

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTOS DE LA INCLUSIÓN DIETARIA DE *Ulva clathrata* SOBRE EL
DESEMPEÑO REPRODUCTIVO Y LA CALIDAD DEL DESOVE EN
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EN
CONDICIONES DE PRODUCCIÓN COMERCIAL**

POR

DIANA CRISTINA CORRAL ROSALES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN NUTRICIÓN Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS PARA ORGANISMOS ACUÁTICOS**

JULIO, 2019

**EFFECTOS DE LA INCLUSIÓN DIETARIA DE *Ulva clathrata* SOBRE EL
DESEMPEÑO REPRODUCTIVO Y LA CALIDAD DEL DESOVE EN
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EN
CONDICIONES DE PRODUCCIÓN COMERCIAL**

Comité de Tesis

DRA. LUCIA ELIZABETH CRUZ SUAREZ

Presidente

DR. DENIS RICQUE MARIE

Secretario

DRA. MARTHA GUADALUPE NIETO LOPÉZ

Vocal

DRA. MIREYA TAPIA SALAZAR

Vocal

DR. JULIAN GAMBOA DELGADO

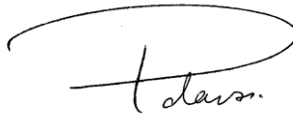
Vocal

**EFFECTOS DE LA INCLUSIÓN DIETARIA DE *Ulva clathrata* SOBRE EL
DESEMPEÑO REPRODUCTIVO Y LA CALIDAD DEL DESOVE EN
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EN
CONDICIONES DE PRODUCCIÓN COMERCIAL**

Dirección de Tesis

DRA. LUCIA ELIZABETH CRUZ SUÁREZ

Directora



DRA. ELENA PALACIOS MECHETNOV

Directora externa
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de Tesis la doctora Elizabeth y Elena, excelentes investigadoras las cuales admiro y respeto, gracias por darme la formación académica y toda su paciencia, por todo su apoyo gracias.

A CONACYT (455811), por las becas otorgadas (beca doctoral y beca ayudante de investigador nacional nivel III durante cinco y un año, respectivamente), al grupo acuícola Mexicano GAM, por la confianza y financiamiento a este proyecto.

Al Ing. Octaviano Carillo director general y presidente del grupo acuícola Mexicano, a los técnicos y a todo el personal del laboratorio Granmar, sin ellos y sin su ayuda este trabajo no habría sido posible.

Al doctor Denis Ricque por todo su apoyo y formación.

A los doctores miembros de mi comité de tesis y del programa Maricultura, muchas gracias por todo su apoyo y contribuciones.

A Olivia Arjona, Maribel Maldonado, Carmen Jaramillo y Roberto Hernández gracias por su apoyo, guía y paciencia al realizar mis análisis.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por permitirme realizar parte de mi doctorado en sus instalaciones.

A Denisse, Ana, Maribel y Sara, gracias por hacer más ameno todo el camino.

A mis suegros Nora de Leija y Antonio Cantú por todo el apoyo, porque sin su ayuda esto no habría sido posible.

A mis hermanas Paulina y Karina, por tener tantas esperanzas en mí, fueron una motivación.

A Rodrigo y Priscilla por ayudarme en momentos difíciles de mi tesis por su apoyo gracias.

A mi madre Virginia Rosales por todo el apoyo, por siempre estar para mí, por creer ciegamente en lo que puedo dar, eres un gran ejemplo para mí.

A mi esposo Antonio por la paciencia, los desvelos y el apoyo que día con día me dabas, por siempre motivarme a dar todo de mí, por todo el amor, gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado con todo mi AMOR

A mi madre, por todo el apoyo y el amor del mundo, por darme fortaleza a toda hora y en todo momento.

A mi compañero de vida Antonio, por todo el sacrificio, por los buenos y no tan buenos momentos, por el apoyo, la paciencia y el amor, por creer siempre en mí.

A mi pequeño Toñito, por ser mi principal motivación, mi fuerza y mi inspiración.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en:

- Departamento de Ecología, Programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Cd. Universitaria San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Laboratorio de Metabolismo de Lípidos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, México.
- Laboratorio de Larvas Granmar S.A. de C.V. La Paz, Baja California Sur, México.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIACIONES Y SIMBOLOS..... | I |
| ÍNDICE DE TABLAS | III |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VI |
| RESUMEN..... | IX |
| ABSTRACT..... | XI |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 2.1. Biología general de peneidos..... | 3 |
| 2.1.1. Taxonomía | 3 |
| 2.1.2. Morfología | 4 |
| 2.1.3. Distribución | 4 |
| 2.2. Reproducción de peneidos..... | 5 |
| 2.2.1. Maduración gonádica y mecanismos endócrinos en hembras | 7 |
| 2.2.2. Control endócrino | 10 |
| 2.2.3. Sistema reproductor de machos peneidos..... | 10 |
| 2.2.4. Maduración testicular y mecanismos endocrinos en machos | 11 |
| 2.2.5. Cortejo sexual y apareamiento..... | 12 |
| 2.2.6. Ciclo de vida..... | 13 |
| 2.3. Reproducción en cautiverio | 14 |
| 2.3.1. Criterios productivos de desempeño reproductivo | 14 |
| 2.3.2. Criterios morfológicos de desempeño reproductivo..... | 15 |
| 2.3.3. Criterios bioquímicos de desempeño reproductivo | 16 |
| 2.3.4. Extirpación del pedúnculo ocular (ablación)..... | 17 |
| 2.3.5. Requerimientos nutricionales de reproductores penaeidos..... | 18 |
| 2.4. Algas verdes | 21 |
| 2.4.1. Composición química y valor nutricional de algas del genero <i>Ulva</i> | 21 |
| 2.4.2. Compuestos funcionales con propiedades biológicas en algas del género <i>Ulva</i> | 23 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 25 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 26 |
| 5. OBJETIVOS | 27 |
| | |
| 6. Capacidad reproductiva de <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931) en relación a las dietas de maduración suplementadas con harina de <i>Ulva clathrata</i> | 28 |
| 6.1. Resumen | 29 |
| 6.2. Introducción..... | 29 |
| 6.3. Materiales y Métodos | 31 |
| 6.3.1. <i>Ulva clathrata</i> | 31 |

| | |
|--|----|
| 6.3.2. Preparación de la dieta experimental | 31 |
| 6.3.3. Condiciones experimentales para la maduración de reproductores | 32 |
| 6.3.4. Análisis estadísticos | 34 |
| 6.4. Resultados..... | 35 |
| 6.5. Discusión | 36 |
| 6.6. Conclusión..... | 38 |
| | |
| 7. Disminución del agotamiento reproductivo utilizando <i>Ulva clathrata</i> en reproductores de camarón blanco del Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931) durante la maduración comercial. | 39 |
| 7.1. Resumen | 40 |
| 7.2. Introducción..... | 40 |
| 7.3. Materiales y métodos..... | 42 |
| 7.3.1. Origen y crianza de reproductores | 42 |
| 7.3.2. Condiciones de cultivo del alga y diseño experimental..... | 42 |
| 7.3.3. Colecta de muestras | 42 |
| 7.3.4. Análisis histológico e histoquímico de ovarios | 43 |
| 7.3.5. Análisis bioquímicos..... | 43 |
| 7.3.6. Análisis estadístico | 45 |
| 7.4. Resultados..... | 46 |
| 7.4.1. Composición proximal de la dieta fresca y la harina de <i>Ulva clathrata</i> | 46 |
| 7.4.2. Composición química de las gónadas | 46 |
| 7.4.3. Composición bioquímica del hepatopáncreas de hembras | 47 |
| 7.4.4. Composición bioquímica del músculo de hembras | 47 |
| 7.4.5. Seguimiento individual y parámetros reproductivos de hembras | 48 |
| 7.4.6. Histología e histoquímica de gónadas | 49 |
| 7.5. Discusión | 50 |
| | |
| 8. Ácidos grasos, esteroides, compuestos fenólicos y carotenoides en respuesta a la inclusión dietaria de <i>Ulva clathrata</i> en camarones reproductores <i>Litopenaeus vannamei</i> | 59 |
| 8.1. Resumen | 60 |
| 8.2. Introducción..... | 61 |
| 8.3. Materiales y métodos..... | 62 |
| 8.3.1. Diseño experimental y <i>U. clathrata</i> | 62 |
| 8.3.2. Colección de muestras | 62 |
| 8.3.3. Análisis de lípidos..... | 63 |
| 8.3.4. Análisis de compuestos fenólicos | 65 |
| 8.3.5. Análisis estadístico | 65 |
| 8.4. Resultados..... | 66 |
| 8.4.1. Ácidos grasos de <i>Ulva</i> y de los ingredientes de la dieta fresca | 66 |

| | |
|--|-----|
| 8.4.2. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar de gónadas | 66 |
| 8.4.3. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar del hepatopáncreas | 69 |
| 8.4.4. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar de músculo..... | 71 |
| 8.4.5. Esteroles determinados en gónada, hepatopáncreas y músculo..... | 72 |
| 8.4.6. Compuestos fenólicos en gónadas | 74 |
| 8.4.7. Carotenoides analizados en gónadas, hepatopáncreas y músculo | 77 |
| 8.5. Discusión..... | 77 |
| | |
| 9. Reducción de la melanización del espermátforo en camarones <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados con <i>Ulva clathrata</i> durante la producción de un laboratorio comercial..... | 81 |
| 9.1. Resumen | 82 |
| 9.2 Introducción..... | 82 |
| 9.3. Materiales y métodos..... | 84 |
| 9.3.1. Diseño experimental y variables producción..... | 84 |
| 9.3.2. Obtención de muestras..... | 85 |
| 9.3.3. Análisis bioquímicos..... | 85 |
| 9.3.4. Análisis de ácidos grasos y esteroles | 85 |
| 9.3.5. Análisis de compuestos fenólicos y carotenoides..... | 85 |
| 9.3.6. Análisis estadístico | 86 |
| 9.4. Resultados..... | 86 |
| 9.4.1. Parámetros reproductivos y efecto de la temperatura | 86 |
| 9.4.2. Composición bioquímica en tejidos de machos..... | 89 |
| 9.4.3. Perfil de ácidos grasos en tejidos de machos..... | 89 |
| 9.4.4. Esteroles analizados en tejidos de machos | 91 |
| 9.4.5. Contenido de compuestos fenólicos y carotenoides en tejidos de machos.... | 93 |
| 9.5. Discusión..... | 94 |
| | |
| 10. Mejora de la calidad de desove utilizando <i>Ulva clathrata</i> en reproductores de camarón blanco del Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)..... | 100 |
| 10.1. Resumen | 101 |
| 10.2. Introducción..... | 102 |
| 10.3. Materiales y métodos..... | 103 |
| 10.3.1. Desoves y colecta de muestra | 103 |
| 10.3.2. Microfotografía de campo brillante | 104 |
| 10.3.3. Análisis bioquímicos..... | 105 |
| 10.3.4. Análisis de ácidos grasos, esteroles y carotenoides..... | 105 |
| 10.3.5. Análisis estadístico | 105 |
| 10.4. Resultados..... | 105 |
| 10.4.1. Microfotografías y medidas de huevos y nauplios | 105 |
| 10.4.2. Composición bioquímica de huevos y nauplios | 107 |

| | |
|--|-----|
| 10.4.3. Ácidos grasos de huevos de <i>L. vannamei</i> | 107 |
| 10.4.4. Ácidos grasos de nauplios de <i>L. vannamei</i> | 110 |
| 10.4.5. Esteroles en huevos y nauplios de <i>L. vannamei</i> | 111 |
| 10.5. Discusión | 111 |
| 11. DISCUSIÓN COMPLEMENTARIA | 115 |
| 12. CONCLUSIONES | 120 |
| 13. PERSPECTIVAS | 121 |
| 14. BIBLIOGRAFÍA..... | 122 |
| 15. RESUMEN BIOGRÁFICO | 144 |
| 16. ANEXOS..... | 148 |

LISTA DE ABREVIACIONES Y SIMBOLOS

| | |
|--------|--|
| AG | glándula androgénica |
| AGH | hormona androgénica |
| ARA | ácido araquidónico |
| CIBNOR | Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste |
| cm | Centímetro |
| DA | Dopamina |
| DHA | ácido docosahexaenoico |
| E | estadio de maduración |
| et al. | Et alii: locución latina que significa “-y otros” |
| FA | ácido graso |
| FAO | Organización de las naciones unidas para la agricultura y alimentación |
| g | Gramo |
| GEH | hormona estimuladora de la gónada |
| GIH | hormona inhibidora de la gónada |
| GSH | hormona estimulante de las gónadas |
| HUFA | ácido graso altamente insaturado |
| kg | Kilogramo |
| L | Litro |
| LA | ácido linoleico |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MUFA | ácido graso mono insaturado |
| ND | no determinado |
| NS | no significativo |
| NxT | Interacción |
| P | Probabilidad |
| pH | potencial de hidrógeno |
| ppm | partes por millón |

| | |
|---------------|--|
| ppt | partes por mil |
| PUFA | ácido graso poliinsaturado |
| rpm | revoluciones por minuto |
| SAGARPA | Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación |
| T | Tratamiento |
| UANL | Universidad Autónoma de Nuevo León |
| α | Alpha |
| β | Beta |
| % | partes por cien |
| < | menor que |
| > | mayor que |
| \pm | mas menos |
| Σ | Sumatoria |
| C | Centígrado |
| μ | Micras |
| μm | Micrómetro |
| ‰ | partes por mil |
| ° | Grado |

ÍNDICE DE TABLAS

| MARCO TEÓRICO | | Pág. |
|----------------------|---|------|
| Tabla 1. | Evaluaciones de diferentes aditivos en regímenes alimenticios sobre la capacidad reproductiva y la calidad del desove y de las larvas en peneidos..... | 19 |
| Tabla 2. | Requerimientos nutricionales de dietas para maduración de peneidos..... | 20 |
| Tabla 3. | Composición bromatológica de algas del genero <i>Ulva</i> | 22 |
| Tabla 4. | Compuestos funcionales con propiedades biológicas en algas del genero <i>Ulva</i> | 23 |
| Tabla 5. | Uso de algas y sus derivados en dietas para especies de interés acuícola..... | 24 |
| CAPÍTULO 1 | | |
| Tabla 1-1. | Calculo de inclusión de harina <i>Ulva</i> en la dieta fresca para maduración..... | 33 |
| Tabla 1-2. | Desempeño reproductivo de reproductores <i>L. vannamei</i> alimentados con una dieta Control y una dieta experimental suplementada con harina <i>U. clathrata</i> en el laboratorio de larvas Granmar durante el periodo experimental de 45 días..... | 36 |
| CAPÍTULO 2 | | |
| Tabla 2-1. | Composición proximal (g kg^{-1} dw = peso seco por sus siglas en ingles) de la harina de <i>U. clathrata</i> y de los componentes de la dieta control (medias \pm ES)..... | 46 |
| Tabla 2-2. | Composición bioquímica (mg g^{-1} dw) de la gónada de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con una dieta con o sin <i>Ulva</i> , en relación con la etapa de maduración, en un período experimental de 45 días (medias \pm ES), considerando T=Tratamiento; E=Etapa de maduración. Los valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes..... | 47 |
| Tabla 2-3. | Composición bioquímica (mg g^{-1} dw) de hepatopáncreas de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con una dieta con o sin <i>Ulva</i> , en relación con la etapa de maduración, en un período experimental de 45 días (medias \pm ES), considerando T=Tratamiento; E=Etapa de maduración..... | 47 |
| Tabla 2-4. | Composición bioquímica (mg g^{-1} dw) de músculo de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con una dieta con o sin <i>U. clathrata</i> , en relación con la etapa de maduración, en un período experimental de 45 días (medias \pm ES), considerando T=Tratamiento; E=Etapa de maduración..... | 48 |
| CAPÍTULO 3 | | |
| Tabla 3-1. | Ácidos grasos (% del total), esteroides (% del total de esteroides), carotenoides (mg g^{-1}) y lípidos totales (mg g^{-1}) medidos en harina de <i>U. clathrata</i> e ingredientes frescos utilizados en la dieta | |

| | | |
|------------|--|----|
| | (Medias \pm ES)..... | 67 |
| Tabla 3-2. | Perfil de ácidos grasos de la fracción neutra de gónadas (% del total, medias \pm ES) de reproductores hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días..... | 68 |
| Tabla 3-3. | Perfil de ácidos grasos de la fracción polar de gónadas (% del total, medias \pm ES) de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días..... | 70 |
| Tabla 3-4. | Perfil de ácidos grasos de la fracción neutra del hepatopáncreas (% del total, medias \pm ES) de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días..... | 71 |
| Tabla 3-5. | Perfil de ácidos grasos de la fracción polar del hepatopáncreas (% del total, medias \pm ES) de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días..... | 72 |
| Tabla 3-6. | Perfil de ácidos grasos de la fracción neutra de músculo (% del total, medias \pm ES) de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días..... | 73 |
| Tabla 3-7. | Perfil de ácidos grasos de la fracción polar del músculo (% del total, medias \pm ES) de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días..... | 74 |
| Tabla 3-8. | Medias (\pm ES) del perfil de esteroides (% del total de esteroides) medido en gónadas, hepatopáncreas y músculos de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período de 45 días..... | 75 |

CAPITULO 4

| | | |
|------------|--|----|
| Tabla 4-1. | Ácidos grasos de la fracción neutra y polar (% del total, medias \pm ES) de hepatopáncreas de machos <i>L. vannamei</i> alimentados con o sin <i>U. clathrata</i> en la dieta durante un período de 45 días..... | 91 |
| Tabla 4-2. | Ácidos grasos de la fracción neutra y polar (% del total, medias \pm ES) de músculo de machos <i>L. vannamei</i> alimentados con o sin <i>U. clathrata</i> durante 45 días..... | 92 |
| Tabla 4-3. | Ácidos grasos (% del total, medias \pm ES) en espermátóforos de machos <i>L. vannamei</i> alimentados con o sin <i>U. clathrata</i> durante 45 días..... | 93 |
| Tabla 4-4. | Perfil de esteroides (% del total de esteroides, medias \pm ES) en hepatopáncreas, músculo y espermátóforo de machos <i>L. vannamei</i> alimentados con o sin <i>Ulva</i> durante 45 días..... | 94 |

CAPÍTULO 5

| | | |
|------------|--|-----|
| Tabla 5-1. | Ácidos grasos de la fracción neutra y polar (% del total, medias± ES) medidos en huevos de <i>L. vannamei</i> alimentados con o sin <i>U. clathrata</i> en la dieta fresca durante 45 días..... | 109 |
| Tabla 5-2. | Ácidos grasos de la fracción neutra y polar (% del total, medias ± ES) medidos en nauplios de <i>L. vannamei</i> alimentados con o sin <i>U. clathrata</i> en la dieta fresca durante 45 días..... | 110 |
| Tabla 5-3. | Perfil de esteroides (% del total de esteroides, medias ± ES) en huevos y nauplios de <i>L. vannamei</i> alimentados con o sin <i>Ulva</i> en la dieta durante 45 días..... | 111 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| MARCO TEÓRICO | | Pág. |
|----------------------|--|------|
| Figura 1. | Hábitat natural e introducido de <i>L. vannamei</i> . Los colores del rango de distribución indican el grado de idoneidad del hábitat que puede interpretarse como probabilidades de ocurrencia (Aquamaps, 2016)..... | 5 |
| Figura 2. | Morfología del camarón, vista ventral donde se muestra la posición de las estructuras copuladoras de hembras y machos (Lee y Wickins, 1992)..... | 6 |
| Figura 3. | Sistema reproductor de hembras peneidos. Localización anatómica del sistema reproductor (A), localización del télico (B), vista dorsal del sistema reproductivo disectado de la hembra (C) (Alfaro, 2001)..... | 7 |
| Figura 4. | Hembras peneidos de télico cerrado (A: <i>Farfantopenaeus brasiliensis</i>) y télico abierto (B: <i>Litopenaeus vannamei</i>). C: Hembra <i>L. vannamei</i> con espermatóforo adherido al télico (Foto tomada por Corral-Rosales 2014, 2017 en el laboratorio de larvas Granmar (B) y en la unidad académica SISAL-UNAM (A))..... | 8 |
| Figura 5. | Sistema reproductor interno masculino de camarones peneidos y petasma (Treece y Yates, 1988)..... | 11 |
| Figura 6. | Secuencia de apareamiento en <i>L. vannamei</i> ; (a) persecución del macho; (b) nado paralelo; (c) copulación; (d) adhesión del espermatóforo en el télico de la hembra Yano et al. (1988)..... | 12 |
| Figura 7. | Ciclo de vida de camarones (Motoh, 1984, modificada por Corral-Rosales, 2019)..... | 13 |
| Figura 8. | Evaluación visual del estado de maduración de la gónada de una hembra <i>L. vannamei</i> | 16 |
| Figura 9. | Ablación del pedúnculo ocular en hembras reproductoras <i>L. vannamei</i> | 18 |
| Figura 10. | Cultivo de macroalga <i>U. clathrata</i> (imagen tomada de Aonori Aquafarms)..... | 22 |
| CAPÍTULO 1 | | |
| Figura 1-1. | Preparación del alimento (calamar fresco congelado con 2% de harina de <i>U. clathrata</i>)..... | 32 |
| Figura 1-2. | Ubicación del laboratorio de producción Granmar donde fue realizado el experimento..... | 33 |
| Figura 1-3. | Condiciones de operación del laboratorio de larvas Granmar..... | 35 |
| CAPÍTULO 2 | | |
| Figura 2-1. | Desempeño reproductivo de hembras <i>L. vannamei</i> alimentadas con harina de <i>Ulva clathrata</i> (gris oscuro) vs. control (gris claro) en relación con el número de desoves: A) Número de hembras por número de desoves durante el período experimental de 45 días; B) Nauplios por número de desove. Los valores se analizaron usando un ANOVA de una vía y los resultados se expresaron como medias \pm SE. T=Tratamiento; M=Etapa de maduración..... | 49 |
| Figura 2-2. | Micrografías del desarrollo gonadal de hembras de <i>L. vannamei</i> | |

| | | |
|-------------------|--|----|
| | utilizando tinción con Hematoxilina-eosina. A) Control: ovario en vitelogénesis avanzada en estadio III con ovocitos previtelogénicos (pro) y ovocitos vitelogénicos tardíos (lvo). B) Control: ovario con ovocitos postvitelogénicos en estadio IV (pvo). C) Ovario con <i>Ulva</i> en vitelogénesis avanzada en estadio III con ovocitos previtelogénicos y ovocitos en vitelogénesis exógena o tardía (lvo). IV D) Ovario con <i>Ulva</i> : ovocitos postvitelogénicos en estadio IV (pvo); barras corticales (cr); n = núcleo; E) y F) Sudán Negro tr = triglicéridos ph = fosfolípidos..... | 51 |
| Figura 2-3. | A) Frecuencia previtelogénica, B) Vitelogénica temprana, C) Vitelogénica tardía, D) Frecuencia postvitelogénica (%) en relación con las etapas de maduración durante el desarrollo ovárico de reproductores hembra <i>L. vannamei</i> después de ser alimentados con una dieta control (gris claro) o <i>Ulva</i> (gris oscuro)..... | 53 |
| Figura 2-4. | A) Área de ovocitos (μm) en relación con los estadios vitelogénicos (Previtelogénesis, vitelogénesis temprana, vitelogénesis tardía, postvitelogénesis) durante el desarrollo ovárico de hembras alimentadas con una dieta de control (gris claro) o con <i>Ulva</i> (gris oscuro)..... | 54 |
| CAPÍTULO 3 | | |
| Figura 3-1. | Compuestos fenólicos medidos en gónadas hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con una dieta con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días (medias \pm SE), considerando E=estadio; T=tratamiento; ExT=interacción. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes..... | 75 |
| Figura 3-2. | Carotenoides medidos en gónadas (A), hepatopáncreas (B) y músculo (C) de hembras <i>L. vannamei</i> después de ser alimentadas con una dieta con o sin <i>Ulva</i> en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días..... | 76 |
| CAPÍTULO 4 | | |
| Figura 4-1. | A) Mortalidad, B) Cortejo, y C) Espermatóforos melanizados por período experimental, y D) Viabilidad en <i>L. vannamei</i> después de recibir una dieta control (gris claro) o una dieta enriquecida con <i>Ulva</i> (gris oscuro) durante 45 días (media \pm ES)..... | 86 |
| Figura 4-2. | A) Supervivencia y B) Actividad diaria de cortejo en <i>L. vannamei</i> alimentados con una dieta control (línea gris) y una dieta experimental suplementada con <i>U. clathrata</i> (línea negra) durante un ciclo de producción. La temperatura se indica mediante la línea dentada de color gris claro (eje derecho)..... | 87 |
| Figura 4-3. | A) Incidencia diaria de espermatóforo melanizado y B) Viabilidad del huevo en machos <i>L. vannamei</i> alimentados con una dieta control (línea gris) y una dieta experimental suplementada con <i>U. clathrata</i> (línea negra) durante un ciclo de producción. La temperatura se indica mediante la línea dentada de color gris claro (eje derecho)..... | 88 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 4-4. | Composición bioquímica (mg g^{-1} dw) de hepatopáncreas (HP) y músculo (M) en machos <i>L. vannamei</i> alimentados con una dieta control (gris claro) o una dieta con <i>Ulva</i> (gris oscuro) durante 45 días (medias \pm estándar error)..... | 90 |
| Figura 4-5. | Compuestos fenólicos (PC) en A) hepatopáncreas y B) músculo, y carotenoides en C) hepatopáncreas y D) músculo de machos <i>L. vannamei</i> alimentados con una dieta control (gris claro) o una dieta con <i>Ulva</i> (gris oscuro) durante 45 días (medias \pm SE)..... | 95 |

CAPÍTULO 5

| | | |
|-------------|---|-----|
| Figura 5-1. | Área de desove (A); Cilindros individuales de 200 L para el desove (B); Cosecha de nauplio en cosechadores de 30 L (C)..... | 104 |
| Figura 5-2. | Microfotografías de desoves de reproductores alimentados con y sin <i>Ulva</i> en la dieta fresca. (A) Nauplios de desoves de la dieta con <i>Ulva</i> (10X, campo claro); (B) Nauplios de desoves de la dieta control (10X, campo claro)..... | 106 |
| Figura 5-3. | Diámetro de huevos (A), altura (A) y ancho (B) de nauplios de desoves de reproductores <i>L. vannamei</i> alimentados con y sin <i>Ulva</i> en la dieta para reproductores, durante 45 días (promedio \pm ES)..... | 106 |
| Figura 5-4. | Carbohidratos (CHO), proteínas (mg g^{-1} dw) y carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$) en huevos y nauplios de <i>L. vannamei</i> alimentados con una dieta de control (gris claro) o una dieta con <i>Ulva</i> (gris oscuro) durante 45 días (promedio \pm ES)..... | 108 |

