelo	140
4.2.4	Origen y síntesis de vitelo	142
4.2.5	Factores que influyen en la vitelogénesis de crustáceos	145
4.2.5.1	Factores externos (ambientales)	145
4.2.5.2	Factores internos	147
4.2.5.2.1	Control Endocrino de la Muda y la Reproducción	147
4.2.5.2.2	Hormonas involucradas en el proceso de la Muda	149
4.2.5.2.3	Hormonas involucradas en la Reproducción	151
4.2.5.2.4	Control Hormonal	153
4.2.5.3	Ablación peduncular	157
4.2.6	Técnicas y métodos utilizados en el estudio de la vitelogénesis	157

4.2.6.1	Caracterización y purificación	157
4.2.6.2	Cromatografía	158
4.2.6.3	Electroforesis	158
4.2.6.4	Ultracentrifugación	158
4.3	METODOLOGIA	161
4.3.1	<i>Caracterización y purificación de la VTG y VTL</i>	161
4.3.1.1	Obtención de hemolinfa	162
4.3.1.2	Preparación del extracto de ovario	162
4.3.1.3	Ultracentrifugación	162
4.3.1.4	Filtración en gel	163
4.3.1.5	Cromatografía de intercambio iónico	163
4.3.1.6	Determinación de lípidos	163
4.3.1.7	Determinación de carotenoides	164
4.3.1.8	Determinación de proteínas	164
4.3.1.9	Concentración de proteínas	164
4.3.2	<i>Determinación del peso molecular</i>	164
4.4	RESULTADOS	165
4.4.1	<i>Caracterización y purificación de la VTG y VTL</i>	165
4.4.1.1	Ultracentrifugación	165
4.4.1.2	Filtración en gel	168
4.4.1.3	Intercambio de iones	171
4.4.2	<i>Determinación del peso molecular</i>	172
4.5	DISCUSION	176
4.5.1	<i>Purificación de la VTG y VTL</i>	176
4.5.2	<i>Caracterización</i>	178
4.5.2.1	Evaluación del peso molecular	178
4.5.2.2	Caracterización de la VTG y VTL por sus grupos prostéticos	182
4.5.2.3	Caracterización por el rol fisiológico de las moléculas	183
4.5.2.4	Corolario	185
4.6	CONCLUSION	186
APENDICE 1	187

APENDICE 2	188
APENDICE 3	189
5.- LITERATURA CITADA	190



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE TABLAS

CAPITULO 2.- ANÁLISIS DE LA FECUNDIDAD EN HEMBRAS DE *Procambarus clarkii*

2.1 Comparación interespecífica del porcentaje de pérdida entre el número de ovocitos en el ovario y el número de huevecillos abdominales o juveniles del estadio III (Tomado y modificado de Corey, 1991).....	27
2.2 Producción de ovocitos (Potencial reproductivo) y huevecillos (reproducción realizada) en algunas especies de acociles cambáridos (Tomada y modificada de Huner y Lindqvist, 1991).	29
2.3 Estudios recientes sobre el análisis de fecundidad en diferentes especies de crustáceos decápodos, que implican la relación talla y número de huevecillos.	31
2.4 Clasificación de los huevecillos de <i>P. clarkii</i> (Tomada de Huner y Barr, 1984).	34
2.5 Valores promedio, mínimo y máximo de LC, PT y LT de las hembras utilizadas para el análisis de fecundidad.....	38
2.6 Valores mínimos, máximos y promedio del número de ovocitos por estadio gonadal de las hembras de <i>Procambarus clarkii</i>	40
2.7 Parámetros de la regresión potencial del número de ovocitos (NO) por estadio en función de LC y PT.	40
2.8 Tipo de crecimiento relativo de NO en función de LC y PT por estadio gonadal.	41
2.9 Prueba de comparación de las pendientes obtenidas en la relación NO vs. PT de los tres estadios gonadales.	43
2.10 Prueba de comparación de las pendientes obtenidas en la relación NO vs. LC de los tres estadios gonadales.	44
2.11 Valores estimados de NO utilizando las regresiones obtenidas en cada estadio, en función de LC.	44
2.12 Valores estimados de NO utilizando las regresiones obtenidas en cada estadio, en función de PT.	45
2.13 Comparación de la diferencia porcentual de pérdida (DPP) del NO estimados por estadio gonadal en función de diferentes clases de talla (LC) de las hembras.	45

2.14 Valores mínimos, máximos y promedio del número de huevecillos por fase de desarrollo embrionario llevados por hembras de <i>Procambarus clarkii</i> .	46
2.15 Parámetros de la regresión potencial del número de huevecillos (NH) por estadio en función de LC y PT.	47
2.16 Tipo de crecimiento relativo de NH en función de LC y PT por fase de desarrollo embrionario.	48
2.17 Valores estimados de NH utilizando las regresiones obtenidas en cada estadio (HBC, HBL, JUV), en función de LC (mm).	50
2.18 Comparación de la diferencia porcentual de pérdida (DPP) del número de ovocitos (NO) estimados en estadio IV (OIV), con respecto al número de huevecillos (NH) estimados en los estadios HBC y HBL, utilizando la LC (mm) como variable de referencia.	51
2.19 Comparación de la diferencia porcentual de pérdida (DPP) del número de huevecillos (NH) estimados entre los estadios HBC, HBL y JUV, utilizando la LC (mm) como variable de referencia.	51
2.20 Análisis de comparación de las pendientes de regresión de los huevecillos en blástula de campo y blástula de laboratorio con LC.	52
2.21 Análisis de comparación de las pendientes de regresión de los huevecillos en blástula de campo y ovocitos en estadio IV con LC.	53
2.22 Análisis de comparación de las pendientes de regresión de los huevecillos en blástula de laboratorio y ovocitos en estadio IV con LC.	53
2.23 Comparación de las elevaciones de dos pendientes (HBL y HBC), utilizando LC, como variable de referencia.	54
2.24 Comparación de las elevaciones de dos pendientes (HBC y OIV), utilizando LC, como variable de referencia.	55
2.25 Comparación de las elevaciones de dos pendientes (HBL y OIV), utilizando LC, como variable de referencia.	56

CAPITULO 3.- ESTUDIO HISTOQUÍMICO DEL OVARIO E ÍNDICES SOMÁTICOS INVOLUCRADOS EN EL CICLO DE MADURACIÓN GONADAL DE *Procambarus clarkii*

3.1 Comparación de los diferentes estudios gonadales basados en sus características histoquímicas y desarrollo de ovocitos, de acuerdo a Kulkarni, et al. (1991).	67
---	----

3.2 Antecedentes sobre el uso de técnicas histológicas para el estudio del ciclo gonadal de hembras en diferentes especies de crustáceos.	69
3.3 Antecedentes sobre el uso de Índices Gonadosomáticos para estudios de reproducción en crustáceos.	72
3.4 Valores de IHS en algunas especies de crustáceos decápodos.	75
3.5 Composición del alimento ofrecido a las hembras.	77
3.6 Relación del estado de la muda con respecto al estadio gonadal.	85
3.7 Datos morfométricos por estadio gonadal de hembras de <i>P. clarkii</i>	86
3.8 Valores del peso ovárico para cada estadio gonadal.	88
3.9 Datos del peso del ovario de las hembras recolectadas durante 1998.	88
3.10 Valores de Índices Gonadosomáticos por estadio gonadal.	90
3.11 Índices Gonadosomáticos por mes de colecta.	91
3.12 Ecuaciones y valores de <i>a</i> y <i>b</i> obtenida de la relación <i>W</i> (Peso del ovario) en función de <i>S</i> (Peso de la hembra - Peso del ovario).	92
3.13 Análisis de Covarianza de las regresiones de los cuatro estadios gonadales, para calcular el coeficiente de regresión común.	92
3.14 Ecuación de $IGR = aW/S^b$ para cada estadio gonadal.	93
3.15 Valores de Índice Gonadal Relativo (IGR) por estadio gonadal.	93
3.16 Valores del peso del hepatopáncreas (PH) para cada estadio gonadal.	94
3.17 Datos del peso del hepatopáncreas (PH) por mes de recolección.	95
3.18 Valores de los Índices Hepatosomáticos (IHS) por estadio gonadal.	98
3.19 Valores de los Índices Hepatosomáticos por mes de recolección.	99
3.20 Valores promedio y desviación estándar de los IGS e IHS por estadio gonadal de las hembras de <i>Procambarus clarkii</i> , colectadas en 1998.	100
3.21 Diámetros de los ovocitos por estadio gonadal (en μm).	101
3.22 Diámetro de núcleos por estadio gonadal.	105

3.23 Relación núcleo-citoplasma en los diferentes estadios gonadales.	106
3.24 Comparación de las formas de los ovocitos para cada estadio gonadal.	106
3.25 Comparación del número de nucleolos por estadio gonadal.	108
3.26 Presencia de zona perinuclear y vacuola por estadio gonadal.	109
3.27 Comparación de las principales características histológicas de los ovocitos por estadio gonadal.	112
3.28 Reacciones histoquímicas para cada estadio gonadal.	114

CAPITULO 4.- PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA VITELOGENINA PLASMÁTICA Y VITELINA OVÁRICA DEL ACOCIL ROJO *Procambarus clarkii*

4.1 Estimaciones del peso molecular de las subunidades de VTL, en diferentes especies de crustáceo.....	142
4.2 Síntesis de la VTL y VTG, en diferentes especies de crustáceos.	145
4.3 Técnicas empleadas para la purificación y caracterización de la VTL y la VTG en diferentes especies de crustáceos.	159
4.4 Valores utilizados en el análisis de regresión lineal.	172

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO 2.- ANÁLISIS DE LA FECUNDIDAD EN HEMBRAS DE *Procambarus clarkii*

2.1 Relación morfométrica de las hembras utilizando LC, LT y PT.	39
2.2 Relación del número de ovocitos (NO) en función de LC. a) Estadio II, b) Estadio III, c) Estadio IV.	42
2.3 Relación del número de ovocitos (NO) en función de PT. a) Estadio II, b) Estadio III, c) Estadio IV.	42
2.4 Relación del número de huevecillos (NH) en función de LC. a) blástula, b) juveniles, c) blástula (laboratorio).	49
2.5 Relación del número de huevecillos (NH) en función de PT. a) blástula, b) juveniles, c) blástula (laboratorio).	49

CAPITULO 3.- ESTUDIO HISTOQUÍMICO DEL OVARIO E ÍNDICES SOMÁTICOS INVOLUCRADOS EN EL CICLO DE MADURACIÓN GONADAL DE *Procambarus clarkii*

3.1 Estructuras gonadales de <i>Procambarus clarkii</i> . A) Hembra y B) Macho (Tomado de Arrignon, J., 1979).	65
3.2 Diagrama de flujo del diseño experimental.	82
3.3 Ovarios de <i>Procambarus clarkii</i> en diferentes estadios gonadales; a) estadio I, b) estadio II, c) estadio III y d) estadio IV.	83
3.4 Escala cromática.	84
3.5 Margen del urópodo que representa las características de un espécimen en estadio D (las flechas indican la presencia de nuevas setas).	85
3.6 Relación de PT y LC de las hembras colectadas en 1998.	87
3.7 Relación de POV y PT de las hembras colectadas en 1998.	89
3.8 Índices Gonadosomáticos por estadio gonadal.	90
3.9 Comparación mensual de Índices Gonadosomáticos.	91
3.10 Relación de PH y PT de las hembras colectadas en 1998.	96

3.11 Relación del POV y PH de las hembras colectadas en 1998.	97
3.12 Índices Hepatosomáticos por estadio gonadal.	98
3.13 Índices Gonadosomáticos (IGS) en azul e Índices Hepatosomáticos (IHS) en rojo para hembras colectadas en 1998.	100
3.14 Comparación del diámetro de los ovocitos por estadio gonadal.	102
3.15 Cortes transversales (10 X) de ovario en estadio I donde se puede observar el Núcleo (N) y Tejido Ovárico (TO) (Hematoxilina de Harris y Eosina).	102
3.16 Corte transversal de ovario, a) Estadio II (4.1X) - La flecha indica las células foliculares (Cf) alrededor del ovocito (barra de calibración = 129.65 μm); b) Estadio III (10X).- ovocito con vacuola (V), característica distintiva de este estadio (Barra de calibración = 52.6402 μm). (Hematoxilina de Harris y Eosina).	103
3.17 Corte de ovario (10 X) en Estadio IV: Se observan los nucleolos (Nc), algunas gotas de vitelo (V) y presencia de espacios blancos (Eb) intracelulares como característica de una reabsorción del ovario (Hematoxilina de Harris y Eosina). Barra de calibración = 60.8511 μm.	104
3.18 Comparación del diámetro del núcleo por estadio gonadal.	105
3.19 Formas de los ovocitos por estadio gonadal.	107
3.20 Cortes de ovario (10 X) con diferentes formas de ovocitos que se presentan en diversos estadios. a) ovoide, b) semiesférico, c) rectangular y d) cuadrado. (a. Acido Periódico-Reucción de Schiff; b, c y d Hematoxilina de Harris y Eosina).	107
3.21 Número de nucléolos por estadio gonadal.	108
3.22 Presencia de zona perinuclear y vacuola en los diferentes estadios gonadales.	109
3.23 Cortes de ovario (10 X) en estadio III. Presencia de vacuolas, distintivo de este estadio (Hematoxilina de Harris y Eosina). Barra de calibración = 52.6402.	110
3.24 a) Corte de ovario en estadio III (10 X, Acido Periódico-reacción de Schiff); b) Ampliación de la zona perinuclear (Zp) (40 X), (Acido Periódico-Reacción de Schiff). Barra de calibración = 52.6402.	110
3.25 Corte de ovario en estadio IV donde se pueden observar una gran cantidad de espacios. a) 40X; b) 10X (Acido Periódico-Reacción de Schiff).	111

3.26	<i>Cortes de ovario (10 X) con reacción positiva al Acido Periódico- Reacción de Schiff. Gránulos de glicoproteínas indicado por flechas; a) Estadio III, Barra de calibración = 52.6402; b) Estadio IV, Barra de calibración = 60.8511; (Acido Periódico- Reacción de Schiff).</i>	113
-------------	---	-----

CAPITULO 4.- PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA VITELOGENINA PLASMÁTICA Y VITELINA OVÁRICA DEL ACOCIL ROJO *Procambarus clarkii*

4.1	<i>Diagrama esquemático del control hormonal (Tomado de Mendoza, 1992).</i>	156
4.2	<i>Diagrama de flujo para la purificación de la VTG y de la VTL.</i>	161
4.3	<i>Representación de las fases obtenidas de la ultracentrifugación (120,000 g X 24h) de extracto de ovario maduro.</i>	166
4.4	<i>Barrido longitudes de onda de 300-700 nm de la fase Eov5, observándose un pico a una absorbancia de 466 nm.</i>	167
4.5	<i>Concentración de proteína en las fases de la centrifugación de ovario maduro.</i>	168
4.6	<i>Fracciones proteicas del extracto de ovario maduro a 280 nm (azul) después de filtración en Sephacryl 300, absorbancia a 466 nm (rojo) y reacción positiva de las fracciones con Negro Sudan (•).</i>	169
4.7	<i>Comparación de las fracciones del extracto de ovario maduro (azul), hemolinfa de hembra madura (rojo) y fase Eov5 (verde) en Sephacryl 300 a 280 nm.</i>	170
4.8	<i>Fracciones de extractos de ovario maduro (azul), ovario impúber (rojo) y extracto de testículo (verde) en Sephacryl 300.</i>	170
4.9	<i>Fracciones de pool de ovario maduro (EOv5) después de someterlos a cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacel) (.). Gradiente lineal de 1M en buffer TRIS-HCL a un flujo de 1 ml/min.</i>	171
4.10	<i>Estimación del logaritmo del peso molecular de proteínas, mediante el análisis de regresión lineal del Kav y LogMW.</i>	173
4.11	<i>Determinación de los radios de stokes de la VTL y VTG.</i>	174
4.12	<i>Determinación del peso molecular de la VTL y VTG mediante los radios de stokes.</i>	175

RESUMEN

Se estudió aspectos de la biología y fisiología del acocil rojo *Procambarus clarkii*, especie exótica en el norte de México. Esta especie es de gran interés en la acuicultura de varios países del mundo. Sin embargo, en México no ha sido un recurso atractivo para su explotación, a pesar de que pudo haber sido introducida para estos fines. Los especímenes fueron recolectados en el Río San Juan, Santiago, Nuevo León. La producción de ovocitos (Potencial reproductivo) no presentó diferencias significativas por estadio gonadal, y el máximo valor fue de 1,038 ovocitos. La reproducción realizada (Número de huevecillos adheridos) presentó un valor máximo de 719 huevecillos, existiendo diferencias en el número de huevecillos producidos por las hembras grávidas recolectadas en campo y las mantenidas en el laboratorio. El porcentaje de pérdida de fecundidad que ocurrió de ovocitos maduros a huevecillos recién liberados, para hembras obtenidas en campo y las mantenidas en laboratorio, fue de 34.51 y 38.59%, respectivamente. Se determinó las características morfológicas e histológicas de los ovocitos de cada estadio gonadal. Los índices gonadales fueron significativamente diferentes entre cada estadio, con sus valores máximos en el estadio IV. Por otra parte, el índice hepatosomático fue significativamente diferente en el estadio III, con respecto a los otros tres estadios. Mediante técnicas de cromatografía, como filtración en gel e intercambio iónico se estimó el peso molecular de la vitelina (VTL) y la vitelogenina (VTG), con valores de 512.6 y 521.8 kDa, respectivamente. Ambos tipos de vitelo fueron característicos de ovarios considerados maduros de acuerdo a sus características morfológicas e histológicas. La VTL y VTG, presentaron valores cercanos al peso molecular estimado de la VTL de hembras del género *Procambarus*, que fue de 500 kDa.

CAPITULO I.- INTRODUCCION GENERAL

1.1.- INTRODUCCION

En el continente Americano se han descrito 406 especies de acociles (Hobbs Jr., 1989; Crandall, 1999). Gran parte de esta biodiversidad corresponde al género *Procambarus*, con 16 subgéneros y 156 especies, que se distribuyen principalmente en el Sureste de los Estados Unidos, incluyendo los estados de Texas, Louisiana, Missouri, Illinois, Nuevo México y Oklahoma y la vertiente del Golfo de México y Cuba (Hobbs Jr., 1984).

En México, habitan 57 especies de acociles (Hobbs Jr., 1989; Villalobos-Hiriart *et al.*, 1993), más una nueva especie de *Procambarus* (*P. citlaltetel*) descrita por Rojas *et al.* (1999), para el estado de Veracruz. Las especies mexicanas son consideradas de afinidad neártica (Villalobos-Hiriart *et al.*, 1993), y se localizan principalmente en la vertiente del Golfo de México, pero algunas especies son habitantes de ambientes dulceacuícolas del occidente de México (Hobbs Jr., 1984, 1989; Villalobos-Figueroa, 1982). La mayor parte de esta biodiversidad corresponde al género *Procambarus* (49 especies) y solamente se conocen 9 especies del género *Cambarellus* (Hobbs Jr., 1989). Se ha documentado la existencia de tres especies consideradas exóticas para México, *P. clarkii*, *Orconectes virilis* y *Cherax quadricarinatus* (Campos y Contreras-Balderas, 1985; Hobbs Jr., 1962; Rodríguez-Almaraz y Campos, 1994; Rodríguez-Almaraz y Mendoza-Alfaro, 1999).

El acocil *Procambarus clarkii*, como la mayor parte de las especies de este género, habita en medios lóticos y lénticos de agua dulce, tanto permanentes como temporales (Huner y Barr, 1984) y se ha adaptado a diferentes formas de vida, tales como: túneles que perforan bajo la tierra húmeda, bajo piedras con vegetación y también en las raíces de árboles riparios (Villalobos-Figueroa, 1955; Huner, 1976; Hobbs Jr., 1989; Campos y Rodríguez-Almaraz, 1992). Debido a la abundancia de las especies de acociles en los cuerpos de agua dulce se han considerado como la principal fauna macrobentónica, tanto por su aportación de biomasa a los ecosistemas, así como por la gran diversidad biológica que estos

representan (Momot, 1978; Momot, 1984; Hobbs III *et al.*, 1989). Esta especie es tolerante a las variaciones fisicoquímicas de los ecosistemas acuáticos, e inclusive a las sequías, para lo cual utilizan madrigueras (Hobbs Jr., 1984).

El interés particular que tiene *P. clarkii*, se refleja en su importancia dentro del contexto de la acuicultura y en las pesquerías, actividades que se efectúan en diversas partes del mundo, pero con un particular desarrollo y arraigo en el estado de Louisiana, Estados Unidos de América (Huner y Barr, 1984), no obstante, esta actividad se ha venido fomentando en diferentes partes del mundo, principalmente por su alta calidad proteica (Huner y Lindqvist, 1991).

La biología y ecología de *P. clarkii* es conocida principalmente en base a los estudios de las poblaciones del estado de Louisiana, en donde se utilizan grandes extensiones de terreno para su cultivo, lo que permite generar rendimientos de 500 a 4,497 kg/ha. Estos rangos de producción dependen del tipo de estanques, la estación del año, la disponibilidad de alimento, la presencia o ausencia de depredadores y de los factores fisicoquímicos (Chien y Avault, 1980; Chien y Avault, 1983; Huner y Avault, 1976a; Huner, 1978a; Huner, 1978b; Romaine y Lutz, 1989; Romaine, 2000). Independientemente de estas variables, la producción obtenida representa ganancias de hasta de 70 millones de dólares/año (Momot y Romaine, 1981; Culley *et al.*, 1985; Brankston *et al.*, 1988).

El éxito del acocil rojo es atribuible a varias características biológicas inherentes a la especie, entre las que se cuentan su voracidad y su eficiencia reproductiva. En efecto, esta especie se reproduce todo el año, presentando una frecuencia de copulas a finales de mayo y principio de junio (La Caze, 1976; Huner y Barr, 1984). La época de desove generalmente empieza en agosto y termina en octubre, sin embargo se han registrado desoves esporádicos en noviembre y diciembre (Dendy, 1978).

El panorama internacional nos muestra lo atractivo que resulta el acocil rojo, y es una de las razones que ha justificado no solo su producción, sino también el uso de especies de acociles exóticos. Nuestro país no puede ser la excepción, ya que hay planes ambiciosos para la producción de langosta de uña roja *Cherax quadricarinatus* y el propio acocil rojo *P. clarkii*, cuyo consumo es aún

limitado (Rodríguez-Almaraz y Mendoza-Alfaro, 1999), a pesar de que la expansión de esta última especie alcanza numerosos ambientes del norte de México.

A pesar de la importancia de *P. clarkii* en la industria acuacultural de los Estados Unidos de América, muy pocos estudios han sido desarrollados para entender la fisiología reproductiva de esta especie y su eventual control de reproducción (Daniels *et al.*, 1994). Por lo tanto resulta imperativo que para el aprovechamiento de *P. clarkii* y otras especies nativas de México, se analicen los aspectos fundamentales de su fisiología reproductiva, así como los principales parámetros biológicos, particularmente aquellos relativos a la reproducción y crecimiento, debido a su repercusión sobre la estructura y dinámica de sus poblaciones. Por lo anterior, este estudio tiene como metas principales caracterizar la biología y fisiología reproductiva, en particular del ciclo tipo de la vitelogénesis secundaria de una población de *P. clarkii* del estado de Nuevo León, así como los cambios temporales de la composición de sexos de su estructura poblacional.

Sobre este último aspecto, cabe mencionar que previamente a este estudio, se han venido realizando diversos esfuerzos encaminados a elucidar diferentes aspectos sobre la biología reproductiva de la población antes mencionada (Abdo de la Parra, 1991; Tobías-Chavana, 1991; González Aguilar, 1995).

1.2.- OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general de este estudio:

Estudiar y describir el ciclo de maduración sexual y en particular el de la vitelogénesis secundaria y otros aspectos implicados en las características fisiológicas y estructurales relativas a la reproducción del acocil rojo *P. clarkii*.

1.2.2. Objetivos particulares de cada capítulo:

- a) Establecer las tallas de madurez sexual
- b) Analizar la fecundidad de hembras de esta especie, comparando el Potencial Reproductivo, Reproducción Realizada y Reproducción Actual,

tanto de especímenes obtenidos en campo y aquellos mantenidos en laboratorio

- c) Determinar los índices gonadosomáticos (IGS) e índices hepatosomáticos (IHS) mensuales y por estadio de madurez ovárica
- d) Describir y caracterizar histoquímicamente los diferentes estadios de madurez de las gónadas
- e) Probar diferentes aproximaciones para llevar a cabo la purificación de la vitelogenina plasmática (VTG) y vitelina ovárica.
- f) Caracterizar dichas moléculas en función de su peso molecular, presencia de grupos prostéticos, y el rol fisiológico en hembras maduras.
- g) Relación de los niveles de VTG y VTL con otros índices reproductivos (GS, IHS) y características histológicas de los ovocitos.

1.3. HIPOTESIS

La fecundidad (Producción de ovocitos y huevecillos) de las hembras estará en función de su talla y estado de desarrollo de la gónada o de los huevos liberados.

Se podrá diferenciar y establecer los diferentes estadios de maduración gonádica de las hembras utilizando técnicas histoquímicas.

Los valores del Índice Gonadosomático e Índice Hepatosomático estarán en función del estado de madurez ovárica y temporada de muestreo.

Mediante la utilización de diferentes técnicas bioquímicas será posible aislar y purificar la VTG y VTL en hembras maduras, a partir de muestras de hemolinfa y extractos de ovario, respectivamente. Y en base a las características estructurales de estas moléculas se podrá determinar su rol fisiológico.

1.4.- ANTECEDENTES GENERALES

1.4.1. DISTRIBUCIÓN DE *Procambarus clarkii*

El acocil rojo *Procambarus clarkii* en los Estados Unidos de América es nativo en los estados de Texas, Alabama, Louisiana, Mississippi, Florida, Arkansas, Tennessee, Missouri, Illinois, Nuevo México, Oklahoma). Sin embargo, hasta el momento ha sido introducido en Arizona, Nevada, California, Oregon, Maryland, Carolina del Norte y del Sur, Virginia, Georgia, Indiana y Ohio. Igualmente, existen poblaciones establecidas en otras regiones del continente americano, como Belice, Costa Rica, República Dominicana, Brasil, Nicaragua, Guatemala, Venezuela, Colombia y Ecuador. Así mismo, se ha introducido en países europeos como España, Francia, Gran Bretaña y Portugal. En Asia se le ha localizado en China, Taiwan, Hawaii y Japón, mientras que en el continente Africano esta especie se introdujo en Kenia, Uganda, Zambia, Zimbawe y Uganda (Huner y Barr, 1984; Hobbs III *et al.*, 1989; Campos y Rodríguez-Almaraz, 1992).

En México, *P. clarkii* se encuentra en todos los estados del norte, pero en algunas regiones de Nuevo León, Chihuahua y Coahuila es considerado como residente natural y se ha introducido en el Centro-Este de Tamaulipas, Sonora, Centro de Nuevo León, Baja California y en la cuenca del río Colorado dentro de la vertiente del Pacífico (Hobbs Jr., 1962; Hobbs Jr., 1976; Hobbs Jr., 1984; Hobbs Jr., 1989; Hobbs III, *et al.*, 1989; Campos y Rodríguez-Almaraz, 1992; Rodríguez-Almaraz y Campos, 1994).

La introducción del acocil rojo *P. clarkii* ha ocasionado un impacto ecológico de magnitudes considerables en los diversos ecosistemas acuáticos donde reside (Hobbs Jr., *et al.*, 1989). Dentro del contexto regional, la especie exótica *P. clarkii* ha originado un gran impacto ecológico, particularmente en el centro del estado de Nuevo León, ya que ha venido desplazando a la especie nativa *Procambarus regiomontanus*, por lo que sus poblaciones se han visto mermadas, hasta el grado en que actualmente la especie nativa está considerada como una especie en peligro de extinción (Rodríguez-Almaraz y Campos, 1994).

1.4.2. ESTADO ACTUAL DE LAS ESPECIES NATIVAS

La mayoría de las especies nativas de México solo son conocidas en su localidad tipo y áreas circunvecinas, y desde su hallazgo y descripción, han sido pocos los estudios de tipo bioecológico realizados con esta fauna, (e.g. Campos-González, 1982; Rodríguez-Almaraz y Campos, 1994; Rojas, 1999, Rodríguez-Virgen, 1999). Ante este desconocimiento parcial, se corre el riesgo que algunas especies lleguen a desaparecer y no se pueda obtener información bioecológica de estas. Ejemplo de lo anterior, son los siguientes casos, *Cambarellus areolatus*, especie endémica de Coahuila, que desde su descripción no ha sido observada o recolectada en su localidad tipo (Contreras-Balderas, *comunicación personal*). Al menos en el noreste de México, una especie esta en peligro (*P. regiomontanus*), que es una consecuencia de la alteración y modificación de su hábitat; y probablemente por la introducción y migración de *P. clarkii* en el centro de Nuevo León. *Cambarellus alvarezii* fue considerada una especie amenazada (Rodríguez-Almaraz y Campos, 1994), sin embargo, mas tarde se declaró extinta y solo era conocida para el ejido el Potosí, Galeana, Nuevo León (Contreras-Balderas y Lozano-Vilano, 1996).

En contraste, adicionalmente a la nueva especie de *Procambarus* de Veracruz (Rojas *et al.*, 1999); se han descubierto dos nuevas especies para el noreste de México, cada una perteneciente a *Procambarus* y *Cambarellus* que están siendo descritas (Observaciones personales). Así mismo, Rodríguez-Virgen (1999), menciona que una población de *P. bouvieri* de Uruapan, Michoacán, ha sufrido una notable reducción por la captura hecha por el hombre.

1.4.3. ECOLOGÍA E IMPACTO DE LOS ACOCILS EN LOS ECOSISTEMAS

1.4.3.1. Hábitat

Los acociles, algunas especies de langostinos y cangrejos braquiuros (e.g. pseudotelefúsid) son habitantes bentónicos de ecosistemas de agua dulce, tanto en rios, arroyos, canales de riego, lagos, presas e incluyendo los ambientes

temporales y cuerpos de agua de cavernas (Villalobos-Figueroa, 1955; Huner, 1997).

La mayoría de los acociles son de hábitos nocturnos, y en este momento es cuando deambulan para su reproducción y búsqueda de alimento, mientras que durante el día, se ocultan en sus madrigueras o cualquier refugio disponible (Villalobos-Figueroa, 1955; Huner y Barr 1984).

Algunas especies de acociles, como *P. clarkii*, están adaptadas para vivir en áreas que son alternadamente inundadas y secas, esto permite el crecimiento de vegetación que sirve de alimento y refugio (Huner y Barr, 1984). Además, se pueden localizar entre detritos, piedras, raíces de árboles riparios y madrigueras (Rodríguez-Almaraz y Campos, 1994; Hobbs Jr., 1989; Villalobos-Figueroa, 1955).

1.4.3.2. Madrigueras

Los acociles construyen estructuras simples o complejas denominadas madrigueras, de acuerdo a su uso y función, los cambáridos son clasificados como enmadrigadores primarios, secundarios y terciarios (Hobbs Jr., 1942; Huner y Barr, 1984).

Los enmadrigadores primarios.- Construyen madrigueras muy complejas (Huner y Barr, 1984) y están restringidos a este hábitat (Hobbs Jr., 1942) en donde pasan casi toda su vida dentro de ella y ocasionalmente salen a la superficie para copular, alimentarse o buscar nuevos territorios.

Los enmadrigadores secundarios.- Ocupan generalmente madrigueras que son simples y verticales, pero frecuentemente salen a aguas abiertas cuando las entradas de las madrigueras están inundadas.

Los enmadrigadores terciarios.- Viven exclusivamente en las madrigueras en épocas de sequía o en invierno, ocasionalmente, pero no necesariamente, las ocupan en épocas de reproducción (Huner y Barr, 1984; Hobbs Jr., 1989). Existe un grado de complejidad en la estructura de este tipo de madriguera, dependiendo si el hábitat es temporal o permanente. (Huner y Barr, 1984; Huner, 1990).

El acocil rojo *P. clarkii* (enmadrigador terciario) construye diferentes tipos de

madrigueras (Huner y Barr, 1984), igualmente, se ha observado a especímenes de esta especie *protegiéndose bajo piedras que presentan restos de humedad en el cauce de arroyos o ríos secos, durante los meses más cálidos (Junio-Agosto) en la parte central de Nuevo León (observaciones personales).*

1.4.3.3. Hábitos alimenticios y papel politrófico

El comportamiento alimenticio en el acocil rojo, se manifiesta porque es atraído por el alimento animal o artificial mediante el receptores de distancia (telereceptores), posteriormente, agitan las maxilas y maxilípedos vigorosamente para crear corrientes que conducen el alimento hacia los órganos sensoriales en la región anterior del cuerpo, de esta manera lo reconocen físicamente y puede ser consumido (Huner y Barr, 1984).

Los acociles son considerados politróficos, pero el grueso de su dieta consiste de detritos de plantas, siguiendo en orden de importancia las plantas y animales vivos (Miltner y Avault, Jr. 1981; Davis, 1983; Huner y Barr, 1984; Huner, 1990). El detrito es colonizado por organismos unicelulares descomponedores y epifíticos, el valor nutricional de este material esta dado por esta colonización. Aunque los animales representan la menor contribución a la dieta, éstos proveen compuestos orgánicos esenciales, como colesterol y proteínas (Huner y Barr, 1984). Sin embargo, estudios previos sugieren que el material animal es más importante en la dieta de acociles juveniles que en los adultos (Huner, 1990). A este respecto, Hobbs III (1993), recopiló los estudios sobre las relaciones tróficas de acociles y langostinos de Norteamérica, que incluyen datos de ingestión de material vegetal y detritos, además de los principales macro y microinvertebrados que son ingeridos por estos crustáceos. Así mismo, menciona las diferentes especies de peces, anfibios, reptiles, aves o mamíferos que son depredadoras de los acociles.

Así de manera general los resultados de diversos estudios efectuados por ecólogos y acuacultores arrojan que los acociles son principalmente detritívoros-herbívoros, debido a la presencia a la presencia de material vegetal y los productos de su descomposición en sus estómagos, rechazando prácticamente la

ingestión de material fácilmente digerible como son los metazoarios de cuerpo suave. En contraste con esta premisa, Momot (1995), realizó estudios comparativos, donde analizó el papel de los acociles en los ecosistemas acuáticos, y los resultados demostraron que los acociles no son omnívoros indiscriminantes sino que presentan una predilección por la proteína animal, y que durante la búsqueda de alimento, ellos ingieren grandes cantidades de material herbáceo y detritos, ya que entre este material son localizadas las presas, de hecho, este grupo de animales se encuentra entre los principales carnívoros de ríos y lagos, pero la fuente de proteína animal puede estar limitada por diversos factores, por lo que los acociles tienen la capacidad de ingerir material herbáceo o detritos, convirtiéndose en herbívoros facultativos si la materia animal es ausente o carente.

1.4.3.4. Cambios o modificación del hábitat por la presencia de acociles

Numerosos estudios señalan que la materia vegetal favorece la producción de acociles en áreas naturales y de cultivo. El uso de pastos silvestres y otras plantas terrestres, incluyendo el arroz, son cultivadas o se permite que crezcan dentro de los estanques de cultivo para la formación de detritos (Huner y Barr, 1984; Huner, 1990). En áreas naturales el material vegetal alóctono y las macrofitas contribuyen en la producción y refugio de los acociles. Tanto la disminución de la vegetación natural que sirve de alimento, como la pobre calidad del agua, son dos de los principales problemas en el cultivo de acociles en Louisiana (Miltner y Avault Jr., 1981)

Por otra parte, se ha sugerido que los acociles juegan un papel importante en la estructura de las macrofitas y las comunidades de invertebrados que se refugian entre ellas. (Lodge y Lorman, 1987). En efecto, las comunidades de macrofitas son reducidas o eliminadas durante la actividad forrajera o búsqueda de presas por parte de los acociles (Momot, 1995). Por ejemplo, Lodge *et al.* (1994), mencionan que el acocil *O. rusticus* ejerce un efecto significativo en la reducción de las macrofitas, lo cual trae como consecuencia repercusión en el microhábitat, ya que estas plantas sirven como substrato para el crecimiento de

perifitón y refugio de muchos macroinvertebrados.

A este respecto, se ha reportado que las plantas acuáticas como *Elodea* (*Egeria densa*) y la planta Lagarto (*Althemanthera philoxeroides*) resultan adecuadas para incrementar la superficie del sustrato y son a su vez una fuente de alimento para los acociles (Nelson y Dendy, 1979).

En el mismo sentido, Hill y Lodge (1995), señalan que los acociles afectan directamente a más de un nivel trófico (detritivoro, macroinvertebrados, herbívoros y macrofitas). Sin embargo, la actividad forrajera de los acociles podría controlarse a través de la biomanipulación, como sería en el caso de la introducción de peces depredadores de invertebrados, que contribuyen con este comportamiento alimenticio, en el crecimiento y abundancia de las macrofitas. Igualmente, Charbelois y Lamberti (1996), mencionan que algunos acociles, como *Orconectes rusticus*, afectan directa e indirectamente el bentos de un ambiente lótico, ocasionando un efecto de cascada trófica, ya que tienen un efecto multitrófico en las redes alimenticias de los arroyos, donde esta especie habita.

1.4.3.5. Calidad del agua en ambientes naturales y de cultivo

La alcalinidad, dureza, oxígeno, pH, salinidad y temperatura, se encuentran entre los principales parámetros fisicoquímicos que deben ser considerados durante el manejo de poblaciones naturales y de cultivo de acociles (Huner y Barr, 1984; Huner 1990). Así mismo, ha sido señalado que el incremento en la dureza del agua aumenta el promedio de peso ganado y supervivencia del acocil rojo (*P. clarkii*) (de la Bretonne et al., 1969; de la Bretonne Jr., y Avault Jr., 1971). Por otra parte, la reducción de oxígeno representa un gran problema para el cultivo de acociles de Louisiana, ya que valores menores de 3 ppm causan estrés, reducción en el crecimiento y mortalidad (Avault Jr. et al., 1974; Romaire, 1986; Culley y Duobinis-Gray, 1987).

La resistencia a los cambios en estos parámetros es en función de la especie. Así por ejemplo, el acocil australiano *Cherax destructor* es más tolerante a las bajas de oxígeno que *Cherax tenuimanus*, esta última especie trata de escapar de su hábitat buscando oxígeno atmosférico, como ocurre en otras

especies de acociles (Huner, 1986). Otro caso es el del acocil europeo *Astacus astacus* que puede tolerar concentraciones de oxígeno disuelto de 2 ppm durante el invierno en lagos de Finlandia (Avault Jr., 1976).

En lo que concierne al género *Procambarus*, de acuerdo a Romaine (1986) y Huner (1990), mencionan que los principales parámetros fisicoquímicos y sus respectivos rangos, que deben ser considerados durante el cultivo de los acociles *P. clarkii* y *P. zonangulus*:

Temperatura: 21-25 °C

O₂: >3 ppm

pH: 6.5-8.5.

Dureza (CaCO₃): 50-400 ppm

Alcalinidad 50 - 400 ppm

Salinidad (agua dulce): 10-15 ppm

Toxicidad: amplia a diferentes pesticidas, los insecticidas resultan más tóxicos que los herbicidas y fungicidas.

1.4.4.- BIOLOGIA REPRODUCTIVA

1.4.4.1. Dimorfismo sexual

Los acociles cambáridos tienen un ciclo de vida distintivo que involucra una alternancia morfológica entre formas sexualmente activas e inactivas. La forma activa es nombrada como forma I, pero una vez que los adultos mudan nuevamente se transforman a una forma II, sin embargo, esta forma no puede ser distinguida de la forma inmadura (Huner, 1990). El dimorfismo sexual en los acociles queda de manifiesto en la mayor talla de machos adultos en comparación con las hembras, además sus quelas son más largas y gruesas (Hobbs Jr. y Marchand, 1943; Huner y Barr, 1984; Huner y Lindqvist, 1991). La diferenciación sexual en *Procambarus*, es reconocida en las hembras por la presencia de los gonoporos en los coxopoditos del tercer par de pereiópodos y la existencia de una abertura en forma de herradura entre el 4° y 5° par de apéndices torácicos llamado *annulus ventralis*, en donde el macho deposita el espermatóforo. En el caso de los machos esta diferenciación morfológica se distingue por el desarrollo

de las quelas y la ornamentación y dureza de los pleópodos I (gonópodos) Hobbs Jr. (1989). Los gonoporos se ubican entre el 5º par de pereiópodos y sus primeros pleópodos están modificados para realizar la cópula; en *Procambarus clarkii* se presentan adicionalmente unos procesos a manera de ganchos en el izquierdo del 3º y 4º par de pereiópodos (Hobbs Jr. y Marchand, 1943; Huner y Barr, 1984). En la Fig. 1.1 se presentan dichos caracteres dimórficos de acuerdo a Huner y Barr (1984).

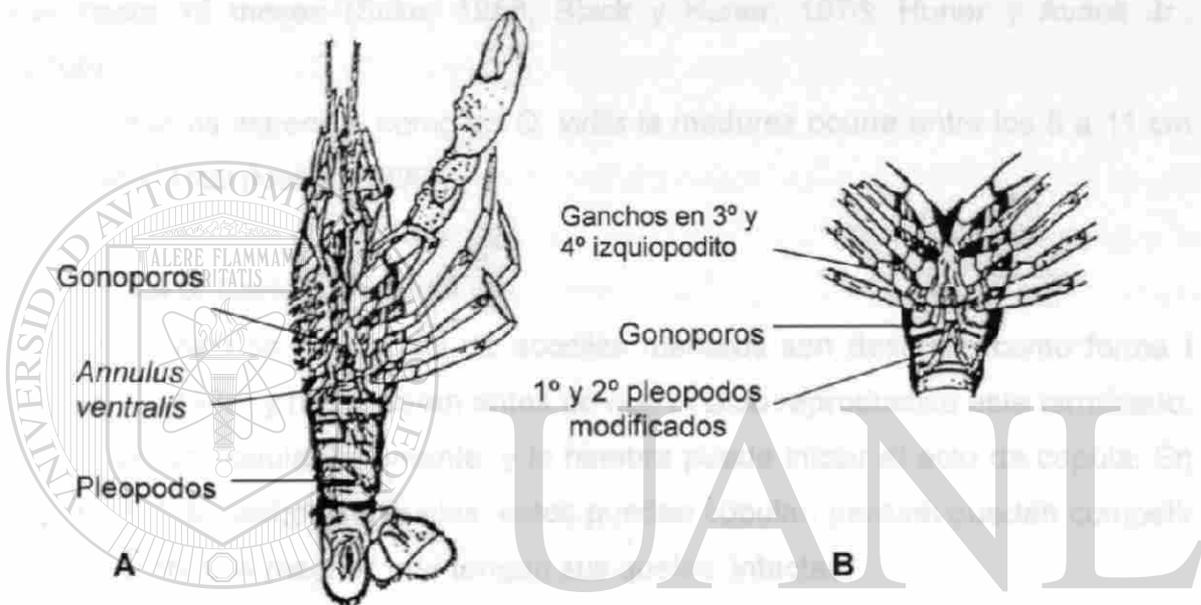


Fig. 1.1.- Dimorfismo sexual de *Procambarus clarkii* en base a caracteres externos, A) Hembra y B) Macho. (Tomado de Huner y Barr, 1984).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4.4.2. Maduración sexual

La talla a la cual llegan a su madurez sexual los acociles depende de la especie (existen variaciones interespecíficas e intraespecíficas), potencial genético de crecimiento y condiciones ambientales (Huner y Romaine, 1978; Momot, 1984; Lutz y Wolters, 1986). Sin embargo, se considera que la densidad de organismos es más importante que el factor genético en la determinación de la talla de madurez (Huner *et al.*, 1994). La talla promedio de madurez en los acociles es una buena indicación del crecimiento potencial de estos en un hábitat específico (Huner, ---). En las especies de *Procambarus* la talla de madurez varía

de 45 a 125 mm de longitud total, en particular, las hembras de *P. clarkii* pueden alcanzar su madurez desde los 50 mm, alcanzando tallas entre los 89 a 108 mm de longitud total (Huner y Barr, 1984; Huner, 1990; Corey, 1987a; Huner y Lindqvist, 1991; Aiken y Waddy, 1992). Estos cambáridos maduran en un amplio rango de talla, por lo que la talla no es un criterio adecuado para identificar a los acociles de forma II (Huner *et al.*, 1994). Esta especie alcanza su madurez sexual normalmente en 6 a 8 semanas, pero puede prolongarse hasta 6 meses y pueden vivir hasta 18 meses (Suko, 1958; Black y Huner, 1976; Huner y Avault Jr., 1976b).

En otras especies, como en *O. virilis* la madurez ocurre entre los 5 a 11 cm de longitud total (Huner, 1990).

1.4.4.3. Cortejo y cópula

Los machos y hembras de acociles maduros son descritos como forma I (Hobbs Jr., 1972) y no mudaran antes de que el ciclo reproductivo este terminado. Estos pueden copular libremente, y la hembra puede iniciar el acto de copula. En el caso de los machos sin quelas, estos pueden copular, pero no pueden competir exitosamente con machos que tengan sus quelas intactas.

Los acociles exhiben un comportamiento copulatorio distintivo (Huner y Barr, 1984; Huner, 1990). Este comportamiento se resume en encuentros de ambos sexos, previo a un reconocimiento químico y visual, que inicia con peleas entre ambos sexos, utilizando sus quelípedos, hasta que el macho sostiene firmemente a las hembras con estos apéndices, postrando a la hembra con su dorso en el substrato. Posteriormente el macho usa sus pléopodos modificados en gonópodos para dar inicio a la cópula, esta puede durar de unos cuantos minutos hasta una hora y media. Finalmente, los machos transfieren con gonopodos erectos un espermátforo en un receptáculo seminal (*annulus ventralis*) de las hembras. El esperma queda almacenado, por un período que se puede extender hasta 8 meses, hasta que ocurre la ovulación, debido a que la fertilización es externa. (Huner y Barr, 1984).

El comportamiento reproductivo en los machos depende de su estado de

desarrollo, en el caso de *Procambarus clarkii* se presentan dos formas de acuerdo a esta característica. Una vez que los machos han alcanzado un desarrollo en el que se observa la presencia de ganchos en los pereiópodos, los gonopodios y quelas alargadas se dice que son forma I (sexualmente activos); posteriormente a la forma I se presenta una muda en la que se observa una apariencia de "juvenil", entonces se dice que han llegado a la forma II (inactivos sexualmente). Normalmente en una siguiente muda estos retornaran a la fase I (estado activo). Es común que los cambáridos alteren las formas activas y de apariencia juvenil (I y II respectivamente) a lo largo de su vida (Huner y Barr, 1984; Huner *et al.*, 1994).

El acocil rojo es una especie que se puede aparear durante todo el año (Lowery y Mendes, 1977; Huner y Barr, 1984; González-Aguilar, 1995); aunque la mayoría de las cópulas ocurren entre finales de Mayo y principios de Junio, siendo estas fertilizadas a finales del verano o principios de otoño (Avault, Jr. 1972; Hobbs Jr. y Marchand, 1943; La Caze, 1976; Huner y Barr, 1984; Huner y Lindqvist, 1991).

1.4.4.4. Desove e Incubación

Es prácticamente desconocido el ciclo reproductivo de la mayoría de las especies mexicanas de acociles, salvo por algunos estudios efectuados. En relación con esto, Campos-González (1982), describió aspectos del ciclo de vida de *P. regiomontanus* y otro hecho por Cruz y Civera (1982), quienes estudiaron el desove e incubación del acocil enano *Cambarellus montezumae*. Otros estudios han sido hechos con la especie ahora residente del norte de México, *P. clarkii*, para la cual se han caracterizado aspectos de la madurez sexual, fecundidad y ciclo vitelogénico (González-Aguilar, 1985; Abdo de la Parra, 1991; Tobias-Chavana, 1991).

Las especies de acociles del norte de los Estados Unidos de América y Canada desovan los huevos en otoño, cuando la temperatura del agua y longitud del día decrece rápidamente, pero estos son desovados principalmente en primavera (Huner, 1990; Huner y Lindqvist, 1991). En cambio, las especies de

latitudes más bajas, como *P. clarkii*, desovan durante todo el año (Huner, 1990), pero los "picos" de desove se registran a finales de verano u otoño (Avault Jr., 1972; Huner y Barr, 1984). Esta especie localizada en el centro de Nuevo León, presentan un patrón reproductivo similar al de las poblaciones de esta misma especie localizadas en áreas naturales y de cultivo de Louisiana (observaciones personales).

Las hembras de cambáridos se refugian en madrigueras o en otras áreas para desovar e incubar los huevecillos (Huner y Barr, 1991). Antes de ovipositar la hembra limpia su abdomen con los pereiópodos y una sustancia gelatinosa "clara" es liberada por glándulas de cemento localizada en el abdomen y urópodos. Estas glándulas se alargan y forman parches amplios de color blanco en el abdomen y urópodos (Huner *et al.*, 1994).

Posteriormente, los huevos salen de los oviductos que se abren en el tercer par de pereiópodos, conforme se van liberando se fertilizan con el esperma almacenado en el receptáculo seminal. Utilizando la "clara" y la propia pared adherente de los huevecillos estos quedan unidos en las setas de los pleópodos de tal manera que quedan protegidos (Cruz y Civera, 1982; Huner y Barr, 1984; Huner y Lindqvist, 1991; Huner *et al.*, 1994).

Una vez liberados los huevecillos permanecen adheridos en los pleópodos de las hembras para su incubación. El tiempo de incubación varía con la especie, la latitud y la estación. Al respecto, Corey (1991) menciona que los huevecillos producidos por hembras de acociles normalmente pueden eclosionar en un periodo de 4 a 6 semanas. Sin embargo, en *P. clarkii*, especie ampliamente estudiada sobre estos aspectos, el periodo de incubación depende de la temperatura y puede ser tan corto como 3 semanas durante el verano o a temperatura de 22 a 24 °C y tan largo como 2 a 6 meses, cuando son desovados entre el otoño o invierno, o si las poblaciones están ubicadas en latitudes norteñas (Avault Jr., 1972; Huner y Barr, 1984; Huner, 1990; Huner *et al.*, 1994). Al respecto, Suko (1954, 1956), menciona que el desarrollo de huevos fertilizados a temperaturas de 22.8 °C es de 17 días, mientras que a 9 °C el desarrollo se alarga hasta 162 días.

Durante la incubación, la hembra mantiene la circulación del agua, gracias a los movimientos de sus pleópodos, para aumentar la oxigenación y evitar el depósito de sedimentos (Auvergne, 1982); no obstante los huevecillos están propensos a infecciones causadas por el hongo *Saprolegnia parasitica*, que puede causar la muerte a estos (Avault Jr., 1972). La maduración y desarrollo de los huevecillos dependen primordialmente de la temperatura, las condiciones de las madrigueras y la ausencia de luz en estas (de la Bretonne y Avault Jr., 1976).

En el interior de los huevecillos ocurre un desarrollo interno pasando por varios estadios de crecimiento (mórula, gástrula, nauplios y embrión tardío), antes de su eclosión (Huner y Barr, 1984). Por lo tanto de la eclosión se obtienen juveniles y no larvas como ocurre en otros crustáceos decápodos, por lo cuál quedan reducidos los requerimientos necesarios para el buen desarrollo de los estadios larvales (Goyert y Avault Jr., 1978). Este tipo de desarrollo se denomina abreviado. Los juveniles permanecen con la madre hasta la segunda muda (Huner y Barr, 1984; Huner, 1990; Corey, 1991).

1.4.4.5. Fecundidad

Los estudios de fecundidad han sido reconocidos como un aspecto ecológico importante en las poblaciones de crustáceos (Corey y Reid, 1991). En los acociles, la producción de huevecillos es uno de los aspectos más significativos para su manejo en las pesquerías y acuacultura, ya que este parámetro es de transcendencia para la conservación del "stock" de las especies nativas (Huner y Lindquist, 1991).

El número de huevos producidos y liberados de los ovarios de las hembras en los cambáridos, es directamente proporcional a su talla. Por ejemplo, una hembra de 57 mm puede producir 100 huevecillos, una de 80 mm produce hasta 300, mientras que una de 98 mm llega a producir alrededor de 500 huevos. En cada puesta el número de huevos es generalmente menor al número de ovocitos producidos en el ovario (Huner y Barr, 1984). Se ha observado en hábitats favorables para *P. clarkii*, que las hembras obtienen una mayor talla y en condiciones desfavorables maduran, pero son más pequeñas y menos "fecundas"

(Huner y Lindqvist, 1991).

Huner y Lindqvist (op. cit.) encontraron una relación directa entre el número de huevecillos y la talla en hembras de *P. clarkii*, a los 70 mm de longitud total producen 325 huevecillos, mientras que a los 100 mm producen 605. Sin embargo, en la literatura se observa una variación importante en los valores de fecundidad. Por ejemplo, Avault Jr. (1972), registra para *P. clarkii* hasta 700 huevecillos por desove, mientras que Somer (1984), encontró un rango de 124 a 956 huevecillos. Por otra parte, Abdo de la Parra (1991), encontró en una población de *Procambarus clarkii* de Nuevo León, hembras grávidas con un rango de 149 a 495 huevecillos, cuya maduración varió de 6 a 32 semanas.

1.4.5. CRECIMIENTO

El crecimiento en los acociles, como en el resto de los crustáceos se produce a través del proceso de muda o ecdísis, el cual implica el desprendimiento del exoesqueleto y la formación de uno nuevo, esto permite que se expandan los tejidos con el consecuente incremento en tamaño y volumen (Huner y Barr, 1984; Aiken y Waddy, 1992). Durante este proceso, los individuos presentan cambios en su fisiología, bioquímica, conducta y anatomía. Los factores que pueden influir sobre el crecimiento desde la fase juvenil, incluyen la especie, densidad, temperatura, fotoperíodo, nutrición, condiciones hidrológicas y stress (Abrahamsson, 1972; Bittner y Kopanda, 1973; Black y Huner, 1976; Goyert y Avault, Jr. 1978; Romaire, et al, 1978; Huner y Barr, 1984; Aiken y Waddy, 1992).

El crecimiento somático obtenido por la muda, se inhibe durante el proceso de reproducción, período durante el cual los organismos se resguardan en sus madrigueras o refugios (Huner, 1976).

Los juveniles recién eclosionados miden 7 mm aproximadamente, se alimentan del vitelo y permanecen unidos a la membrana del huevecillo mediante un filamento membranoso que se pierde después de varios días (Auvergne, 1982); este estadio primario, presenta algunas características como el cefalotórax engrosado y redondeado, el rostro plegado hacia la parte inferior, la cola en forma redondeada u oval y sin urópodos, el cuerpo es transparente y los ojos son

sésiles.

Los juveniles de especies de diferentes latitudes, permanecen con la madre hasta el estadio III, para posteriormente ser independientes (Corey, 1987 b; Momot, 1984; Huner *et al.*, 1994), por lo que es evidente un cuidado materno (Pollock, 1991). Así, si un juvenil o varios se separan de la madre, estos son atraídos por un feromona materna (Huner y Barr, 1984; Huner *et al.*, 1994).

Estas formas recién eclosionadas mudan varios días después para convertirse en juveniles más grandes, los cuales se caracterizan por presentar las mismas proporciones que los adultos; la cola se ensancha, los urópodos se van desarrollando, y el caparazón se endurece. Una vez que la hembra sale de la madriguera, los juveniles se pueden separar de la madre y nadar libremente, además de alimentarse, en esta etapa miden cerca de 8 mm de longitud total (LT) (Huner y Barr, 1984; Huner *et al.*, 1994).

Los juveniles de *P. clarkii* pueden ser encontrados durante todo el año (Penn, 1943; Suko, 1958) y llevan a cabo 11 mudas durante su crecimiento, hasta antes de alcanzar su madurez sexual (Suko, 1953; Black, 1966; Huner y Barr, 1984). Las primeras dos mudas se efectúan cuando aún están adheridos al abdomen de la madre, con un aumento en talla, que puede ser de hasta 6.3 mm por muda. El tiempo entre una muda y otra es de 5 a 6 días para los juveniles (Huner y Barr, 1984). La maduración sexual en los acociles puede darse en un tiempo breve que fluctúa de 8 semanas a casi tres meses, bajo condiciones ideales. Sin embargo, en general toma de 5 a 6 meses en latitudes sureñas y 10-18 meses en latitudes norteñas (Payne, 1978; Huner y Barr, 1984). La reproducción se puede iniciar cuando una generación tiene cuatro meses y medio de vida (Huner y Barr, 1984).

La tasa de crecimiento mensual es mayor en machos que en hembras debido a los periodos de incubación y cuidado de juveniles (Hazlett y Rittschof, 1985). En *Orconectes virilis* el crecimiento se ha relacionado con un aumento en la calidad de alimento, principalmente de larvas de insectos (Momot y Jones, 1977).

Se considera que los acociles son los miembros más grandes y longevos

de los crustáceos dulceacuicolas de Norteamérica (Momot *et al.*, 1978). Muchas especies de acociles de latitudes bajas tienen una longevidad más corta, como las especies del género *Procambarus* que viven dos años o menos, mientras que las especies de cambáridos de latitudes altas y ambientes fríos, usualmente viven de 4 a 16 años, además que su madurez es más tardía (Momot, 1984). En un bioensayo de laboratorio, el crecimiento de *P. clarkii* alcanzó tallas de 74.60 mm, talla mucho menor a la observada en las poblaciones naturales de Nuevo León que alcanzan valores de hasta 108 mm (Rodríguez-Almaraz y Compean-Jimenez, 1991).

1.4.6. IMPORTANCIA DE LOS ACOCILES

1.4.6.1. Producción de acociles en áreas naturales y de cultivo

Anteriormente se discutió la importancia de las plantas y el significado de su posterior descomposición para la producción de acociles en áreas naturales y silvestres.

En años recientes, Momot (1995), presentó datos de la producción de acociles en áreas naturales de diferentes especies, que fluctúan de 17-670 Kg/ha en estanques y lagos; y de 64 a 505 kg/ha en ambientes lóticos. En lagos de Michigan, *Orconectes virilis* dominó la producción bentónica, con valores de 1,000–1,400 kg/ha (Momot *et al.*, 1978).

Los acociles en los E.U.A. son cultivados en aproximadamente 46,000 ha de estanquería produciendo casi 25,000 toneladas métricas, el 90% de la producción se encuentran en Louisiana donde se cultiva principalmente *P. clarkii*, (Huner y Lindqvist, 1991; Lutz y Wolters, 1999). La producción comercial de acociles de Norteamérica, se basa principalmente en dos especies *P. clarkii* y *P. zonangulus*, la primera especie representa entre el 80% (Lutz y Wolters, 1999) y el 85% (Huner, 1997) de dicha producción.

La producción de acociles está determinada por las características de los estanques. Al respecto, Romaine y Lutz (1989) reportan una producción de 536-642 kg/ha, sin embargo, con un buen manejo la cosecha puede alcanzar valores de 800 a 1,000 kg/ha anuales, y en ausencia de depredadores puede haber

rendimientos de 2,200 kg/ha a 2,800 kg/h (Huner, 1978b; Avault Jr, y Huner, 1985). En campos de arroz o en estanques abiertos normalmente se registran cosechas de 1,000 a 1,200 kg/ha (Huner, 1990).

Los acociles pueden ser consumidos y bien aprovechados una vez que hayan alcanzado una talla de 100 mm (Huner y Lindqvist, 1991), no obstante, que solo se aproveche el músculo abdominal (cola) que representa entre el 12 al 15% del peso del animal (Culley *et al.*, 1985). Actualmente, se ha iniciado la comercialización del acocil en una forma denominada "acocil suave" (Soft shell), que ofrece como ventaja el poder consumir hasta un 95 % del peso corporal (Huner y Lindqvist, 1991).

1.4.6.2. Nutrición

En diferentes estudios se ha mencionado la importancia de la vegetación (alóctona y autóctona) como fuente de alimentación para los acociles que son cultivados en Norteamérica. En estos se plantea que la carencia o disminución de este tipo de alimento, detiene el crecimiento de los organismos en tallas subcomerciales (<75 mm de longitud total) y esto ocasiona pérdidas en la producción de acociles (Avault Jr. *et al.*, 1974; Cauge *et al.*, 1982). El detritos vegetal producido en los campos de arroz es considerado el principal nutrimento y es la base de las redes alimenticias de un estanque de cultivo de *P. clarkii*, (Huner, 1990). Se ha establecido que el detritos está directamente relacionado a la proporción de C:N, una alta relación de C:N (17:1) es una medida indicativa del alto valor nutricional del detritos para acociles (Avault *et al.*, 1983).