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de la suplementación de harina de alga *Ulva clathrata* en el calamar (20g de harina de *Ulva* por kg de calamar fresco) de una dieta fresca para maduración de reproductores *Litopenaeus vannamei* sobre el rendimiento reproductivo, la histología e histoquímica de la gónada, la composición bioquímica, el perfil de ácidos grasos, los esteroides, el contenido de carotenoides y compuestos fenólicos de gónadas, espermatóforos, hepatopáncreas, músculos, huevos y nauplios. Además, se evaluó el agotamiento reproductivo en hembras y la melanización en machos. El estudio se realizó en un laboratorio comercial (Larvas Granmar, La Paz, Baja California Sur) donde se usaron hembras ablacionadas y marcadas con anillos oculares para un seguimiento individual. La evaluación sobre el rendimiento reproductivo mostro que el consumo de *Ulva* aumentó 17.9% la producción de nauplios por hembra, mejoro 13.3% la tasa de eclosión y disminuyó significativamente la mortalidad (1.11 vs. 2.25 hembras/día/tanque, en comparación con el control) y el agotamiento reproductivo ocasionado por desoves múltiples, al mantener la producción continua de nauplios en hembras con uno o más desoves durante el periodo experimental. Las hembras alimentadas con *Ulva* tuvieron ovocitos vitelogénicos tardíos y postvitelogénicos más grandes (+7, +15%, respectivamente), y los ovocitos presentaron un área ocupada barras corticales mayor. Las hembras alimentadas con *Ulva* tuvieron 35% más de lípidos en las gónadas, y 84% más de 20:4n-6 en los acilglicéridos de las gónadas maduras y 30% más de 18:3n-3, 13% de 20:4n-6 y 10% de 22:6n-3 en los fosfolípidos de las gónadas maduras en comparación con los controles. En hepatopáncreas el 22:6n-3 aumentó 51% en los lípidos de reserva en hembras alimentadas con *Ulva* en comparación con los controles. Los carotenoides aumentaron 43% en las gónadas y cinco veces en el hepatopáncreas en hembras maduras alimentadas con *Ulva*. La proporción de fucosterol e isofucosterol pasó de indetectable en controles a 0.3 y 0.2%, respectivamente, en camarones alimentados con el alga. Los compuestos fenólicos en la gónada fueron más altos en las gónadas maduras en comparación con los inmaduros, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en relación con el consumo de *Ulva*. Los machos alimentados con *Ulva* tuvieron menos espermatóforos melanizados en comparación con los controles (120

machos o 1.9% vs. 233 machos o 3.7%). Los machos alimentados con *Ulva* tuvieron mayor actividad de cortejo (839 machos 13.2% vs. 689 machos o 10.8%) y mayor tasa de fertilización durante el desarrollo embrionario (85.5% vs. 81.2%). No se observó una diferencia significativa en la mortalidad machos como resultado de la dieta. Los machos alimentados con *Ulva* tuvieron 50% menos de carbohidratos en hepatopáncreas y 53% menos de carbohidratos en el músculo, pero más 20:4n-6 en la fracción de acilglicéridos en hepatopáncreas (2.8 ± 0.2 vs. 2.2 ± 0.2 , un aumento del 27%) y en el espermátforo (6.4 ± 0.3 vs. 5.7 ± 0.2). Los huevos y nauplios desovados por reproductores alimentados con *Ulva* tuvieron valores significativamente mayores de proteína (55% más proteína en huevos y 55% más en nauplios) y carotenoides (122% más en huevos y 36% en nauplios). El largo (+12%) y ancho (+22%) de los nauplios y el diámetro (+14%) de los huevos fue significativamente mayor con el consumo del alga. En huevos la concentración de 18:3n-3 y 22:6n-3 de la fracción polar aumentó significativamente en 81% y 11% respectivamente. En los lípidos de reserva el 20:4n-6 aumentó 18% y el 20:5n-3 19% con el consumo de *Ulva*. En nauplios el 18:3n-3, el 20:4n-6 y el 20:5n-3 de los acilglicéridos aumentaron 150%, 24% y 20% con el consumo de *Ulva*. En los nauplios con *Ulva*, el deshidrocolesterol aumentó tres veces y el colesterol disminuyó 10%. *Ulva clathrata* es una fuente de compuestos funcionales (terpenos, esteroides, ácidos grasos, flavonoides, compuestos polifenólicos, pigmentos y polisacáridos sulfatados) con diversas propiedades biológicas que actúan principalmente sobre la acumulación y el transporte de lípidos durante la vitelogénesis y como protectores antioxidantes de moléculas claves en la fisiología reproductiva. Se concluye que la suplementación con harina de *Ulva clathrata* en una dieta fresca para reproductores es una estrategia viable e innovadora para mejorar el rendimiento reproductivo y la calidad del desove de camarones bajo condiciones comerciales.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the effect of including *Ulva clathrata* meal in the squid (20 g of *Ulva* meal per kg of fresh squid) of a fresh diet for maturation of *Litopenaeus vannamei* broodstock, on the reproductive performance, histology and histochemistry of the gonad, biochemistry composition, the profile of fatty acids, sterols, carotenoid content and the phenolic compounds of gonads, spermatophores, hepatopancreas, muscles, eggs and nauplii. Additionally, reproductive exhaustion in females and melanization in males were assessed. The study was done in a commercial larvii production laboratory (Larvas Granmar, La Paz, Baja California Sur, Mexico) using ablated females with eye ring for individual follow-up. The evaluation on the reproductive performance showed that the consumption of *Ulva* increased 18% the production of nauplii per female and 13% the hatching rate, while significantly decreasing mortality and reproductive exhaustion in ablated females. Females fed with *Ulva* had bigger oocytes but only those in late vitellogenesis (+7%) and postvitellogenesis (+15%); they also had a bigger area occupied by cortical rods in postvitellogenic oocytes. Females fed *Ulva* had more lipids in gonads (+35%), and 84% more 20:4n-6 in the acylglycerides of mature gonads. In the phospholipids of mature gonads fed *Ulva*, there was a 30% increase of 18:3n-3, 13% increase of 20:4n-6 and 10% of 22:6n-3. In hepatopancreas, 22:6n-3 increased 51% in the reserves of *Ulva*-fed shrimp compared to controls. Carotenoids increased by 43% in gonads and five-fold in hepatopancreas of mature females fed with *Ulva*. The proportion of fucosterol and isofucosterol went from undetectable in controls to 0.3 and 0.2%, respectively, in shrimp fed with the algae. The phenolic compounds in the gonad were higher in the mature gonads compared to the immature, however, no significant differences were found in relation to the consumption of *Ulva*. Males fed with *Ulva* had less melanized spermatophores compared to controls (120 males or 1.9% vs. 233 males or 3.7%, $P<0.01$); Males fed with *Ulva* also had increased courtship activity (839 males 13.2% vs. 689 males or 10.8%, $P<0.01$) and a higher proportion of viable eggs (85.5% vs. 81.2%, $P<0.01$). No significant difference in male mortality was observed as a result of the diet. Males fed with *Ulva* had 50% less carbohydrates in hepatopancreas and 53% less carbohydrates in muscle, but more 20:4n-6 in the acylglyceride fraction of the

hepatopancreas (2.8 ± 0.2 vs. 2.2 ± 0.2 , a 27% increase, $P < 0.05$) and in the spermatophore (6.4 ± 0.3 vs. $5.7 \pm 0.2\%$, $P < 0.05$). The eggs and nauplii spawned by broodstock fed with *Ulva* had significantly higher protein values (55% more protein in eggs and 55% more in nauplii) and carotenoids (122% more in eggs and 36% in nauplii). The length (+12%) and width (+22%) of the nauplii and the diameter (+14%) of the eggs were significantly bigger in *Ulva* fed shrimp. In eggs, 18:3n-3 and 22:6n-3 increased 100% and 11% in the neutral fraction and 81% and 11% in the polar fraction, respectively. In lipid reserves, 20:4n-6 increased 18% and 20:5n-3 19% in shrimp fed *Ulva*. In nauplii, 18:3n-3, 20:4n-6 and 20:5n-3 of acylglycerides increased 150%, 24% and 20% in shrimp fed *Ulva*. In nauplii from shrimp fed with *Ulva*, dehydrocholesterol increased 3-fold and cholesterol decreased 10%. *Ulva clathrata* is a source of functional compounds (terpenes, sterols, fatty acids, flavonoids, polyphenolic compounds, pigments and sulphated polysaccharides) with diverse biological properties that act mainly on accumulation and transport of lipids during vitellogenesis and as antioxidants of important molecules in reproductive physiology. The supplementation of *Ulva clathrata* meal in the diet for broodstock is a viable and innovative strategy to improve the reproductive performance and quality of shrimp under commercial conditions.

1. INTRODUCCIÓN

México se encuentra entre los diez principales productores de alimentos pesqueros y acuícolas de alto valor en el mundo, ocupando el séptimo lugar a nivel mundial y el segundo lugar en el continente americano después de Ecuador. En el 2017, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) reportó que la producción de camarón fue de 146,835 toneladas por acuicultura, siendo una de las mayores industrias acuícolas en México (CONAPESCA, 2017). La actividad comercial de la camaronicultura inició en México en los años 80s; en aquel entonces, el cultivo estaba basado en la captura estacional de postlarvas silvestres de camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Villalón y Preis, 1993; Pérez-Castañeda et al., 2015). Pronto la necesidad de un aprovisionamiento predecible, constante y programado originó el desarrollo de laboratorios de maduración y producción de postlarvas. Sin embargo, en los años 90s las enfermedades virales produjeron cambios importantes en las operaciones de maduración, ya que se identificó que el uso de reproductores maduros capturados en medio silvestre y cultivados bajo condiciones de cautiverio, eran vectores potenciales de enfermedades (Chang et al., 1998; Lotz, 1997; Walker y Winton, 2010). Debido a esto se promovió el uso de reproductores domesticados a ciclo cerrado como una alternativa a los reproductores silvestres. En México, los pioneros en el uso de esta tecnología fueron la empresa Acuicultores de la Paz (APSA) en conjunto con el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), quienes lograron producir varias generaciones de reproductores (Ibarra et al., 1997). Con el tiempo, la utilización de reproductores domesticados bajo ciclo cerrado es una de las mejores alternativas para producir postlarvas de camarón, romper con las desventajas de los reproductores silvestres y permitir programas de mejoramiento genético.

Uno de los problemas críticos durante la reproducción en cautiverio es la alimentación, cuya calidad promueve la maduración sexual e influye en la fecundidad y la viabilidad de las larvas (Pérez, 2005). Sin embargo, siendo la alimentación un factor decisivo, los avances en el desarrollo de dietas para reproductores penaeidos han sido lentos. Actualmente, en la mayoría de los criaderos comerciales usan como alimento organismos marinos sin procesar, ya sean frescos o congelados. Estos incluyen

calamares, diversos moluscos (mejillones, ostras y almejas), poliquetos marinos, crustáceos como el langostino (Coman et al., 2007) y la biomasa de *Artemia* (Hoa et al., 2008). El éxito nutricional de estos ingredientes sobre los reproductores no ha sido del todo estudiado, pero se cree que está basado en su alto contenido de aminoácidos, ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), esteroides y posiblemente la presencia de sustancias con actividad hormonal (Wouters et al., 2002). Estos ingredientes son necesarios para asegurar la maduración y reproducción, pero presentan varias desventajas: son costosos, su disponibilidad es impredecible, deterioran la calidad del agua y su calidad nutricional puede variar con la especie, edad, época y lugar de captura. Por lo anterior, estos alimentos suelen ser complementados con dietas peletizadas o aditivos nutricionales como vitaminas, minerales y HUFA (Hoa et al., 2009). Actualmente, las dietas peletizadas utilizadas para reproducción de camarones a nivel comercial son utilizadas únicamente para sustituir sólo del 5 al 20% del alimento fresco, considerándose como ideal que el porcentaje de sustitución sea de al menos 50% de la dieta para obtener un impacto significativo sobre la disminución del costo (Wouters, 2000). Por otro parte, se ha demostrado que la suplementación de la dieta fresca con algas como *Spirulina* incluida dentro del calamar para reproductores *Fenneropenaeus indicus* (Regunathan y Wesley, 2006), o derivados de algas como alginato de sodio inyectado en el poliqueto en alimento para *Penaeus monodon* (Chung et al., 2011) mejoran algunos parámetros reproductivos como el número de nauplios por desove y la viabilidad. Sin embargo, aún se pueden realizar mejoras y proponer soluciones a la dieta fresca para maduración de *L. vannamei*, que es la principal especie de peneido cultivada en México (CONAPESCA, 2017).

Por otra parte, la macroalga *Ulva clathrata* presenta una serie de características atractivas al tener una composición bioquímica de macronutrientes, pero principalmente micronutrientes como: β -caroteno, xantofilas, luteína, zeaxantina, esteroides como isofucosterol y fucosterol, ácidos grasos n-3, compuestos fenólicos, polisacáridos sulfatados (ulvan), vitaminas: A, C, E y minerales quelados altamente biodisponibles (Peña-Rodríguez, 2011). Se ha propuesto que el incremento en crecimiento, pigmentación y respuesta inmune de los camarones en cultivo se deben a estos nutrientes (Cruz-Suárez et al., 2009b). El consumo de esta alga por juveniles de *L.*

vannamei modifica el perfil de lípidos y pigmentos corporales y produce una sobreexpresión de genes del hepatopáncreas involucrados en el metabolismo de lípidos y en procesos de oxidación (Elizondo-Reyna et al., 2016). En 2013, Corral-Rosales evaluó el efecto de incluir *Ulva* en la dieta fresca para maduración de reproductores de *L. vannamei* sin ablación peduncular y encontró que mejoró la calidad del agua e incrementó el número de nauplios por hembra y la tasa de eclosión y disminuyó la mortalidad, deformidad y los tiempos de metamorfosis en nauplios, mysis y protozoa. En el presente trabajo, se propone evaluar el efecto de la suplementación de *Ulva* en la dieta fresca para maduración sobre la capacidad reproductiva de reproductores ablacionados de *L. vannamei* bajo condiciones comerciales sobre criterios reproductivos, bioquímicos y morfológicos en reproductores, huevos y nauplios como parte de una estrategia viable de alimentación que mejore la dieta fresca para maduración de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Biología general de peneidos

2.1.1. Taxonomía

Los camarones peneidos pertenecen al filo más numeroso en el reino animal, el Artrópodo. El grupo es caracterizado por la presencia de apéndices pareados y una cutícula o exoesqueleto que cubre el cuerpo de todo el animal. El subfilo de los crustáceos está formado de 42,000 especies, predominantemente acuáticas, que pertenecen a 10 Clases; dentro de la clase malacostraca, los camarones, junto con cangrejos, langostas y jaibas pertenecen al orden de los decápodos.

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea (Brünnich, 1772)

Clase: Malacostraca (Latreille, 1802)

Orden: Decapada (Latreille, 1802)

Superfamilia: Penaeoidae (Rafinesque, 1815)

Familia: Penaeidae (Rafinesque, 1815)

Género: *Litopenaeus* (Pérez Farfante, 1969)

Especie: *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Taxonomía de los camarones peneidos (ITIS Report)

2.1.2. Morfología

Los camarones peneidos presentan las siguientes características morfológicas: tienen el cuerpo alargado y comprimido lateralmente. El cuerpo se divide en cefalotórax, abdomen y telson; en el cefalotórax se observan un par de pedúnculos oculares y un rostro de longitud variable con espinas que permiten diferenciar distintas especies. Además, en las partes laterales del caparazón, se encuentran surcos y carenas. El Cefalotórax y el abdomen llevan distintos tipos de apéndices articulados, formados por dos ramas: exopodito y endopodito (Boschi y Angelescu, 1962). La mayoría de los órganos, como son las branquias, hepatopáncreas y corazón, están localizados en el cefalotórax, mientras en el abdomen se concentran músculos, gónadas e intestino. Los apéndices del cefalotórax varían en apariencia y función: En la región cefálica, anténulas y antenas realizan funciones sensoriales. Las mandíbulas y los dos pares de maxilares forman la estructura mandibular que están involucradas en la alimentación (Solís, 1988). En la región torácica, los maxilípedos son los tres primeros pares de apéndices, modificados para manipular la alimentación, y los restantes cinco pares son los apéndices caminadores (pereiópodos). En el abdomen se concentran cinco pares de apéndices denominados pleópodos (Bell y Lightner, 1988; Baily-Brock y Moss, 1992).

2.1.3. Distribución

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México al Norte, hacia Centro y Sudamérica hasta Tumbes en

Perú, en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C (Dall et al., 1990; Medina-Reyna, 2001; Rodríguez et al., 2007). Sin embargo, debido a que es una especie introducida por acuicultura, actualmente encuentra en hábitats marinos tropicales de todo el mundo (Figura 1) (Senanan et al., 2010).

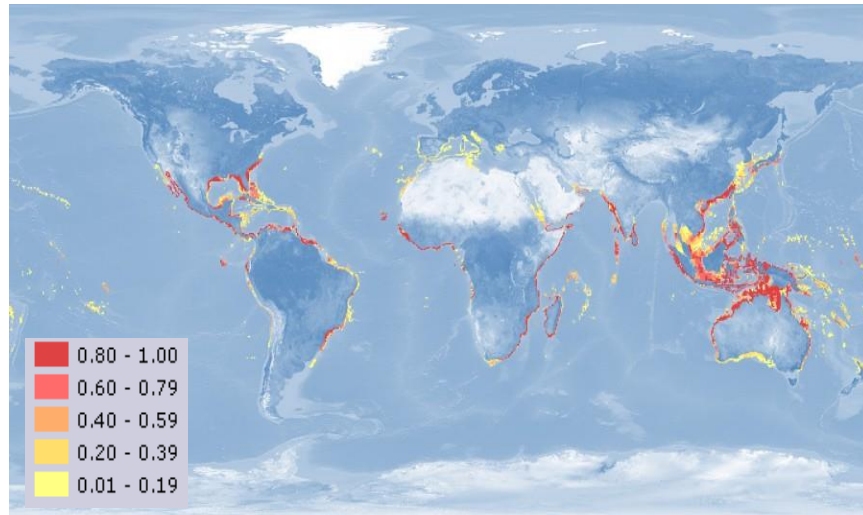


Figura 1. Hábitat natural e introducido de *L. vannamei*. Los colores del rango de distribución indican el grado de idoneidad del hábitat que puede interpretarse como probabilidades de ocurrencia (Aquamaps, 2016)

2.2. Reproducción de peneidos

Los machos y las hembras pueden diferenciarse por una serie de estructuras sexuales secundarias (Figura 2). El sistema reproductor en hembras consiste de los ovarios y oviductos. Los ovarios son cuerpos simétricos pareados fusionados principalmente de manera bilateral, presentan lobulaciones y se extienden desde la región cardiaca del estómago al telson (Browdy, 1992). Los oviductos se originan en la punta del sexto o séptimo lóbulo lateral y desciende al aparato genital externo hasta la coxa del tercer par de periópodos (Cummings, 1961). El télico está estructuralmente desarrollado en hembras de 34-42 mm de longitud y listo para recibir espermatóforos (Quinitio et al., 1993). El sistema reproductor masculino consiste de testículo, vaso deferente y petasma (Bauer y Cash, 1991)

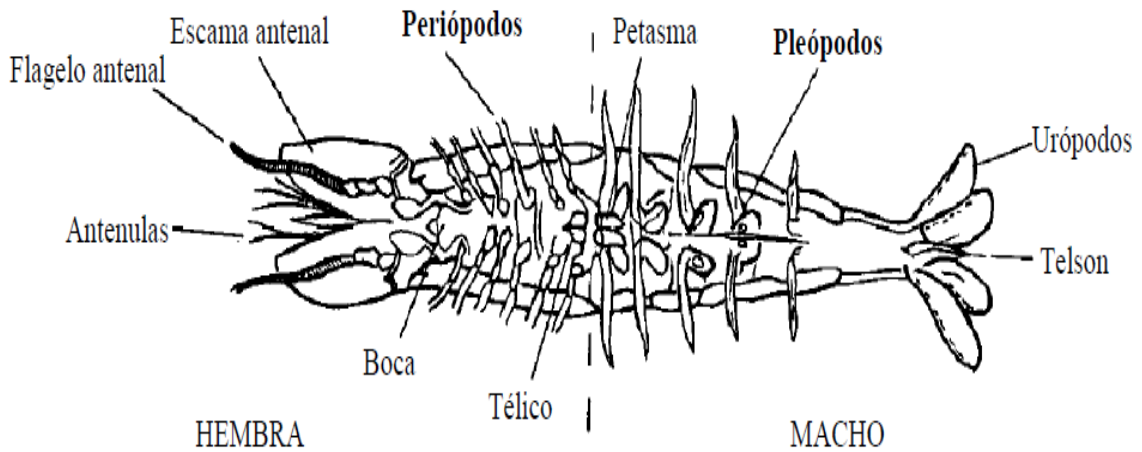


Figura 2.- Morfología del camarón, vista ventral donde se muestra la posición de las estructuras copuladoras de hembras y machos (Lee y Wickins, 1992)

Las hembras de camarón blanco tienen un sistema reproductor formado por un par de ovarios (Figura 3) que se extienden desde la región cardiaca del estómago hacia el telson, estos se encuentran formados por dos cuerpos fusionados en forma bilateral y simétrica, estos lóbulos se encuentran adjuntos al intestino (King, 1948). El télico es una modificación de la parte ventral del cefalotórax a la altura del tercer, cuarto y quinto par de pereiópodos en esta estructura es donde el macho deposita su espermatóforo (Quinitio et al., 1993). Se pueden distinguir hembras con dos tipos de télico: abierto y cerrado (Figura 4). En las hembras con télico cerrado (*Farfantopenaeus brasiliensis*, *P. monodon* y *P. japonicus*) se pueden observar en la parte ventral del cefalotórax receptáculos seminales, cubiertos con mayor grado por placas laterales donde el semen se almacena y protege hasta el tiempo de desovar. En las especies de télico abierto (*L. stylirostris* y *L. vannamei*), el cefalotórax tiene una serie de depresiones, sedas, espinas, etc. que permiten la adhesión del espermatóforo, carecen de receptáculos seminales. Las hembras de télico abierto copulan durante la intermuda, mientras que las hembras de télico cerrado solo pueden copular inmediatamente después de la muda, cuando su exoesqueleto este blando es decir inmediatamente después de la muda (Pérez-Farfante, 1975; Bauer, 1991; Browdy, 1992). El télico abierto no presenta placas, por lo que el espermatóforo queda colocado exteriormente entre el tercer y quinto par de pereiópodos, las hembras de télico abierto desarrollan los ovarios antes de haber

copulado y las de tético cerrado lo hacen después de copular, en estas últimas puede suceder que teniendo los ovarios desarrollados no copulen y desoven sin haberse apareado (Aquacop, 1977) (Figura 4).

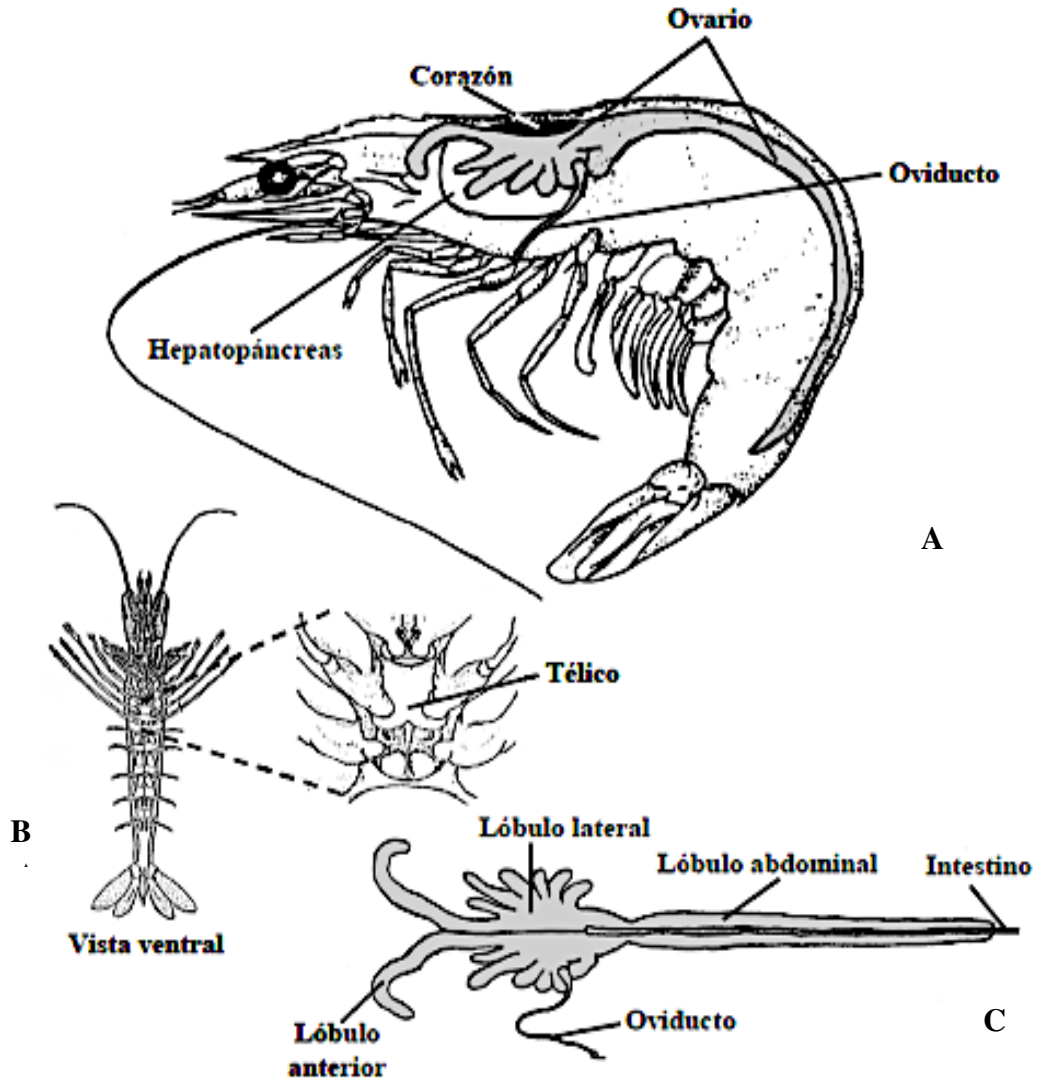


Figura 3. Sistema reproductor de hembras peneidas. Localización anatómica del sistema reproductor (A), localización del tético (B), vista dorsal del sistema reproductivo disectado de la hembra (C) (Alfaro, 2001)

2.2.1. Maduración gonádica y mecanismos endócrinos en hembras

La maduración gonádica implica una secuencia de eventos celulares (gametogénesis), bioquímicos (acumulación y transporte de nutrientes) y fisiológicos (control hormonal) concatenados para la producción de gametos, eventos que son más evidentes en el caso de las hembras, aunque no necesariamente más importantes que en machos.

La maduración en ovario es un proceso continuo, que para su estudio se divide en varios estadios de desarrollo en base a características morfocromáticas o histológicas (Yano, 1983; Tan-Fermin y Pudadera, 1989).



Figura 4. Hembras peneidos de téllico cerrado (A: *Farfantopenaeus brasiliensis*) y téllico abierto (B: *L. vannamei*). C: Hembra *L. vannamei* con espermatóforo adherido al téllico (Foto tomada por Corral-Rosales 2014, 2017 en el laboratorio de larvas Granmar (B) y en la unidad académica SISAL-UNAM: A)

Durante el proceso de maduración gonádica en hembras, el peso de los ovarios puede incrementarse de cuatro a nueve veces en aproximadamente una semana (Mourete y Rodríguez, 1991; Ravid et al., 1999; Wouters et al., 1999). El incremento de peso se debe a la acumulación de nutrientes en el vitelo (Wouters et al., 2001a; Racotta et al., 2003), el componente principal del huevo (Adiyodi, 1985; Serrano-Pinto et al., 2003), compuesto por lipo-glico-caroteno-proteínas, contiene los constituyentes químicos necesarios para la embriogénesis y la supervivencia de los huevos hasta que puedan alimentarse de forma independiente (Wouters et al., 2001b; Arcos et al., 2003; Racotta et al., 2003). Los lípidos se acumulan en los ovocitos durante la maduración temprana formando gotas lipídicas (Castille y Lawrence, 1989; Mohamed y Diwan, 1992; Spaargaren y Haefner, 1994), mientras que lipoproteínas son sintetizadas en el

hepatopáncreas con el aporte de reservas de otros tejidos y de la dieta y movilizadas como vitelogenina hacia la gónada, donde se almacenan como vitelo (Shafir et al., 1992; Tseng et al., 2001; Tsang et al., 2003), proceso llamado vitelogénesis. Los lípidos tienen un papel fundamental tanto como reserva energética (acilglicéridos), como en la construcción de membranas (fosfolípidos y colesterol) o en la síntesis de hormonas (colesterol). Los lípidos almacenados en el vitelo aseguran el desarrollo embrionario y constituye la reserva de la larva temprana, ya que los huevos y nauplios son lecitotróficos (reciben nutrientes desde el vitelo del huevo) y su desarrollo depende de las reservas bioquímicas transferidas por la hembra (Wouters et al., 2001b; Arcos et al., 2003; Racotta et al., 2003).

2.2.1.1. Evaluación de la maduración ovárica por método microscopio

La evaluación ovárica se ha reportado para varias especies de camarón. En camarón *L. vannamei* García et al. (1993) describe cuatro etapas de desarrollo ovárico: ovario tipo I, donde solamente se observa un tipo de ovocito (estadio de nucléolos cromáticos), ovario tipo II, dos tipos de ovocitos en el ovario (estadio I y II de gotas lipídicas), ovario tipo III, tres tipos de ovocitos (estadio de menor vitelo, estadio de gránulos de vitelo y estadio de pre-maduración) y ovario tipo IV, ovocitos completamente maduros. Tan-Fermín y Pudadera (1989) describe el desarrollo de los ovarios de acuerdo con el tipo de ovocitos en cuatro etapas de maduración: (I) ovocitos previtelogénicos, (II) ovocitos vitelogénicos tempranos o endógenos, (III) ovocitos vitelogénicos tardíos o exógenos, y (IV) ovocitos postvitelogénicos maduros con barras corticales.

El crecimiento de ovocitos en crustáceos se ha dividido en vitelogénesis temprana o endógena (síntesis de glicoproteínas endógenas) y vitelogénesis exógena o tardía, que es cuando el crecimiento se incrementa principalmente por la incorporación endocítica de material adicional (Charniaux-Cotton, 1985; Browdy, 1992; Van-Herp, 1992). La vitelogénesis endógena o acumulación de gotas lipídicas corresponde a los estadios I y II previtelogénicos mientras que la vitelogénesis exógena con acumulación de vitelo corresponde al estadio III o vitelogénico (Palacios et al., 2003).

2.2.2. Control endócrino

Se han descrito diversos centros endocrinos que son reguladores directos de la reproducción en el camarón. El primero es el sistema neurosecretor órgano X-glándula sinusal, localizado en el ganglio óptico; los otros son el cerebro, el ganglio torácico, el órgano mandibular, la glándula androgénica y los ovarios (Fingerman, 1987; Huberman, 2000; Alfaro, 2001). El órgano X/glándula sinusal constituye el principal centro de control endocrino en crustáceos: entre sus funciones está el control neuroendocrino del crecimiento, la maduración sexual, la muda y la regulación de la osmolaridad y el metabolismo en crustáceos. Está compuesta por un conjunto de terminaciones axonales que se agrupan para formar el órgano X (Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Laufer et al., 1988; Fingerman, 1995; Huberman, 2000; Subramoniam, 2000; Khalaila et al., 2002; Parnes et al., 2006). Los productos neurosecretorios producidos por estas células son almacenados en las terminaciones axonales y liberados mediante exocitosis (Kallen et al., 1990; Luschen et al., 1993). Se ha sugerido que las hormonas secretadas por este sistema están controladas por los transmisores/neuromoduladores dopamina, serotonina y encefalina (Ollivaux et al., 2006). En hembras el mecanismo propuesto para el control de la maduración gonadal es un modelo antagonista, el cual involucra la síntesis de una hormona inhibidora de la gónada (GIH, por sus siglas en inglés) que inhibe o compite con una probable hormona estimuladora de la gónada (GSH) que se localiza en el cerebro y ganglio torácico (Kulkarni y Nagabhushanam, 1980; Fingerman, 1987; Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Browdy, 1992; Kulkarni et al., 1992; Alfaro, 2001). Adicionalmente, el metilfarnesoato, también llamada la hormona juvenil del crustáceo, tiene una función estimulante en la reproducción en ambos géneros; esta hormona se sintetiza en la glándula del órgano mandibular (Laufer et al., 1987; Homola et al., 1991; Laufer et al., 1993; Sagi et al., 1994).

2.2.3. Sistema reproductor de machos peneidos

El sistema reproductor de machos de camarones del género *Litopenaeus* y la formación y estructura del espermatóforo de diferentes especies ha sido descrito por varios autores (Pérez- Farfante, 1975; Guitart et al., 1985; Ro et al., 1990; Chow et al., 1991). El

sistema reproductor en machos consiste de testículos pareados y vasos deferentes (Browdy, 1992) y una región muscular altamente dilatada llamada ámpula terminal dentro de la cual se termina de formar el espermatóforo estructura constituida por dos placas quitinosas en forma de vaina que cubren a la masa espermática (Browdy, 1992). Tiene además, dos placas laterales en su porción posterior para que el espermatóforo se fije al tético de la hembra, ayudado por una sustancia gelatinosa que lo acompaña cuando es expulsado (King, 1948; Pérez-Farfante, 1975; Ro et al., 1990). Además, el macho tiene una estructura especializada llamada petasma, cuya función es la transferencia del espermatóforo hacia el tético de la hembra (Pérez-Farfante, 1975) (Figura 5). Los espermatozoides dentro del espermatóforo se presentan como una masa viscosa y lechosa, no son motiles, son de forma esférica con una punta que se extiende desde la porción esférica (Browdy, 1992). El grado de madurez ha sido correlacionado con la estructura del petasma (Figura 5) y con los cambios histológicos que se producen en testes y ampollas terminales (Bray y Lawrence, 1992).

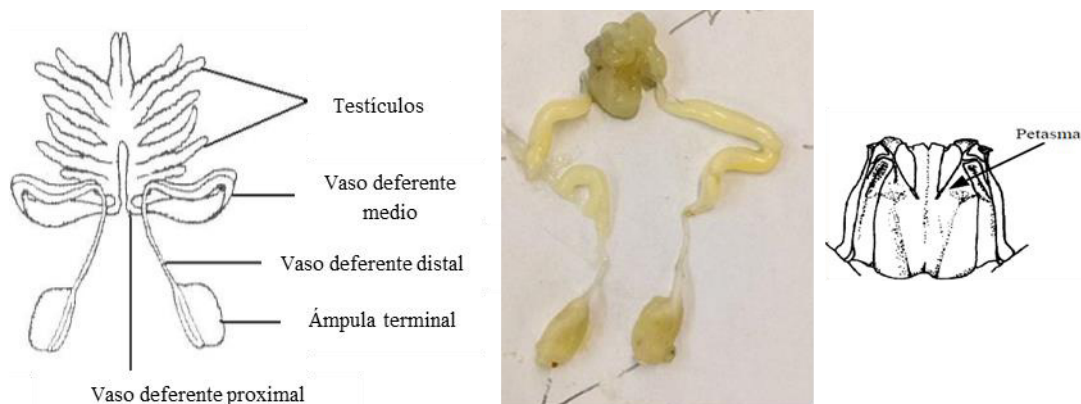


Figura 5.- Sistema reproductor interno masculino de camarones peneidos y petasma (Treece y Yates, 1988).

2.2.4. Maduración testicular y mecanismos endocrinos en machos

La maduración testicular en los crustáceos decápodos se controla desde el sistema nervioso central por la acción estimulante de la triptamina 5-hidroxi (5-HT), que estimula la liberación de GSH que activa la síntesis y liberación de la hormona androgénica (AGH) por la glándula androgénica. La AGH desencadena la maduración testicular y la espermatogénesis (Fingerman, 1997). La dopamina inhibe la maduración testicular mediante el bloqueo de la liberación de GSH y o estimula la liberación de

GIH (Fingerman, 1997). Alfaro (1993) describe que la maduración de los machos de *L. stylirostris* tiene al menos tres niveles independientes: El primero es la maduración de los testículos, los cuales producen células inmaduras (espermáticas). El segundo es la maduración de los vasos deferentes, en los cuales se completa la maduración de los espermatozoides con la formación del "spike". El tercer nivel es la síntesis del espermatóforo en las ámpulas terminales, donde el producto final se completa. La evaluación visual de maduración en el macho se ha basado en el tamaño de las ampollas terminales y se divide en tres estadios (Castille y Lawrence, 1991): I- Inmaduro; las ampollas terminales no son visibles a través del exoesqueleto; II- Desarrollo parcial; las ampollas terminales son pequeñas pero visibles a través del exoesqueleto; III- Maduro; las ampollas terminales son largas y claramente visibles a través del exoesqueleto. Todo este proceso está sujeto a diversos factores, entre ellos, el grado de desarrollo del animal (edad y tamaño), el ambiente, en particular las altas temperaturas, y la nutrición, que pueden afectar el proceso de maduración gonádica y por lo tanto la calidad espermática.

2.2.5. Cortejo sexual y apareamiento

Los camarones peneidos presentan un cortejo sexual previo al apareamiento; Yano et al. (1988) plantea que el cortejo sexual en *L. vannamei* lo conforman varios pasos: acercamiento, arrastre, persecución y apareamiento ventral (Figura 6).

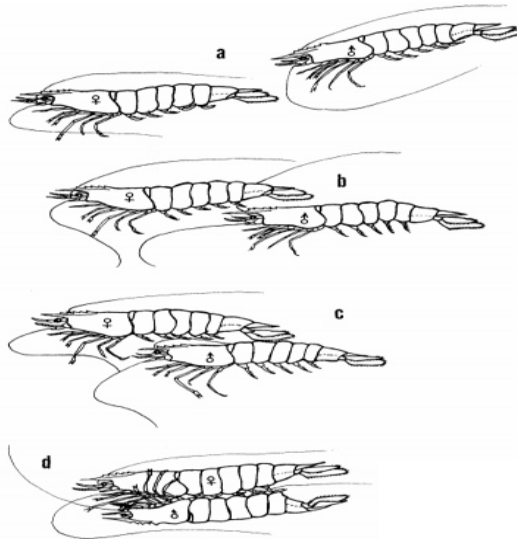


Figura 6. Secuencia de apareamiento en *Litopenaeus vannamei*; (a) persecución del macho; (b) nado paralelo; (c) copulación; (d) adhesión del espermatóforo en el téglico de la hembra. Tomado de Yano et al. (1988).

Una sola hembra puede ser perseguida por 2 a 3 machos a la vez. Si no se logra la transferencia de espermátóforos, el macho regresa inmediatamente a la posición vertical anterior, tratando de nadar paralelamente a la hembra. Luego, el macho vuelve de nuevo hacia el lado ventral y se adhiere a la hembra. Este comportamiento de apareamiento puede ser repetido de 2 a 3 veces con la misma hembra.

2.2.6. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de los camarones peneidos incluye varias fases que son encontradas en una variedad de hábitat (Figura 7). Las hembras maduras desovan un número variado de veces entre 250,000 y 700,000 huevos, dependiendo de la especie, el peso y el tamaño de la hembra (Quackenbush, 1986).

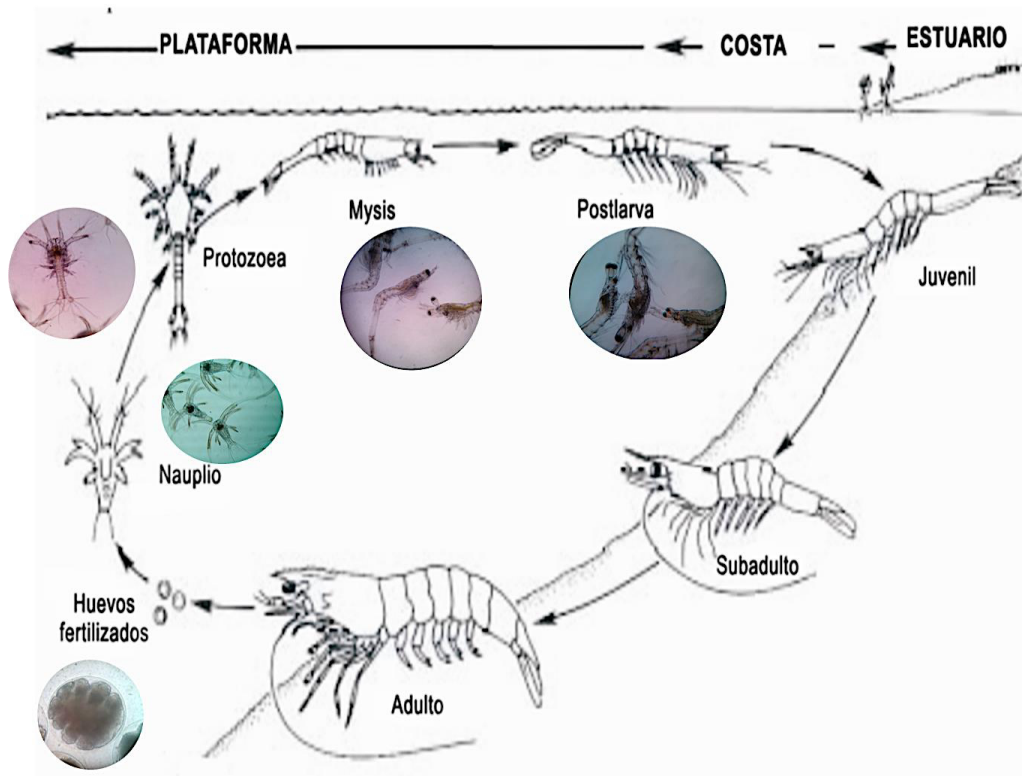


Figura 7. Ciclo de vida de camarones (Motoh, 1984, modificada por Corral-Rosales, 2019).

Los huevos eclosionan unas 16 horas después de la fertilización. Los estadios larvales comprenden el nauplio (6 fases, 2 días), que se alimenta de sus reservas por algunos días (desarrollo lecitotrófico); protozoa (3 fases, 5 días) que se alimentan de microalgas; mysis (3 fases, 4-5 días) que consumen algas y zooplancton; y postlarva (6

a 35 días) (García y Le Reste, 1987). Los estadios larvales habitan aguas superficiales ricas en plancton, con migración costera conforme crecen (Dall et al., 1990). La transición de juvenil a sub-adulto toma 135-255 días y la subsiguiente madurez sexual ocurre en los primeros diez meses (Motoh, 1984). Los juveniles prefieren áreas costeras con agua salobre y estuarios cubiertos de mangle. Los adultos migran al océano a zonas profundas donde se lleva a cabo la reproducción.

2.3. Reproducción en cautiverio

La primera reproducción en cautiverio de un peneido fue lograda en 1934, cuando Fujinaga logró desovar hembras maduras de *P. japonicus* y llevar a cabo el desarrollo larvario hasta juveniles (Weidner y Rosenberry, 1992). Sin embargo, no fue hasta principios de la década de los 70's cuando se logró exitosamente la maduración gonádica en cautiverio de *P. duorarum* (Caillouet, 1972) por medio de la aplicación de la técnica de manipulación endocrina conocida como ablación unilateral del tallo ocular, descubierta por Panouse (1943). El empleo de ablación ha tenido una contribución importante en el inicio de la domesticación de camarones, junto con las dietas naturales y adecuadas condiciones medio ambientales, con lo cual se ha logrado la maduración y desove de hembras con la producción de huevos viables, lo que ha permitido la obtención de generaciones en cautiverio sucesivas de varias especies de peneidos, cerrando así el ciclo (Aquacop, 1979, 1983; Ibarra et al., 1997). Los principales indicadores o criterios utilizados en la camaronicultura para evaluar el desempeño reproductivo y la calidad de su progenie (huevos y larvas) han sido divididos por algunos autores en cinco categorías principales: productivos, morfológicos, y bioquímicos (Bray y Lawrence, 1991; Bray y Lawrence, 1992; Fegan, 1992; Racotta et al., 2003; Vázquez-Boucard et al., 2004).

2.3.1. Criterios productivos de desempeño reproductivo

Los criterios productivos o el potencial reproductivo en hembras están asociados a las características que se pueden analizar en hembras y aquellas que se analizan en el desove, que son mucho más comunes a nivel de producción. Dentro de los criterios que se pueden agrupar para establecer la calidad del desove, están: la frecuencia de desoves, el número de huevos (fecundidad), el porcentaje de fertilización, el porcentaje de

eclosión, el número de nauplios, la composición bioquímica, la supervivencia larvaria durante el cultivo y después de pruebas de estrés (fototropismo, salinidad, etc.). Por ejemplo, se ha sugerido que nauplios con una fuerte tendencia a dirigirse hacia la luz (fototropismo positivo) son más viables y de mejor calidad (Villalón, 1991; Treece y Fox, 1993). La prueba de estrés de salinidad se basa en que las larvas más maduras migran hacia el mar y son más tolerantes a cambios de salinidad (Álvarez et al., 2004). El potencial reproductivo en machos suele ser evaluado mediante análisis de la calidad espermática, peso de espermátforo, conteo de espermátforo, viabilidad y normalidad de espermatozoides y regeneración de espermátforo (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987; Pratoomchat et al., 1993). Existen numerosos reportes donde evalúan y comparan el potencial reproductivo de camarones silvestres y domesticados, de varias especies bajo diferentes condiciones fisiológicas y de manejo durante un ciclo productivo (Cavalli et al., 1997; Palacios et al., 1999a; Peixoto et al., 2003; Racotta et al., 2003).

2.3.2. Criterios morfológicos de desempeño reproductivo

Dentro de esta categoría se encuentran el tamaño, la forma, la coloración, el peso, la ocurrencia de deformidades en gónadas y espermátforos de reproductores (Villalón, 1991; Bray y Lawrence, 1992; Treece y Fox, 1993), pero también de deformidades en el desarrollo embrionario y larvario, coloración del huevo, etc. Durante la maduración los cambios morfológicos se han asociado principalmente a los cambios en petasma y tético (Alfaro, 1993; Ceballos-Vázquez et al., 2003), así como los diversos cambios en la coloración durante el desarrollo gonadal, dado que, a nivel macroscópico, la maduración ovárica va acompañada de cambios de color y tamaño de la gónada, que son visibles a través del exoesqueleto de los camarones. Esto ha favorecido el desarrollo de diferentes escalas de maduración morfocromáticas con las que se puede asignar un estadio de madurez sin necesidad de un análisis microscópico (Yano, 1983; Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Palacios et al., 2003). Como consecuencia, son una herramienta útil en los laboratorios de maduración, pues se pueden asignar sin sacrificar a la hembra (Figura 8). En hembras el sistema comúnmente usado para evaluar la madurez del ovario, divide el desarrollo del ovario en cinco etapas (Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Castille y Lawrence, 1991):

Estadio 1.- Inmaduro; se observa los ovarios traslúcidos, sin pigmentación e invisible a través del exoesqueleto.

Estadio 2.- Inicio de la madurez; los ovarios se los observa largos, opacos, amarillosos a través del exoesqueleto (lóbulos anteriores y medios).

Estadio 3.- Los ovarios son visibles a través del exoesqueleto, el desarrollo de los lóbulos anteriores y medios es completo y el diámetro del lóbulo posterior es más grande que el intestino; su coloración es amarillo naranja.

Estadio 4.- Llegan a su punto de madurez, son claramente visibles a través del exoesqueleto y presentan un color café-oliva.

Hembra desovada- Después del desove los ovarios se observan flácidos, sin coloración y desgastados, como en estadio 1.



Figura 8. Evaluación visual del estado de maduración de la gónada de una hembra *L. vannamei*

2.3.3. Criterios bioquímicos de desempeño reproductivo

La dinámica de la composición bioquímica a lo largo de los estadios de maduración ha sido establecida por varios autores (Harrison, 1990; Mohamed y Diwan, 1992; Bray y Lawrence, 1992; Palacios et al., 2000). Asimismo, se han descrito los cambios bioquímicos como criterios de calidad durante el desarrollo lecitotrófico de los huevos y nauplios, es decir, cuando su estado de desarrollo depende de las reservas bioquímicas transferidas de la hembra (Racotta et al., 2003).

La bioquímica de las reservas y los cambios a través del tiempo ocasionados por el uso o la síntesis de componentes estructurales determinan una mayor calidad de las larvas e influyen directamente en el éxito del desarrollo embrionario y larvario (Holland, 1978; Fraser, 1989; Palacios et al., 2001). Particularmente, los lípidos y los triglicéridos han

sido usados como indicadores del estado nutricional y de la calidad de los desoves (Cahu et al., 1988; Lavens y Sorgeloos, 1991; Cahu et al., 1995; Palacios et al., 1999b).

2.3.4. Extirpación del pedúnculo ocular (ablación)

La ablación unilateral del pedúnculo ocular constituye la vía más común y efectiva para inducir la maduración ovárica y desove en muchas especies de camarones peneidos (Browdy, 1992). Se basa en la remoción por corte o laceración y vaciado de uno de los globos ópticos del pedúnculo ocular, lo cual resulta en la eliminación del complejo neurosecretor órgano X/glándula sinusal presente en esta estructura y responsable de la síntesis y liberación de la GIH (Figura 9).

Dado que la GSH se produce fuera del órgano X/glándula sinusal, la maduración queda estimulada. Esta técnica presenta como ventajas que favorece la maduración ovárica y el desove en aproximadamente el 60% de los camarones ablacionados (Treerattrakool et al., 2014), aumenta las tasas de crecimiento, peso ovárico e índice gonadosomático (Uawisetwathana et al., 2011), además de ser rápida, relativamente sencilla y poco costosa.

No obstante, presenta como desventajas que hay una disminución de otras hormonas, lo cual produce un desequilibrio metabólico en términos de concentración de glucosa, triglicéridos y proteínas de la hemolinfa (Sainz-Hernández et al., 2008), además de generar un gran estrés en el animal y las lesiones pueden dar lugar a infección y necrosis en el sitio del corte. Entre las consecuencias más evidentes están la disminución de la supervivencia de los reproductores y sus larvas, así como la cantidad de nauplios por desove, especialmente durante los primeros eventos de desove después de la ablación. Además, se ha reportado que este procedimiento acorta el ciclo de muda y afecta la respuesta inmune al alterar las concentraciones de varios metabolitos importantes en la modulación de la misma como la fenoloxidasas, producto de la reducción de la cantidad de otros neuropéptidos producidos en el órgano X/glándula sinusal (Uawisetwathana et al., 2011, Treerattrakool et al., 2014).

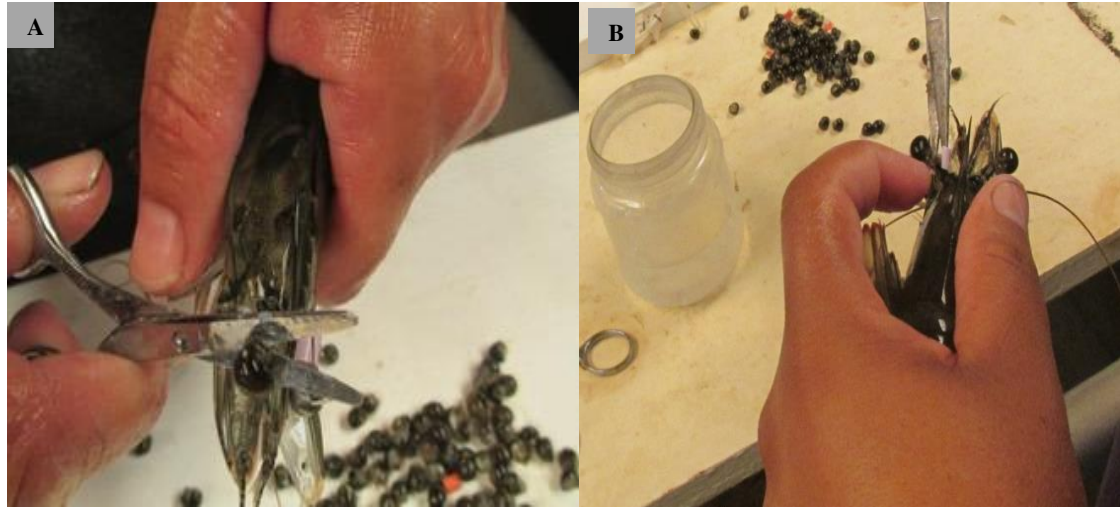


Figura 9. Ablación del pedúnculo ocular en hembras reproductoras *Litopenaeus vannamei*

2.3.5. Requerimientos nutricionales de reproductores penaeidos

La reproducción en los crustáceos conlleva movilización, biosíntesis y acumulación de nutrientes, principalmente del hepatopáncreas hacia las gónadas. La nutrición es un factor muy importante que promueve la maduración sexual e influye en la fecundidad y la viabilidad de las larvas. Las dietas usadas para la reproducción de peneidos deben ser suministradas de forma fresca o congelada, ricas fundamentalmente en proteínas y ácidos grasos polinsaturados (Bray et al., 1990; Harrison, 1990; Browdy, 1992; Wouters et al., 2001a). En la Tabla 1 se muestran investigaciones donde se evalúan diferentes aditivos en regímenes alimenticios sobre la capacidad reproductiva, la calidad del desove y de las larvas en penaeidos.

Una de las dificultades para formular dietas de maduración para peneidos, ha sido que los requerimientos nutricionales son diferentes para cada especie (Rosas et al., 1996). Evaluando la respuesta reproductiva en relación al régimen alimenticio, se ha reportado que en *L. vannamei* se obtienen mejores resultados con una dieta natural combinada, mientras que en *L. stylirostris* los mejores resultados se obtienen con una dieta peletizada (Galgani et al., 1989).

Tabla 1. Evaluaciones de diferentes aditivos en regímenes alimenticios sobre la capacidad reproductiva y la calidad del desove y de las larvas en peneidos

| Especie | Componente | Efecto | Autor |
|----------------------|---------------------|--|------------------------------|
| <i>P. monodon</i> | Carotenoides | Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación, aumenta el conteo de espermias | Quinitio et al. (1996) |
| <i>P. monodon</i> | ARA, EPA y DHA | Incrementan el número de huevos fertilizados y la tasa de eclosión | Millamena, (1989) |
| <i>P. monodon</i> | Astaxantina y HUFA | Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación | Paibulkichakul et al. (2008) |
| <i>P. monodon</i> | ARA, EPA y DHA | Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación | Nguyen et al. (2009) |
| <i>P. monodon</i> | ARA | Aumenta los desoves por hembra y el número de huevos por desove | Coman et al. (2011) |
| <i>P. monodon</i> | ARA | Mejora el desarrollo del huevo | Coman et al. (2011) |
| <i>L. vannamei</i> | Fosfolípidos y HUFA | Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación | Cahu et al. (1994) |
| <i>L. vannamei</i> | ARA | Mejora los tiempos de metamorfosis de nauplios a zoea y aumenta la tolerancia a diferentes salinidades | Xu et al. (2017) |
| <i>P. indicus</i> | Vitamina C y E | Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación | Cahu et al. (1995) |
| <i>P. esculentus</i> | Carotenoides | Mejor rendimiento reproductivo, la tasa de eclosión e incrementa el contenido de astaxantina en el ovario. | Dall et al. (1995) |
| <i>E. sinensis</i> | Fosfolípidos y HUFA | Incrementan los huevos fertilizados y tasas de eclosión | Wu et al. (2007) |

ARA: ácido araquidónico (20:4n-6); EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ácido docosaheptaenoico (22:6n-3)

Los HUFA (Cahu et al., 1994; Gonzalez-Felix y Perez-Velazquez, 2003), fosfolípidos (Cahu et al., 1994; Wouters et al., 1999; Wouters et al., 2001b) y colesterol (Kanazawa et al., 1988) son considerados lípidos esenciales en la dieta para maduración. También, se ha reportado que los carotenoides tienen efectos positivos sobre la maduración en crustáceos e incrementan la supervivencia en las larvas (Dall et al., 1995; Palacios et al., 1999b; Wouters et al., 1999a). Probablemente los efectos de los carotenoides puedan ser atribuidos a las propiedades antioxidantes (Wyban et al., 1997) o a su papel como precursores de la vitamina A (Dall et al., 1995). En la Tabla 2 se muestran algunos requerimientos nutricionales para maduración de penaeidos.

Tabla 2. Requerimientos nutricionales para maduración de penaeidos (valores expresados en % de la dieta, base seca)

| Especie | Ingrediente | % | Autores |
|-----------------------|---------------|-------|------------------------------|
| <u>Télico abierto</u> | | | |
| <i>L. vannamei</i> | ARA* | 4.6 | Xu et al. (2017) |
| <i>L. vannamei</i> | Fosfolípidos | 2.0 | Cahu et al. (1994) |
| <i>L. vannamei</i> | Vitamina E** | 350.0 | Du et al. (2006) |
| <u>Télico cerrado</u> | | | |
| <i>P. monodon</i> | Colesterol | 1.0 | Paibulkichakul et al. (2008) |
| | Vitamina A | 0.04 | |
| | Vitamina C | 0.06 | |
| | Vitamina E | 0.02 | |
| | ARA* | 1.7 | |
| | EPA* | 7.1 | |
| <i>P. monodon</i> | Proteína | 52.0 | Yong Seok Kian et al. (2004) |
| | Lípidos | 14.2 | |
| | Carbohidratos | 15.7 | |
| | Cenizas | 10.2 | |
| <i>P. monodon</i> | Proteína | 65-64 | Hoa et al. (2009) |
| | Lípidos | 14-18 | |
| <i>P. monodon</i> | Colesterol | 1.0 | Paibulkichakul et al. (1998) |
| | Lecitina | 0.5 | |
| <i>P. chinensis</i> | Colesterol | 0.5 | Xu et al. (1994) |
| | Vitamina C | 1.0 | |
| | ARA* | 0.8 | |
| | EPA* | 8.40 | |
| | DHA* | 6.7 | |
| <i>P. chinensis</i> | Vitamina A** | 60.0 | Mengqing et al. (2004) |

*% del total de ácidos grasos; ** mg kg⁻¹

2.3.5.1. Pérdida de calidad en alimentos congelados.

Los alimentos utilizados para reproductores son generalmente mariscos frescos que son congelados para su almacenamiento (Galgani et al., 1989; Cavalli et al., 1997), por lo que su valor nutricional puede deteriorarse a causa de: lixiviación (Álvarez et al. 1989), pérdidas de humedad por sublimación, absorción y redistribución de la humedad en los alimentos o sus componentes, recristalización del hielo y las pérdidas por goteo que se dan durante la descongelación (Franks, 1983; Conchillo et al., 2005). Por otro lado, la congelación detiene el crecimiento de los microorganismos, pero dado que el proceso no destruye a todos los tipos de vida microbiana, aquellos que sobreviven se reaniman en la comida al descongelarse (Alzate, 2008). Por otra parte, el principal proceso

perjudicial que tiene lugar durante el almacenamiento por congelado es la oxidación de lípidos (Bhattacharya et al., 1988; Farouk et al., 1988). Estas reacciones oxidativas se inician en los fosfolípidos altamente susceptibles que contienen membranas, que contienen cantidades relativamente grandes de HUFA (Higgins et al., 1998) y que pueden producir compuestos que afectan negativamente la calidad del alimento (Conchillo et al., 2005).

2.4. Algas verdes

Las algas verdes, pertenecientes a la clase Chlorophyta pueden definirse como clorofitas que no tienen los gametangios rodeados por una envoltura estéril de células. Es un grupo muy heterogéneo de algas con clorofila a y b, algunas xantófilas tales como luteína, violaxantina, neoxantina y enteroxantina; con esta composición de pigmentos el cuerpo del alga se ve verde, lo que permite una fácil identificación en terreno. Una característica biológica importante de este grupo es el almidón que almacenan como material de reserva en sus células (Santelices, 1989). Las algas verdes se encuentran en playas arenosas y rocosas. La mayoría de ellas pueden tolerar baja salinidad y colonizarán áreas donde los ríos se encuentran con el mar. Algunas algas verdes como *Codium* y *Ulva* (anteriormente *Enteromorpha*) se usan comúnmente como fuentes alimenticias (Ferreira-Rodríguez, 2016). *Ulva clathrata* (también conocida como *Enteromorpha clathrata*) es un alga verde de la familia Ulvaceae, cuya distribución es mundial (Hayden et al., 2003). Es de talo laminar, tubular, más estrecho en la zona basal y formado por dos capas de células, mide hasta 40 cm de largo. *Ulva* tiene un gran potencial para el desarrollo de cultivo (Figura 10) debido a sus características de rápido crecimiento y de tolerancia ante un rango amplio a salinidad y temperatura (Moll y Deikman, 1995).

2.4.1. Composición química y valor nutricional de algas del genero *Ulva*

Las especies de *Ulva* tienen una composición química interesante que las hace ser atractivas para su explotación comercial y han sido utilizadas para innumerables productos comestibles para consumo humano y animal (Critchley, 2004). El contenido proteico en *Ulvaceas* puede variar de 7 a 29% de proteína en base seca (Tabla 3) y el contenido de lípidos oscilar entre 0.2 a 5.6%, esto puede variar dependiendo de las

condiciones de cultivo, la cosecha y la estación del año (Wong y Cheung, 2000; Kirby, 2001; Frikha et al., 2011). Peña-Rodríguez y col. (2011) reportan para *U. clathrata* de 20 a 26% de proteína, siendo la tercera parte compuesta de aminoácidos esenciales. Los principales monosacáridos en *Ulva* son ramnosa (36-40%), ácidos urónicos (27-29%), xilosa (10-13%) y glucosa (10-16%), y el contenido de fibra dietética total es de 26 a 41%. Los ácidos grasos saturados corresponden de 31-51% y PUFAS 13-33%, el contenido de carotenoides oscila entre 358-169 mg kg⁻¹ dw. Además, es rica en Ca (9-19 g kg⁻¹), Fe (0.6- 4.2 g kg⁻¹), Cu (44-14 mg kg⁻¹), Zn (93-17 mg kg⁻¹) y As (2-9 mg kg⁻¹).