Sin embargo, Momot (1995) discutió el papel nutricional asignado al detritos vegetal, considera que del 30 al 50% del Nitrógeno encontrado en detritos de diferentes tiempos de descomposición, consiste de compuestos nitrogenados no proteicos, estos son resistentes a la degradación química y no son asimilados por los detritívoros. Los acociles no pueden digerir totalmente estos compuestos por lo que tienen que ingerir grandes cantidades de detritos para obtener un beneficio nutricional. Finalmente concluye que la relación C:N es de ligera utilidad como una medida del valor nutricional. El detritos solo sirve para proporcionar algo de

energía para el mantenimiento, pero es incapaz de sostener el crecimiento. En ambientes lóticos, el detritos puede ser ingerido accidentalmente porque constituye el substrato para complejas comunidades de insectos y metazoarios de cuerpo suave.

En México, no existen estudios dirigidos sobre aspectos alimenticios de las especies nativas, no obstante, hay reportes preliminares con la especie exótica *P. clarkii*, donde se probaron dietas naturales (Muñoz-Ortiz, 1993) y alimentos formulados (Re Araujo, 1985; Cordero-Esquivel, 1988). Uno de los aspectos ecológicos más importantes a estudiar, es el papel y efecto de las actividades alimenticias de las poblaciones de acociles mexicanos en los diferentes ecosistemas que habitan.

1.4.6.3. Especies exóticas

No obstante que la principal razón de la introducción de acociles, en particular de *P. clarkii*, sea de interés económico, existen ejemplos de diversas consecuencias negativas a nivel ecológico a raíz de la introducción de esta y otras especies (Avault Jr., 1976; Hobbs Jr., 1984; Hobbs Jr., 1989). Un ejemplo en nuestra región, es el posible desplazamiento de la especie *P. regiomontanus* nativa de Nuevo León, la cual hasta 1985 era dominante en la cuenca del Río San Juan (Campos y Rodríguez Almaraz, 1992; Rodríguez *et al.*, 1993; Rodríguez Almaraz y Campos, 1994).

En México se han registrado tres especies exóticas de acociles: *Orconectes virilis*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quadricarinatus*. La primera especie ha sido ubicada al norte de Chihuahua (Campos-González y Contreras-Balderas, 1985), y podría compartir el hábitat con *P. clarkii*, que tiene una amplia distribución en el norte de México (Campos y Rodríguez-Almaraz, 1992).

La langosta de uña roja *Cherax quadricarinatus* nativa de Australia, es una especie que ha sido introducida en varios estados de México con la intención de producirla comercialmente (Rodríguez-Almaraz y Mendoza-Alfaro, 1999). Hasta el momento, no es conocido el efecto ecológico por la introducción de esta especie en nuestro país, no solo para los acociles nativos, sino también para otros grupos

de crustáceos decápodos de agua dulce y macroinvertebrados.

La introducción de especies acuáticas de una región geográfica a otra, se justifica por el bienestar económico que ofrecen, tanto en la acuicultura y pesquerías. La posible utilización en México del acocil rojo y de la langosta de uña roja, se basa por el aparente éxito que ha tenido la producción acuícola y demanda de estos crustáceos en diferentes partes del mundo. Además, para ambas especies se han logrado desarrollar las técnicas de producción y manejo, que conllevan a una facilidad relativa de su cultivo, lo cual viene a ser potencializado por el desconocimiento bioecológico y de producción de las especies nativas. En los Estados Unidos de América, los acuicultores han mostrado interés en cultivar la langosta de uña roja, sin embargo, las autoridades han sido muy cuidadosas en no permitir cultivar esta especie en estanquería abierta (Huner, 1997).

1.4.6.4. Mercado y uso actual de las especies nativas y exóticas

El aprovechamiento de las especies nativas es casi totalmente desconocido, salvo el consumo local del acocil enano *Cambarellus montezumae*, que es capturado de manera artesanal en diversos estados del centro del país. Esta especie ha sido consumida desde los antiguos pobladores del valle de México hasta su actual comercialización a baja escala en los mercados populares. (Rodríguez-Almaraz y Mendoza-Alfaro, 1999).

La pesquería de diversas especies mexicanas del género *Procambarus* es considerada artesanal, y no hay datos de los valores de producción (Huner, 1995). Ante esta situación, consideramos importante el estudio de diferentes poblaciones de acociles, particularmente las del género *Procambarus*, ya que alcanzan las tallas más atractivas para su producción y comercialización, de esta manera se podría determinar que especies y cuáles áreas geográficas son susceptibles para una producción armónica de este recurso sin mermar las poblaciones naturales.

CAPITULO 2.- ANALISIS DE LA FECUNDIDAD EN HEMBRAS DE *Procambarus clarkii*

2.1. INTRODUCCION

Los estudios de fecundidad han sido reconocidos como un aspecto ecológico importante en las poblaciones y el conocimiento del ciclo de vida de cualquier especie (Corey y Reid, 1991). El conteo de huevos es usado para describir el potencial de fecundidad en muchas especies acuáticas (Snyder, 1983). En los acociles, la producción de huevecillos es uno de los aspectos más significativos para su manejo en las pesquerías y acuacultura, además, este parámetro es de transcendencia para la conservación del "stock" de las especies nativas (Huner y Lindqvist, 1991). Estos crustáceos son los invertebrados bentónicos más importantes desde el punto de vista energético y son dominantes en muchas regiones templadas de Norteamérica, Europa y Australia (Momot, 1984; Corey, 1991). Esto se debe no solo a que estos ocurren en gran número, sino que se propagan rápidamente (Corey, 1991). Se considera que la alimentación, calidad del agua y refugio de los acociles contribuyen a la mayor producción de huevecillos (Huner y Lindqvist, 1991).

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. Estrategias y factores ambientales que influyen en la producción de huevos en acociles.

Los acociles no tienen un estado larval, probablemente en respuesta a las condiciones de los sistemas lóticos, donde ocurren normalmente, ahí la corriente del agua es unidireccional y constantemente removería las larvas de una población (Cobb y Wang, 1985). Los acociles pueden ser estrategias *r* o *K* de acuerdo al tamaño de huevo que produzcan. Un estrategia *r*, tiene una vida corta, crecen rápidamente y producen un alto número de pequeños huevecillos, de aquí que *P. clarkii* sea considerado un estrategia *r*, ya que sus huevos llegan a medir 2 mm de diámetro. Por otra parte, los estrategias *K*, viven por largo tiempo, crecen

lentamente y producen pocos huevos que son grandes, como en el caso de *Cambarus robustus*, cuyos huevos miden 3 mm de diámetro. Los estrategas *K*, viven en climas fríos y la incubación prolongada permite que los huevos contengan más reservas orgánicas, para asegurar un desarrollo viable de los juveniles durante la incubación (Huner y Lindqvist, 1991).

La luz y la temperatura como en otros organismos, afectan el ciclo ovárico de los acociles, esto permite a los acuacultores manipular el ciclo reproductivo, produciendo juveniles sobre una base predecible. Los acociles expuestos a un fotoperiodo corto y normal maduran rápidamente, en cambio cuando son mantenidos en fotoperiodo constante o días largos estos presentan un reciclamiento continuo, que afecta la maduración sexual (Huner y Lindqvist, 1991).

Existe un efecto de la nutrición sobre la reproducción de acociles, en *Cherax tenuimanus* bajo condiciones de cultivo, la producción de huevos se ve afectada negativamente por una pobre nutrición, los cuales son pequeños y escasos, en cambio cuando hay una disponibilidad importante de detritos las hembras fueron más productivas (Morrissy, 1975). Momot (1984), sugiere que la fecundidad de *O. virilis* es controlada por la disponibilidad de alimento para hembras adultas. France (1983), encontró en esta misma especie, que la relación talla-fecundidad, varía con la producción de los lagos, así, cuando son más productivos es más alta la fecundidad y mayor el crecimiento somático de las hembras. Otro factor que puede influir en la producción de huevecillos, son los pigmentos carotenoides que son depositados en altas concentraciones en los huevos, la deficiencia de estos, afecta la viabilidad de embriones y larvas (Castell y Kean, 1986).

2.2.2. Perdida de huevecillos

Los acociles, así como otros grupos de crustáceos decápodos pierden un gran número de huevecillos y larvas durante la embriogénesis, la eclosión y el desarrollo larval mientras están adheridos a la hembra (Corey, 1987; Corey, 1991; Kuris, 1991). Consiguientemente, en los estudios de fecundidad en crustáceos, es importante observar las diferencias en talla del huevo o cualquier cambio en el

número de huevecillos durante el desarrollo. Si existe alguna diferencia significativa, los estados de desarrollo deben ser considerados separadamente. La alta producción de huevos se considera como una estrategia ecológica-evolutiva, por ejemplo, el excesivo número de huevecillos desovados por algunos camarones alfeidos pudiera actuar como una reserva para compensar la pérdida de huevecillos durante el desarrollo, con el cuál maximizan el número de larvas eclosionadas (Corey y Reid, 1991; Corey, 1991). La pérdida de huevecillos en hembras de acociles durante la oviposición y la incubación puede variar de 0 a 69.8% (Corey, 1991). En *P. clarkii*, de acuerdo a Penn (1943), el porcentaje de pérdida es de 38.3% (Tabla 2.1). Por otra parte Kuris (1991), para esta misma especie registra una pérdida del 28%, y menciona que esta pérdida no tiene una asociación con la talla de la hembra. Estas pérdidas de huevecillos en acociles y en otras especies de crustáceos decápodos, se atribuyen a diferentes factores, por ejemplo, la fuerza de la corriente del agua (Corey, 1991), presencia de huevos infértiles (Corey, 1991; Kuris, 1991), una inadecuada adhesión de los huevecillos (Corey, 1991) y una pérdida durante la oviposición y fracaso en la eclosión (Kuris, 1991). En los acociles contrariamente a algunos camarones peneidos (e.g. *Litopenaeus setiferus*) no es común la retención de huevos atresicos, después de la extrusión de la masa de huevos (Kuris, 1991). En laboratorio se ha observado que las hembras tienen problemas para expulsar los huevos, y a veces estas mueren mientras reabsorben sus ovocitos maduros (Penn, 1943; Mason, 1970).[®] Otras causas pueden deberse a procesos mecánicos, como el desprendimiento de huevos de las setas de los pleópodos, esta podría ser una consecuencia necesaria del desarrollo normal de los huevos, ya que la talla de estos se incrementa sustancialmente durante el desarrollo; además la pérdida se puede atribuir a la abrasión de la masa de huevos en las madrigueras y al manejo de hembras ovígeras (Kuris, 1991; Shields, 1991).

Entre otras pérdidas, se atribuye el crecimiento de juveniles aún sobre el cuerpo de la hembras, causando la separación de los mismos. Igualmente contribuye la talla de la hembra, lo cual al liberar un exceso de huevos, propicia que algunos pueden quedar fuera del área protectora. También se han atribuido

perdidas al parasitismo de *Crepidostomum cornutum* (Corey, 1991). En el caso de que los huevos no sean fertilizados, estos llegan a ser cubiertos por hongos y comidos por las hembras (Corey, 1987; Corey, 1991). Todas las especies de acociles de Norteamérica, incluyendo *P. clarkii*, son resistentes a la plaga del hongo *Aphonomices astaci*, pero son portadoras de la enfermedad (Vey et al., 1983). En algunos decápodos, puede existir un canibalismo materno, como una medida para separar huevos infectados (Aiken et al., 1985).

La extrusión incompleta de huevecillos en algunas especies de acociles, es seguida por la reabsorción de estos, así por ejemplo en *O. propinquus*, el porcentaje de ovocitos reabsorbidos varía de 5 a 75% (Corey, 1991).

La pérdida de huevecillos causada por la velocidad de la corriente de un río, se ha observado en *O. propinquus*, donde se determinó una relación negativa entre el número de huevecillos liberados y la corriente, la fuerza de esta durante las lluvias de primavera, tiene dos efectos: primeramente, el sustrato cambia y causa un incremento en el movimiento de las hembras ovígeras, consecuentemente hay pérdida de huevos. En segundo lugar, la corriente puede ser tan fuerte que evita la copula de primavera, que es importante para una exitosa fertilización y llega a intervenir en la adherencia de huevos (Corey, 1987). Otros factores que afectan la fecundidad en los crustáceos son la temperatura, salinidad, desecación y contaminación por metales pesados (Kuris, 1991; Shields, 1991).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 2.1.- Comparación interespecifica del porcentaje de pérdida entre el número de ovocitos en el ovario y el número de huevecillos abdominales o juveniles del estadio III (Tomado y modificado de Corey, 1991).

Especie	% de pérdida de huevecillos	Autor
<i>Cambarus longulus longulus</i>	Cerca de 50	Smart, 1962
<i>C. robustus</i>	58.9-69.7	Corey, 1991 ^a
<i>Procambarus clarkii</i>	38.3	Corey, 1991 ^a
<i>P. hayi</i>	41.3	Penn, 1943
<i>Orconectes viridis</i>	42	Momot, 1967
<i>O. virilis</i>	0-48.5 ³	Momot y Gowing, 1977
<i>O. rusticus</i>	0-30 ³	Reid y Corey (com. Pers.)
<i>O. rusticus</i>	0-23.1 ³	
	39-41 ³	
<i>O. propinquus</i>	13.8-47.0 ³	Corey, 1987
	44.0-69.8 ³	
<i>O. kentuckiensis</i>	6-15 ¹	Boyd y Page, 1978
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Casi 27 ²	Mason, 1977

¹Rango de pérdida debido a las diferentes tallas de las hembras

²Pérdida de huevecillos abdominales de estadio II en hembras de acuario

³Rango de pérdida observada debido a diferentes años y/o localidades

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.3. Potencial reproductivo y reproducción realizada

De acuerdo a Corey (1991), hay varias formas de estimar la fecundidad en los acociles; potencial reproductivo (número de ovocitos), reproducción realizada (número de huevecillos adheridos al abdomen), producción actual (número de larvas en estadio III) y la eficiencia reproductiva (porcentaje de sobrevivientes que alcanzan el estadio III), estas relaciones varía interespecificamente e intraespecificamente en muchas especies de acociles.

2.2.3.1. Potencial Reproductivo

Dentro de los factores que afectan el potencial reproductivo y la capacidad bioenergética de los acociles se encuentran la densidad de animales, como ocurre en *O. virilis* (Momot y Gowing, 1977), la calidad del agua (oxígeno y temperatura) y alimento (calidad y cantidad) (Momot, 1984). En el caso particular de acociles los australianos se ha determinado que existe una relación directa entre el alimento disponible y el desarrollo ovárico. En ausencia de una adecuada nutrición, las hembras reabsorberán sus huevos (Mills *et al.*, 1994).

De acuerdo a Corey (1991), existe una relación positiva entre el número de ovocitos y la longitud del caparazón en hembras de cinco especies de acociles como en *C. robustus*, y *O. propinquus*, la tasa de incremento de la pendiente resulto más alta en en la segunda especie, debido a que los ovocitos eran más grandes (2.6 mm) en *C. robustus*.

2.2.3.2. Reproducción Realizada

Se han realizado diversos estudios sobre reproducción realizada en acociles, particularmente en las especies *Pacifastacus leniusculus*, *Orconectes limosus*, *O. propinquus* y *Cambarus robustus* (Abrahamsson y Goldman, 1970; Mason, 1977; Smith, 1981; Corey, 1987).

A este respecto, Penn (1943), encontró en *P. clarkii* una relación significativa al asociar el número de huevecillos adheridos a la hembra (reproducción actual) y la talla (longitud del caparazón). Adicionalmente, Huner y Lindqvist (1991), mencionan que en *P. clarkii* hay una relación directa del número de huevos ováricos y la talla, con 5-6 cm de LT se producen de 50 a 100 huevos, mientras que hembras de 11 a 12 cm producen de 500 a 600 huevos.

Además de existir una relación positiva entre el número de huevos y la talla de los acociles, adicionalmente, se ha encontrado una relación significativa entre el volumen del caparazón y el volumen de la masa de huevecillos (Corey, 1987).

Entre otros estudios, Huner y Lindqvist (1991), aportaron los valores del número de ovocitos y de huevecillos llevados por las hembras de distintas especies de acociles, por ejemplo, *P. clarkii*, presentó un rango de 325 a 605 ovocitos y de 100 a 535 huevecillos de acuerdo a la talla (Tabla 2.2).

La diferencia entre el número de ovocitos en el ovario y el número de huevecillos llevados sobre el abdomen ha sido descrita para *P. clarkii* (Penn, 1943), *P. hayi*, *Cambarus longulus longulus*, *Orconectes causeyi*, *O. kentuckiensis*, *O. rusticus* y *O. virilis* (Momot y Gowing, 1977).

Tabla 2.2 - Producción de ovocitos (Potencial reproductivo) y huevecillos (reproducción realizada) en algunas especies de acociles cambáridos (Tomada y modificada de Huner y Lindqvist, 1991).

Especie	# de Ovocitos		Autor	# de Huevecillos		Autor
	7 cm LT	10 cm LT		7 cm LT	10 cm LT	
<i>P. clarkii</i>	325	605	Delong (com. pers.)	100	535	Penn, 1943
<i>P. acutus</i>	280	420	Delong (com. pers.)	-	-	-
<i>P. hayi</i>	285	400	Payne, 1971	170	260	Payne, 1971
<i>O. limosus</i>	250	400	Kossakowski, 1966	110	220	Kossakowski, 1966
<i>O. rusticus</i>	270	460	Prins, 1968	190	320	Prins, 1968
<i>O. virilis</i>	-	-	-	280	480	Weagle y Ozburn, 1972

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.4. Producción actual y eficiencia reproductiva

La producción de acociles se puede definir como el número de juveniles en estadio II o III. Durante el crecimiento de los juveniles realizan dos mudas en el cuerpo de la hembra y el tiempo entre estas mudas depende de la temperatura, durante este período difícilmente sobreviven fuera de la protección de la madre (Huner *et al.*, 1994). La cuantificación de juveniles de acociles que sobreviven hasta su liberación de la madre es prácticamente desconocido en acociles. En *Cherax tenuimanus* el número de juveniles es generalmente menor al número de huevos ováricos (Morrissy, 1974; Mills *et al.*, 1994). Esta situación es normal en

muchos crustáceos, ya que no todos los huevos pueden ser extruidos (Morrisy, 1974). Pero en *Cherax destructor*, la mayoría de huevos contenidos dentro del ovario son liberados, por lo tanto la fecundidad (producción) actual es muy cercana al potencial reproductivo, este primer parámetro es mucho más importante que el potencial reproductivo (Mills *et al.*, 1994).

2.2.5. Métodos para evaluar la fecundidad en crustáceos

En los estudios de fecundidad de crustáceos, se han utilizado diversos modelos de regresión, desde la regresión lineal hasta la curvas asintóticas. Sin embargo, el uso indistinto de estos modelos puede contribuir a una ausencia relativa de comparación de la fecundidad entre crustáceos. Los modelos más utilizados son 1).- regresión simple de mínimos cuadrados 2).- modelo exponencial o regresión de mínimos cuadrados con la transformación logarítmica de la fecundidad 3).- modelo de la transformación de la raíz cuadrada 4).- regresión simple de los mínimos cuadrados de la fecundidad contra volumen de la hembra 5).- modelo alométrico (transformación logarítmica del número de huevos y la talla) y la 6).- regresión asintótica. El modelo alométrico o logarítmico de la fecundidad que es usado comúnmente en biología pesquera, resulta ideal para utilizarse en crustáceos. La fecundidad es una medida volumétrica que tiende a incrementarse exponencialmente con la talla de la hembra. La función potencial o modelo alométrico que se expresa $Y=aX^b$, llega a ser una simple regresión de mínimos cuadrados cuando la fecundidad y la talla son transformados logarítmicamente ($\log Y=\log a+\log Xb$). Este modelo alométrico tiene la característica de simplicidad e interpretabilidad. Además, representa los cambios proporcionales en la fecundidad con respecto a los cambios proporcionales en la talla de la hembra; como se emplean logaritmos, la pendiente es independiente de la escala original de medición. Las ventajas del modelo alométrico son: la transformación logarítmica, ya que así se elimina la correlación entre la variación de la fecundidad y la talla de la hembra. Igualmente, esta transformación permite que la pendiente de la regresión, tenga una escala independiente, permitiendo la comparación entre poblaciones o taxas y este modelo da una pendiente teórica (=3), implicando que

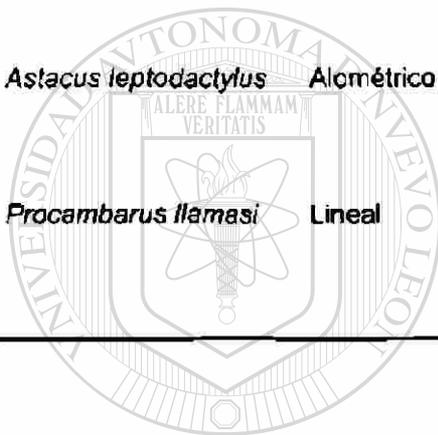
la fecundidad es una simple función volumétrica de la talla de la hembra (Somers, 1991).

El uso de los modelos ya mencionados, se presentan en la Tabla 2.3 con ejemplos de algunos estudios recientes sobre fecundidad en crustáceos decápodos.

Tabla 2.3.- Estudios recientes sobre el análisis de fecundidad en diferentes especies de crustáceos decápodos, que implican la relación talla y número de huevecillos.

Especie	Modelo	Comentario	Autor
<i>Leander tenuicornis</i>	Alométrico	Utilizó hembras que recién desovaron sus huevos para minimizar el error por la pérdida de estos	Bauer, 1991
<i>Latreutes parvulus</i>			
<i>Cancer spp.</i>	Alométrico, con transformación logarítmica	Algunas especies de <i>Cancer</i> no presentan relación entre la talla y fecundidad por varias razones, las hembras grandes pueden producir menos huevos que las más pequeñas que son más reproductivas, las hembras viejas no mudan anualmente y tienen menos esperma almacenado lo que provoca huevos infértiles	Shields, 1991
<i>Philocheles trispinosus</i>	Regresión lineal	Isometría del número de huevos en función de la talla	Oh y Hartnoll, 1999
<i>Lithodes aequispina</i>	Alométrico	Encontraron una linealidad entre la talla y fecundidad	Jewett et al., 1985
<i>Palaemon xiphias</i>	Alométrico	Usaron hembras con huevos de primer estadio, por la pérdida de huevecillos durante la incubación	Guerao et al. 1994
<i>Chionoecetes bairdi</i>	Alométrico	Analizaron fecundidad en huevos de primer estadio por la pérdida de estos	Sornerton y Meyers, 1983
<i>Ranina ranina</i>	Alométrico	De acuerdo al análisis la fecundidad oscila de 78,000 a 256,000 huevos	Kennelly y Watkins, 1994
<i>Platyxanthus patagonicus</i>	Alométrico	Consiste en el número de huevos de acuerdo a la talla	Carsen et al., 1996

<i>Cangrejos Grapsidos</i>	Alométrico	Hay relación significativa entre el número huevos y talla, la fecundidad es de casi 200,000 huevos	Tsuchida y Watanabe, 1997
<i>Camarones carideos</i>	Alométrico	Encontraron una relación significativa de la fecundidad con varios parametros morfológicos	Anger y Moreira, 1998
<i>Metapenaeus joyneri</i>	Alométrico	El peso del ovario maduro se incrementó en razón de la longitud del caparazón	Chu, 1995
<i>Calcinus tibicen</i>	Alométrico	El número de huevos esta influenciado por la especie de concha ocupada	Medina-Mantelatto y Biagi-García, 1999
<i>Astacus leptodactylus</i>	Alométrico	Determinan que no hay relación del tamaño del huevo y la talla de la hembra	Harioglu y Turkgulu, 2000
<i>Procambarus flamasii</i>	Lineal	El número de huevos producidos por la hembra depende de su talla, alcanzado valores de 700 huevos	Rodríguez-Serna <i>et al.</i> , 2000

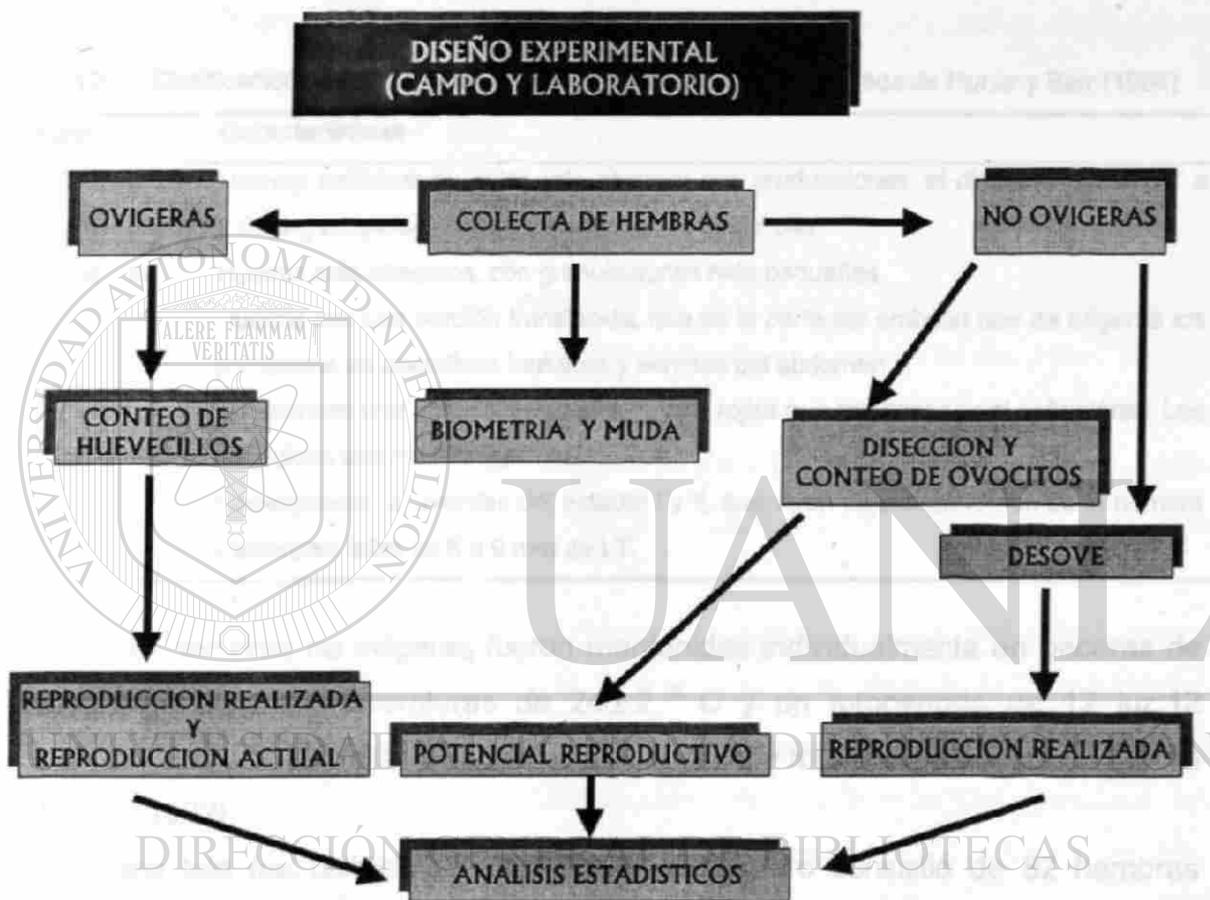


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.3.- METODOLOGIA

2.3.1. Diseño Experimental



2.3.2. Recolección y acondicionamiento de las hembras en laboratorio

Las hembras ovigeras y no ovigeras de *P. clarkii* fueron recolectadas mensualmente en una porción del lecho del Río San Juan, Congregación La Boca (25°27'11"; 100°05'12"), Santiago, Nuevo León. Los muestreos fueron nocturnos de acuerdo a las técnicas recomendadas por Rodríguez-Almaraz y Campos (1994). Estas hembras pertenecen a lotes distintos de los especímenes utilizados para el estudio de histología, Indices Gonadosomáticos y Vitelogénesis que se presentan en

los siguientes capítulos. Todas las hembras fueron llevadas vivas en recipientes de plástico al laboratorio, en el caso particular de las hembras ovígeras (40 ejemplares), inmediatamente se procedió a separar, clasificar y contar los huevecillos que llevan bajo el abdomen. La clasificación de los huevos se realizó básicamente de acuerdo al criterio de Huner y Barr (1984), quienes establecen 5 estadios, además de algunas observaciones personales (Tabla 2.4).

Tabla 2.4.- Clasificación de los huevecillos de *P. clarkii* tomada y modificada de Huner y Barr (1984)

Estadio	Características
I.- Blástula	Huevos esféricos de color café oscuro con graduaciones, el diámetro es de 1.7 a 2.0 mm, a través de todos los estados de desarrollo.
II.- Gástrula	Huevos más oscuros, con granulaciones más pequeñas.
III.- Nauplio	Huevos con una porción translúcida, que es la parte del embrión que da origen a los primordios de apéndices torácicos y somitas del abdomen.
IV.- Embrión tardío	Huevos con una porción translúcida y café rojiza que corresponde al cefalotórax. Los apéndices son más conspicuos.
V.- Juvenil	Corresponden a juveniles del estadio I y II, que viven bajo el abdomen de la hembra y alcanzan tallas de 5 a 9 mm de LT.

Las hembras no ovígeras fueron mantenidas individualmente en peceras de vidrio, expuestas a temperaturas de 24 ± 2 ° C y un fotoperíodo de 12 luz:12 oscuridad. En cada ejemplar se determinó el estado de muda por setogénesis (Aiken y Waddy, 1992).

Este lote fue dividido en dos partes, el primero consistió de 82 hembras colectadas en distintos muestreos, las cuales después de 3-5 días, fueron disecadas para separar, clasificar y pesar el ovario. Una porción del tejido ovárico fue pesado nuevamente y se contó el número de ovocitos contenidos en la muestra, con el fin de estimar el número de ovocitos totales contenidos en cada ovario de cada ejemplar. La clasificación de los ovarios se llevó a cabo de acuerdo a de la Bretonne y Avault, Jr. (1976). Las características de cada estadio se presenta con detalle en el capítulo 3.

El segundo lote de hembras fue mantenido de forma aislada y en oscuridad total por un tiempo indefinido, con el propósito de inducir el desove en laboratorio. En

el caso que el desove fuera exitoso, los huevos (estadio I) fueron separados inmediatamente y contados para su posterior análisis con los datos de peso o talla de las hembras.

2.3.3. Datos biométricos de las hembras

Para cada hembra recolectada fueron registrados los siguientes valores morfométricos: Longitud Total (LT en mm), Longitud del cefalotórax (LC en mm) y Peso Total (PT en g). Estos datos fueron relacionados con el número de ovocitos, número de huevos o número de juveniles mediante análisis estadísticos, que en la sección siguiente serán explicados.

2.4.4. Métodos para describir la fecundidad

Para el análisis de la fecundidad de las hembras de *Procambarus clarkii*, se dividió este parámetro biológico en tres fases de acuerdo al criterio de Smart (1962), Abrahamsson (1971), Corey (1987) y Corey (1991): a).- Potencial Reproductivo (número de ovocitos por ovario) b).- Reproducción realizada (número de huevecillos llevados bajo el abdomen) y c).- Reproducción actual (número de juveniles llevados por la hembra).

Para cada fase fue utilizado el modelo de regresión potencial, relacionando los datos de fecundidad y biométricos de cada hembra. Este análisis estadístico permite asociar ambas variables y determina el tipo de crecimiento alométrico de la fecundidad en función de la talla. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en estudios biológicos de crustáceos (Teisser, 1960; Hartnoll, 1982; Aiken y Waddy, 1992). El término alométrico se refiere a que una variable (en este caso la fecundidad) se incrementa más o menos rápido con respecto a otra variable de referencia (talla o peso). Los valores del coeficiente de regresión (b), indican el tipo de crecimiento. La isometría corresponde a valores de $b = 1$ o 3 , si corresponden a una relación con la talla o peso, respectivamente. La alometría negativa o positiva se presenta cuando $b < 1$ o 3 o $b > 1$ o 3 , respectivamente. El primer paso fue determinar la significancia de la regresión, probando las siguientes hipótesis mediante un ANOVA y una prueba de F

$$H_0: \beta = 0$$

$$H_a: \beta \neq 0$$

La decisión estadística fue si F calculada es mayor que la F tabulada $[0.05 (1), v_1, v_2]$, donde v_1 y v_2 , son los grados de libertad (GL) de la regresión (=1) y residual ($n-2$)], se rechaza H_0 .

Para determinar el tipo de crecimiento en cada regresión, se utilizó una prueba de "t" de student para probar las siguientes hipótesis:

$$H_0: \beta = 1 \text{ (o 3) Isometría}$$

$$H_a: \beta \neq 1 \text{ (o 3) Alometría negativa o positiva}$$

Para calcular la "t" se utilizó la siguiente ecuación:

$$t = \frac{\text{(Parámetro estimado)} - \text{(Valor hipotético de } b)}{\text{Error típico del parámetro estimado}}$$

Donde: si t calculada es mayor que t tabulada $0.05(2), n-2$, se rechaza H_0 , debido a que se determinaron diferentes estadios para el Potencial reproductivo, Reproducción realizada y Reproducción actual, los análisis de regresión se llevaron a cabo de manera independiente y más aún, considerando dos variables de referencia (LC y PT). Esto permitió la obtención de diferentes ecuaciones de regresión, para lo cual, se utilizaron pruebas de comparación múltiple de pendientes y comparación de dos pendientes de acuerdo a Zar (1996). En el caso de que las pendientes resultaron iguales se comparó la elevación de las pendientes. Adicionalmente, para cada regresión se obtuvieron las estadísticas descriptivas (Promedio, mínimo, máximo y desviación estándar).

Por otra parte, se determinó el porcentaje promedio de pérdida de ovocitos de un estadio a otro, y el porcentaje de pérdida de ovocitos del cuarto estadio a huevos recién desovados (estadio I). Esto fue hecho con la finalidad de conocer la dinámica de producción y pérdida de huevos, así como el número de huevos que llegaban a lograrse como juveniles. Se elaboró una base de datos en EXCEL 97 (Microsoft®) y SPSS (versión 8 para Windows®), que incluye los valores de cada una de las variables para poder realizar los análisis estadísticos anteriormente mencionados.

2.4.- RESULTADOS

2.4.1. Datos del estado de la muda, talla (LC) y peso (PT) de las hembras

De las hembras recolectadas ($n= 155$) el 90% estuvieron en el estado C (intermuda) y el resto en estado D (premuda). La LC y LT promedio fue de 40.18 (± 3.56) y 84.38 mm (± 7.01), respectivamente. El PT promedio fue de 15.77 g (± 4.56), y los valores mínimo y máximo fueron de 6.80 y 35.90 g, respectivamente. Los datos de LC, LT y PT fueron agrupados por estadio gonadal o desarrollo embrionario de los huevecillos (nueve grupos), con la finalidad de determinar diferencias significativas de estos parámetros morfométricos (Tabla 2.5). En el caso de la LC el ANOVA indicó de diferencias significativas de este parámetro por grupo ($F=2.313$, $P<0.05$) y la prueba de Duncan determinó que las hembras de estadio gonadal IV, con un promedio de LC 42.22 mm, eran significativamente diferentes a los seis grupos de hembras restantes. Igualmente, se encontró una diferencia entre los valores promedio de LT entre los diferentes grupos ($F= 2.928$, $P<0.05$). El ANOVA para los datos de PT no mostró diferencias significativas ($F=1.804$, $P>0.05$), entre los grupos de hembras.

Al asociar PT, LT y LC mediante un análisis de regresión potencial para determinar el tipo de crecimiento alométrico de estas variables, se determinó que el crecimiento de PT en función de LC y LT era isométrico ($t=1.645$, $P>0.05$ para LC) ($t=0.2032$, $P>0.05$ para LT). En el caso de LC en función de LT se obtuvo un crecimiento alométrico positivo ($t=3.000$, $P<0.05$). En los tres análisis de regresión los coeficientes de regresión (b) fueron significativos (Prueba F , $P<0.05$). En la gráfica 2.1 se presentan las ecuaciones y los valores del coeficiente de determinación (r^2) para cada análisis. Se encontró, en la relación LC vs. LT, el mayor valor de r^2 (0.965).

Tabla 2.5.- Valores promedio, mínimo y máximo de LC, PT y LT de las hembras utilizadas para el análisis de fecundidad

Estadio*	LC			PT			LT			N
	Prom	Min	Max	Prom	Min	Max	Prom	Min	Max	
II	39.85	37.00	44.00	13.64	11.10	20.00	84.19	79	92	21
III	40.77	36.00	49.00	15.47	11.40	25.60	86.72	78	104	18
IV	42.22	34.00	49.00	17.10	9.20	27.30	88.48	74	102	31
Blástula	38.58	33.00	43.00	15.48	7.60	21.30	80.67	68	92	12
Gástrula	39.60	36.00	42.00	15.26	10.70	20.70	82.70	76	90	10
Nauplio	38.57	36.00	41.00	14.10	10.30	19.30	81.14	78	89	7
Embrión	38.77	35.00	45.00	14.16	10.30	20.10	81.22	74	92	9
Juveniles	39.28	31.00	45.00	15.10	6.80	23.90	82.57	67	94	14
Blástula*	40.00	31.00	49.00	17.37	7.00	35.90	83.55	67	100	33

*Incluye los estadios de la gónada y el estado de desarrollo de los huevecillos

*Huevecillos recién desovados (blástula) en laboratorio

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

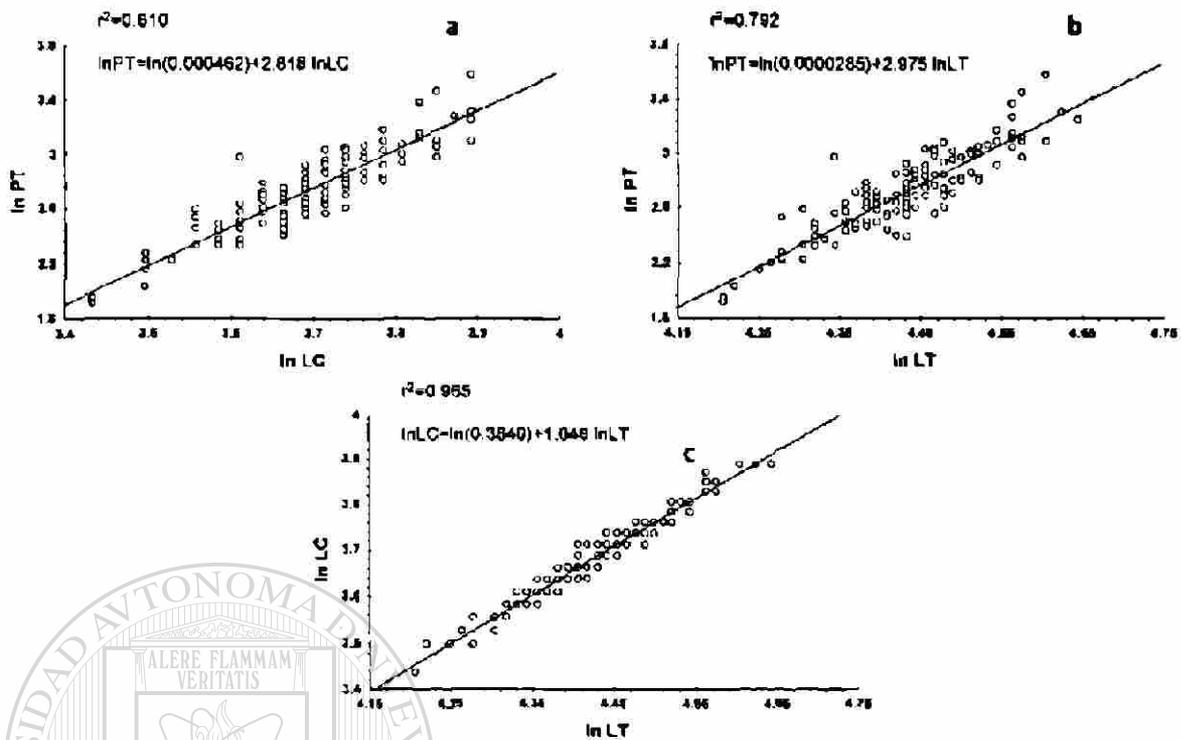


Figura 2.1.- Relación morfométrica de las hembras utilizando LC, LT y PT

2.4.2. POTENCIAL REPRODUCTIVO

2.4.2.1. Valores del número de ovocitos por estadio gonadal

El número promedio y los rangos de ovocitos producidos por estadio gonadal de las hembras recolectadas en campo son presentados en la Tabla 2.6. Para su análisis solamente se consideraron los estadios II, III y IV del ovario. El estadio I no fue incluido ya que los ovocitos fueron inconspicuos, y debido al pequeño tamaño de la gónada, por lo cuál resultaba difícil de manipular y contabilizar los ovocitos. El número promedio de ovocitos fue mayor en el estadio II con un valor de 621.66 (\pm 127.09), sin embargo, el valor máximo se observó en estadio IV con 1,038 ovocitos. El ANOVA mostró que los valores promedio de los ovocitos por estadio no eran significativamente diferentes ($F=0.3419$, $P>0.05$) entre los tres estadios.

Tabla 2.6.- Valores mínimos, máximos y promedio del número de ovocitos por estadio gonadal de las hembras de *Procambarus clarkii*

Estadio	n	\bar{X}	Mínimo	Máximo	CV
II	21	621.66 (± 127.09)	440	838	20.44
III	18	579.44 (± 151.07)	371	1,024	26.07
IV	31	604.67 (± 181.90)	375	1,038	30.08

2.4.2.2. Análisis estadísticos del número de ovocitos en función a las variables morfométricas

Los datos de número de ovocitos (NO) por estadio fueron analizados en función de LC y PT usando la regresión potencial ($Y = aX^b$), las ecuaciones y los valores del coeficiente de determinación se presentan en la Tabla 2.7 y en las Figuras 2.2 y 2.3. En el caso de cada regresión los coeficientes de regresión (b) fueron estadísticamente significativos de acuerdo al ANOVA y la prueba de F (Tabla 2.7). Las ecuaciones de regresión permitieron calcular el número de ovocitos por estadio en función de LC o PT. Los valores de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2) fueron mayores en el estadio III tanto para la relación NO vs. LC, como para NO vs. PT. Utilizando los valores de b se estimó el tipo de crecimiento alométrico que presentaba el NO en función de LC y PT. En el estadio II el crecimiento fue alométrico positivo y negativo en función de LC y PT, respectivamente. En el estadio III se presenta una alometría positiva y en el estadio IV, un crecimiento alométrico negativo para ambas variables morfométricas (Tabla 2.8).

Tabla 2.7.- Parámetros de la regresión potencial del número de ovocitos (NO) por estadio en función de LC y PT

Edio.	n	r	r^2	Ecuación	Intercepto	b	Significancia
II	21	0.8230	0.6774	$NO = 0.0093LC^{3.006}$	-4.6743	3.0095	F=39.9032 P<0.05
II	21	0.5991	0.3589	$NO = 71.639PT^{0.8225}$	4.2716	0.8225	F=10.6397 P<0.05

III	18	0.9010	0.8182	NO=0.0072LC ^{3.0373}	-4.9216	3.0373	F=69.022
							P<0.05
III	18	0.9159	0.8389	NO=29.5229PT ^{1.0845}	3.3851	1.0845	F=83.33
							P<0.05
IV	31	0.8471	0.7176	NO=0.0358LC ^{2.5927}	-3.3294	2.5927	F=73.71
							P<0.05
IV	31	0.8524	0.7266	NO=42.7866PT ^{0.9290}	3.7562	0.9290	F=77.08
							P<0.05

Tabla 2.8.- Tipo de crecimiento relativo de NO en función de LC y PT por estadio gonadal

Estadio	Relación	B	t*	P	Tipo de crecimiento
II*	NO vs. LC	3.0095	4.2179	<0.001	Alometría +
II**	NO vs. PT	0.8225	-8.6350	<0.001	Alometría -
III*	NO vs. LC	3.0373	5.5628	<0.001	Alometría+
III**	NO vs. PT	1.0845	-16.122	<0.001	Alometría +
IV*	NO vs. LC	2.5927	5.2742	<0.001	Alometría -
IV**	NO vs. PT	0.9290	-19.572	<0.001	Alometría -

Para probar $H_0: b=1^* \text{ o } b=3^{**}$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

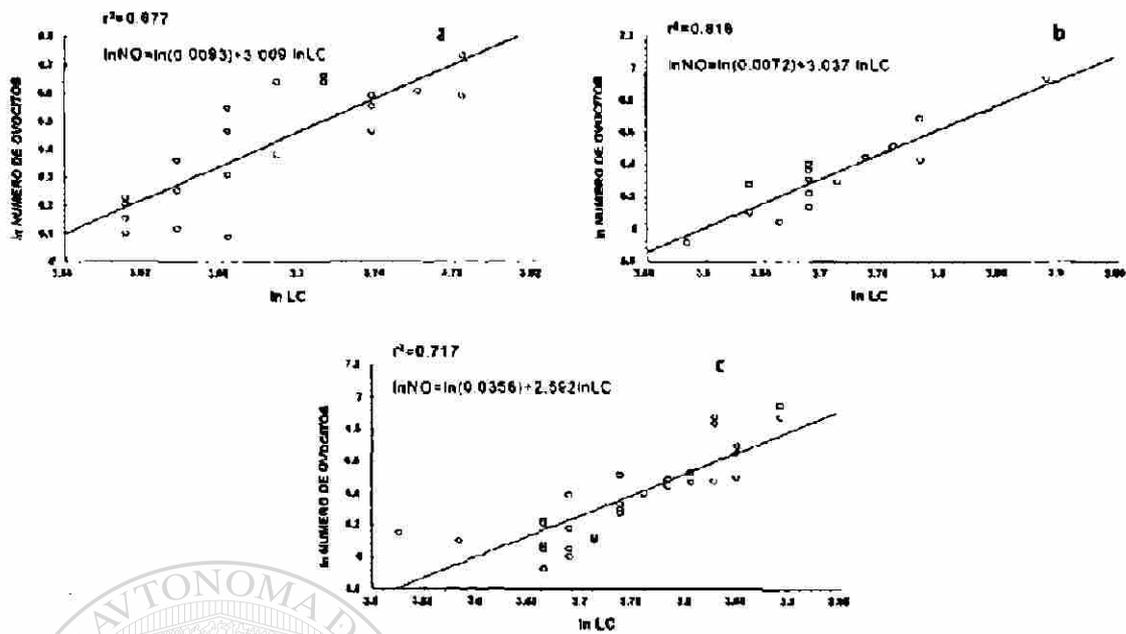


Figura 2.2.- Relación del número de ovocitos (NO) en función de LG. a) Estadio II, b) Estadio III, c) Estadio IV

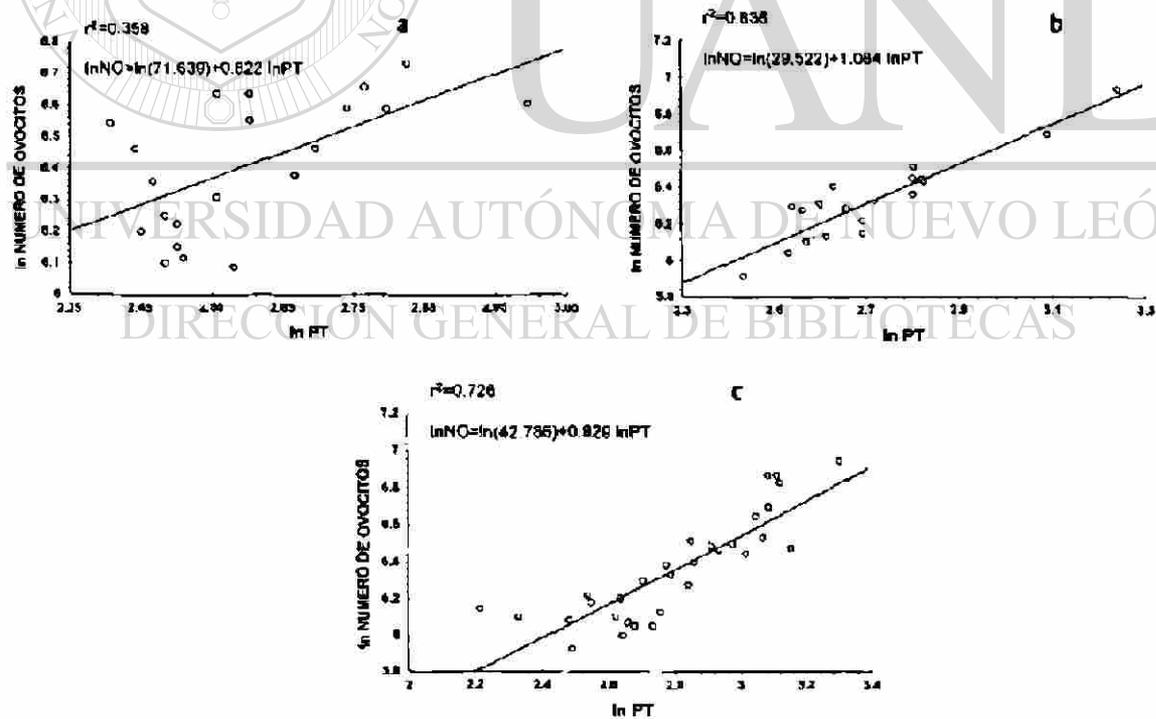


Figura 2.3.- Relación del número de ovocitos (NO) en función de PT. a) Estadio II, b) Estadio III, c) Estadio IV

Utilizando el método de comparación de pendientes (Zar, 1996), para determinar la existencia de diferencias entre los coeficientes de regresión (b), de los tres estadios en las dos relaciones (NO vs. LC y NO vs. PT), se encontró que estos coeficientes para cada estadio no presentaban diferencias significativas (Para PT; $F=0.4962$, $P>0.05$) (Para LC; $F=0.4036$, $P>0.05$) (Tabla 2.9 y 2.10). Como los coeficientes de regresión (b) obtenidos de NO vs. LC o PT fueron iguales, se comparó la elevación de las pendientes mediante una Prueba de F (Zar,1996). En ambos casos se observó que las pendientes de los tres estadios tenían diferentes elevaciones (Para LC $F=11.4637$, $P<0.05$)(Para PT $F=16.9305$, $P<0.05$).

Tabla 2.9.- Prueba de comparación de las pendientes obtenidas en la relación NO vs. PT de los tres estadios gonadales.

Estadio	Σx^2	Σxy	Σy^2	n	B	S.C. Residual	G.L. Residual
II	0.4679	0.3837	0.8756	21	0.8200	0.56099	19
III	0.6865	0.7440	0.9569	18	1.0836	0.1506	16
IV	2.0137	1.8698	2.3826	31	0.9285	0.6461	29
Regresión							
Mancomunada						1.3577	64
Regresión	3.1682	2.9976	4.2149		0.9461	1.3788	66
Común							
Regresión	3.6945	2.8872	4.3425	70		2.0862	68
Total							

F calculada=0.4962; $F_{0.05}(1)2,64=3.15$ Ho: $B_1=B_2=B_3$

Tabla 2.10.- Prueba de comparación de las pendientes obtenidas en la relación NO vs. LC de los tres estadios gonadales.

Estadio	Σx^2	Σxy	Σy^2	n	b	S.C.	G.L.
						Residual	Residual
II	0.0872	0.2881	0.9569	18	2.9606	0.1925	16
III	0.0672	0.1982	0.8756	21	2.9494	0.2910	19
IV	0.2582	0.66232	2.3823	31	2.5651	0.6833	209
Regresión							
mancomunada						1.1670	64
Regresión	0.4126	1.1187	4.2149		2.7111	1.1817	66
Común							
Regresión	0.4385	1.0982	4.3425	70		1.5922	68
Total							

F calculada=0.4036; $F_{0.05}(1)2,64=3.15$ $H_0: B_1=B_2=B_3$

2.4.2.3.- Valores estimados del número de ovocitos por talla (LC) y peso (PT)

Considerando que todas las ecuaciones de regresión fueron significativas, se calculó el NO por estadio en diferentes clases de talla y peso (Tabla 2.11 y 2.12). Los resultados mostraron un aumento del número de ovocitos a medida que se incrementaba la talla o peso por estadio. La selección de estas clases de talla y peso, se basó en su pertenencia dentro del rango que presentó el material recolectado en campo. Los valores mínimos y máximos del NO estimados en función de LC fueron 223.37 y 1605.29, respectivamente. Considerando el PT de las hembras se estimaron 358.61 y 1395.91 ovocitos como valores mínimos y máximos, respectivamente.

Tabla 2.11.- Valores estimados de NO utilizando las regresiones obtenidas en cada estadio, en función de LC.

E	Ecuación	LC (mm)					
		30	35	40	45	50	55
II	$\ln NO = \ln(0.0093) + 3.009 \ln LC$	259.09	411.71	615.72	886.47	1204.20	1605.29
III	$\ln NO = \ln(0.0072) + 3.037 \ln LC$	223.37	356.75	535.19	765.38	1054.04	1391.13
IV	$\ln NO = \ln(0.0358) + 2.592 \ln LC$	241.98	360.88	510.17	692.37	909.87	1164.84

Tabla 2.12.- Valores estimados de NO utilizando las regresiones obtenidas en cada estadio, en función de PT.

E	Ecuación	PT (g)					
		10	15	20	25	30	35
II	$\ln NO = \ln(71.639) + 0.822 \ln PT$	476.02	664.45	841.83	1011.43	1175.07	1333.91
III	$\ln NO = \ln(29.522) + 1.084 \ln PT$	358.61	556.67	760.49	968.71	1180.50	1395.31
IV	$\ln NO = \ln(42.786) + 0.929 \ln PT$	363.32	529.52	691.75	851.10	1008.19	1163.41

Los valores estimados de NO presentados anteriormente fueron utilizados para determinar la diferencia porcentual de pérdida de ovocitos (DPP) entre dos estadios por cada clase de talla (LC) (Tabla 2.13). El valor promedio total de DPP fue 13.27, entre el estadio II y III. Los valores de DPP entre los estadios II y IV presentaron incrementos significativos a medida que aumentaba la talla de la hembra. Entre el estadio III y IV los valores de DPP no tuvieron relación con la talla, incluso los valores estimados de NO para las tallas de 30 y 35 mm, fueron mayores en el estadio IV.

Tabla 2.13.- Comparación de la diferencia porcentual de pérdida (DPP) del NO estimados por estadio gonadal en función de diferentes clases de talla (LC) de las hembras.

Talla (mm)	Relación Estadio II-III		Relación Estadio II-IV		Relación Estadio III-IV	
	Relación	DPP	Relación	DPP	Relación	DPP
30	259.09-223.37	13.78	259.09-241.98	6.60	223.37-241.98	7.69
35	411.71-356.75	13.34	411.71-360.88	12.34	356.75-360.88	1.14
40	615.72-535.19	13.07	615.72-510.17	17.14	535.19-510.17	4.67
45	886.47-765.38	13.65	886.47-692.37	21.89	765.38-692.37	9.53
50	1204.2-1054.04	12.46	1204.2-909.87	24.44	1054.04-909.87	13.67
55	1605.2-1391.13	13.34	1605.2-1164.84	27.43	1391.1-1164.84	16.26
	Promedio	13.27	Promedio	18.30	Promedio	16.26

2.4.3. - REPRODUCCIÓN REALIZADA Y REPRODUCCIÓN ACTUAL

2.4.3.1.- Valores del número de huevecillos llevados por las hembras por fase de desarrollo embrionario, incluyendo a los juveniles.

Las hembras ovígeras recolectadas en campo fueron separadas de acuerdo al desarrollo embrionario de los huevecillos, que incluyó cinco estados. El rango de producción de huevecillos por las hembras recolectadas en campo fue de 106 a 495, sin considerar el estado embrionario. El valor promedio por fase embrionaria fue mayor en blástula (307.75), y estos valores fueron decreciendo conforme pasaban los huevecillos de un estado a otro hasta la fase juvenil (Tabla 2.14).

Por otra parte, las hembras que desovaron en laboratorio presentaron producciones de 138 a 719 huevecillos en blástula, con un promedio de 318.78 (\pm 140.145). De acuerdo al ANOVA y la prueba de Duncan, los valores promedio fueron significativamente diferentes entre los estados de blástula y juveniles; y el valor promedio de huevecillos desovados en laboratorio fue significativamente diferente a los valores de huevos en estado de embrión y juveniles ($F=3.63$; $P<0.05$).

Tabla 2.14.- Valores mínimos, máximos y promedio del número de huevecillos por fase de desarrollo embrionario llevados por hembras de *Procambarus clarkii*

Fase de Desarrollo	n	Promedio	Mínimo	Máximo	CV
Blástula	12	307.75 (\pm 84.13)	180	473	27.33
Gástrula	10	266.90 (\pm 45.34)	224	361	16.98
Nauplio	7	250.71 (\pm 119.22)	144	495	47.55
Embrión	8	213.00 (\pm 48.76)	138	281	22.89
Juveniles	14	194.07 (\pm 64.57)	106	360	33.27
Blástula*	33	318.78 (\pm 140.45)	138	719	44.05

*Huevecillos obtenidos en laboratorio

2.4.3.2.- Análisis estadístico del número de huevecillos en función de las variables morfológicas.