Figura 10. Cultivo de macroalga *Ulva clathrata* (imagen tomada de Aonori Aquafarms)

Tabla 3. Composición bromatológica de algas del genero *Ulva* (valores expresados en % peso seco).

| Especie | Localidad | C | P | L | F | CHO | Autores |
|---------------------|---------------------|------|------|-----|------|------|-------------------------------|
| <i>U. rígida</i> | Golfo de Gabes | 25.7 | 7.3 | 0.8 | | 36.7 | Frikha et al. (2011) |
| <i>U. fasciata</i> | Brasil | 20.6 | 13.3 | 1.9 | 10.8 | 53.3 | Pádua et al. (2004) |
| <i>U. lactuca</i> | Guaraqueaba, Brasil | 12.5 | 18.3 | 1.7 | 9.6 | 57.6 | Pádua et al. (2004) |
| <i>U. lactuca</i> | La Paz, BCS | 24.3 | 10.7 | 0.2 | 4.8 | 30.9 | Castro-González et al. (1996) |
| <i>U. clathrata</i> | San Quintín BCS | 18.6 | 27.2 | 1.1 | 5.4 | 47.8 | Cruz-Suárez et al. (2009b) |

C: ceniza; P: proteína; L: lípidos; F: fibra; CHO: carbohidratos

Se sabe que las *Ulvas* tienen alto contenido de minerales, más del 30 por ciento del peso seco de las algas marinas es ceniza. Las algas contienen diiodotirosina que es precursor de las hormonas tiroideas esenciales tiroxina y triiodotironina (Chandini et al., 2008). Todas las algas del genero *Ulva* ofrecen un nivel elevado de potasio que es muy similar a nuestro nivel plasmático natural siendo fuentes recomendadas para disminuir la hipertensión (Fleurence et al., 1995; Chandini et al., 2008).

La mayoría de las algas contienen grandes cantidades de vitaminas B1 y B2 (Matsuno, 2001). En *Ulva clathrata*, los principales carotenoides son β -caroteno, xantofilas, luteína y zeaxantina (Cruz-Suárez et al., 2009b; Peña-Rodríguez et al., 2011; Cruz-Suárez et al., 2013). Estos carotenoides tienen efectos beneficiosos al actuar como antioxidantes.

Tabla 4. Compuestos funcionales con propiedades biológicas en algas del genero *Ulva*

| Compuestos | Propiedades | Autores |
|---|--|--|
| Polisacáridos: ulvan | -Antihiperlipidémicos, antiviral, antitumoral, antioxidante. -Inmunoestimulante: estimulan la secreción de macrófagos de PGE2 e inducen un aumento en la expresión de COX-2; estimula la desgranulación hemocítica y activa la profenol oxidasa para ser convertida en fenol oxidasa | (Qi y Sun 2015; Qi y Sheng, 2015; Thanh et al., 2016; Yaich et al., 2017; Morelli et al., 2017; Pangestuti, y Kurnianto, 2017; Sun y Sheng, 2018) |
| Carotenoides: β -caroteno xantofilas luteína zeaxantina | -Antioxidantes (actúan contra el daño oxidativo en procesos de oxidación) -Reguladores en la señalización celular y precursores -Antioxidantes en el proceso de peroxidación lipídica. | (Polyakov et al., 2001; Guerin et al., 2003; Cruz-Suárez et al., 2009b; Johnson, 2014; Zhong et al., 2015) |
| Compuestos polifenólicos: Ácido ascórbico Fenoles Flavonoides | -Antioxidantes (inhiben o suprimen la generación de radicales libres) -Antidiabéticos (modulan el estrés oxidativo inducido por glucosa, inhiben enzimas digestivas del almidón) -Anticancerígenos (inhiben la proliferación de las células cancerosas e influyen en las respuestas antiinflamatorias; reguladores en la señalización celular, la actividad genética, la modulación de la respuesta inmune y la inducción de la apoptosis) | (Celikler et al., 2009; Godard et al., 2009; Hassan et al., 2011; Rodríguez et al., 2011; Ambreen et al., 2012; Yildiz et al., 2012; Farasat et al., 2014) |
| Terpenos Esteroles (fucosterol) | -Antibacterianos (actividades inhibitoras contra patógenos bacterias y hongos) -Antioxidantes (inhiben o suprimen la generación de radicales libres) | (Lu et al., 2008; Chakraborty et al., 2010; Yung et al., 2011; Trigui et al., 2013; Pushparaj et al., 2014) |

2.4.2. Compuestos funcionales con propiedades biológicas en algas del género *Ulva*

Las algas marinas se consideran una fuente de compuestos bioactivos, ya que son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios con un amplio espectro de aplicaciones (Smit, 2004). La Tabla 4 muestra algunos compuestos funcionales en algas del genero *Ulva*. Estudios recientes se han centrado en las actividades biológicas y en los metabolitos secundarios de las algas marinas. Debido a su gran potencial en el desarrollo de nuevos productos para el consumo humano y animal, se ha evaluado el uso de algas y/o sus derivados en dietas para especies de interés acuícola (Tabla 5).

Tabla 5. Uso de algas y sus derivados en dietas para especies de interés acuícola.

| Alga/ derivado | Especie | Nombre común | Resultado | Autor |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------|--|-------|
| Harina de <i>Ulva</i> sp. | <i>D. labrax</i> | Lubina | En crecimiento: <i>Ulva</i> modifica la tasa metabólica de la lubina, el sistema inmune innato y las respuestas antioxidantes | 1 |
| Harina de <i>U. clathrata</i> | <i>L. vannamei</i> | Camarón blanco | En crecimiento: <i>Ulva</i> aumenta el crecimiento y mejora la tasa de conversión del alimento balanceado, aumenta el contenido de pigmentos carotenoides en camarón | 2 |
| Harina de <i>U. clathrata</i> | <i>L. vannamei</i> | Camarón blanco | En reproducción: <i>Ulva</i> mejora el rendimiento reproductivo en términos de más número de huevos por desove, aumento en la tasa de fertilización y la tasa de eclosión. | 3 |
| Harina de <i>U. clathrata</i> | <i>L. vannamei</i> | Camarón blanco | En reproducción: <i>Ulva</i> estimula la vitelogénesis avanzada, aumenta la acumulación de lípidos en las gónadas, y disminuye el agotamiento reproductivo durante la producción. | 4 |
| ulvan (<i>U. clathrata</i>) | <i>Oreochromis niloticus</i> | Tilapia del Nilo | En crecimiento: La suplementación de ulvan en la dieta contribuye a un aumento en la respuesta inmune de la tilapia del Nilo. | 5 |
| ulvan (<i>U. ohnoi</i>) | <i>Salmo salar</i> | Salmón del Atlántico | En crecimiento: La suplementación de ulvan modifica el metabolismo lipídico principalmente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (n-3 PUFA). | 6 |
| <i>U. clathrata</i> fresca | <i>L. vannamei</i> | Camarón blanco | En crecimiento: <i>Ulva</i> mejora la digestibilidad aparente de la proteína de la dieta, tiene un efecto promotor del crecimiento y aumenta la pigmentación de los camarones | 7 |
| <i>U. clathrata</i> fresca | <i>L. vannamei</i> | Camarón blanco | En crecimiento: <i>Ulva</i> produce una sobre-expresión de genes del hepatopáncreas involucrados en el metabolismo de lípidos, respuesta inmune, y procesos de oxidación | 8 |
| <i>Spirulina</i> | <i>F. indicus</i> | Camarón de la india | En reproducción: aumento los pigmentos en los huevos y en las larvas, mejoró la calidad del desove (número de desoves, número de nauplios por desove, y viabilidad de los nauplios). | 9 |
| Alginato de sodio | <i>P. monodon</i> | Camarón tigre | En reproducción: mejora el rendimiento reproductivo de y aumenta la supervivencia en larvas. | 10 |

Peixoto et al., 2016¹, Cruz-Suárez et al., 2010², Corral-Rosales et al., 2018a³, Corral-Rosales et al., 2018b⁴, Quezada-Rodríguez y Fajer-Ávila, 2017⁵, Norambuena et al., 2015⁶, Peña-Rodríguez, 2011⁷, Elizondo-Reyna et al., 2016⁸, Regunathan y Wesley 2006⁹, Chung et al., 2011¹⁰

3. JUSTIFICACIÓN

El suministro de semilla de camarones *L. vannamei* es un paso determinante en la industria camaronícola. La tecnología para su reproducción en cautiverio se encuentra desarrollada, sin embargo hasta la fecha, las prácticas de maduración establecidas en los laboratorios de producción son las mismas de hace 25 años. No se ha logrado usar alimentos inertes, que son más fáciles de almacenar y formular, con resultados similares a los frescos, por lo que se siguen usando alimentos congelados (i.e. calamar, poliquetos, mejillones) y esto incrementa considerablemente los costos y produce una serie de problemas a nivel de abasto y calidad de los ingredientes. El presente trabajo tiene como objetivo incluir en la dieta fresca para maduración harina de *Ulva clathrata*, una macroalga verde relativamente económica comparada con la dieta fresca, fácil de agregar en la dieta, con menor riesgo de enfermedades ya que se encuentra en forma de harina, y al ser de cultivo su calidad nutricional es poco variable y su disponibilidad es sostenida. Debido a sus propiedades nutraceuticas y a sus efectos benéficos descritos en otros organismos, nuestra expectativa es que la inclusión de esta alga mejore la calidad reproductiva y el desove de hembras y machos *Litopenaeus vannamei*. Se espera que el conocimiento generado será útil para la industria acuícola del camarón, fortalezca las líneas de investigación de científicos que trabajan con nutrición y tecnología de alimentos para camarón y permita validar la funcionalidad de nuevos aditivos alimentarios derivados de algas marinas. De ser así, esto generará nuevo conocimiento de aplicación de un ingrediente natural que no es fragmentado o purificado y trabaja de manera sinérgica con todos sus componentes y que puede originar nuevos formulados de dietas inertes. En su aplicación, permitirá trabajar con menor gasto de infraestructura y tener una producción sostenida de postlarva, con beneficios económicos redituables.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis general

El desempeño reproductivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* mejorará con la incorporación de *Ulva clathrata* en la dieta fresca para maduración.

Hipótesis particulares

- La inclusión de *U. clathrata* en la dieta para maduración mejorará la producción de larvas de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones comerciales, independientemente de la ablación.
- El consumo de *Ulva clathrata* estimulará la acumulación de nutrientes en gónada y con ello, el crecimiento y la maduración de los ovocitos y disminuirá el agotamiento reproductivo de hembras *L. vannamei* bajo condiciones de producción comercial.
- La inclusión de *U. clathrata* en la dieta incrementará la movilización de ácidos grasos, esteroides y carotenoides desde el hepatopáncreas hacia la gónada de hembras *L. vannamei*.
- La inclusión de *U. clathrata* en la dieta disminuirá la melanización del espermatóforo y modificará el perfil lipídico y antioxidante de hepatopáncreas, músculo y espermatóforos de machos *L. vannamei* bajo condiciones de producción comercial.
- La inclusión de *U. clathrata* en la dieta incrementará el tamaño de huevos, la fecundidad y la eclosión, al incrementar la acumulación de ácidos grasos esenciales en fosfolípidos de huevos, mejorando la calidad del desove de *L. vannamei* bajo condiciones de producción comercial.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inclusión de *Ulva clathrata* deshidratada en dietas frescas para reproductores de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sobre el desempeño reproductivo y el desarrollo gonadal.

Objetivos particulares

- Evaluar los efectos de la suplementación de dietas frescas para reproductores con harina de *U. clathrata* sobre el desempeño reproductivo de *L. vannamei* bajo condiciones de producción comercial durante 45 días (Capítulo 1).
- Determinar el efecto del consumo de *Ulva clathrata* sobre la vitelogénesis, la composición bioquímica y el agotamiento reproductivo de hembras *L. vannamei* bajo condiciones de producción comercial durante 45 días (Capítulo 2)
- Evaluar el efecto del consumo de *U. clathrata* sobre el perfil ácidos grasos, esteroles y carotenoides de gónadas, hepatopáncreas y músculo de hembras *L. vannamei* bajo condiciones de producción comercial durante 45 días (Capítulo 3).
- Evaluar el efecto del consumo de *U. clathrata* sobre la melanización del espermatóforo, las reservas bioquímicas y el perfil lipídico y antioxidante de hepatopáncreas, músculo y espermatóforos de machos *L. vannamei* bajo condiciones de producción comercial durante 45 días (Capítulo 4).
- Evaluar el efecto del consumo de *U. clathrata* sobre la calidad del desove (Capítulo 5).

CAPÍTULO 1

6. Capacidad reproductiva de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en relación a las dietas de maduración suplementadas con harina de *Ulva clathrata*

Artículo: Corral-Rosales, D. C., Palacios, E., Ricque-Marie, D., y Cruz-Suárez, L. E. (2018). Enhancement of reproductive performance in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) by supplementation of *Ulva clathrata* meal in maturation diet in two commercial hatcheries. *Aquaculture Research*, 49(2), 1053-1059.

<https://doi.org/10.1111/are.13554>

Anexo 1.

Nota: En este artículo se reportaron los resultados zootécnicos realizados en dos experimentos, el primero realizado en el transcurso de la tesis de licenciatura, y el segundo durante la tesis de doctorado. En el presente capítulo de la tesis de doctorado se reportarán solo los resultados obtenidos en el segundo experimento. Este segundo experimento permitió corroborar el efecto de la suplementación con *Ulva* como un primer paso, y sobretodo realizar muestreos extensos y los análisis bioquímicos correspondientes cuyos resultados se reportaron en artículos subsecuentes, que permiten elucidar los posibles mecanismos de los efectos reportados aquí.

6.1. Resumen

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la suplementación de harina de alga *Ulva clathrata* (20 g kg⁻¹) en la fracción del calamar de una dieta fresca formulada, sobre el rendimiento reproductivo en reproductores *Litopenaeus vannamei* con ablación unilateral bajo condiciones de producción comercial. Los resultados mostraron que la mortalidad diaria en hembras fue mayor ($P < 0.01$) para el grupo control en comparación con el grupo alimentado con *Ulva*. Adicionalmente, no se encontraron diferencias en la mortalidad de machos. Los reproductores alimentados con *Ulva* produjeron más huevos (un aumento de +5% en comparación con el control, $P < 0.05$) y nauplios por hembra (+18%, $P < 0.01$). Las tasas de eclosión aumentaron en los reproductores alimentados con *Ulva* en la dieta (+13%, $P < 0.001$). El número de desoves por día tuvo una tendencia a ser mayor en los reproductores alimentados con *Ulva*, pero la diferencia no alcanzó significancia estadística (+14%). Concluimos que la inclusión de *Ulva* como un aditivo funcional en las dietas para maduración de *L. vannamei* mejora el rendimiento reproductivo a escala comercial.

6.2. Introducción

Mejorar la capacidad reproductiva de adultos domesticados *Litopenaeus vannamei* es un desafío constante para los laboratorios comerciales de producción de postlarvas de camarón. Por lo general, la maduración y el desove en estos laboratorios se logran después de la ablación unilateral del tallo ocular, que es el centro endocrino más importante del camarón y donde se secreta la hormona inhibidora de la gónada (Vaca y Alfaro, 2000), consecuentemente, los organismos ablacionados presentan un agotamiento reproductivo que culmina en una calidad y número de desoves deficientes al finalizar la temporada de reproducción. Por otra parte, se ha reportado que la viabilidad del desove puede ser mejorada por la calidad de la alimentación suministrada a los reproductores durante la maduración (Bray y Lawrence 1990; Wouters et al., 2001a). En la actualidad, la alimentación comúnmente utilizada para la maduración de reproductores en laboratorios comerciales es a base de una mezcla de invertebrados frescos congelados como calamar, poliquetos, mejillones, krill, *Artemia* (camarón de salmuera), etc. lo cual incrementa considerablemente los costos de producción

(Chamberlain y Lawrence, 1981; Galgani y AQUACOP, 1989; Cahu et al., 1994). El éxito de estos ingredientes frescos ha sido atribuido a su alto contenido de HUFA, fosfolípidos, pigmentos, esteroides, aminoácidos, y vitaminas (Chamberlain y Lawrence, 1981; Hoa et al., 2009). Desafortunadamente, las variaciones temporales, la conservación inapropiada, las deficiencias en su procesamiento y la distribución deficiente pueden afectar su composición nutricional. Estos problemas han sido parcialmente solucionados usando aditivos (Chimsung, 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que la suplementación de dietas frescas con micronutrientes como la vitamina C y E, astaxantinas u otros pigmentos, HUFA y colesterol mejora el desempeño reproductivo y la calidad del desove (Teshima et al., 1988; Alava et al., 1993; Cahu et al. 1994; Cahu et al., 1995; Dall, 1995; Wouters et al., 2001b; Palacios et al., 2004; Du et al., 2006; Hoa et al. 2009; Coman et al., 2011). Otros estudios han demostrado que la suplementación de dietas frescas con *Spirulina*, paprika, biofloc o con alginato, mejoran el desempeño reproductivo del camarón y la calidad de las larvas (Wyban et al., 1997; Regunathan y Wesley 2006; Chung et al., 2011; Emerenciano et al., 2013; Cardona et al., 2016). Nuestra hipótesis es que la macroalga verde *Ulva clathrata* puede ser un buen aditivo en dietas frescas para maduración debido a que presenta una composición bioquímica de macro, pero principalmente micronutrientes que individualmente se ha mostrado que mejoran la capacidad reproductiva, como carotenoides (300-400 mg kg⁻¹ dw, principalmente β-caroteno, xantofilas, luteína, zeaxantina), esteroides, ácidos grasos omega 3 y otros nutrientes que tienen actividades antioxidantes, como los compuestos fenólicos, polisacáridos sulfatados (ulvan) y vitaminas (A, C, E) (Cruz-Suárez et al., 2009b; Peña-Rodríguez et al., 2011; Cruz-Suárez et al., 2013). Además, se ha demostrado que la inclusión de *Ulva clathrata* en alimento para crecimiento (engorda) de camarón mejora la calidad de pellet (estabilidad en agua, capacidad de retención de agua y textura), aumenta el consumo de alimento, mejora la eficiencia de alimentación, la tasa de crecimiento y la calidad del producto final (pigmentación y contenido de colesterol) (Cruz-Suárez et al. 2009a,b; 2010). También se ha reportado una mejora en la digestibilidad de proteína en juveniles de *L. vannamei* mediante la suplementación de 4 u 8% de alga verde *Ulva* y *Enteromorpha* (Vargas-Cardenas et al., 2015). Adicionalmente, se ha demostrado que la

suplementación de *U. clathrata* en la dieta durante la etapa de crecimiento estimula el sistema inmune y los genes involucrados en el metabolismo de lípidos (Elizondo-Reyna et al., 2016). No existen trabajos anteriormente publicados sobre el efecto de la inclusión de macroalgas en dietas para maduración de camarón. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la suplementación de dietas frescas para reproductores con harina de *U. clathrata* sobre el desempeño reproductivo de *L. vannamei* bajo condiciones de producción comercial.

6.3. Materiales y Métodos

6.3.1. *Ulva clathrata*

El alga *Ulva clathrata* utilizada en este estudio fue cultivada en San Quintín, Baja California, México, bajo una tecnología patentada (WO 2004093525 A2 Moll 2004). La biomasa de *Ulva* fresca fue lavada con agua dulce para remover sedimentos, epifauna, y epifitas; fue secada en una secadora diseñada especialmente para este fin a 50°C durante 8 horas. El alga seca fue molida utilizando un molino (Pulvex, México) equipado con un tamiz de 500 µm, y almacenada en bolsas negras de plástico a 4°C. La composición proximal del lote de *Ulva* fue determinada siguiendo los métodos de la AOAC (1997): 930.15 (humedad), 942.05 (ceniza), 962.09B (fibra), 960.39 (lípidos), 990.03 (proteína cruda); el extracto libre de nitrógeno fue calculado por diferencia. El total de compuestos fenólicos (TPC) fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu (Cabello-Pasini et al., 2011), y la actividad antioxidante por el radical de DPPH (2, 2-difenol-1-picrilhidracil) de acuerdo a García et al., (2010).

6.3.2. Preparación de la dieta experimental

Diariamente se pesaron y molieron 3,000 g de calamar congelado necesarios para cumplir con la demanda de las dosis aplicadas para las dos pilas con tratamiento. Estos 3,000 g de calamar molidos se mezclaron por 3 min con 60 g de harina de *Ulva* en una cubeta de plástico hasta obtener una pasta homogénea (Figura 1-1). La mezcla de calamar con la harina de *Ulva* fue aplicada en dos raciones por día. La segunda ración se mantuvo en refrigeración desde su preparación hasta su aplicación. La alimentación se realizó por voleo en cada tanque de maduración.

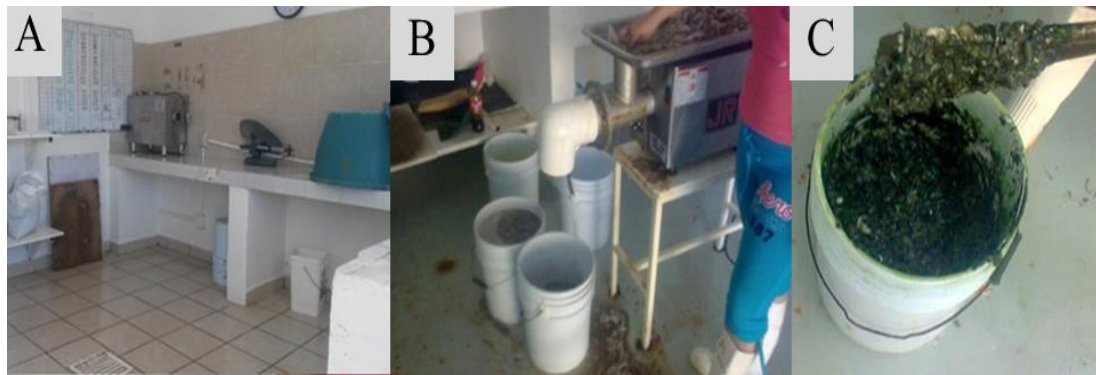


Figura 1-1. Preparación del alimento (calamar fresco congelado con 2% de harina de *Ulva clathrata*). **A)** Área de preparación y molienda de la dieta para maduración. **B)** Molienda del calamar. **C)** Mezclado del calamar con la harina de *Ulva clathrata*

6.3.3. Condiciones experimentales para la maduración de reproductores

Camarones adultos de *Litopenaeus vannamei* (Boone) fueron pre-madurados en el laboratorio de larvas Granmar ubicado en La Paz, Baja California Sur en estanques rectangulares cubiertos de plástico (linner) de 88 m² a una densidad de 35-40 camarones por m² durante 10 meses; en este período, los reproductores juveniles recibieron dietas peletizadas comerciales (Nutrimar SI-35% proteína) para crecimiento sin *U. clathrata*. Al finalizar el período de crecimiento en estanques, 2000 camarones fueron capturados con redes y transportados a las instalaciones de maduración de la compañía (período experimental 15 de junio al 30 de julio, 2014) (Figura 1-2).

Se usaron 1,200 camarones, 600 hembras (53 ± 8 g) y 600 machos (36 ± 7 g) seleccionados genéticamente para alto crecimiento (stock local) para el ciclo de producción experimental (45 días) que se distribuyeron en cuatro tanques rectangulares de maduración de 30 m² con diez animales por m² (Figura 1-3). La temperatura, salinidad y oxígeno promedio fueron 29.6 ± 1.5 °C, 32.6 ± 0.5 mg L⁻¹ y 5.3 ± 0.9 mg L⁻¹, respectivamente (media \pm DE). El fotoperíodo se mantuvo a las 14 h de luz: 10 h de oscuridad con un sistema de luz artificial. La proporción de hembras y machos fue de 1:1 y el intercambio diario de agua fue del 250%. Los camarones fueron alimentados con una dieta Control (dos tanques) o dieta enriquecida con *Ulva* (dos tanques).

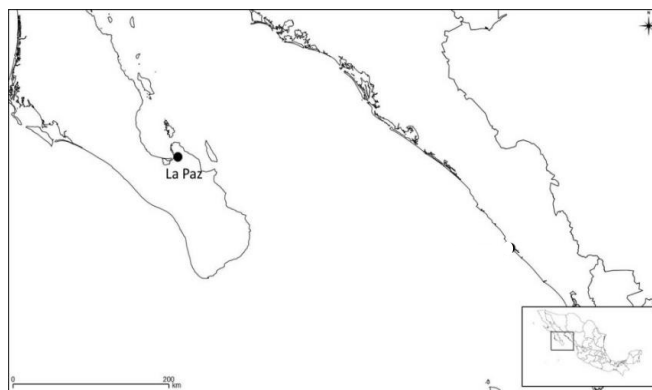


Figura 1-2. Ubicación del laboratorio de producción Granmar donde fue realizado el experimento.

La dieta Control estuvo compuesta de invertebrados congelados frescos en base a un régimen estándar de alimentación para maduración: calamar (40%), poliquetos (10%), mejillón (40%) y krill (10%). El calamar y el mejillón se molieron en un molino de carne (Torrey, EE. UU.) mientras aún estaban congelados. Todos los ingredientes se descongelaron a temperatura ambiente antes de pesarlos y distribuirlos en cada tanque.

La dieta experimental con *Ulva* consistió en la dieta Control más el suplemento de harina de *Ulva clathrata* (10% de humedad) de 2% en la fracción de calamar (78% de humedad) 20 g kg^{-1} . La inclusión de 2% de *Ulva* corresponde el 3.8% basado en el peso seco de todos los ingredientes de la dieta o bien el 0.8% considerando la *Ulva* seca y el resto de la dieta húmeda (Tabla 1-1).

Tanto la dieta Control como la experimental se dividieron en seis porciones diarias; las fracciones de 40% de calamar y mejillón fueron divididas en dos porciones de 20%. El peso total de las seis porciones diarias fue equivalente al 25% de la biomasa de camarón presente en el tanque de maduración correspondiente.

Tabla 1-1. Cálculo de inclusión de harina *Ulva* en la dieta fresca para maduración

| Componentes de la dieta | % de alimentación de la dieta sin <i>Ulva</i> (ww) | Humedad (%) | Alimento suministrado en peso húmedo por pila (g) | Alimento suministrado en peso seco (g) | Ajuste del % de alimentación de la dieta adicionando <i>Ulva</i> (dw) | Ajuste del % de alimentación de la dieta adicionando <i>Ulva</i> (ww) |
|-------------------------|--|-------------|---|--|---|---|
| Calamar | 40 | 78 | 1500 | 329 | 42.4 | 39.7 |
| Mejillón | 40 | 86 | 1500 | 218 | 28.1 | 39.7 |
| Poliqueto | 10 | 75 | 375 | 93 | 12.0 | 9.9 |
| Krill | 10 | 71 | 375 | 108 | 14.0 | 9.9 |
| <i>Ulva</i> | 2 | 10 | 30 | 27 | 3.8 | 0.8 |

dw: peso seco; ww: peso húmedo

La alimentación con *Ulva* comenzó una semana después de practicar la ablación de los pedúnculos oculares en las hembras; la ablación unilateral se llevó a cabo una vez que el 80% de las hembras había mudado, inmediatamente después fueron etiquetadas con un anillo codificado con color y número colocado alrededor del tallo ocular y finalmente se volvieron a colocar en sus tanques.

Cada día, los tanques fueron revisados en busca de camarones muertos, se colectó, se contabilizó y se llevó un registro del organismo y el número de tanque. Las mudas se recolectaron tres veces al día y se registraron con los respectivos números de tanque.

El desarrollo de las gónadas se monitoreó diariamente por la noche; las hembras maduras con un espermátforo adherido se recolectaron y se colocaron en tanques individuales de desove de 200 L; el agua para los tanques de desove se filtró previamente (10 μm) y se trató con hipoclorito de calcio (1 g/m^3), luego con tiosulfato de sodio (0.1 g/m^3) y EDTA (10 g/m^3) (Figura 1-3). Después del desove individual, durante la noche las hembras fueron devueltas a los tanques respectivos de donde fueron recolectadas, permitiendo que los huevos eclosionen en los tanques de desove individuales durante la noche. Todas las mañanas se examinaron los tanques de desove para contar nauplios y huevos sin eclosionar, que se concentraron en un cosechador de 30 L con aireación, usando un tamiz de 100 μm . La piedra de aire se retiró y se realizó un recuento volumétrico de los nauplios después de agitar y tomar tres muestras de 1 ml cada una. Luego se dejó que los nauplios se concentraran en la parte superior mediante fototropismo positivo y se cosecharon mediante sifón. El volumen se restauró a 10 L y después de la mezcla manual se realizó un recuento volumétrico de los huevos no eclosionados tomando tres muestras de 1 mL cada una.

6.3.4. Análisis estadísticos

El número de mudas, la mortalidad y las variables de producción (huevos y nauplios por hembras desovadas por día) se compararon usando ANOVA de una vía considerando el tratamiento dietético como factor independiente (Control vs. *Ulva*). El ANOVA de un factor fue precedido por una prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de la varianza (homocedasticidad) entre los grupos experimentales (STATISTICA Software, Versión 5.0). El nivel de significancia se consideró como $P < 0.05$.

6.4. Resultados

La composición proximal (en peso seco) del lote de *Ulva* utilizada en el laboratorio fue: 22% de proteína bruta; 1.5% de grasa, 29% de ceniza, y 47.5% de carbohidratos (fibra más extracto libre de nitrógeno). El contenido de compuestos fenólicos de *Ulva* fue 2.23 mg de eq floroglucinol g⁻¹ de alga. La actividad de eliminación del radical DPPH fue de 14%. La mortalidad diaria de las hembras ablacionadas del grupo con *Ulva* fue significativamente menor (1.11 vs 2.25 hembras/día/tanque) en comparación con el grupo Control ($P<0.01$). Al contrario de la mortalidad en hembras, la mortalidad en machos no mostró diferencias significativas entre los tanques de Control y *Ulva*. De forma similar, la frecuencia de mudas diarias (para ambos sexos) no mostró ninguna diferencia significativa entre los tratamientos.



Figura 1-3. Condiciones de operación del laboratorio de larvas Granmar. A) Área de maduración. B) Área de desove. C) Colecta de huevos y nauplios provenientes de un desove individual. D) Ablación del pedúnculo ocular en una hembra reproductora.

Los reproductores alimentados con *Ulva* produjeron significativamente más huevos (+5% de mejora relativa) y nauplios (+18%) por hembra desovada ($P<0.05$ y $P<0.001$ respectivamente). La tasa de eclosión fue significativamente mayor en los reproductores alimentados con *Ulva* ($P<0.001$): la inclusión de *Ulva* mejoró la tasa de eclosión en un

13% en el laboratorio de producción. Aunque el número de desoves diarios fue un poco mayor para el tratamiento con *Ulva*, las diferencias con el grupo control no fueron significativas (Tabla 1-2). La producción total (número total de nauplios/período) aumentó en un 24% con el consumo de *Ulva*.

Tabla 1-2. Desempeño reproductivo de reproductores *L. vannamei* alimentados con una dieta Control y una dieta experimental suplementada con harina *U. clathrata* en el laboratorio de larvas Granmar durante el periodo experimental de 45 días

| Parámetros | Dieta | Dieta | ANOVA | |
|--|-------------|-------------|-----------------|----------------|
| | Control | <i>Ulva</i> | | |
| Numero de desoves/día/tanque | 12 ± 1 | 14 ± 1 | NS | |
| Huevos totales producidos/tanque/día (x10 ³) | 2,406 ± 174 | 2,794 ± 174 | NS | |
| Huevos totales producidos/ hembra (x10 ³) | 212 ± 2 | 223 ± 2 | <i>P</i> <0.05 | |
| Nauplios producidos/día/tanque (x10 ³) | 1,378 ± 121 | 1,705 ± 121 | <i>P</i> <0.05 | |
| Nauplios producidos/hembra (x10 ³) | 128 ± 2 | 151 ± 2 | <i>P</i> <0.001 | |
| Tasa de eclosión (%) | 60 ± 1 | 68 ± 1 | <i>P</i> <0.001 | |
| Mudas/día/tanque (piezas) | 18.39 ± 1.2 | 16.39 ± 1.2 | NS | |
| Mortalidad/día/tanque (organismos) | Hembras | 2.25 ± 0.3 | 1.11 ± 0.3 | <i>P</i> <0.01 |
| | Machos | 0.3 ± 0.1 | 0.27 ± 0.1 | NS |

6.5. Discusión

Considerando que la composición proximal de calamar fresco *Loligo californiano* (*Doryteuthis opalescens*) es de 78.5% de agua, 15.6% de proteína, 1.4% de lípidos, 1.4% de ceniza y 3.1% de carbohidratos y fibra (USDA ARS 2008), la adición de 2% de harina de *Ulva* (10% de humedad) modifica escasamente los contenidos de la mezcla, pasando a 15.7% de proteína, 1.9% ceniza y 4% de carbohidratos/fibra, mientras la proporción de lípidos permaneció sin cambios. Dado que el régimen de alimentación para maduración incluía calamar solo en una fracción de 40%, está claro que la composición proximal global del régimen se mantuvo prácticamente inalterada, y los efectos del suplemento *Ulva* deben atribuirse a propiedades funcionales o nutrientes capaces de actuar a dosis muy bajas como terpenos, esteroides, flavonoides compuestos polifenólicos y polisacáridos sulfatados (Suganthy et al. 2009; Trigui et al., 2013; Declarador et al., 2014). Aun cuando los reproductores de ambos tratamientos fueron ablacionados, el enriquecimiento de la dieta fresca con *Ulva* incrementó el desempeño reproductivo. Se sabe que la ablación produce desgaste reproductivo (reducción en huevos y viabilidad de nauplios después de determinado tiempo) (Palacios et al.,

1999b), también afecta otros parámetros bioquímicos (Palacios et al., 2000); este desgaste es ocasionalmente seguido por un incremento en la mortalidad de hembras. Sin embargo, para las hembras ablacionadas a las que se les proporcionó *Ulva*, la mortalidad se redujo a la mitad. Esto puede significar que el consumo de *Ulva* disminuye los efectos negativos de desgaste causados por la ablación. Por ejemplo, *Ulva* puede incrementar la respuesta inmune, como ha sido descrito en camarones juveniles alimentados con *Ulva* (Elizondo-Reyna et al., 2016). *Ulva* es rica en carotenoides (luteína, clorofila, y zeaxantina) (Peña-Rodríguez et al., 2011) que pueden ser metabolizados a astaxantina en el tejido del camarón (Cruz-Suárez et al., 2010). La astaxantina acumulada por el camarón en su forma libre y esterificada puede reducir la oxidación, y además se ha reportado que promueve la maduración ovárica y el desove exitoso en *P. monodon* cuando se suministra en la dieta bajo condiciones experimentales (Pangantihon et al., 1998). Los carotenoides involucrados en el desarrollo embrionario (Olson, 1993) son transportados vía vitelina y concentrados en el ovario durante la maduración (Dall, 1995). Los carotenoides pueden actuar directamente en la regulación de genes de las hormonas que controlan la maduración ovárica (Liñán-Cabello et al., 2004) o indirectamente disminuir la peroxidación de lípidos y la formación de radicales libres e hidroperóxidos. Esto es particularmente importante en las gónadas que acumulan altas cantidades de HUFA, los cuales a su vez, tienen efectos directos en la viabilidad de desoves (Cahu et al., 1994; Xu et al., 1994). El efecto de la ablación peduncular se hace más evidente a lo largo del ciclo de producción (Palacios y Racotta 1999b): la ablación produce un desgaste reproductivo en reproductores, reflejado en una disminución en el contenido de carotenoides en huevos (Wyban et al. 1997; Palacios et al., 1998; Regunathan y Wesley 2006). Se ha reportado que suplementos de carotenoides minimizan la disminución de desoves en hembras ablacionadas silvestres y domesticadas (Palacios et al., 2000).

Los efectos de la suplementación de *Ulva* en la maduración son comparables con otros aditivos en dietas frescas. Chung et al. (2011) registraron un incremento por hembra de 27% en huevos producidos y 18% en la tasa de eclosión con la inclusión de alginato de sodio (200 mg kg⁻¹) como inmunoestimulante en dietas frescas para maduración de *P. monodon*. Otro aditivo más complejo, como el biofloc, mejoró 18% la producción de

nauplios por hembra, 23% la producción de huevos por hembra, y 10% de tasa de eclosión por día en *L. vannamei* (Emerenciano et al., 2013). El biofloc también incrementó 15% la producción de nauplios por hembra en *L. stylirostris* en condiciones experimentales, probablemente debido a que es una fuente antioxidante y una fuente significativa de lípidos, particularmente fosfolípidos esenciales y ácidos grasos altamente insaturados omega 3 para camarón (Cardona et al., 2016). El alga *Spirulina* suplementada en dieta fresca (3 g *Spirulina* por kg de calamar) incrementó 15% la producción de nauplios por hembra en *Fenneropenaeus indicus* bajo condiciones comerciales (Regunathan y Wesley, 2006). Estos suplementos para dietas tienen en común con *Ulva* una alta actividad antioxidante por su alto contenido de pigmentos, vitaminas, polifenoles y polisacáridos sulfatados (ulvan en el caso de las algas del género *Ulva*) (Gershwin y Belay, 2008; Ganesan et al., 2011; Wijesekara et al., 2011; Yildiz et al., 2012; Yu et al., 2012; Emerenciano et al., 2013; Cardona et al., 2016). Una característica adicional de *Ulva*, *Spirulina* y las microalgas presentes en biofloc es que tienen altos contenidos de fitoesteroles, particularmente 28-isofucoesterol (Gershwin y Belay, 2008; Lopes et al., 2013; Bensehaila et al., 2015). El fucosterol actúa como intermediario en la producción de colesterol (Teshima et al., 1988) y en la síntesis de hormonas esteroideas (Spaziani et al., 1993; Teshima y Kanazawa, 1979).

6.6. Conclusión

La suplementación de la fracción de calamar de las dietas frescas para maduración con harina de *Ulva clathrata* (20g de harina de *Ulva* por kg de calamar fresco) aumenta la sobrevivencia en hembras ablacionadas y la tasa de eclosión, mejorando la producción de larvas de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones comerciales.

CAPÍTULO 2

7. Disminución del agotamiento reproductivo utilizando *Ulva clathrata* en reproductores de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) durante la maduración comercial.

Artículo: Corral-Rosales, D. C., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Rodríguez-Jaramillo, C. y Palacios, E. (2018). Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. *Aquaculture Research*, 49(12), 3711-3722.
<https://doi.org/10.1111/are.13839>

Anexo 2

7.1. Resumen

En el presente estudio se complementó la fracción de calamar de la dieta fresca para maduración de reproductores *Litopenaeus vannamei* con harina de *Ulva clathrata* (3.8%, basada en el peso seco de todos los ingredientes) en un laboratorio de larvas comercial y se analizaron sus efectos sobre el rendimiento reproductivo, histología e histoquímica de la gónada y la composición bioquímica de la gónada, el hepatopáncreas y el músculo. Los resultados mostraron que las hembras que recibieron *Ulva* en la dieta tuvieron menor mortalidad en comparación con los controles, sin diferencias significativas en los machos. También, las hembras que se alimentaron de la dieta con *Ulva* presentaron ovocitos más grandes durante la vitelogénesis tardía (+7%, $P<0.01$) y postvitelogénesis (+15%, $P<0.01$); también presentaron una mayor proporción de ovocitos vitelogénicos tardíos en la etapa de maduración II y una mayor área de cobertura ocupada por barras corticales. No se encontraron diferencias significativas para la proporción de ovocitos previtelogénicos o vitelogénicos tempranos por la etapa de maduración o por el consumo de *Ulva*. En la composición bioquímica, las hembras alimentadas con *Ulva* presentaron niveles más altos de lípidos en el ovario (+35%, $P<0.05$), sin presentar diferencias significativas en las reservas bioquímicas en el hepatopáncreas o el músculo. El número total de huevos (+5%, $P<0.01$), nauplios por desove (+18%, $P<0.01$) y la tasa de eclosión (+13%, $P<0.01$) durante el ciclo productivo fue mayor para los camarones alimentados con la dieta con *Ulva*. El seguimiento individual de las hembras marcadas durante el ciclo productivo mostró una disminución del agotamiento reproductivo en hembras alimentadas con *Ulva* durante desoves consecutivos. Está claro que *U. clathrata* estimula la vitelogénesis avanzada al mejorar la acumulación de lípidos en las gónadas, y esto a su vez aumenta el rendimiento reproductivo: la inclusión de *Ulva* en la dieta para camarones podría usarse para disminuir el agotamiento reproductivo durante la producción.

7.2. Introducción

La importancia en la calidad del alimento para la maduración de reproductores cautivos, el apareamiento, la fertilidad y la calidad del desove ha sido ampliamente revisada; sin embargo, el progreso de estas dietas ha sido lento (Bray et al., 1990; Harrison, 1990;

Naessens et al., 1997; Wouters et al., 2001a; Coman et al., 2007). Con el tiempo, las dietas de maduración han pasado de ser dietas de un solo ingrediente (Chamberlain y Lawrence, 1981) a dietas compuestas de una mezcla de invertebrados frescos congelados, como el calamar, los poliquetos, el mejillón, el krill, la *Artemia*, por nombrar algunos (Primavera et al., 1979; Chamberlain y Lawrence, 1981; Galgani et al., 1989; Bray et al., 1990; Cahu et al., 1994; Harrison, 1997; Wouters et al., 1999). Actualmente, se usan dietas semi-húmedas y peletizadas para complementar la dieta compuesta por mariscos frescos congelados (Chimsung et al., 2014). Adicionalmente, el uso de micronutrientes y aditivos para dietas de maduración, como algas o sus derivados, *Spirulina*, alginato, paprika y biofloc ha ido en aumento, con buenos resultados sobre la capacidad reproductiva y la calidad de las larvas (Regunathan y Westey, 2006; Chung et al., 2011; Emerenciano et al., 2013; Cardona et al., 2016). En los últimos años se ha evaluado el uso de harina de *Ulva clathrata* en camarones juveniles, encontrando efectos positivos sobre el crecimiento, la eficiencia alimenticia, la pigmentación y la respuesta inmune (Cruz-Suárez et al., 2009a, 2010). La harina de *U. clathrata* se puede producir fácilmente y a bajo costo para su inclusión en las dietas, por ser un producto seco en forma de harina es fácil de almacenar, tiene menos riesgos de transmitir vectores de enfermedades. Recientemente, evaluamos la incorporación de harina de *U. clathrata* en la dieta para maduración sobre el rendimiento reproductivo del camarón *L. vannamei* en dos criaderos comerciales y descubrimos que el consumo de *Ulva* disminuye la mortalidad en hembras ablacionadas, aumenta la fecundidad y la tasa de eclosión y mejora el rendimiento reproductivo (Corral-Rosales et al., 2018). Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción de la harina de *U. clathrata* sobre la maduración. Aquí, analizamos el tamaño y la frecuencia de los ovocitos por histología y su composición lipídica mediante histoquímica, así como la composición bioquímica del hepatopáncreas, del músculo y de la gónada, durante la maduración gonadal en un laboratorio comercial, para determinar si *Ulva clathrata* puede afectar la vitelogénesis.

7.3. Materiales y métodos

7.3.1. Origen y crianza de reproductores

El origen y crianza de los reproductores se describen en el Capítulo 1 apartado 6.3.3.

7.3.2. Condiciones de cultivo del alga y diseño experimental

El alga utilizada y sus condiciones de cultivo se describen en el Capítulo 1 al igual que los detalles del diseño experimental y el proceso de alimentación, apartados 6.3.1, 6.3.2. y 6.3.3.

7.3.3. Colecta de muestras

Al final del ciclo de producción (45 días) se colectaron 12 hembras por tanque en los diferentes estadios de maduración evaluadas visualmente (Palacios et al., 2003):

Estadio 1.- Inmaduro; se observa los ovarios traslúcidos, sin pigmentación e invisible a través del exoesqueleto.

Estadio 2.- Inicio de la madurez; los ovarios se los observa largos, opacos, amarillosos a través del exoesqueleto (lóbulos anteriores y medios).

Estadio 3.- Los ovarios son visibles a través del exoesqueleto, el desarrollo de los lóbulos anteriores y medios es completo y el diámetro del lóbulo posterior es más grande que el intestino; su coloración es amarillo naranja.

Estadio 4.- Llegan a su punto de madurez, son claramente visibles a través del exoesqueleto y presentan un color café-oliva.

Hembra desovada- Después del desove los ovarios se observan flácidos, sin coloración y desgastados, como en estadio 1.

Se determinó el peso total y la longitud de cada hembra después de secarlas con papel absorbente al momento de la captura. Los camarones enteros se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para análisis posteriores. Se diseccionaron muestras de gónada, hepatopáncreas y músculo de hembras congeladas sobre una placa congelada una semana después de la captura.

7.3.4. Análisis histológico e histoquímico de ovarios

Para análisis histológico e histoquímico se diseccionaron las gónadas de la región abdominal y se fijaron en solución de Davidson durante 24 h, se incluyeron en una mezcla de parafina con paraplast, se seccionaron (6-8 μm) y se tiñeron con hematoxilina-eosina de Harris (Humanson, 1972). La etapa de desarrollo de los ovarios se evaluó como describen Tan-Fermín y Pudadera (1989). El diámetro máximo de ovocitos se determinó con el software SCAN-PRO versión 5.0. Solo se midieron los ovocitos que mostraban núcleos seccionados aproximadamente en el plano ecuatorial, como se describe en Palacios y colaboradores (1999).

El análisis histoquímico fue aplicado a los ovocitos postvitelogénicos: Para estimar la proporción relativa de los lípidos (triglicéridos y fosfolípidos) en las gónadas de las hembras, se utilizó la tinción Sudán Negro B. El Sudán es un reactivo de auxocrómo azul-negro diluido en etanol acuoso; por solubilidad tiene preferencia por los componentes lipídicos de los tejidos, tiñéndolos fosfolípidos en tonos grises, así como ésteres de colesterol y triglicéridos en tonalidades que van de azul oscuro a negro (Rodríguez-Moscozo y Arnaiz, 1998).

7.3.5. Análisis bioquímicos

Las gónadas, hepatopáncreas y músculos se analizaron como se describe en Palacios y colaboradores (2000): las muestras se pesaron, liofilizaron y homogeneizaron en 1 mL de agua destilada (homogenizador MP). El homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 5°C. Para los triglicéridos, se utilizó una prueba enzimática (Radox, TR1697).

7.3.5.1. Proteínas totales (Bradford, 1976)

Se utilizó la técnica del Ácido Bicinconínico o BCA; se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinconínico, sal sódica (verdoso) para formar un color morado. El color formado es proporcional al contenido proteico de la muestra. Se utilizó una solución reactiva comercial de Sigma (solución de ácido bicinconínico B9643) y solución de sulfato de cobre (II C2284). Se tomó una alícuota de 10 μL del homogeneizado y se digirió en 100 μL de NaOH 0.1N durante 120 minutos;

posteriormente se tomaron 25 μL del digerido y se colocaron en el fondo de una microplaca y se agregó el reactivo preparado de BCA (200 μL). Se incubó a 60°C durante 15 minutos y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 562 nm. Se utilizó una solución estándar con una concentración de 2mg mL⁻¹ de albúmina bovina, la cual se diluyó en proporción 1:2 en solución salina hasta tener concentraciones de 2, 1 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg mL⁻¹ de proteína y solución salina como blanco.

La concentración de proteínas se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de Proteínas (mg g}^{-1}\text{)} = (\text{Abs.sol.prob.} \times \text{FD}) / (m \times \text{peso de la muestra})$$

Dónde: FD es el factor de dilución y m es la pendiente en la curva tipo.

7.3.5.2. Lípidos totales (Barnes y Blackstock, 1973)

Se utilizó el método de la sulfafosfovainillina según Barnes y Balckstock (1973). Se tomó una alícuota de 25 μL de cada muestra homogenizada en tubos Eppendorf, se les agregó 250 μL de ácido sulfúrico concentrado y se incubaron a baño maría a 90°C, por 10 minutos. Los tubos se dejaron enfriar en baño de hielo, posteriormente se tomaron 20 μL de cada tubo y se colocaron en el fondo del pozo de una microplaca (placa ELISA) de 96 pozos, se les agregó 200 μL de solución reactiva para lípidos (fosfovainillina al 0.2% en ácido sulfúrico al 80%), se dejó incubar la placa por 40 minutos a temperatura ambiente y se tomó la lectura de la placa en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan Spectrum, Vantaa-Finlandia) a 540nm. Al mismo tiempo que reaccionaban las muestras se preparó una curva de calibración la cual se preparó de la siguiente manera:

Curva tipo: La solución estándar de lípidos (Lin-Trol Sigma L2648) contenía 20 mg mL⁻¹, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 1 mL de solución salina, quedando concentraciones de 10, 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.15625 mg mL⁻¹ de lípidos. Se utilizó solución salina como blanco. La cantidad de lípidos se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Concentración de lípidos (mg g}^{-1}\text{)} = (\text{Abs.sol.prob.} \times \text{FD}) / (m \times \text{peso de la muestra})$$

Dónde: m es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución.

7.3.5.3. Carbohidratos (Van Handel, 1965)

Para determinar la concentración de carbohidratos totales se utilizó un método basado en el de Roe et al. (1957). Se tomó 0.2 mL de homogeneizado de cada muestra y se mezclaron con 0.2 mL de Ácido Tricloroacético (TCA) al 20% en tubos Eppendorf de 0.65 mL, esto con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de carbohidratos. Los tubos se centrifugaron a 3600 rpm (1376 g) por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5810 R, NY-USA). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios. Se colocó 0.1 mL de sobrenadante en un tubo de vidrio, se le agregó 1 mL de solución de antrona 0.1% diluida en H₂SO₄ al 72%. Se calentaron a baño maría a 90 °C durante 5 minutos y se enfriaron en baño de hielo. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 620 nm. Curva tipo: La solución estándar de carbohidratos contenía 5mg mL⁻¹, se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 500µL de TCA, quedando concentraciones de 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 mg mL⁻¹ de carbohidratos. La cantidad de carbohidratos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de carbohidratos (mg g}^{-1}\text{)} = (\text{Abs.sol.prob.x FD}) / (m \times \text{peso de la muestra})$$

Dónde: *m* es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución

7.3.6. Análisis estadístico

Se usó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) usando Tratamiento (T, con dos niveles, con o sin *Ulva*) y Etapa de maduración (M: cuatro niveles para análisis bioquímico y dos niveles para ácidos grasos) para variables bioquímicas y de producción, seguido de una prueba de Tukey para la comparación de las medias cuando se encontró un efecto significativo en las etapas de maduración (STATISTICA Software, Versión 5.0). El ANOVA anidado (considerando los ovocitos de cada hembra anidado en el tratamiento) se utilizó para encontrar diferencias significativas para la histología y la histoquímica, seguido de una prueba de Tukey ($P < 0.05$).

7.4. Resultados

7.4.1. Composición proximal de la dieta fresca y la harina de *Ulva clathrata*

La composición proximal de *U. clathrata* y los demás ingredientes que integran la dieta de maduración se muestran en la Tabla 2-1. La harina de *Ulva* tuvo un contenido de humedad muy bajo, la composición promedio (base seca en porcentaje \pm ES) fue de 19.3 ± 1.7 de proteína, 2.0 ± 0.8 de lípidos y 28.1 ± 2.3 de ceniza. El calamar presentó $70.9 \pm 0.1\%$ de proteína, 5.5 ± 0.1 de lípidos y 8.3 ± 0.1 de cenizas. Los poliquetos $59.9 \pm 0.1\%$ de proteína, $10.8 \pm 0.1\%$ de lípidos y $14.4 \pm 0.1\%$ de ceniza. El Krill $55.4 \pm 0.2\%$ de proteína, 22.5 ± 0.2 de lípidos y 11.6 ± 0.2 de cenizas. El mejillón 64.3 ± 0.4 de proteína, 6.1 ± 0.6 de lípidos y 9.3 ± 0.2 de cenizas.

Tabla 2-1. Composición proximal (g kg^{-1} dw = peso seco) de la harina de *U. clathrata* y de los componentes de la dieta control (medias \pm ES).

| Parámetro | <i>U. clathrata</i> | Calamar | Poliqueto | Krill | Mejillón |
|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Proteína cruda | 193.3 ± 17.1 | 709.8 ± 1.3 | 599.5 ± 1.2 | 554.2 ± 2.0 | 643.1 ± 4.7 |
| Extracto etéreo | 20.0 ± 8.0 | 55.3 ± 1.0 | 108.2 ± 1.0 | 225.3 ± 2.1 | 61.3 ± 6.1 |
| Cenizas | 281.5 ± 23.3 | 83.1 ± 1.1 | 144.1 ± 1.0 | 116.6 ± 2.0 | 93.1 ± 2.3 |
| Fibra cruda | 54.3 ± 7.1 | 6.4 ± 0.4 | 7.6 ± 1.3 | 18.1 ± 0.4 | 9.8 ± 0.2 |
| NFE | 452.0 ± 0.0 | 147.0 ± 0.0 | 142.0 ± 0.0 | 87.0 ± 0.0 | 194.0 ± 0.0 |
| Humedad inicial | 102.3 ± 12.1 | 781.2 ± 2.3 | 855.3 ± 2.1 | 752.2 ± 1.0 | 811.3 ± 10.2 |

NFE: extracto libre de nitrógeno

Los resultados de la mortalidad diaria en las hembras ablacionadas, la mortalidad en machos, la frecuencia de muda, el número de huevos y nauplios, la tasa de eclosión y el número total de desoves se reportó en el Capítulo 1.

7.4.2. Composición química de las gónadas

La composición bioquímica de las gónadas (Tabla 2-2) mostró niveles más altos de lípidos en camarones alimentados con *Ulva* (efecto global del tratamiento: 26.9 ± 2.6 vs. 35.8 ± 3.2 mg g^{-1} dw), mientras que la etapa de maduración afectó los niveles de proteína (efecto de maduración global: etapa de maduración I = 251.8 ± 24.1 ; M II = 243.6 ± 14.5 ; M III = 341.4 ± 24.5 ; M IV = 327.0 ± 14.7 mg g^{-1} dw) y de carbohidratos (M I = 5.3 ± 0.9 ; M II = 4.0 ± 0.5 ; M III = 5.4 ± 1.0 ; M IV = 6.5 ± 0.6 mg g^{-1} dw).

7.4.3. Composición bioquímica del hepatopáncreas de hembras

La composición bioquímica del hepatopáncreas se muestra en la Tabla 2-3. No se encontraron diferencias significativas por la dieta (con o sin *Ulva*) en el hepatopáncreas. Sin embargo, los carbohidratos se vieron afectados significativamente por la etapa de maduración; considerando el efecto de maduración global se pueden calcular los siguientes valores promedio para los dos tratamientos M I = 12.4 ± 1.1 ; M II = 9.6 ± 3.2 ; M III = 12.7 ± 1.0 ; M IV = 12.6 ± 3.1 mg g⁻¹ en peso seco.

7.4.4. Composición bioquímica del músculo de hembras

Los resultados de la composición bioquímica en el músculo no mostraron diferencias significativas con el tratamiento o la etapa de maduración (Tabla 2-4).

Tabla 2-2. Composición bioquímica (mg g⁻¹ dw) de la gónada de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con una dieta con o sin *Ulva*, en relación con la etapa de maduración, en un período experimental de 45 días (medias \pm ES), considerando T=Tratamiento; M=Etapa de maduración. Los valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes

| | T | M I | M II | M III | M IV | T | M | TxM |
|----------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|-----|
| Proteína | Control | 225.0 \pm 32.6b | 241.4 \pm 23.9ab | 322.0 \pm 29.6ab | 313.5 \pm 16.9ab | NS | <0.05 | NS |
| | <i>Ulva</i> | 284.9 \pm 32.6ab | 246.7 \pm 16.6ab | 353.7 \pm 23.6a | 338.7 \pm 25.6a | | | |
| CHO | Control | 5.3 \pm 0.9ab | 4.2 \pm 0.8ab | 3.4 \pm 0.3b | 6.5 \pm 1.1a | NS | <0.05 | NS |
| | <i>Ulva</i> | 5.3 \pm 1.7ab | 3.7 \pm 0.6b | 6.7 \pm 1.3a | 6.4 \pm 0.8a | | | |
| Lípidos | Control | 22.8 \pm 3.2b | 24.9 \pm 3.3b | 30.1 \pm 6.0ab | 30.4 \pm 4.2ab | <0.05 | NS | NS |
| | <i>Ulva</i> | 32.6 \pm 4.9ab | 26.7 \pm 8.1ab | 39.6 \pm 6.1ab | 40.9 \pm 4.9a | | | |

NS = sin diferencia significativa ($P>0.05$). CHO = carbohidratos

Tabla 2-3. Composición bioquímica (mg g⁻¹ dw) de hepatopáncreas de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con una dieta con o sin *Ulva*, en relación con la etapa de maduración, en un período experimental de 45 días (medias \pm ES), considerando T=Tratamiento; M=Etapa de maduración.

| | T | M I | M II | M III | M IV | T | M | TxM |
|----------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----|-------|-----|
| Proteína | Control | 197.2 \pm 19.8 | 206.5 \pm 17.9 | 220.3 \pm 23.5 | 220.3 \pm 14.8 | NS | NS | NS |
| | <i>Ulva</i> | 198.4 \pm 16.1 | 176.9 \pm 16.4 | 193.3 \pm 15.6 | 212.6 \pm 13.2 | | | |
| CHO | Control | 11.6 \pm 1.4 | 10.9 \pm 1.1 | 14.1 \pm 0.8 | 12.4 \pm 1.3 | NS | <0.05 | NS |
| | <i>Ulva</i> | 13.3 \pm 1.2 | 8.0 \pm 0.9 | 11.8 \pm 1.5 | 12.8 \pm 1.4 | | | |
| Lípidos | Control | 33.2 \pm 4.8 | 27.9 \pm 3.8 | 28.2 \pm 7.5 | 26.5 \pm 4.3 | NS | NS | NS |
| | <i>Ulva</i> | 26.0 \pm 6.1 | 17.0 \pm 4.3 | 23.4 \pm 6.1 | 34.8 \pm 4.0 | | | |

NS = sin diferencia significativa ($P>0.05$). CHO = carbohidratos

Tabla 2-4. Composición bioquímica (mg g⁻¹ dw) de músculo de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con una dieta con o sin *Ulva*, en relación con la etapa de maduración, en un período experimental de 45 días (medias ± ES), considerando T=Tratamiento; M=Etapa de maduración.

| | T | M I | M II | M III | M IV | T | M | TxM |
|-----------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----|----|-----|
| Proteínas | Control | 260.3 ± 14.3 | 250.2 ± 6.4 | 257.5 ± 4.3 | 242.5 ± 9.3 | NS | NS | NS |
| | <i>Ulva</i> | 255.0 ± 17.6 | 272.4 ± 14.3 | 254.5 ± 17.6 | 270.4 ± 12.4 | | | |
| CHO | Control | 3.7 ± 0.6 | 3.1 ± 0.5 | 3.5 ± 0.8 | 3.4 ± 0.6 | NS | NS | NS |
| | <i>Ulva</i> | 3.2 ± 0.7 | 3.8 ± 0.6 | 3.7 ± 0.7 | 3.5 ± 0.5 | | | |
| Lípidos | Control | 6.9 ± 0.8 | 4.9 ± 0.7 | 6.2 ± 1.2 | 4.6 ± 0.8 | NS | NS | NS |
| | <i>Ulva</i> | 4.9 ± 1.0 | 6.0 ± 0.8 | 5.1 ± 1.0 | 5.1 ± 0.5 | | | |

NS = sin diferencia significativa ($P>0.05$). CHO = carbohidratos

7.4.5. Seguimiento individual y parámetros reproductivos de hembras

El seguimiento individual de las hembras reproductoras se muestra en la Figura 2-1A. En los reproductores alimentados con la dieta con *Ulva* hubo 23 hembras que nunca desovaron. En el tratamiento control, hubo casi tres veces más. En general, hubo un mayor número de hembras con desoves consecutivos en el tratamiento con *Ulva* (Fig. 2-1A). La producción de nauplios por desove en relación con el número total de desoves consecutivos se muestra en la Figura 2-1B. Hubo una disminución significativa en la producción de nauplios en relación con el número de desoves por hembra, aumentado en el tratamiento control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para la producción de nauplios en relación con el número de desove en el grupo *Ulva*.