Este análisis permitió establecer la relación del número de huevecillos y juveniles en diferentes fases de desarrollo embrionario, incluyendo a juveniles, que son llevados en el abdomen de las hembras con respecto a LC y PT. Para este análisis se utilizó el mismo procedimiento aplicado para determinar el **Potencial Reproductivo**. Estas relaciones fueron solamente significativas (ANOVA y prueba de F, $P < 0.05$) en la fase de blástula, juveniles y huevecillos desovados en laboratorio (blástula) (Tabla 2.15). Los valores de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r^2) fueron más altos en la fase de blástula tanto de hembras recolectadas en campo y como en aquellas que desovaron en laboratorio y la más baja correlación se presentó en gástrula, nauplio y embrión (Tabla 2.15; figs. 2.4 y 2.5). Utilizando los valores del coeficiente de regresión (b), se estimó que el crecimiento relativo del número de huevecillos en estado de blástula (tanto de campo y laboratorio) fue alométrico positivo y negativo (prueba t , $P < 0.05$) con respecto a LC y PT, respectivamente. El crecimiento del número de juveniles con respecto a LC fue isométrico y alométrico negativo con PT (tabla 2.16).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Tabla 2.15.- Parámetros de la regresión potencial del número de huevecillos (NH) por estado en función de LC y PT

Fase	n	R	r^2	Ecuación	Intercepto	b	Significancia
Blástula	12	0.9344	0.8732	$NH = 0.0130LC^{2.7498}$	-4.3390	2.7498	F=68.904 P<0.05
Blástula	12	0.8980	0.8065	$NH = 39.429PT^{0.7498}$	3.6745	0.7499	F=41.690 P<0.05
Gástrula	10	0.6109	0.3732	$NH = 0.4533LC^{1.7311}$	-0.7911	1.7311	F=4.7644 P>0.05*
Gástrula	10	0.5556	0.3087	$NH = 94.642PT^{0.3753}$	4.5501	0.3793	F=3.5723 P>0.05*
Nauplio	7	0.6645	0.4416	$NH = 0.22 \times 10^{-6} LC^{5.688}$	-15.3296	5.6887	F=3.9550

							P>0.05*
Nauplio	7	0.5357	0.2869	NH=15.287PT ^{1.054}	2.7270	1.0342	F=2.0123
							P>0.05*
Embrión	9	0.6314	0.3987	NH=0.4901LC ^{1.9604}	-0.7131	1.6604	F= 4.6420
							P>0.05*
Embrión	9	0.5407	0.2924	NH=48.476PT ^{0.5606}	3.8810	0.5606	F=2.8926
							P>0.05*
Juveniles	14	0.6756	0.4565	NH=0.0467LC ^{2.2594}	-3.0637	2.2594	F= 10.0810
							F<0.05
Juveniles	14	0.5379	0.2894	NH=46.391PT ^{0.5187}	3.8371	0.5187	F=4.8879
							P<0.05
Blástula*	33	0.8764	0.7682	NH=0.00077LC ^{3.4849}	-7.1605	3.4849	F=102.75
							P<0.05
Blástula*	33	0.8513	0.7248	NH=2.8690PT ^{1.0050}	2.8690	1.0050	F= 81.6451
							P<0.05

*relaciones no significativas

Tabla 2.16.- Tipo de crecimiento relativo de NH en función de LC y PT por fase de desarrollo embrionario

Fase	Relación	b	t*	P	Tipo de crecimiento
Blástula*	NH vs. LC	2.7498	5.2821	<0.001	Alometría +
Blástula**	NH vs. PT	0.7499	-19.3707	<0.001	Alometría -
Juvenil*	NH vs. LC	2.2594	1.7698	>0.05	Isométrico
Juvenil**	NH vs. PT	0.5187	-10.576	<0.001	Alometría -
Blástula*	NH vs. LC	3.4849	7.2279	<0.001	Alometría +
Blástula**	NH vs. PT	1.0050	-17.93343	<0.001	Alometría -

Para probar Ho: b=1* o b=3**

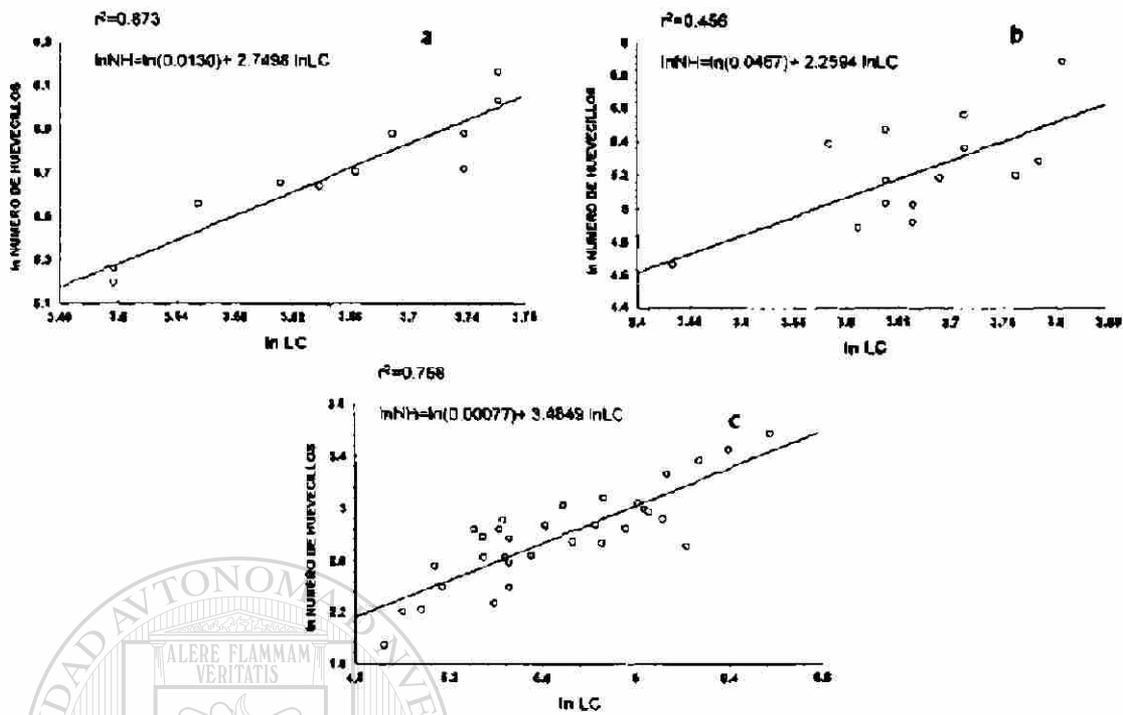


Figura 2.4.- Relación del número de huevecillos (NH) en función de LC. a) blastula, b) juveniles, c) blastula (laboratorio)

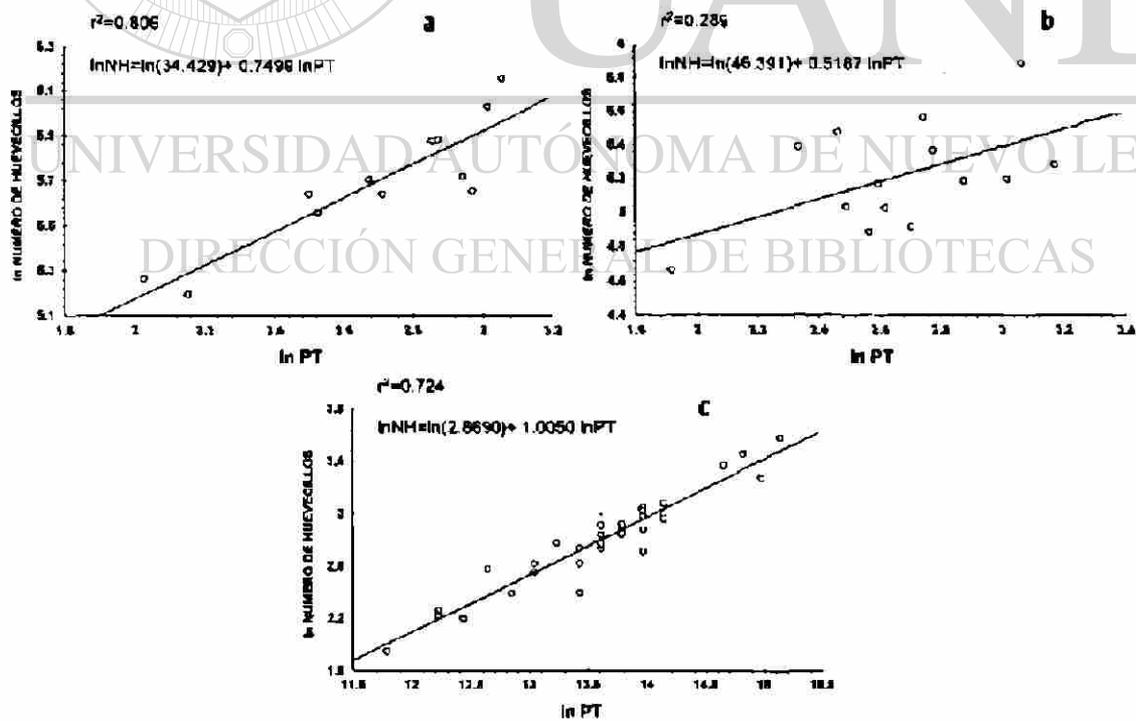


Figura 2.5.- Relación del número de huevecillos (NH) en función de PT. a) blastula, b) juveniles, c) blastula (laboratorio)

2.4.3.3.- Valores estimados del número de huevecillos por talla (LC)

Los valores calculados del número de huevecillos (NH) en función de LC, de los estadios de desarrollo embrionario donde las regresiones fueron significativas se presentan en la Tabla 2.17. La fase de blástula representa a la reproducción realizada y los juveniles a la reproducción actual. Al comparar el NH en blástula de hembras de campo y laboratorio, los valores resultaron mayores en las hembras de campo con tallas de 30 a 45 mm de LC, pero en las tallas de 50-55 mm, estos valores fueron más altos en las hembras que desovaron en laboratorio. El valor máximo calculado de huevecillos en blástula fue de 902.01 huevecillos. Los valores calculados de juveniles con respecto a hembras de 30 a 55 mm de LC, presentaron un rango de 101.59 a 399.67, estos valores presentan una similitud al valor mínimo y máximo de huevecillos en embrión tardío, que es la fase previa a la eclosión, cuyos valores fueron 138 y 281 huevecillos (Tabla 2.14).

Tabla 2.17.- Valores estimados de NH utilizando las regresiones obtenidas en cada estadio (HBC, HBL, JUV), en función de LC (mm).

Est.	Ecuación	30	35	40	45	50	55
HBC	$\text{LnNH}=\ln(0.0130)+2.749 \ln LC$	150.43	229.85	331.82	458.74	612.90	796.55
HBL	$\text{LnNH}=\ln(0.00077)+3.4849 \ln LC$	109.10	186.70	297.33	448.23	647.09	902.01
JUV	$\text{LnNH}=\ln(0.016712)+2.2594 \ln LC$	101.59	143.93	194.61	253.95	322.24	399.67

La diferencia porcentual de pérdida (DPP) entre OIV (potencial Reproductivo) y HBC (Reproducción Realizada) fue menor a medida que se incrementaba la talla de las hembras y presentó un valor promedio de 34.51. Esta misma relación se presenta al comparar OIV y HBL, pero el rango de DPP fue mayor (54.91-22.56 %) y el promedio porcentual fue 38.59 (Tabla 2.18).

La DPP entre HBC y HBL, HBC y JUV; y HBL y JUV, se incrementa a medida que aumenta de talla de las hembras, excepto entre HBC y HBL donde a tallas de 45 mm se presentó un decremento (0.97) y posteriormente un incremento (5.28). En esta misma relación la DPP de huevecillos promedio fue menor, que al

comparar los huevecillos en blástula de campo y laboratorio con juveniles (Tabla 2.19).

Tabla 2.18.- Comparación de la diferencia porcentual de pérdida (DPP) del número de ovocitos (NO) estimados en estado IV (OIV), con respecto al número de huevecillos (NH) estimados en los estadios HBC y HBL, utilizando la LC (mm) como variable de referencia.

LC (mm)	OIV	HBC	DPP	HBL	DPP
30	241.98	150.43	37.83	109.10	54.91
35	360.88	229.85	36.30	186.70	48.26
40	510.17	331.82	34.95	297.33	41.71
45	692.37	458.74	33.74	448.23	35.26
50	909.87	612.90	32.63	647.09	28.88
55	1164.84	796.55	31.51	902.01	22.56
		Promedio	34.51		38.59

Tabla 2.19.- Comparación de la diferencia porcentual de pérdida (DPP) del número de huevecillos (NH) estimados entre los estadios HBC, HBL y JUV, utilizando la LC (mm) como variable de referencia.

LC (mm)	HBC	HBL	DPP (%)	HBC	JUV	DPP (%)	HBL	JUV	DPP (%)
30	150.43	109.10	27.47	150.43	101.59	32.46	109.10	101.59	6.88
35	229.85	186.70	18.76	229.85	143.93	37.38	186.70	143.93	22.90
40	331.82	297.33	10.39	331.82	194.61	41.35	297.33	194.61	34.54
45	458.74	448.23	0.97	458.74	253.95	55.35	448.23	253.95	43.34
50	612.90	647.09	5.28	612.90	322.24	47.42	647.09	322.24	50.20
55	796.55	902.01	11.69	796.55	399.67	49.82	902.01	399.67	55.69
		Prom.	12.42			43.96			35.59

2.4.3.4.- Comparación de las regresiones entre Potencial Reproductivo y Reproducción Realizada

Se utilizó el método de comparación de dos pendientes de regresión (Zar, 1996), de las relaciones obtenidas con LC: Huevecillos en blástula de campo (HBC)

vs. Huevecillos en blástula de laboratorio (HBL), HBC vs. Ovocitos en estadio IV (OIV) y HBL vs. OIV. En todos los casos las pendientes fueron estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba *t*. En las tablas 2.20, 2.21 y 2.22 se presentan los estadísticos calculados y los resultados obtenidos.

Tabla 2.20.- Análisis de comparación de las pendientes de regresión de los huevecillos en blástula de campo y blástula de laboratorio con LC

Estadístico	Blástula	Blástula (lab.)	Conclusión
Σx^2	0.097483	0.3661	
Σxy	0.272912	1.274898	
Σy^2	0.86659	5.77884	
N	12	33	
B	2.7995	3.482376	
SC residual	0.102559	1.339166	
GL residual	10	31	
CM residual mancomunada			0.035164
$S_{b_1-b_2}$			0.675847
V (grados de libertad)			41
t calculada			1.010400
$t_{0.05(2), v}$			2.020
Prueba			$H_0: b_1 = b_2$
Decisión			Se acepta H_0 .

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 2.21.- Análisis de comparación de las pendientes de regresión de los huevecillos en blástula de campo y ovocitos en estadio IV con LC

Estadístico	Blástula	Estadio IV	Conclusión
Σx^2	0.097483	0.258206	
Σxy	0.272912	0.662334	
Σy^2	0.86659	2.382322	
N	12	31	
B	2.7995	2.5651	
SC residual	0.102559	0.683345	
GL residual	10	29	
CM residual mancomunada			0.020151
$S_{b_1-b_2}$			0.533621
V (grados de libertad)			39
t calculada			0.439263
$t_{0.05 (2), v}$			2.023
Prueba			Ho: $b_1 = b_2$
Decisión			Se acepta Ho:

Tabla 2.22.- Análisis de comparación de las pendientes de regresión de los huevecillos en blástula de laboratorio y ovocitos en estadio IV con LC

Estadístico	Blástula (lab)	Estadio IV	Conclusión
Σx^2	0.3651	0.258206	
Σxy	1.274898	0.662334	
Σy^2	5.77884	2.382322	
N	33	31	
B	3.482376	2.5651	
SC residual	1.339165	0.683345	
GL residual	31	29	
CM residual mancomunada			0.033708
$S_{b_1-b_2}$			0.471826
V (grados de libertad)			60
t calculada			1.94409
$t_{0.05 (2), v}$			2.000
Prueba			Ho: $b_1 = b_2$
Decisión			Se acepta Ho:

Debido a la similitud entre las pendientes, se compararon las elevaciones de dos pendientes (Zar, 1996), en las mismas relaciones mencionadas: HBC vs. HBL, HBC vs. OIV, HBL vs. OIV. En todos los casos se determinó que las pendientes tenían diferente elevación, de acuerdo a la prueba t. En las Tablas 2.23., 2.24, y 2.25 se presentan los estadísticos calculados y los valores de t.

Tabla 2.23.- Comparación de las elevaciones de dos pendientes (HBL y HBC), utilizando LC, como variable de referencia.

Estadístico	HBL vs. HBC	Comentarios
Suma de cuadrados de X para la "regresión común" (A_c)	$A_c = (\sum X^2)_1 + (\sum X^2)_2$ $A_c = 0.46358$	
Suma de los productos cruzados para la "regresión común" (B_c)	$B_c = (\sum xy)_1 + (\sum xy)_2$ $B_c = 1.54781$	
Suma de cuadrados de Y para la "regresión común" (C_c)	$C_c = (\sum y^2)_1 + (\sum y^2)_2$ $C_c = 6.64543$	
Suma de cuadrados residual para la "regresión común" (SS_c)	$SS_c = C_c - B_c^2/A_c$ $SS_c = 1.4775$	
Grados de libertad residual para "regresión común" (DF_c)	$DF_c = n_1 + n_2 - 3$ $DF_c = 42$	
MS residual para la "regresión común" ($S^2_{y,x})_c = SS_c/DF_c$	$(S^2_{y,x})_c = 0.03518$	
b_c	$b_c = 3.3388$	
Prueba estadística t	$t = 2.05783$ $t_{0.05(2), 42} = 2.018$	Se rechaza H_0 . $b_1 \neq b_2$, las pendientes tienen diferente elevación

Tabla 2.24.- Comparación de las elevaciones de dos pendientes (HBC y OIV), utilizando LC, como variable de referencia.

Estadístico	HBC vs. OIV	Comentarios
Suma de cuadrados de X para la "regresión común" (A_c)	$A_c = (\sum x^2)_1 + (\sum x^2)_2$ $A_c = 0.35568$	
Suma de los productos cruzados para la "regresión común" (B_c)	$B_c = (\sum xy)_1 + (\sum xy)_2$ $B_c = 0.935246$	
Suma de cuadrados de Y para la "regresión común" (C_c)	$C_c = (\sum y^2)_1 + (\sum y^2)_2$ $C_c = 3.24891$	
Suma de cuadrados residual para la "regresión común" (SS_c)	$SS_c = C_c - B_c^2/A_c$ $SS_c = 0.78971$	
Grados de libertad residual para "regresión común" (DF_c)	$DF_c = n_1 + n_2 - 3$ $DF_c = 40$	
MS residual para la "regresión común" ($S^2_{y,x})_c = SS_c/DF_c$	$(S^2_{y,x})_c = 0.01974$	
b_c	$b_c = 2.62945$	
Prueba estadística t	$t = -1212.2523$ $t_{0.05(2), 40} = 2.021$	Se rechaza $H_0: b_1 = b_2$, las pendientes tienen diferente elevación

Tabla 2.25.- Comparación de las elevaciones de dos pendientes (HBL y OIV), utilizando LC, como variable de referencia.

Estadístico	HBL vs. OIV	Comentarios
Suma de cuadrados de X para la "regresión común" (A_c)	$A_c = (\sum x^2)_1 + (\sum x^2)_2$ $A_c = 0.62430$	
Suma de los productos cruzados para la "regresión común" (B_c)	$B_c = (\sum xy)_1 + (\sum xy)_2$ $B_c = 1.93723$	
Suma de cuadrados de Y para la "regresión común" (C_c)	$C_c = (\sum y^2)_1 + (\sum y^2)_2$ $C_c = 8.16116$	
Suma de cuadrados residual para la "regresión común" (SS_c)	$SS_c = C_c - B_c^2/A_c$ $SS_c = 2.14985$	
Grados de libertad residual para "regresión común" (DF_c)	$DF_c = n_1 + n_2 - 3$ $DF_c = 61$	
MS residual para la "regresión común" ($S^2_{y,x})_c = SS_c/DF_c$	$(S^2_{y,x})_c = 0.03524$	
b_c	$b_c = 3.10304$	
Prueba estadística t	$t = 4.13043$ $t_{0.05(2), 61} = 2.000$	Se rechaza $H_0: b_1 = b_2$, las pendientes tienen diferente elevación

2.5. DISCUSION

2.5.1. Talla de las hembras

La talla de maduración sexual de *P. clarkii* es de 50 mm de LT y puede alcanzar una longitud de hasta 108 mm (Huner y Barr, 1984; Corey, 1987; Huner, 1990; Aiken y Waddy, 1992). Las hembras recolectadas presentaron un rango de 67 a 104 mm de LT, que coincide con el rango de madurez sexual de esta especie. Las posibles variaciones en talla entre poblaciones de una misma especie de acociles, depende de su potencial genético y condiciones ambientales (Momot, 1984; Lutz y Wolters, 1986), y es reconocido en estos crustáceos, el amplio rango de talla a la cuál maduran (Huner, *et al.*, 1994). Al respecto, Sommer (1984) y Huner y Lindqvist (1991), registraron hembras grávidas de *P. clarkii*, a partir de los 70 mm de LT, para este estudio se encontró una ligera diferencia a lo anterior, ya que la talla inferior para una hembra grávida fue de 67 mm. La talla de maduración en otras especies del género *Procambarus* varia de 45 a 125 mm (Huner y Barr, 1984; Huner, 1990; Aiken y Waddy, 1992). Pero recientemente, Rodríguez-Serna *et al.* (2000), reporto para *P. llamasii* que el comportamiento reproductivo se inicia cuando las hembras alcanzan una talla de 31 mm, pero solamente ovipositan sus huevos cuando alcanzan tallas entre los 40 y 60 mm.

2.5.2. Potencial Reproductiva

2.5.2.1. Producción de ovocitos

El estudio de Huner y Lindqvist (1991), menciona que *P. clarkii* produce de 325 a 605 ovocitos dependiendo de la talla entre un rango de 70 a 100 mm de LT (35 a 50 mm de LC). En este estudio, las hembras con las mismas tallas produjeron entre 371 a 1038 ovocitos, lo cual es mayor a lo previamente señalado. En otras especies de acociles, como *P. acutus* y *Orconectes rusticus*, se han registrado una producción hasta 460 ovocitos, como los valores máximos (Huner y Lindqvist, 1991). De acuerdo a los valores promedio de ovocitos por estadio gonadal, se presentó un mayor potencial reproductivo en los ovocitos tempranos que en los ovocitos tardíos. Este hallazgo es similar a lo reportado por

Corey (1987), para diferentes poblaciones de *O. propinquus*. Al respecto, se considera que la densidad, la calidad del agua (oxígeno y temperatura), el alimento y la talla de las hembras (Momot y Gowing, 1977; Momot, 1984; Corey, 1991), actúan como los principales factores que afectan el potencial reproductivo de acociles.

2.5.2.2. Relación Número de ovocitos-Talla de las hembras

En diversas especies de acociles como *P. hayi*, *Cambarus longulus*, *C. robustus*, *O. rusticus*, *O. virilis*, *O. propinquus* y la especie de referencia en este estudio, se ha observado una relación positiva entre el número de ovocitos maduros y la talla (LC) de las hembras (France, 1987; Corey, 1991; Huner y Lindqvist, 1991). Esta misma relación fue observada en las hembras utilizadas, pero no solamente con los ovocitos maduros, sino también con ovocitos inmaduros. Incluso, la relación no solo fue significativa con LC, sino también con el PT de las hembras. Pero además, los valores de correlación (r) de los ovocitos en III y IV estadio fueron mayores a los determinados en las especies anteriormente mencionadas.

2.5.2.3. Crecimiento alométrico de los ovocitos

Se determinó que la velocidad de incremento de los ovocitos (alometría positiva) fue mayor a medida que se incrementa la talla (LC) de las hembras en los estadios II y III. En cambio en el estadio IV se presentó una alometría negativa. Esta diferencia en el tipo de crecimiento puede atribuirse a diferentes factores, por ejemplo, los ovocitos del estadio IV tuvieron una talla mayor a un mm. Durante este estadio, la gónada ocupó gran parte del caparazón, por el notable incremento en volumen de los ovocitos, pero con una consiguiente reducción en el número de estos. Esta misma observación fue hecha por Corey (1991), al determinar una pendiente de regresión más alta en la relación talla-ovocitos de *O. propinquus* que en *C. robustus*, esta última especie presentó ovocitos de mayor talla. Esto ocasiono que ocupen totalmente el espacio del cefalotórax que esta destinado para el crecimiento ovárico. Además, que existió una reabsorción de ovocitos que ocurrió durante el desarrollo gonadal. La anterior aseveración es respaldada por

los resultados de este estudio, al encontrar diferente elevación de las pendientes por estadio al considerar NO vs LC o PT.

2.5.2.4. Estimación del número de ovocitos por estadio gonadal

La utilidad de relacionar el NO con la talla de las hembras (LC o PT), permitió obtener ecuaciones para estimar el NO por talla, en este caso, fue observado una mayor producción de ovocitos a través de su desarrollo. Al respecto, Huner y Lindqvist (1991), señalaron la importancia de estimar la producción de huevecillos u ovocitos en función de la talla, para diferentes especies de acociles de importancia comercial.

2.5.2.5. Pérdida de ovocitos por estadio gonadal

De acuerdo al porcentaje de pérdida de ovocitos entre un estado gonadal y otro, la mayor pérdida fue entre el estadio II y IV (18.30%) y la menor pérdida entre el estadio II y III (13.27%). Esta pérdida de ovocitos fue inferior a lo registrado para el acocil *O. propinquus*, quien presentó una pérdida de ovocitos durante el desarrollo de la gónada del 15 al 75% (Corey, 1991).

2.5.3. -Reproducción Realizada y Reproducción actual

2.5.3.1. Valores del número de huevecillos

En los acociles, como en *O. virilis* el promedio de huevos adheridos a la hembra, es usualmente inferior al promedio de número de ovocitos (Momot y Gowing, 1977). En el caso del acocil rojo *P. clarkii*, las hembras producen de 12 a 956 huevecillos y existe una notoria relación de esta producción con la talla (Penn, 1943; Avault, Jr., 1972; Huner, 1978a; Sommer, 1984; Huner y Lindqvist, 1991). En este estudio, la fecundidad observada para las hembras de campo y laboratorio, quedo dentro del rango mencionado. En el primer grupo fue observado valores de 138 hasta 495 huevecillos adheridos. Mientras que las hembras mantenidas en el laboratorio, presentaron una mayor fecundidad, con un valor máximo de 719 huevecillos.

2.5.3.2. Relación fecundidad-talla

Con respecto, a la relación del número de huevecillos con la talla, esta fue solamente significativa en los huevos recién desovados (campo y laboratorio) e incluyendo la fase juvenil. Este tipo de relación, también ha sido estudiada en los acociles de las especies *Pacifastacus leniusulus*, *Orconectes limosus*, *O. propinquus*, *C. robustus* (Abrahamsson y Goldman, 1970; Corey, 1987; Smith, 1981), *O. virilis* (Momot, 1981), *P. llamasí* (Rodríguez-Sandoval *et al.*, 2000) y *Cherax quadricarinatus* (Showalter, 1996); además de otras especies de crustáceos decápodos (e. g. Jewett, *et al.*, 1985; Corey, 1987; Oh y Hartnoll, 1999; Tsuchida y Watanabe, 1997), en todos ellos se encontró una relación significativa entre ambos parámetros. A este respecto, Somers (1991), consideró que la fecundidad es una medida volumétrica que tiende a incrementarse exponencialmente con la talla de las hembras.

Sin embargo, es importante resaltar que al momento de analizar este tipo de relación biométrica, se debe considerar la edad de las hembras. Por ejemplo, Shields (1991), encontró que puede no existir una relación fecundidad-talla en las especies del cangrejo *Cancer*, atribuyendo esto a que las hembras de mayor talla pudieron estar en senectud y por lo tanto, produzcan menos huevos que las hembras más pequeñas, que presentaron un mayor potencial reproductivo.

2.5.3.3. Estados de desarrollo de los huevecillos

En los estudios sobre reproducción realizada con el acocil rojo (e.g. Sommer, 1984; Huner y Lindqvist, 1991), no se menciona si fue considerado el estado de desarrollo embrionario de los huevecillos, ya que de un estado a otro, se puede presentar diferencias significativas en los valores de fecundidad. En cambio, Bauer (1991) y Guerao *et al.* (1994), al estudiar la fecundidad de diferentes especies de camarones carideos, solamente consideraron aquellas hembras que presentaban huevecillos de los primeros estados, ambos argumentaron que existe una pérdida significativa de huevecillos en etapas más tardías de su desarrollo.

En este estudio, las hembras ovígeras si fueron separadas de acuerdo a la fase de desarrollo de los huevecillos propuesta por Huner y Barr (1984). Pero, como se indicó anteriormente la relación fecundidad-talla, solo fue significativa para las hembras con huevecillos en blástula (estado I) y hembras que llevaron juveniles. Por lo tanto, solo estos lotes de hembras fueron consideradas para analizar el tipo de crecimiento alométrico de los huevecillos y/o juveniles en función de la talla.

2.5.3.4. Crecimiento Alométrico y estimación del número de huevecillos

El crecimiento de los huevecillos fue alométrico positivo y negativo al asociarse con la LC y el PT, respectivamente. En cambio la fase juvenil presentó isometría con respecto a LC.

Huner y Lindqvist (1991), al utilizar ecuaciones de regresión estimaron el número de huevos que puede producir las hembras de *P. clarkii* y otros acociles, de acuerdo a su talla. Para la primera especie fue estimado hasta 535 huevecillos a tallas de 100 mm de LT (50 mm LC). En este estudio, se estimó que las hembras a esta misma talla producen 612.90 y 647.09 huevos en blástula (recién desovados), para los especímenes de campo y laboratorio, respectivamente.

2.5.3.5. Factores que afectan la Reproducción Realizada y la Reproducción actual

Las diferencias observadas en los valores de fecundidad para *P. clarkii*, están íntimamente ligadas a diversos factores como calidad del agua, disponibilidad de refugio y alimento (Huner y Lindqvist, 1991). En este último aspecto, Fernández *et al.* (1994), señalo que las hembras de esta especie requieren gran cantidad de energía para la producción de huevecillos. Por ejemplo, en el acocil *O. virilis* la relación fecundidad-talla es más alta en los lagos productivos (Momot, 1978).

La pérdida significativa de huevecillos y larvas que ocurre mientras están adheridos a las hembras, es otra causa de la variabilidad en la fecundidad en las especies de acociles y otros grupos de crustáceos (Corey, 1987, 1991). De

acuerdo a Corey (1987), la velocidad de la corriente del agua es el principal factor ambiental que origina la pérdida de huevecillos en los acociles.

De acuerdo a Penn (1943) y Corey (1981), los porcentajes de pérdida que ocurre de ovocitos maduros a huevecillos recién liberados, varía con la especie de acociles, y alcanzan valores máximos del 69.8 %. Para *P. clarkii*, esta pérdida fue de 38.3 %. En este estudio, los resultados fueron casi similares, la pérdida estimada fue de 34.51 y 38.59%, para hembras de campo y laboratorio, respectivamente. En otras especies de crustáceos decápodos, también fue calculado el porcentaje de pérdida de huevecillos, por ejemplo, las langostas pierden del 30 al 50% (Talbot, 1991) y la langosta de uña roja (*Cherax quadricarinatus*) del 20 al 40% (Showalter, 1996).

La pérdida porcentual de la reproducción actual (número de juveniles) al compararse con los huevecillos en blástula (estado I), tanto de hembras de campo y laboratorio, fue 43.96 y 35.59, respectivamente. Estos valores son mayores a lo reportado por Penn (1943), quien registro una pérdida de 28% de crías, pero no encontró una asociación con la talla de la hembra. En este estudio si existió una relación significativa entre el número de juveniles y la talla de los especímenes revisados.

2.6. CONCLUSIÓN

Talla de las hembras

Las hembras presentaron un amplio rango en la talla de madurez sexual, que es característico de esta especie.

Potencial Reproductivo

Las hembras utilizadas en este estudio presentaron un mayor potencial reproductivo, con respecto a lo registrado en otros estudios similares para *Procambarus clarkii*.

Se encontró una relación lineal positiva entre la talla o peso de las hembras con respecto al número de ovocitos inmaduros y maduros producidos por el ovario. Sin embargo, el tipo de crecimiento alométrico de los ovocitos fue diferente de acuerdo a su estado de desarrollo.

De acuerdo a las observaciones y el análisis de los ovarios de distinto estado gonadal. Se encontró que durante el desarrollo del ovario se pierde una cantidad significativa de ovocitos, y de acuerdo a las estimaciones hechas fue mayor entre los estadios II y IV, con valores de hasta 27%.

Reproducción realizada y Reproducción actual

La reproducción realizada fue inferior al potencial reproductivo.

Los valores de fecundidad obtenidos para hembras recolectadas en campo y las mantenidas en laboratorio, se ajustan al rango establecido para esta especie. Sin embargo, el número de huevecillos o juveniles fue significativamente diferente de acuerdo al desarrollo de los mismos.

Para establecer una mejor relación entre la talla y número de huevecillos adheridos, es más adecuado hacer la estimación de fecundidad, cuando los huevecillos hayan sido recién desovados (en blástula). Considerando que hay una pérdida significativa de estos durante la incubación.

Los valores estimados de pérdida de huevecillos son mayores a medida que se incrementa la talla de las hembras y cuando los huevecillos pasan de un estadio de desarrollo a otro.

CAPITULO 3.- ESTUDIO HISTOQUIMICO DEL OVARIO E INDICES SOMATICOS INVOLUCRADOS EN EL CICLO DE MADURACION GONADAL DE *Procambarus clarkii*

3.1. ANTECEDENTES

3.1.1.- Anatomía y descripción de los ovarios en crustáceos decápodos

En los crustáceos, los ovarios están localizados ya sea dorsal o dorsolateralmente al intestino como en otros artrópodos mandibulados (Adiyodi y Subramoniam, 1983). En los verdaderos cangrejos (*Brachyura*), el ovario tiene forma de H, conectándose a un cuerpo central de tejido ovárico (Payen, 1974), mientras que en los camarones, los ovarios son pareados fusionándose con cuerpos bilaterales, extendiéndose así desde la región cardíaca del estómago hasta el telson. Existe una serie de lóbulos de cada lado del ovario, los primeros lóbulos anteriores se extienden a lo largo del cefalotórax, estos son llamados lóbulos anteriores, enseguida se localizan los lóbulos medios, situados al lado del hepatopáncreas y finalmente los abdominales que se extienden hacia el telson (Adiyodi y Subramoniam, 1983). En el langostino *Macrobrachium lanchesteri*, los ovarios se encuentran confinados solamente al cefalotórax y no se extienden posteriormente (Woo-Khoo, 1988). En las langostas espinosas y homáridas los ovarios se presentan a manera de bastones cilíndricos pareados, localizados entre el corazón y el tracto alimenticio (Aiken y Waddy, 1980).

En los cambáridos (acociles) las gónadas en ambos sexos son trilobuladas y se sitúan entre el corazón (inmediatamente abajo y delante de él) y el tubo digestivo. Estas se dividen en dos lóbulos anteriores y un lóbulo posterior. En las hembras los oviductos (uno a cada lado) desembocan en las aberturas de las papilas genitales que se encuentran en la base del 3er. par de pereiópodos. Antes y después de ovipositar, estas papilas son cubiertas por una capa muy fina de exoesqueleto. En el macho existen dos canales deferentes enrollados (uno a cada lado del testículo) muy largos y estrechos, que desembocan en las aberturas de

las papilas fálicas localizadas en la base del 5º par de pereiópodos (Huner y Barr, 1984).

De la literatura y Aiken (1980), consideramos como etapas de desarrollo:

- 1) Condición gestada, los gónados son blancos y pequeños, no se distinguen los núcleos.
- 2) Gónados de color rosado, se empieza a distinguir los núcleos.
- 3) Gónados de color rojo, los núcleos son más grandes y se empieza a distinguir los cromosomas.
- 4) Gónados de color rojo oscuro, los núcleos son aún más grandes y se empieza a distinguir los cromosomas.
- 5) Gónados de color rojo oscuro, los núcleos son aún más grandes y se empieza a distinguir los cromosomas.

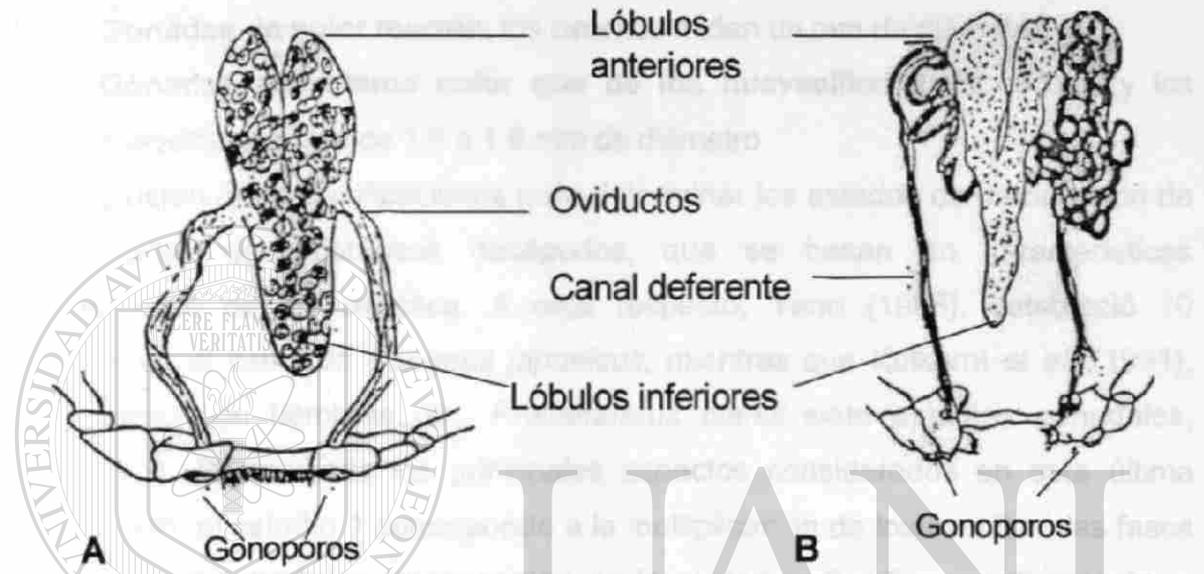


Fig. 3.1.- Estructuras gonadales de *Procambarus clarkii*. A) Hembra y B) Macho (Tomado de Arrignon, J., 1979).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.1.2.-Clasificación de las gonádas de acuerdo a sus características morfológicas e histoquímicas

Durante el desarrollo de los ovarios de los decápodos, estos cambian en talla y color, desde su inicio hasta la madurez, variando durante los ciclos de vitelogénesis y oviposición (Aiken y Waddy, 1980). Estos cambios en la morfología y el color han propiciado que se establezcan diversas clasificaciones tomando en cuenta estos criterios (Woo-Khoo, 1988).

El número de estados ováricos, varía de especie a especie, por ejemplo en las langostas de los géneros *Jasus*, *Panulirus* y *Nephrops*, se han establecido siete, seis y 5-6 estados de desarrollo, respectivamente (Aiken y Waddy, 1980). Mientras que el camarón *Penaeus merguensis* y otros peneidos, así como en el langostino *Macrobrachium lanchesteri* se diferencian cuatro estadios (Woo-Khoo, 1988).

En el caso particular de *Procambarus clarkii*, especie de interés en este estudio, De la Bretonne y Avault (1976), consideran cuatro estadios de desarrollo, cuyas características corresponden a la siguiente descripción:

- I) **Condición gastada**, las gónadas son blancas y pequeñas, no se distinguen los ovocitos.
- II) **Gonádas de color crema**, se empieza a distinguir los ovocitos.
- III) **Gonádas de color marrón**, los ovocitos miden un mm de diámetro
- IV) **Gonádas del mismo color que de los huevecillos** (café oscura) y los huevecillos miden de 1.6 a 1.9 mm de diámetro

Existen otras clasificaciones para determinar los estados de maduración de las gónadas de crustáceos decápodos, que se basan en características histoquímicas de los ovocitos. A este respecto, Yano (1988), estableció 10 estadios en el camarón *Penaeus japonicus*, mientras que Kulkarni *et al.* (1991), determinaron en hembras de *Procambarus clarkii* siete estadios gonadales, (Tabla 3.1). Resumiendo los principales aspectos considerados en esta última clasificación, el estadio 1 corresponde a la multiplicación de los ovocitos, las fases inmadura y avitelogénica se presentan en los estadios 2 y 3 respectivamente, y del 4 al 5 corresponden a la fase vitelogénica, acomodándose las células foliculares alrededor de los ovocitos a partir del estadio 3. En los estadios del 4 al 6 se desarrollan gránulos de vitelo en el citoplasma.

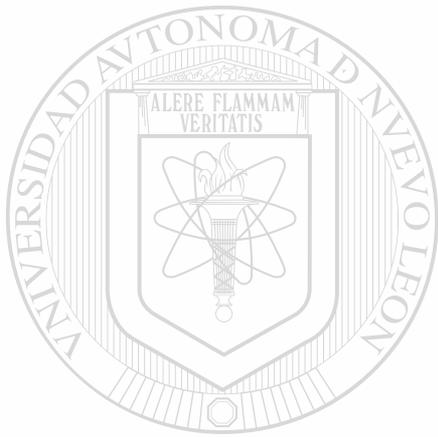
Desde un punto de vista general los estudios sobre maduración gonadal de los crustáceos ha sido ampliamente revisada por Adiyodi y Subramoniam (1983), Meusy y Charniaux-Cotton (1984), Charniaux-Cotton, (1985) y Meusy y Payen (1988).

Tabla 3.1.- Comparación de los diferentes estadios gonadales basados en sus características histoquímicas y desarrollo de ovocitos, de acuerdo a Kulkarni *et al.* (1991).

Característica	Oogonial (1)	Inmaduro (2)	Avitelogénico (3)	Vitelogénico temprano (4)	Vitelogénico intermedio (5)	Vitelogénico tardío (6)	Postvitelogénico (7)
Diámetro del ovocito	< 10µm	10 - 50µm	66-160µm	161-245µm	246-455µm	456-980µm	Degenerados
Diámetro del núcleo	-----	6.5-48µm Muy desarrollado	30-42.5µm	32-43.5µm	28.5-34.5µm	24-30µm	Degenerados
Forma del ovocito	-----	Esféricos	Esféricos, elípticos	Esféricos	Esféricos	Cuadrados	Degenerados
Presencia de folículos alrededor	-----	No	Si	Si	Si	Si	Menor cantidad y forman espacios
Zona perinuclear	-----	No	No	No	Presente	Presente	No se aprecia
Posición del núcleo	-----	Central	Central	Central	Central	No siempre es central	Deforme
Presencia de nucléolos	-----	No	Generalmente 1 (Periférico)	2-3, casi nunca más (periféricos)	3-4 y a veces más periféricos	Más que el anterior	-----
Presencia de vitelo	-----	No	No	Si	En gran cantidad	Si	Empezan a desaparecer
Presencia de vacuola	-----	No	No	No	Si, única y distintiva	No	-----
Presencia de cromatina	-----	No	Si	Si	Si	Si	Más compacta
Presencia de membrana	-----	No bien definida	Bien definida	Bien definida	Bien definida	Bien definida	No

3.1.3.- Estudios sobre histología gonadal en crustáceos decápodos

En los estudios de reproducción, las técnicas histoquímicas han sido una herramienta muy útil en la determinación de las características del ciclo de maduración gonadal de muchas especies de crustáceos, como se señala en la Tabla 3.2.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 3.2.- Antecedentes sobre el uso de técnicas histológicas para el estudio del ciclo gonadal de hembras en diferentes especies de crustáceos.

Autor, Año	Especie	Técnica Histológica	# de estadios	Propósito del estudio	Método de observación
Perryman (1969).	<i>Procambarus simulans</i>	Hematoxilina y Eosina de Delafield Aldehído-fucsina de Gomori	-----	Cambios en el ciclo ovárico inducidos por la luz	Microscopía óptica
Duronslet et al. (1975).	Camarones peneidos	*Uranil Metanólico acetato de uranilo **Azul de metileno acuoso	V	Crecimiento del huevo	*M. Electrónica **M. óptica
Fauvel (1981).	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Tricromo de Gabe PAS, Hematoxilina de Groat	-----	Determinación del ciclo reproductivo	Microscopía óptica
Pochon-Mason, et al. (1984).	<i>Carcinus maenas</i>	Tricromo de Gabe o eosina-hemalun	-----	[] de taurina en ovarios y hepatopáncreas	Microscopía óptica
Tom, et al (1987*).	<i>Parapenaeus longirastis</i>	Feulgen picro metil azul Black Sudan B	-----	Caracterización de la vitelina	Microscopía óptica
Paulus y Laufer (1987).	<i>Carcinus maenas</i> y <i>Libinia emarginata</i>	Hematoxilina y eosina de *Gill **PAS contrastado con verde rápido	III	Determinación de vitelogénesis	*Ovario y hepatopáncreas **Hepatopáncreas Microscopía de luz
Yano y Chinzei (1987).	<i>Penaeus japonicus</i>	Delafield Hematoxilina Eosina Plus	VI	Determinación del sitio de síntesis de la vitelogenina	Microscopía de luz
Yano (1988).	<i>Penaeus japonicus</i>	Delafield Hematoxilina y Eosina Plus Black Sudan B	X	Desarrollo de los Ovocitos	Microscopía de luz
Tsumura y Nakagawa. 1989	<i>Palaemon paucidens</i>	Hematoxilina y Eosina	III	Acumulación de vitelina	Microscopía óptica
Sandoval-Quintero y	<i>Penaeus brasiliensis</i>	Hematoxilina y Eosina	V	Estado de desarrollo gonadal	Microscopía óptica

Gracia (1998).					
-------------------	--	--	--	--	--

3.1.4.- *Indices Gonadosomáticos*

Los índices gonadosomáticos (IGS) establecen la relación proporcional que existe entre el peso del ovario y el peso de la hembra. Considerando que el peso del ovario puede ser usado como indicador de la maduración del mismo, dicho peso va a caracterizar un estado de desarrollo ovárico en particular; incrementándose proporcionalmente al volumen corporal (De Vlaming, *et al.*, 1982; Aiken y Waddy, 1980). La utilización de índices gonadosomáticos en casi todos los decápodos para el estudio de su reproducción, ha sido de gran beneficio científico, ya que así se ha podido conocer la maduración gonadal y épocas de desove (Gonor, 1972 y De Vlaming *et al.*, 1982). El uso de los métodos de relación para normalizar la talla gonadal supone que, en una población dada, los animales de diferente talla, mantienen la relación talla gonadal-talla corporal. Además, el índice gonadal es útil en la comparación de animales de la misma talla a través del tiempo en una población o de diferentes hábitats (Gonor, 1972).

El peso del ovario puede ser usado como un indicador de la maduración de este, sin embargo, este peso debe ser utilizado para un particular estado de desarrollo ovárico, por ejemplo, el ovario de una langosta de gran talla contiene más ovocitos que las langostas más pequeñas, es decir que el peso del ovario en cualquier estadio, se incrementa en proporción al volumen corporal (Aiken y Waddy, 1980).

El Índice Gonadosomático (IGS):

$$IGS = \text{Peso del ovario} / \text{Peso total de la hembra} \times 100$$

Es de uso común para evaluar el crecimiento gonadal. Sin embargo, Grant y Tyler (1983), consideran que los índices gonádicos solamente son satisfactorios en especies de peces con una reproducción estacional marcada. Por otra parte, Erickson *et al.*, (1985), mencionan que los IGS al ser usados para cuantificar la condición reproductiva de peces, pueden resultar inapropiados con ejemplares de

diferentes tallas, sin embargo, el crecimiento gonadal es frecuentemente alométrico. De aquí que este autor haya desarrollado otro índice denominado Índice Gonadal Relativo (IGR), el cual cuantifica la condición reproductiva de un animal independientemente de la talla de estos. En este índice se considera una relación del peso gonadal y la talla del ejemplar (menos el peso gonadal), de acuerdo a la siguiente ecuación de regresión: $W = a S^b$. Al menos en las tres especies de peces que utilizó, el IGR fue más satisfactorio que el IGS.

Los estudios sobre IGS en acociles han sido realizados por Kulkarni *et al.* (1991), quienes observaron para *Procambarus clarkii*, que los IGS se incrementaban hasta el estadio 6, sin embargo, para el 7 (Fase Postvitelogénica) este índice decreció. Por otra parte, Tobias-Chavana (1991), realizó un estudio de ablación unilateral del pedúnculo ocular en *P. clarkii*, observando que con este método, se acelera el desarrollo gonadal en organismos que no habían mudado, y encontró que las hembras que mudaron presentaban IGS más bajos, presumiblemente a causa de la exclusión mutua de los procesos de muda y reproducción, como se mencionó anteriormente. También encontró una correlación positiva al estudiar la relación existente entre la talla de la hembra y la longitud de la gónada de los acociles en laboratorio.

Otros factores tienen influencia determinante en el desarrollo gonadal. Así, Daniels *et al.* (1994), evaluó los índices gonadosomáticos y hepatosomáticos en *Procambarus clarkii* en función de la temperatura y fotoperíodo, los valores máximos del IGS se realizaron en especímenes sometidos a fotoperíodo corto (10 horas-luz: 14 horas-oscuridad) y a una temperatura de 29 ° C. En relación con lo anterior, González-Aguilar (1995), para una población de *P. clarkii* en Santiago, Nuevo León, encontró que los IGS tuvieron los valores más altos en el estadio IV y durante el mes de Agosto.

El estudio concerniente a reproducción de crustáceos ha generado cierto cúmulo de información sobre la determinación de IGS en varias especies de decápodos, algunos de los cuales se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3.- Antecedentes sobre el uso de Índices Gonadosomáticos para estudios de reproducción en crustáceos.

Año	Autor	Especie	Estadio	Valor IGS	Observaciones
1974	Bomirski y Klek	<i>Rhithropanopeus harrisi</i> (sin IGS), <i>Crangon crangon</i>	-----	0.29 - 1.78* 0.30 - 1.06**	*IGS para <i>C. Crangon</i> con extirpación de pedúnculos oculares. **IGS, misma especie, hembras inyectadas con extracto de pedúnculo ocular.
1981	Quackenbush y Herrmkind	<i>Panulirus argus</i>	-----	1.22 - 4.518* 0.259 - 1.15**	*IGS de hembras inyectadas con extracto de pedúnculo ocular de <i>Uca pugilator</i> . **Hembras intactas.
1982	Nakagawa et al.	<i>Palaemon paucidens</i>	-----	1.0 - 14.5*	*IGS, el diámetro del ovocito fue de 160 a 1210 μm , no aumentó proporcionalmente con el IGS. Crecimiento discontinuo.
1989	Tsumura y Nakagawa	<i>Palaemon paucidens</i>	I - III	≤ 1.5 - ≥ 4.5	I.- IGS < 1.5, II.- IGS de 1.5 a 4.5; III.- IGS > 4.5.
1991	Kulkarni et al.	<i>Procambarus clarkii</i>	I - VII	0.006* - 2.622**	* Ovario inmaduro; **Ovario en vitelogénesis tardía.
1993	Chang, et al.	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	-----	≥ 5	Solamente usaron hembras con IGS ≥ 5 y ovocitos ≥ 0.35 mm de diámetro (hembras maduras).
1993	Haefner, Jr. y Spaargaren	<i>Crangon crangon</i>	I - VIII	0.483 (I) 5.978 (VII)	Incremento en peso, 69% de desarrollo ovárico hasta previtelogénesis; 282% de pre a vitelogénesis.
1993	McClintock et al.	<i>Callinectes sapidus</i>	-----	* 0.8 - 1.7	* Los IGS se realizaron en hembras y machos
1994	Daniels et al.	<i>Procambarus clarkii</i>	-----	0.079 - 1.225	Hembras maduras, con 2 tratamientos a diferente T°C y fotoperiodo.
1995	Chu	<i>Metapenaeus ioxneri</i>	V	0.6 - 7.9	Ovarios de 15 individuos
1995	Courtney et al.	<i>Penaeus plebejus</i>	-----	≤ 0.15	Concluyen que el IGS no es un buen indicador de reproducción en camarón.

1996	Medina et al.	<i>Penaeus kerathurus</i>	I - V	1.0 - 2.8* 1.4 - 3.7**	*IGS mensuales de hembras silvestres. **IGS de hembras mantenidas en estanques.
1996	Sagi et al.	<i>Cherax quadricarinatus</i>	-----	0.42* - 2.15**	*Hembras previtelogénicas, ovocitos 287µm **Hembras vitelogénicas, ovocitos de 1020µm
1997	Lee y Chang	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	I - V	0.48 - 7.42 (I - V)	El IGS se incrementa con el desarrollo del ovario.
1998	Alunno-Bruscia y Sainte-Marie	<i>Chionoecetes opilio</i>	I - III	Los valores se expresan en ln	Sólo consideran hembras de \geq 28.9 mm de LC
1998	Spaargaren & Haefner	<i>Crangon crangon</i>	I - VIII	0.483*, 5.978**	*Mínimo; **Máximo.
1999	Chu-Woong y Hartnoll	<i>Philocheas trispinosus</i>	V	7 - 9	-----

3.1.5.- Índices Hepatosomáticos (IHS)

En muchos crustáceos decápodos, el hepatopáncreas es una masa glandular pareada larga y compacta, que ocupa gran parte de la cavidad del cefalotórax y se localiza a los lados del estómago e intestino anterior. Esta glándula se une al intestino medio a través de un par de conductos primarios, y estos se ramifican en cientos de tubulos secundarios, los cuales se conectan a la masa lobular de este tejido. En *Procambarus clarkii*, los tubos primarios se unen en la parte ventrolateral del intestino medio (Gibson y Barker, 1979; Ceccaldi, 1998).

El patrón de coloración presente en el hepatopáncreas es variable entre los distintos grupos de decápodos, dando tonalidades de café amarillento en las especies *Cancer pagurus*, *Paratelphusa hydrodromus*, *Metapenaeus bennettiae* y *Scylla serrata* o verde amarillento en *Homarus gammarus* y *Cambarus virilis*. Otros colores observados son el amarillo naranja (*Panulirus polyphagus*), rojo-naranja (*Palaemon macolmsonii*), amarillo o café (*Astacus fluviatilis*, *Cambarus virilis*, *Cancer pagurus* y *Nephrops*) (Gibson y Barker, 1979). En *Astacus leptodactylus*,

se han observado cambios de coloración del hepatopáncreas durante el ciclo de muda, dando tonalidades de verde a amarillo (Durliat y Vranckx, 1982).

El β caroteno es el principal pigmento en los crustáceos decápodos, con un 42-90% del contenido total de carotenoides. Otros pigmentos identificados son la astaxantina, luteína, flavoxantina y la 4-keto-zeaxantina (Gibson y Barker, 1979). Estos pigmentos pueden estar presentes en el ovario, pero previamente se concentran en el hepatopáncreas y pasan posteriormente a la hemolinfa durante la vitelogénesis (Varadarajan y Subramonian, 1980).

El hepatopáncreas es un órgano vital de los crustáceos, ya que es responsable de diversas funciones, como las síntesis y secreción de enzimas digestivas y la subsiguiente toma de nutrientes, pero también está implicado en la excreción, ciclo de muda, almacenamiento de reservas inorgánicas y el metabolismo de lípidos y carbohidratos, y al menos una porción de sus funciones están bajo un control neuroendocrino (Gibson y Baeker, 1979). Las diversas funciones del hepatopáncreas están relacionadas a los diferentes tipos de células epiteliales que se presentan en el ápice de los tubulos (Ceccaldi, 1998). La nomenclatura y función de cada célula fue propuesta por Hirsch y Jacobs (1930), y posteriormente utilizada por Gibson y Barker (1979) y Dall y Moriarty (1983). Las células E, estas tienen características embrionarias; las células R, tienen una función de almacenamiento; las células F, presentan una apariencia fibrosa y las células B, tienen una función secretora (Ceccaldi, 1998; Paulus y Laufer, 1987). Las células R son abundantes y contienen numerosas vacuolas llenas de lípidos y elementos inorgánicos, pero también hay pequeños depósitos calcáreos y partículas de glicógeno. En *P. clarkii*, estas células contienen gránulos de cobre, sulfuro y otros elementos menos abundantes (Gibson y Barker, 1979; Ceccaldi, 1998).

El tamaño del hepatopáncreas varía de acuerdo a la especie y en los machos puede ser más grande que en las hembras. En el cangrejo *Arenaeus cribrarius*, el estadio IV gonadal de ambos sexos, se distingue porque los machos presentan un hepatopáncreas cuatro veces mayor en tamaño que la gónada, mientras que el hepatopáncreas de las hembras solamente llega a ser del doble

del tamaño del el ovario (Amaro-Pinheiro y Fransozo, 1998). En las hembras del camarón *Crangon crangon*, el hepatopáncreas es casi del doble de talla que el ovario en los primeros estadios gonadales (I-IV), pero posteriormente decrece en tamaño durante la vitelogenésis. Estos cambios en volumen de ambos órganos están asociados al transporte de reservas desde el hepatopáncreas, absorción y síntesis por el ovario (Haefner y Spaargaren, 1993; Spaargaren y Haefner, 1994).

El hepatopáncreas esta relacionado en la producción de vitelo exógeno necesario para el desarrollo del ovario (Paulus y Laufer, 1987; Quackenbush, 1986). En las hembras adultas, el hepatopáncreas puede ser más pequeño debido a la maduración del ovario, al tiempo que se drenan las reservas metabólicas hacia este órgano (Gibson y Barker, 1979). En el acocil *Orconectes nais*, el contenido de lípidos en gónadas se incrementa mientras que los lípidos del hepatopáncreas declinan (Armitage *et al.*, 1972; Armitage *et al.*, 1973), esto ocurre principalmente durante la maduración ovocitaria (Mourente y Rodríguez, 1991).

En algunos estudios sobre el ciclo de maduración ovarica de crustáceos decápodos, además de determinar los Índices Gonadosomáticos (IGS), se ha calculado la relación existente entre el peso del hepatopáncreas y el peso total de la hembra, que es conocida como Índice Hepatosomático (IHS).

En la tabla 3.4, se presentan los valores de IHS obtenidos para algunas especies de crustáceos decápodos.

Tabla 3.4.- Valores del IHS en algunas especies de crustáceos decápodos

Especie	Rango de los IHS por estadio gonadal	Fuente
<i>Penaeus kerathurus</i>	3.2-4	Mourente y Rodríguez, 1991
<i>Procambarus clarkii</i>	6.78-8.99	Daniels <i>et al.</i> , 1994
<i>Metapenaeus joyneri</i>	3.3-4.4	Chu, 1995
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	3.58-6.17	Lee y Chang, 1997

3.2. METODOLOGIA

3.2.1.- *Colecta del material biológico*

Los especímenes (hembras) de *Procambarus clarkii* se obtuvieron en un transecto del Río San Juan, ubicado en la Congregación "La Boca", en Santiago, Nuevo León (25° 27'11" N: 100°05'12" W), utilizando la técnica de colecta mencionada por Campos y Rodríguez Almaraz (1992), consistente en el uso de cebos (higado de res), redes entomológicas y captura manual durante la noche. Los muestreos fueron mensuales durante 1998. En cada visita se obtuvieron hembras de diferentes tallas (26-36 mm de Longitud del cefalotórax o LC) con el fin de obtener hembras de diferente estado de madurez sexual, estas fueron trasladadas vivas en cajas de plástico de 42x33x27 cm, para su estudio en laboratorio.

3.2.2.- *Acondicionamiento de los especímenes en laboratorio*

Los animales colectados se colocaron individualmente en peceras de 15x15x25 cm, con un nivel de agua de 4 cm, la temperatura se mantuvo entre los 24°-26°C y un fotoperíodo de 14 horas luz: 10 horas oscuridad como lo sugiere Daniels *et al.* (1994).

El agua de dichos contenedores se cambió cada tercer día. El alimento que se proporcionó diariamente a los animales consistió en una dieta balanceada basada en harina de pescado como fuente principal de proteína y soya, proporcionada por tesis de las tesis del Laboratorio de Maricultura, sus características nutricionales se indican en Pelcastre (1996), y se detallan en la Tabla 3.5. Estas condiciones de laboratorio se mantuvieron hasta la disección de los ejemplares, generalmente de 5 a 6 días.

Tabla 3.5.- Composición del alimento ofrecido a las hembras

Ingredientes	%	Ingredientes	%
Coe 50s:50p	45.000	▪ Premix Mineral	0.500
Sorgo	43.379	Vitamina C	0.200
Harina de Subproducto Animal	7.000	Cloruro de Colina	0.080
Harina de Sangre	2.000	Antioxidante Redox	0.013
Aceite de Soya	1.378	Antifúngico	0.250
▪ Premix Vitamínico	0.200		

- Premix Vitamínico: Vit.A 10,000,000 U.I.; Vit D3 1,200,000 U.I.; Vit E 50,000 U.I.; Vit. K3 5 g; Tiamina 12 g; Riboflavina 20 g; Piridoxina 10 g; Vit. B12 20 g; Biotina 600 g; Acido fólico 2.5 g; Niacina 100 g; D-Pantotenato de Calcio 40 g; Vit. C 200 g. Exc. cbp. 1000 g.
- Premix Mineral: Zinc 80 g; Manganeso 50 g; Yodo 2.5 g; Cobre 10 g; Cobalto 0.300 g; Hierro 100 g; Exc. cbp. 1000 g; Vit. C como Ascarbil Polifosfato; Cloruro de Colina 60%.

3.2.3.- Biometría

A cada uno de los acociles se le tomaron datos de longitud total (LT) y longitud del cefalotórax (LC) con un Vernier Scala con una precisión de 0.1 mm y de manera adicional se registró el peso total (PT) en una balanza electrónica OHAUS Modelo C305P. La LT se consideró desde la parte anterior del rostro hasta la parte terminal del urópodo, mientras que la LC solamente se consideró hasta la unión con el primer segmento abdominal. Estos valores (talla y peso) fueron incluidos en una base de datos generada en Excel y SPSS para Windows 1998.

3.2.4.- Estado de muda

Para la determinar el estado de muda de cada ejemplar se utilizó la técnica de setogénesis de los urópodos siguiendo los criterios de Aiken y Waddy (1992).

3.2.5.- Disección

Previamente a la disección de los especímenes, cada uno fue colocado en el interior de un frasco que contenía un algodón impregnado con cloroformo, esto con la finalidad de mantenerlos inertes. Posteriormente, a los acociles se les quito el cefalotórax por ambos lados para llevar a cabo la disección con pinzas y agujas

para la extracción de gónadas y hepatopáncreas. Ambos tejidos húmedos fueron pesados en una báscula MARCA, con una precisión de 0.00001g. Para cada gónada disecada se determinó el estadio gonadal según la clasificación de De la Bretonne y Avault Jr. (1976). Los datos de peso húmedo del ovario y peso húmedo del hepatopáncreas fueron también incluidos en la base de datos, para su análisis y relación con otras variables seleccionadas.

La gónada fue seccionada y conservada en tubos eppendorf a una temperatura de -20°C . Una de las secciones se tomó para realizar cortes histológicos y el resto fueron utilizadas en un estudio colateral destinado a la caracterización y purificación de los tipos de vitelo.

3.2.6.- Técnicas histológicas

3.2.6.1.- Histología para caracterización morfométrica y morfológica de los ovocitos mediante la Técnica de Haematoxilina de Harris y Eosina (H y E)

a).- Fijación

Las muestras de ovario obtenidas de cada ejemplar fueron fijadas en líquido de Bouin durante 24 horas, posteriormente se deshidrataron en alcohol etílico de 50 a 100% con baños de 3 horas cada uno y se mantuvieron inmersas en butanol por tiempo indefinido. Posteriormente, se colocaron en benceno durante media hora y se realizó la inclusión en parafina de 52°C de punto de fusión (Control Técnico y Representaciones®).

b).- Microtomía

Habiéndose realizado la inclusión de las muestras de gónadas, se realizaron cortes histológicos con un espesor de $8\mu\text{m}$ usando un microtomo (American Optical Company); estos se colocaron en portaobjetos para teñirlos con Hematoxilina de Harris y Eosina.

c).- Tinción

Esta técnica se utilizó para realizar la descripción de las gónadas por estadio, considerando el diámetro, forma de ovocitos, diámetro del núcleo, número de nucleolos; presencia de células foliculares y de vitelo, de acuerdo al criterio de Kulkarni *et al.* (1991). El procedimiento para llevar a cabo la tinción fue el propuesto por Humason (1972), modificado por técnicos del Laboratorio de Histología de la F.C.B. (Apéndice 1).

3.2.6.2.- Histoquímica para la determinación de glicoproteínas, con la técnica de Acido Periódico-Reacción de Schiff (PAS)

a).- Fijación y microtomía

Para esta técnica se realizó el mismo procedimiento de fijación e inclusión en parafina utilizado en la técnica de H y E, los cortes también fueron de un espesor de 8µm.

b).- Tinción

Esta técnica de tinción se utilizó para determinar la presencia de carbohidratos (glicoproteínas) en el citoplasma, siguiendo las técnicas descritas por Putt (1972) y Humason (1972), modificando algunos de los tiempos de permanencia en los reactivos con la finalidad de obtener mejores resultados. Los pasos de la tinción se enumeran en el Apéndice 2.

Los cortes de gónadas que contienen glicoproteínas dan como PAS positivo gránulos de color rosa a rojo púrpura

3.2.6.3.- Histoquímica para determinar la presencia de lípidos mediante la técnica de Black Sudan B (BSB)

a).- Fijación y microtomía

Para la técnica de BSB los tejidos fueron fijados en formalina al 10 %, realizando 3 cambios cada 24 horas. Las gónadas se conservaron en butanol para

incluirlos en parafina posteriormente. La inclusión y obtención de los cortes se realizó de la misma forma mencionada en las técnicas de H y E, y PAS.

b).- Tinción

La determinación de lípidos por medio de la técnica de BSB se llevó a cabo en base al procedimiento utilizado por Johnson 1980 y las modificaciones realizadas por Tom *et al.* (1987a), (*comunicación personal*, Apéndice 3).

Los lípidos combinados con algunas otras moléculas, así como otros lípidos neutros exhiben una reacción positiva a esta técnica obteniendo una coloración negra, azul-grisácea o parduzca.

3.2.7.- Índices Gonadosomáticos

La determinación de los Índices Gonadosomáticos (IGS) por estadio y mes de muestreo, fue de acuerdo a la relación ya mencionada. Este índice ha sido utilizada en diversas especies de crustáceos decápodos (Quackenbush y Herrnkind, 1981; Nakagawa *et al.*, 1982; Kulkarni *et al.*, 1991; Haefner y Spaargaren, 1993; Daniels *et al.*, 1994; Lee y Chang, 1997; Spaargaren y Haefner, 1998):

Adicionalmente se utilizó el Índice gonadal Relativo (IGR) propuesto por Erickson *et al.* (1985), donde se utilizó primeramente la siguiente ecuación $W = aS^b$ para cada estadio gonadal, donde W es el peso del ovario, S es la diferencia del peso somático total menos el peso del ovario de cada hembra, a y b son constantes de la ecuación. Posteriormente, se utilizó una comparación múltiple de pendientes, para probar si las pendientes (b) de cada regresión presentaban diferencias significativas entre los estadios gonadales (Zar, 1996). En este caso como las pendientes no fueron diferentes, se procedió a calcular un coeficiente de regresión (b) común para cada regresión, de esta manera el IGR quedó expresado como:

$$IGR = aW/S^b$$

Donde a es el valor del intercepto de cada regresión, en este caso por estadio y b es el coeficiente de regresión común.

3.2.8. Índices Hepatosomáticos (IHS)

Para la construcción de los IHS por estadio gonadal y mes de muestreo, se utilizó la relación entre el peso húmedo del hepatopáncreas (PHP) y el peso húmedo de las hembras (PHE):

$$IHS = (PHP/PHE) \times 100$$

3.2.9. Análisis estadísticos

Los valores promedio del peso de las hembras (PT), longitud del cefalotórax (LC), peso del ovario, peso del hepatopáncreas, IGS, IGR, IHS y el diámetro de los ovocitos fueron sometidos a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si presentaban una distribución normal. Para estas mismas variables, se determinó si existían diferencias significativas entre sus valores promedio, ya sea por estadio gonadal o mes de muestreo, mediante un ANOVA (F , $P < 0.05$) y la prueba de Duncan (Prueba t ; $P < 0.05$). Adicionalmente, se obtuvieron las estadísticas descriptivas de las variables mencionadas por mes y estado de madurez (Promedio, Desviación estándar, Error estándar, valor mínimo y máximo, así como el coeficiente de variación).

Todas las pruebas y análisis estadísticos fueron hechos con el programa SPSS versión 5, 1992 y Zar (1996). Las gráficas de cada análisis se editaron con el programa Statistica y Excel para Windows 98.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. RESULTADOS

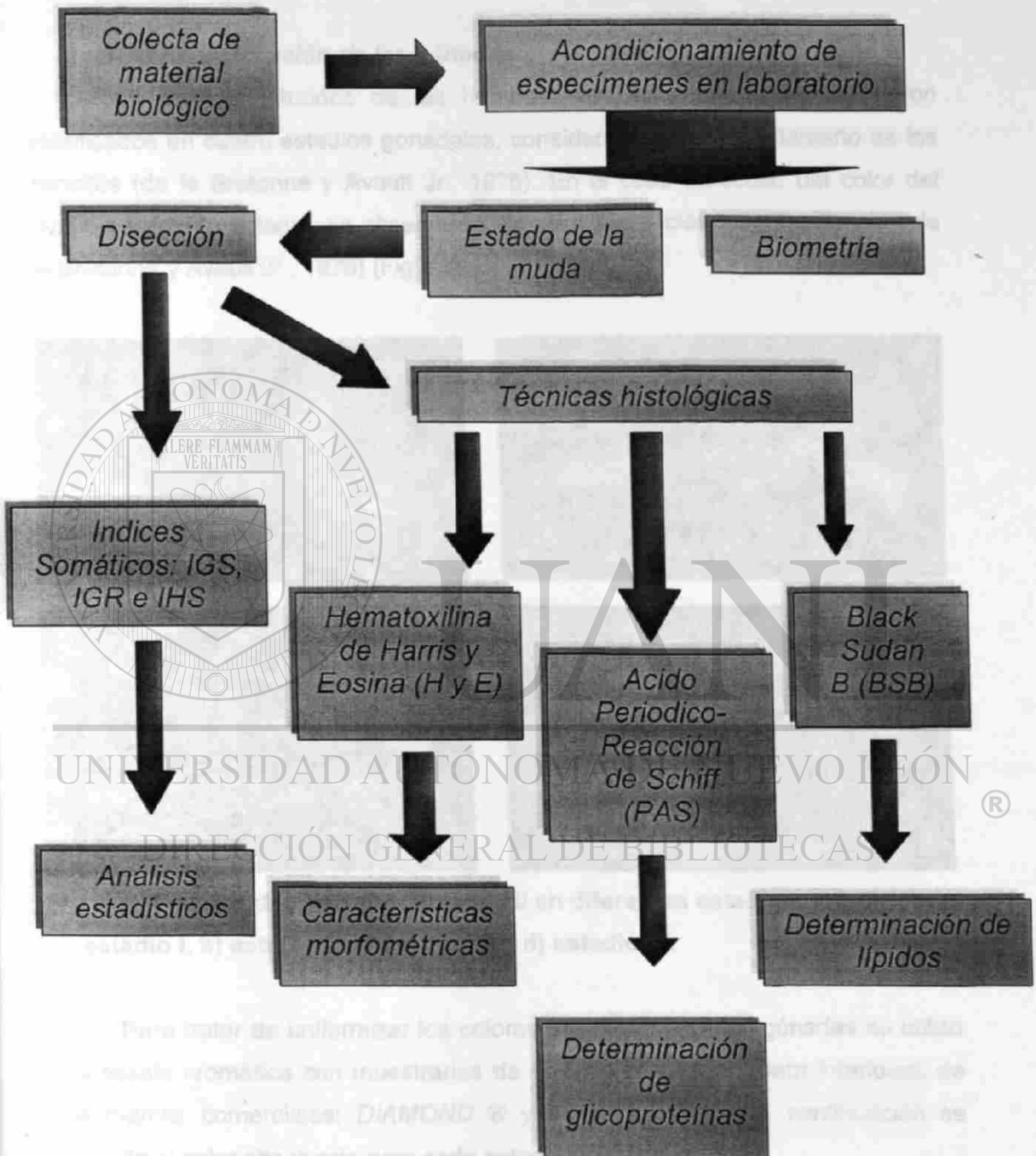


Fig. 3.2.- Diagrama de flujo del diseño experimental

3.3. RESULTADOS

3.3.1.- Clasificación de las gónadas

Los ovarios extraídos de las hembras de *Procambarus clarkii*, fueron clasificados en cuatro estadios gonadales, considerando el color y tamaño de los ovocitos (de la Bretonne y Avault Jr., 1976). En el caso particular del color del ovario para cada estadio, se observaron algunas diferencias (ver clasificación de la Bretonne y Avault Jr., 1976) (Fig.3.3).

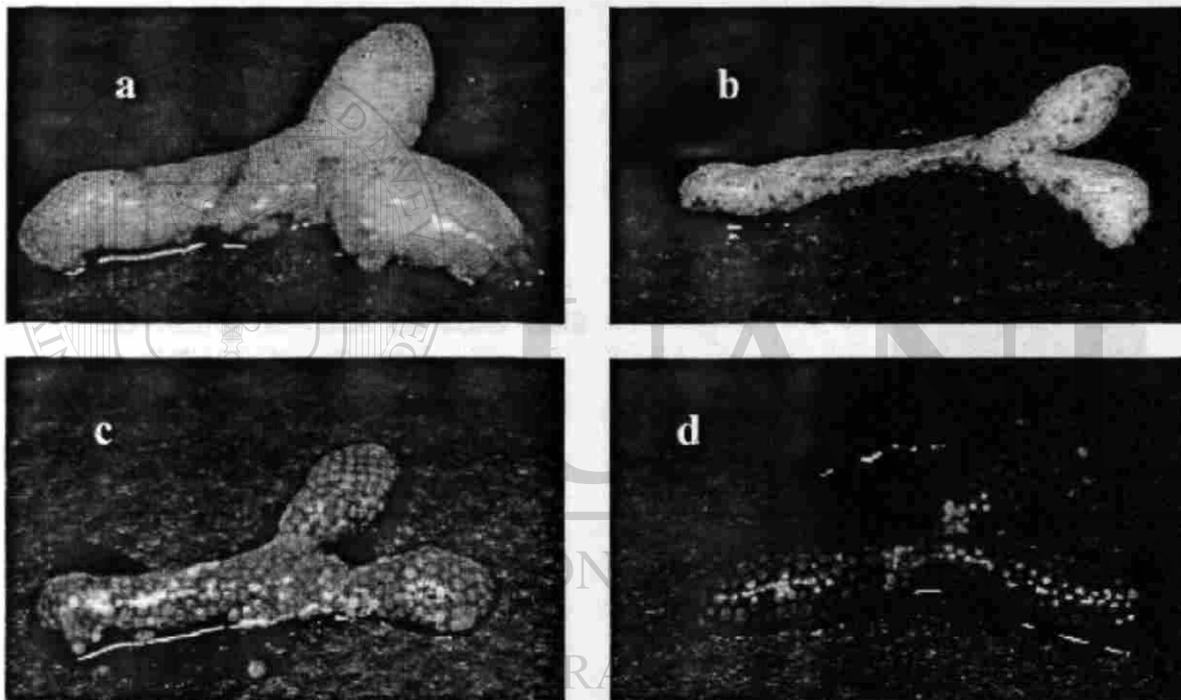


Fig. 3.3.- Ovarios de *Procambarus clarkii* en diferentes estadios gonadales; a) estadio I, b) estadio II, c) estadio III y d) estadio IV.

Para tratar de uniformizar los colores observados en las gónadas se utilizó una escala cromática con muestrarios de colores de pinturas para interiores, de dos marcas comerciales: *DIAMOND* ® y *DUTCH BOY* ®. A continuación se presenta el color observado para cada estadio (Fig. 3.4).

ESTADIO I.- Son ovarios de color blanco a amarillo claro.

Diamond®
Mayonnaise

ESTADIO II.- El color característico es crema.

Diamond®
Surfspray

ESTADIO III.- Son de color café en distintas tonalidades

Dutch Boy®
Fiddler

ESTADIO IV.- Los ovocitos son de color de los huevecillos; presentan un color café oscuro.

Dutch Boy®
Buffalo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3.2.- Estado de la muda

Se colectaron 291 ejemplares hembras para este estudio, de las cuales de acuerdo al criterio de setogénesis correspondieron en un 79.76 % y 19.24 %, a los estadios de muda C y D, respectivamente. En la tabla 3.6 se presenta una relación del número de organismos por muda. La Fig. 3.5 muestra la observación al microscopio del urópodo de una hembra en estado D.

Tabla 3.6.- Relación del estado de la muda con respecto al estadio gonadal.

ESTADIO GONADAL	ESTADO DE LA MUDA				Total
	A Post-muda	B Post-muda	C Intermuda	D Premuda	
I	2		26	21	49
II	1		78	29	108
III			60	5	65
IV			68	1	69
Total	3	0	232	56	291

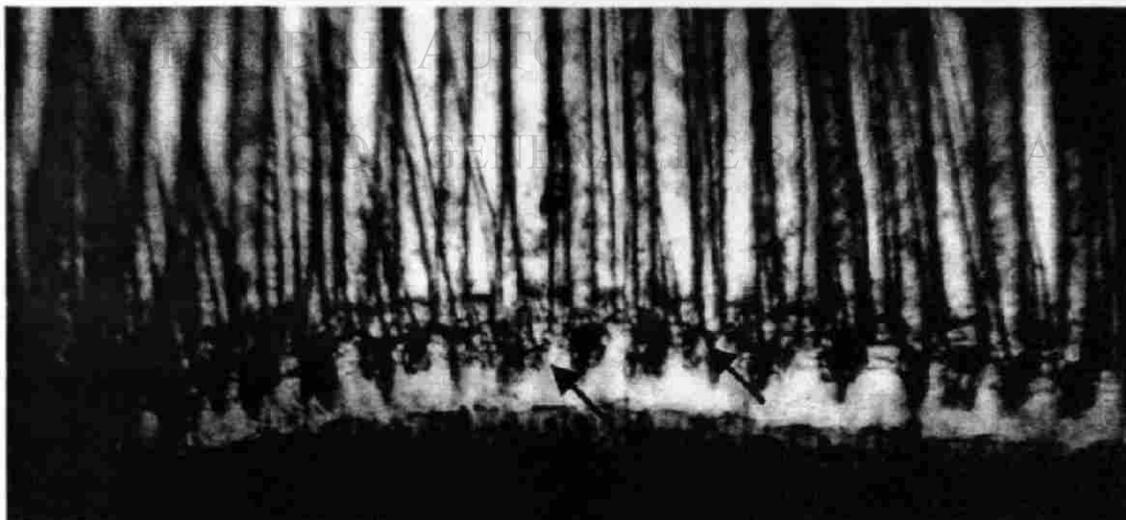


Fig. 3.5.- Margen del urópodo que representa las características de un espécimen en estadio D (las flechas indican la presencia de nuevas setas).

3.3.3.- Datos morfométricos (LC y PT)

Las biometrías obtenidas de los ejemplares utilizados indicaron un incremento, tanto en la LC como en el PT, a medida que avanzó el proceso de maduración. Se observó que los organismos en estadio I midieron en promedio 26.7125 mm de LC, mientras que los del estadio IV midieron 35.329 mm, a este respecto se determinó la existencia de diferencias significativas en cuanto a los valores promedio. Las hembras de estadios I y IV difirieron significativamente ($F=19.0738$; $P<0.05$) de acuerdo a la prueba de Duncan con los estadios II y III.

De manera similar, el peso total del animal se incrementó de 8.3146 gr a 13.395 gr en promedio del estadio I al IV respectivamente ($F=14.3321$; $P<0.05$). Se observó una diferencia significativa en el peso promedio del estadio I que difirió del resto (Duncan, $P<0.05$) formándose 2 subconjuntos en los cuales no se presentaron diferencias significativas, el II-III y el III-IV. En la Tabla 3.7, se muestra la relación de los valores de ambos parámetros para cada uno de los estadios.

Tabla 3.7.- Datos morfométricos por estadio gonadal de hembras de *P. clarkii*.

Estadio	(n) Ejemplar	LONGITUD DEL CEFALOTORAX (mm)				PESO TOTAL (gr)			
		Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar
I	48	44	26.7125	12	7.3243	19.1	8.3146	2.7	3.5176
II	106	48	31.9012	21	5.8823	30.7	10.829	3.1	4.1516
III	65	48.5	33.1031	19.5	6.486	37.5	12.296	4.4	5.0467
IV	69	44	35.329	20	5.41	25.5	13.395	6.4	4.5193

El análisis de regresión de PT en función de LC fue significativo ($F=187.849$; $P<0.05$) (Fig. 3.6). El coeficiente de regresión (b) fue 1.125, de acuerdo a este valor el crecimiento de PT fue alométrico negativo ($t=22.86$; $P<0.05$).

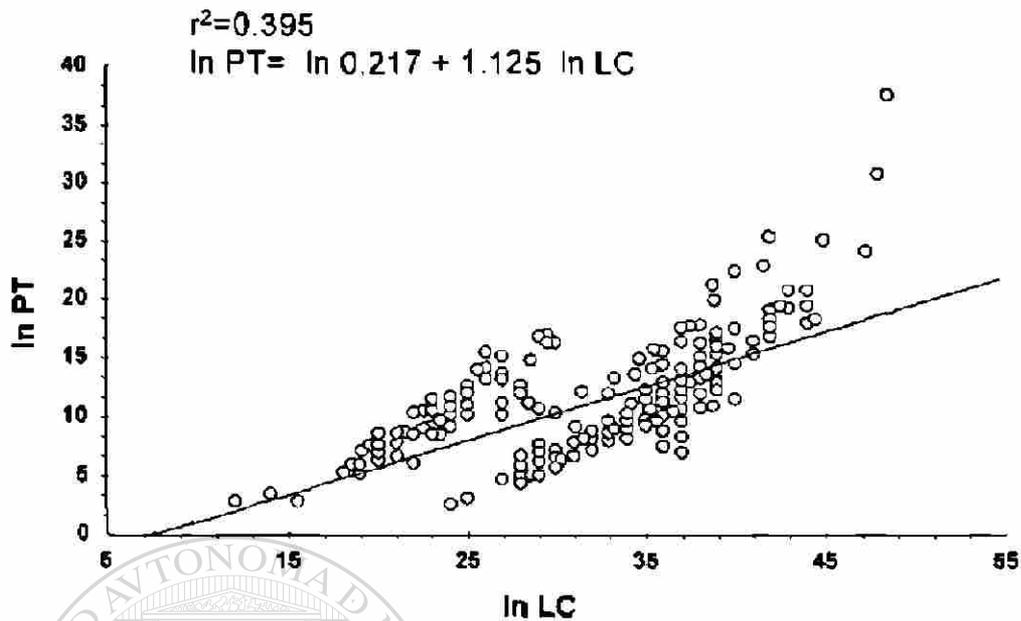


Fig. 3.6.- Relación de PT y LC de las hembras colectadas en 1998

3.3.4.- Peso del ovario

El peso del ovario es uno de los parámetros biométricos necesarios para determinar el Índice Gonadosomático, los valores máximos y mínimos fueron 0.0043 y 1.4819 g, respectivamente. Se realizó un ANOVA que permitió el establecimiento de diferencias significativas ($F= 71.1241$; $P< 0.05$), así como una prueba de Duncan con un 95% de confianza, por medio de la cual quedó de manifiesto que los estadios III y IV son los que marcan la diferencia respecto a los demás. Los pesos de las gónadas aumentaron de acuerdo a la evolución de los estadios de maduración gonadal (Tabla 3.8).

Los valores promedio del peso gonadal fueron mayores en Diciembre (0.3577) y Enero (0.4864), esto es sin considerar el estado gonadal. El valor promedio mínimo se presentó en Mayo (0.0458). Estos valores fueron significativamente diferentes de acuerdo a un ANOVA ($F= 7.7379$; $P< 0.05$), y se determinó que los valores promedio de los meses de Enero, Julio, Agosto, Octubre y Diciembre, fueron significativamente diferentes al resto, de acuerdo a la prueba de Duncan con un 95% de confianza (Tabla 3.9).

Tabla 3.8.- Valores del peso ovárico para cada estadio gonadal.

Estadio	Número de ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (CV)
I	48	0.1630	0.0262	0.0043	0.0278	106.1068
II	108	0.2370	0.0441	0.0079	0.0326	73.9229
III	65	1.1337	0.1521	0.0213	0.2115	139.05325
IV	69	1.4819	0.4695	0.0710	0.3625	77.2097

Tabla 3.9.- Datos del peso del ovario de las hembras recolectadas durante 1998.

Mes	Número de Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
Enero	15	1.4002	0.4864	0.6640	0.5457	112.19161
Febrero	25	0.5568	0.0735	0.0043	0.1080	146.93877
Marzo	26	0.4220	0.0514	0.0062	0.0877	170.62256
Abril	35	0.2667	0.0474	0.0084	0.0553	116.6666
Mayo	36	0.3961	0.0458	0.0140	0.0674	147.16157
Junio	21	0.1808	0.0510	0.0266	0.0499	97.84313
Julio	21	0.8680	0.2582	0.0209	0.2741	106.15801
Agosto	31	0.9059	0.2918	0.0237	0.2908	99.65729
Septiembre	19	0.7248	0.1761	0.0433	0.1746	99.14821
Octubre	20	1.1337	0.2149	0.0128	0.2692	125.26756
Noviembre	20	0.8430	0.1914	0.0063	0.2102	109.82236
Diciembre	21	1.4819	0.3577	0.0133	0.4588	128.2639

El coeficiente de regresión ($b=1.872$) obtenido de la regresión del POV en función de PT fue significativo ($F=156.877$; $P<0.05$), pero el coeficiente de determinación fue muy bajo $r^2= 0.353$ (Fig. 3.7). El crecimiento de POV fue alométrico negativo ($t= 7.570$; $P<0.05$).

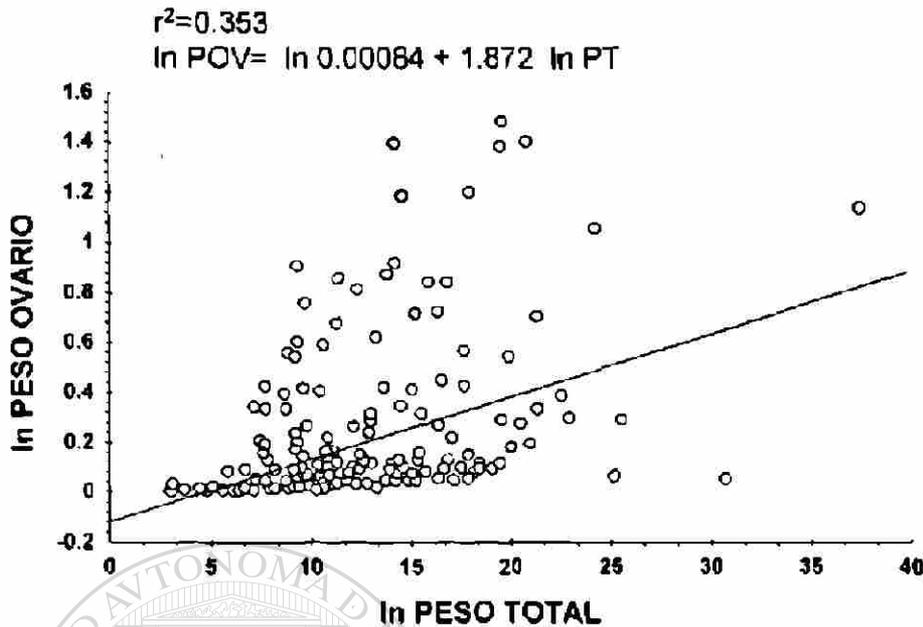


Fig. 3.7.- Relación de POV y PT de las hembras colectadas en 1998

3.3.5.- Índices Gonadosomáticos (IGS)

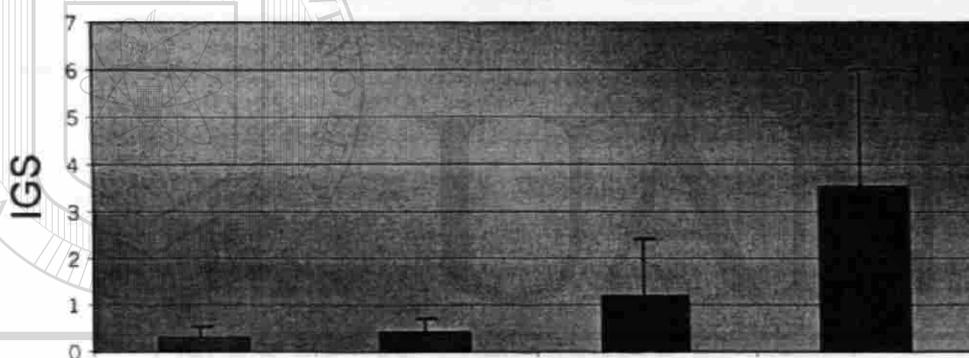
3.3.5.1.- IGS por estadio gonadal

Los valores promedio de IGS fueron diferentes en cada estadio (Tabla 3.9), los cuales se incrementaron hacia el estadio IV (3.5565). Estos datos fueron analizados con un ANOVA y se determinaron diferencias significativas en los distintos estadios de maduración ($F = 88.4532$; $P < 0.05$). De acuerdo a la prueba de Duncan, los IGS se agrupan en tres subconjuntos, uno formado por los IGS de los estadios I y II, los cuales no presentan diferencias significativas, un segundo subconjunto que incluyó solo al IGS del estadio III y el tercer subconjunto formado por el IGS del estadio IV, por lo tanto el IGS de los estadios III y IV difirieron entre sí y con el subconjunto formado por el estadio I y II (Tabla 3.10 y Fig. 3.8).

Tabla 3.10.- Valores del Índice Gonadosomáticos por estadio gonadal.

Estadio	No. Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (CV)
I	48	1.4685	0.2878*	0.0951	0.2227	77.38012
II	108	2.5761	0.4117*	0.0775	0.2880	69.95384
III	65	6.1973	1.1604**	0.2173	1.2560	108.23853
IV	69	9.7923	3.5565***	0.6042	2.4635	69.26753

Fig. 3.8 Índices Gonadosomáticos por estadio gonadal.

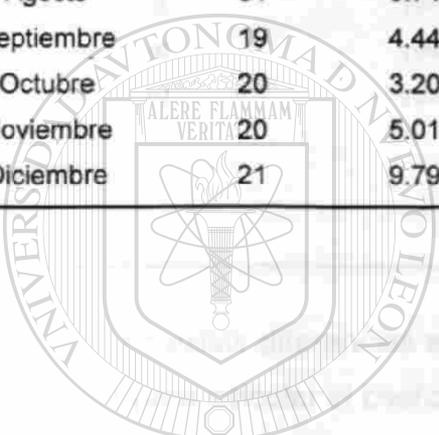


3.3.5.2.- IGS mensual

Los IGS mensuales, sin considerar el estadio gonadal, presentaron diferencias significativas a lo largo del ciclo anual, registrándose los valores promedio más altos durante los meses de Diciembre-Enero y Julio-Agosto (2.6154, 2.8645, 2.155 y 2.9204, respectivamente). Todos los valores promedio fueron significativamente diferentes de acuerdo a un ANOVA con una $F = 8.5582$; $P < 0.05$. Además, se realizó una prueba de Duncan con un 95% de confianza, observándose que los meses de Diciembre, Enero, Julio y Agosto, marcaron una diferencia significativa con respecto al resto (Tabla 3.11 y Fig. 3.9).

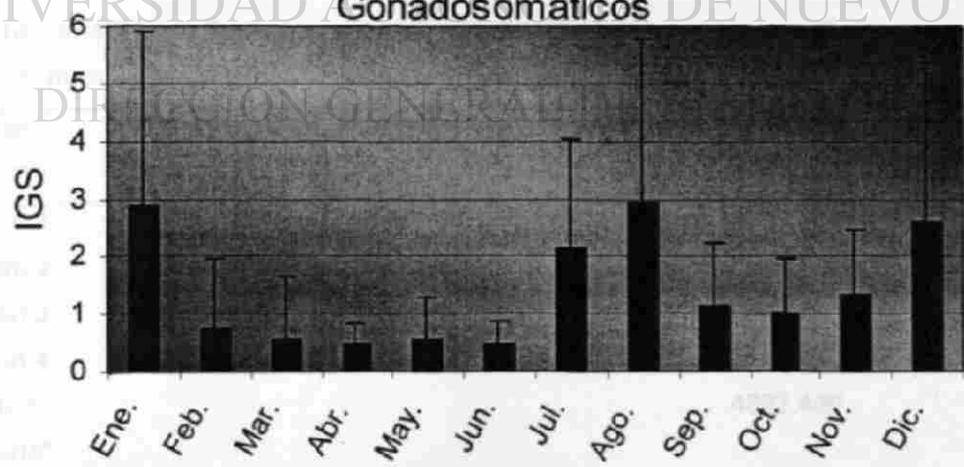
Tabla 3.11.- Índices Gonadosomáticos por mes de colecta.

Mes	Número de Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de Variación (CV)
Enero	15	8.1075	2.8645	0.4232	3.0662	107.04136
Febrero	25	6.3273	0.7222	0.0951	1.2270	169.89753
Marzo	26	5.4805	0.5376	0.0775	1.1120	206.84523
Abril	35	1.9833	0.4401	0.1377	0.3981	90.45671
Mayo	36	4.6058	0.5455	0.1968	0.7544	138.29514
Junio	21	1.6587	0.4749	0.1100	0.3850	81.06969
Julio	21	7.4833	2.1550	0.4644	1.8850	87.47099
Agosto	31	9.7409	2.9204	0.3825	2.8550	97.76058
Septiembre	19	4.4466	1.1508	0.1834	1.0870	94.45603
Octubre	20	3.2000	1.0156	0.1265	0.9684	95.3525
Noviembre	20	5.0179	1.3099	0.2333	1.1730	89.54882
Diciembre	21	9.7923	2.6154	0.1919	2.7210	104.03762



UANL

Fig. 3.9 Comparación mensual de Índices Gonadosomáticos



3.3.6. Índice Gonadal Relativo (IGR)

La comparación múltiple de las pendientes (b) obtenidas entre W (Peso del ovario) y S (Diferencia entre el peso somático menos y el peso del ovario) permitió determinar la ausencia de diferencias significativas entre los cuatro estadios gonadales ($F=0.0474$; $P>0.05$) (Tabla 3.12).

Tabla 3.12.- Ecuaciones y valores de a y b obtenidas de la relación W (Peso del ovario) en función de S (Peso de la hembra - Peso del ovario).

Estadio gonadal	Ecuación	Hipótesis y Decisión
I	$W=0.00104 S^{1.4203}$	$H_0: b_1 = b_2 = b_3 = b_4$ Se acepta H_0 $F=0.0474$; $P>0.05$
II	$W=0.00424 S^{0.9277}$	
III	$W=0.00573 S^{1.1606}$	
IV	$W=0.05980 S^{0.7047}$	

Al no existir diferencias entre los coeficientes de regresión, se utilizó un ANCOVA para calcular el coeficiente de regresión común que tuvo un valor de 1.084 (Tabla 3.13).

Tabla 3.13.- Análisis de Covarianza de la regresiones de los cuatro estadios gonadales, para calcular el coeficiente de regresión común.

Relación	$\sum X^2$	$\sum XY$	$\sum Y^2$	n	B	SC Residual	G.L. Residual
Regresión 1	9.139	12.981	1561.242	48	1.4203	1542.8041	46
Regresión 2	14.797	13.728	2421.454	108	0.9277	2408.718	106
Regresión 3	8.531	9.902	759.940	65	1.1606	748.447	63
Regresión 4	7.478	5.270	196.174	69	0.7047	192.460	67
Regresión "combinada"						4892.430	282
Regresión común	39.947	41.882	4938.811		1.0484	4894.900	
Regresión Total				290			288

Considerando los anteriores análisis para obtener un coeficiente de regresión (b) común, la ecuación para determinar los IGR de cada estadio gonadal quedaría de la siguiente manera (Tabla 3.14):

Tabla 3.14.- Ecuación del $IGR = a W/S^b$ para cada estadio gonadal.

Estadio gonadal	Ecuación
I	$IGR = 0.00104 W/S^{1.0484}$
II	$IGR = 0.00424 W/S^{1.0484}$
III	$IGR = 0.00573 W/S^{1.0484}$
IV	$IGR = 0.05980 W/S^{1.0484}$

Los valores mínimos y máximos del IGR fueron 0.0000009 y 0.005822, respectivamente, esto es sin considerar el estadio gonadal. Los valores promedio por estadio gonadal se presentan en la Tabla 3.15. De acuerdo al ANOVA y la prueba de Duncan, los valores promedio de los estadios I, II y III no difirieron entre ellos, sin embargo, difirieron significativamente con el valor promedio del estadio IV ($F=137.5096$; $P<0.05$).

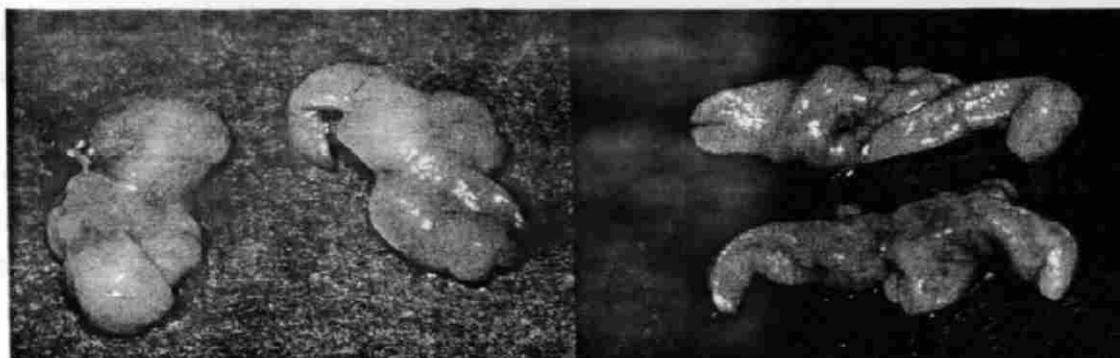
Tabla 3.15.- Valores del índice gonadal relativo (IGR) por estadio gonadal.

Estadio	No. Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (CV)
I	48	0.1380^{04}	0.0000027	0.900^{06}	0.000002089	74.07
II	108	0.1008^{03}	0.0000157	0.290^{05}	0.000011225	71.33
III	65	0.3381^{03}	0.0000606	0.112^{04}	0.000067827	111.88
IV	69	0.5822^{02}	0.0019855	0.322^{03}	0.00143857	72.45

3.3.7. Color y Peso del Hepatopáncreas.

El hepatopáncreas presentó una coloración que varió de acuerdo al estadio gonadal de las hembras, las tonalidades fueron verde-café para el estadio I, amarillo claro para el estadio II y III, mientras que para el estadio IV fue de un

color amarillo fuerte. En la siguiente figura se presenta el hepatopáncreas de hembras del tercer y cuarto estadio gonadal.



Hepatopáncreas de hembras estadio III Hepatopáncreas de hembras estadio V

Los pesos máximos y mínimos del hepatopáncreas fueron 0.1038 y 1.9710. Los valores promedio del peso del hepatopáncreas (PH) agrupados por estadio gonadal presentaron una tendencia de incremento del estadio I al III, para decrecer en estadio IV (Tabla 3.16). De acuerdo al ANOVA y a la prueba de Duncan estos valores fueron diferentes entre el estadio I y II, y ambos difirieron con los estadios III y IV, en estos dos últimos no se encontraron diferencias significativas ($F=24.922$; $P<0.05$).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 Tabla 3.16.- Valores del peso del hepatopáncreas (PH) para cada estadio gonadal. [®]

Estadio	Número de ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (CV)
I	48	0.8448	0.3979	0.1038	0.1669	41.9452
II	105	0.9686	0.5188	0.2299	0.1525	29.3947
III	63	1.9710	0.6997	0.1370	0.2894	41.3605
IV	69	1.4700	0.6745	0.2831	0.2494	36.9755

Los valores del PH agrupados por mes de muestreo indicaron que en Octubre y Noviembre se presentaron los valores máximos y mínimos absolutos, respectivamente. Mientras que, Mayo y Octubre se observaron los valores promedio mínimo (0.4391) y máximo (0.8033), respectivamente (Tabla 3.17).

Estos promedios de acuerdo al ANOVA y la prueba de Duncan fueron subclasificados en 5 grupos que no presentaron diferencias significativas.

Tabla 3.17.- Datos del peso del hepatopáncreas (PH) por mes de recolección.

Mes	Número de Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
Enero	15	0.9882	0.7009	0.4258	0.1816	25.9095
Febrero	25	0.8863	0.5575	0.1442	0.2095	37.5784
Marzo	22	1.1035	0.5783	0.2024	0.2112	36.5208
Abril	35	0.8207	0.4896	0.2375	0.1540	31.4542
Mayo	35	0.7985	0.4391	0.2299	0.1370	31.2001
Junio	21	0.9012	0.5052	0.1634	0.1698	33.6104
Julio	21	0.8447	0.5316	0.2784	0.1561	29.3641
Agosto	31	0.8151	0.4818	0.1370	0.1437	29.8256
Septiembre	19	1.1660	0.7259	0.3379	0.2392	32.9521
Octubre	20	1.9710	0.8033	0.2333	0.4022	50.0684
Noviembre	20	1.4700	0.7232	0.1038	0.3274	45.2710
Diciembre	21	1.5810	0.6425	0.2997	0.2609	40.6070

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El coeficiente de regresión ($b=0.875$) de la relación del PH vs. PT fue significativo ($F=797.334$; $P<0.05$) (Fig. 3.10). La correlación existente entre ambas variables fue de 0.738. El crecimiento de PH fue alométrico negativo ($t=68.54$; $P<0.05$).

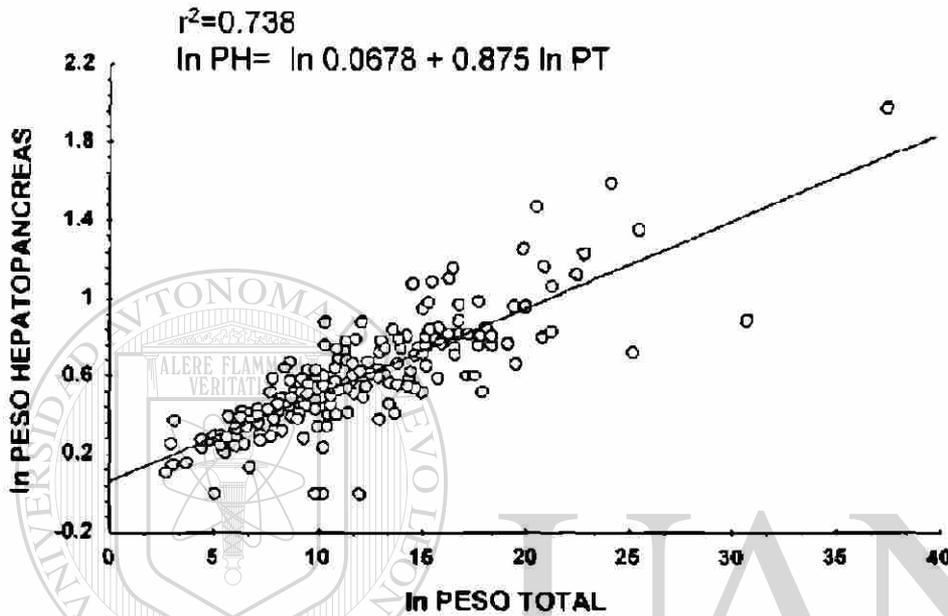


Fig. 3.10.- Relación de PH y PT de las hembras colectadas en 1998

El análisis de regresión de los valores absolutos del POV y PH sin considerar el estadio gonadal fue significativo de acuerdo al ANOVA ($F=132.976$; $P<0.05$), sin embargo, el valor del coeficiente de determinación ($r^2=0.320$) fue muy bajo (Fig. 3.11). El crecimiento de POV fue alométrico negativo ($t=8.33$; $P<0.05$).

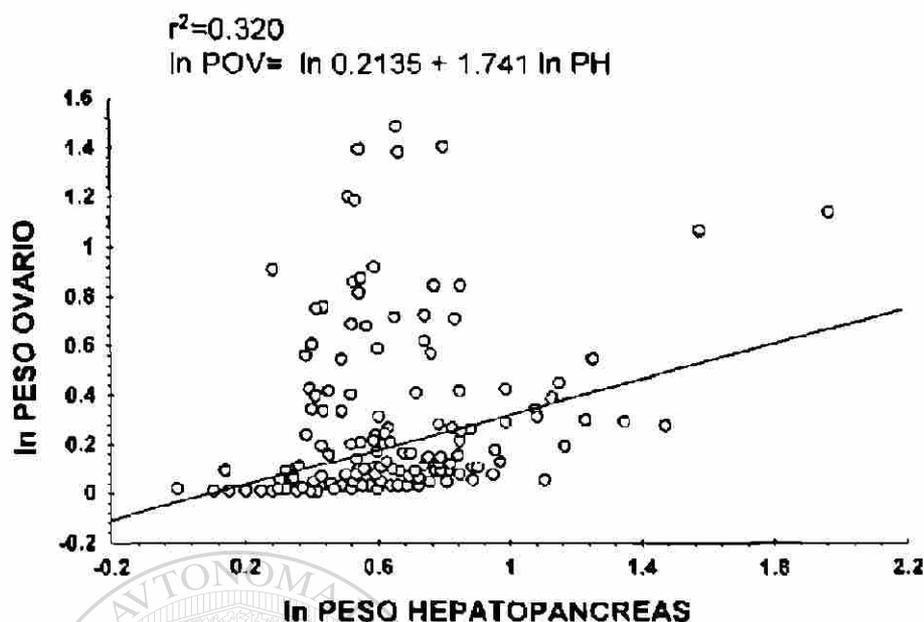


Fig. 3.11.- Relación de POV y PH de las hembras colectadas en 1998

3.3.8. Índices Hepatosomáticos (IHS)

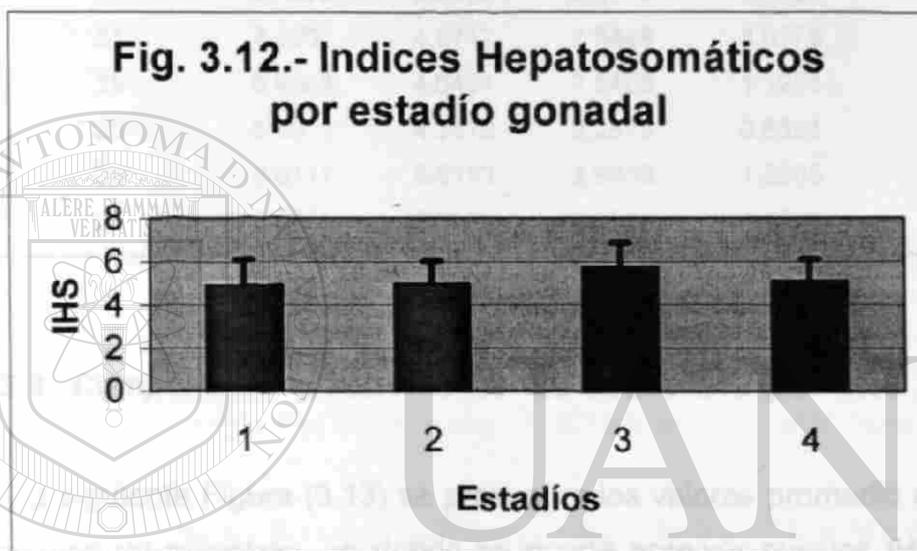
3.3.8.1.- Índices Hepatosomáticos por estadio gonadal

El rango de los Índices Hepatosomáticos (IHS) fue de 2.044 a 11.864 en las hembras examinadas. Se observó una tendencia de incremento en los valores promedio de los tres primeros estadios (4.914- 5.741), para disminuir este valor en el estadio IV. De acuerdo al ANOVA y la prueba de Duncan, los IHS de los estadios I, II y IV difieren significativamente con el IHS del estadio III ($F=7.759$; $P<0.05$) (Tabla 3.18 y fig. 3.12).

Tabla 3.18.- Valores de los Índices Hepatosomáticos (IHS) por estadio gonadal.

Estadio	Número de ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (CV)
I	48	8.5345	4.9140	2.2873	1.1792	23.9967
II	105	11.8645	4.9855	2.8488	1.0693	21.4481
III	63	8.5117	5.7410	2.0448	1.1323	19.7230
IV	69	7.1707	5.1079	2.8609	1.0039	19.6538

Fig. 3.12.- Índices Hepatosomáticos por estadio gonadal



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3.8.2.- Índices Hepatosomáticos mensuales

Los IHS promedio por mes, sin considerar el estadio gonadal, fueron en Enero (4.366) y en Diciembre (5.959), los valores mínimo y máximo, respectivamente (Tabla 3.19). Por medio del análisis de varianza y la prueba de Duncan se determinaron 5 subgrupos de IHS mensuales, donde cada grupo difirió significativamente de los demás grupos ($F=4.373$; $P<0.05$).

Tabla 3.19.- Valores de los Indices Hepatosomáticos por mes de recolección.

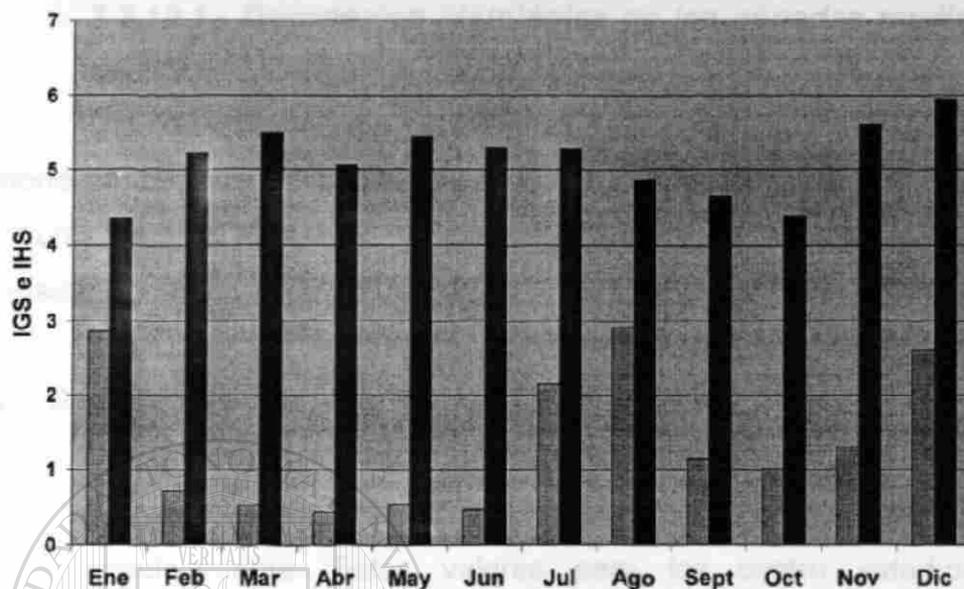
Mes	Número de Ejemplares	Máximo	Promedio	Minimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
Enero	15	5.7655	4.3465	2.8609	0.7528	17.3196
Febrero	25	7.4462	5.2787	3.5380	1.1292	21.3916
Marzo	22	8.5345	5.5005	3.6800	1.0645	19.3527
Abril	35	7.0058	5.0694	3.5827	0.8894	17.5444
Mayo	35	11.8645	5.4564	3.9583	1.3027	23.8747
Junio	21	6.4582	5.2961	4.3243	0.5201	9.8204
Julio	21	6.7299	5.2903	2.9473	1.0125	19.1388
Agosto	31	7.2603	4.8712	2.0448	1.0775	22.1198
Septiembre	19	6.9968	4.6464	2.8488	1.1286	24.2897
Octubre	20	5.3810	4.3913	2.2873	0.8391	19.1082
Noviembre	20	8.5117	5.6153	3.5430	1.3363	23.7974
Diciembre	21	7.7826	5.9599	3.3724	1.1835	19.8577

3.3.9. Comparación y relación de los IGS e IHS por mes y estadio gonadal

En la siguiente Figura (3.13) se presentan los valores promedio de los IGS e IHS por mes de muestreo, en donde se puede apreciar que los IHS siempre presentaron valores más altos que los IGS.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig. 3.13.- INDICES GONADOSOMATICOS (IGS) EN AZUL E INDICES HEPATOSOMATICOS (IHS) EN ROJO PARA HEMBRAS COLECTADAS EN 1998



De acuerdo al análisis de regresión entre IGS e IHS, sin considerar el estadio gonadal, no existió una relación significativa entre ambos índices ($F=0.344$; $P>0.05$).

En la Tabla 3.20, se presenta una comparación de los IGS e IHS por estadio gonadal, en donde se observa que los valores del IHS fueron más altos que los del IGS.

Tabla 3.20.- Valores promedio y desviación estándar de los IGS e IHS por estadio gonadal de las hembras de *Procambarus clarkii*, colectadas en 1998.

ESTADIOS	IGS		IHS	
	n	X	n	X
I	58	0.2878 (0.2227)	58	4.9140 (1.1793)
II	133	0.4117 (0.2880)	130	4.9855 (1.0693)
III	92	1.1604 (1.2560)	90	5.7410 (1.1324)
IV	85	3.5565 (2.4635)	85	5.1080 (1.0040)

3.3.10. - Histología gonadal

3.3.10.1.- Descripción histológica de las gónadas mediante la técnica de H y E

Usando esta técnica se lograron determinar las principales características morfo-anatómicas de los ovocitos en sus diferentes estadios gonadales. En las Figuras de la 3.15 a 3.17, se presentan microfotografías de ovocitos de distinto estadio gonadal.

a).- Diámetro de ovocitos

Los diámetros promedio de los ovocitos mostraron una tendencia hacia el incremento que varió desde 170.9149 μm hasta 760.6388 μm para los estadios I y IV, respectivamente. Estos valores para los cuatro estadios presentaron diferencias significativas de acuerdo al ANOVA ($F= 85.0275$; $P < 0.05$) y la prueba de Duncan, donde se observó que el diámetro de los ovocitos de los estadios I y IV difirió de los del tercer y cuarto estadio. Sin embargo, cabe resaltar que los rangos máximos y mínimos absolutos presentaron un traslape en cada estadio (Tabla 3.21 y Fig. 3.14).

Tabla 3.21.- Diámetros de los ovocitos por estadio gonadal (en μm).

Estadio gonadal	N	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
I	31	343.6176	170.9149	22.1689	69.5631	40.70043
II	33	509.8842	324.1359	210.6044	82.9035	25.57677
III	34	620.7286	394.8017	210.6044	104.6243	26.50046
IV	45	1285.7950	760.6388	243.8577	247.949	32.59746

Fig. 3.14.- Comparación del diámetro de los ovocitos por estadio gonadal.

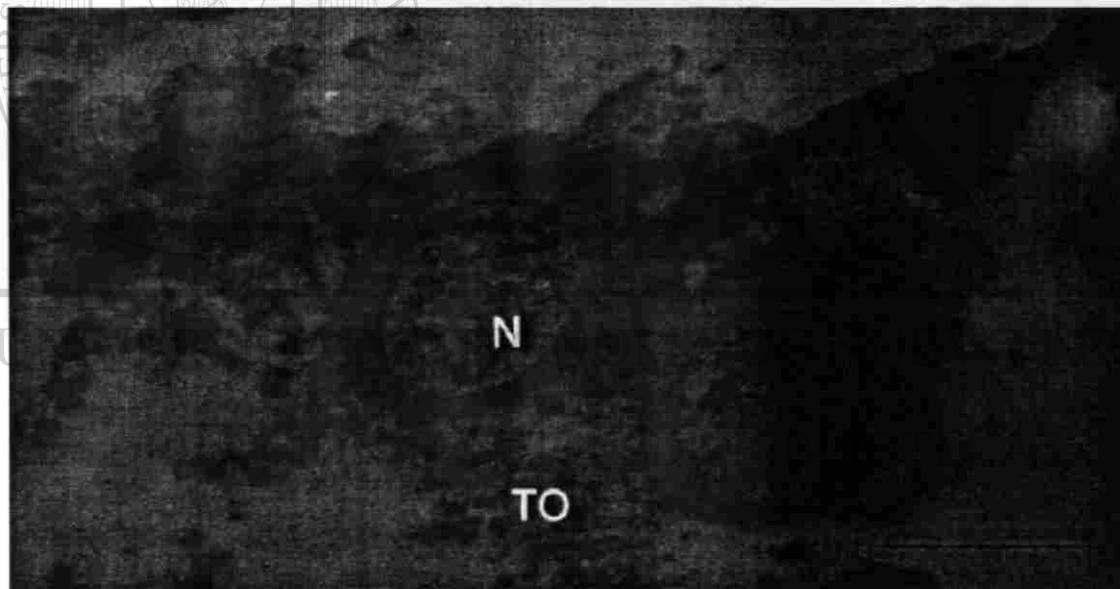
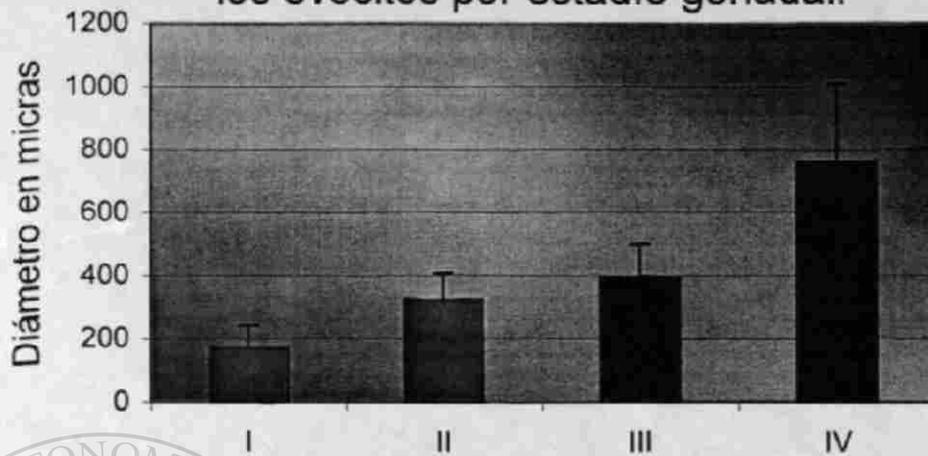


Fig. 3.15.- Cortes transversales (10 X) de ovario en Estadio I donde se puede observar el Núcleo (N) y Tejido ovárico (TO) (Hematoxilina de Harris y Eosina). Barra de calibración = 77.6 μm .

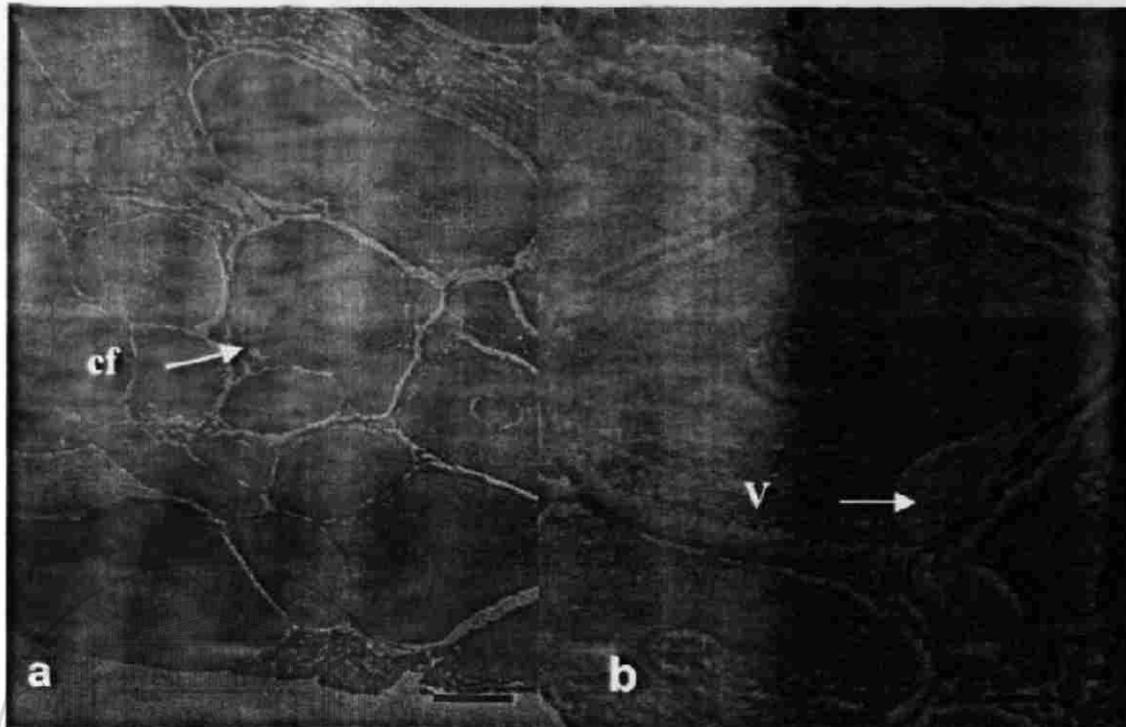


Fig. 3.16.- Corte transversal de ovario, a) Estadío II (4.1X).- La flecha indica las células foliculares (Cf) alrededor del ovocito (barra de calibración = 129.65 μm); b) Estadío III (10X.- ovocito con vacuola (V), característica distintiva de este estadío (Barra de calibración = 52.6402 μm), (Hematoxilina de Harris y Eosina).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

... del I al II, pero se presentó un decremento del estadío II al III. Al

®

la DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

... significativas. Desde el estadío III al que siguió el IV, de acuerdo a la

... de Dorsani, sin embargo encontramos un traslapo entre los rangos de los

... unidades gonadales (Tabla 3-22 y Fig. 3-16).

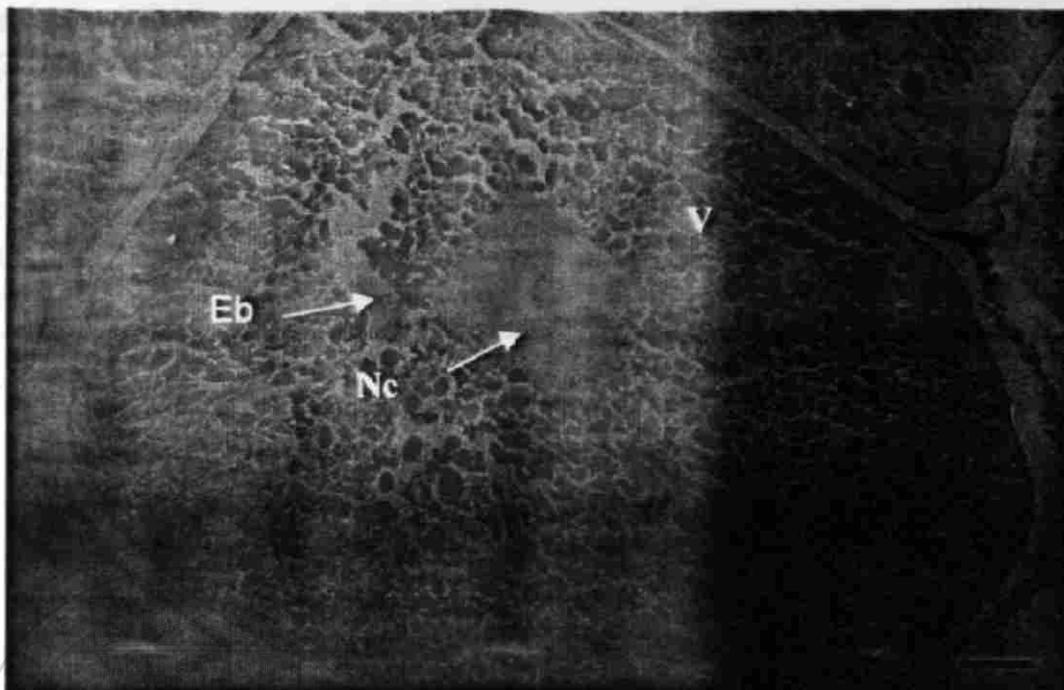


Fig. 3.17.- Corte de ovario (10 X) en Estadío IV: Se observan los nucleolos (Nc), algunas gotas de vitelo (V) y la presencia de espacios blancos (Eb) intracelulares como una característica de reabsorción del ovario (Hematoxilina de Harris y Eosina). Barra de calibración = 60.8511 μ m.

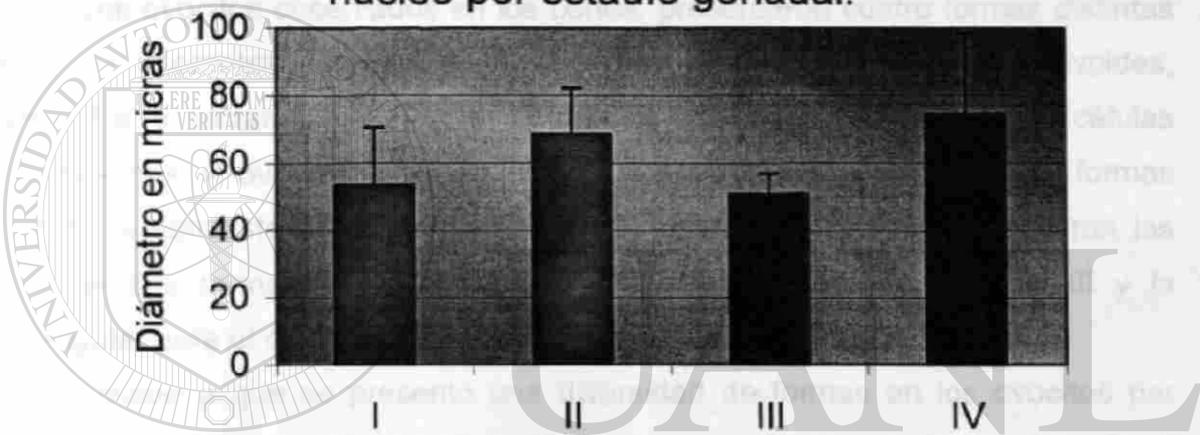
b).- Diámetros de los núcleos

Los valores promedio del diámetro de los núcleos se incrementaron del estadio gonadal I al II, pero se presentó un decremento del estadio II al III. Al analizar los datos mediante un ANOVA ($F= 5.0233$; $P<0.05$) se encontraron diferencias significativas, siendo el estadio III el que difirió del IV, de acuerdo a la prueba de Duncan, sin embargo encontramos un traslape entre los rangos de los distintos estadios gonadales (Tabla 3.22 y Fig. 3.18).