La Figura 2-1 muestra los resultados en el rendimiento reproductivo por número de desoves totales por hembra.

Los camarones que consumieron *Ulva* durante el período experimental tuvieron un número significativamente mayor de desoves totales ($P<0.05$) que los camarones alimentados con una dieta control (hembras que desovaron una vez: 109 vs. 114; 2 veces = 59 vs. 66; 3 veces = 33 vs. 38; 4 veces = 22 vs. 33; 5 veces = 10 vs. 11; 6 veces = 0 vs 6). Se encontró un resultado similar para el número de nauplios por desove, con una mayor producción de nauplios totales en las hembras alimentadas con *Ulva*, y un aumento a lo largo del número de desoves (Desove 1=128 vs 128; desove 2= 107 vs 124; desove 3= 99 vs. 110; desove 4= 71 vs. 85; desove 5= 75 vs. 114 nauplios por desove x10³). La tasa de eclosión disminuyó constantemente en los camarones alimentados con la dieta control, con diferencias significativas en el sexto desove,

mientras que los camarones alimentados con *Ulva* se mantuvieron una tasa de eclosión similar a lo largo de los desoves.

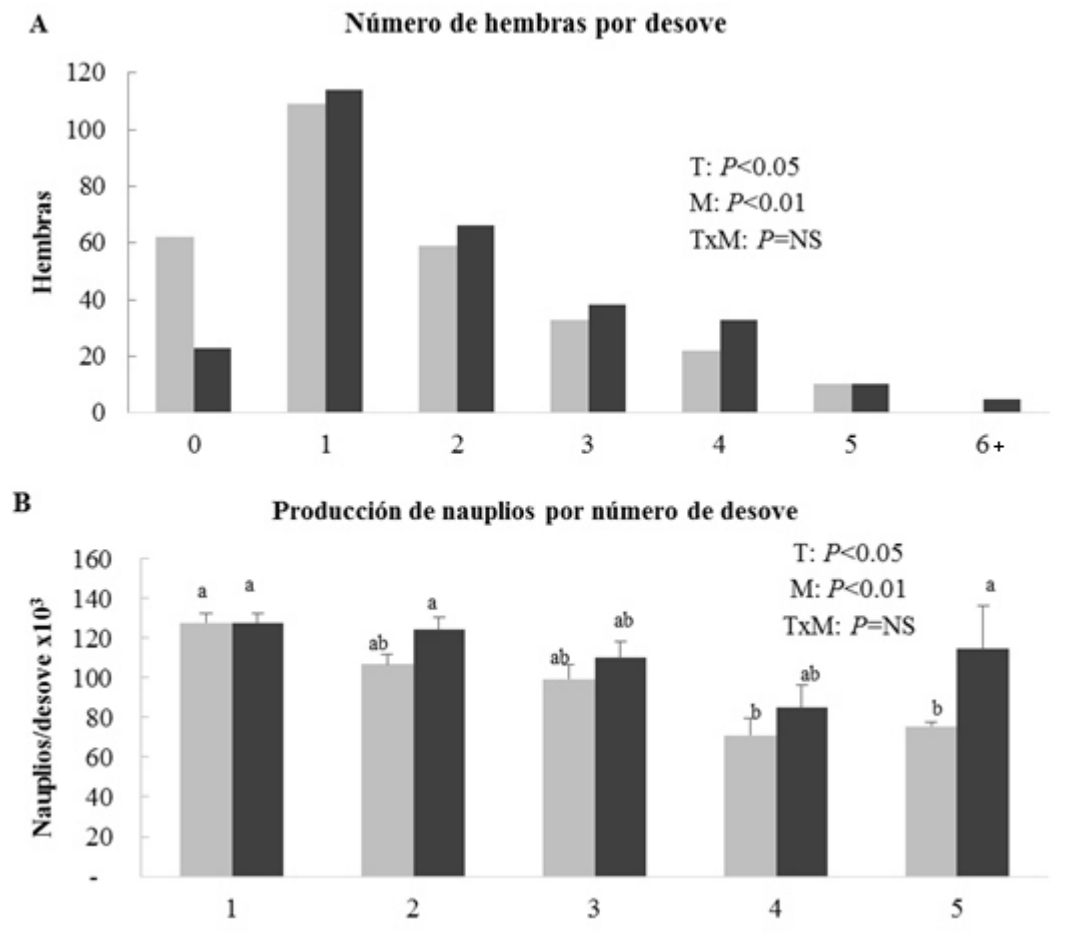


Figura 2-1. Desempeño reproductivo de hembras *Litopenaeus vannamei* alimentadas con harina de *Ulva clathrata* (gris oscuro) vs. control (gris claro) en relación con el número de desoves: A) Número de hembras que presentaron cierto número de desoves durante el período experimental de 45 días; B) Nauplios por número de desove. Los resultados se expresaron como medias \pm SE. T=Tratamiento; M=Etapa de maduración.

7.4.6. Histología e histoquímica de gónadas

En la Figura 2-2 se muestra el desarrollo gonadal de hembras *L. vannamei* usando tinción con hematoxilina-eosina, y en la figura 2-3 se muestra la frecuencia de ovocitos (%), que se vio afectada por el tratamiento con *Ulva*, pero sólo para ovocitos vitelogénicos tardíos y postvitelogénicos. Las hembras alimentadas con *Ulva* presentaron ovocitos vitelogénicos más avanzados, particularmente en la etapa de maduración II y más ovocitos postvitelogénicos, particularmente en la etapa de

maduración III. No se encontraron diferencias significativas para los ovocitos previtelogénicos o vitelogénicos tempranos por etapa de maduración o por tratamiento. No hubo diferencias significativas en el tamaño de ovocitos vitelogénicos tempranos y previtelogénicos en relación con el tratamiento (Fig. 2-4A). Los ovocitos de las hembras alimentadas con *Ulva* fueron significativamente más grandes que los de las hembras alimentadas con el control, pero solo en ovocitos vitelogénicos tardíos ($17,002 \mu\text{m}^2$ *Ulva* vs. $14,434 \mu\text{m}^2$ grupo control, $P < 0.01$) y en ovocitos postvitelogénicos ($30,569 \mu\text{m}^2$ *Ulva* vs. $23,273 \mu\text{m}^2$ control, $P < 0.01$).

Los índices de triglicéridos y fosfolípidos solo se analizaron en los ovocitos postvitelogénicos (Fig. 2-4B), y ambos fueron significativamente diferentes, con triglicéridos más altos en las hembras que fueron alimentadas con *Ulva* en comparación con aquellas que recibieron el control ($P = 0.026$, 59.6 vs. 69.2%). En contraste, el índice de fosfolípidos fue significativamente menor en las hembras alimentadas con *Ulva* (21.6 ± 1.0 *Ulva* vs. 29.0 ± 1.3 grupo control, $P < 0.01$).

La longitud cortical en los ovocitos postvitelogénicos fue mayor en las hembras control, en comparación con las hembras alimentadas con *Ulva* (Figura 2-4C). Por el contrario, el área total cubierta por las mucinas corticales contenidas en las barras corticales de los ovocitos postvitelogénicos, fue mayor en las hembras alimentadas con *Ulva* en comparación con los controles (Fig. 2-4D).

7.5. Discusión

Los camarones alimentados con *Ulva* tuvieron mayor número de desoves por día, número de huevos por desove, tasa de eclosión y número de nauplios por hembra, lo cual incrementó la producción global durante el periodo de muestreo. Cuando se realizó un seguimiento individual de los parámetros reproductivos por hembra, encontramos que las hembras alimentadas con *Ulva* tenían más desoves consecutivos (Fig. 2-1A) y la producción de nauplios por desove consecutivo no se redujo (Fig. 2-1B). Esta disminución en los controles es similar al agotamiento reproductivo reportado antes en reproductores *L. vannamei* durante producción comercial, y se caracteriza por una reducción en el número de desoves por hembra, el número de huevos y nauplios por

desove y la calidad de las larvas al final del ciclo de producción comercial (Palacios et al., 1998; 1999a).

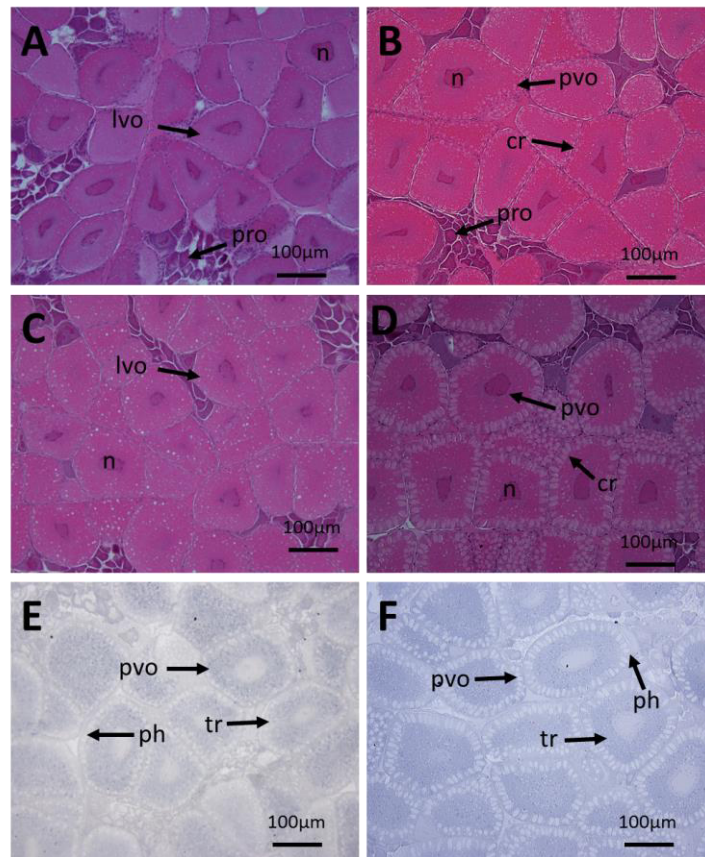


Figura 2-2. Micrografías del desarrollo gonadal de hembras de *L. vannamei* utilizando tinción con Hematoxilina-eosina. A) Control: ovario en vitelogénesis avanzada en estadio III con ovocitos previtelogénicos (pro) y ovocitos vitelogénicos tardíos (lvo). B) Control: ovario con ovocitos postvitelogénicos en estadio IV (pvo). C) *Ulva*: en vitelogénesis avanzada en estadio III con ovocitos previtelogénicos y ovocitos en vitelogénesis exógena o tardía (lvo). IV D) *Ulva*: ovocitos postvitelogénicos en estadio IV (pvo); barras corticales (cr); n = núcleo; E) y F) Sudán Negro tr=triglicéridos ph = fosfolípidos

Se ha teorizado que el agotamiento reproductivo podría ser el resultado del aumento de GIH de la glándula restante, para compensar la reducción de GIH inmediatamente después de la ablación, con la reducción concomitante en la producción de desove y nauplios (Palacios et al., 1999b). Curiosamente, los reproductores silvestres, incluso cuando son ablacionados, no presentan un agotamiento reproductivo tan evidente, presentan más desoves consecutivos y la producción de nauplios no se ve tan afectada por reproducciones consecutivas en comparación con los reproductores domesticados (Palacios et al., 1999c). Aparentemente, los reproductores criados en estanques carecen

de algo que los camarones silvestres tienen, y eso disminuye el agotamiento reproductivo. Aquí encontramos que los camarones criados en estanques alimentados con *Ulva* también presentan un agotamiento menor en comparación con los controles. Probablemente, *Ulva* aporta algún (o algunos) micronutriente (s), al (los) que tienen acceso los camarones silvestres en el medio natural.

La dieta de maduración en cautiverio se ha basado tradicionalmente en la composición de las gónadas del camarón hembra (Middleditch et al., 1979), pero en la composición de macronutrientes, donde los niveles de proteínas y lípidos, particularmente ácidos grasos insaturados, se equiparan con ingredientes naturales, como poliquetos y moluscos. Sin embargo, hay una variedad de micronutrientes que usa el camarón: Por ejemplo, los camarones alimentados con biofloc (agregación de bacterias, microalgas, protozoos, etc.) tienen un mejor estado de defensa antioxidante (Cardona et al., 2016). Además, los camarones tienen la capacidad de ingerir y digerir activamente microalgas en suspensión (Kent et al., 2011, Varadharajan y Pushparajan, 2013) e incluso prefieren ingerir material vegetal (algas verdes filamentosas, diatomeas, cianobacterias) que pellets y restos de animales, incluyendo exuvia (Focken et al., 1998). Es posible que lo que se conoce como agotamiento reproductivo esté asociado a una reducción particular de nutrientes en organismos de cultivo (Palacios et al., 1999c). De acuerdo con nuestros resultados, *Ulva* puede proporcionar una parte de dichos nutrientes, disminuyendo así el agotamiento.

Ulva no tiene altos niveles de proteínas o lípidos, pero contiene polisacáridos sulfatados (fibra) y minerales. La fibra puede afectar la digestión al mejorar el impacto sobre la motilidad y las tasas de digestión del intestino delgado y también puede afectar las secreciones exocrinas del páncreas y el hígado (Chater et al., 2015). También puede modificar la microbiota intestinal en el tracto gastrointestinal (Slavin, 2013) y promover la producción de productos finales fermentativos, actuar como agente emulsionante y antioxidante y modificar el contenido de proteína enlazadora de beta-glucanos (BGBP) que tiene un doble rol: en el transporte de lípidos y en la respuesta inmune (Li et al., 2018). Existen otros micronutrientes que *Ulva* puede suministrar para aumentar el rendimiento reproductivo, como minerales, lípidos y antioxidantes.

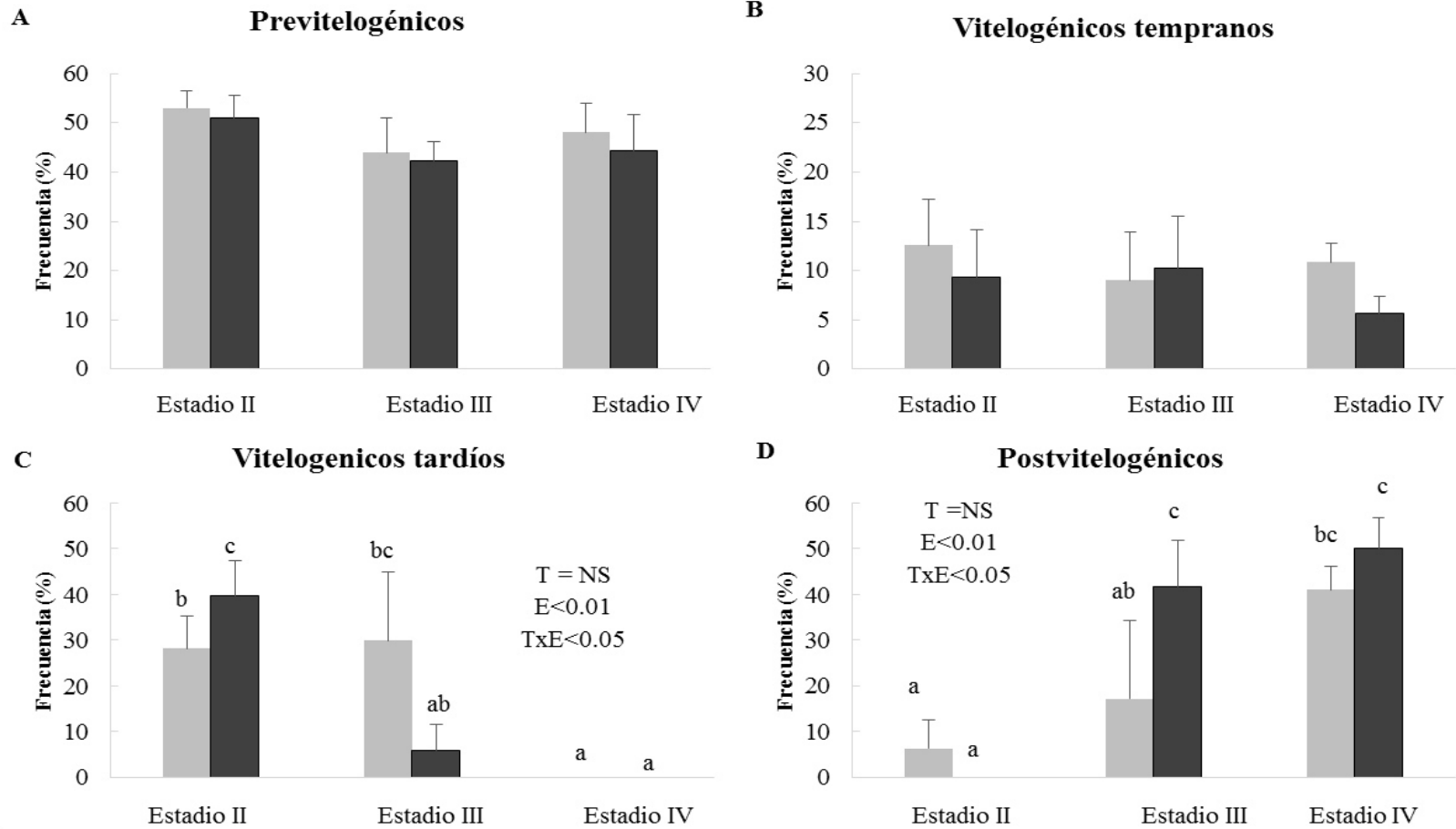


Figura 2-3. A) Frecuencia previtelogénica, B) Vitelogénica temprana, C) Vitelogénica tardía, D) Frecuencia postvitelogénica (%) en relación con las etapas de maduración durante el desarrollo ovárico de reproductores hembra *L. vannamei* después de ser alimentados con una dieta control (gris claro) o *Ulva* (gris oscuro). Los valores fueron analizados usando un ANOVA anidado y los resultados se expresan como medias \pm SE. T=Tratamiento; M=Etapa de maduración.

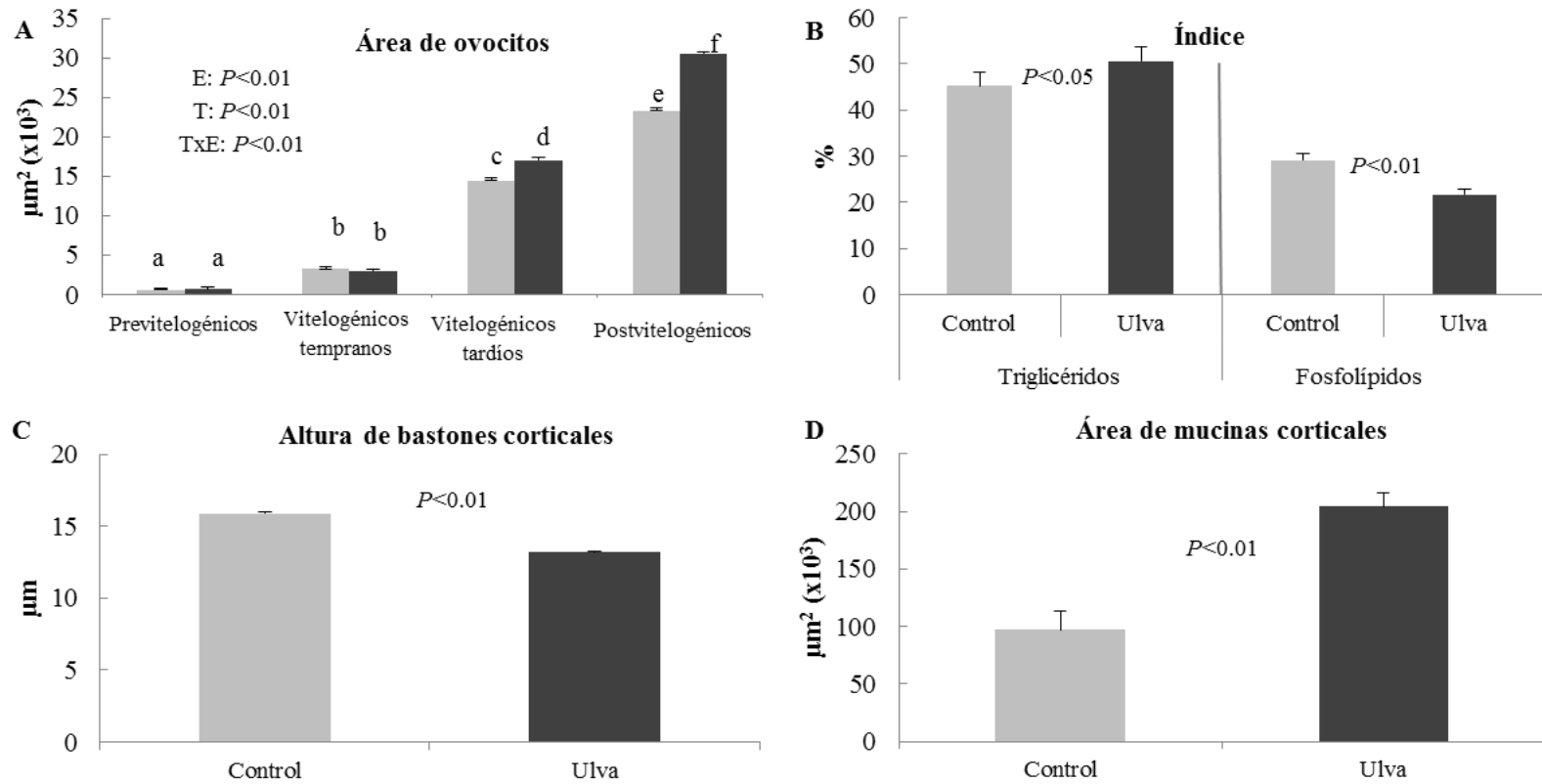


Figura 2-4. A) Área de ovocitos (μm) en relación con los estadios vitelogénicos (Previtelogénesis, vitelogénesis temprana, vitelogénesis tardía, postvitelogénesis) durante el desarrollo ovárico de hembras *L. vannamei* alimentadas con una dieta de control (gris claro) o con *Ulva* (gris oscuro) E = Etapa de maduración, T = Tratamiento, TxE = Interacción. Valores analizados usando un ANOVA anidado. B) Histoquímica (índice de triglicéridos o fosfolípidos) en ovocitos postvitelogénicos. Valores analizados utilizando un ANOVA de un factor. C) Longitud de las varillas corticales (μm) en ovocitos postvitelogénicos. D) Área de mucinas corticales (μm^2) en ovocitos postvitelogénicos.

Yaich et al. (2011) encontraron altos contenidos de magnesio en *Ulva*; esto es interesante porque los camarones tienen bajos niveles de magnesio después de un ciclo reproductivo en un laboratorio comercial en comparación con el camarón silvestre (Méndez et al., 1999). Por otro lado, la dieta congelada podría perder algunos nutrientes esenciales en comparación con una dieta fresca. Congelar los ingredientes puede reducir la calidad de proteínas, lípidos y minerales (Arannilewa et al., 2005). La composición de los ingredientes también puede diferir en relación con el tiempo de almacenamiento y el período de cosecha (Ashie et al., 2009; Schiener et al., 2015). Si los minerales y los lípidos se ven afectados por la congelación, *Ulva* podría estar proporcionando nutrientes que originalmente estaban allí, pero que se perdieron. En este sentido, sería interesante comparar si *Ulva* tiene el mismo efecto en los parámetros reproductivos cuando la dieta es fresca, en comparación con la dieta congelada. En otros trabajos sobre reproducción de camarones con ingredientes frescos, el uso de aditivos ha demostrado que algunos lípidos, como los HUFA, aumentan la calidad del huevo y la eclosión (Xu et al., 2017); los carotenoides contenidos en *Spirulina* aumentan la producción de huevos en 2%, producción de nauplios 5% y tasa de eclosión 2% (Regunathan y Wesley, 2006); y el alginato de sodio incluido en poliquetos aumenta la supervivencia en larvas, la producción de nauplios 17% y la tasa de eclosión 8% (Chung et al., 2011). Es necesaria una mayor investigación sobre los micronutrientes que *Ulva* puede aportar al camarón.

Un resultado muy interesante e inesperado fue el aumento del tamaño de los ovocitos vitelogénicos tardíos y los ovocitos postvitelogénicos en las hembras alimentadas con *Ulva*. La vitelogénesis temprana ocurre cuando las reservas bioquímicas almacenadas en diferentes tejidos se movilizan a la gónada. Esto es concordante con una fuerte disminución de carbohidratos en el hepatopáncreas en el estadio II observado aquí, que corresponde con un aumento de los lípidos en la gónada por el estadio III. La vitelogénesis tardía ocurre cuando las reservas bioquímicas del alimento se incorporan a las lipoproteínas, llamadas vitelogeninas y se transportan a la gónada, donde la vitelogenina se absorbe por endocitosis y se almacena como vitelina (Charniaux, 1985; Tsukimura, 2001). Varios autores reportaron en *P. japonicus* (Yano y Chinzei 1987), *Macrobrachium rosenbergii* (Lee y Chang 1997), *P. aztecus* y *P. setiferus* (Castille y Lawrence, 1989) que un aumento en el contenido de proteína en las gónadas maduras

está relacionado con un rápido crecimiento de ovocitos durante las últimas etapas de la vitelogénesis. Esto coincide con el aumento en el tamaño de los ovocitos vitelogénicos avanzados y el aumento en la proteína encontrada en el presente trabajo. Si bien encontramos un efecto significativo en los ovocitos vitelogénicos tardíos mediante histología, aparentemente *Ulva* está afectando los procesos tempranos y tardíos, ya que los niveles de lípidos y proteínas aumentan en la gónada desde la etapa I de maduración y el tamaño de los ovocitos aumenta significativamente en la vitelogénesis tardía y en ovocitos postvitelogénicos, presumiblemente como resultado de una mayor acumulación de vitelina. Además, hubo más ovocitos vitelogénicos tardíos y postvitelógenos en los camarones alimentados con *Ulva* en la etapa II y III de la maduración, por lo que no solo fueron más grandes los ovocitos, sino que también fueron más abundantes. *Ulva* no está suministrando más proteína en comparación con la dieta control, por lo que el efecto probablemente se asocia a otros mecanismos, como una mayor transferencia de reservas bioquímicas a la gónada en la vitelogénesis, aumento de la producción de vitelogenina y estimulación hormonal. Otro mecanismo, como el aumento del reclutamiento de ovocitos, podría ser posible, pero no explican el aumento del tamaño de los ovocitos individuales. En cualquier caso, una reducción en el número de ovocitos podría aumentar las reservas bioquímicas asignadas a cada ovocito, pero no se observó disminución en el número de huevos por desove.

Aquí encontramos que las barras corticales eran más grandes en el camarón control en comparación con el camarón alimentado con *Ulva* (Fig. 2-3C). La formación de barras corticales en ovocitos postvitelogénicos es la última etapa de maduración y ocurre justo antes del desove (Tan-Fermin y Pudadera, 1989). Las barras corticales están formadas principalmente por proteínas (70-75%) y carbohidratos (25-30%) (Lynn y Clark, 1987), asociadas a varias glucoproteínas que se secretan durante la liberación de ovocitos y ayuda a la reacción acrosómica de los espermatozoides, y pueden tener actividad antimicrobiana (Kruevaisayawan et al., 2007). Como *Ulva* es rica en polisacáridos, esperábamos que las barras corticales estuvieran más desarrolladas en las hembras alimentadas con *Ulva*, sin embargo, es algo más avanzada en el ovario de camarones del grupo de control que en *Ulva*. Sin embargo, cuando se realizó el análisis del área ocupada por mucinas en las barras corticales, encontramos que esta área era más grande

en las hembras alimentadas con *Ulva* (Fig. 2-3D). Es posible que el alto contenido de polisacáridos sulfatados en *Ulva* esté afectando directamente la formación de barras corticales, lo que puede aumentar la eclosión al reducir la poliespermia y la viabilidad de los nauplios al reducir la contaminación microbiana. En cualquier caso, esta puede ser la razón por la que se obtuvo una mayor producción de nauplios para las hembras alimentadas con *Ulva*.