Tabla 3.22.- Diámetro de los núcleos por estadio gonadal.

Estadio	n	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
I	31	84.015	53.4805	16.803	17.1473	32.06271
II	33	103.6185	68.5698	42.0075	13.6681	19.93311
III	29	64.4115	50.98841	39.207	6.098	11.95958
IV	29	126.025	74.53783	33.606	24.0441	32.25757

Fig. 3.18.- Comparación del diámetro del núcleo por estadio gonadal.



Al igual que en el diámetro de los ovocitos y los núcleos, la relación núcleo/citoplasma también presentó un incremento a medida que avanzaba el proceso de maduración gonadal. Tal como lo muestra la Tabla 3.23. Se presentó una relación núcleo/citoplasma de 1:3 como la mínima relación para el estadio I, mientras que la mayor relación se presentó en el estadio IV siendo para este de 1:10.

Tabla 3.23.- Relación núcleo/citoplasma en los diferentes estadios gonadales.

Estadio	Relación núcleo/citoplasma
I	1:3
II	1:5
III	1:7
IV	1:10

c).- Forma de los ovocitos

Los ovocitos observados en los cortes, presentaron cuatro formas distintas entre los diferentes estadios gonadales, siendo estos semiesféricos, ovoides, cuadrados y rectangulares. En el estadio I, solamente se observaron células semiesféricas y ovoides, para el estadio II se presentaron todas las formas excepto la semiesférica, mientras que en el estadio III y IV se presentaron las primeras dos formas, además de la forma cuadrada para el estadio III y la rectangular para el estadio IV. (Tabla 3.24 y Figs. 3.19 y 3.20).

Debido a que se presentó una diversidad de formas en los ovocitos por estadio gonadal, se seleccionaron los que presentarían un mayor tamaño y abundancia en los cortes revisados.

Tabla 3.24.- Comparación de las formas de los ovocitos para cada estadio gonadal.

Estadio gonadal	Forma del ovocito			
	Semiesférico	Ovoide	Cuadrado	Rectangular
I	*	*		
II		*	*	*
III	*	*	*	
IV	*	*		*



Fig. 3.19.- Formas de los ovocitos por estadio gonadal.

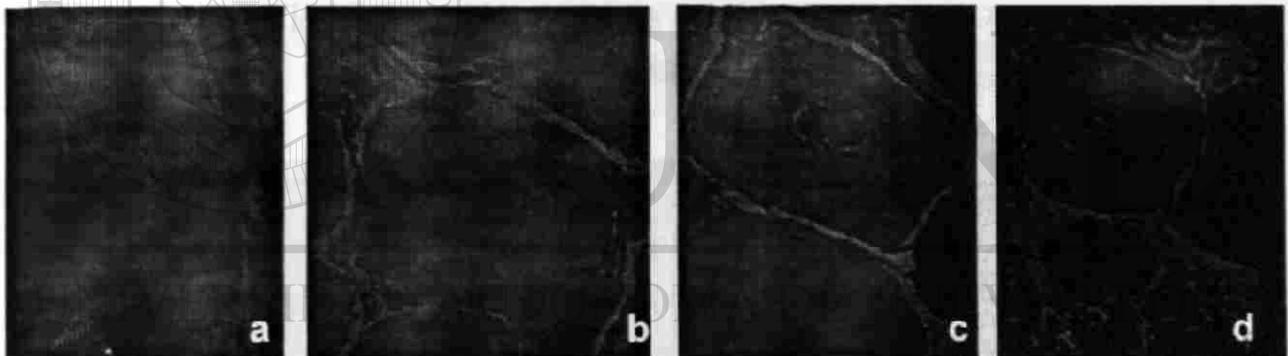


Fig. 3.20.- Cortes de ovario (10 X) con ovocitos de diferentes formas que se presentaron en diversos estadios. a) ovoide, b) semiesférico, c) rectangular y d) cuadrado. (a, Acido Periodico- Reacción de Schiff; b, c y d Hematoxilina de Harris y Eosina).

d).- Número de nucleolos

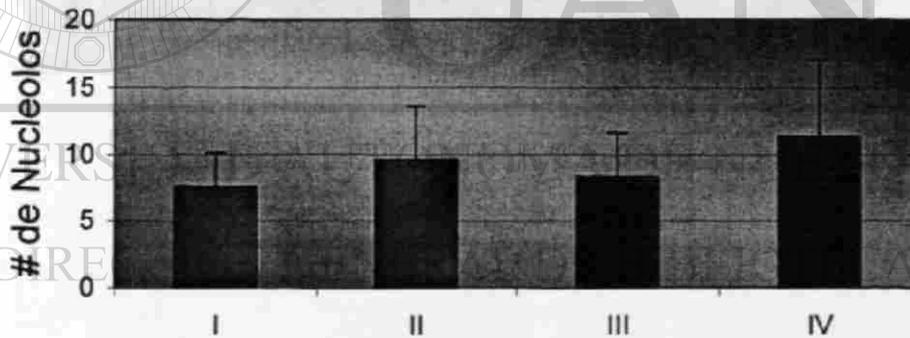
El número mínimo de nucleolos por estadio fue similar (2-4), sin embargo, el número máximo varió en los distintos estadios. En el estadio I, se cuantificaron 13 nucleolos, mientras que para el estadio IV se lograron observar hasta 23. Los

valores promedio fueron evaluados por medio de un ANOVA y se encontraron diferencias significativas entre estos ($F= 4.5161$; $P< 0.05$). Por medio de una prueba de separación de medias se pudieron clasificar en tres grupos: 1) Estadio I (13); 2) estadio II (19) y III (20); 3) y estadio IV (23). (Tabla 3.25 y Fig. 3.21).

Tabla 3.25.- Comparación del número de nucleolos por estadio gonadal.

Estadio	Grupo	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
I	1	13	7.5806	3	2.5136	33.15832
II	2	19	9.5758	4	3.9846	41.61114
III	3	20	8.2903	3	3.3085	39.90808
IV	3	23	11.3333	2	5.7213	50.4822

Fig. 3.21.- Número de nucleolos por estadio gonadal.



e).- Presencia de Vacuola y Zona perinuclear

Una característica única y distintiva del estadio vitelogénico intermedio de acuerdo a la clasificación de Kulkarni *et al.* (1991), es la presencia de una vacuola en la periferia del ovocito, la cual solo se observó en ovocitos en estadio III.

Por otra parte, tanto el estadio vitelogénico intermedio como el tardío, se distinguieron por presentar una zona perinuclear, según lo reportado por Kulkarni

et al. (1991). Esta característica se presentaron en ovocitos pertenecientes a todos los estadios, siendo más frecuentes en los estadios III y IV (Tabla 3.26 y Figs. 3.22, 3.23 y 3.24).

Tabla 3.26.- Presencia de zona perinuclear y vacuola por estadio gonadal.

Estadio	Zona Perinuclear	Vacuola	Zona perinuclear y vacuola a la vez
I	Presente	Ausente	Ausente
II	Presente	Ausente	Ausente
III	Presente	Presente	Presente
IV	Presente	Ausente	Ausente

Fig. 3.22.- Presencia de zona perinuclear y vacuola en los diferentes estadios gonadales.



■ Zona perinuclear (ZP) ■ Vacuola (V) ■ ZP y V

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

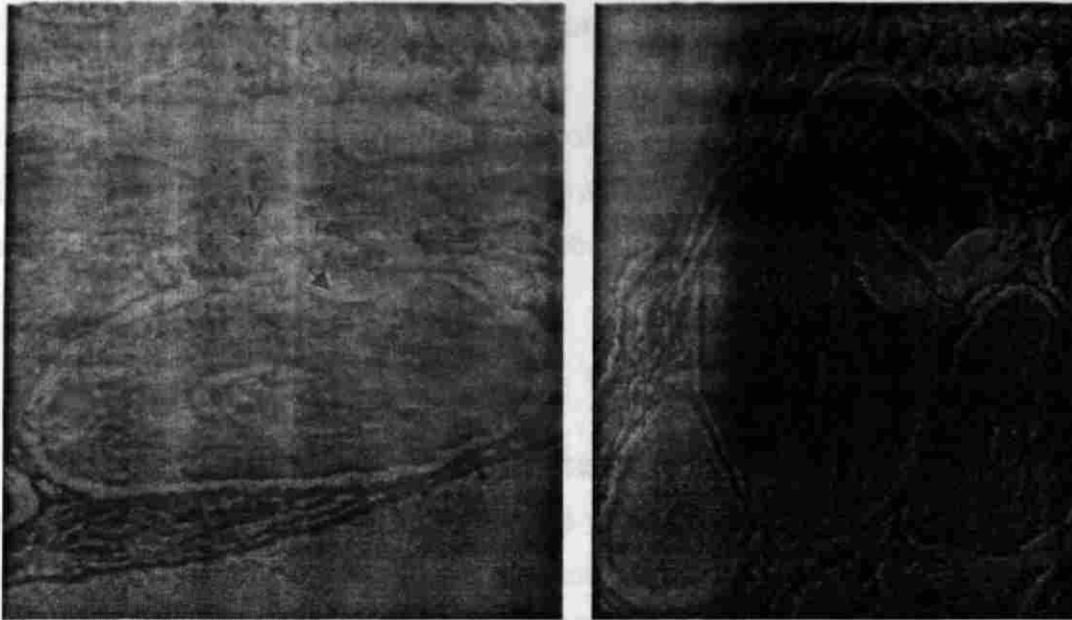


Fig. 3.23- Cortes de ovario (10 X) en estadio III. Presencia de vacuolas, distintivas de este estadio (Hematoxilina de Harris y Eosina). Barra de calibración = 52.6402.

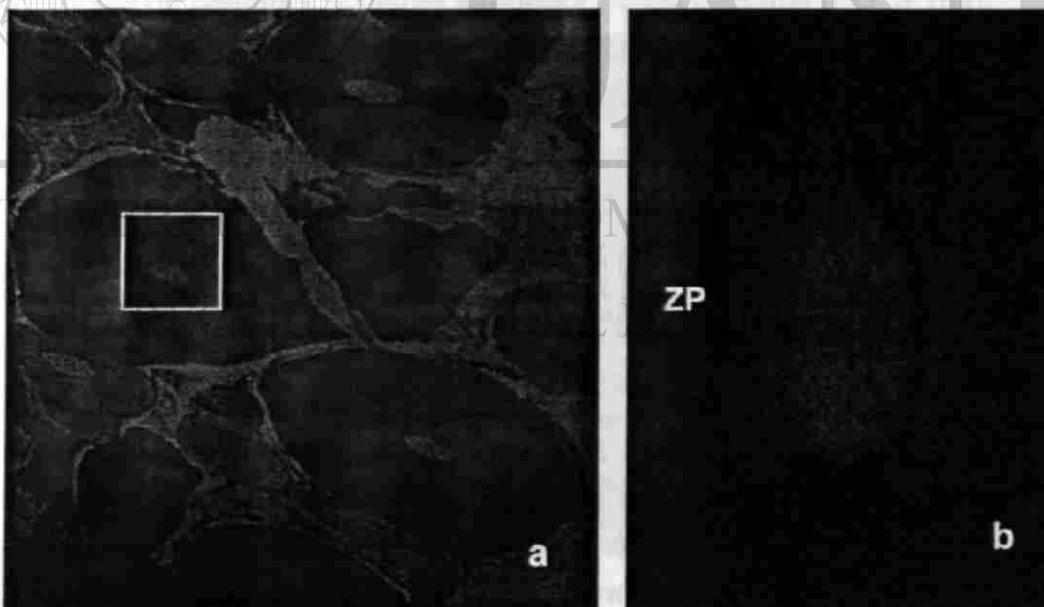


Fig. 3.24.- a) Corte de ovario en estadio III (10 X, Acido Periódico-reacción de Schiff); b) Ampliación de la zona perinuclear (Zp) (40 X), (Acido Periódico-Reacción de Schiff). Barra de calibración = 52.6402.

Cabe mencionar que en un mismo corte histológico se presentaron ovocitos de diferentes diámetros que representan diferentes estadios gonadales, esto explica el hecho de que en ovarios de estadio I y II se encuentre presente la zona perinuclear en algunas células, pero en menor proporción comparado con los estadios III y IV, lo cual viene a corroborar la continuidad del proceso de maduración.

f).- Espacios citoplasmáticos

Una característica que se observó comúnmente en los cortes de ovocitos en estadio IV fue la presencia de pequeños y numerosos espacios, que indicaban la reabsorción del ovocito. Esta característica también se presentó en ovocitos de estadio III, pero en menor cantidad (Fig. 3.25).

g).- Células foliculares

En los estadios del II al IV se presentó otra característica que corresponde a la presencia de células foliculares alrededor de los ovocitos (Fig. 3.16a).



Fig. 3.25.- Corte de ovario en estadio IV donde se pueden observar una gran cantidad de espacios. a) 40X; b) 10X (Acido Periódico-Reacción de Schiff).

Todas las características morfológicas anteriormente mencionadas se presentan de manera comparativa en la Tabla 3.27.

Tabla 3.27.- Comparación de las principales características histológicas de los ovocitos por estadio gonadal.

CARÁCTER	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Diámetro del ovocito (X)	170.9149	324.1359	394.8017	760.6388
Diámetro del núcleo (X)	53.4805	68.5698	50.98841	74.53783
# de nucleolos	7.5806	9.5758	8.2903	11.3333
Forma del Ovocito	Semiesférico u ovoide	Semiesférico, ovoide, cuadrado y rectangular	Semiesférico, ovoide y cuadrado	Semiesférico, ovoide y rectangular
Presencia de Vacuola	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
Presencia de zona perinuclear	Presente	Presente	Presente	Presente
Zona perinuclear y vacuola	Ausente	Ausente	Presente	Ausente

3.3.11.- Características histoquímicas de los ovocitos.

3.3.11.1.- Observación de glicoproteínas

Utilizando la técnica de Acido periódico-Reacción de Schiff (PAS) se observaron resultados positivos desde el primer estadio gonadal, lo cual indica la presencia de glicoproteínas desde esta primera fase.

En la Fig. 3.26, se observan las reacciones positivas de los ovocitos para esta técnica, considerando la presencia de los gránulos de glicoproteínas en el citoplasma del ovocito, las cuales se tiñeron de un color morado claro a intenso dependiendo del estadio gonadal.

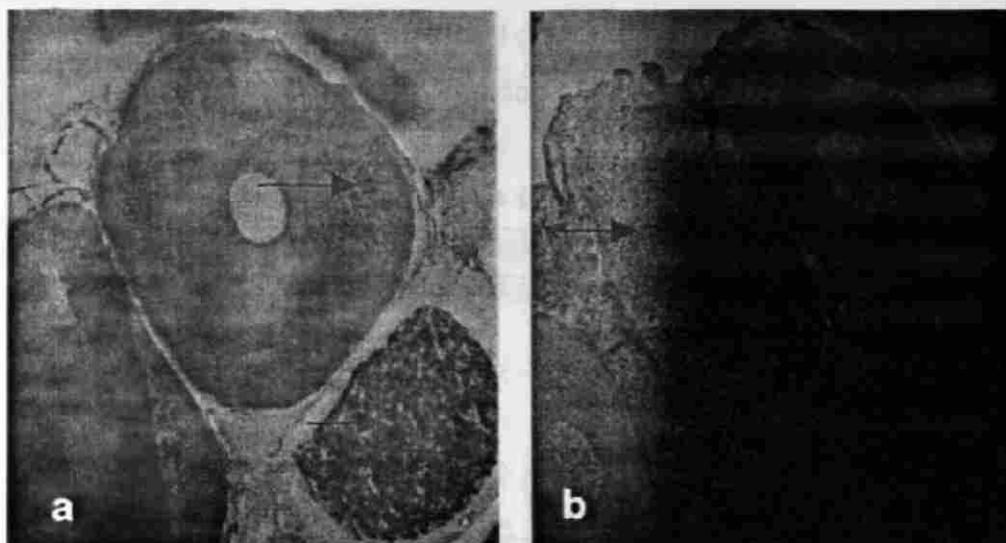


Fig. 3.26.- Cortes de ovario (10 X) con reacción positiva al Acido Periódico-Reacción de Schiff. Gránulos de glicoproteínas indicados por flechas; a) Estadío III, Barra de calibración = 52.6402; b) Estadío IV, Barra de calibración = 60.8511; (Acido Periódico- Reacción de Schiff).

3.3.11.2.- Observación de lípidos

Mediante el uso de la técnica de Black Sudan B, se observó a diferencia de la técnica de PAS, que solamente los estadíos III y IV presentaron una reacción positiva, ya que se observaron gránulos de vitelo teñidos de color azul intenso hasta negro. Para los estadíos I y II la reacción fue negativa por lo que no se observó ningún gránulo teñido. De aquí que esta técnica podría considerarse como la más adecuada para indicar el inicio de la vitelogénesis.

Cabe mencionar que las reacciones de esta tinción, solo se pueden observar por poco tiempo, ya que con la exposición a la luz desaparece la coloración producida en los lípidos.

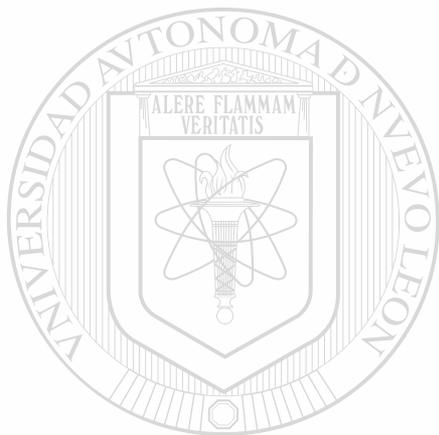
3.3.11.3.- Comparación de las técnicas de PAS y BSB

Los resultados positivos para ambas técnicas de tinción por separado, no indican con exactitud la presencia de la lipo-glico-carotenoproteína. Por esta razón se utilizaron ambas técnicas para determinar en que fase de desarrollo gonadal se

inicia el proceso de vitelogenesis, lo cual ocurrió en los estadios III y IV, en la tabla 3.28, se presentan los resultados obtenidos para las dos técnicas.

Tabla 3.28.- Reacciones histoquímicas para cada estadio gonadal.

Estadio	Técnica Histológica	Técnica histológica
	Reacción de PAS	Reacción de BSB
I	Negativo	Negativo
II	Positivo	Negativo
III	Positivo	Positivo
IV	Positivo	Positivo



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4.- DISCUSION

3.4.1.- Caracterización de las gónadas

En los crustáceos decápodos, el ovario de las hembras durante su desarrollo presenta cambios en talla y color (Aiken y Waddy, 1980), además de su composición bioquímica (Suko, 1953; Charniux-Cotton, 1985; Yano y Chinzei, 1987; Yano, 1988, Browdy *et al.*, 1990; Spaargaren y Haefner, 1994). Estas características distintivas de las gónadas, han permitido establecer diversas clasificaciones del ovario en diferentes grupos de crustáceos (Woo-Koo, 1988), como en especies de camarones (Bomirski y Klek, 1974; Crocos y Kerr, 1983; Yano, 1988; Quackenbush, 1989; Quintio *et al.*, 1990; Haefner y Spaargaren, 1993; Medina *et al.*, 1996; Sandoval-Quintero y Gracia, 1998), cangrejos ermitaños (Varadarajan y Subramoniam, 1980), cangrejos braquiuros (Meredith, 1952; Lee y Puppione, 1988; Quackenbush y Keeley, 1988; Lee y Watson, 1995), langostinos (Bomirski y Klek, 1974; Tsumura y Nakagawa, 1989; Spaargaren y Haefner, 1994; Lee y Chang, 1997), acociles (Suko, 1953; Perryman, 1969; de la Bretonne y Avault Jr., 1976; France, 1987; Kulkarni *et al.*, 1991) y langostas (Aiken y Waddy, 1980; Talbott, 1981; Byard y Aiken, 1984; Minagawa y Higuchi, 1997).

En este estudio se adoptó la clasificación de gónadas propuesta por de la Bretonne y Avault Jr. (1976), quienes consideran cuatro estadios de desarrollo gonadal para *Procambarus clarkii*, en base al color y al tamaño de los ovocitos. Sin embargo, encontramos algunas diferencias en los colores propuestos para cada estadio, por ejemplo, en el estadio I, las gónadas no son totalmente blancas como lo indica esta clasificación, sino que pueden adquirir una tonalidad amarilla. Para el estadio II, sí coincidió con el color crema señalado, pero las mayores diferencias se observaron en los estadios III y IV, donde el color varió de marrón a diferentes tonos de café claro, hasta que el ovario adquiere un color café oscuro en el estadio IV.

Otro criterio para la clasificación de gónadas de *P. clarkii*, es el propuesto por Kulkarni *et al.* (1991), quienes consideran los aspectos histoquímicos de los ovocitos, para distinguir los diferentes estadios gonadales.

Los patrones de coloración del ovario cambian de un grupo de crustáceos a otros, y dichas variaciones están determinadas por la incorporación y concentración de vitelo exógeno al ovario (Bomirski y Klek, 1974; Croisille *et al.*, 1974; Webb, 1977; Aiken y Waddy, 1980; Lee y Puppione, 1988; Zagalski *et al.*, 1990), y en particular debido a la aparición o presencia de pigmentos carotenoides ligados a estas lipoproteínas extraovocitarias (Varadarajan y Subramoniam, 1980; Lee y Puppione, 1988; Quintio *et al.*, 1990; Chen y Chen, 1994; Alunno-Bruscia y Sainte-Marie, 1998). Estos pigmentos se concentran en el hepatopáncreas y pasan a la hemolinfa durante la vitelogénesis sirviendo como acarreadores que facilitan la entrada de las lipoproteínas al interior de los ovocitos (Varadarajan y Subramoniam, 1980); otra función de estas moléculas es proteger a las proteínas y a otras reservas alimenticias de la acción enzimática en los ovarios en desarrollo (Aiken y Waddy, 1980). En el último capítulo se presentaran con detalle las características de la VTG y VTL, pero podríamos mencionar que los pesos moleculares de la VTG y VTL fueron 521.8 y 512.6 KD, de las respectivamente. Estos elevados pesos moleculares son una consecuencia de la asociación de las proteínas con lípidos, glúcidos y grupos prostéticos carotenoides originados durante la vitelogénesis (Meusy, 1980).

Las carotenoproteínas de crustáceos dan un color al ovario que varía de naranja, azul, púrpura o verde (Zalgasky *et al.*, 1990). Adicionalmente, existen diferencias en la coloración de los ovarios según su desarrollo y madurez, así los ovarios inmaduros generalmente se caracterizan por presentar una coloración pálida, blanca o amarilla (Meredith, 1952; Ranking *et al.* 1989; Kulkarni *et al.*, 1991; Dubé y Portelance, 1992), mientras que los ovarios maduros pueden tener un color naranja (Meredith, 1952; Lee y Puppione, 1988, Nakamura, 1994), aunque pueden adquirir tonalidades de gris, verde, púrpura, y café oscuro hasta negro, depende del tipo de carotenoide que predomine en su dieta y del metabolismo del animal (Webb, 1977; Tsumura y Nakagawa, 1989; Kulkarni *et al.*, 1991; Aiken y Waddy, 1992; Dubé y Portelance, 1992). Sin embargo, Haefner y Spaargaren (1993), señalan que esta coloración puede ser un efecto de la fijación de los ovarios y a un cambio en el pH (Webb, 1977).

En acociles, como *P. clarkii* para su crecimiento y desarrollo se considera necesaria una dieta de origen vegetal, ya que esta contiene pigmentos carotenoides que dan color al tegumento y al hepatopáncreas, su carencia ocasiona un tegumento gris o azul pálido y un hepatopáncreas pequeño y con poco color (Aiken y Waddy, 1992).

3.4.2.- Muda

Los crustáceos decápodos pueden ser agrupados en tres categorías de acuerdo a la organización de los procesos de muda y crecimiento:

1).- Aquellos en los cuales la reproducción tiene lugar durante el largo período de intermuda (cangrejos, langostinos y acociles), es decir, los procesos de reproducción y crecimiento están programados como eventos antagónicos. En este caso, el período de intermuda es lo suficientemente largo para que ocurran uno o dos ciclos reproductivos, y los animales entran a un período corto de premuda solamente después de la oviposición y liberación de crías. 2).- Aquellos en los cuales el crecimiento gonadal y somático se manifiesta simultáneamente "sinergista" (isópodos y algunos camarones Natantia). En este caso, la intermuda es demasiado corta para que se lleve a cabo un ciclo ovárico y la premuda es larga. 3).- En otros decápodos, hay una ocurrencia rápida de la muda y la reproducción, por lo que se puede requerir algunos ciclos de muda, como en los cirripedios (Adiyodi y Subramoniam, 1983; Crocos y Kerr, 1983; Charniux-Cotton, 1985 y Quackenbush, 1986).

Como las interrelaciones de muda y reproducción varían de una especie a otra, el ciclo de muda debe ser considerado en cualquier estudio de reproducción. El efecto antagonista de muda y crecimiento, se observó en *Uca pugilator*, donde la frecuencia máxima de los procesos de muda coincide con el peso mínimo del ovario y viceversa (Webb, 1977). Otros estudios al respecto, fueron hechos con las especies *Palaemon paucidens*, *Macrobrachium rosenbregii*, *Palinurus argus* y *Procambarus clarkii*, donde se comprobó una interacción antagónica entre la muda y crecimiento del ovario (Quackenbush y Herrnkind, 1981; O'Donovan *et al.*, 1984; Tsumura y Nakagawa, 1989; Daniels *et al.*, 1994).

En este estudio se determinó que el 79.76% de las hembras se encontraron en el estado C (intermuda). De las 56 (19.24%) hembras en estado D (premuda), el 89.28% presentaron gónadas de los primeros estadios de desarrollo gonadal. Con estos resultados obtenidos se constata que el proceso de muda y crecimiento gonadal en esta especie de acocil son procesos antagónicos, tal como lo señalan Daniels *et al.* (1994), quienes observaron que las hembras no mudan una vez que hay un notable crecimiento ovárico (Vitelógenesis), y solamente mudan después del desove y cuando los juveniles son liberados de la madre. Del total de hembras recolectadas (291), se determinó que únicamente tres especímenes estuvieron en el estado de postmuda (recién mudados) y sus ovarios correspondían a los estadios I y II. En relación con esto, Tobías-Chavana (1991), menciona que en las hembras de *P. clarkii* que fueron epedunculadas se aceleró el desarrollo gonadal en especímenes que no mudaron y la presencia de muda tuvo un efecto negativo sobre el peso de la gónada y los IGS.

3.4.3.- Datos morfométricos

Los ejemplares utilizados en este estudio presentaron un incremento en los valores promedio de longitud del cefalotórax (LC) y peso total(PT), de un estadio de desarrollo gonadal a otro, pero de acuerdo a la prueba de Duncan (comparación de medias), solo se presentaron diferencias significativas entre la talla y peso de las hembras en estado I y III, y no así entre los estadios II y III. No obstante, que los promedios aumentaron en razón del estadio gonadal, se observó un traslape en las tallas y/o pesos entre los diferentes estadios de maduración gonadal.

Las hembras utilizadas presentaron distintas tallas, con un rango de 12 a 48.50 mm de LC, y lo que permitió la obtención tanto de ovarios maduros como inmaduros. En el género *Procambarus* la talla de madurez depende de factores ambientales (e.g. temperatura) y varía de 45 a 125 mm de LT (estos valores corresponden a 22.5 y 62.5 mm de LC) (Huner, 1988; Aiken y Waddy, 1992). En *Procambarus clarkii*, el crecimiento depende estrechamente del tipo de hábitat, así, en estanques temporales y reservorios la talla de madurez es de 57 a 76 mm

de LT (28 a 38 mm LC), mientras que en pantanos se registran tallas entre los 88 a 107 mm de LT (44 a 53 mm LC) (Huner y Barr, 1984). Por otra parte, Huner (1990), menciona que la talla de madurez en acociles está en función de las especies, potencial de crecimiento genético y condiciones ambientales, y esta talla oscila entre los 50-60 mm de LT (25 a 30 mm LC). En contraste, Somer (1984), menciona que hembras grávidas de *Procambarus clarkii* presentaron tallas de 36 a 56 mm de LC. Este último rango involucra sólo la LC, que representa casi la mitad de la LT, por lo que estas tallas equivalen a 72 y 112 mm de LT, lo que coincide con el rango en el que se produce la madurez sexual. De igual manera, la talla de las hembras utilizadas en el presente estudio permitió contar con especímenes con ovarios maduros. Kulkarni et al. (1991), utilizando hembras de 19-48 mm de LC, encontraron todas las fases de desarrollo ovárico, desde el estado oogonial hasta el vitelogénico.

Las tallas de las hembras recolectadas difieren a las tallas observadas por Rodríguez-Almaraz (1992), quien recolectó hembras y machos en el mismo sitio, con una talla de 24 a 52 mm de LC. Esta posible variación puede atribuirse a los cambios ecológicos en el área de estudio, como la reducción del nivel de agua, sequía y una carencia de fuentes alimenticias, principalmente de origen vegetal, tal como señalan Avault Jr. et al. (1974) y Cauge et al. (1982), quienes adicionalmente indican que la reducción o ausencia de vegetación provoca que el crecimiento se detenga en tallas subcomerciales de menos de 75 mm de LT (37.5 mm de LC).

En machos de *P. clarkii*, la talla de madurez puede alcanzar valores de hasta 115 mm de LT (Huner y Romaine, 1978). Los machos son más pesados que las hembras, esto se debe al desarrollo acelerado de las quelas, mientras que las quelas de las hembras permanecen isométricas con su LT (Romaine et al., 1976). Además, los machos son más grandes que las hembras de la misma edad, ya que estas al presentar huevos adheridos, suprimen el proceso de muda (Aiken y Waddy, 1992). Esta relación tiene lugar en la mayoría de los crustáceos decápodos, considerando que gran parte de la energía está dirigida hacia el

crecimiento ovárico, por esta razón la tasa de crecimiento de los machos maduros es más rápida que en las hembras maduras (Aiken y Waddy, 1992).

Al respecto, Chien y Avault, Jr. (1980), mencionan que la tasa de crecimiento de *P. clarkii* está relacionada con una mayor disponibilidad de alimento.

3.4.4.- Peso ovarico

En los crustáceos decápodos, como en la langosta *Homarus americanus*, el desarrollo ovárico se manifiesta externamente por cambios en color y talla (e. g. peso del ovario) (Aiken y Waddy, 1980). El peso del ovario como un indicador del estado gonadal en crustáceos decápodos, se ha utilizado con *Procambarus simulans* (Perryman, 1969), *Uca pugilator*, (Quackenbush y Keeley, 1988) y *Crangon crangon* (Spaargaren y Haefner, 1998). En el presente estudio se observó que el peso promedio del ovario fue incrementándose en relación con el estado gonadal, pero no existieron diferencias significativas entre los pesos promedio de los estadios I y II, por otra parte, los estadios III y IV fueron significativamente diferentes entre sí y además de estos dos últimos estadios, con respecto al subconjunto formado por los estadios I y II. Los valores del peso ovárico promedio desde el estadio I al IV fueron de 0.0262 a 0.4695 g, desde el estadio I al IV, respectivamente. Sin embargo, los valores mínimos y máximos obtenidos fueron 0.0043 (estadio I) y 1.4819 g (estadio IV); además hubo traslape en los pesos de un estadio a otro, esto se puede relacionar a las diferentes clases de talla (LC) de las hembras en cada estadio. Por ejemplo, se obtuvieron hembras con tallas de 20 mm de LC (equivale casi a 40 mm de LT) que presentaron ovarios vitelogénicos, lo cual no corresponde a la talla de madurez registrada para esta especie que oscila entre los 50 - 60 mm de LC (Huner, 1990).

Esta variación en el rango de la talla de madurez sexual, podría estar relacionado a los cambios del hábitat o fluctuaciones ecológicas observadas en el sitio de colecta, principalmente por la falta de lluvias y el poco aporte de agua, que provocó que las hembras maduraran a tallas menores. Esto coincide, a las observaciones hechas por Aiken y Waddy (1982), Huner (1988) y Huner (1990),

quienes relacionaron que los acociles maduran a tallas subcomerciales como un efecto del cambio de hábitat. Por otra parte, cabe destacar que se capturaron hembras con la misma talla pero que presentaron diferente estadio gonadal, este aspecto ha sido igualmente reportado por Chu (1995) en *Penaeus joyneri*, donde el peso del ovario se incrementó con la LC, pero las hembras maduras fueron más pesadas que las hembras inmaduras de la misma talla. Haefner y Spaaragaren (1993), mencionan que el peso del ovario en *Crangon crangon*, se incrementó hasta la vitelogénesis, tal como ocurrió en el presente estudio. Estos mismos autores mencionan que el peso ovárico y el estado de desarrollo gonadal, tienen una relación exponencial y además el incremento del peso ovárico está más relacionado al aumento en volumen del ovario que el incremento del el número de ovocitos.

El peso promedio mensual fue mayor en los meses de Enero (0.4864 ± 5457) y Diciembre (0.3577 ± 0.4588), pero los pesos máximos fueron observados a partir de Julio que es la época postcopulatoria de esta especie (Huner y Barr, 1984). Esto coincide con la estacionalidad reproductiva de *P. clarkii* en estanques de Louisiana y Mississippi, donde los "picos" de desove ocurren de finales de verano hasta mediados de otoño (Huner, 1975; Dendy, 1978; Huner *et al.*, 1994). Sin embargo, se pueden localizar hembras grávidas en cualquier época del año (Huner, 1975; Huner y Avault, 1976b), por lo tanto, hay un reclutamiento continuo (Daniels *et al.*, 1994).

Kulkarni *et al.* (1992), mencionan que Enero es el inicio del período anual de crecimiento ovárico y de maduración de *P. clarkii*, presentando tres fases en este ciclo de reproducción, 1) Crecimiento y maduración (Enero a Marzo), 2) Enmadrigamiento (desove, Junio a Septiembre) y 3) Eclosión (Octubre a Diciembre).

3.4.5.- *Indices Gonadales*

3.4.5.1 *Indices Gonadosomáticos (IGS)*

Una variedad de Índices Gonadosomáticos (IGS) han sido usados para caracterizar los ciclos reproductivos de diversos invertebrados (Gonor, 1972; Grant y Tyler, 1983), ya que describen la actividad gonadal (De Vlaming *et al.*, 1982) y son los indicadores más simples del estado reproductivo (Grant y Tyler, 1983). En los crustáceos decápodos, los IGS también han sido usados en diferentes estudios de reproducción, como una medida de la madurez gonadal (Quackenbush y Herrnkind, 1981; Yano y Chinzei, 1987), incluso se han definido los valores porcentuales de los IGS que deben tener las hembras vitelogénicas en diferentes especies de crustáceos (Armitage *et al.*, 1972; Yano y Chinzei, 1987; Kulkarni *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993; Chang y Jeng, 1995).

Haefner y Spaargaren (1993), observaron que el peso húmedo del ovario del camarón *Crangon crangon*, se incrementó gradualmente hasta la previtelogénesis, pero el desarrollo fue significativamente más rápido en la vitelogénesis secundaria hasta en un 282%. Las hembras de *Procambarus clarkii*, utilizadas en este estudio, presentaron valores promedio de IGS que se incrementaron a medida que avanzó la madurez gonadal desde 0.2878 (estadio I) hasta 3.5564 (estadio IV), sin embargo, el rango de los valores absolutos fue de 0.0775 (estadio I) a 9.7923 (estadio IV). En estudios previos, los IGS obtenidos en esta especie registraron valores inferiores, comparados a los obtenidos en este estudio. Daniels *et al.* (1994), determinaron un rango de IGS de 0.063 a 1.223%, que estuvo en función a los diferentes tratamientos de temperatura y fotoperíodo a los que fueron expuestas las hembras; mientras que Kulkarni *et al.* (1991), registraron un valor de 0.006 para ovarios inmaduros y 2.622 para ovarios vitelogénicos tardíos, puntualizando que el estadio postvitelogénico y reabsortivo de la gónada, el IGS respectivo disminuyó notablemente, obteniendo un valor de 0.021%.

Estas posibles diferencias en los valores de IGS se pueden atribuir a que el estudio de Daniels *et al.* (1994), fue hecho en condiciones de laboratorio y los

valores de IGS no corresponderían por lo tanto a hembras silvestres como en nuestro caso. Por otra parte, la investigación realizada por Kulkarni *et al.* (1991), no menciona el número total de hembras utilizadas y tampoco el período del año en que fueron capturadas, ambos factores podrían influir en la determinación de los IGS. Según Kulkarni *et al.* (1992), esta especie en Lousiana, presenta un ciclo de crecimiento ovárico y de maduración bien definido. Sin embargo, *P. clarkii* puede reproducirse durante todo el año (Huner y Barr, 1984; Daniels *et al.*, 1994). Además, el rango de la talla de las hembras recolectadas por nosotros (12 - 48.50 mm de LC), es muy similar a la talla de las hembras usadas en el estudio de Kulkarni *et al.* (1991), que fue de 19 - 44 mm de LC, por lo tanto, podría esperarse que los índices reproductivos fueran similares. Sin embargo, la talla de madurez que alcanza esta especie se relaciona con el tipo de hábitat y alimentación (Huner, 1978a; Huner y Barr, 1984; Aiken y Waddy, 1992). Además, las hembras de ambos estudios pertenecen a diferentes poblaciones, por lo tanto, las características ecológicas son particulares para cada uno de las poblaciones.

En otros estudios de reproducción de crustáceos, utilizan un índice gonadal que no relaciona el peso del ovario con el peso corporal, sino que la talla (LT o LC), es la variable de referencia (Aiken y Waddy, 1980; Courtney *et al.* 1995; Minagawa y Higuchi, 1997; Tsuchida y Watanabe, 1997).

De acuerdo a De Vlaming *et al.* (1982), una consideración básica para el uso de IGS, entre otras, es que la relación del peso gonadal con el peso corporal sea lineal y que esta relación permanezca igual en todas las fases de desarrollo. Por otra parte, es necesario observar las variaciones del peso corporal de hembras de la misma talla. Al respecto, Bomirski y Klek, (1974) mencionan que al menos en *Rithopanopenaeus harrisci*, estos índices no son confiables, ya que el peso corporal de las hembras está influenciado por la dureza del caparazón y tamaño de la quela. En el caso particular de *P. clarkii*, como se mencionó anteriormente, se ha observado diferencias en el crecimiento alométrico de las quelas de ambos sexos, (Romaine *et al.*, 1976).

Considerando que el peso de las quelas de las hembras puede representar un porcentaje significativo del peso total, en este estudio, se trató de recolectar

sólo hembras completas para minimizar un posible error en la elaboración de los IGS, sin embargo, en algunos meses de muestreo se observó una baja densidad de la población, principalmente después de una lluvia, y se recurrió a recolectar todas las hembras disponibles, incluyendo algunas de que carecían de quelas o bien, estos apéndices estaban poco desarrollados. Debido a lo anterior, se realizó un análisis de regresión lineal de peso gonadal con peso corporal determinando que esta relación fue positiva, y la carencia de quelas en algunas hembras no tuvo un efecto significativo en la asociación de ambas variables.

Hasta el momento, no existen datos en la literatura que permitan comparar los valores de IGS por mes sin considerar el estado gonadal, a excepción del realizado por González-Aguilar (1995), quien menciona que para esta especie (*Procambarus clarkii*), también recolectada en el mismo sitio, el mayor IGS promedio se presentó en Agosto (3.099) y el menor en Junio (0.2111). En el presente estudio, también el máximo valor de IGS mensual promedio correspondió al mes de Agosto (2.9204), pero el menor valor se encontró en Octubre (1.0156), estos resultados coinciden con los atributos de esta especie en Lousiana, donde se establece que a finales de Octubre y principios de Noviembre hay mayor cantidad de hembras ovígeras, además se presenta un segundo grupo de hembras postovígeras a principios de Enero, pero el desove se presenta en una menor cantidad de hembras (Avault Jr., 1972; de la Bretonne y Avault, 1976; Dendy, 1978; Romaire y Lutz, 1989).

El menor y mayor valor de la desviación típica del IGS mensuales fueron 0.3850 (Junio) y 3.0662 (Enero), respectivamente. Sin embargo, los coeficientes de variación (CV), indican que hay una mayor dispersión de nuestros IGS, para el mes de Marzo (CV = 206.8452). Esto se puede atribuir a la presencia de hembras de diferente clase de edad, esto es, la existencia de hembras postovígeras y nuevas reclutas, considerando que esta especie tiene un reclutamiento continuo, como se indicó anteriormente (De la Bretonne y Avault Jr., 1976; Huner, 1978a y b; Dendy, 1978; Romaire y Lutz, 1989) y esta mezcla de hembras de distinta edad puede influir en la condición gonadal de las mismas (maduras e inmaduras).

3.4.5.2- Índice Gonadal Relativo (IGR)

Este índice ha sido poco utilizado para evaluar la condición reproductiva de organismos acuáticos, una característica importante del IGR, es que para su construcción se elimina del peso total de las hembras, el peso de la gónada (Erickson *et al.*, 1985). La utilización de este índice en este estudio se debe a que las pendientes de regresión de la ecuación $W=aS^b$, no presentaron diferencias significativas, lo cual es un requisito básico para su uso. Adicionalmente, el IGR permitió comparar los resultados del IGS. En ambos índices, los valores promedio del estadio IV presentaron diferencias significativas con los tres primeros estadios, esto se explica por el incremento significativo de la biomasa gonadal. El cálculo del IGR implica un mayor esfuerzo estadístico a diferencia del IGS, que es un índice más convencional por la simplicidad de su obtención.

3.4.6.- Peso de el hepatopáncreas (PH)

Los pesos promedio del pH agrupados por estadio gonadal, se incrementaron del estadio I al III, pero decreció ligeramente en el estadio IV, esta apreciación coincide a los resultados obtenidos del peso de hepatopáncreas por Daniels *et al.* (1994) y Armitage *et al.* (1972), ambos señalan que este estadio corresponde a la fase vitelogenica del ovario, donde hay una disminución del peso de este órgano debido al transporte de la energía necesaria hacia los ovocitos vitelogenicos. Incluso en esta fase tanto el ovario y el hepatopáncreas pueden tener la misma talla (Amaro-Pinheiro y Fransozo, 1998), pero en nuestros resultados el hepatopáncreas durante este estadio fue más pesado, con un 31% más de biomasa que el ovario. Haefner y Spaargaren (1993), mencionan que los cambios en volumen de ambos órganos en el camarón *Crangon crangon*, deben ser asociado con el transporte de reservas del hepatopáncreas, absorción y síntesis por el ovario, y hay un notorio decremento del hepatopáncreas durante la vitelogénesis. A pesar del decremento del valor promedio del pH observado entre el estadio III y IV, no se presentaron diferencias significativas entre ambos promedios, esto podría relacionarse a que los ovocitos del estadio III ya son

vitelogenicos, como se comprobó por histoquímica y bioquímica durante este estudio.

Los valores promedio del pH mensual, al no ser agrupados por estadio gonadal, no reflejan la actividad cíclica gonadal de esta especie, tomando en cuenta que el acocil rojo puede reproducirse todo el año, por lo que estos promedios son el producto de una mezcla de hembras en distinto estado de desarrollo ovárico y de diferente talla (20-48 mm de LC), que incluye hembras maduras e inmaduras. Armitage *et al.* (1972), encontraron que el pH de las hembras grandes y maduras (>35 mm de LC) del acocil *Orconectes nais*, se incrementó al doble de Abril a Mayo, y empezó a decrecer en el verano y en Octubre se obtuvo valores muy bajos, similares a los de Abril. Mientras que las hembras pequeñas (20-30 mm LC), los valores de PH en peso húmedo cambiaron ligeramente de un mes a otro.

3.4.7. Índices Hepatosomáticos (IHS)

Los valores del IHS obtenidos en este estudio presentaron un rango diferente (2.0448-11.8644), al citado para esta misma especie por Daniels *et al.* (1994), quienes establecieron un rango de IHS de 6.78 a 8.99 en hembras maduras, aunque este estudio fue hecho en laboratorio. Por otra parte, Los IHS promedio del estadio III presentaron un incremento significativo, con respecto a los primeros estadios y fue significativamente diferente al valor promedio del estadio IV.

En las especies como *Penaeus kerathurus* y *Procambarus clarkii*, los valores respectivos del IHS permanecen constantes y no presentan diferencias significativas entre un estadio gonadal y otro (Mourente y Rodriguez, 1991; Daniels *et al.*, 1994). Por otra parte, en el camarón *Metapenaeus joyneri*, Chu (1995), determinó que los IHS de los primeros estadios son similares, para incrementarse en los últimos estadios. Esto coincide a las observaciones hechas por Lee y Chang (1997), con el langostino *Macrobrachium rosenbergii*, quienes encontraron resultados similares del IHS, donde los IHS se incrementan de 4.49 a 6.17 del estadio I al II, pero decrecen a partir del estadio III (4.37) hasta alcanzar

un valor de 3.58 en el estadio IV. Ellos consideraron que el decremento del IHS en este estadio es debido a la movilización de lípidos de reserva del hepatopáncreas hacia los ovocitos en maduración, esta conclusión también pudo ser la razón de los cambios observados en los IHS por estadio gonadal en la especie de referencia de este estudio.

Los IHS por mes presentó valores constantes de Febrero a Julio, pero decrecieron de Agosto a Octubre, para incrementarse en Noviembre y Diciembre , y nuevamente presentaron valores inferiores en Enero. El decremento observado entre Agosto y Octubre, se relacionó con el principal período de desove de *Procambarus clarkii* en hábitats de Louisiana (Huner y Barr, 1984) y el área central de Nuevo León (Abdo de la Parra, 1991; González-Agular, 1995).

3.4.8.- Relación del IGS e IHS

No obstante que el análisis de regresión entre los valores de IGS e IHS(sin considerar el estadio gonadal) determinó que no hay una relación significativa. Se observó un decremento del IHS durante la época reproductiva (Agosto-October) de esta especie y coincide con el máximo valor del IGS observado a lo largo del muestreo.

Los IHS por estadio gonadal fue mayor a los IGS, aunque hubo un ligero decremento del IHS entre el estadio III y IV. Esto coincide, con los resultados de IHS obtenidos por Daniels *et al.* (1994), para hembras de esta misma especie, quienes fueron expuestas a diferentes valores de temperatura y fotoperíodo en condiciones de laboratorio.

En el langostino *Macrobrachium rosenbergii*, el IGS solamente fue mayor al IHS en el último estadio (V) (Lee y Chang, 1997). Por otra parte, en los camarones *Metapenaeus joyneri* y *Penaeus kerathurus*, los IGS presentaron valores más altos que los IHS en los dos últimos estadios (III y IV) (Mourente y Rodríguez, 1991; Chu, 1995).

3.4.9.- Histología gonadal

En este estudio se utilizaron tres técnicas histológicas, las cuales permitieron caracterizar de manera morfológica y química a los ovocitos en los diferentes estadios de desarrollo. Estas fueron la técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina, Ácido Periódico-Reacción de Schiff y Black Sudan B.

La técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina (H y E) ha sido utilizada en diferentes estudios del desarrollo gonadal de crustáceos decápodos con el propósito de observar la morfología y características celulares (O'donovan *et al.*, 1984; Paulus y Laufer, 1987; Crocos y Kerr, 1983; Minagawa y Higuchi, 1987; Yano y Chinzei, 1987; Sandoval - Quintero y Gracia, 1998). Esta técnica histológica también ha sido usada con el mismo fin en *P. clarkii* por Nagamine y Knigh (1987); Kulkarni *et al.* (1991), Kulkarni *et al.* (1992) y Sarojini *et al.* (1995).

3.4.9.1.- Células foliculares (CF)

En todos los estadios gonadales fue observado células foliculares, pero en el estadio I, estas fueron encontradas de manera dispersa en la matriz ovárica; para los estadios II, III y IV. Las CF estuvieron presentes alrededor de los ovocitos, sin embargo, estas células fueron más grandes para el estadio II. Esto coincide con las observaciones hechas por Kulkarni *et al.* (1991) y Tobias-Chavana (1991).

3.4.9.2.- Diámetro de ovocitos

Los ovocitos presentaron un rango de diámetro entre 22.1689 y 1285.7950 μm a través de todos los estadios de desarrollo gonadal, este rango difirió al registrado por Kulkarni *et al.* (1991), para esta misma especie, quienes establecieron un rango de 10 a 980 μm . Esta diferencia se puede relacionar con los máximos valores de IGS de ambos trabajos, y que en este estudio correspondió a 3.5565, mientras que el registrado por Kulkarni *et al.* (1991) fue de 2.622, esto indica que las gónadas de las hembras de este estudio fueron más pesadas. Por su parte, Spaargaren y Haefner (1998), señalan al respecto que el incremento del peso ovárico esta más relacionado al incremento en volumen que

al aumento del número de ovocitos, particularmente en los últimos estadios. Por lo tanto, en este caso el mayor peso gonadal sería atribuible a un notable aumento del diámetro de los ovocitos durante su desarrollo. Este crecimiento de los ovocitos se relaciona con la toma activa de vitelo extraovárico (Charniux-Cotton, 1978; Fauvel, 1986) y la síntesis de vitelina (Fielder *et al.*, 1971; Shafir *et al.*, 1992).

Es importante señalar que para cada estadio de desarrollo solamente fueron medidos los ovocitos mayores y con núcleos, ya que en un mismo corte fue observado diferentes grupos de ovocitos, tanto en tamaño como en forma. Al respecto, Tom *et al.* (1987), Damrongphol *et al.*, (1991), Kulkarni *et al.* (1991) y Medina *et al.* (1996), mencionan que en un ovario, aún maduro, se pueden observar diferentes clases de talla de ovocitos que corresponden a diferentes estadios de desarrollo.

3.4.9.3.- Diámetro de los núcleos

El núcleo presentó un incremento en su diámetro de un estadio a otro, exceptuando la transición del estadio II al III, donde su valor promedio fue inferior al estadios II y IV, sin embargo, en cada estadio gonadal la relación núcleo/citoplasma siempre fue mayor al pasar de un estado de madurez a otro más avanzado, desde 1:3 hasta 1:10. Esta misma relación de decremento del núcleo de un estadio a otro, también fue observada por Kulkarni *et al.* (1991), ya que en el estadio V (vitelogénico intermedio), el diámetro disminuyó con respecto a los estadios IV (Vitelogénico temprano) y VI (Vitelogénico tardío). Considerando esta característica morfométrica de reducción del núcleo, las hembras del estadio III de nuestro estudio, correspondieron a un estado vitelogénico.

En los primeros estadios observamos que la posición del núcleo fue central en el ovocito, tal como lo señala Kulkarni *et al.* (1991), en su clasificación establecen que en los primeros cinco estadios, los núcleos son de posición central y que a partir de la fase vitelogénica tardía, como ocurrió en nuestro estudio, el núcleo puede tener una posición periférica. Al respecto, Yano (1988), observó que los ovocitos maduros de *Penaeus japonicus* presentan núcleos que emigran a la

periferia del citoplasma. Al final de un ciclo vitelogénico (postvitelogénico y reabsortivo) de *P. clarkii*, los núcleos son deformes (Kulkarni *et al.*, 1991).

3.4.9.4.- Forma de los ovocitos

Se observó que la forma de los ovocitos fue variable de acuerdo al estadio gonadal. Así en los primeros estadios (I y II) fueron semiesféricos u ovoides y en los últimos (III y IV), presentaron una forma rectangular. A esta misma conclusión llegaron Kulkarni *et al.* (1991), quienes observaron una forma cuadrangular del ovocito en la fase de vitelogénesis tardía (estadio III). A este respecto, Minagawa y Higuchi (1997), mencionan que en las langostas palinuridas, la forma de los ovocitos se puede utilizar como un índice de maduración del ovario.

3.4.9.5.- Número de nucleolos

Existió una variación del número de nucleolos por estadio, con un rango de 2 a 23, este último valor correspondió al estadio IV. Estos valores obtenidos difieren considerablemente a lo registrado para esta misma especie por Kulkarni *et al.* (1991), quienes encontraron hasta 4 y raramente más nucleolos en la fase vitelogénica intermedia. Esta variación y gran cantidad de número de nucleolos en nuestras hembras, particularmente las de estadio IV, esta presente de manera similar en *Parapenaeus longirostris*, donde estos organelos en la fase vitelogénica son transformados en numerosas estructuras pequeñas que rodean al núcleo y en la terminación de esta fase, los nucleolos desaparecen (Tom *et al.*, 1987b).

3.4.9.6.- Presencia de vacuola y zona perinuclear

Los ovocitos del estadio III presentaron una característica distintiva de la etapa vitelogénica intermedia de la clasificación propuesta por Kulkarni *et al.* (1991), que fue la presencia de una cavidad a manera de vacuola. Sin embargo, es importante señalar que los ovocitos de algunos ovarios de este estadio, no presentaron esta cavidad, por lo tanto, esta fase de desarrollo incluye el estado vitelogénico inicial e intermedio de la clasificación mencionada. Además, hay otras características que permitieron comparar ambas clasificaciones y determinar que

el estadio III, ya corresponde a una fase vitelogénica, como fue el color y la presencia de lípidos del ovario.

Una zona perinuclear (ZP) fue observada en los ovocitos de todos los estadios gonadales, pero con mayor frecuencia en los estadios III y IV. Sin embargo, Kulkarni *et al.* (1991), establecieron que esta ZP era distintiva de la etapa vitelogénica intermedia y tardía. Debido a la discrepancia de ambos estudios, en cuanto a la presencia de este carácter histológico (ZP), no podría considerarse la ZP como un indicador de la madurez de la gónada de *P. clarkii*.

3.4.9.7.- Espacios citoplasmáticos

Fue observado en algunos ovarios de estadios III y IV, pero con mayor frecuencia aquellos del estadio IV, que el citoplasma presentó numerosos espacios de forma irregular. Al respecto, Perryman (1969), mencionó que la reabsorción de un ovario se manifiesta por la aparición de estos espacios a manera de vacuolas en el citoplasma. En la langosta *Homarus americanus*, se ha observado que la reabsorción del ovario ocurre al final de la vitelogénesis secundaria (Aiken y Waddy, 1980).

En diferentes especies de acociles, como *Procambarus simulans* y *Cambarellus shufeldti*, también se ha observado la presencia de espacios que indican la finalización de un ciclo de maduración (Perryman, 1969; Lowe, 1960; Stephens, 1951); además la presencia de vacuolas está relacionada a la forma cuboidal que adquieren los ovocitos (Stephens, 1951). En concordancia con lo anterior, Kulkarni *et al.* (1991), observó que los ovarios postvitelogénicos de *P. clarkii*, sus ovocitos y núcleos están degenerados, los gránulos de vitelo desaparecen y hay espacios blancos citoplasmáticos. Durante la reabsorción los ovocitos no pueden ser distinguidos ya que son muy pequeños (Lowe, 1960; Kulkarni *et al.*, 1991).

3.4.10.- Técnicas histoquímicas

Diferentes técnicas histoquímicas han sido utilizadas para diferenciar glicoproteínas y lípidos en los ovocitos de crustáceos decápodos (Varadarajan y

Subramoniam, 1980; Talbot, 1981; Tom *et al.*, 1987a,b; Yano y Chinzei, 1987; Tan-Fermin, 1991; Medina *et al.*, 1996). En particular, las técnicas de PAS (glicoproteínas) y SBB (lípidos) han sido utilizadas en la histoquímica ovárica del cangrejo ermitaño *Clibanarius clibanarius* (Varadarajan y Subramoniam, 1980), en los camarones *Penaeus japonicus* (Yano, 1988), *Parapenaeus longirostris* (Tom *et al.*, 1987b), y *Penaeus semisulcatus* (Browdy *et al.*, 1990) y en el cangrejo *Paratelphusa hydrodromis* (Adiyodi, 1969).

3.4.10.1.- Determinación de glicoproteínas por la técnica de PAS

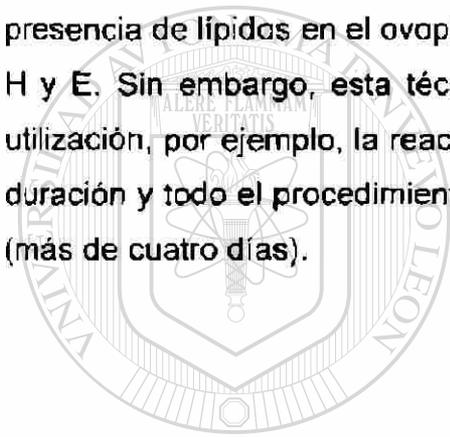
Utilizando esta técnica se observó la presencia de finos gránulos inmersos en el citoplasma de los ovocitos en todos los estadios de desarrollo, y que corresponden a glicoproteínas. La técnica de H y E no evidencia en forma clara a estos gránulos, en particular en cortes de las mismas gónadas de los primeros estadios. A este respecto, Kulkarni *et al.* (1991), observó solamente gránulos de vitelo en ovocitos de *P. clarkii* al inicio de la etapa vitelogénica, estos gránulos fueron numerosos en el estadio vitelogénico intermedio, probablemente estos resultados se debieron a que la técnica histológica utilizada fue H y E, la cual no es específica para una identificación clara de gránulos de vitelo. Sin embargo, Tobías-Chavana (1991), utilizando la técnica H y E observó que en las gónadas de los estadios II y III de *Procambarus clarkii*, los ovocitos ya presentaban gránulos de vitelo. En otro estudio, Tom *et al.* (1987b), mencionan que los ovarios del camarón *Parapenaeus longirostris*, presentan dos fases de desarrollo citoplasmático que corresponde al crecimiento y la etapa vitelogénica, desde la primera etapa hubo una gradual reacción positiva a la técnica de PAS. Esta misma reacción positiva al PAS, también se observó desde el estadio I al III en *Clibanarius clibanarius* (Varadarajan y Subramoniam, 1980).

La técnica de PAS es utilizada generalmente para determinar la presencia de carbohidratos, ya que existen otras técnicas más específicas para la observación de glicógeno, como es la técnica de Carmin de Best (Varadarajan y Subramoniam, 1980).

3.4.10.2.- Determinación de lípidos por la técnica de BSB

Los ovocitos en estadio III y IV presentaron una reacción positiva a la técnica de BSB, de acuerdo a la coloración azul intensa de los gránulos de vitelo. En un estudio similar, Tom *et al.* (1987b), observaron que el material PAS (+) gradualmente desapareció del citoplasma en la fase vitelogénica y se presentaron grandes glóbulos de lípidos fuertemente teñidos por la técnica de BSB. Además, esta técnica permitió reconocer una disminución notable en la cantidad de vitelo de los ovocitos del estadio IV en reabsorción, lo cual coincide con las observaciones hechas por Kulkarni *et al.* (1991). A este respecto.

A pesar de que la técnica de BSB sirvió para identificar claramente la presencia de lípidos en el ovoplasma en comparación a la técnica convencional de H y E. Sin embargo, esta técnica tiene sus limitaciones o desventajas para su utilización, por ejemplo, la reacción o tinción positiva a esta técnica tuvo una corta duración y todo el procedimiento de tinción involucra una gran cantidad de tiempo (más de cuatro días).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.5. CONCLUSION

- ◆ Se registraron cuatro estadios gonadales basados en las características de color y tamaño de los ovocitos.
 - ◆ En el acocil rojo, la reproducción se lleva a cabo principalmente durante el período de Intermuda.
 - ◆ Las hembras colectadas presentan un rango promedio de LC de 26.72 a 35.3 mm, incrementándose del estadio I al IV, sin embargo, de acuerdo a los resultados observados estos parámetros morfométricos no se consideran buenos indicadores del desarrollo gonadal.
 - ◆ El peso ovárico se incrementa del estadio gonadal I (0.0043 g) al IV (1.4819 g) y está influenciado por los parámetros ambientales y la época del año en el sitio de colecta.
 - ◆ En las hembras de *Procambarus clarkii* el IGS representativo de la madurez gonadal presenta el mayor promedio en el mes de Agosto y en Octubre se observa el mínimo.
 - ◆ El incremento del diámetro de los ovocitos y el núcleo está relacionado con el incremento del peso gonadal y el estadio, además la forma de los ovocitos también varía de acuerdo al estadio gonadal.
 - ◆ Existe una fuerte variación del número de nucleolos por estadio registrándose la mayor variabilidad en el estadio IV.
-
- ◆ La presencia de vacuolas característica de la fase vitelogénica se presentó en el estadio III, mientras que la zona perinuclear no resulta un buen indicador de la madurez gonadal ya que se observa en todos los estadios.
 - ◆ La presencia de espacios citoplasmáticos (estadio IV) indican la reabsorción del ovario y la finalización del ciclo de maduración.
 - ◆ En cada estadio gonadal se pueden observar ovocitos en más de un estadio debido a que el proceso de maduración es continuo.
 - ◆ La presencia de glicoproteínas es evidente en todos los estadios gonadales, mientras que la aparición de lípidos se observa principalmente en los estadios III y IV.

CAPITULO 4.- PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA VITELOGENINA PLASMATICA Y VITELINA OVARICA DEL ACOCIL ROJO *Procambarus clarkii*

4.1.- INTRODUCCION

Los estudios sobre fisiología reproductiva, maduración y desarrollo de las gónadas en crustáceos decápodos son diversos, y de estos destacan los realizados con **camarones peneidos** (Tom *et al.*, 1987a; Tom *et al.*, 1987b; Shafir *et al.*, 1992; Fainzilber *et al.*, 1992; Chen y Chen, 1993; Chang *et al.*, 1993a; Cariolou y Flytzanis, 1993; Chen y Chen, 1994; Courtney *et al.*, 1995), **acociles** (Kulkarni *et al.*, 1991), **langostinos** (Chang *et al.*, 1993b) y **cangrejos** (Lee y Puppione, 1988; Quackenbush y Keeley, 1988; Paulus y Laufer, 1987; Lee y Watson, 1995).

Como en la mayor parte de los invertebrados acuáticos, los crustáceos decápodos como el acocil *Procambarus clarkii*, ovopositan una gran cantidad de huevos dependiendo de la talla de la hembra, los cuales dispondrán de las reservas de vitelo necesarias para cubrir sus requerimientos energéticos durante el desarrollo embrionario (Meusy, 1963). Es conocido entre los Crustáceos Malacostrácos que las hembras en etapa reproductiva producen vitelo, el cual es una sustancia nutritiva constituida principalmente de proteínas, lípidos y carbohidratos, que se presenta en cantidades variables en la mayoría de los ovocitos formando una reserva necesaria para su desarrollo embrionario (Charniux-Cotton, 1985).

4.2.- ANTECEDENTES

4.2.1.- Recrudescimiento Gonadal

La maduración gonadal, se desarrolla en la mayor parte de los animales, de manera continua y regular. Sin embargo, es común que algunas hembras presenten anomalías tales como la reabsorción de los ovarios en ciertos estados del desarrollo gonadal. Estos ciclos abortivos y la rapidez a la que se desarrolla este proceso explican en parte el diferente número de individuos observados en cada estadio de maduración.

De aquí que resulte necesario recurrir a criterios precisos tanto histológicos como morfológicos, para establecer la etapa de maduración en que se encuentran los

organismos. La gónadas de los decápodos cambian de talla y color durante el desarrollo de los ovarios, desde su inicio hasta la madurez, variando durante los ciclos de vitelogénesis y oviposición (Aiken y Waddy, 1980). El seguimiento de estas modificaciones morfológicas ha sido utilizado por varios autores para caracterizar la evolución gonadal de diferentes crustáceos (King, 1948; Tuma, 1967; Aquacop, 1977; Woo-Khoo, 1988). En el caso particular de *Procambarus clarkii*, De La Brettone y Avault (1976), consideraron cuatro estadios para describir el desarrollo gonadal, basado en el color y tamaño de los ovocitos.

4.2.2.-Vitelogénesis

Actualmente, está bien comprendido que durante la reproducción de los crustáceos malacostrácos, los ovocitos requieren grandes cantidades de vitelo para su crecimiento y desarrollo (Charniaux-Cotton, 1985). De aquí, la definitiva importancia del papel del vitelo en el desarrollo larvario. Esto ha propiciado que originen diversas investigaciones sobre aspectos de vitelogénesis en diferentes crustáceos desde los años 60's y en los últimos años las investigaciones se han orientado al estudio de la biosíntesis del complejo proteína-vitelo, aspecto que ha sido cuidadosamente tratado por varios autores (Adiyodi y Subramoniam, 1983; Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985; Quackenbush, 1986; Meusy y Payen, 1988; Charniaux-Cotton y Payen, 1988 y Quackenbush, 1991). Sin embargo, aún existen muchos puntos oscuros acerca del o los sitios de producción de vitelo exógeno y de la hormonas involucradas en la estimulación y coordinación de síntesis de vitelo.

De manera sucinta se puede decir que durante el proceso fisiológico de la ovogénesis, se presentan una serie de cambios graduales que implican el crecimiento, diferenciación y maduración ovocitaria de las células germinales.

El proceso de vitelogénesis en los crustáceos, está caracterizado durante el ciclo reproductivo femenino, por la acumulación de una extensa cantidad de vitelo y es por consiguiente de particular interés dentro del mismo ciclo reproductivo (Quinitio *et al.*, 1989). Durante esta fase el vitelo completa todos sus componente orgánicos e inorgánicos, necesarios para el crecimiento de los ovocitos (Adiyodi y Subramoniam, 1983; Charniux-Cotton, 1985; Quackenbush, 1986)

En el desarrollo ovocitario en los crustáceos, principalmente en los malacostráceos se distinguen las siguientes fases o estados:

- a) Fase inicial (crecimiento o multiplicación ovocitaria)
- b) Previtelogénesis
- c) Vitelogénesis Primaria
- d) Vitelogénesis Secundaria

a).- Fase inicial.- El crecimiento ovocitario ocurre en la zona germinativa donde las ogonias están completamente rodeadas por células mesodérmicas, las cuales impiden que un factor andrógeno (6-hidroxi-farnesil-cetona) actúe sobre ellas. Durante esta fase ocurre numerosas divisiones mitóticas ogoniales y continuamente las ogonias salen por mecanismos desconocidos (Aiken y Waddy, 1980; Adiyodi y Subramoniam, 1983; Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985; Woo-Khoo, 1988); en esta fase los ovocitos se preparan para la vitelogénesis.

Al liberarse del emprisionamiento del tejido mesodérmico, las células quedan expuestas a la eventual influencia del efector andrógeno, el cuál si llegara a actuar sobre estas determinaría su conversión en espermatoцитos, por lo cuál sino se ejerce la influencia de este efector (hormona andrógena= 6-hidroxifarnesil-cetona), las células germinales se convertirían espontáneamente en ovocitos (autodiferenciación).

Posteriormente estas ogonias entran en meiosis para detenerse en profase y convertirse en ovocitos primarios (Payen, 1980; Charniaux-Cotton, 1985); esta fase de descanso es a veces denominada previtelogénesis (vitelogénesis primaria) (Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985). Durante este proceso se deposita material vitelino endógeno en el seno de ovocitos, (Kessel, 1968; Lui y O'Connor, 1976; Woo Khoo, 1988), a raíz del establecimiento de vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) en el citoplasma ovocitario el cual contribuye a la síntesis de glicoproteínas (vitelo endógeno), (Payen, 1980; Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985).

b).- Previtelogénesis.- El termino previtelogénesis es un termino confuso en el sentido de que en muchos casos, el deposito de vitelo comienza en este particular estado (Adiyodi y Subramoniam, 1983). La fase de descanso de los ovocitos previtelogénicos es estimulada por factores externos para proceder de una meiosis a una vitelogénesis primaria, fase durante la cual se deposita el material vitelino endógeno por

los ovocitos (Beams y Kessel, 1963; Kessel, 1968; Lui *et al.*, 1974; Lui y O'Connor, 1977; Yano y Chizei, 1987; Woo Khoo, 1988).

c).- Vitelogénesis Primaria.- (Vitelogénesis I) Este estado fue llamado así por Aiken y Waddy (1980), Charniaux-Cotton (1985) y Quackenbush (1986) o Vitelogénesis I por Adiyodi (1985). Durante la vitelogénesis primaria existe una gran formación de vesículas del retículo endoplásmico rugoso (RER) en los ovocitos primarios y que contiene glicoproteínas (síntesis de vitelo endógeno), este compuesto y las lipoproteínas son de origen endógeno o autóctono (Nelson, no publicado). Esto se va traducir en un ligero incremento en el tamaño de la gónada, al aumentar el volumen de los ovocitos, los cuales adquieren el material necesario para la síntesis de proteínas (Zerbib, 1976). Otra característica, es que las células foliculares primarias que posiblemente se originaron en la zona germinativa rodean a cada ovocito (Payen, 1980; Adiyodi y Subramoniam, 1983; Adiyodi, 1985; Charniaux-Cotton, 1985; Quackenbush, 1986).

La ovogénesis desde ogonias hasta el final de la vitelogénesis primaria es un proceso continuo (Payen, 1980; Charniaux-Cotton, 1985) y no existe factores externos o internos, como un control endocrino conocido, que pudieran controlar o influenciar esta fase (Fauvel, 1986). Esta es permanente durante toda la vida de la hembra (Charniaux-Cotton, 1978).

En el transcurso de esta citodiferenciación los ovocitos más jóvenes reemplazan a los ovocitos más maduros, que se encuentran en el centro del ovario, dirigiéndolos progresivamente hacia la periferia de este.

d) Vitelogénesis Secundaria.- (Vitelogénesis II)

Durante el reposo genital los ovocitos permanecen estacionados en vitelogénesis primaria, pero en épocas de reproducción, los ovocitos en las etapas finales de la vitelogénesis primaria van sincrónicamente van hacia vitelogénesis secundaria, que se caracteriza por un desarrollo muy rápido, selectivo y sincronizado de estos. Esta segunda fase, es un fenómeno cíclico con dependencia hormonal y de factores externos (Charniaux-Cotton, 1978; Meusy y Payen, 1988). La vitelogénesis secundaria también es conocida como la fase de maduración por los acuacultores.

La vitelogénesis secundaria empieza con la formación de folículos secundarios, que rodean completamente a los ovocitos (Payen, 1980; Nelson, no publicado). Esto es una condición necesaria para la internalización de la Vitelogenina (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

En esta segunda fase continua el depósito de vitelo, incrementándose masivamente la vitelogénesis y existe un incremento sustancial en el volumen y peso gonadal. El vitelo es de origen endógeno y exógeno (Kerr, 1968; Aiken y Waddy, 1980; Charniaux-Cotton, 1985; Tom *et al.*, 1987a)

Existen evidencias para sostener que existe un secuestro de proteínas extra-ovocitarias (Vitelogenina) por endocitosis tomada de la hemolinfa desde el sitio de producción hasta el ovario (Payen, 1980; Woo-Khoo, 1988; Nelson, no publicado). La Vitelogenina (VTG) o proteína específica de las hembras (FSP) es un precursor plasmático de la Vitelina (VTL) ovocitaria, constituyente principal del vitelo (Payen, 1980; Adiyodi y Subramoniam, 1983, Charniaux-Cotton, 1985; Nelson, no publicado), que es inmunológicamente idéntica a este vitelo endógeno y solo se presenta en hembras que han entrado en su fase reproductiva (puberal) (Aiken y Waddy, 1980; Meusy, 1980; Payen, 1980).

El sitio de origen de la vitelogenina (VTG) se ha discutido y se mencionan a los siguientes tejidos: hepatopáncreas (Lui *et al.*, 1974; Fyffe y O'Connor, 1974; Aiken y Waddy, 1980; Charniaux-Cotton, 1985), tejido graso subepidérmico (cuerpo graso) (Tom *et al.*, 1987a; Woo-Khoo, 1988) y los hemocitos (Kerr, 1969). La contribución de la vitelogénesis exógena varía de especie a especie aparentemente y no todos los crustáceos requieren vitelina exógena (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

Durante la vitelogénesis secundaria el RER continua sintetizando glicoproteínas, las cuales son inmunológicamente diferentes de la vitelogenina (Meusy, 1980). Además, aparecen gotaletas de lípidos en la periferia del ooplasma llenándolo. En el caso de los palaemónidos cada ovocito esta rodeado por una capa de células foliculares secundarias y que los microvellos del oocito cruzan la envoltura vitelina con la función aparente de secuestrar al precursor hemolinfático del vitelo, al final de la vitelogénesis secundaria estos microvellos se retractan (Adiyodi y Subramoniam, 1983). La foliculogénesis secundaria que es un fenómeno probablemente general en malacostráceos, separa a los

ovocitos en dos poblaciones; a) ovocitos rodeados por células foliculares primarias y estratificadas en zonas que corresponden a los diferentes estados de la ovogénesis hasta el final de la vitelogénesis primaria b) ovocitos rodeados por células foliculares secundarias, que están en el mismo estado de la vitelogénesis secundaria (Charniaux-Cotton, 1985).

El final de la vitelogénesis secundaria se caracteriza por la ruptura de la vesícula germinativa (-*Germinal Vesicle Break Down*-GVBD), la cual tiene lugar antes de la ovulación (Quackenbush, 1991)

4.2.3.- Tipos de vitelo

Durante la reproducción de los crustáceos malacostrácos, los ovocitos requieren grandes cantidades de vitelo Charniaux-Cotton, (1985). Sin embargo esto parece depender de la ontogenia de cada grupo. A este respecto, Mendoza, (1992), encontró una cantidad mínima de vitelo en los ovocitos de los peneidos con respecto a la determinada en ovocitos de otros crustáceos, atribuyendo esto al breve periodo larvario de los peneidos.

El depósito de vitelo comienza durante la vitelogénesis primaria (Adiyodi y Subramoniam, 1983), proceso que se caracteriza por la acumulación de glicoproteínas en el ovocito, mientras que la vitelogénesis secundaria se distingue por la acumulación de lípidos y proteínas en el vitelo, (Cuzin-Roudy y O'Leary, 1991). Esto es debido a que durante esta fase un precursor hemolinfático, la vitelogenina (VTG), se internaliza en el ovocito mediante un proceso mediado por receptores el cual permite el transporte de la molécula al interior de los ovocitos (Mendoza y Fauvel, 1989). Así, durante la vitelogénesis secundaria esta molécula al concentrarse en los ovocitos se transforma en vitelina (VTL), la cual constituye la proteína mayoritaria del vitelo.

Los estudios relativos a la composición del vitelo han sido enfocados principalmente a las proteínas que son sintetizadas externamente y que posteriormente son conducidas por la hemolinfa y acumuladas en el ovocito (Muñoz *et al.*, 1990; Shafir *et al.*, 1992).

El vitelo es el material nutritivo que una vez acumulado en cantidades sustanciales en el ooplasma podrá satisfacer los requerimientos básicos para el desarrollo embrionario. El tipo y composición de vitelo varía de especie a especie, y depende del tipo de dieta (Adiyodi y Subramoniam, 1983). Existen dos tipos de vitelo, la vitelina (VTL) o lipovitelina, que es la proteína más abundante en el huevo y la vitelogenina (VTG) (Aiken y Waddy, 1980; Adiyodi, 1985; Quackenbush, 1986). Ambos tipos de vitelo contribuyen en el crecimiento de las células ovocitarias.

Las proteínas y lípidos constituyen la mayor parte de las reservas orgánicas del vitelo. El papel de los carbohidratos está aún por elucidar, pero muy probablemente participen en aportar energía durante la eclosión. Las proteínas proveen el material básico necesario para la creación de tejidos, mientras que los lípidos, especialmente los neutros sirven como fuente de energía (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

En el caso de las lipo-glico-proteínas, como la VTL, están asociadas a pigmentos carotenoides, estas uniones son altamente sensibles. Se ha sugerido que el pigmento sirve como un escudo contra las radiaciones para proteger al embrión (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

Una de las particularidades de la molécula de la VTG en los crustáceos es su alto peso molecular consecuencia de la asociación de las proteínas con lípidos, glúcidos y grupos prostéticos carotenoides originados durante la vitelogénesis (Meusy, 1980). Por otra parte, la VTL, inmunológicamente indistinguible de la VTG, presenta también un elevado peso molecular y se caracteriza por ser la proteína más abundante en el huevo, constituida por 28% y 35% de lípidos, 4.8% de carbohidratos, y carotenoides. A dichas asociaciones se les identifica como lipo-glico-carotenoproteínas (Meusy, 1980; Fyffe y O'Connor, 1974).

La lipovitelina consiste de algunas subunidades que se asocian y se disgregan, en *Procambarus*, el vitelo puede disociarse en cinco subunidades (Lui y O'Connor, 1976). El peso molecular tanto de VTG y VTL (Tabla 4.1) varía de acuerdo a las especies, y en términos generales se ha estimado que varía entre los 300×10^3 y los 600×10^3 Daltons (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

En *Procambarus* sp. se estimó el peso molecular de la VTL en 500,000 Daltons con un porcentaje de lípidos del 35% (Fyffe y O'Connor, 1974). En el anfípodo *Orchestia*

gammarella los pesos moleculares para la LVI fue 348,200 y de 498,600 para la LVII y en esta misma especie el peso molecular de la VTG fue de 397,000 Daltons (Junera et al., 1977).

Tabla 4.1.- Estimaciones del peso molecular de las subunidades de VTL, en diferentes especies de crustáceos.

ESPECIE	SUBUNIDAD DE VITELINA	PESO MOLECULAR EN kDa	AUTOR	AÑO
<i>Penaeus monodon</i>	5 Polipéptidos	540 (VTL). 74, 83, 90, 104, 168 (Subunidad)	Quinitio et al.,	1990
<i>Penaeus monodon</i>	8 Polipéptidos (lipo-glico-carotenoproteínas)	492 (VTL) 35, 45, 49, 58, 64, 68, 82, 91. (Subunidad)	Chang et al.,	1993a
<i>Penaeus chinensis</i>	2 Polipéptidos	191 y 85	Chang y Jeng	1995
<i>Penaeus chinensis</i>	5 VTL1 (lipo-glyco-caroteno-fosfo-proteína) 3 VTL2 (glico-fosfo-proteína)	360 (VTL1) 105, 85, 78, 58, 40 (Subunidad). 500 (VTL2) 155, 85, 78 (Subunidad).	Chang et al.,	1996
<i>Penaeus monodon</i>	4 Polipéptidos (glicoliproteínas)	168, 104, 83 y 74	Chen y Chen	1993
<i>Parapenaeus longirostris</i>	2 Glicoproteínas	45 y 66	Tom et al.,	1987 ^a
<i>Armadillium vulgare</i>	VTL1 - VTL4 (glicoliproteínas) VTL4 con 3 polipeptidos.	700,000 620,00 540,000 4470,000 (VTL) 80,000, 99,000, 127,000 (VTL4)	Susuki et al.,	1987
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	3 VTL con 2 lipo-glicocarotenoproteína. 1 VTL con un mínimo	240, 450, 800 (VTL). 90 y 104 (Subunidad) 194 (VTL con un mínimo peso molecular).	Chang et al.,	1993b
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	2 Lipoglycoproteínas	700 (Vn) 100 y 89 (Subunidades)	Lee et al.,	1997
<i>Pandulus kessleri</i>	VTL1 - VTL2 con 2 lipo-caroteno-proteína.	560 (VTL1-VTL2) 81 y 110 (Subunidades)	Quinitio et al.,	1989
<i>Potamon potamicus</i>	3 Polipéptidos	115, 105 y 85	Pateraki y Stratakis	1997
<i>Callinectes sapidus</i>	2 lipoproteínas y 1 proteína	109 y 86 188.	Lee y Watson	1994
<i>Callinectes sapidus</i>	4 Proteínas	188, 168, 109 y 86	Lee y Watson	1995

4.2.4.-Origen y Síntesis del Vitelo

La síntesis endógena del vitelo ha sido confirmada en varios estudios por medio de la incubación de ovarios *in vitro*, lo que ha sido constatado por medio de la

incorporación de aminoácidos marcados (Dhen *et al.*, 1983; Eastman-Reks y Fingerman, 1985; Yano y Chinzei, 1987; Quackenbush, 1989a; Browdy *et al.*, 1990).

Sin embargo, se ha demostrado igualmente la existencia de una síntesis de vitelo exógeno en crustáceos, que incluye al hepatopáncreas, el tejido adiposo subepidérmico y los hemocitos (Kerr, 1969; Meusy, 1980; Meusy *et al.*, 1983; Souty y Piccaud, 1984; Paulus y Laufer, 1987; Tom *et al.*, 1987a; Quackenbush y Keeley, 1988; Woo-Khoo, 1988; Quackenbush, 1989a; Qunitio *et al.*, 1990). Aiken y Waddy (1980), sugiere que el hepatopáncreas sería el blanco de una hormona ovarica estimuladora de la vitelogenina (VSOH). Paulus y Laufer (1987), presento la evidencia de células especializadas del hepatopáncreas que estarían implicadas en la síntesis de VTG, a estas células se les denominó como vitelogenocitos. En isópodos y anfípodos, se ha emitido la hipótesis de que el cuerpo graso es el sitio extraovárico de la síntesis de vitelo (Piccaud, 1980; Piccaud y Souty, 1980; Meusy *et al.*, 1983b).

Adicionalmente, han sido varios los autores que han podido detectar y medir la VTG en la hemolinfa (Derelle *et al.*, 1986; Yano, 1987; Lee y Puppione, 1988; Quackenbush, *op.cit.*; Mendoza *et al.*, 1993). La presencia de VTG en la hemolinfa aumenta los cuestionamientos sobre los sitios extra ováricos para la síntesis de la VTL o de los precursores moleculares (Fainzilber *et al.* 1992).

Estas contradicciones aparentes se deben sin duda a diferencias: entre las especies, a los métodos de incubación utilizados, a las técnicas de purificación de la VTG y la VTL y a la preparación de anticuerpos (Browdy, 1992).

Adiyodi y Subramoniam (1983), mencionan que la presencia de una fracción de vitelo (VTG) en la hemolinfa, que serológicamente es idéntica a la lipovitelina (VTL), se podría explicar en dos formas; 1) Puede ser el resultado de la lisis del vitelo y su posterior liberación hacia la hemolinfa 2) Síntesis activa de una proteína específica (VTG = FSP) fuera del ovario y su subsecuente liberación a la hemolinfa, posiblemente para facilitar su incorporación selectiva por los ovocitos.

Estas hipótesis variadas y evidencias alternativas de los diferentes sitios de vitelogénesis en crustáceos no esta completamente esclarecida, mucho menos aún la comprensión del control endocrino y regulación de la vitelogénesis en crustáceos (Woo-

Khoo, 1988). No obstante que estos resultados sean aún objeto de controversia parece muy posible vislumbrar una dualidad en las modalidades de elaboración de la VTL, en algunos crustáceos. En efecto, de acuerdo a Adiyodi (1985), la proporción de síntesis endógena/exógena variaría según la especie. De esta manera, algunos trabajos realizados recientemente en algunos peneidos han conducido a resultados que han llevado a reconsiderar estas interpretaciones indicando que los dos orígenes son posibles, sin embargo, el principal lugar de síntesis sería el ovario (Yano y Chinzei, *op cit.*; Fainzilber *et al.*, 1989; Rankin *et al.*, 1989). Quackenbush (1989a), considera un origen mixto del vitelo (tanto endógeno como exógeno), argumentando que diferentes partes de la molécula de la VTG serían sintetizadas en distintos órganos y probablemente ensamblada en el hepatopáncreas, para de ahí dirigirse al ovario. A este propósito, se ha postulado que la coordinación endocrina de la producción de vitelo a partir de la síntesis de proteínas en los diferentes tejidos, sería un mecanismo para optimizar la energía invertida que se requiere para la producción de un gran número de huevos (Quackenbush, *op.cit.*).

Por otra parte, hay evidencias en diferentes especies de crustáceos, que el ovario es el sitio exclusivo de síntesis de VTL y la presencia de VTG en la hemolinfa en diversas especies debe ser explicado por otro mecanismo, donde se señale sobre la síntesis extraovárica y la posterior liberación del precursor de proteína vitelina (Lee *et al.*, 1996).

En la siguiente Tabla (4.2), se muestran los distintos sitios propuestos para la síntesis de la VTG y VTL en diferentes especies de crustáceos.

Tabla 4.2.- Síntesis de la VTL y VTG, en diferentes especies de crustáceos

ESPECIE	ORIGEN	SÍNTESIS DE VTL	SÍNTESIS DE VTG	AUTOR	AÑO
<i>Penaeus mondon</i>	Ovario	*		Chen y Chen	1994
<i>Penaeus semisulcatus</i>	Ovario		*	Fainzilber et al.	1992
<i>Penaeus mondon</i>	Ovario	*		Quinitio et al.	1990
<i>Penaeus japonicus</i>	Ovario		*	Yano y Chinzei	1987
<i>Pandalus kessleri</i>	Ovario Hepatopáncreas	*		Quinitio et al.	1989
<i>Callinectes sapidus</i>	Ovario pedúnculo ocular	*		Lee y Watson	1994
<i>Callinectes sapidus</i>	Ovario	*		Lee y Watson	1995
<i>Callinectes sapidus</i>	Ovario	*		Lee et al.	1996
<i>Carcinus maenas</i> y <i>Libinia emarginata</i>	Ovario hepatopáncreas		*	Paulus y Laufer.	1987
<i>Armadillidium vulgare</i>	Ovario cuerpo graso		*	Susuki et al.	1989
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Extraovárico.	*		Tom et al.	1987 b
<i>Palaemon poudicens</i>	Ovario	*		Tsumura y Nakagawa.	1989

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.5.- Factores que influyen en la vitelogénesis de crustáceos

El desarrollo de la vitelogénesis secundaria en crustáceos decápodos se produce gracias a la integración de diversos factores externos (temperatura, fotoperíodo, salinidad y otros) y factores internos, esta integración se realiza por medio de los órganos de los sentidos, principalmente de los ojos, y por medio de un complejo neurohormonal presente en el pedúnculo ocular (Charniaux-Cotton, 1985).

4.2.5.1.- Factores externos (ambientales)

Existe una variedad de factores que repercuten en el control de la reproducción (maduración ovárica) de los camarones peneidos, tal es caso de la temperatura,

salinidad, fotoperiodo, sustrato, dieta, fase lunar, ablación peduncular y tratamiento con hormonas exógenas incorporadas a través de inyecciones o de sus dietas (Chamberlain y Gervais, 1984; Woo-Khoo, 1988). Por otra parte, Adiyodi y Subramoniam (1983, 1985), mencionan que los factores involucrados en la vitelogénesis de crustáceos, no solo son físico-químicos y hormonales, sino también genéticos.

Aiken y Waddy (1980), señalan que la temperatura y fotoperiodo son factores que regulan la vitelogénesis secundaria en la langosta *Homarus*. En condiciones de oscuridad constante se puede inducir la maduración del ovario en *Orconectes virilis* sin reabsorción (Aiken, 1969). En *Pachygrapsus marmoratus*, el incremento del fotoperiodo (de 0-20 horas) indujo un ciclo de maduración más rápido y reabsorción de ovocitos en hembras maduras e inmaduras y el descenso de fotoperiodo estabilizó la condición madura del ovario (Perryman, 1969).

En la langosta espinosa *Panulirus argus* existió una interacción significativa entre el fotoperiodo y la temperatura sobre la maduración de las hembras, donde fotoperíodos mayores y temperaturas más altas tienen un efecto sobre la maduración y desove (Lipcius y Herrnkind, 1987).

Fauvel (1986), señala que la nutrición de los crustáceos tiene un papel importante sobre la vitelogénesis secundaria, influyendo en el metabolismo de hormonas y la calidad de vitelo. Además, menciona que la temperatura y la luz son otros factores importantes en estos eventos fisiológicos. En el caso del camarón *Penaeus japonicus*, la temperatura óptima es de 26 a 32^o C y es posible que con un incremento de luz asociado a incrementos progresivos de temperatura, se propicie la maduración y desove en hembras ablacionadas de esta especie. Para el camarón *Penaeus vannamei*, la maduración y desove puede ser frenadas por un ligero decremento de la temperatura.

Las hembras del acocil *Orconectes limasus* expuestas a condiciones de temperatura de 10 a 12^o C y oscuridad, aceleró la maduración ovárica (Dube y Portelance, 1992). En otra especie de acocil (*Procambarus clarkii*), Daniels et al. (1994), determinaron que los valores máximos del Índice Gonadosomático fueron a un fotoperiodo de 10horas-luz:14 horas-oscuridad y a una temperatura de 27^o C.

Quackenbush (1994), encontró una interacción del fotoperíodo y temperatura, los cuales regulan el proceso de biosíntesis de vitelo en hembras de la langosta americana (*Homarus americanus*).

4.2.5.2.- Factores internos

4.2.5.2.1.- Control Endocrino de la Muda y la Reproducción

Los eventos de muda y reproducción en crustáceos decápodos y su respectivo control hormonal, están estrechamente relacionados (Aiken y Waddy, 1980). Estos sistemas de control residen en gran parte en complejos neurosecretores presentes en el sistema nervioso central (Nelson, no publicado). Este sistema neuroendócrino en crustáceos consiste de glándulas endocrinas propiamente y estructuras neuroendocrinas (las células neurosecretoras y órganos neurohemales) (Fingerman, 1987). La mayor parte del conocimiento de la influencia o mecanismos de control endocrino en crustáceos derivan de estudios hechos en malacostrácos (Adiyody, 1985; Fingerman, 1987).

Las estructuras endocrinas en crustáceos se pueden clasificar en los siguientes tipos.

a) Complejo Organo X-Glandúla del Sinus

b) Organo Postcomisural

c) Organo Pericardio

d) Organo Y

e) Glandúla Andrógena

f) Ovario

g) Organos Mandibulares

a) Complejo Organo X-Glandúla del Sinus

Este complejo es el más importante centro de control neuroendocrino de los crustáceos, sin embargo, en los crustáceos entomostrácos este complejo está ausente. Este glándula fue por primera vez descrita por Hanstrom (1933), y se localiza en el pedúnculo ocular y presenta una extensión fuera del cuerpo propio del pedúnculo, que consta de la lamina ganglionaris, medulla externa, medulla interna y medulla terminalis.

Es un hecho que la glándula del seno no produce las hormonas que contiene, debido a que es un *órgano neurohemal* que almacena y libera estas neurohormonas. Esta glándula esta constituida por axones terminales y la mayoría de estos pertenecen o provienen de los cuerpos celulares que descansan en una porción de la *Medulla Terminalis* conocida como *órgano X*, que es el centro productor de hormonas (Fingerman, 1987; Woo-Khoo, 1988). Esta glándula afecta el proceso de reproducción al liberar a la hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH), que inhibe tanto el proceso de la captación de la VTG como su síntesis (Charniaux-Cotton, 1985).

b) Organo Postcomisural y c) Organo Pericardio

Hay órganos neurohormonales adicionales, el *órgano Postcomisural* (PCO) y el *órgano Pericardio* (PO). El PCO es una conjunción de axones terminales de nervios, su papel es almacenar y liberar hormonas que controlan la coloración (Fingerman, 1987).

d) Organo Y

Es una glándula epitelial no neural, esta fue descrita para 58 especies de malacostrácos. Se localiza en el segmento máxilar del cuerpo y es sitio de producción de la hormona de la muda. Al parecer las células del *órgano Y* absorbe colesterol de la hemolinfa y convierten este en la hormona de la muda a medida que sea necesario (Fingerman, 1987).

e) Glandúla Andrógena

Esta glándula esta presente solo en los machos y al parecer es exclusiva de los malacostrácos, su posición es subterminal en la región eyaculatoria del *vaso deferente*. Su función es la de secretar una hormona (6-Hidroxi-Farneci-Cetona) que interviene en la diferenciación y funcionamiento del sistema reproductor de machos (Fingerman, 1987).

f) Ovario

El ovario de isópodos y anfípodos es el sitio de producción de una o más hormonas que controlan la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios, esto

similarmente se presenta en los decápodos (Fingerman, 1987). Por otra parte, durante la durante la foliculogénesis secundaria, se ha postulado que las células foliculares pueden ser endocrinas, secretando la hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis (VSOH) (Charniaux-Cotton, 1985).

g) Organos Mandibulares

Es un enigma, el posible origen endocrino de los órganos mandibulares, se presentan cerca del Organo Y, y ha sido incluso mal identificado y confundido con este. Su papel esta relacionado con la muda y/o reproducción, ya que sus células cambian en apariencia a nivel de ultraestructura durante la vitelogénesis y en algunas especies también durante el ciclo de muda (Aoto *et al.*, 1974; Taketomi y Kawano, 1985). Hasta hace poco se descubrió en cinco especies de decápodos, como en *Libinia emarginata*, la producción de Metil Farnesoato, que se puede convertir en hormona juvenil (J-III y Acido Farnesoico) (hormona bien definida en insectos); este compuesto es altamente lipofílico, y al parecer su papel endocrino, esta vinculado con aspectos de reproducción y su concentración es seis veces más alta en hembras vitelogénicas que en hembras no vitelogénicas y juveniles (Borst *et al.*, 1985; Laufer *et al.*, 1987; Woo-Khoo, 1988). En langostas ablacionadas, los niveles de esta hormona se incrementa hasta 30 ng/ml (Tsukimura y Borst, 1992).

4.2.5.2.2.- Hormonas involucradas en el proceso de la Muda

El aislamiento y características de las hormonas peptídicas del pedúnculo ocular, que regulan la muda y el desarrollo gonadal, han sido ampliamente estudiadas para algunos decápodos (Adiyodi, 1985; Fingerman, 1987).

El termino de muda es usado para referirse al proceso entero del ciclo de muda. Al ocurrir la exuviación hay un notorio incremento en talla debido a la absorción de agua y la formación y endurecimiento del nuevo exoesqueleto, este termino de muda es sinónimo con el de ecdisis (Fingerman, 1987). El ciclo total de muda se divide en cinco principales estados, con algunos subestados que fue propuesto originalmente por Drach (1939) y ha sufrido diversas modificaciones entre los diferentes grupos de decápodos.

Estos estados son reconocidos por letras (A-E); el estado A empieza después de la propia ecdisis, en este ya existe la nueva epicutícula y la exocutícula. El estado B, empieza pocos días después, durante este empieza la síntesis de la endocutícula que continúa hasta C₁ y C₂; con la formación de la capa membranosa se considera el subestado C₃; para que posteriormente el animal pase a la anaecdisis (C₄). La duración de la anaecdisis es tan largo como un año. En la proecdisis (D₀-D₄), la vieja cutícula empieza a ser degradada hasta en un 75%, además el calcio y pigmentos como astaxantinas son almacenados en los gastrolitos y en la hemolinfa, respectivamente. La nueva epicutícula y exocutícula son sintetizadas y la exuviación ocurre en el estado E (Skinner, 1985).

Los factores hormonales que controlan el ciclo de muda, corresponden a la hormona de la Muda (β -Ecdisona) y la Hormona Inhibidora de la Muda (MIH), esta última es producida en el complejo Organo X-Glandula del Seno (Skinner, 1985; Fingerman, 1987). La MIH es un neuropeptido y los esfuerzos por purificarla, la han realizado Quackenbush (1985) y Chang (1985), El peso molecular estimado para la MIH esta entre los 1,000 y 5,000 Daltons (Freeman y Bartell, 1976).

La acción de la MIH fue originalmente considerada como un factor en la inhibición de la β -ECD producida por el Organo Y, sin embargo, hay evidencias que actúa antagónicamente con la β -ECD, en células periféricas (epidermales), por lo que regulan la respuesta de la β -ECD (Fingerman, 1987). La liberación de la MIH esta regulada por un neurotransmisor, 5-Hidroxitriptamina (5-HT).

Las hormonas de la muda son ecdisteroides, que son sintetizados a partir del colesterol en el Organo Y y posteriormente liberadas a la hemolinfa. El Organo Y produce una alfa-ecdisona (Ecdisona, esteroide Polihidroxilada), la cuál es convertida periféricamente (en otros tejidos) a 20-Hidroxiecdisona (Beta Ecdisona, Ecdisterona) (Skinner, 1985; Fingerman, 1987). Evidencias de que el Organo Y es el lugar de producción de la ecdisona y el papel de la 20-OH-ecdisona en el control de la muda se han acumulado por diversos estudios, estos han incluido, la estimulación de la muda precoz por tratamientos de animales anacecdisiales con ecdisteroides, medición del incremento de los títulos de los ecdisteroides en la hemolinfa en animales proecdisiales,

secreción de la ecdisona por el Organo Y *in vitro* (Chang y O'Connor, 1977; Skinner, 1985).

La cantidad de ecdisteroides circulantes parece ser variable entre los crustáceos, por ejemplo, los cangrejos liberan mucho menos ecdisterona que las langostas homáridas, estas diferencias pueden ser debidas a las técnicas de medición o la diferencia entre las especies. Se han encontrado ecdisteroides en otros tejidos, además del Organo Y, pero su funcionamiento es desconocido (Hopkins, 1983; Chang, 1984, 1985 en Quackenbush, 1986).

Los ecdisteroides de algunos insectos controlan la vitelogénesis, lo anterior supone que estos compuestos regulan algunos aspectos de la reproducción de crustáceos, ya que han sido encontradas en gónadas de algunas especies (Adiyodi y Subramoniam, 1983).

Hay registros que en adición de la MIH y la β -ECD, hay otra hormona involucrada en el proceso de muda, denominada hormona aceleradora de la muda (MAH), que posiblemente sea producida en el pedúnculo ocular, cerebro o ganglio torácico (Nelson, no publicado) y posiblemente estimula la producción de ecdisteroides por el Organo Y.

4.2.5.2.3.- Hormonas involucradas en la Reproducción

— El control endocrino de la reproducción ha sido investigado en una amplia variedad de crustáceos, particularmente los isópodos y anfípodos han recibido una considerable atención. Las neurohormonas también como las hormonas son el producto de glándulas endocrinas (Fingerman, 1987).

Adiyody y Adiyodi (1970), mencionan que seis hormonas están involucradas en aspectos de la reproducción de crustáceos decápodos, que a continuación se señalan:

MIH (Hormona inhibidora de la muda)

β -ECD (Hormona de la muda)

GIH (Hormona inhibidora de la gónada)

GSH (Hormona estimuladora de la gónada)

AH (Hormona andrógena)

FH (Hormona de la hembra?)

Posteriormente, Junera *et al.* (1977), incluyo en esta lista a la VSOH (Hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis).

β -ECD (Hormona de la muda)

En anfípodos e isópodos, los ecdisteroides parecen tener un papel reproductivo, en adición a la muda, evento necesario para la síntesis de vitelogenina (Meusy *et al.*, 1977; Blanchet-Tournier, 1982). En anfípodos, bajos títulos de 20-OHecdisona es requerida para la vitelogénesis (Charniaux-Cotton, 1985). Por otra parte, en *Orchestia gammarella* las inyecciones exógenas de ecdisteroides acortan o prolongan el ciclo de muda, cuando la vitelogénesis esta ocurriendo y altos títulos de ECD en la premuda tardía evitan la foliculogénesis secundaria y la síntesis de la VTG por el cuerpo graso (Nelson, no publicado).

GIH (Hormona inhibidora de la gónada)

Es una neurohormona que se origina en el complejo Organo X-Glandúla del Sinus, es un neuropéptido con pesos moleculares de 2,000 (Bomirski *et al.*, 1981), 5,000 (Quackenbush y Herrnkind, 1983) y 7,000 Daltons (Fauvel, 1986), y pertenece a la familia de los neuropeptidos que incluye a la MIH y dos isoformas de las hormona hiperglicémica y la CCH (Aguilar *et al.*, 1992).

La GIH esta involucrada en el descanso genital, porque inhibe la vitelogénesis secundaria (Charniaux-Cotton, 1978, 1980) y previene la toma de vitelogenina por los ovocitos a través de una competencia de "enlace" con los receptores de membrana, los cuáles reconocen y capturan las moléculas antes de la internalización (toma activa) (Jugan y Soyez, 1985). La liberación de la VSOH puede ser controlada por la GIH (Fauvel, 1986).

La GIH y la GSH ocurren en ambos sexos, y la primera esta presente tanto en hembras inmaduras como maduras. Algunos estudios sobre la identificación y caracterización de esta hormona fueron realizados por Bomirski *et al.*, (1981), Charniaux-Cotton (1985) y Aguilar *et al.*, (1992).

GSH (Hormona estimuladora de la gónada)

La GSH es una neurohormona producida en el protocerebro y ganglio torácico (Fauvel, 1986; Fingerman, 1987). La acción de la GSH podría ser doble: 1).- estimulación directa al ovario y 2).- la inhibición de la GIH (Adiyodi, 1985); además, suprime la entrada del animal a la premuda (Aiken y Waddy, 1980). La cantidad de esta hormona está relacionada con el estado reproductivo, siendo mayor su concentración en fases reproductivas.

VSOH (Hormona ovárica estimuladora de la vitelogénesis)

Los estudios con el anfípodo *Orchestia gammarella* realizados por Junera *et al*, (1977), concluyen que el ovario produce un factor que estimula la síntesis de vitelogenina. El tejido folicular secundario del ovario, se le atribuye la función endocrina y secretora de la VSOH (Charniaux-Cotton, 1985). La síntesis de VSOH es suprimida por la GIH y promovida por la GSH, sin embargo, esto es especulativo (Aiken y Waddy, 1980).

4.2.5.2.4.- Control Hormonal

La vitelogénesis secundaria se encuentra bajo el control de factores externos (temperatura, luz, salinidad, pH, etc.), que son integrados por el sistema nervioso central y que a su vez regulan la maduración por medio de un balance hormonal (Figura 4.1). Este equilibrio se debe, por una parte a dos hormonas que favorecen la síntesis de la VTG: una de origen nervioso, la VSH (*Vitellogenesis Stimulating Hormone*) y otra que proviene de los ovarios, sintetizada por las células foliculares, la VSOH (*Vitellogenesis Stimulating Ovarian Hormone*) que actuaría de la misma manera que los estrógenos en los vertebrados para estimular la síntesis de la VTG.

Por otra parte, una regulación negativa es ejercida por medio de una hormona de origen peduncular, inhibidora de la vitelogénesis secundaria, la VIH (*Vitellogenesis Inhibiting Hormone*). Por último, una serie de hormonas esteroidicas, sesquiterpenoides, (metil fernezoato, ácido fernezoico, hormona juvenil) y de péptidos

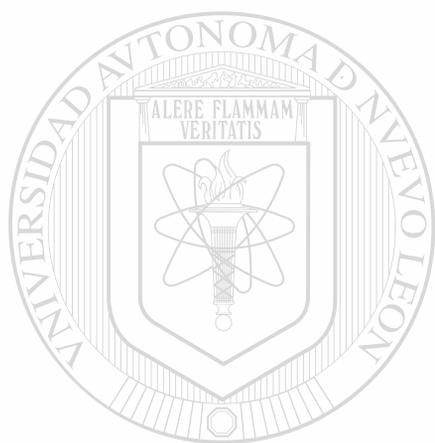
(-Moulting Inhibiting Hormone-MIH) parecen participar en los procesos de inducción, de inhibición, y de mantenimiento de la vitelogénesis (Mendoza, 1992).

La muda es inducida solo cuando los niveles de MIH y VSH son bajos en la hemolinfa y altos en MH (-Moulting Hormone-) que actúa directamente desde el órgano-Y, situado cerca de las mandíbulas y VIH. Esto se explica por que la MIH, de origen peduncular, la cual inhibe a la MH mientras que la VIH suprime la acción de la VSH. Esta interacción hormonal adquiere mayor importancia en la reproducción debido al antagonismo existente entre el crecimiento somático (en el cual depende de la muda) y la vitelogénesis.

En el caso particular de la VIH, esta hormona ha sido caracterizada como un neuropéptido sintetizado por el órgano X- glándula del sinus (Fainzilber *et al.*, 1992). Dicha hormona es la responsable del reposo genital, ya que inhibe la vitelogénesis secundaria (Charniaux-Cotton, 1978), previendo la captación de vitelogenina por los ovocitos a través de una competencia de "enlace" con los receptores de membrana, los cuales reconocen y capturan las moléculas de VIH antes de la internalización (toma activa) de la VTG (Jugan y Soyez, 1985). Se ha postulado que esto es debido a que la VIH tiene mayor afinidad que la VTG misma por los receptores de esta última y posiblemente intervenga igualmente, impidiendo la acción de las hormonas estimuladoras de la vitelogénesis (VSH, VSOH), (Meusy, 1980; Fauvel, 1986). Finalmente, se ha demostrado la inhibición *in vitro* de la síntesis de proteínas precipitables por anticuerpos contra una subunidad de VTL y VTG (Lee y Watson, 1994).

En lo que concierne a la VSH, se trata de una neurohormona producida en el protocerebro y ganglio torácico (Fauvel, 1986; Fingerman, 1987), cuya acción podría ser doble: 1).- estimulando directamente al ovario y 2).- contrarrestando la acción de la VIH (Adiyodi, 1985). Adicionalmente, puede intervenir suprimiendo la entrada del animal a la premuda (Aiken y Waddy, 1980). La cantidad de esta hormona está relacionada con el estado reproductivo, siendo mayor su concentración en las fases

avanzadas de la vitelogénesis. Por otra parte la VSH, se estimularía a la VSOH, siendo esta de origen ovárico, la cual propiciaría directamente la síntesis de la VTG (Aiken y Waddy, 1980).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

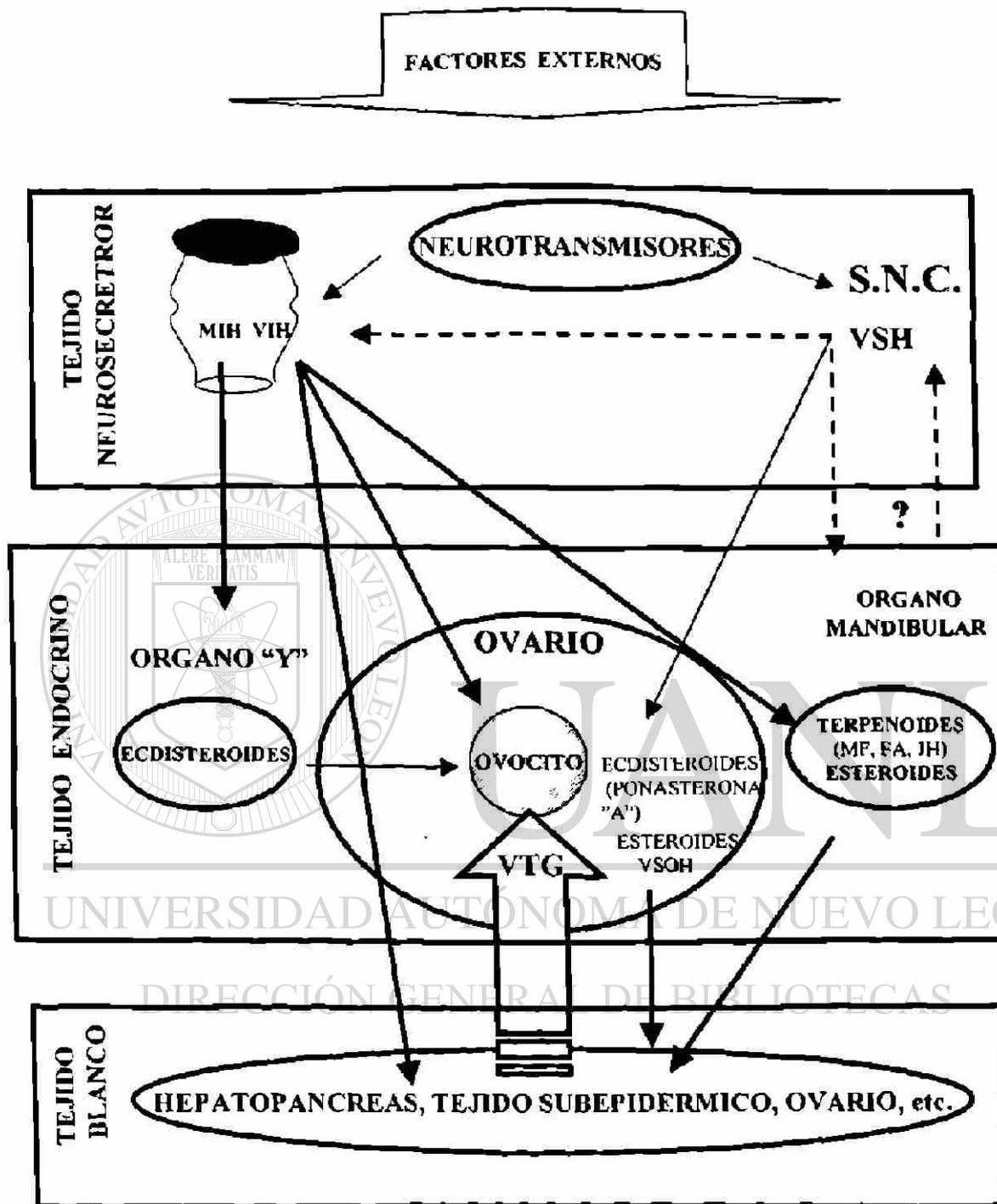


Figura 4.1. Diagrama esquemático del control hormonal (Tomado de Mendoza, 1992).

4.2.5.3.- Ablación Pedúncular

Existen varios métodos para inducir la maduración ovocitaria y desove en camarones, que podrían también ser referidos para otros decápodos, como es la manipulación ambiental, nutrición, tratamiento con hormonas exógenas a través de inyecciones o inclusiones en la dieta y la ablación pedúncular (Woo-Khoo, 1988). Todas estas técnicas relacionadas a la producción tecnológica de crustáceos.

Es ampliamente conocido que la ablación pedúncular en crustáceos decápodos, elimina parte del sistema neuroendocrino que produce las neurohormonas como la MIH y VIH, esta técnica favorece el proceso de muda, la biosíntesis del vitelo, en casi todas las especies de crustáceos (Quackenbush, 1986) y la maduración ovárica (Koo-Whoo, 1988).

El efecto de la ablación pedúncular es dependiente de la especie y estado de muda. Así, cuando la extirpación del pedúnculo ocular se realiza durante la etapa de premuda inicia súbitamente el proceso de muda, de aquí que, la ablación solo sea efectiva después de la exuviación, pero es preferible que se realice durante la etapa de intermuda. Los efectos no solo se reflejan en la muda, crecimiento y reproducción, sino además en la tasa cardíaca, metabolismo de proteínas y azúcares, balance del agua y pigmentación (Aiken y Waddy, 1980).

— En especies de decápodos como *Cangron crangon*, *Rhithropanopeus harnisii*, *Penaeus monodon* y *Panulirus argus*, se ha observado el efecto de la ablación pedúncular sobre la maduración gonadal (Bomirski y Klek, 1974; Quackenbush y Herrnkind, 1981; Tan-Fermin, 1991).

4.2.6.- Técnicas y métodos utilizados en el estudio de la vitelogénesis

4.2.6.1.- Caracterización y Purificación

La frecuente utilización de diversas técnicas de cromatografía y electroforesis se ha llevado acabo para aislar y separar moléculas, medir su peso molecular, distinguir diferentes aspectos de su estructura y evaluar la pureza de los compuestos aislados. Así, en estudios recientes se ha purificado y caracterizado la VTL en ovarios maduros

de distintos crustáceos, utilizando diversas técnicas bioquímicas como la filtración en gel, intercambio de iones, electroforesis en gel de poliacrilamida, agarosa e Inmunolectroforesis. Se han obtenido como resultado moléculas nativas y subunidades de polipéptidos de alto peso molecular variando según la especie (c.f. Figura 4.1). Un patrón común dentro de estas investigaciones es que la purificación de la VTL y VTG se ha basado en la de sus constituyentes principales: lípidos, carbohidratos y carotenoides, como se mencionó anteriormente.

4.2.6.2.-Cromatografía

La separación por cromatografía se basa en las fuerzas competitivas de dos fases, una fija o estacionaria que consta de diminutas partículas esféricas de gel que funcionan como cribas moleculares; y otra continuamente renovada o móvil, que se establece por las moléculas de un soluto. El fundamento para la filtración en gel se basa en la mayor o menor posibilidad de penetrar las moléculas en los poros de las partículas de relleno. Según su tamaño, se introducirán en los poros; cuanto menores sean, más profundamente entrarán y más tardarán en ser eluidas de la columna, permitiendo así la separación de moléculas en función de su masa molecular.

4.2.6.3.- Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), es un método analítico, de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través del gel de corrida, siendo una poderosa herramienta para efectuar separaciones, aislamientos, evaluaciones de pureza y cuantificaciones del peso molecular. Las ventajas de la PAGE son su facilidad y rapidez de operación, la alta precisión de sus detecciones, el hecho de que no se dañen sustancias tan delicadas como las proteínas y los ácidos nucleicos, y sobre todo el hecho de que se logre separar los componentes individuales de mezclas complejas.

4.2.6.4.- Ultracentrifugación

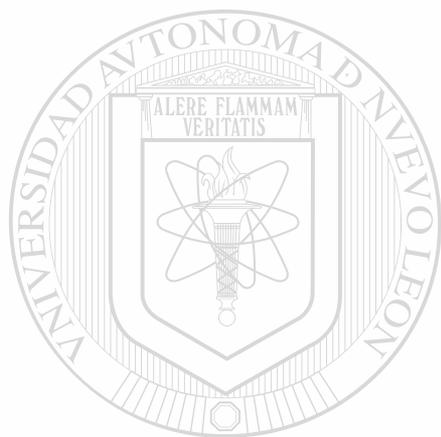
La ultracentrifugación permite el aislamiento y la caracterización de las proteínas. La aplicación de la fuerza centrífuga a las moléculas en solución les permite

una velocidad de sedimentación que permite separar las proteínas dependiendo de su tamaño, masa y densidad relativa al solvente.

Tabla 4.3.- Técnicas empleadas para la purificación y caracterización de la VTL y la VTG en diferentes especies de crustáceos.

ESPECIE	TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	RESULTADO	AUTOR	AÑO
<i>Penaeus mondon</i>	Cromatografía Inmunolectroforesis	Extracción y Caracterización de la vitelina.	Quinitio <i>et al.</i>	1990
<i>Penaeus mondon</i>	Cromatografía PAGE Inmunolectroforesis.	Purificación y extracción de vitelina	Chang <i>et al.</i> ,	1993 a
<i>Penaeus chinensis</i>	PAGE, Electroelucion.	Purificación	Chang y Jeng	1995
<i>Penaeus chinensis</i>	Cromatografía (SDS)-PAGE	Purificación y Caracterización de la vitelina.	Chang <i>et al.</i> ,	1996
<i>Penaeus mondon</i>	PAGE Inmunolectroforesis	Extracción y Caracterización de vitelina.	Chen y Chen	1993
<i>Penaeus vannamei</i>	Ultracentrifugación Filtración en gel Cromatografía de intercambio iónico	Purificación y Determinación de la VTG y VTL.	Mendoza <i>et al.</i> ,	1993
<i>Penaeus japonicus</i>	Electroforesis (SDS)- PAGE.	2 Polipeptidos de la vitelogenina.	Yano y Chinzei	1987
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Cromatografía (intercambio iónico) Electroforesis discontinua Inmunolectroforesis	Purificación y Caracterización de vitelina.	Tom <i>et al.</i> ,	1987 a
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Cromatografía (DEAE- Sephacel) PAGE Inmunolectroforesis Inmunofluorescencia	Material inmunológicamente similar a la vitelina del tejido adiposo, subepidermal, hemolinfa y en glóbulos del vitelo de los ovocitos.	Tom <i>et al.</i> ,	1987 b
<i>Armandillidium vulgare</i>	PAGE Inmunolectroforesis	4 formas de VTL y 4 formas de VTG	Suzuki	1987
<i>Pandalus kessleri</i>	Cromatografía Inmunolectroforesis	Identificación y Caracterización de la vitelina	Quinitio <i>et al.</i> ,	1989
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Filtración en gel (DEAE- Sephacel) HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) PAGE	Purificación y Caracterización en tres vitelinas	Chang <i>et al.</i> ,	1993 b
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Cromatografía (columna, DEAE, hidroxylapatite), SDS-PAGE, ELISA.	Purificación y Caracterización de vitelina.	Lee y Chang	1997

	Western-blotting.			
<i>Callinectes sapidus</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida	Cuatro subunidades de vitelina	Lee y Watson	1995
<i>Potamon potamios</i>	Cromatografía, SDS-PAGE, Western blotting	Identificación, Determinación y Purificación de Vn y Vg	Pateraki y Stratakis.	1997
<i>Periplaneta americana</i>	Cromatografía de intercambio de iones PAGE, Filtración en gel (DEAE-Sephadex y Sepharose)	Purificación y Caracterización de la vitelina	Kim y Lee	1994



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.3.- METODOLOGIA

4.3.1.- Caracterización y Purificación de la VTG y VTL

En la siguiente figura (4.2) se presenta el diseño experimental utilizado para la caracterización y purificación de VTL y VTG.

PURIFICACION DE LA VTG Y DE VTL



4.2.- Diagrama de flujo para la purificación de VTG y VTL

4.3.1.1.-Obtención de hemolinfa

Para la extracción de la hemolinfa se utilizó una jeringa de 1 ml., previamente enjuagada con oxalato de potasio al 5%, para evitar la coagulación de la misma. Las punciones se realizaron en la cara ventral del primer segmento abdominal. Las muestras se centrifugaron a 15,000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C, separando el plasma de las células sanguíneas. Todas las muestras fueron mantenidas en congelación a -20°C, para ser utilizadas en la purificación y caracterización de la VTG.

4.3.1.2.- Preparación del extracto de ovario

Para la purificación y caracterización de la VTL se utilizaron gónadas de hembras en estadio IV, el cual fue confirmado por medio del IGS y cortes histológicos. Por otra parte, se realizaron extractos de gónadas de hembras impúberes (estadio I) y de machos, para ser utilizadas como controles negativos.

Las gónadas (10.2 g) se homogenizaron en un Potter-Elvehjem con un buffer de fosfatos 50mM pH 7.2 (8 ml) conteniendo Fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0.5 mM (5 µl.) a 4°C. (Mendoza *et al.*, 1993). Posteriormente el homogenizado se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 15 min. a la misma temperatura para eliminar los residuos sólidos, y el sobrenadante fue utilizado para la purificación (Tom *et al.*, 1992; Riley y Tsukimura, 1998).

4.3.1.3.- Ultracentrifugación

Se ultracentrifugaron los extractos de ovario a 120,000 g durante 24 h a 4°C, en un gradiente de densidad a base de Bromuro de Potasio (KBr $\rho=1.33\text{g/ml}$) (Mendoza *et al.*, 1993; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995).

d) Precipitación

Tanto la hemolinfa como los extractos de ovario (5 ml) se precipitaron con una solución de EDTA 20mM, pH 7.7 (20 ml). Posteriormente, se adicionó MgCl_2 0.5M (1.6 ml), y se mezclaron por inversión. El precipitado resultante se centrifugó a 2,500 g durante 15 min. El sobrenadante fue desechado, y el pellet fue rediseuelto con un buffer TRIS-Cl 50mM, NaCl 1M pH 7.5 (3 ml) (Wiley *et al.*, 1979).

Igualmente se probó un protocolo alternativo consistente en disolver la hemolinfa y los extractos de ovario en un buffer TRIS-Cl 50mM, NaCl 1M pH 7.5 (3 ml), con Fluoruro de fenimetilsulfonil (PMSF) 3 mM. Posteriormente se precipitó por la adición de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. (De Vlaming *et al.*, 1980).

4.3.1.4.- Filtración en gel

Para la filtración en gel e intercambio de iones se utilizó un cromatógrafo modelo Gradi Frac (PHARMACIA BIOTECH). Las muestras fueron inyectadas en una columna (XK/26) de 51 cm de altura con 270 ml. de SEPHACRYL-300 HR (PHARMACIA BIOTECH), a un flujo de 1 ml./min. (Mendoza *et al.*, 1993)

La columna se empacó con buffer de fosfato 0.1M pH 7.2, iniciando con un flujo de 4 ml/min durante 2 h, para posteriormente incrementarlo a 6 ml/min. durante 1h. El eluente se monitoreó a 280 nm. Para la calibración de la columna se utilizaron las siguientes moléculas de referencia: anhidrasa carbónica (29,000 Da), albúmina (66,000 Da), alcohol deshidrogenasa (150,000 Da), β -amilasa (200,000 Da), apoferritina (443,000 Da), tiroglobulina (669,000 Da) y azul dextran (2,000,00 Da) (MW-GF-1000 KIT, SIGMA). Las fracciones de extracto de ovario obtenidas fueron incubadas con Negro Sudan y se registró la absorbancia a 466nm.

4.3.1.5.- Cromatografía de Intercambio Ionico

Por medio de la filtración en gel mencionada en el inciso d) se obtuvo un pico proteico, el cual fue introducido a una columna (XK/16) de 20 cm de alto con 41 ml. de DEAE-Sephacel (SIGMA), equilibrada con buffer TRIS HCl 50 mM pH 8, a un flujo de 1ml/min. (Mendoza, 1992). Para la elución de las moléculas retenidas se utilizó un gradiente lineal de 0 - 50 % de KCl.

4.3.1.6.- Determinación de Lípidos

Los lípidos presentes en el ovario y la hemolinfa se determinaron por medio de la técnica de Negro Sudan B, la cual consiste en incubar 250 μl . de muestra, con 250 μl de Negro Sudan en tubos eppendorf incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 h en oscuridad.

Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 15 min. (Allen y Budowle, 1994).

4.3.1.7.- Determinación de carotenoides

Para determinar la longitud de onda de mayor absorbancia para los carotenoides presentes en la VTG y VTL se realizó un barrido del extracto de ovario en el espectrofotómetro (SPECTRONIC GÉNESIS 2) a longitudes de onda entre 300 y 700 nm. Posteriormente, se utilizó esta longitud de onda (466 nm), para identificar las fracciones con carotenoides obtenidas en las diferentes muestras obtenidas por cromatografía.

4.3.1.8.- Determinación de Proteínas

La concentración de proteínas presentes en el ovario y hemolinfa se determinó mediante de la técnica descrita por Bradford (1976). Las muestras se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro (SPECTRONIC GÉNESIS 2). Se utilizó BSA como proteína de referencia a partir de una solución de 1 mg/ml.

4.3.1.9.- Concentración de Proteína

Después de la cromatografía de intercambio iónico la fracción fue desalada en una columna PD-10 (SEPHADEX G-25, PHARMACIA) (Mendoza, 1992). Finalmente, la proteína fue concentrada por medio de ultrafiltración en una membrana de celulosa (unidad de centrifugación por filtración) de 10,000 NMWL a 4,000 r.p.m. durante 30 min. (Figura 4.2).

4.3.2.- Determinación del Peso Molecular

Para la determinación del peso molecular de la VTG y VTL, se realizó un análisis de regresión considerando el parámetro de elución K_{av} , y el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar

$$X = \frac{Y - A}{B}$$

Donde X: Antilogaritmo del peso molecular

Y: Kav

A: Intercepto

B: Coeficiente de regresión

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

donde V_o : Volumen muerto

V_e : Volumen de elución de la molécula

V_t : Volumen total de la columna

Esta determinación fue ajustada por medio de una regresión exponencial, utilizando los radios de Stokes de las moléculas, considerando que estos deben ser utilizados al tratarse de proteínas no globulares como ha sido reportado para la VTL y VTG (Mendoza, 1992).

4.4.- RESULTADOS

4.4.1.- Caracterización y Purificación de la VTG y VTL

4.4.1.1.- Ultracentrifugación

La ultracentrifugación de 7 ml. de extracto de ovario (Eov) permitió la obtención de 5 fases (Figura 4.3). Únicamente la fase EOv5 presentó una coloración anaranjada. Considerando la naturaleza caroteno-proteica de la VTL, se realizó un barrido en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 300 a 700 nm, obteniéndose un pico de absorbancia de 466nm para esta última fracción (Figura 4.4).

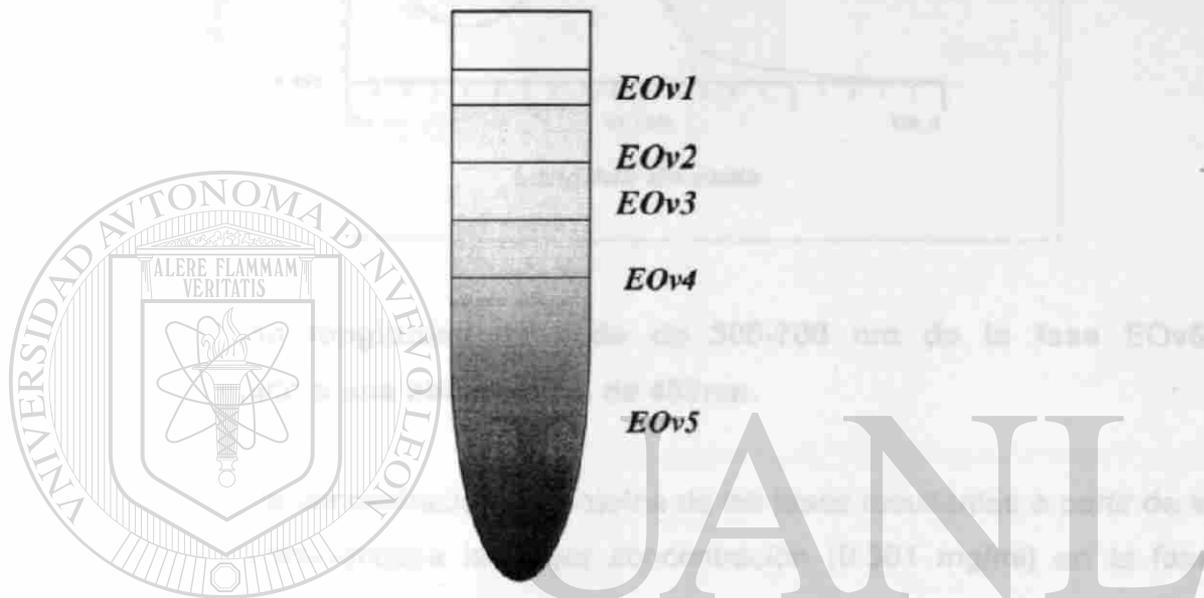


Figura 4.3.- Representación de las fases obtenidas de la ultracentrifugación (120,000 g X 24h) de extracto ovario maduro.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

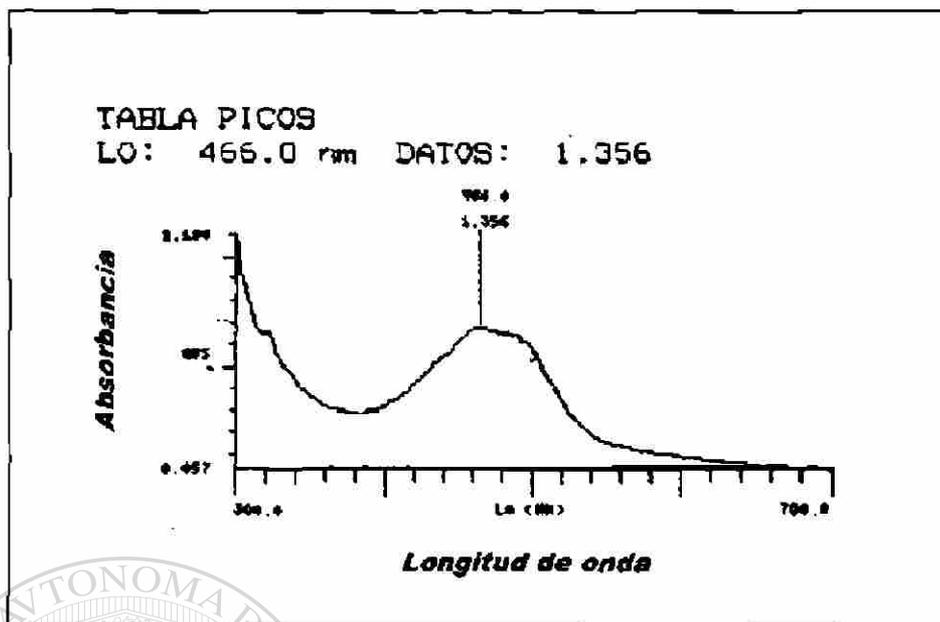


Figura 4.4.- Barrido longitudes de onda de 300-700 nm de la fase EOv5, observándose un pico a una absorbancia de 466nm.

Se determinó la concentración de proteína de las fases resultantes a partir de la ultracentrifugación, obteniéndose la mayor concentración (0.301 mg/ml) en la fase EOv5 (Figura 4.5).

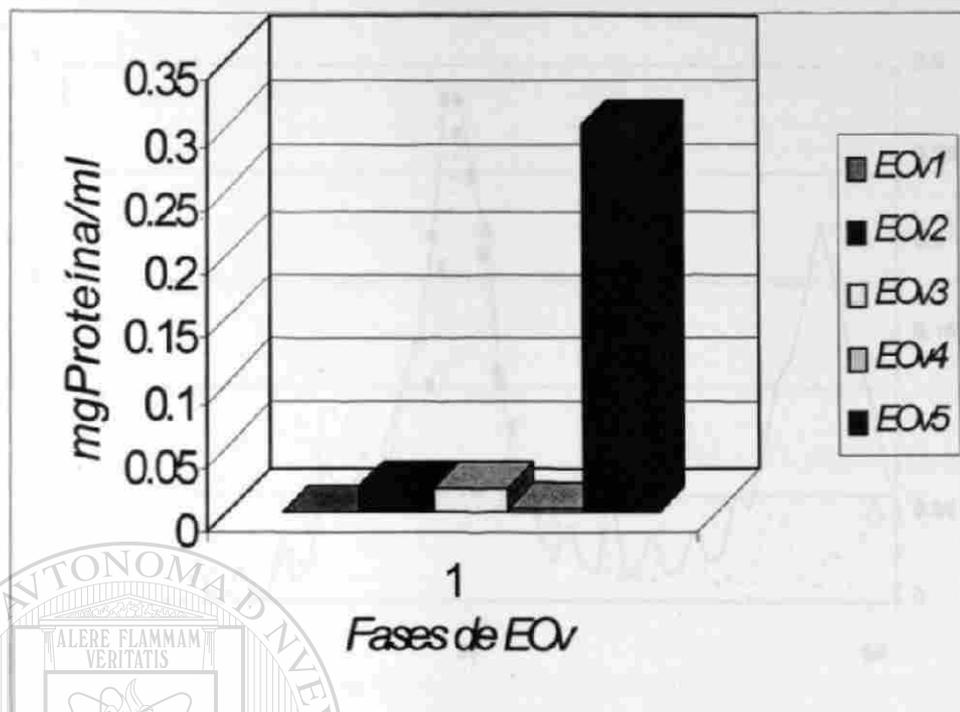


Figura 4.5.- Concentración de proteína en las fases de la centrifugación de ovario maduro.

4.4.1.2- Filtración en gel

En la Figura 4.6, se muestra el cromatograma de extractos de ovario no centrifugado (EOvNc) filtrado, en la que se pueden apreciar dos picos principales de proteínas detectados a 280 nm. El primer pico proteico comprendido entre las fracciones 25 a 36 presentó valores similares a los registrados a 466 nm, indicando que la proteína obtenida estaba asociada a carotenoides.

Por otra parte, se comprobó la naturaleza lipoproteica de las fracciones 26 a 33 mediante la técnica de Negro Sudan B (Figura 4.6).

Al mismo tiempo, se pudo observar que los espectros de elución de la fracción proteica del EOv5 y de la hemolinfa de hembra madura, coincidían, sin embargo la fracción proteica correspondiente al EOv5 presentó una menor concentración (Figura 4.7).

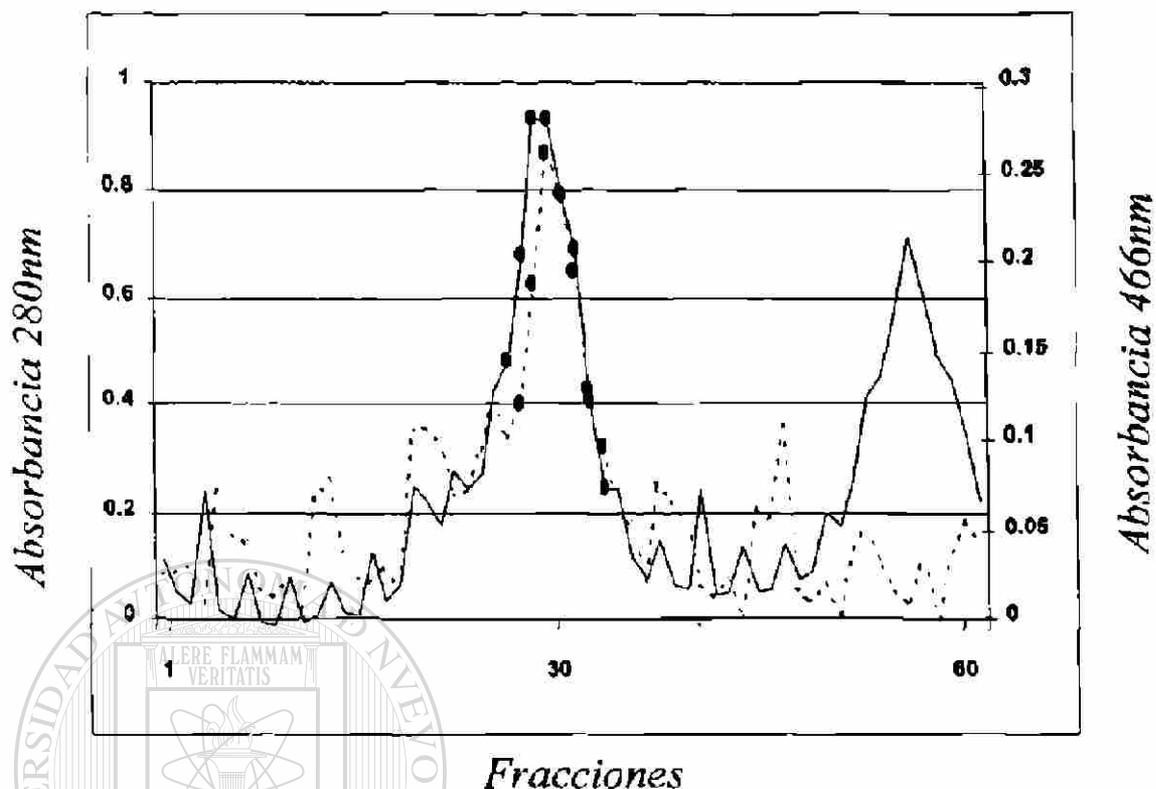


Figura 4.6.- Fracciones proteicas del extracto de ovario maduro a 280nm (azul) después de filtración en Sephacryl 300, absorbancia a 466nm (rojo) y reacción positiva de las fracciones con Negro Sudan (*).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Un aspecto interesante es que estas fracciones proteicas no se encontraron en [®] los extractos de ovario de hembras impúberes (Eoimp.) ni en los extractos de testículo (Etest.) (Figura 4.8), indicando que esta molécula únicamente se presenta en los ovarios y la hemolinfa de hembras maduras.

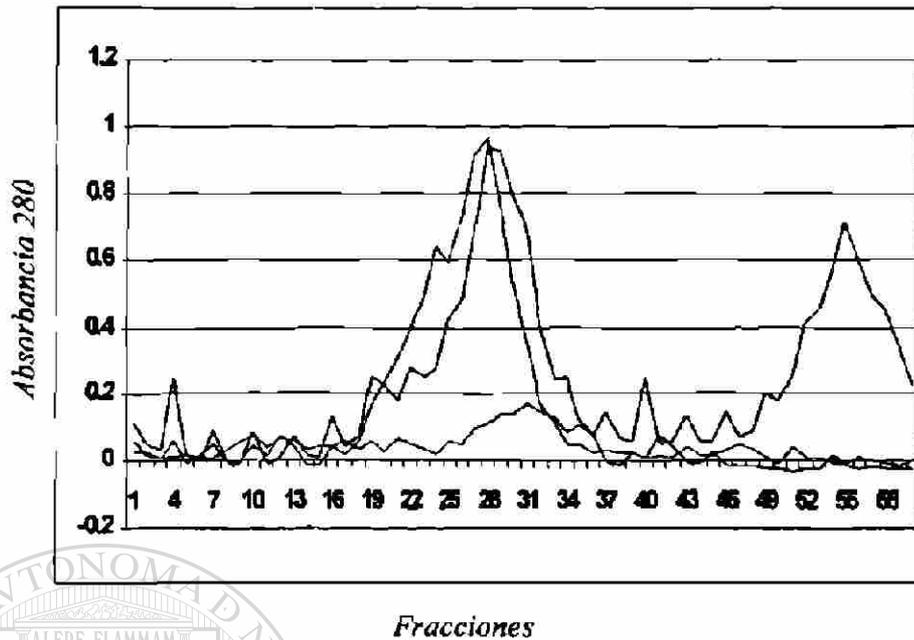


Figura 4.7.- Comparación de las fracciones del extracto de ovario maduro (azul), hemolinfa de hembra madura (rojo) y fase EOv5 (verde) en Sephacryl 300 a 280 nm.

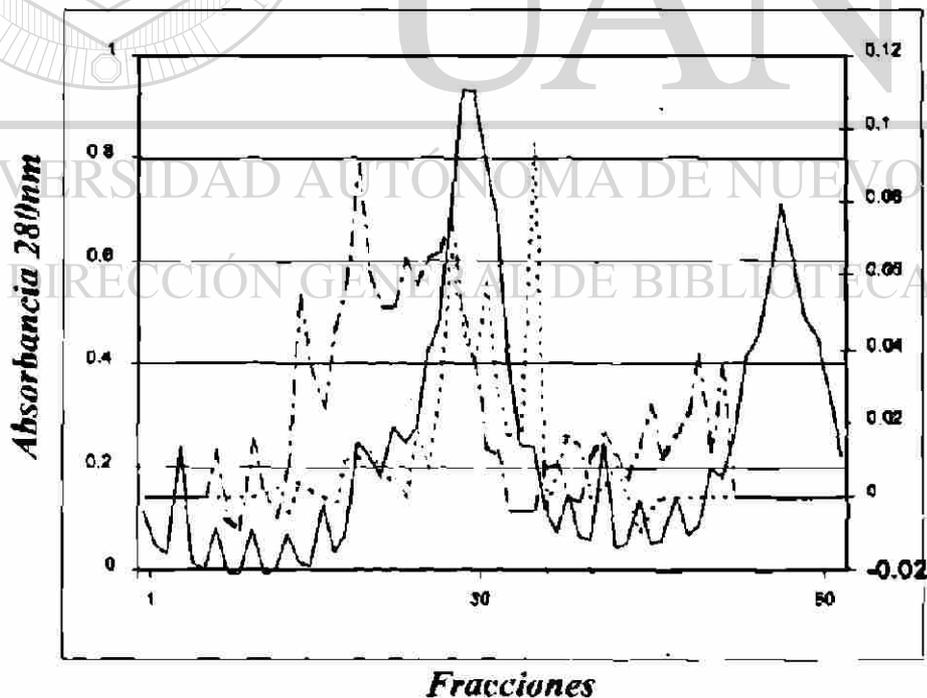


Figura 4.8.- Fracciones de extractos de ovario maduro (azul), ovario impúber (rojo) y extracto de testículo (verde) en Sephacryl 300.

4.4.1.3.- Intercambio de Iones

El pool de las fracciones de ovario maduro con características lipocarotenoproteicas (EOv5) fue sometido a cromatografía de filtración de intercambio de iones utilizando un gradiente de KCl de 0-50% (Figura 4.9) lo que permitió obtener un pico simétrico a nivel de las fracciones 24-32, indicando que se trataba de la proteína mayoritaria.

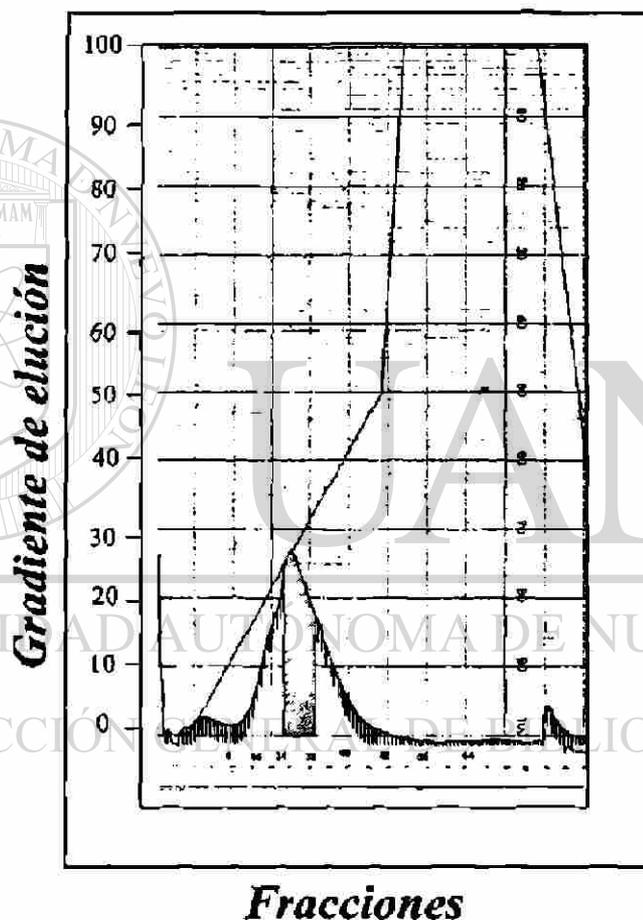


Figura 4.9.- Fracciones de pool de ovario maduro (EOv5) después de someterlos a cromatografía de Intercambio iónico (DEAE-Sephacel) (-). Gradiente lineal de 1M en buffer TRIS-HCL a un flujo de 1 ml/min.

4.4.2- Determinación del Peso Molecular

En base a la calibración de la columna y mediante el análisis de regresión lineal entre el factor de elución K_{av} y logaritmo de peso molecular, se logró determinar un peso molecular de 562,431 daltons para la VTL y de 594,259 daltons para la VTG (Figura 4.10)

Los datos necesarios para el cálculo del K_{av} de las proteínas se encuentran detallados en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4.- Valores utilizados en el análisis de regresión lineal.

	MW	Log. MW	Ve	Ve-Vo	K_{av}
Tiro globulina	669,000	5.825	94.5	18.5	0.1076
Apoferritina	443,000	5.646	109	33	0.1919
β -Amilasa	200,000	5.301	122	46	0.2575
OH- Deshidrogenasa	150,000	5.176	132.5	56.5	0.3286
Albúmina	66,000	4.819	152	76	0.4421
Anhidrasa Carbónica	29,000	4.462	170	94	0.5468
VTL	562,431	5.755	100	24	0.1396
VTG	594,259	5.773	99	23	0.1340

* $V_o = 76$ $V_t = 247.9$ $V_t - V_o = 171.9$

ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR

$$K_{av} = 1.9649 + (-0.3171)(\text{Log P.M.})$$

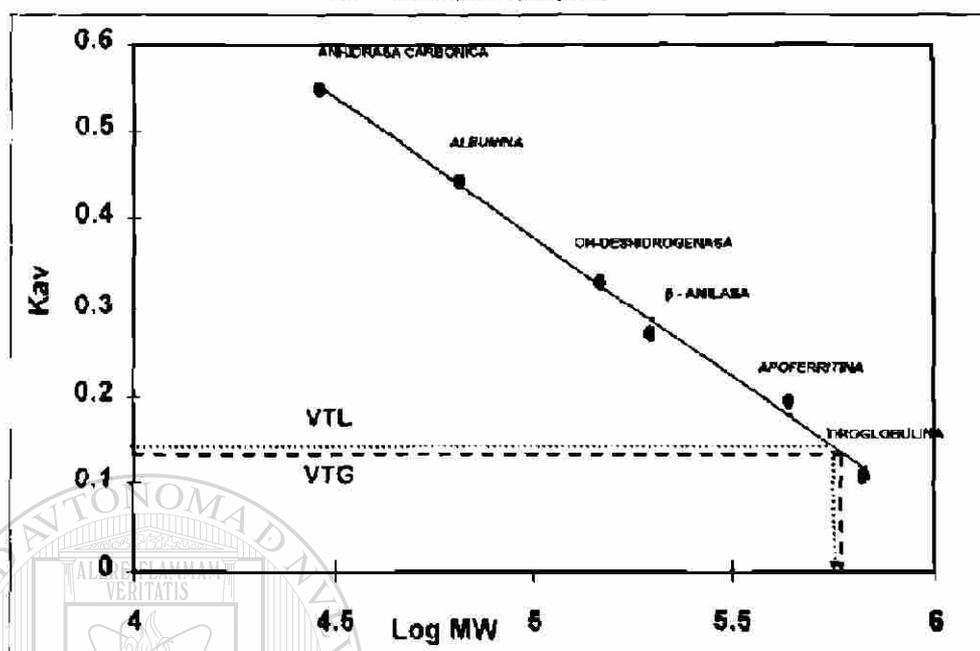


Figura 4.10.- Estimación del logaritmo del peso molecular de proteínas, mediante el análisis de regresión lineal del Kav y LogMW.

Sin embargo, como ya se había mencionado, al no ser estas moléculas proteínas globulares fue necesario recurrir a un análisis de regresión lineal en el cual se consideran los radios de stokes calculando los valores de 75.2 \AA^0 y de 76.6 \AA^0 para la VTL y VTG respectivamente (Figura 4.11). Los radios de stokes de las moléculas de referencia del mismo kit de peso molecular fueron proporcionados por el servicio de asistencia técnica de SIGMA .

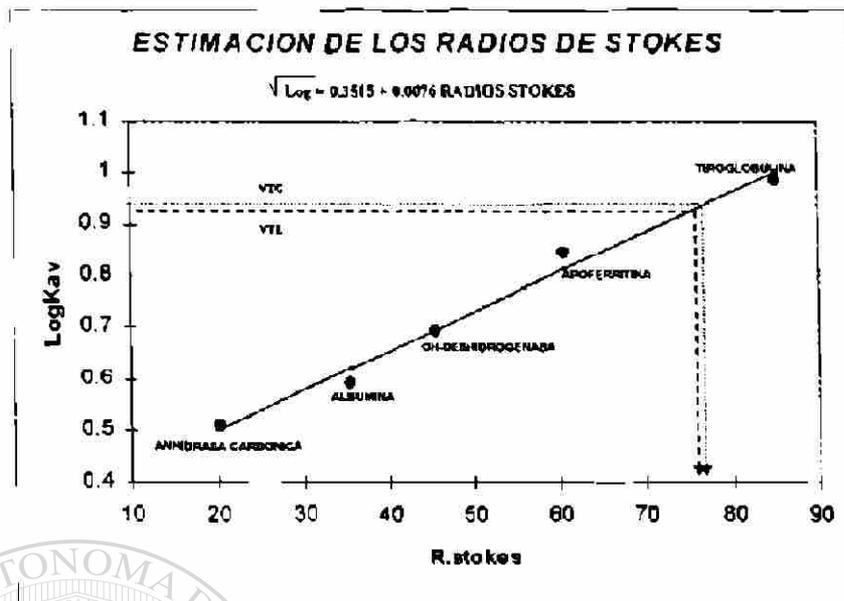


Figura 4.11.- Determinación de los radios de stokes de la VTL y VTG.

Tomando en cuenta a los radios de stokes se realizó una nueva estimación del peso de la VTL y VTG, para lo cual se utilizó la regresión exponencial que se presenta en la Figura 4.12. De esta forma, se obtuvieron los pesos moleculares de 512.6 kDa para la VTL y de 521.8 kDa para la VTG.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

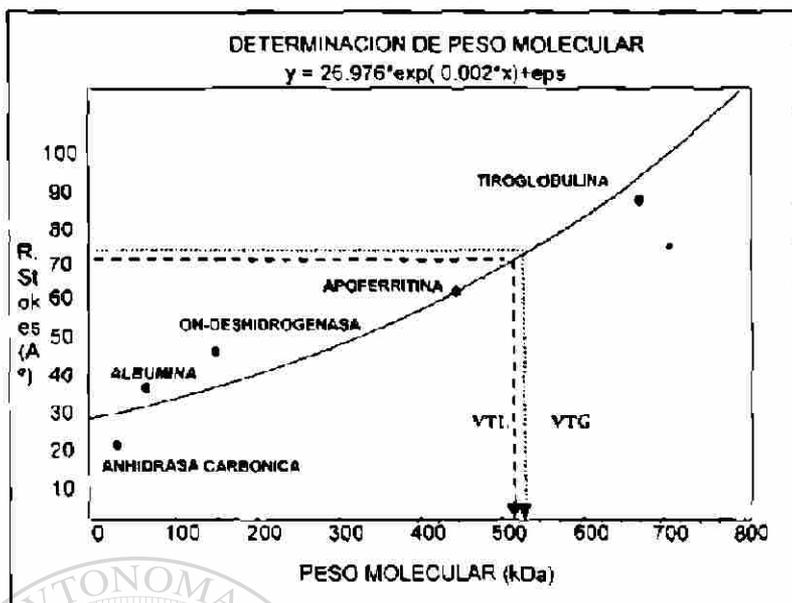
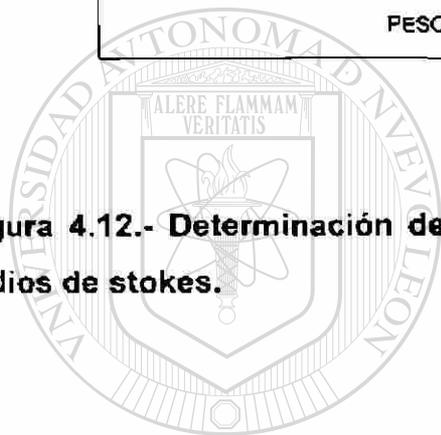


Figura 4.12.- Determinación de peso molecular de la VTL y VTG mediante los radios de stokes.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.5.-DISCUSION

4.5.1.- Purificación de la VTG y VTL

Hasta el momento, se han utilizado diversos procedimientos para purificar la VTG y la VTL de diferentes organismos acuáticos, destacando aquellos que implican una etapa de separación inicial basada en la precipitación de estas moléculas por medio del empleo de diversas sales (Wiley *et al.*, 1978; De Vlaming *et al.*, 1980; Norberg y Haux, 1988; Mendoza, 1987). Siendo el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el MgCl_2 los más comunes para precipitar las proteínas, debido a su gran solubilidad en agua, lo que permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas. Estos procedimientos son importantes para la separación de mezclas de proteínas, ya que las diferentes proteínas varían en su respuesta frente a la concentración de sales neutras. La ventaja de este procedimiento es que las proteínas precipitadas por salado ("salting out") retienen su conformación nativa y pueden disolverse de nuevo, normalmente sin experimentar desnaturalización (Lehninger, 1979).

No obstante, este tipo métodos aplicados a nuestro material no dieron resultados satisfactorios por lo que fue necesario recurrir a una adaptación del protocolo.

Unas de las principales modificaciones consistió en intercalar una etapa de separación inicial, con el fin de aumentar la eficacia del procedimiento. De esta manera, se recurrió a la separación por ultracentrifugación como primera etapa. Esta técnica reveló ser mejor que las utilizadas en experimentos clásicos, tales como las precipitaciones por EDTA- MgCl_2 o por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La primera ha sido habitualmente utilizada para purificar la VTG de vertebrados, incluyendo peces, así como de algunos crustáceos (Wiley *et al.*, 1978; De Vlaming *et al.*, 1980; Norberg y Haux, 1988; Mendoza, 1987). Mientras que la segunda es un procedimiento común para separar y concentrar prácticamente cualquier proteína en solución (Jason y Rydén, 1989).

Existen al menos dos hipótesis para explicar que el fenómeno de desnaturalización reversible en presencia de EDTA- MgCl_2 , no haya dado resultados satisfactorios con nuestro material

a) Parecería que, las cargas en la superficie de la proteína, que están implicadas en la precipitación, están ligadas a la presencia de los grupos fosfatos, y en el caso de la VTG de los crustáceos existe una mínima cantidad de grupos fosfatos debido a la baja cantidad de serina presente en la molécula (Quinitio *et al.*, 1990), contrariamente a la abundante presencia de estos grupos en la VTG de peces (Campbell y Idler, 1980; Nath y Sundararaj, 1981; Norberg y Haux, 1988).

b) Además, este tipo de precipitación suele ser particularmente eficaz cuando se presentan concentraciones elevadas de la VTG como en el caso de salmónidos, contrariamente a lo que sucede en el caso del goldfish (Norberg y Haux, 1988). En este sentido cabe señalar que, las concentraciones de VTG registrada en diferentes crustáceos son relativamente bajas (Derelle *et al.*, 1986; Mendoza y Fauvel, 1989; Quackenbusch, 1989a).

Con respecto a la precipitación por el sulfato de amonio, a pesar de ser de amplia utilización y presentar la ventaja de poder conservar intacta la molécula de VTG, esta técnica, no se retuvo en nuestro caso debido a problemas de resolubilización encontrados.

Las otras modificaciones aportadas a la purificación fueron la utilización de una columna por filtración en gel de gran tamaño (2.6 x 51 cm) para obtener una mejor separación, y la adaptación de ciertas condiciones señaladas por Wiley *et al.* (1979) para la etapa de intercambio iónico, ya que los resultados obtenidos con otros buffers (etanolamina, pH 9) y con el uso de otras sales (NaCl) ofrecieron resultados pocos resolutivos con nuestro material.

Hasta el momento, diversos autores han purificado la VTL y la VTG de crustáceos por una combinación de cromatografía de exclusión molecular y de intercambio de iones (Saiag *et al.*, 1979; Tom *et al.*, 1987 a; Andrieux y Freshville, 1992). La cromatografía se ha seleccionado ya que ofrece la ventaja de disponer de la molécula en fase líquida, lo que permite continuar con su ulterior purificación por medio de diferentes técnicas (cromatografía de afinidad, cromatoenfoque, electroforesis, etc.). Entre los medios de filtración en gel que han producido mejores resultados para la *al.*, 1990; Tom *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993 a y b; Chang *et al.*, 1996; Pateraki y purificación de VTG y la VTL en crustáceos se encuentra la Shepharosa CL (Quinitio *et*

Stratakis, 1997). Sin embargo, el Sephacryl, un medio que presenta características similares a la Shepharosa, presenta una mejor estabilidad química a diferentes amortiguadores en un mayor rango de pH (Farmacia Biotech, 1999) y soporta una presión más elevada, lo cual permite procesar una mayor cantidad de muestras en un menor tiempo. Este medio también ha sido utilizado exitosamente en la purificación de la VTG y VTL de *Penaeus vannamei* (Mendoza, 1992), por lo cual se decidió utilizarlo para la purificación de la VTG y VTL del acocil rojo.

Es pertinente notar que el perfil de elución de las proteínas después de su paso por cromatografía de intercambio de iones muestra que la etapa de la filtración en gel no resultaba suficiente en sí, ya que otras proteínas hemolinfáticas con un peso molecular equivalente eran eluidas al mismo tiempo que la VTG. Sin embargo, la carga de la VTG a pH 8 permitió separarla. Este protocolo de purificación permitió la obtención de una fracción de VTG a partir de la hemolinfa, y de VTL a partir del ovario, cuya pureza y las principales propiedades pudieron ser estudiadas. La pureza de la VTG y VTL aisladas en el transcurso de este trabajo pudo ser demostrada en base a la obtención de un solo pico simétrico obtenido al finalizar el segundo paso a través de la columna de intercambio de iones. Después de estas diferentes etapas, la pureza de la VTG y la VTL resultó satisfactoria sobre todo después de las diferentes pruebas de caracterización a las que fueron sometidas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.5.2.- Caracterización

Una parte esencial del estudio radicó en la caracterización de estas moléculas.

4.5.2.1.- Evaluación del peso molecular

Las proteínas purificadas se caracterizaron primeramente por su peso molecular. Al evaluar los factores de elución (K_{av}) de las fracciones consideradas como VTG y VTL, se encontró que estas presentaban un peso molecular de 594 kDa y 562 kDa respectivamente, los cuales se ajustaron mediante los radios de Stokes de estas moléculas, proporcionando una estimación de la masa molecular real para proteínas no globulares de: 521.8 kDa para la VTG y 512.6 kDa para la VTL. Como se mencionó anteriormente, estos elevados pesos moleculares son consecuencia de la asociación de las proteínas con lípidos, glúcidos y grupo prostéticos carotenoides

originados durante la vitelogénesis (Meusy, 1980). Es interesante notar que estos valores resultan cercanos al de 500 kDa determinados en el caso de la lipovitelina de *Procambarus sp.*, estimados mediante ultracentrifugación en gradiente, reportado por Fyffe y O'Connor (1974). Y además concuerdan con el rango de valores de aquellas moléculas reportadas para otras especies de crustáceos decápodos, los cuales fueron determinadas mediante electroforesis en poliacrilamida y en agarosa. A este respecto, Lee *et al.*, (1997) reportaron valores de 700 kDa para la VTG en *Macrobrachium rosenbergii*; Tsumura y Nakagawa, (1989), reportaron un peso molecular de 800 kDa para la VTL y 860 kDa para la VTG de *Palaemon paucidens*; Chang y Jeng, (1995) reportaron un valor de 276 kDa para la VTG de *Penaeus chinensis*. Mientras que otros autores han reportado pesos moleculares más elevados, Chang *et al.*, (1996) reportaron dos moléculas de VTL para la misma especie con peso molecular de 380 kDa y 500 kDa; Pateraki y Stratakis, (1997) encontraron un valor de 551 kDa y 510 kDa para la VTG y VTL de *Potamon potamon* respectivamente; Quinitio *et al.*, (1990) reportaron 540 kDa para la VTL de *Penaeus monodon* y Chang *et al.*, (1993 a) reportaron para la misma especie un peso molecular de 492 kDa para la VTL; Mendoza, (1992) reporta un peso molecular de 575 kDa y 527 kDa para la VTG y VTL de *Penaeus vannamei* respectivamente; Quinitio *et al.*, (1989) reportaron un peso molecular de 560 kDa para la VTL de *Pandalus kessleri*.

Cabe agregar que la naturaleza estructural de la VTG y la VTL observada en el curso de la purificación y los valores de los pesos moleculares registrados, es común para la mayor parte de los artrópodos. De este modo, ha sido señalado que la VTL y VTG en lepidópteros y ortópteros tienen un peso molecular comprendido entre los 500 y 600 kDa (Wyat y Pan, 1974; Yamashita y Indirasith, 1988). De esta misma manera, los peces la vitelogénina plasmática (VTG) lo cual ha sido químicamente definida como una lipoglicofosfocarotenoproteína (Campbell y Idler, 1990; Ho, 1987; Hori *et al.*, 1979; Nuñez *et al.*, 1996) similar a las de otros vertebrados (Mommensen y Walsh, 1988), presenta un rango de pesos moleculares que van de los 326 kDa a los 550 kDa (Campbell y Idler, 1980; Nath y Sundararaj, 1981; Norberg y Haux, 1988). Esto parece indicar que la naturaleza de la molécula esta altamente conservada, aún en los vertebrados ovíparos.

Cabe señalar que, la técnica de estimación de la masa molecular por cromatografía nos ha parecido más apropiada, aún con las correcciones adaptadas para las proteínas no globulares, que el método alternativo de SDS-PAGE. En efecto, las estimaciones obtenidas por el tratamiento en SDS, conducen a una sobrestimación artificial de peso molecular, dado que el SDS solo se une a la parte proteica de las glicoproteínas por lo que no actúan sobre los eventuales residuos glicosídicos, esto resulta en una disminución de la movilidad de las glicoproteínas por lo cual parecen tener una masa molecular aparentemente más grande (Milleret, 1985). Por otra parte, el gran número de sub-unidades reportado para estas moléculas en diferentes especies bajo condiciones desnaturalizantes es aún objeto de controversia. Así, en el caso particular de la VTG y VTL, difícilmente podíamos establecer un criterio de pureza por SDS-PAGE, pues el número de sub-unidades es con frecuencia elevado -2-11- (Lui y O'Connor, 1977; Meusy y Junera, 1979; Zagalasky, 1985; Eastman-Reks y Fingerman, 1985; Tom *et al.*, 1987 a; Quintio *et al.*, 1989). Adicionalmente, la constatación del grado de pureza por esta técnica no parece satisfactoria puesto que las proteínas son separadas en función de una combinación de su carga y de su peso molecular, sin embargo, la suma de estas propiedades no proporciona una medida absoluta, considerando que una zona electroforética puede cubrir proteínas con la misma movilidad, pero con un peso molecular y cargas diferentes, y por consecuencia pueden presentar propiedades inmunológicas diferentes (Engelman, 1979; Clausen, 1988).

Un aspecto notable observado durante esta investigación es que al igual que los resultados obtenidos en el presente estudio, los resultados de otras investigaciones indican que la VTG, presenta una masa molecular más elevada en comparación con la VTL, (Junera *et al.*, 1977; Picaud, 1978; Tsumura y Nakagawa, 1989; Mendoza *et al.*, 1993). La diferencia encontrada en los pesos moleculares de ambas moléculas no es atribuible a una posible desnaturalización de estas en el transcurso de su purificación, considerando que ambas fueron purificadas por el mismo procedimiento y tomando la precaución de trabajar siempre a bajas temperaturas y en presencia de inhibidores enzimáticos (PMSF) para evitar cualquier tipo de degradación. Esta ligera diferencia de peso molecular indicaría que la VTG es efectivamente el precursor de la VTL, siendo

sintetizada extraovariamente y posteriormente transportada hacia el ovario a través de la hemolinfa (Suzuki, 1987; Tsumura y Nakagawa, 1989). Y una vez en el ovario sería procesada enzimáticamente, como en el caso de otros organismos, lo cual explicaría la menor masa molecular de la VTL después de ser internalizada (Campbell y Idler, 1980; Nath y Sundararaja, 1981; Norbergh y Haux, 1988; Mendoza *et al.*, 1993). En efecto durante mucho tiempo se consideró que la transformación de la VTG a VTL era un fenómeno exclusivo de vertebrados, sin embargo un fenómeno similar a sido señalado en el caso de algunos insectos (Chino *et al.*, 1977; Chinzei *et al.*, 1981), anélidos (Porchet *et al.*, 1989) y varios autores lo han señalado en los crustáceos (Suzuki *et al.*, 1989; Tsumura y Nakagawa, 1989; Meusy y Junera, 1979).

Este aspecto ha sido reportado en otros estudios en los cuales dentro de un sistema competitivo para llevar a cabo el desplazamiento de la vitelogenina, se ha requerido una cantidad mayoritaria de vitelina, lo que deja visualizar la eventualidad de un reconocimiento parcial de esta proteína por el anticuerpo anti-VTG. Las dos moléculas tendrían entonces conformaciones similares pero el anticuerpo estaría más adaptado a la vitelogenina. La energía de enlace implicada en el complejo anticuerpo-VTG sería entonces superior a la del complejo anticuerpo-VTL, de aquí un número mayor de moléculas VTL sería necesario para desplazar el enlace VTG-anticuerpo (Bolton y Hunter, 1986). Otros casos similares han sido registrados en los peces, así por ejemplo Campbell y Idler, (1980) al utilizar un anticuerpo anti-VTL, en un RIA[®] necesitaron emplear una cantidad menos importante de VTG plasmática para desplazar la VTL. En este sentido, también Mendoza *et al.*, (1993) encontraron que se requería una cantidad mayor de VTL, para el desplazamiento de la VTG al utilizar un ELISA competitivo.

En los crustáceos, varios inmunoensayos han sido realizados utilizando estándares preparados a partir de extractos de ovarios, mientras que la molécula que se pretendía cuantificar era de origen hemolinfático. Es evidente la probabilidad de que las constantes de asociación (ó de disociación) de los dos complejos serían diferentes y relativamente elevadas en este caso. Esto viene a confirmar la importancia de trabajar en un sistema homólogo, en el cual, el mismo antígeno sea utilizado para

generar los anticuerpos además de su utilización como estándar y como competidor (Nicoll, 1975; Maitre *et al.*, 1985).

4.5.2.2.- Caracterización de la VTG y la VTL por sus grupos prostéticos

En una segunda etapa las moléculas de la VTG y la VTL se caracterizaron por su naturaleza compleja de glicolipocarotenoproteínas, lo cual nos permitió identificarlas como las proteínas buscadas en el presente estudio. En efecto, los extractos de ovario de crustáceos separados mediante filtración en gel generalmente presentan dos fracciones proteicas mayoritarias (Mendoza, 1992; Chang *et al.*, 1993 a y b; Pateraki y Stratakis, 1997), presentándose en el caso de *P. clarkii* un patrón similar (Figura 4.6). Una característica de la lipovitelina ovárica es la presencia de una fracción de naturaleza carotenica, la cual proporciona una coloración característica para cada especie, siendo en *Homarus sp.* de color verde (ovoverdina), en *Callinectes sapidus* amarilla (crustoquina), en *Pagurus hemhardus* morado (crustaxanina) y en *Penaeus monodon* de color verde oscuro (ovoverdina) (Quinitio *et al.*, 1990; Zagalazky *et al.*, 1990). Esta coloración permite que estas moléculas puedan ser detectadas mediante espectrofotometría, dentro de rangos de longitud de onda cercanos a 470 nm siendo estos los que proporcionan la mayor absorbancia (Fyffe y O'Connor, 1974; Zagalaski *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1993a y b; Chang *et al.*, 1996; Pateraski y Stratakis, 1997). En el caso de los extractos de ovario maduro del acocil rojo, estos presentaban una coloración naranja característica atribuible a la zeaxantina. Esta molécula que se acumula en el transcurso de la maduración gonadal es el producto de la oxidación de la zeaxantina monoéster de origen hepatopancreático que sería vehiculada por las lipoproteínas en la hemolinfa (Vincent *et al.*, 1988). Por medio de un barrido en el espectrofotómetro se logró determinar que la mayor absorbancia se presentaba a una longitud de onda de 466 nm (Figura 4.4). Considerando este valor, fue posible identificar y separar solo aquellas fracciones proteicas (Figura 4.3), obtenidas después de la etapa preliminar de ultracentrifugación. Este mismo criterio fue utilizado para separar una fase que presentaba una coloración anaranjada por medio de filtración en gel correspondiente a una sola fracción proteica con un volumen de elución similar, y con una absorbancia a 466 nm (Figura 4.6).

Por otra parte, el complejo molecular que constituye tanto a la vitelogenina como la lipovitelina implica la presencia de grupos prostéticos lipídicos. Esta es una de las características principales de estas moléculas ya que son las responsables del transporte de diversas clases de lípidos y su translocación al sistema circulatorio en los animales (Hunerland y Bowers, 1989). La fracción lipídica llegan a representar del 9 % en *Pontamon pontamios* hasta un 35 % en *Procambarus sp.* (Fyffe y O'Connor, 1974; Pateraki y Stratakis, 1997). Considerando esta característica y aprovechando la afinidad del Negro Sudan B por los lípidos, esta fracción lipídica pudo ser detectada fácilmente, en la fracción proteica obtenida de la filtración en gel, así como en la fase con coloración anaranjada de la ultracentrifugación (Fig. 15).

De esta forma, al observar que en el cromatograma de la fase anaranjada (EOv5) de ultracentrifugación se presentó un solo pico proteico similar a la fracción del extracto de ovario maduro con características lipídicas y de carotenoide (Figura 4.7), se consideró que estas fracciones correspondían a la molécula de la vitelina ovárica.

Por otra parte, al tomar en cuenta que la VTL y VTG son moléculas no solo muy similares, sino inmunológicamente indistinguibles, se asumió, a raíz de lo anterior, que la presencia de una fracción con características similares a las de la VTL en el cromatograma de hemolinfa de hembras maduras, correspondía a la VTG (Figura 4.7).

4.5.2.3.- Caracterización por el rol fisiológico de las moléculas

Finalmente, en una tercera etapa como una constatación adicional, al analizar de manera comparativa los cromatogramas de hemolinfa de machos y de ovarios de hembras impúberes se observó la ausencia de la fracción lipocarotenoproteica referida anteriormente (Figura 4.8), confirmando de esta forma que esta fracción se presentaba exclusivamente en hembras maduras. Por lo cual, es posible considerar que esta fracción corresponde a la molécula de la vitelogenina plasmática. Ya que tanto la VTG como la VTL, son moléculas características solo de las hembras y únicamente se presentan en el estado reproductivo, marcando así el inicio de la pubertad.

Otro aspecto que viene a aportar cierta validación a la presente investigación es el hecho de que tanto la presencia como la abundancia de las moléculas de vitelina y

vitelogenina estén relacionadas con el ciclo de muda, siendo observadas principalmente en el estado de intermuda, al igual que en *Rynchocinetes typus* (Muñoz *et al.*, 1990), *Paratelphus hydromonous* (Adiyodi, 1985) y en *O. Gammarella* (Meusy, 1980).

La ausencia de estados de maduración avanzados durante la pre-muda y la baja frecuencia observada durante la post-muda nos conducen a considerar la existencia de un posible antagonismo entre estos dos fenómenos. De acuerdo a AQUACOP, (1977) y Adiyodi, (1985) dicho antagonismo estaría causado por la desincronización de las hormonas responsables de la muda y de la maduración; entre las maduraciones que se producirían aleatoriamente, solo aquellas que iniciaran en un estado de muda favorable llegarían a su término, a condición de que las reservas del hepatopáncreas fueran suficientes. Esto viene a explicar los fenómenos de reabsorción del ovario en aquellos ejemplares en estado de post-muda al sucitarse de forma inminente el fenómeno de ecdisis. La racional de este argumento ha sido basada en el desbalance energético producido por dos procesos cuya demanda energética es muy alta: crecimiento somático y reproducción.

La interacción de los procesos de muda y maduración estaría también ilustrada por una duración más extendida del periodo de intermuda en el caso de las hembras como lo señala Bizot-Espiard, (1980).

El protocolo de purificación adaptado y el hecho de disponer la vitelogenina nativa para la producción de anticuerpos, son factores que sin duda alguna contribuirá a su especificidad. Contrariamente a otros estudios en donde los anticuerpos han sido generados a partir de extractos de ovario (Derelle *et al.*, 1986), o bien a partir de subunidades de vitelina (Quackenbush, 1989).

A este respecto, ha sido demostrado, por una parte, que la desnaturalización de los antígenos disminuye la inmunogenicidad con respecto a las formas nativas, como consecuencia de una falta de anticuerpos contra los epitopes conformacionales y de una pérdida posible de determinantes (Tijssen, 1985). De hecho, existe una relación entre la complejidad estructural y la aptitud para inducir una inmunología (Maurer y Callahan, 1980).

Por otra parte, ha sido constatado en el caso de los peces que los inmunoensayos desarrollados para medir fragmentos proteolíticos pueden dar rendimientos sobre-estimados o falsas determinaciones (Copeland y Thomas, 1988). La causa de esta sobre-estimación sería que al ser necesario un solo epítope del antígeno para ser reconocido por el anticuerpo, las fracciones o metabolitos del antígeno portadores del epítope, pudieron ser reconocidas como la molécula entera (Barbier, 1989).

4.5.2.4.- Corolario

La aportación principal de este estudio es la disponibilidad de moléculas puras tanto de origen plasmático como ovárico, que serán utilizadas para generar anticuerpos y establecer su cuantificación, lo cual es de gran importancia ya que la calidad de cualquier inmunoensayo reposa sobre la pureza del antígeno (Oellerich, 1980; Kurstak, 1985), esto es un parámetro capital en las etapas claves de la cuantificación. Primeramente, en el momento de la inmunización, la pureza del antígeno es primordial para evitar los riesgos de una respuesta inmunitaria hacia otras proteínas contaminantes (Tijssen, 1985). En segundo término, en el momento de la calibración los estándares y competidores deben corresponder estrechamente a los antígenos que se pretenden dosificar. Finalmente, en el caso de los inmunoensayos en fase sólida, la fijación de los antígenos a la superficie (e.g. pozos de placas ELISA) puede verse impedida por moléculas contaminantes que entren en competencia con el antígeno por los sitios de fijación disponibles, enmascarando ocasionalmente los determinantes antigénicos (Voller y Bidwell, 1986).

La utilidad práctica del inmunoensayo que se pretende desarrollar con estas moléculas radica en una evaluación precisa y sensible de los estadios de maduración de *Procambarus clarkii* sin llegar a sacrificar el animal y ofrece además la ventaja adicional de ser de gran utilidad durante el sexado precoz de los individuos en los nuevos sistemas de producción de larvas basados en la constitución de un lote de reproductores generados a partir de organismos juveniles.

4.6.- CONCLUSION

El protocolo utilizado para la purificación de la VTL ovárica y la VTG hemolinfática resultó apropiado ya que se logró obtener un solo pico proteico, en ambos casos.

Las proteínas obtenidas presentan características bioquímicas correspondientes a la de otras VTG y VTL reportadas.

Estas proteínas son específicas de hembras en estado reproductivo, con lo que se confirma que se trata de las proteínas que se pretendían aislar y purificar.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE 1

Procedimiento para la técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina:

1. - Xilol I y Xilol II, 5 minutos en cada uno
2. - Alcohol etílico absoluto, 3 minutos
3. - Alcohol etílico al 96 %, 3 minutos
4. - Alcohol etílico 80 %, 3 minutos
5. - Lavado en agua destilada
6. - Tinción en Hematoxilina de Harris durante 1 a 2 minutos
7. - Lavado en agua destilada nuevamente
8. - 10 a 11 inmersiones en agua ácida
9. - Lavado en agua destilada
10. - 10 inmersiones en agua amoniaca
11. - Lavado en agua destilada

12. - Colorear con Eosina de 1 a 2 min.
13. - Alcohol etílico de 80, 96 y absoluto, con 5 inmersiones rápidas en cada uno.
14. - Xilol I y Xilol II, 5 min. en cada uno.
15. -Montaje en resina.

APÉNDICE 2

Procedimiento para la técnica de Acido Periodico-Reacción de Schiff

1. - Desparafinización de los tejidos en Xilol durante 15 minutos. Baños en alcohol etílico de 100 a 70 % por espacio de 4, 3, 2 1/2 y 2 minutos respectivamente.
2. - Acido periódico (fórmula alcohólica) durante 2 1/2 horas.
3. - Lavado con alcohol al 90% durante 5 minutos.
4. - Hidratación en agua rápidamente.
5. - Reactivo de Schiff durante 10 minutos.
6. - Soluciones de sulfito, realizando 3 cambios de 1 ½ a 2 minutos en cada uno.
7. - Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
8. - Deshidratación en alcohol etílico al 95% ½ minuto y 2 cambios en alcohol etílico absoluto de 1 a 2 minutos cada uno.
9. - Aclarar en xileno (2 cambios).
10. - Montaje con Bálsamo de Canadá.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE 3

Procedimiento para la técnica de Black Sudan B

1. - Fijación del tejido en formalina al 10%, realizando 3 cambios cada 24 horas.

Conservación en butanol para incluir posteriormente en parafina.

2. - Obtención de cortes por duplicado, los cuales se hidrataron en alcohol etílico de 96 a 70% y agua durante 20 minutos en cada uno.

3. - Dicromato de potasio de 60 a 90 minutos.

4. - Agua de la llave durante 10 minutos.

5. - Deshidratación en alcoholes de 20, 40, 60 y 70%, 30 minutos en cada uno.

6. - Black Sudan B por un periodo de 16 horas.

7. - Lavado en alcohol etílico al 70% (rápidamente).

8. - Rojo neutro durante un minuto.

9. - a) Lavar una laminilla en agua corriente de 5-10 minutos.

b) Incluir la segunda laminilla en acetona durante 8 horas.

10. - Introducir rápidamente la primera laminilla en agua destilada y montar en gelatina-glicerina.

11. - Retirar la segunda laminilla de la acetona, lavar rápidamente en agua destilada y montar en gelatina-glicerina; comparar con la primera laminilla.

12. - Remover la gelatina-glicerina de la segunda laminilla y repetir los pasos del 5 al 10, omitiendo el paso 8.

5.- LITERATURA CITADA

- Abdo de la Parra, I. 1991. Análisis de la fecundidad y algunos aspectos de crecimiento de *Procambarus clarkii* y *P. simulans* (Decapoda: Cambaridae) del área central del estado de Nuevo León. Tesis inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 109 pags.
- Abrahamsson, S.A.A. 1971. Density, growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. *Oikos*. 22: 373-380.
- 1972. Density growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. *Oikos*. 22: 373-380.
- 1972. Fecundity and Growth of some populations of *Astacus astacus* Linné in Sweden with special regard to introductions in northern Sweden. Institute of freshwater Research. 52: 23-37.
- and G. R. Goldman. 1970. Distribution, density and production of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, in Lake Tahoe, California-Nevada. *Oikos*. 21: 83-91.
- Adiyodi, R. G. 1969. Protein metabolism in relation to reproduction and moulting in the crab, *Paratelphusa hydrodromus*: Part III-RNA Activity and protein-yolk biosynthesis during normal vitellogenesis and under conditions of acute inanition. *Indian Journal Exp. Biol.* Vol. 7. 13-16.
- and R. G. Adiyodi. 1970. Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biol. Rev.*, 45:121.165.
- and T. Subramoniam. 1983. Arthropoda.- Crustacea, pp. 443-496 in: K.G. Adiyodi and R.G. Adiyodi (ed.) *Reproductive biology of Invertebrates*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- 1985. Reproduction and its control, pp.147-215. in: Bliss D. E. and L.H. Mantel (ed.) *The Biology of Crustacea*, 9 Integument, Pigments, and Hormonal Processes, Academic Press, Inc, New York.
- Aguilar, M.B., ,D.T. Hunt, J. Shabanowitz and A. Huberman. 1992. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone

- from the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.*, 102B:491-498.
- Aiken, D.E. 1969. Ovarian maturation and egg laying in the crayfish *Orconectes virilis*: influence of temperature and photoperiod, *Can. J. Zool.*, 47:931-935.
- and S.L. Waddy. 1980. Reproductive Biology, pp. 215-276 in: Stanley Cobb J. and B. F. Phillips (ed.) *The Biology and Management of Lobsters, I Physiology and Behavior*, Academic Press, Inc. New York.
- and ----- . 1982. Cement gland development, ovary maturation and reproductive cycles in the american lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology*. 2: 315-327.
- and ----- . 1992. The growth process in crayfish. *Reviews in Aquatic Sciences*, 6:335-381.
- , S. L. Waddy, K. Moreland and S. M. Polar. 1984. Electrically induced ejaculation and artificial insemination of the american lobster *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology*, 4:519-527.
- , S. L. Waddy and L. S. Uhazy. 1985. Aspects of the biology of *Pseudocarcinonemertes homari* and its association with American lobsters, *Homarus americanus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 351-356.
- Allen, R.C. and Budowle Bruce. 1994. Gel electrophoresis of proteins and nucleic acids; Selected techniques. Walter de Gruyter, Berlin, New York. 210 -211.
- Alunno-Bruscia, M. and B. Sainte-Marie. 1998. Abdomen allometry, ovary development, and growth of female snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae), in the northwestern Gulf of St. Lawrence. *Fish. Aquat. Sci.* 55: 459-477.
- Amaro Pinheiro, M. A. and A. Fransozo. 1998. Sexual maturity of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Decapoda, Brachyura, Portunidae), in the Ubatuba Littoral, Sao Paulo State, Brazil. *Crustaceana*. 71(4): 434-452.
- Andrieux, N. and J. Fresheville. 1992. *Caractérisation de la vitelline secondaire chez le crustacé brachyoure Carcinus maenas*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 314, Serie III,: 227 - 230.

- Anger, K. And G. S. Moreira. 1998. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. *Journal of Crustacean biology*. 18: 823-838.
- Aoto, T, Y. Kamiguchi and S. Hisano. 1974. Histological and ultrastructural studies on the Y organ and mandibular organ of the freshwater prawn, *Palaemon paucidens*, with special reference to their relation with the molting cycle. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Series VI, Zoology* 19:295-308.
- Aquacop. 1977. Observations on the maturation and reproduction of penaeid shrimp in captivity in a tropical medium. 3rd Aquaculture Workshop, ICES, May 10 -13 Brest, France. *Actes de colloques du CNEXO 4*: 157-178
- Armitage, K. B; A. L. Buikema, Jr. and N .J. Willems. 1972. Organic constituents in the annual cycle of the crayfish *Orconectes nais* (Faxon). *Comp. Biochem. Physiol.* 41A : 825-842.
- Arrignon, J. 1979. Cría del Cangrejo de Río. Edit. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 28-29.
- Auvergne, A 1982. El cangrejo de río. Cría y explotación. Primera edición Editorial Mundi-Prensa Madrid, España. 117 p.
- Avault, Jr. J. W. 1972. Crayfish farming in the United States. *First International Symposium on Freshwater Crayfish. Austria* 1:239-250.
- 1976. Crawfish in Europe: Some Facts and Folklore. *Annual Meeting Louisiana Crawfish Farmers Association* 1-9.
- , L.W. de la Bretonne and J. V. Huner. 1974. Two major problems in culturing crayfish in ponds: Oxygen depletion and overcrowding. *Second International Symposium on freshwater crayfish. Louisiana.*
- and J. V. Huner. 1985. *Crayfish Culture in the United States*, chapter 1 In: *Crustacean and Mollusk aquaculture in the United States*, J. V. Huner and E.E. Brown (eds.), *AVI Publishing Company, Inc.* 1-54 pp.
- , R.P. Romaine, and M.R. Miltner. 1983. Red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, 15 years research at Louisiana State University. *Freshwater Crayfish*, 5:362-369.