Durante el desarrollo ovárico, el ovocito cambia su composición para incorporar cantidades significativas de triglicéridos que se usan durante la etapa lecitotrófica (Palacios et al., 1998), mientras que los fosfolípidos aumentan debido a la formación de nuevas membranas con la división celular. Los triglicéridos son la reserva de energía más importante para la embriogénesis y el desarrollo larval, y que estos se transportan desde el hepatopáncreas hasta las gónadas durante el desarrollo ovárico (Ouellet et al., 1992; Wickins et al., 1995; Palacios et al., 1999b). Estos resultados están de acuerdo con lo que hemos obtenido en el presente trabajo al aumentar la proporción de triglicéridos en los ovocitos postvitelogénicos con el consumo de *Ulva* y disminuir los fosfolípidos, lo que indica un mayor crecimiento por acumulación que por división celular, además coincide con los resultados obtenidos en camarones silvestres ablacionados, donde la proporción de triglicéridos y lípidos totales era más alta en comparación con los camarones criados en estanques durante un ciclo de producción, lo que indica que hay más triglicéridos y menos fosfolípidos en las gónadas, particularmente en las gónadas maduras (Palacios et al., 2000). Se espera que los fosfolípidos aumenten en los ovocitos si hay una hiperplasia, ya que se forma más membrana con cada ovocito, mientras que los triglicéridos aumentan cuando hay hipertrofia o crecimiento ovocítico, con un aumento del área y una disminución relativa de la superficie o fosfolípidos en la membrana. Estos resultados están de acuerdo con el aumento en el tamaño de los ovocitos y el aumento en el contenido de lípidos en los ovarios de hembras alimentadas con *Ulva*.

La mortalidad fue otro parámetro afectado por la inclusión de *Ulva*. Las hembras alimentadas con *Ulva* tuvieron una menor incidencia de mortalidad, mientras que no se encontraron diferencias para los machos. Curiosamente, cuando las hembras no son sometidas a ablación y puestas en producción, la mortalidad no se ve afectada por *Ulva*

(Corral-Rosales et al., 2018). La ablación de hembras es una práctica común en los laboratorios de reproducción, y si bien la mortalidad se ha reducido considerablemente con la práctica, sigue siendo un problema, porque incluso si las hembras no mueren inmediatamente, tienden a verse más afectadas por condiciones adversas. Por ejemplo, pueden morir más fácilmente después de mudar. Aquí, la muda no se vio afectada por el consumo de *Ulva*, ni en estudios previos cuando las hembras no fueron sometidas a ablación (Corral-Rosales et al., 2018a), aun incluso cuando la hormona inhibidora de la muda también se secretada en el tallo de los ojos, al igual que la hormona inhibidora de las gónadas. Adicionalmente, la muda puede estar regulada por los ecdisteroides y el metil farnesoato, ambas hormonas estables que pueden almacenarse y usarse durante el corto período de reproducción en el laboratorio, ya que los ciclos de muda pueden durar todo un mes (Chang, 1993). La inclusión de *U. clathrata* al 2% en la dieta para los reproductores *L. vannamei* reduce el agotamiento reproductivo y aumenta la producción de nauplios y promueve la sobrevivencia en hembras ablacionadas sin afectar la de machos. El consumo de *Ulva* aumenta el contenido de lípidos en los ovarios, los triglicéridos en los ovocitos postvitelogénicos y promueve el desarrollo de ovocitos tardíos vitelogénicos y postvitelogénicos.

Capítulo 3

8. Ácidos grasos, esteroides, compuestos fenólicos y carotenoides en respuesta a la inclusión dietaria de *Ulva clathrata* en camarones reproductores *Litopenaeus vannamei*

Artículo: Corral-Rosales, D. C., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E., Arjona, O. y Palacios, E., (2019). Fatty acids, sterols, phenolic compounds and carotenoid changes in response to dietary inclusion of *Ulva clathrata* in shrimp *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Applied Phycology*. 00-00.

Anexo 3

8.1. Resumen

En este estudio se evaluaron los cambios en las reservas de lípidos como resultado de la suplementación de 3.8% de harina de *Ulva clathrata* (basada en el peso seco de todos los ingredientes) en la dieta fresca para reproductores *Litopenaeus vannamei* en un laboratorio larvas comercial. Se analizó el perfil de ácidos grasos, esteroides, carotenoides y compuestos fenólicos de los ingredientes de la dieta y de las gónadas, el hepatopáncreas y los músculos de hembras ablacionadas. La harina de *Ulva* mostró una alta proporción de ácido palmítico (16:0, 35.5%), su esteroil principal fue el isofucoesterol (95%) seguido de fucoesterol (1.8%) y su contenido de carotenoides fue de 3.6 mg g⁻¹. En el calamar el 22:6n-3 fue el principal ácido graso con casi el 26%, los poliquetos presentaron una alta proporción de 16:0 (17%), el krill mostró una alta proporción de 16:0 (23%) y los mejillones tuvieron altas proporciones de 22:6n-3 (37%). El principal esteroil de los componentes frescos fue el colesterol (97.0%, 79.1%, 78.6% y 49.4% respectivamente). Los camarones alimentados con la dieta suplementada con *Ulva* tuvieron proporciones significativamente más altas de ácido araquidónico (20:4n-6) en los acilglicéridos de las gónadas maduras (84% de aumento) en comparación con las gónadas maduras del grupo control. En los fosfolípidos de las gónadas maduras, hubo un aumento del 30% de 18:3n-3, 13% de 20:4n-6 y 10% de ácido docosahexaenoico (22:6n-3) en camarones alimentados con *Ulva* en comparación con la dieta control. El 22:6n-3 también aumentó 51% en las reservas de lípidos del hepatopáncreas de camarones alimentados con *Ulva* en comparación con el control. Los carotenoides aumentaron 43% en las gónadas y cinco veces en el hepatopáncreas de las hembras maduras alimentadas con *Ulva*. En gónadas, la proporción de fucoesterol e isofucoesterol pasó de ser indetectable en controles a 0.3 y 0.2%, respectivamente, en camarones alimentados con *Ulva*. No se encontraron diferencias significativas en el músculo. Los compuestos fenólicos en la gónada fueron más altos en las gónadas maduras en comparación con las inmaduras, pero no se encontraron diferencias significativas en relación con el consumo de *Ulva*. Los carotenoides y los compuestos fenólicos presentes en *Ulva* podrían actuar como antioxidantes de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), aumentando la proporción de 20:4n-6 y 22:6n-3. Sin embargo, otros mecanismos asociados a estos compuestos y al fucoesterol pueden

sincronizar la maduración del ovocito y aumentar del transporte de HUFA durante la vitelogénesis, y en conjunto tener un impacto adicional en el rendimiento reproductivo de las hembras

8.2. Introducción

El rendimiento reproductivo en el camarón está asociado a la nutrición. El suministro inadecuado de nutrientes durante la nutrición de los reproductores afecta la maduración del ovario, la calidad del desove (Wouters et al., 2001a) y la embriogénesis (Harrison, 1990; Pérez-Velázquez et al., 2002). Pocos estudios han logrado tener un buen rendimiento reproductivo cuando no se incluye una dieta fresca de invertebrados. Esto es desafortunado, ya que los ingredientes frescos además de ser caros, tienen una variabilidad en su composición nutricional debido a la época de captura, estado fisiológico y proceso de conservación (Cahu et al., 1995; Coman et al., 2011; Kacem et al., 2011). En contraste, hay reportes que han logrado mantener o incluso aumentar el rendimiento reproductivo utilizando dietas frescas complementadas con antioxidantes como ácido ascórbico, alginato de sodio, biofloc y espirulina, por mencionar algunos (Regunathan y Wesley, 2006; Chung et al., 2011; Cardona et al., 2016). También se ha reportado un aumento en la producción cuando se utilizan lípidos, particularmente HUFA (Wouters et al., 2001b; Huang et al., 2008; Hoa et al., 2009), como 20:4n-6 (Xu et al., 2017). Los HUFA se acumulan en grandes cantidades en la gónada de las hembras durante la maduración y se transfieren a los huevos donde son esenciales para la formación de membranas celulares, órganos y como fuente de energía durante el desarrollo lecitotrófico (Cahu et al., 1995; Wouters et al., 2001b; Vázquez-Boucard et al., 2004). Previamente, encontramos que la macroalga seca *U. clathrata* incluida en el alimento fresco de reproductores durante un ciclo comercial, incrementa la capacidad reproductiva, medida por el aumento de la tasa de eclosión, la fecundidad y la fertilidad en hembras con y sin ablación (Corral-Rosales et al., 2018a). Por otra parte, *Ulva sp.* es rica en 18:3n-3 (Carrillo et al., 2008, Serviere-Zaragoza et al., 2014), un ácido graso omega 3 (n-3) que es un precursor de HUFA, como son el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) y 22:6n-3, ambos esenciales para el camarón (Izquierdo et al., 2001; Wouters et al., 2001b). Una dieta deficiente en HUFA n-3 administrada a los camarones durante

la maduración tiene un efecto negativo en el desarrollo del ovario, la fecundidad y la calidad del huevo (Pérez-Velázquez et al., 2002; Mirheydari et al., 2014). Las algas también son una fuente de compuestos bioactivos que tienen propiedades antioxidantes, como los florotanninos, los polisacáridos sulfatados, los pigmentos, el fucosterol, las vitaminas C y A y los compuestos fenólicos (Godard et al., 2009; Yildiz et al., 2012; Elizondo-Reyna et al., 2016): Los HUFA son propensos a la oxidación y los antioxidantes pueden prevenir esta oxidación (Coman et al., 2011; Wang et al., 2015). En el presente capítulo, analizamos el efecto de incorporar la harina de *U. clathrata* en la dieta de reproductores de camarón sobre los ácidos grasos, el contenido de esteroides y carotenoides en tejidos de hembras durante un ciclo de maduración en un laboratorio comercial.

8.3. Materiales y métodos

8.3.1. Diseño experimental y *U. clathrata*

Las condiciones de maduración, y la obtención y preparación de la dieta con *Ulva* se muestran en el Capítulo 1, la obtención de las muestras y la captura de hembras se muestran en el Capítulo 2.

8.3.2. Colección de muestras

Al inicio del bioensayo se tomó una muestra representativa de harina de *Ulva* y de los ingredientes frescos congelados y se mantuvieron a -80°C para su posterior análisis. Al final del ciclo de producción (45 días) 12 hembras por tratamiento, seleccionadas en dos etapas de maduración diferentes: 6 inmaduras y 6 maduras fueron muestreadas para el análisis de lípidos. Las hembras enteras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. Las muestras de gónada, hepatopáncreas y músculo de hembras congeladas se diseccionaron sobre una placa congelada, las muestras de los tejidos diseccionados y los ingredientes de la dieta fresca fueron pesados y preparados para el análisis de ácidos grasos, esteroides, actividad antioxidante y carotenoides.

8.3.3. Análisis de lípidos

8.3.3.1. Extracción de lípidos

Se pesaron aproximadamente 100 mg de muestra de tejido fresco en un vial de 8 mL con tapa de teflón y se agregó 6 mL de solución de Folch (una mezcla de cloroformo metanol 2:1 v/v), 10 µL de antioxidante BHT (2, 6-di-ter-butyl-p-cresol) y 10 µL del estándar interno C23:0 (Ácido Tricosanoico). Posteriormente la muestra se agitó unos instantes con un vortex, y se dejó reposar durante 24 horas a -20 °C.

8.3.3.2. Determinación de lípidos por gravimetría

Se colocaron tubos de borosilicato de 10 mL en un horno de temperatura controlada a 80°C por 24 horas (como mínimo), hasta peso constante. Se colocaron los tubos en un desecador y se dejaron enfriar por 1 hora. Se registró el peso de cada uno de los tubos. Posteriormente se agregó 2 mL del extracto lipídico (obtenido por el método de Folch) y se evaporó a sequedad con gas nitrógeno. Se colocaron los tubos nuevamente en el horno de temperatura controlada a 30°C por 24 h y al finalizar el tiempo se colocaron en un desecador por 1 hora, finalmente se registró el peso de cada tubo más los lípidos

8.3.3.3. Análisis de carotenoides

La muestra se disgregó utilizando un homogeneizador de vidrio y se sónico en un baño con hielo por 15 minutos. De los 6 mL, 1 mL se tomó para el análisis de carotenoides que se filtró usando una micro columna de silica y eluyendo con 10 mL de solución Folch. Se concentró la muestra en un evaporador de solventes (Jouan) hasta aproximadamente 1 mL y luego en viales de 2 mL a sequedad con gas nitrógeno. La muestra se resuspendió en acetona (grado HPLC, Fermont-6015) y se analizó en un espectrofotómetro multiskan, midiendo la absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 470, 653 y 666 nm, utilizando como blanco acetona grado HPLC, y aplicando las cuantificaciones propuestas por Wellburn (1994).

$$\text{Clorofila a} = 15.68 (\text{Abs } 666) - 7.34 (\text{Abs } 653) \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{Clorofila b} = 27.05 (\text{Abs } 653) - 11.21 (\text{Abs } 666) \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 1000 (\text{Abs } 470) - 2.86 (\text{clorofila a}) - 129.2 (\text{clorofila b}) \mu\text{g mL}^{-1}$$

8.3.3.4. Análisis de ácidos grasos en lípidos neutros y polares

Se prepararon micro-columnas utilizando pipetas Pasteur empacadas con fibra de vidrio y 3 cm sílica hidratada al 6%, y se vortexearon para acomodar las partículas de sílice. La muestra (3 mL) se evaporó a 0.5 mL utilizando nitrógeno gaseoso y se pasó por la columna, eluyendo con 10 mL de cloroformo–metanol 98:2 (v/v) para lípidos neutros; seguida de 15 mL de metanol para lípidos polares. El volumen total de los lípidos neutros y polares, se dividió en dos partes iguales. Una parte se utilizó para la determinación de ácidos grasos metil esterificados y la otra (5 mL LN y 7.5 mL LP) para análisis de esteroides.

Los extractos obtenidos de lípidos totales se evaporaron a sequedad con nitrógeno gaseoso y trans-esterificados con 800 μ L de Trifloruro de Boro-metanol ($\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$) a 85°C por 15 min. Se dejaron enfriar y se les agregó 1 mL de hexano y fueron lavados añadiendo 1.5 mL de agua destilada. Después de agitar y separar las dos fases por centrifugación (2,000 rpm x 5 min a 5 °C), la fase inferior (Agua destilada+ $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ + restos de carbohidratos) se separó de la fase superior (hexano + ácidos grasos metil-esterificados), repitiendo el lavado dos veces. Posteriormente se recuperó el hexano y se analizaron los FAME en un cromatógrafo de gases (CG) marca Agilent Technologies 6890N equipado con un detector de ionización de flama (FID); utilizando una columna: DB-23 de Silica fundida; (50%-Cianopropil)-metilpolisiloxano de 30m L x 0.25mm ID x 0.25 μ m espesor de película, J&W Scientific. Se usó gases acarreadores: hidrógeno, nitrógeno y aire; grado cromatográfico (INFRA). La identificación de cada ácido graso metil-esterificado se corroboró comparando el tiempo de retención de la muestra contra estándares externos (SIGMA). La concentración se calculó en base con el área del estándar interno (23:0, SIGMA).

8.3.3.5. Análisis de esteroides

Se tomaron 2 mL del extracto de lípidos, se evaporaron a sequedad y se esterificaron agregando a cada muestra 2000 μ L de metóxido de sodio en 0.5 M de metanol, con agitación constante por 90 minutos a temperatura de ambiente. Posteriormente se agregó 1,200 μ L de hexano y 2 mL de agua previamente extraída con hexano y se agitó por 10 minutos. Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos a 5°C. La muestra se separó en

dos fases. Se desechó la parte inferior (metanol + sodio + impurezas); dejando únicamente el hexano que contiene los esteroides. Este proceso de lavado se repitió varias veces. Finalmente, se recuperaron los esteroides más hexano y se transfirieron a un vial ámbar de 2 mL y almacenaron a -20°C para inyectarlos al CG.

Los esteroides se analizaron en un CG marca Agilent Technologies 6890N con detector de ionización de flama (FID); utilizando una columna capilar Rtx®-65 de Silica fundida (Crossbond «65%-difenil-35% dimetil polisiloxano) de 15 m de longitud x 0.25 de espesor de película x 0.25 mm de diámetro interno (Restek). Se usó hidrógeno como gas acarreador a presión constante de 50 psi y una rampa de temperatura de $50\text{--}260^{\circ}\text{C}$. La identificación de los esteroides se realizó comparando el tiempo de retención del cromatograma de la muestra con los estándares externos (Brasicasterol, Sigma, B4936; Campesterol, Sigma, C5157; β -Sitosterol, Sigma, S9889; Fucosterol, Sigma, F5379; Colesterol, Sigma, C8667; Estigmasterol, Sigma, S2424; Dihidro-colesterol, Sigma, D6128), y la cuantificación en base al estándar interno de la muestra (Colestano, Marca Sigma, D6128).

8.3.4. Análisis de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos en gónada, músculo y hepatopáncreas de hembras reproductoras se determinaron colocando 200 mg de tejido en viales Eppendorf con 1 mL de etanol al 80% (v/v) y se incubaron a 70°C durante 1 h. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min. Posteriormente se tomó una alícuota de 200 μL de extracto de muestra y se adicionaron 50 μL de reactivo Folin-Ciocalteu 365, se incubaron por 3 min y se les adicionó 750 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5% (p/v). La reacción se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 2 h y la absorbancia se leyó a 765 nm de acuerdo con el método de Cabello-Pasini et al. (2011).

8.3.5. Análisis estadístico

Se utilizaron análisis de varianza de dos vías (ANOVA) utilizando el tratamiento (T: con dos niveles, con o sin *Ulva*) y el estadio de maduración (E: dos niveles, maduro e inmaduro) para los ácidos grasos, esteroides y variables de compuestos fenólicos, seguido de una prueba post-hoc de Tukey para la comparación de medias cuando se encontró un efecto significativo (STATISTICA Software, versión 8.0). Adicionalmente

se realizaron análisis de regresión lineal para determinar las correlaciones entre los ácidos grasos, los esteroides y los carotenoides de gónadas y hepatopáncreas.

8.4. Resultados

8.4.1. Ácidos grasos de *Ulva* y de los ingredientes de la dieta fresca

Los perfiles de ácidos grasos de *U. clathrata* y de los ingredientes de la dieta fresca para maduración se muestran en la Tabla 3-1. *Ulva* presentó una alta proporción de ácido palmítico (16:0, 35.5%), seguido de 18:3n-3 (11.1%) y ácido linoleico (18:2n-6, 8.1%). Entre los ácidos grasos esenciales, solo 20:5n-3 y 20:4n-6 estuvieron por encima del 1%, mientras que los niveles de 22:6n-3 fueron muy bajos (0.1%).

En el calamar, 22:6n-3 fue el principal ácido graso con casi el 28.7%, seguido de 16:0 (25.8%) y 20:5n-3 (15.8%). Los poliquetos presentaron una alta proporción de 16:0 (17.2%), 18:1n-9 (14.3%), 18:2n-6 (11.5%) y 20:5n-3 (7.2%). El krill mostró una alta proporción de 16:0 (23.3%) seguido de 20:5n-3 (13.9%) y 18:1n-9 (10.3%). En los mejillones, el ácido graso principal fue 22:6n-3 (36.8%), seguido de 20:5n-3 (15.5%).

El esteroide principal en *Ulva* fue isofucoesterol (95%) seguido de fucoesterol (1.8%). En el calamar, el poliqueto, el krill y el mejillón, el esteroide más abundante fue el colesterol con 97.0%, 79.1%, 78.6% y 49.4% respectivamente. Los compuestos fenólicos solo se analizaron en *Ulva*, mientras que los carotenoides se analizaron en todos los ingredientes, pero se detectaron principalmente en *Ulva* (3.6 mg g⁻¹) y krill (2.1 mg g⁻¹).

8.4.2. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar de gónadas

Las proporciones de ácidos grasos de la fracción neutra de las gónadas de hembra maduras e inmaduras se presentan en la Tabla 3-2.

Tabla 3-1. Ácidos grasos (% del total), esteroides (% del total), carotenoides (mg g⁻¹) y lípidos totales (mg g⁻¹) medidos en harina de *U. clathrata* e ingredientes frescos utilizados en la dieta (Medias ± ES).

| Parámetro | <i>Ulva</i> (n=3) | Calamar (n=3) | Poliqueto (n=3) | Kril (n=3) | Mejillón (n=3) |
|-----------------|----------------------|------------------|--------------------|---------------|-------------------|
| 16:0 | 35.5 ± 1.1 | 25.8 ± 2.0 | 17.2 ± 3.5 | 23.3 ± 2.1 | 13.6 ± 0.3 |
| 18:0 | 0.6 ± 0.0 | 5.3 ± 0.1 | 4.3 ± 0.3 | 1.5 ± 0.2 | 2.7 ± 0.0 |
| 20:0 | 0.6 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 |
| 16:1n-9 | 6.2 ± 1.0 | 0.4 ± 0.1 | 1.5 ± 0.1 | 0.6 ± 0.1 | 2.6 ± 0.6 |
| 16:1n-7 | 4.0 ± 0.1 | 1.1 ± 0.1 | 4.4 ± 1.2 | 4.3 ± 1.3 | 4.3 ± 0.0 |
| 17:1n-8 | 3.8 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 0.2 ± 0.1 | 0.4 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 |
| 18:1n-9 | 1.3 ± 0.0 | 3.2 ± 0.2 | 14.3 ± 8.5 | 10.3 ± 1.1 | 1.6 ± 0.1 |
| 18:1n-7 | 6.9 ± 0.4 | 2.0 ± 0.1 | 6.1 ± 2.1 | 7.5 ± 1.5 | 1.6 ± 0.0 |
| 20:1n-9 | 0.2 ± 0.0 | 4.3 ± 0.2 | 3.2 ± 0.4 | 0.7 ± 0.0 | 2.1 ± 0.3 |
| 20:1n-7 | 0.1 ± 0.1 | 0.2 ± 0.1 | 2.8 ± 0.6 | 0.5 ± 0.0 | 2.8 ± 0.4 |
| 18:2n-6 | 8.1 ± 0.1 | 0.5 ± 0.2 | 11.5 ± 3.9 | 2.0 ± 0.5 | 1.3 ± 0.1 |
| 18:3n-6 | 1.0 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.2 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 |
| 18:3n-3 | 11.1 ± 0.2 | 0.2 ± 0.0 | 2.1 ± 0.5 | 2.3 ± 0.4 | 1.6 ± 0.0 |
| 20:2n-6 | 0.1 ± 0.0 | 0.4 ± 0.1 | 7.1 ± 2.1 | 0.1 ± 0.0 | 0.4 ± 0.0 |
| 20:3n-3 | 0.0 ± 0.0 | 0.5 ± 0.0 | 0.6 ± 0.2 | 0.3 ± 0.0 | 0.4 ± 0.0 |
| 20:4n-6 | 1.1 ± 0.2 | 1.8 ± 0.6 | 2.1 ± 0.4 | 0.3 ± 0.0 | 2.2 ± 0.6 |
| 20:5n-3 | 1.8 ± 0.1 | 15.8 ± 1.1 | 7.2 ± 0.6 | 13.9 ± 0.8 | 15.5 ± 0.7 |
| 22:6n-3 | 0.1 ± 0.0 | 28.7 ± 2.1 | 1.8 ± 0.1 | 8.7 ± 0.7 | 36.8 ± 1.1 |
| ΣSaturados | 43.7 ± 1.1 | 35.9 ± 2.5 | 24.5 ± 3.7 | 39.0 ± 2.7 | 19.3 ± 0.1 |
| ΣMUFA | 25.1 ± 0.9 | 14.0 ± 1.0 | 39.1 ± 3.2 | 26.1 ± 0.8 | 17.1 ± 1.6 |
| ΣPUFA | 31.2 ± 0.8 | 50.1 ± 3.6 | 36.4 ± 0.5 | 34.9 ± 3.3 | 63.5 ± 1.4 |
| ΣHUFA | 10.4 ± 0.3 | 48.3 ± 4.0 | 14.2 ± 1.7 | 29.5 ± 2.1 | 59.8 ± 1.3 |
| n-3/n-6 | 1.0 ± 0.0 | 10.5 ± 0.0 | 0.6 ± 0.0 | 3.4 ± 0.0 | 7.8 ± 0.6 |
| DHC | ND | 3.0 ± 0.6 | 4.7 ± 1.4 | 8.9 ± 1.6 | 10.9 ± 0.2 |
| Colesterol | 0.4 ± 0.0 | 97.0 ± 0.7 | 79.1 ± 5.5 | 78.6 ± 3.6 | 49.4 ± 1.0 |
| BRS | 0.1 ± 0.1 | ND | 3.6 ± 1.4 | ND | 12.1 ± 0.7 |
| Campesterol | 0.2 ± 0.0 | ND | 7.8 ± 1.3 | 12.5 ± 2.0 | 4.3 ± 0.1 |
| Stigmasterol | 1.0 ± 0.1 | ND | 1.9 ± 0.7 | ND | 17.6 ± 0.8 |
| B-Sitosterol | 1.4 ± 0.0 | ND | 2.8 ± 0.8 | ND | 5.5 ± 0.1 |
| Fucosterol | 1.8 ± 0.0 | ND | ND | ND | ND |
| Isofucosterol | 95.0 ± 0.1 | ND | ND | ND | ND |
| Carotenoides | 3.6 ± 1.1 | ND | 0.1 ± 0.0 | 2.1 ± 0.4 | 0.6 ± 0.1 |
| Lípidos totales | 31.8 ± 7.2 | 70.1 ± 8.8 | 63.6 ± 9.8 | 64.5 ± 2.0 | 75.0 ± 2.0 |

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; DHC: deshidrocolesterol; BRS: Brassicasterol, PC: compuestos fenólicos. ND: no detectado.

Tabla 3-2. Perfil de ácidos grasos de la fracción neutra de gónadas (% del total, media \pm ES) de reproductores hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días.

| Estadio Tratamiento | Inmadura (n=12) | | Madura (n=12) | | ANOVA | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------|----|-----|
| | Control | <i>Ulva</i> | Control | <i>Ulva</i> | E | T | ExT |
| 16:0 | 28.9 \pm 2.0a | 38.3 \pm 2.3b | 25.6 \pm 2.0a | 27.1 \pm 2.0a | ** | * | NS |
| 18:0 | 7.3 \pm 0.7ab | 9.9 \pm 0.8b | 6.9 \pm 0.7ab | 6.7 \pm 0.7a | * | NS | NS |
| 20:0 | 0.5 \pm 0.1a | 0.8 \pm 0.1b | 0.5 \pm 0.1a | 0.5 \pm 0.1a | * | NS | NS |
| 16:1n-9 | 1.4 \pm 0.1a | 1.0 \pm 0.2a | 1.5 \pm 0.1b | 1.6 \pm 0.1b | * | NS | NS |
| 16:1n-7 | 10.7 \pm 0.8a | 6.1 \pm 0.9b | 11.7 \pm 0.8a | 9.8 \pm 0.8a | * | ** | NS |
| 17:1n-8 | 0.8 \pm 0.1 | 0.7 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 18:1n-9 | 15.9 \pm 0.7a | 10.5 \pm 0.9b | 16.0 \pm 0.7a | 13.5 \pm 0.7ab | NS | ** | NS |
| 18:1n-7 | 5.1 \pm 0.3a | 3.3 \pm 0.3b | 5.4 \pm 0.3a | 5.1 \pm 0.3a | ** | ** | * |
| 20:1n-9 | 1.6 \pm 0.2a | 1.2 \pm 0.3a | 2.3 \pm 0.2b | 2.6 \pm 0.2b | ** | NS | NS |
| 20:1n-7 | 0.6 \pm 0.1a | 0.4 \pm 0.1b | 0.7 \pm 0.1a | 0.5 \pm 0.1b | NS | ** | NS |
| 18:2n-6 | 1.6 \pm 0.2 | 1.7 \pm 0.2 | 1.8 \pm 0.2 | 1.7 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 18:3n-6 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 18:3n-3 | 1.6 \pm 0.2 | 2.0 \pm 0.2 | 1.9 \pm 0.2 | 2.1 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 20:2n-6 | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:3n-3 | 0.4 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | 3.0 \pm 0.3a | 3.0 \pm 0.4a | 2.5 \pm 0.3a | 4.6 \pm 0.3b | NS | ** | ** |
| 20:5n-3 | 8.6 \pm 0.7 | 8.2 \pm 0.8 | 8.7 \pm 0.7 | 8.6 \pm 0.7 | NS | NS | NS |
| 22:6n-3 | 7.7 \pm 0.7 | 8.3 \pm 0.8 | 8.8 \pm 0.7 | 9.7 \pm 0.7 | NS | NS | NS |
| Σ Saturados | 38.2 \pm 2.7a | 51.1 \pm 3.1b | 34.4 \pm 2.7a | 35.8 \pm 2.7a | ** | * | NS |
| Σ MUFA | 37.1 \pm 1.9a | 23.8 \pm 2.2b | 39.2 \pm 1.9a | 35.1 \pm 1.9a | ** | ** | * |
| Σ PUFA | 24.7 \pm 1.3a | 25.0 \pm 1.5a | 26.4 \pm 1.3a | 29.1 \pm 1.3b | * | NS | NS |
| Σ HUFA | 20.1 \pm 1.1a | 20.1 \pm 1.3a | 21.2 \pm 1.1a | 23.9 \pm 1.1b | * | NS | NS |
| n-3/n-6 | 3.0 \pm 0.3 | 3.1 \pm 0.3 | 3.0 \pm 0.3 | 2.5 \pm 0.3 | NS | NS | NS |

*Diferencias significativas ($P < 0.05$); **Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$); letras diferentes indican diferencia significativa entre medias. Ver tabla 3-1 para nomenclatura.