- Barbier, Y. 1989. Principes généraux des immunodosages. In: Les immunodosages de la théorie à la pratique. Y.Barbier (Ed.), Editions de l'ACOMEN. Ch. 4. pp. 43 - 57.
- Bauer, R. T. 1991. Analysis of embryo production in a caridean shrimp quild from a tropical seagrass meadow. In: Wenner, A. and A. Kuris (eds.) PP. 181-192. CRUSTACEAN 7. Crustacean egg production, A. A. Balkena, Rotterdam.
- , 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimps: A functional and phylogenetic perspective, pp. 183-207 in: R. T. Bauer and J. W. Martin (eds.), Crustacean Sexual Biology, Columbia University Press, New York.
- Beams, H. W. and R. G. Kessel. 1963. Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special references to the origin yolk, J. Cell. Biol., 18:621-649.
- Benfey, T. J., E. M. Donaldson and T. G. Owen. and An Homologous radioimmunoassay for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, with general applicability to other pacific salmonids. General and Comparative Endocrinology, 75:78-82.
- Bittner. G.D. and R. Kopanda. 1973. Factors influencing molting in the crayfish *Procambarus clarkii*. J. Exp. Zool. 186: 7-16.
- Bizot-Espiard, A. 1980. Croissance et reproduction de la crevette *Penaeus japonicus* en élevage: effets de l'épédonculation, histologie de l'appareil génital mâle. Thèse de Doctorat de 3^e cycle Océanographie, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 168 pp.
- Black, J. B. 1966. Cyclic male reproductive activities in the dwarf crawfishes, *Cambarellus shuffeldtii* (Faxon) and *Cambarellus puer* Hobbs. Transactions American Microscopic Society. 85: 214-232.
- and J.V. Huner. 1976. Breeding your own crayfish stock. Carolina tips 42 (4) : 1-3.
- Blanchet-Tournier, M.F. 1982. Quelques aspects des interactions hormonales entre la mue et la vitellogenèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarella* (Pallas) . Reproduction, Nutrition, Développement 22:325-344.

- Bolton, A. and M. Hunter. 1986. Radioimmunoassay and related methods. In: *Handbook of experimental immunology*, vol. 1. *Immunochemistry*. D. Weir (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. Ch. 26. pp. 26.1 - 26.56.
- Bomirski, A. and E. Klek. 1974. Action of eyestalks on the ovary in *Rhithropanopeus harrisi* and *Crangon crangon* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*, 24:329-337.
- , M. Arendarczyk, E. Kawinska and L.H. Kleinholz. 1981. Partial characterization of crustacean gonad-inhibiting hormone. *International Journal of Invertebrate Reproductive*, 3:213-219.
- Borst, D. W., M. Sinkus and H. Laufer. 1985. Methyl farnesoate production by the crustacean mandibular organ. *American Zoologist* 25:103.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Brankston, J. D.; T. B. Lawson and R. P. Romaine. 1988. *Crawfish Procambarus Processing Plant Wastewater Characterization*. American Society of Agricultural Engineers 31(2): 582-584.
- Browdy, C. 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. Wybari, J. (edi). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA.
- , M. Fainzilber, M. Tom, Y. Loya and E. Lubzens. 1990. Vitellin Synthesis in Relation to Oogenesis *In Vitro*-Incubated Ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Journal of Experimental Zoology*. 255: 205-215.
- Byard E. H. and D.E. Aiken. 1984. The relationship between molting, reproduction and a haemolymph female-specific protein in the lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A:749-757.
- Campbell, C. and D. Idler. 1980. Characterization of an estradiol - induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and

- radioimmunological crossreactivity to ovarian yolk fractions. *Biol. Reprod.*, 22 : 605 - 617.
- Campos-González, E. 1982. Distribución geográfica, ciclo de vida y hábitos de *Procambarus simulans regiomontanus* Villalobos, en el estado de Nuevo León, México. Tesis inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 45 pags.
- Campos E. and S. Contreras-Balderas, 1985. First record of *Orconectes virilis* (Hagen) (Decapoda: Cambaridae) from Mexico. *Crustaceana*, 49:218-219.
- and G.A. Rodríguez-Almaraz. 1992. Distribution of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda: Cambaridae) in Mexico: an update. *Journal of Crustacean Biology*, 12:627-630.
- Cariolou M. A. and C. N. Flytzanis. 1993. Biochemical characterization of gonadal development in the shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B:579-584.
- Carsen, A. E., S. Kleinman and M. A. Scelzo. 1996. Fecundity and relative growth of the crab *Platyxanthus patagonicus* (Brachyura: Platyxanthidae) in Patagonia, Argentina. *Journal of Crustacean Biology*. 16: 748-753.
- Castell, J. D. And J. C. Kean. 1986. Evaluation of the role of nutrition in lobster recruitmen. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 43: 2320-2327.
- Cauge, S., M. Miltner and J.W. Avault, Jr. 1982. Range Pellets as Supplemental Crayfish Feed. *Prog. Fish Cult.* 44: 23-24.
- Ceccaldi, H. J. 1998. Asynopsis of the morphology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. *Reviews in Fisheries Science*. 6: 13-39.
- Chamberlain, G. W. and N. F. Gervais. 1984. Comparison of unilateral eyestalk ablation with environmental control for ovarian maturation of *Penaeus stylirostris*. *J. World Maricul. Soc.* 15: 29-30.
- Chang, C. F. and S. R. Jeng. 1995. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn *Penaeus chinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 112B (2): 257-263.
- Chang, E. S. and J. D. O'Connor. 1977. Secretion of β -ecdysone by crab Y-organs in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:615-618.

- , 1985. Hormonal control of molting in decapod crustacea. *American Zoologist* 25:179-185.
- , F. Lee and Y. Huang. 1993. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B:409-414.
- , T. Shih and H. Hong. 1993. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B:609-615.
- , S.R. Jeng, M.N. Lin, and Y.Y. Tin. 1996. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus chinensis*. *Invertebrate Reproduction and Development.*, 29,2: 87-93.
- Charlebois P.M. and G.A. Lamberti. 1996. Invading crayfish in a Michigan stream: direct and indirect effects on periphyton and macroinvertebrates. *Journal North American Benthological Society*, 15:551-563.
- Charniaux-Cotton, H. 1978. L'ovogenèse, la vitellogénine et leur contrôle chez le crustacé Amphipode *Orchestia gammarella* (Pallas). Comparaison avec d'autres Malacostracés. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 119:365-397.
- , 1980. Experimental studies of reproduction in malacostraca crustaceans: Descriptions of vitellogenesis and of its endocrine control. in: W.H. Clark Jr. and T. S. Adams (eds.), *Advances in invertebrate reproduction*, pp. 177-186, Elsevier, North Holland.
- , 1985. Vitellogenesis and its control in Malacostracan Crustacea. *Amer. Zool.*, 25:197-206.
- , and G. Payen. 1988. Crustacean reproduction pp. 279-304 in: H. Laufer and R.G.H. Downer (eds.) *Endocrinology of select invertebrates types*, Alan Liss Publ., New York.
- Chen, C. and S. Chen. 1993. Isolation and partial characterization of vitellin from the egg of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B:141-146.
- and -----, 1994. Vitellogenesis in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius, 1789. *Comp. Bioch. Physiol.*, 107B:453-460.

- Chien, Y.H. and J. W. Avault, Jr. 1980. Production of crayfish in ricefields. *The Progressive Fish Culturist*, 42:67-71.
- , 1983. Effects of flooding dates and disposals of rice straw on crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard) culture in rice fields. *Aquaculture*, 31:339-359.
- Chino, H., Yamagata, M. and S. Sato. 1977. Further characterization of lepidopteran vitellogenin from hemolymph and mature eggs. *Insect Biochem.*, 7 : 125 - 131
- Chinzei, Y., Chino, H. and G. Wyatt 1981. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. *Insect. Biochem.*, 11 : 1 - 7.
- Chu, K. H. 1995. Aspects of reproductive biology of the shrimp *Metapenaeus joyneri* from the Zhujiang estuary, China. *Journal of Crustacean Biology*. 15 (2): 214-219.
- Chu-Woong, O. and R. G. Hartnoll, 1999. Size at sexual maturity, reproductive output, and seasonal reproduction of *Philocheirus trispinosus* (Decapoda) in port Erin bay, Isle of Man. *Journal of Crustacean Biology*, 19 (2): 252-259.
- Clausen, J. 1988. Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. Burdon, R. And P. Van Krippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam. 464 pp.
- Cobb, J. S. and D. Wang. 1985. Fisheries biology of lobsters and crayfishes. *In: A. J. Provenzano* (ed.), *the Biology of Crustacea*. Vol. 10 Economic Aspects: Fisheries and culture: pp. 168-248. New York: Academic Press.
- Contreras-Balderas, S. and M.L. Lozano-Vilano. 1996. Extinction of most Sandia and Potosi valleys (Nuevo León, Mexico) endemic pupfishes, crayfishes and snails. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 7: 33-40.
- Copeland, P.A., J. P. Sumpter, T. K. Walker and M. Croft. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B:487-493.
- and P. Thomas. 1988. The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B:17-23.

- Cordero-Esquivel, B.. 1988. Evaluación de tres dietas artificiales para *Procambarus clarkii* (Girard). Tesis inédita, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), 58 pags.
- Corey, S. 1987. Intraspecific Differences in Reproductive Potential, Realized Reproduction in the Crayfish *Orconectes propinquus* (Girard, 1852) in Ontario. *The American Midland Naturalist* 118(2): 424-431
- 1991. Comparative potential reproduction and actual production in several species of North American crayfish. In: Crustacean production Wenner, A. y A. Kuris (Eds.) Vol. 7 Crustacean issues. A. A. Balkem-Rotterdam-Brookfield, pp. 69-75.
- and D.M. Reid. 1991. Comparative fecundity of decapod crustaceans I. The fecundity of thirty three species of nine families of caridean shrimps. *Crustaceana*, 60:270-294
- Courtney, A.J., S.S. Montgomery, D.J. Die, N.L. Andrew, M.G. Cosgrove and C. Blount. 1995. Maturation in the female eastern king prawn *Penaeus plebejus* from coastal waters of eastern Australia, and considerations for quantifying egg production in penaeid prawns. *Marine Biology*, 122:547-556.
- Crandall, K.A. 1999. North American crayfish species described since Hobb's (1989) checklist. Crayfish Home Page, 3 pp.
- Crocos, P. J. and J. D. Kerr. 1983. Maturation and spawning of the banana prawn *Penaeus merguensis* de Man (CRUSTACEA: PENAEIDAE) in the Gulf of Carpentaria, Australia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 69: 37-59.
- Croisille, Y; H. Junera; J.J. Meusy and H. Charniaux-Cotton. 1974. The female-specific (vitellogenic protein) in crustacea with particular reference to *Orchestia gammarela* (Amphipoda). *Amer. Zool.* 14: 1219-1228.
- Cruz, S.E. y R. Civera. 1982. Bioensayos de incubación artificial del acocil *Cambarellus montezumae* (Decapoda-Astacidae). Tesis de Licenciatura Univ. Aut. Metropolitana, 75 pp.
- Cuisset, B., C. Pelissero, F. Le Menn and J. Nuñez Rodriguez. 1991. ELISA for siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) vitellogenin. . *Acipenser*, 107-111.

- Culley D.D., M.Z. Said and E. Rejmankova. 1985. Producing Soft Crawfish: a status report. Louisiana Sea Grant College Program, Louisiana State University. 16 pp.
- , M. Z. Said and P. T. Culley. 1985. Procedures Affecting the Production and Processing of Soft- Shelled Crawfish. P. 2-20.
- and L. Doubins-Gray. 1987. Update of soft crawfish research. School forestry, wildlife and fisheries. Louisiana State University.
- Cuzin-Roudy, J. and M. O'leary. 1991. Ovarian development and sexual maturity staging in antarctic krill, *Euphausia superba* (Euphausiacea), *Journal of Crustacean Biology*, 11: 236-249.
- Dall, W. and D. J. W. Moriarty. 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. In: *The biology of Crustaceans, Internal Anatomy and Physiological Regulation*, Academic Press, New York. 215-261.
- Damrongphol, P.; N. Eangchuan and B. Poolsanguan. 1991. Spawning cycle and oocyte maturation in laboratory-maintained giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*. Pp. 95: 347-357.
- Daniels, W. H., L. R. D'Abramo and K. F. Graves. 1994. Ovarian development of female red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as influenced by temperature and photoperiod. *Journal of Crustacean Biology*, 14:530-537.
- Davis, J. T. 1983. *Biology and Life History of Crawfish*. Fisheries Specialist, Texas Agricultural Extension Service 1-6.
- Dehn, P., Aiken D., and S. Waddy. 1983. Aspects of vitellogenesis in the lobster *Homarus americanus*. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1161: iv+ 24p.
- De la Brettone, L. Jr. and J. Avault, Jr. 1976. Egg development and management of *Procambarus clarkii* (Girard) in a south Louisiana commercial crawfish pond. Third International crayfish symposium, Kuopio, Finland, 3:133-140.
- and J.W. Avault, Jr. 1971. Liming increases crayfish production. *Louisiana Agriculture*, 15(1):10.
- , J. W. Avault Jr. and R. O. Smitherman. 1969. Effects of soil and water hardness on survival and growth of the red swamp crawfish, *Procambarus*

- clarkii* in plastic pool. Proceedings of 23rd. Annual conference of the southeastern associations of game and fish commissioners, 626-633.
- Dendy, J.S. 1978. Preliminary experiment with photoperiod to influence crawfish spawning. *Aquaculture* (15): 379-382.
- Denise Re Araujo A. 1985. Crecimiento y sobrevivencia de *Procambarus clarkii* (Girard) (Crustacea:Decapoda) con diferentes temperaturas y dietas isocalóricas. *Ciencias Marinas, México*. 11(2):39-68.
- Derelle, E. 1989. Etude des protéines spécifiques de la reproduction chez le crustacé décapode *Macrobrachium rosenbergii*, à l'aide des anticorps monoclonaux. Thèse de Doctorat, Université de Paris VI.
- , J. Grosclaude, J.-J. Meusy, H. Junera, M. Martin. 1986. ELISA titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal antibody, *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B:1-4.
- De Vlaming, V. L.; H. S. Wiley; G. Delahunty and R. A. Wallace. 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 67 B: 613-623.
- De Vlaming, V. G.; Grossman and F. Chapman. 1982. On the Use of the Gonadosomatic Index. *Com. Biochem. Physiol.* 73(1): 31-39.
- Drach, P. 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. océanog.*, 19:103-391.
- Dubé, P. and B. Portelance. 1992. Temperature and photoperiod effects on ovarian maturation and egg laying of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Aquaculture*: 102:161-168.
- Durliat, M. and R. Vranckx. 1982. Proteins of aqueous extracts from the hepatopancreas of *Astacus leptodactylus*. 1.- Changes in proteins during the molt cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B: 155-163.
- Duronslet, M. J.; A. I. Yudin; R. S. Wheeler and W. H. Clark Jr. 1975. Light and fine structural studies of natural and artificially induced egg growth of Penaeid shrimp. *Proc. World Mariculture Society*, 6: 105-122.
- Eastman-Reks, S., and M. Fingerman. 1985. In vitro synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *J. Exp. Zool.*, 233: 111 - 116.

- Engelmann, F. 1979. Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. In: *Advances in Insect Physiology*, D. Treherne, M. Berridge and V. Wigglesworth eds, Academic Press, London. 14: 49: 107
- Erickson, D. L. , J.E. Hightower and G. D. Grossman. 1985. The relative gonadal index: An alternative index for quantification of reproductive condition. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81A:117-120.
- Fainzilber, M., Browdy C., Tom M., Lubzens E. and Applebaum. 1989. Protein synthesis in vitro in cultures of the subepidermal adipose tissue and the ovary of the shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Tissue and Cell*. 21(6): 911-916.
- , M. Tom, S. Shafir, S.W. Applebaum and E. Lubzens. 1992. Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in Penaeid shrimp?. *Biol. Bull.*, 183:233-241.
- Fauvel, C. 1981. Étude de l'ovaire de la Crevette d'eau douce *Machrobrachium rosenbergii* (de Man) au cours du cycle de reproduction. Première description de la folliculogenèse secondaire chez un Crustacé Décapode. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 292. Ser. III pp. 547-552.
- 1986. *Hatcheries techniques: Control of maturation and reproduction*. International workshop on marine crustacean culture development and management, Venecia, 12 pp.
- Felgenhauer and L. G. Abele. 1991. Morphological diversity of decapod spermatozoa pp. 32-341 in: R. T. Bauer and J. W. Martin (eds.), *Crustacean Sexual Biology*, Columbia University Press, New York.
- Ferrero, E. A., R. Marzari, A. Mosco and D. Riggio. 1989. Effects of eyestalk ablation on vitellogenesis and molting in *Squilla mantis*. *Aquaculture.- A Biotechnonology in Progress*, 517-523.
- Fielder, D. R.; K. R. Rao and M. Fingerman. 1971. A female-limited lipoprotein and the diversity of hemocyanin components in the dimorphic variants of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as revealed by disc electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 291-297.
- Fingerman, M. 1987. The endocrine mechanism of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 7:1-24.

- France, R. L. 1983. Relationship of crayfish (*Orconectes virilis*) growth to population abundance and system productivity in small alogotrophic lakes in the experimental lakesarea, northwestern Ontario, Can. J. Fish. Aquatic. Sci. 42: 1096-1102.
- , 1987. Reproductive impairment of the crayfish *Orconectes virilis* in response to acidification of lake 223. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44: 97-106.
- Freeman, J. A. and C. K. Bartell. 1976. Some effects of the molting-inhibiting hormone and 20-hydroxiecodysonone upon molting in grass shrimp *Palaemonetes pugio*. General and Comparative Endocrinology 28:131-142
- Fyffe, W. E. and J.D. O'Connor. 1974. Characterization and quantific of a crustacean lipovitellin. Comp. Biochem. Physiol., 47B:851-867.
- Gibson R. and P. L. Barker. 1979. The decapod hepatopancreas. Ocenogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 17: 285-346.
- Gonor, J.J. 1972. Gonad Growth in the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson) (Echinodermata: Echinoidea) and the Assumptions of Gonad Index Methods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 10:89-103.
- González-Aguilar, J.A. 1995. Indices Gonadosomáticos y análisis trófico de una población de *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda: Cambaridae) de Nuevo León, México. Tesis Inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 53 pags.
- Goyert, J.C. and J.W. Avault, Jr. 1978. Effects of stocking, density and subnature on growth and survival of crawfish (*Procambarus clarkii*) grown in a recirculating cultures system. Proceedings of the ninth annual meeting world mariculture society. 9:731-735.
- Grant, A. and P. A. Tyler. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction: I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. International of Invertebrate Reproduction, 6:259-269.
- Guerao, G., J. Pérez-Baquera and C. Ribera. 1994. Growth and reproductive biology of *Palaemon xiphias* Risso, 1816 (Decapoda: Caridea: Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology. 14: 280-288.

- Haefner, P. A. Jr. and D.H. Spaargaren, 1993. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.): I. weight and volume relationships.- *Journal of Crustacean Biology* 13: 523-531.
- Hanstrom, B. 1933. Neue Untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem des crustaceen II. *Zoologische Jahrbucher Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere* 56:387-520.
- Harioğlu, M. M. and I. Türkgülü. 2000. The relationship between egg size and female size in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Aquaculture International*. 8: 95-98.
- Hartnoll, R. G. 1982. Growth. In: Abele, L. G. Editor. *The Biology of Crustacea*, Vol. 2: Embriology, morphology and genetics. Academic Press, New York. Pp. 110-196.
- Hazlett, B. A. and D. Rittschof. 1985. Variation in rate of growth in the Crayfish *Orconectes virilis*. *Journal of Crustacean Biology*. 53:341-346.
- Hill, A.M. and D.M. Lodge. 1995. Multi-trophic level impact of sublethal interactions between bass and omnivorous crayfish. *Journal North American Benthological Society*, 14:306-314.
- Hirsch, G. W. 1991. Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluids of reptantian decapods, pp. 290-307 in: R. T. Bauer and J. W. Martin (eds.), *Crustacean Sexual Biology*, Columbia University Press, New York.
- Hirsch, G. C. and W. Jacobs. 1930. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. II.- Wachstum als primärer factor des Rhythmus eines polyphasischen, organischen sekretions systems. *Z. Vergl. Physiol.* 12: 524-558.
- Ho, S. 1987. Endocrinology of vitellogenesis. *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. Norris D. O. and Jones R. E. (eds). Plenum Press, N. Y.; 145-169 pp.
- Hobbs, H.H. Jr. 1942. *The crayfishes of Florida*. University of Florida Publications, Biological Science Series, 3(2), 179 pp.

- , 1962. La presencia de *Procambarus clarkii* (Girard) en los estados de Chihuahua y Sonora, México. (Decapoda, Astacidae). Anales del Instituto de Biología. (Universidad Nacional Autónoma de México) 23(1 y 2): 273-276.
- , 1972. Biota of freshwater ecosystems. Identification manual 9: Crayfishes (Astacidae) of North and Middle America. Water Pollution Control Series. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C., USA.
- , 1984. On the distribution of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Cambaridae). Journal of Crustacean Biology, 4:12-24.
- , 1976. Crawfishes (Astacidae) of North and Middle America. Water Pollution Control Research Series. U. S. Environmental Protection Agency. Pp. 1-73.
- , 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae and Parastacidae). Smithsonian Contributions to Zoology, 180:391-413.
- and L. J. Marchand. 1943. A Contribution toward a knowledge of the crawfishes of the Reelfoot Lake area. Journal of the Tennessee Academy of Sciences 18(1): 6-35.
- Hobbs, H.H.III. 1993. Trophic relationships of North American freshwater crayfishes and shrimps. Milwaukee Public Museum, Contributions in Biology and Geology, 85: 110 pp.
- , J.O. Jass and J.V. Huner. 1989. A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda: Cambaridae). Crustaceana, 56:299-316.
- Hopkins, P. M. 1983. Patterns of serum ecdysteroids during induced and uninduced proecdysis in the fiddler crab *Uca pugilator*, General and Comparative Endocrinology, 52:350-356.
- Hoque, M., A. Takemura and K. Takano. 1998. Annual changes development and serum vitellogenin level in the rabbitfish *Siganus canaliculatus* (Park) in Okinawa, Southern Japan., Fisheries Science., 64: 44-51.

- Hori, S., T. Kodama and K. Tanahashi. 1979. Induction of vitellogenine synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocr.*, 37 : 306-320.
- Humason, G. L. 1972. *Animal Tissue Techniques*. Third edition. Edit. W. H. Freeman and Company. U.S.A. 641 pages.
- Huner, J. V. 1975. *Observations on the life histories of recreationally important crawfishes in temporal habitats*. *Proceedings of the Louisiana Academy of Sciences*. 38: 20-24.
- , 1976. The Biological feasibility of raising baitsized. Red Swamp Crawfish *Procambarus clarkii* (Girard) in Louisiana. *Dissertation Abstracts International*. 36 (7).
- , 1978a. Information about population biology for crawfish pond managers in: Annual Meeting of the Louisiana Crawfish Farmer's Association, 12 pp.
- , 1978b. Crawfish population dynamics as they affect production in several small, open commercial crawfish ponds in Louisiana. *Proc. of World Mariculture Society, Atlanta*, 619-640 pp.
- , 1986. *Australian Crawfish*. *Farm pond Harvest* Vol. 20(3)13-14.
- , 1988. *Procambarus* in North America and elsewhere, *Freshwater Crayfish Biology, Management and Exploitation*, Holdich, D. M. and Lowery, R. S. Eds., Croom Helm, London. Pp.239.
- , 1990. Biology, fisheries, and cultivation of freshwater crawfishes in the U.S. *Aquatic Sciences*. Vol. 2 (2): 229-254
- , 1997. The Crayfish Industry in North America. *Fisheries- American Fisheries Society*. 22: 28-31.
- and J. W. Avault, Jr. 1976a. Sequential pond flooding: A prospective management technique for extended production of bait size crawfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 105:637-642.
- and -----, 1976b. The Molt Cycle of Subadult Red Swamp Crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Proceedings of the World Mariculture Society*, 7: 267- 273.
- and J.E. Barr. 1984. *Red Swamp Crawfish. Biology and Exploitation*. The

- Louisiana Sea Grant College Program, Louisiana State University, 135 pp.
- and -----, 1991. Red Swamp Crawfish: Biology and Exploitation. Third Edition. Sea Grant No. LSU-11-80-001, LSU Center for Wetland Resources, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- and O. V. Lindqvist. 1991. Special problems in freshwater crayfish egg production 235-246. In: Crustacean production Werner, A. y A. Kuris (Eds.) Vol. 7 Crustacean Issues. A. A. Balkem-Rotterdam-Brookfield.
- , M. Moody and R. Thune. 1994. Cultivation of freshwater crayfishes in North America 5-115. In: Freshwater crayfish aquaculture in North America, Europe and Australia, families Astacidae, Cambaridae and Parastacidae. J. V. Huner (Eds.). Hawort Press. 312 pp.
- , and R. P. Romaine, 1978. Size at maturity as a means of comparing populations of *Procambarus clarkii* (Girard) (Crustacea: Decapoda) from different habitats. In: Fourth int. Symp. On freshwater crayfish, Thononles-Bains, France.
- Hunerland, N. and W. Bowers. 1989. Comparative studies on arthropod lipoproteins. Comp. Bioch. Physiol. 92B (1): 137 - 141.
- Janson, J.C. and Rydén L., 1989. Protein purification; principles high resolution methods, and applications. VCH Publishers, Inc. 502 pp.
- Jewett, S. C., N. A. Sloan and D. A. Somerton. 1985. Size at sexual maturity and fecundity of the fjord-dwelling golden king crab *Lithodes aequispina* Benedict from Northern British Columbia. Journal of Crustacean Biology. 5: 377-385.
- Johnson, P. T. 1980. Histology of the blue crab *Callinectes sapidus* -A model for Decapoda. Publishers, New York.
- Jugan, P. and C. Zerbib. 1984. Follicle cell tubular system in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. A route for exchanges between haemolymph and vitellogenic oocytes? Biol. Cell. 51:395-398.
- and D. Soyeux. 1985. Démonstration in vitro de l' inhibition de l' endocytose ovocytaire par un extrait de glande de sinus chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii*. C. R. Acad. Sc. Paris, 300 (III):705-709.

- Junera, H., C. Zerbib, M. Martin and J.-J. Meusy. 1977. Evidence for control of vitellogenin synthesis by an ovarian hormone in *Orchestia gammarella* (Pallas), Crustacea, Amphipoda. *Gen. Comp. Endocr.* 31:457-462.
- Kennelly, S. J. and D. Watkins. 1994. Fecundity and reproductive period, and their relationship to catch rates of spanner crabs, *Ranina ranina*, off the East Coast of Australia. *Journal of Crustacean Biology*, 14: 146-150.
- Kerr, M.S. 1968. Protein synthesis by hemocytes of *Callinectes sapidus*: A study of in vitro incorporation of ¹⁴C-leucine, *J. Cell. Biol.* 39:72-73.
- , 1969. The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes salpidus*. *Dev. Biol.*, 20:1-17.
- Kessel, R.G. 1968. Mechanisms of protein yolk synthesis and position in crustacean oocytes, *Z. Zellforsch* 89:17-38.
- Kim, H. R. And S. D. Lee. 1994. Purification and characterization of vitellin-2 from the ovary of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp. Biochem. Physiol.* 108 B: 135-145.
- King, J. E. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol. Bull. (Woods Hole)*. 94(3): 244-262.
- Kulkarni, G. K. and R. Nagabhushanam. 1979. Mobilization of organic reserves during ovarian development in a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture.*, 18: 373-377.
- , L. Glade and M. Fingerman. 1991. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Crustacean Biology*, 11:513-522.
- , R. Nagabhushanam, G. Amaldoss, R.G. Jaiswal and M. Fingerman. 1992. In vivo stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard), by 5-hydroxytryptamine. *Invertebrate reproduction and development*. 21 (3): 231-240.
- Kuris, A. M. 1991. A review of patterns and causes of crustacean brood mortality. *In: Wenner A. and A. Kuris (eds.) pp. 117-141. CRUSTACEAN ISSUES 7. Crustacean egg production, A. A. Balkena, Rotterdam.*

- Kurstak, E. 1985. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bull. W.H.O.* 63 (4): 793 - 811.
- La Caze, C. 1976. Crawfish farming. Louisiana Wildlife and Fisheries Commission Bull 7: 1-26.
- Laufer, H., D. Borst, F.C. Baker, C. Carrasco, M. Sirkus, C.C. Reuter, L. W. Tsai and D. A. Schooley. 1987. The identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science* 235:202-205.
- Lee, C.Y. and R. D. Watson. 1994. Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin and vitellogenin of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Crustacean Biology*, 14:617-626.
- and ----- . 1995. In vitro study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): Site and control of vitellin synthesis. *The Journal of Experimental Zoology*, 271:364-372.
- , H. R. Umphrey and R. D. Watson. 1996. Developmental changes in the level of vitellin-immunoreactive proteins in hemolymph and tissues of the blue crab *Callinectes sapidus*: Relation to vitellogenesis. *Journal of Crustacean Biology*, 16:1-9.
- Lee, F. Y. and C. F. Chang. 1997. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and ----- protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117 A (4): 433-439.
- , T. W. Shih and C. F. Chang. 1997. Isolation and characterization of the female-specific protein (Vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: comparison with ovarian vitellin. *General and Comparative Endocrinology*. 108: 406-415.
- Lee, R.F. and D.L. Puppione. 1988. Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. *The Journal of Experimental Zoology*, 248:278-289.
- and A. Walker. 1995. Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Zoology*, 271:401-412.

- Lehninger, A. L. 1979. Bioquímica: bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. Editorial OMEGA, S. A. Pp. 166 - 167.
- Lodge, D.M., M.W. Kershner and J.E. Aloï. 1994. Effects of an omnivorous crayfish (*Orconectes rusticus*) on a freshwater littoral food web. *Ecology*, 75:1265-1281.
- and J. G. Lorman. 1987. Reductions in submersed macrophyte biomass and species richness by the crayfish *Orconectes rusticus*. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 44:591-597.
- Lowe, M. E. 1960. The female reproductive cycle of the crayfish *Cambarellus shufeldti*: the influence of the environmental factors. *Institute of Biological Sciences*, 8 (6): 157-169.
- Lowery, R. S. and A. J. Mendes. 1977. *Procambarus clarkii* in Lake Naivasha, Kenya, and its Effects on Established and Potential Fisheries. *Aquaculture* 11: 111-121.
- Lui, C. W., B. A. Sage and J. D. O'Connor. 1974. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. *J. Exp. Zool.*, 188:289-296.
- and J. D. O'Connor. 1976. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary II. Characterization of an in vitro incorporation of amino acids into purified subunits. *J. Exp. Zool.*, 195: 41-52.
- and -----, 1977. Biosynthesis of Crustacean Lipovitellin. III. The incorporation of labeled amino acids into the purified lipovitellin of the crab *Pachygrapsus crassipes*. *J. Exp. Zool.* 199: 105-108.
- Lipcius R. N. and W.F. Herrnkind. 1987. Control and coordination of reproduction and molting in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Marine Biology*, 96:207-214.
- Lutz, C.G. and W. R. Wolters. 1986. The effect of five stocking densities on growth and yield of the red swamp crawfish *Procambarus clarkii*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 17: 33-36.
- and W.R. Wolters. 1999. Growth and yield of red swamp crawfish *Procambarus clarkii* stocked separately and in combination with white river crawfish *Procambarus zonangulus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 3:394-397.

- Mañanos, E., J. Nuñez, S. Zanuy, M. Carrillo and F. Le Menn. 1994a. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B:217-223.
- ,-----,-----,-----and-----,1994b. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I. Induction, purification and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B:205-216.
- Maitre, J. L., Le Quellec, C., Derrien, S., Tenniswood, M. and Y. Valotaire. 1985. Measurement of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis: application to the kinetic analysis of estrogen stimulation in the male. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63 : 982 - 987.
- Mason, J. C. 1970. Eggs laying in the western North American Crayfish, *Pacifastacus trowbridgii* (Stimpson) (Decapoda, Astacidae). *Crustaceana*. 19: 37-44.
- . 1977. Reproductive efficiency of *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in culture. *Freshwater crayfish*. 3: 101-107.
- Maurer, P. and H. Callahan 1980. Proteins and polypeptides as antigens. *Methods in Enzymology*, 70 (2): 49 - 69.
- Medina, A.; Y. Vila; G. Mourente and A. Rodríguez. 1996. A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture* 148. Pp. 63-75.
- Medina-Mantelatto, F. L. and R. Biagi-García. 1999. Reproductive potential of the hermit crab *Calcinus tibicen* (Anomura) from Ubatuba, Sao paulo, brazil. *Journal of Crustacean Biology*. 19: 268-275.
- Mendoza, R. 1987. Caractérisation des stades de maturation d'une crevette péneide (*Penaeus vannamei*): évolution biochimique de l'hémolymphe. D.E.A. d'Océanologie Biologique, Université de Bretagne Occidentale. 29 pp.
- . 1992. Etude de la vitellogenèse et de sa stimulation chez des crevettes Pénéides par des facterus hétérologues et homologues. These de doctorat de L'Université de Bretagne Occidentale. pp. 68-71.

- , 1997. Blue shrimp, *Penaeus stylirostris* nauplii production from wild, cultivated and mixed populations. *Journal of Applied Aquaculture* 7(2):41-50
- , and C. Fauvel. 1989. Study of crustacean vitellogenesis by vitellogenin assay: the particular case of a penaeid shrimp, *Europ. Aquac. Soc. spec. publ.*, 10:169-170.
- , J. Guillaume and C. Fauvel. 1993. Homologous ELISA procedure for the determination of penaeid shrimp vitellogenin. *Aquat. living Resour.*, 6:39-48.
- Meredith, S. S. 1952. A study of *Crangon vulgaris* in the Liverpool Bay area. *Proc. Trans. Liverpool Biological Soc.*, 58: 75-109.
- Meusy, J.J. 1963. La gamétogénese d' *Orchestia gammarella*, Crustacé Amphipode. *Bull. Soc. Zool.*, 88: 197-220.
- , 1980. Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in crustacea: A review. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20:1-21.
- , M.F. Blanchet and H. Junéra. 1977. Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarella* Pallas. II. Étude de la synthèse de la vitellogénine ("fraction protéique femelle" de l'hémolymphe) après destruction des organes Y. *General Comparative Endocrinology* 33:35-40.
- and H. Junera. 1979. Analyse préliminaire de la composition en sous-unités polypeptidiques de la vitellogénine et des lipovitellines du crustacé amphipode *Orchestia gammarella*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 288: 1415 - 1418.
- , C. Zerbib, F. Dacheux, M. P. Dubois, M. Martin and R. Pouhle. 1983. Subcellular localization of vitellogenin in crustaceans adipocytes by the unlabelled antibody enzyme method. *Tiss. Cell.* 15:301-310.
- , Junera, H., Cledon, P. and M. Martin. 1983. La vitellogénine chez un Crustacé Décapode Natantia, *Palaemon sarrafus* Pennat. Mise en évidence, comparaison immunologique avec les vitellines, site de synthèse et rôle des pédoncules oculaires. *Reprod. Nutr. Develop.*, 23: 625-640.
- and H. Charniaux-Cotton. 1984. Endocrine control of vitellogenesis in malacostraca crustacea pp. 231-241 in: Engels, W., W. H. Clark, A. Fischer,

- P. J. Olive and D.F. Went (eds.) *Advances in invertebrate reproduction* 3. Elsevier Science Publishers, New York
- and G. Payen. 1988. Female reproduction in malacostracan crustacea, *Zoological Sciences* 5:217-266.
- Miltner, M and J. W. Avault, Jr. 1981. Rice and millet as forages for crawfish. *Louisiana agriculture*. 24(3)8-10.
- Milleret, V. 1985. Contribution à l'étude expérimentale de la physiologie femelle de *Palaemonetes varians*. Rapport de D.E.A., Université de Poitiers. 45 pp.
- Mills, B. J., N. M. Morrissy and J.V. Huner. 1994. 217-312 pp. Cultivation of freshwater crayfishes in Australia. *In: J. V. Huner (ed.). Freshwater crayfish aquaculture in North America, Europe and Australia: Families Astacidae, Cambaridae and Parastacidae*. Food Products Press, New York, 312 pp.
- Minagawa, M. and S. Higuchi. 1997. Analysis of size, gonadal maturation, and functional maturity in the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae) *Journal of Crustacean Biology*. 17 (1): 70-80.
- Mommsen, T.P. and P.J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. *in: Fish Physiology*. Hoar, W.S. and D.J. Randall (eds.). Academic Press, London. 347-406 pp.
- Momot, W. T. 1978. Annual production and production/biomass of the crayfish, *Orconectes virilis* in two Northern Ontario lakes. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 96: 202-209.
- , 1984. Crawfish Production. A Reflection of Community Energetics *Journal of Crustacean Biology* 4(1): 35-53.
- 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* 3 (1): 33-63.
- and P.D. Jones. 1977. The Relationship between biomass, growth rate and annual production in the Crayfish *Orconectes virilis*. *Freshwater Crayfish*, 3:3-31.
- and H. Gowing. 1977. Production and population dynamics of the crayfish *Orconectes virilis* in three Michigan lakes. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34: 2041-2055.

- , ----- and P. D. Jones. 1978. The Dynamics of Crayfish and their role in ecosystems. *The American Midland Naturalist*, 99:10-35.
- and R. P. Romaine. 1981. Use of a Seine to Detect Stunted Crawfish Populations in Ponds, a Preliminary Report. *J. World Mariculture Soc.* 12(2): 384-390.
- Morrissy, N. M. 1974. The ecology of marron *Cherax tenuimanus* (Smith) introduced into some farm dams near Boscabel in the Great Southern area of the Wheatbelt Regions of western Australia. *Fisheries Research Bulletin Western Australia*, 12:1-55.
- , N. M. 1975. Spawning variations and its relationship to growth rate and density in marron, *Cherax tenuimanus* (Smith). *Fish. Bull. West. Aust.* 16: 1-32.
- Muñoz, G., S. Donghi and H. Cerisola. 1990. Vitellogenesis in the crayfish *Rhynchocinetes typus*: role of hepatopancreas in lipid yolk biosynthesis, *Cellular and Molecular Biology.*, 36: 531-536.
- Muñoz-Ortiz, R.. 1993. Eficiencia de asimilación del acocil *Procambarus clarkii* (Girard) (Crustacea: Cambaridae) a tres alimentos naturales. Tesis inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, UANL, 34 pags.
- Nagamine, C. and A. W. Knigh, 1987. Masculinization of female crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *International Journal of reproduction and development* 11: 77-87.
- Nakagawa, H., A. Salam and S. Kasahara. 1982. Female-specific lipoprotein level in hemolymph during egg formation in freshwater shrimp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48:1073-1080.
- Nakamura, K. 1994. Maturation. In: B. F. Phillips, J. S. Cobb y J. Kittaka (Eds.). *Spiny Lobster Management*. Pp. 374-383.
- Nath, P. and B. Sundararaj. 1981. Induction of vitellogenesis in the hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis*: effects of piscine and mammalian hormones. *Gen. Comp. Endocrin.*, 43: 191-200.
- Nelson, K. (unpublished). Scheduling of molting, growth and reproduction in malacostracans crustaceans.

- Nelson R.G. and J. S. Dendy. 1979. Conditions for holding and propagating crawfish brood stock (*Procambarus clarkii*). Proc. World Maricul. Soc. 10:503-509.
- Nicoll, C. 1975. Radioimmunoassay and radioreceptor assays for Prolactin and Growth Hormone: a critical appraisal. Amer. Zool. 15: 881 - 903.
- Norberg, B. and C. Haux. 1988. An homologous radioimmunoassay for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin. Fish Physiology and Biochemistry, 5:59-68.
- Nuñez-Rodríguez, J., O. Kah, M. Geffard and F. Le Menn. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (*Solea vulgaris*) vitellogenin. Comp. Biochem. Physiol., 92B:741-746.
- Nuñez, J., E. Bon and F. Le Menn. 1996. Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. The Journal of Experimental Zoology; 274
- O'Donovan, P; M. Abraham and D. Cohen. 1984. The ovarian cycle during the intermolt in ovigerous *Machrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. Pp. 347-358.
- Oellerich, M. 1980. Enzyme immunoassays in clinical chemistry: present status and trends. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 18: 197-208.
- Oh, Ch.-W. and R. G. Hartnoll. 1999. Size at sexual maturity reproductive output seasonal reproduction of *Philocheras trispinosus* (Decapoda) in Port Erin Bay, Isle of Man. Journal Crustacean of Biology. 19: 252-259.
- Pacoli, C. Q., J. M. Grizzle and J. T. Bradley. 1990. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 90:353-367.
- Pateraki, L. and E. Stratakis. 1997. Characterization of vitellogenin and vitellin from Land Crab *Potamon potamios*: Identification of a precursor polypeptide in the molecule. The Journal of Experimental Zoology. 279: 597 - 608.
- Paulus, J. E. and H. Laufer. 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda: Brachyura). International Journal of Invertebrate Reproduction and Development, 11:29-44.

- Payen, G.G., 1974. Morphogèneses sexuelle de quelques Brachyours (cyclométopes) au cours du développement embryonnaire, larvaire et postlarvaire, *Bull. Mus. Hist. Nat.*, 209, Zool., 139:201-262.
- , 1980. Aspects fondamentaux de l'endocrinologie de la reproduction chez les crustacés marins. *Oceanis*, 6:309-339.
- Payne, J. F. 1978. Aspects of the life histories of selected species of North American Crayfishes. *The Fisheries Bulletin*. 3: 5-8.
- Pelcastre, V. M. 1996. Desarrollo de Co-extraídos de Pasta de Soya (*Glycine max*) y Subproductos de Carpa Herbívora (*Ctenopharindon idella*) para Nutrición de Bagre (*Ictalurus punctatus*). Tesis de Maestría en Ciencias. F.C.B., U.A.N.L. 76 pp.
- Penn, G.H., 1943. A study of the life history of the Louisiana red crawfish, *Cambarus clarkii* Girard. *Ecology*, 24:1-18.
- Pennak, R. W. 1953. Freshwater invertebrates of the United States. The Roland Press Company, Nueva York. 447-461.
- Perez, L. E. and I. P. Callard. 1993. Regulation of hepatic vitellogenin synthesis in the little skate (*Raja erinacea*): Use of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Experimental Zoology*, 266:31-39.
- Perryman, E. K. 1969. *Procambarus simulans*: Light-induced changes in Neurosecretory cells and in ovarian cycle. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 88:514-524.
- Pharmacia Biotech. 1999. Gel filtration; theory and practice. Sixth edition. Pp.103.
- Picaud, J. L. 1978. Contribution à l'étude des propriétés physico-chimiques des protéines spécifiques femelles de *Porcellio dilatatus*. *C.R. Soc. Biol.* 172: 299 - 303.
- , 1980. Vitellogenin synthesis by the fat body of *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacea, Isopoda), *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 2:341-349.
- and C. Souty. 1980. Démonstration immunohistochimique de la présence de vitellogénine dans le tissu adipeux et l'hépatopancreas du Crustacé Isopode Oniscoïde *Porcellio dilatatus* (Brandt). *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D* 290:123-125.

- Pochon-Mason, J.; G. G. Payen; C. Portemer and F. Chatagner. 1984. Variations of Taurine concentration in the ovaries and hepatopancreas of the females crab *Carcinus maenas* L. (Decapoda: Brachyura) during the different phases of its genital activity. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 7: 127-133.
- Pollock, D. E. 1991. Population regulation and stock-recruitment relationships in some crayfish and lobster populations. *In: Crustacean egg production*. Werner, A and A. Kuris (eds.) Vol. 7 *Crustacean Issues*. A.A. Balken-Rotterdam-Brookfield.
- Putt, F. A. 1972. *Manual of Histopathological Staining Methods*. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 335 pp.
- Quackenbush, L.S. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay of black pigment dispersing hormone from the fiddler crab *Uca pugilator*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57:438-444.
- , 1986. Crustacean endocrinology, A review. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 43:2271-2282.
- , 1989a. Vitellogenesis in the shrimp *Penaeus vannamei*: in vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B:253-261.
- , 1989b. Yolk protein production in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 9 (4): 509-516.
- , 1991. Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp pp. 125-140 in: P. DeLoach, W. J. Dougherty and M.A. Davidson (eds.), *Frontiers in Shrimp Research*, Elsevier, Amsterdam.
- and W.F. Herrnkind. 1981. Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus* (Crustacea: Palinuridae): Effect of eyestalk ablation. *Comp. Biochem. Physiol.* 69A:523-527.
- and -----, 1983. Partial characterization of eyestalk hormones controlling molt and gonadal development in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Journal of Crustacean Biology*, 3:34-44.
- , 1994. Lobster Reproduction: A review. *Crustaceana*, 67:82-94.
- and L.L. Keeley. 1988. Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Biol. Bull.*, 175:321-331.

- Quinitio, E. T., A. Hara., K. Yamauchi., T. Mizushima and A. Fuji. 1989. Identification and characterization of vitellin in a hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*, Comp. Biochem. Physiol., 94B (3): 445-451.
- , A. Hara, K. Yamauchi and A. Fuji. 1990. Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*. Invertebrate Reproduction and Development, 17:221-227.
- Rankin, S.M., J. Y. Bradfield and L.L. Keeley. 1989. Ovarian protein synthesis in the south American white shrimp *Penaeus vannamei*, during the reproductive cycle. Invertebrate Reproduction and Development, 15:27-33.
- Reid, D. M. And S. Corey. 1991. Comparative fecundity of decapod crustaceans III. The fecundity of fifty-three species of decapoda from tropical, subtropical and boreal waters. Crustaceana 61: 308-316.
- Riley, G. L. and B. Tsukimura. 1998. Yolk protein synthesis in the riceland tadpole shrimp, *Triops longicaudatus*, Measured by in vitro incorporation of ³H-Leucine. The Journal of Experimental Zoology., 281: 238-247.
- Rodríguez-Almaraz, G.A. 1992. Tamaño poblacional, morfometría y crecimiento de *Procambarus clarkii* (Girard) (Crustacea: Cambaridae) del área central de Nuevo León, México. Tesis inédita, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, México, 107 pags.
- y G. Compeán- Jiménez. 1991. Crecimiento mensual de *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda: Cambaridae) en condiciones de laboratorio. Publicaciones Biológicas, F.C.B./U.A.N.L., 5:45-48.
- , M. A. Coronado-Magdaleno y E. Campos. 1993. Distribución y Notas Ecológicas de los Acociles (Cambaridae: *Procambarus*) del Estado de Tamaulipas, México. The Southwestern Naturalist 38(4): 390-393.
- and E. Campos. 1994. Distribution and status of the crayfishes (Cambaridae) of Nuevo León, México. Journal of Crustacean Biology, 14:729-735.
- and R. Mendoza-Alfaro. 1997. Biological and ecological notes of *Palaemonetes suttkusi* (Crustacea: Palaemonidae) from Cuatro Ciénegas basin, Coahuila, Mexico. The Southwestern Naturalist., 42: 501-504.

- and R. Mendoza-Alfaro, 1999. Crustáceos nativos de agua dulce: conocimiento y utilización. 3ª. Reunión Nacional de Redes de Acuicultura, Cuernavaca, Morelos.
- Rodríguez-Serna, M., C. Carmona-Osalde, M. A. Olvera-Nouoa and J. L. Arredondo-figuero. 2000. Fecundity, egg development and growth of juvenile crayfish *Procambarus (Austrocambarus) llamasii* (Villalobos, 1955) under laboratory conditions. *Aquaculture research*. 31: 173-179.
- Rodríguez-Virgen, I.T. 1999. Ecología poblacional de *Procambarus bouvieri* en la presa Caltzontzin, Uruapan, Michoacán. XV Congreso Nacional de Zoología, Tepic, Nayarit, México, pag. 125.
- Rojas, Y. 1999. Importancia de los caracteres sexuales secundarios en la taxonomía de las especies del subgénero *Austrocambarus* en México. XV Congreso Nacional de Zoología, Tepic, Nayarit, México, pag. 83.
- , F. Alvarez and J.L. Villalobos. 1999. A new species of crayfish of the genus *Procambarus* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) from Veracruz, Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 112:396-404.
- Romaire, R.P. 1986. Water and soil quality criteria for *Procambarid* crawfish farms (red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* and white river crawfish, *Procambarus acutus acutus*). School of Forestry, Wildlife and Fisheries Louisiana State University.
- , 2000. *Procambarid* crawfish aquaculture in forage-based systems. *Aquaculture* America 2000. New Orleans. Pp. 285.
- , J. S. Forester and J. W. Avault. 1976. Length-weight relationships of two commercially important crawfishes of the genus *Procambarus*. Third International Crayfish Symposium, Finlandia.
- , J.S. Forester and J. W. Avault, Jr. 1978. Growth and survival of stunted red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*) in a feeding-stocking density experiment in pool. 4th. International Symposium of the International Association of Astacology, France.

- and C. G. Lutz. 1989. Populations dynamics of *Procambarus clarkii* (Girard) and *Procambarus acutus acutus* (Girard) (Decapoda: Cambaridae) in commercial ponds. *Aquaculture*, 81:253-274.
- Sagi, A; I. Khalaila; A. Barki; G. Hulata and I. Karplus. 1996. Intersex red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens): Functional males with pre-vitellogenic ovaries. *Biol. Bull.* 190:16-23.
- Saiag, B., Mustel, J. J. and Y. Croisille. 1979. Female specific protein (Vitellogenin and lipovitellin) in *O. gamarella*: Isolation and identification by means of glutaraldehyde-polymerized antibodies. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B: 285 - 288.
- Sarojini, R; R. Nagabhushanam and M. Fingerman. 1995. Mode of action of the neurotransmitter 5-Hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. An in vivo and in vitro study. *The Journal of experimental zoology.* 271: 395-400.
- Sandoval-Quintero, M. E. and A. Gracia. 1998. Stages of gonadal development in the spotted pink shrimp *Penaeus brasiliensis* *Journal of Crustacean Biology.* 18(4): 680-685.
- Shafir, S., M. Tom, M. Ovadia and E. Lubzens. 1992. Protein, vitellogenin and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Biol. Bull.* 183:394-400.
- Shields, J. D. 1991. The reproductive ecology and fecundity of *Cancer* crabs. *In: In: Wenner A. and A. Kuris (eds.) pp. 193-213. CRUSTACEAN ISSUES 7. Crustacean egg production, A. A. Balkena, Rotterdam.*
- Skinner, D. M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle, *Biol. Bull.* 123:635-647.
- , 1985. Molting and regeneration. *In: D. E. Bliss (ed.) The Biology of Crustacea.* 9: 44-146. New York: Academic Press.
- Smart, G. C. 1962. The life history of the crayfish *Cambarus longulus longulus*. *Amer. Midl. Nat.* 68: 83-94.
- Smith, D. G. 1981. Life history parameters of the crayfish *Orconectes limosus* (Ret) in southern New England. *Ohio J. Sci.* 81: 169-172.

Snyder, D. E. 1983. Fish eggs and larvae. *In*: L. A. Nielsen and D. L. Johnson (eds.), Fisheries Techniques. Bethesda: American Fisheries Society.

Sommer, T.R. 1984. The biological response of the crayfish *Procambarus clarkii* to transplantation into California ricefields. *Aquaculture*, 41:373-384.

Somers, K. M. 1991. Characterizing size-specific fecundity in crustaceans. *In*: Wenner A. and A. Kuris (eds.) pp. 357-378. CRUSTACEAN ISSUES 7. Crustacean egg production, A. A. Balkena, Rotterdam.

Somerton, D. A. and W. S. Mayers. 1983. Fecundity differences between primiparous and multiparous female Alaskan tanner crab (*Chionoecetes sw bairdi*). *Journal of Crustacean Biology*. 3: 183-186.

Soumoff, C. and D. M. Skinner. 1983. Ecdysteroid titers during the molt cycle of the blue crab resemble those of other crustacea, *Biol. Bull.* 165:321-329.

Souty, C. and J. L. Piccaud. 1984. Effet de l'injection d'une gonadotropine humaine sur la synthèse et la libération de la vitellogénine par le tissu adipeux du Crustacé Isopode marin *Idotea balthica basteri* Audouin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 54: 418-421.

Spaargaren, H. D. and P. Haefner, Jr. 1994. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II Biochemical relationships. *Journal of Crustacean Biology*. 14 (1): 6-19.

and P. A. Haefner Jr. 1998. Quantitative changes during ovarian development in the brown shrimp *Crangon crangon* (L., 1758) (Decapoda-Natantia). *Crustaceana*, 71(3): 247-257.

Stephens, G. J. 1951. Mechanisms regulating the reproductive cycle in the crayfish, *Cambarus*. I. The female cycle. *Tulane Studies in Zoology*. Pp. 70-83.

Subramoniam, T. 1991. Chemical and composition of spermatophores in decapod crustaceans, pp. 308-321 in: R. T. Bauer and J. W. Martin (eds.), *Crustacean Sexual Biology*, Columbia University Press, New York.

Suko, T. 1953. Studies on the development of the crayfish. I. The development of secondary sexual characters in appendages. *Science reports of Saitama University*. 1B: 77-96.

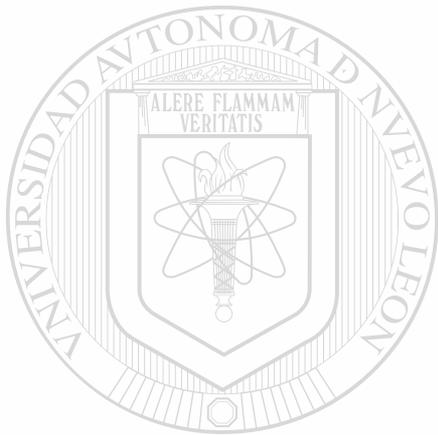
- , 1954. Studies on the development of the crayfish. II. The development of the egg-cell before fertilization. *Science Reports of the Saitama University*. 1B: 165-175.
- , 1956. Studies on the development of the crayfish. IV. The development of winter eggs. *Science Reports of the Saitama University*. 2B: 213-219.
- , 1958. Studies on the development of the crayfish. VI. The reproductive cycle. *Science Reports of the Saitama University*. 3B: 79-91.
- Suzuki, S. 1987. Vitellins and Vitellogenins of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Biol. Bull.*, 173:345-354.
- , K. Yamasaki and Y. Katakura. 1989. Vitellogenin synthesis by fat body and ovary in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *General and Comparative Endocrinology*, 74:120-126.
- Talbot, P. 1981. The ovary of the lobster, *Homarus americanus*. I. Architecture of the mature ovary. *Journal of Ultrastructure. Research*. 76: 235-248.
- , C. Thaler and P. Wilson. 1986. Artificial insemination of the american lobster *Homarus americanus*. *Gamete Research*, 14:25-31.
- Tan-Fermin, J. 1991. effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture*, 93:77-86.
- Takemura, A., A. Hara and K. Takano. 1991. Immochemical identification and partial characterization of female-specific serum proteins in white-edged rockfish, *Sebastes faczanowskii*. *Environmental Biology of Fishes*, 30:49-56.
- Taketomi, Y. and Y. Kawano. 1985. Ultrastructure of the mandibular organ of the shrimp *Penaeus japonicus*, in untreated and experimentally manipulated individuals. *Cell Biology International Reports*, 9:1069-1074.
- Teisser, G. 1960. Relative growth, 537-560 pp. *In: The Physiology of Crustacea*. Vol. I. Metabolism and Growth (T. H. Waterman, ed.). Academic Press, New York, 6to. Pp.
- Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. Burdon, R. and P. van Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam. 549 pp.

- Tobías- Chavana, J. A. 1991. Efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular sobre la muda y el desarrollo gonadal en hembras del cangrejo de río *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). Tesis Inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 75 pags.
- Tom M, M. Goren and M. Ovadia. 1987a. Purification and partial characterization of vitellin from ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Decapoda, Penaeidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 87B:17-23.
- , ----- and ----- . 1987b. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Decapoda, Penaeidae). *Int. J. Inv. Rep. and Dev.*, 12:1-13.
- , M. Fingerman, K. Hayes, V. Johnson, B. Kerner and E. Lubzens. 1992. A comparative study of the ovarian proteins from two penaeid shrimps, *Penaeus semisulcatus* de Haan and *Penaeus vannamei* (BOONE). *Comp. Biochem. Physiol.* 483-490.
- Tsuchida, S. and S. Watanabe. 1997. Growth and reproduction of the grapsid crab *Plagusia dentipes* (Decapoda:Brachyura) *Journal of Crustacean Biology.* 17 (1): 90-97.
- Tsumura, S. and H. Nakagawa. 1989. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 92: 59 - 66.
- and ----- . 1989. Studies on vitellin accumulation in freshwater shrimp, *Palaemon paucidens*. *J. Fac. Appl. Biol. Sci.*, 28:7-14.
- Tsukimura, B. and D. W. Borst. 1992. Regulation of the methyl farnesoate levels in the lobster *Homarus americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 86:287-303.
- Tuma, D. 1967. A description of the development of primary and secondary sexual characters in the banana prawn *Penaeus merguensis*, (Crustacea, Decapoda, Natantia). *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 18: 73 - 88.
- Tyler, C. R. and J. P. Sumpter. 1990. The development of a radioimmunoassay for carp, *Cyprinus carpio* vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8:129-140.

- , 1993. *Electrophoretic patterns of yolk proteins throughout ovarian development and their relationship to vitellogenin in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss**. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B:321-329.
- Van Beek, E. V., M.V. Brussel, G. Criel and A. D. Loof. 1987. A possible extra-ovarian site for synthesis of lipovitellin during vitellogenesis in *Artemia* sp. (Crustacea: Anostraca). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 12:227-240.
- Varadarajan, S. and T. Subramoniam. 1980. Histochemical investigations of vitellogenesis of an anomuran crab, *Clibanarius clibanarius*. *International Journal of Invertebrate Reproduction*. 2: 47-58.
- Vey, A., K. Soderhall and R. Ajaxon. 1983. Susceptibility of *Orconectes limosus* Raff. To the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish* 5: 284-291.
- Villalobos-Figueroa, A. 1955. *Cambarinos de la Fauna Mexicana*. (Crustacea: Decapoda) Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México 290 pp.
- , 1982. Decapoda, 215-239 pp. *In: Hulbert, S. H. and A. Villalobos-Figueroa, A. Decapoda, 215-239. In: Aquatic Biota of México, Central America and the West Indies*. 1982. Hurlbert S. H. and A. Villalobos-Figueroa (eds.). San Diego State University, San Diego, California. 529 pp.
- Villalobos-Hiriart, J.L., A. C. Díaz-Barriga y E. Lira-Fernández. 1993. Los crustáceos de Agua Dulce de México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, Vol Esp. (XLIV): 267- 290.*
- Vincent, M. L. Ramos and M. Oliva. 1988. Variations quantitatives des pigments carotenoïdes dans l'ovaire et l'hépatopancreas de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16 : 431 - 436.
- Voller, A. and D. Bidwell. 1986. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *In: Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Rose, N., Friedman, H. and J. Fahey (Eds.), American Society for Microbiology, Washington. Ch.17 pp. 99 - 115.

- Waddy, S. L. and D. E. Aiken. 1985. Fertilization and egg retention in artificially inseminated female american lobsters, *Homarus americanus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42:1954-1956.
- Webb, H. M. 1977. Eyestalk regulation of molt and vitellogenesis in *Uca pugilator*. Biol. Bull. 153: 630-642.
- Wiley, H, L. Opresko and R. Wallace. 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. Anal. Biochem. 97: 145 - 152.
- Woo-Khoo, H. 1988. Shrimp maturation in captivity: Its control and manipulation. Seafood Asia, 1-37 , Singapore.
- Wyatt, G. and M. Pan. 1974. Insect plasma proteins, Ann. Rev. Biochem. 47:779-817.
- Yamashita, O. and L. S. Indirasith. 1988. Metabolic fates yolk proteins during embryogenesis in Arthropods. Develop. Growth & Differ., 30 (4):337-346.
- Yano, I. 1987. Effect of 17-hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 61: 49-57.
- , 1988. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus* , Marine Biology , 99:547-553.
- and Y. Chinzel. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol., 86B:213-218.
- Yepiz-Plascencia, G., R. Sotelo-Mundo, L. Vazquez-Moreno, R. Ziegler and I. Higuera-Ciapara. 1995. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. Comp. Biochem. Physiol. 181 - 187.
- Zagalasky, P. 1985. A study of the astaxantin - lipovitellin, ovoverdin, isolated from the ovaries of the lobster, *Homarus gammarus*. Comp. Bioch. Physiol. 80B (3): 589 - 597.
- , E. Eliopoulos and J. B. Findlay. 1990. The architecture of invertebrate carotenoproteins. Comp. Biochem. Physiol. 97B: 1 - 18.
- Zar, J.H. 1996. Biostatistical Analysis. Third edition. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 662 pp.

Zerbib, C. 1976. Nature chimique de l'ovocyte en vitellogénèse chez les Ecrevisses *Astacus astacus* et *A. leptodactylus*. *Int. Reprod.*, 1: 289-295.

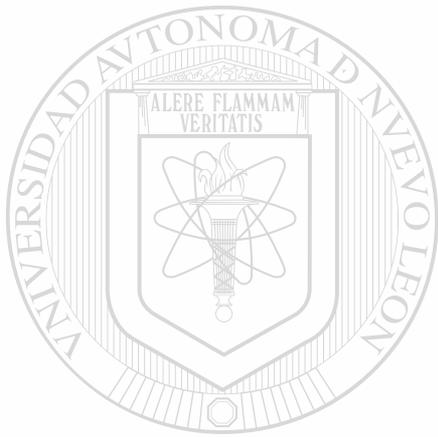


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