En la fracción neutra de las gónadas se encontraron diferencias significativas en las hembras en relación con la etapa de maduración para 16:0, 18:0, 20:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:1n-7, 20:1n-9, suma de saturados, MUFA, PUFA y HUFA, siendo el 16:0 y el 20:0 mayores en hembras inmaduras con *Ulva* 40% y 60% respectivamente, el 18:0 fue mayor en hembras inmaduras con un valor de 9.9% y menor en hembras maduras con *Ulva* con 6.7%. El 16:1n-9 fue mayor en las hembras maduras 25%, el 16:1n-7 y el 18:1n-7 fueron menores en las hembras inmaduras con *Ulva* con valores de 6.1%, 3.3% respectivamente y el 20:1n-9 fue mayor en las hembras maduras un 70%.

En camarones alimentados con *Ulva*, se encontraron diferencias significativas para 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-7, 20:4n-6, suma de saturados y MUFA

presentando todos más altos porcentaje al ser alimentados con *Ulva*. La interacción fue significativa para 18:1n-7, 20:4n-6 y MUFA. El 20:4n-6 aumentó significativamente en las hembras maduras alimentadas con *Ulva* 64% en comparación con las hembras inmaduras, sin diferencias en las hembras inmaduras independientemente del tratamiento.

Los ácidos grasos saturados fueron significativamente más altos en las hembras inmaduras alimentadas con *Ulva* en comparación con las hembras maduras (51.1% vs. 38.2% en inmaduras y 35.8% vs. 34.4% en maduras), mientras que se encontró el efecto opuesto para MUFA (37.1% vs. 23.8%; 39.2% vs. 35.1%).

La proporción de ácidos grasos de la fracción polar de las gónadas de hembras maduras e inmaduras se presenta en la Tabla 3-3. Se encontraron diferencias significativas en las hembras en relación con la etapa de maduración para 16:1n-9, 22:6n-3, PUFA y HUFA. El 16:1n-9 fue mayor en hembras maduras con *Ulva* con un valor de 0.6% y menor en inmaduras controles con 0.3%, el 22:6n-3 fue mayor en maduras con un valor de 9.1% y menor en inmaduras con *Ulva* con 6.5%.

En camarones alimentados con *Ulva*, se encontraron diferencias significativas para 18:3n-3, 20:4n-6 y la relación n-3/n-6. Siendo el 18:3n-3 y el 20:4n-6 mayores en hembras alimentadas con *Ulva* 50% y 17% y la n-3/n-6 menor 25%. Solo el 22:6n-3 tuvo una interacción significativa entre la etapa de maduración y el tratamiento, con valores más bajos en inmaduras (6.5%) y valores más altos (9.1%) en hembras maduras alimentadas con *Ulva*, y valores intermedios en camarones alimentados con la dieta control (8%, 8.3% respectivamente).

8.4.3. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar del hepatopáncreas

Las proporciones de ácidos grasos de la fracción neutra del hepatopáncreas de hembras maduras e inmaduras se presentan en la Tabla 3-4. No hubo diferencias significativas entre los ácidos grasos en relación con la etapa de maduración, tampoco fue significativa la interacción entre la etapa de maduración y el tratamiento en los lípidos neutros del hepatopáncreas.

Tabla 3-3. Perfil de ácidos grasos de la fracción polar de gónadas (% del total de ácidos grasos, medias \pm ES) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días

| Estadio Tratamiento | Inmadura | | Madura | | ANOVA | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-------|----|-----|
| | Control | <i>Ulva</i> | Control | <i>Ulva</i> | E | T | ExT |
| 16:0 | 23.1 \pm 0.5 | 23.6 \pm 0.6 | 22.1 \pm 0.5 | 23.1 \pm 0.6 | NS | NS | NS |
| 18:0 | 10.9 \pm 0.4 | 10.8 \pm 0.5 | 12.0 \pm 0.4 | 11.4 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 20:0 | 0.3 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 16:1n-9 | 0.3 \pm 0.1a | 0.4 \pm 0.1ab | 0.5 \pm 0.1ab | 0.6 \pm 0.1b | * | NS | NS |
| 16:1n-7 | 8.8 \pm 0.3 | 8.2 \pm 0.4 | 8.1 \pm 0.3 | 8.2 \pm 0.4 | NS | NS | NS |
| 17:1n-8 | 0.7 \pm 0.2 | 0.7 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.2 | 0.8 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 18:1n-9 | 17.9 \pm 0.4 | 17.2 \pm 0.5 | 16.8 \pm 0.4 | 16.3 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 18:1n-7 | 5.7 \pm 0.5 | 6.5 \pm 0.6 | 5.7 \pm 0.5 | 5.3 \pm 0.6 | NS | NS | NS |
| 20:1n-9 | 2.2 \pm 0.3 | 2.5 \pm 0.4 | 3.0 \pm 0.3 | 2.5 \pm 0.4 | NS | NS | NS |
| 20:1n-7 | 0.8 \pm 0.2 | 0.5 \pm 0.2 | 0.6 \pm 0.2 | 0.5 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 18:2n-6 | 1.6 \pm 0.1 | 2.0 \pm 0.2 | 1.6 \pm 0.1 | 1.7 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 18:3n-6 | 0.2 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 18:3n-3 | 1.2 \pm 0.1a | 1.9 \pm 0.1b | 1.3 \pm 0.1a | 1.7 \pm 0.1b | NS | * | NS |
| 20:2n-6 | 0.6 \pm 0.1 | 0.7 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | 0.7 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:3n-3 | 0.4 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | 2.9 \pm 0.2a | 3.5 \pm 0.3b | 3.1 \pm 0.2a | 3.5 \pm 0.3b | NS | * | NS |
| 20:5n-3 | 9.4 \pm 0.6 | 8.3 \pm 0.7 | 9.5 \pm 0.6 | 8.8 \pm 0.7 | NS | NS | NS |
| 22:6n-3 | 8.0 \pm 0.5ab | 6.5 \pm 0.5a | 8.3 \pm 0.5ab | 9.1 \pm 0.5b | ** | NS | * |
| Σ Saturados | 36.2 \pm 0.7 | 37.3 \pm 0.8 | 36.6 \pm 0.7 | 37.1 \pm 0.8 | NS | NS | NS |
| Σ MUFA | 38.4 \pm 1.1 | 37.6 \pm 1.2 | 37.2 \pm 1.1 | 35.8 \pm 1.2 | NS | NS | NS |
| Σ PUFA | 25.4 \pm 1.1 | 25.1 \pm 1.3 | 26.3 \pm 1.1 | 27 \pm 1.3 | * | NS | NS |
| Σ HUFA | 21.1 \pm 0.9 | 19.5 \pm 1.1 | 21.6 \pm 0.9 | 21.9 \pm 1.1 | * | NS | NS |
| n-3/n-6 | 3.0 \pm 0.2a | 2.2 \pm 0.2b | 2.9 \pm 0.2a | 2.8 \pm 0.2a | NS | * | NS |

Ver tabla 3-2

Se presentaron diferencias significativas en relación con el tratamiento, siendo más bajos las proporciones de 16:1n-7, 18:1n-9 y 18:2n-6 ($P < 0.05$) en las hembras que consumieron *Ulva*, mientras que la proporción del 22:6n-3 los PUFA y HUFA aumentaron (39%, 22% y 30%) en la fracción neutra de hepatopáncreas de las hembras alimentadas con *Ulva*.

En la fracción polar de los lípidos del hepatopáncreas (Tabla 3-5), solo el 20:5n-3 se vio significativamente afectado por la etapa de maduración y la interacción, con niveles reducidos en hembras inmaduras alimentadas con *Ulva* (14.1%) en comparación con los otros tratamientos (15.4-15.8%).

Tabla 3-4. Perfil de ácidos grasos de la fracción neutra del hepatopáncreas (% del total, medias \pm ES) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días

| Estadio Tratamiento | Inmadura | | Madura | | ANOVA | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|----|-----|
| | Control | <i>Ulva</i> | Control | <i>Ulva</i> | E | T | ExT |
| 16:0 | 19.8 \pm 2.9 | 16.7 \pm 2.8 | 22.4 \pm 2.9a | 16.5 \pm 2.4 | NS | NS | NS |
| 18:0 | 8.1 \pm 1.3 | 7.2 \pm 1.2 | 7.0 \pm 1.3 | 6.0 \pm 1.3 | NS | NS | NS |
| 20:0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 16:1n-9 | 1.9 \pm 0.3 | 1.8 \pm 0.3 | 1.4 \pm 0.3 | 2.1 \pm 0.3 | NS | NS | NS |
| 16:1n-7 | 4.8 \pm 0.4b | 3.8 \pm 0.3a | 4.9 \pm 0.3b | 3.5 \pm 0.3a | NS | * | NS |
| 17:1n-8 | 0.4 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 18:1n-9 | 7.4 \pm 0.5b | 6.2 \pm 0.6a | 7.9 \pm 0.5b | 5.5 \pm 0.5a | NS | * | NS |
| 18:1n-7 | 5.0 \pm 0.4 | 4.2 \pm 0.3 | 4.7 \pm 0.4 | 4.6 \pm 0.4 | NS | NS | NS |
| 20:1n-9 | 3.7 \pm 0.3b | 2.9 \pm 0.3a | 3.2 \pm 0.3b | 3.4 \pm 0.3b | NS | * | NS |
| 20:1n-7 | 1.5 \pm 0.5 | 1.1 \pm 0.5 | 1.6 \pm 0.5 | 1.1 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 18:2n-6 | 1.7 \pm 0.2a | 1.8 \pm 0.2a | 2.0 \pm 0.2b | 1.5 \pm 0.2a | NS | * | NS |
| 18:3n-6 | 0.2 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 18:3n-3 | 1.8 \pm 0.5 | 2.3 \pm 0.6 | 2.3 \pm 0.5 | 1.6 \pm 0.6 | NS | NS | NS |
| 20:2n-6 | 1.0 \pm 0.1a | 1.2 \pm 0.1b | 1.0 \pm 0.1a | 1.3 \pm 0.1b | NS | * | NS |
| 20:3n-3 | 0.7 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 | 0.7 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | 3.3 \pm 0.5 | 3.9 \pm 0.5 | 2.9 \pm 0.5 | 3.7 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 20:5n-3 | 11.6 \pm 1.5 | 13.3 \pm 1.5 | 11.5 \pm 1.5 | 13.2 \pm 1.5 | NS | NS | NS |
| 22:6n-3 | 14.8 \pm 1.7a | 18.8 \pm 1.7b | 13.6 \pm 1.7a | 20.6 \pm 1.7b | NS | ** | NS |
| Σ Saturados | 32.2 \pm 2.2b | 27.5 \pm 2.7a | 33.3 \pm 2.7b | 26.2 \pm 2.2a | NS | ** | NS |
| Σ MUFA | 31.1 \pm 1.1 | 28.2 \pm 1.1 | 29.6 \pm 1.1 | 28.5 \pm 1.1 | NS | NS | NS |
| Σ PUFA | 36.8 \pm 2.3a | 44.4 \pm 2.3b | 37.1 \pm 2.3a | 45.3 \pm 2.3b | NS | ** | NS |
| Σ HUFA | 31.2 \pm 2.7a | 38.2 \pm 2.7b | 29.7 \pm 2.7a | 39.8 \pm 2.7b | NS | ** | NS |
| n-3/n-6 | 4.2 \pm 0.8 | 4.5 \pm 0.8 | 4.3 \pm 0.8 | 4.5 \pm 0.8 | NS | NS | NS |

Ver tabla 3-2

8.4.4. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar de músculo

Las proporciones de ácidos grasos en la fracción neutra y polar en el músculo de hembras maduras e inmaduras se presentan en las Tablas 3-6 y 3-7, respectivamente, donde se puede notar que no hubo cambios significativos en relación con el consumo de *Ulva* o la etapa de maduración.

Tabla 3-5. Perfil de ácidos grasos de la fracción polar del hepatopáncreas (% del total, medias \pm ES) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días.

| Estadio | Inmaduras | | | | Maduras | | | | ANOVA | | | |
|--------------------|-------------|---------|------------|-------------|------------|---------|------------|-------------|------------|----|----|-----|
| | Tratamiento | Control | | <i>Ulva</i> | | Control | | <i>Ulva</i> | | E | T | ExT |
| 16:0 | | 17.8 | \pm 1.0 | 19.3 | \pm 1.0 | 19.6 | \pm 0.8 | 19.0 | \pm 1.1 | NS | NS | NS |
| 18:0 | | 10.1 | \pm 0.8 | 11.0 | \pm 0.8 | 11.3 | \pm 0.7 | 10.3 | \pm 0.9 | NS | NS | NS |
| 20:0 | | 0.2 | \pm 0.0 | 0.2 | \pm 0.0 | 0.2 | \pm 0.0 | 0.2 | \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 15:1n-8 | | 1.1 | \pm 0.1 | 1.1 | \pm 0.1 | 1.2 | \pm 0.1 | 1.3 | \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 16:1n-9 | | 1.4 | \pm 0.1 | 1.4 | \pm 0.1 | 1.3 | \pm 0.1 | 1.5 | \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 16:1n-7 | | 4.7 | \pm 0.4 | 4.1 | \pm 0.4 | 4.1 | \pm 0.4 | 4.8 | \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 17:1n-8 | | 0.4 | \pm 0.2 | 0.1 | \pm 0.2 | 0.2 | \pm 0.2 | 0.2 | \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 18:1n-9 | | 9.7 | \pm 0.5 | 9.2 | \pm 0.5 | 9.1 | \pm 0.4 | 8.7 | \pm 0.6 | NS | NS | NS |
| 18:1n-7 | | 4.4 | \pm 0.4 | 4.5 | \pm 0.4 | 3.9 | \pm 0.3 | 4.5 | \pm 0.4 | NS | NS | NS |
| 20:1n-9 | | 2.3 | \pm 0.2 | 2.2 | \pm 0.2 | 1.9 | \pm 0.2 | 2.5 | \pm 0.3 | NS | NS | NS |
| 20:1n-7 | | 0.4 | \pm 0.1 | 0.4 | \pm 0.1 | 0.3 | \pm 0.1 | 0.3 | \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 18:2n-6 | | 1.4 | \pm 0.1 | 1.6 | \pm 0.1 | 1.6 | \pm 0.1 | 1.4 | \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 18:3n-6 | | 0.2 | \pm 0.0 | 0.2 | \pm 0.0 | 0.2 | \pm 0.0 | 0.2 | \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 18:3n-3 | | 1.1 | \pm 0.2 | 1.6 | \pm 0.2 | 1.5 | \pm 0.2 | 1.2 | \pm 0.3 | NS | NS | NS |
| 20:2n-6 | | 0.7 | \pm 0.0 | 0.8 | \pm 0.0 | 0.7 | \pm 0.0 | 0.8 | \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 20:3n-3 | | 0.5 | \pm 0.0 | 0.5 | \pm 0.0 | 0.4 | \pm 0.0 | 0.5 | \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | | 4.8 | \pm 0.4 | 4.7 | \pm 0.4 | 4.7 | \pm 0.3 | 4.5 | \pm 0.4 | NS | NS | NS |
| 20:5n-3 | | 15.5 | \pm 0.3b | 14.1 | \pm 0.3a | 15.4 | \pm 0.3b | 15.8 | \pm 0.3b | * | NS | ** |
| 22:6n-3 | | 18.6 | \pm 0.8 | 17.4 | \pm 0.8 | 17.7 | \pm 0.7 | 18.1 | \pm 0.9 | NS | NS | NS |
| Σ Saturados | | 30.9 | \pm 1.5 | 33.5 | \pm 1.5 | 34.0 | \pm 1.3 | 32.2 | \pm 1.7 | NS | NS | NS |
| Σ MUFA | | 25.1 | \pm 1.5 | 23.7 | \pm 1.5 | 22.6 | \pm 1.3 | 24.2 | \pm 1.7 | NS | NS | NS |
| Σ PUFA | | 44.0 | \pm 0.7 | 42.8 | \pm 0.7 | 43.5 | \pm 0.7 | 43.6 | \pm 0.9 | NS | NS | NS |
| Σ HUFA | | 40.1 | \pm 0.7 | 38.1 | \pm 0.7 | 39.1 | \pm 0.6 | 39.5 | \pm 0.8 | NS | NS | NS |
| n-3/n-6 | | 4.9 | \pm 0.3 | 4.3 | \pm 0.3 | 4.9 | \pm 0.3 | 5.0 | \pm 0.4 | NS | NS | NS |

Ver tabla 3-2

8.4.5. Esteroles determinados en gónada, hepatopáncreas y músculo

Los esteroles analizados en gónadas, hepatopáncreas y músculos se muestran en la Tabla 3-8; en gónadas el consumo de *Ulva* aumentó significativamente la proporción de fucosterol e isofucosterol en las hembras, independientemente del estado de madurez desde niveles no detectables hasta un promedio de 0.3%, 0.2%, respectivamente. La proporción de los esteroles restantes en la gónada no se vió afectada por la etapa de maduración o por el consumo de *Ulva*.

Tabla 3-6. Perfil de ácidos grasos de la fracción neutra de músculo (% del total, medias \pm ES) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días.

| Estadio Tratamiento | Inmaduras | | Maduras | | ANOVA | | |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|----|-----|
| | Control | <i>Ulva</i> | Control | <i>Ulva</i> | E | T | ExT |
| 16:0 | 16.8 \pm 0.5 | 16.8 \pm 0.6 | 16.3 \pm 0.6 | 16.9 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 18:0 | 11.5 \pm 0.5 | 12.1 \pm 0.6 | 12.3 \pm 0.6 | 10.9 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 20:0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 16:1n-9 | 1.1 \pm 0.1 | 1.0 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.1 | 1.0 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 16:1n-7 | 2.7 \pm 0.1 | 2.5 \pm 0.2 | 2.3 \pm 0.2 | 2.7 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 17:1n-8 | 0.2 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 18:1n-9 | 8.4 \pm 0.9 | 8.6 \pm 1.0 | 8.0 \pm 1.0 | 9.4 \pm 0.9 | NS | NS | NS |
| 18:1n-7 | 2.5 \pm 0.1 | 2.6 \pm 0.1 | 2.3 \pm 0.1 | 2.5 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:1n-9 | 1.2 \pm 0.1 | 1.1 \pm 0.1 | 1.0 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:1n-7 | 0.3 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 18:2n-6 | 5.4 \pm 0.3 | 5.9 \pm 0.3 | 6.4 \pm 0.3 | 6.1 \pm 0.3 | NS | NS | NS |
| 18:3n-6 | 0.1 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 18:3n-3 | 1.2 \pm 0.1 | 1.3 \pm 0.1 | 1.3 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:2n-6 | 0.8 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 20:3n-3 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | 4.3 \pm 0.2 | 4.5 \pm 0.2 | 4.3 \pm 0.2 | 4.2 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 20:5n-3 | 13.5 \pm 0.6 | 13.4 \pm 0.7 | 13.5 \pm 0.7 | 12.5 \pm 0.6 | NS | NS | NS |
| 22:6n-3 | 12.8 \pm 0.3 | 12.0 \pm 0.3 | 11.4 \pm 0.3 | 11.4 \pm 0.3 | NS | NS | NS |
| Σ Saturados | 31.3 \pm 0.8 | 32.1 \pm 0.9 | 31.8 \pm 0.9 | 30.5 \pm 0.8 | NS | NS | NS |
| Σ MUFA | 28.8 \pm 1.1 | 28.0 \pm 1.3 | 28.3 \pm 1.3 | 30.5 \pm 1.1 | NS | NS | NS |
| Σ PUFA | 39.8 \pm 1.0 | 39.9 \pm 1.1 | 39.9 \pm 1.1 | 39.0 \pm 1.0 | NS | NS | NS |
| Σ HUFA | 32.0 \pm 0.9 | 31.5 \pm 1.0 | 31.1 \pm 1.0 | 30.6 \pm 0.9 | NS | NS | NS |
| n-3/n-6 | 2.4 \pm 0.1 | 2.2 \pm 0.1 | 2.1 \pm 0.1 | 2.0 \pm 0.1 | NS | NS | NS |

Ver tabla 3-2

En el hepatopáncreas, el colesterol fue mayor en las hembras maduras (97.5%) en comparación con las hembras inmaduras (95.2%), sin efecto del tratamiento, mientras que el estigmasterol disminuyó en las hembras maduras de 0.9% a 0.5%. El fucosterol se elevó desde niveles no detectables en el hepatopáncreas de hembras alimentadas con la dieta control hasta niveles detectables con la dieta con *Ulva* (0.2% en hembras inmaduras y 0.1% en maduras). La proporción de isofucosterol presentó diferencias significativas solo para el Tratamiento pero no para la Estadio de maduración, aumentando su proporción en hembras inmaduras alimentadas con *Ulva* de 0.2 a 0.5% y en maduras de 0.5 a 0.8%.

En el músculo, solo el contenido de fucosterol se vio afectado por la dieta, ya que aumentó de niveles no detectables en el grupo control a niveles detectables en hembras alimentadas con *Ulva*, independientemente de la etapa de madurez.

Tabla 3-7. Perfil de ácidos grasos de la fracción polar del músculo (% del total, medias \pm ES) de hembras *L vannamei* después de ser alimentadas con o sin *U. clathrata* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días.

| Estadio Tratamiento | Inmadura | | Madura | | ANOVA | | |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|----|-----|
| | Control | <i>Ulva</i> | Control | <i>Ulva</i> | E | T | ExT |
| 16:0 | 20.3 \pm 0.8 | 19.6 \pm 0.9 | 19.3 \pm 0.9 | 19.6 \pm 0.7 | NS | NS | NS |
| 18:0 | 12.6 \pm 0.5 | 13.1 \pm 0.6 | 12.9 \pm 0.6 | 13.0 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 20:0 | 0.4 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 16:1n-9 | 0.9 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 16:1n-7 | 2.4 \pm 0.4 | 3.5 \pm 0.5 | 3.7 \pm 0.5 | 3.7 \pm 0.4 | NS | NS | NS |
| 18:1n-9 | 10.9 \pm 1.9 | 12.9 \pm 2.1 | 12.3 \pm 2.1 | 12.8 \pm 1.7 | NS | NS | NS |
| 18:1n-7 | 3.9 \pm 0.3 | 2.8 \pm 0.3 | 2.7 \pm 0.3 | 2.8 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 20:1n-9 | 2.5 \pm 0.5 | 1.2 \pm 0.6 | 1.3 \pm 0.6 | 1.3 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 20:1n-7 | 0.3 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 18:2n-6 | 6.2 \pm 0.5 | 6.9 \pm 0.6 | 6.6 \pm 0.6 | 6.9 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| 18:3n-6 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| 18:3n-3 | 1.7 \pm 0.1 | 1.8 \pm 0.2 | 1.4 \pm 0.2 | 1.6 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:2n-6 | 1.0 \pm 0.1 | 1.0 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:3n-3 | 0.2 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | 4.0 \pm 0.2 | 4.3 \pm 0.3 | 4.3 \pm 0.3 | 4.4 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| 20:5n-3 | 12.7 \pm 0.9 | 13.0 \pm 1.1 | 13.3 \pm 1.1 | 13.4 \pm 0.8 | NS | NS | NS |
| 22:6n-3 | 11.4 \pm 0.5 | 11.0 \pm 0.6 | 10.8 \pm 0.6 | 10.9 \pm 0.5 | NS | NS | NS |
| Σ Saturados | 36.7 \pm 1.5 | 36.1 \pm 1.7 | 38.5 \pm 1.7 | 36.1 \pm 1.3 | NS | NS | NS |
| Σ MUFA | 24.4 \pm 3.0 | 23.7 \pm 3.4 | 22.9 \pm 3.4 | 23.9 \pm 2.6 | NS | NS | NS |
| Σ PUFA | 38.9 \pm 1.9 | 40.2 \pm 2.2 | 38.6 \pm 2.2 | 40.1 \pm 1.7 | NS | NS | NS |
| Σ HUFA | 29.5 \pm 1.4 | 30.0 \pm 1.6 | 29.3 \pm 1.6 | 30.1 \pm 1.2 | NS | NS | NS |
| n-3/n-6 | 2.2 \pm 0.1 | 2.0 \pm 0.1 | 2.1 \pm 0.1 | 2.1 \pm 0.1 | NS | NS | NS |

Ver tabla 3-2

8.4.6. Compuestos fenólicos en gónadas

Los compuestos fenólicos (Fig. 3-1) se vieron afectados significativamente por la etapa de maduración, con niveles más altos en las hembras maduras en comparación con las hembras inmaduras (1.1% a 4.5%), pero también por el tratamiento, con proporciones más elevadas en hembras alimentadas con *Ulva* vs. el control (2.3% a 3.3%).

Tabla 3-8. Esteroles (% del total de esteroles, Medias \pm ES) en gónadas, hepatopáncreas y músculos de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período de 45 días.

| Estadio Tratamiento | Inmadura | | Madura | | ANOVA | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-----|-----|
| | Control | <i>Ulva</i> | Control | <i>Ulva</i> | E | T | ExT |
| Gónada | | | | | | | |
| Colesterol | 96.1 \pm 1.2 | 95.1 \pm 1.4 | 98.1 \pm 1.0 | 97.3 \pm 1.2 | NS | NS | NS |
| Brassicasterol | 2.6 \pm 1.1 | 3.7 \pm 1.4 | 1.3 \pm 0.9 | 1.4 \pm 1.1 | NS | NS | NS |
| Campesterol | 0.2 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| Estigmasterol | 0.6 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| β -Sitosterol | 0.4 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| Fucosterol | ND | 0.4 \pm 0.1 | ND | 0.3 \pm 0.1 | NS | *** | NS |
| Isofucosterol | ND | 0.2 \pm 0.0b | ND | 0.2 \pm 0.0b | NS | *** | NS |
| Hepatopáncreas | | | | | | | |
| Colesterol | 95.1 \pm 1.0a | 95.3 \pm 1.0a | 98.1 \pm 0.7b | 97.0 \pm 1.0b | * | NS | NS |
| Brassicasterol | 2.3 \pm 1.0 | 2.5 \pm 1.0 | 0.7 \pm 0.7 | 1.8 \pm 1.0 | NS | NS | NS |
| Campesterol | 0.8 \pm 0.2 | 0.5 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| Estigmasterol | 1.0 \pm 0.1b | 0.8 \pm 0.1b | 0.3 \pm 0.1a | 0.4 \pm 0.1a | * | NS | NS |
| β -Sitosterol | 0.3 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.2 | NS | NS | NS |
| Fucosterol | ND | 0.2 \pm 0.0a | ND | 0.1 \pm 0.0b | NS | *** | NS |
| Isofucosterol | 0.2 \pm 0.1ab | 0.5 \pm 0.1bc | 0.1 \pm 0.0a | 0.8 \pm 0.1c | NS | *** | NS |
| Músculo | | | | | | | |
| Colesterol | 95.1 \pm 1.6 | 96.6 \pm 2.2 | 98.8 \pm 1.3 | 97.6 \pm 1.6 | NS | NS | NS |
| Brassicasterol | 4.2 \pm 1.4 | 2.3 \pm 2.0 | 0.5 \pm 1.2 | 1.6 \pm 1.4 | NS | NS | NS |
| Campesterol | 0.1 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| Estigmasterol | 0.5 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.0 | 0.5 \pm 0.1 | NS | NS | NS |
| β -Sitosterol | 0.1 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | NS | NS | NS |
| Fucosterol | ND | 0.2 \pm 0.0 | ND | 0.1 \pm 0.0 | NS | ** | NS |
| Isofucosterol | 0.1 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.1 | NS | NS | NS |

Ver tabla 3-2

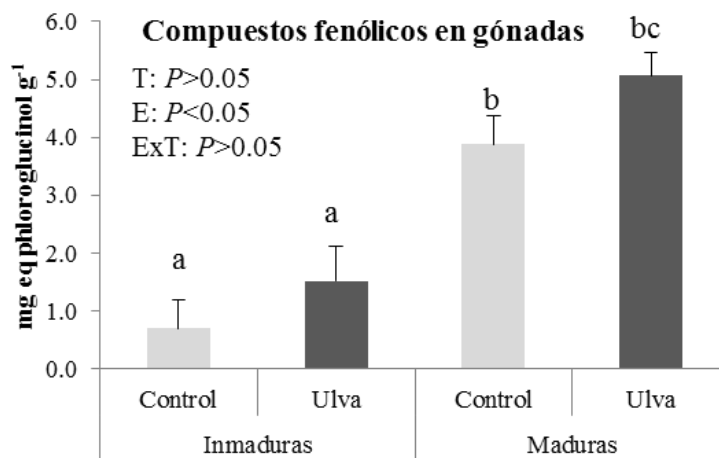


Figura 3-1. Compuestos fenólicos medidos en gónadas hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con una dieta con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días (medias \pm ES), considerando E=estadio; T=tratamiento; ExT=interacción. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes.

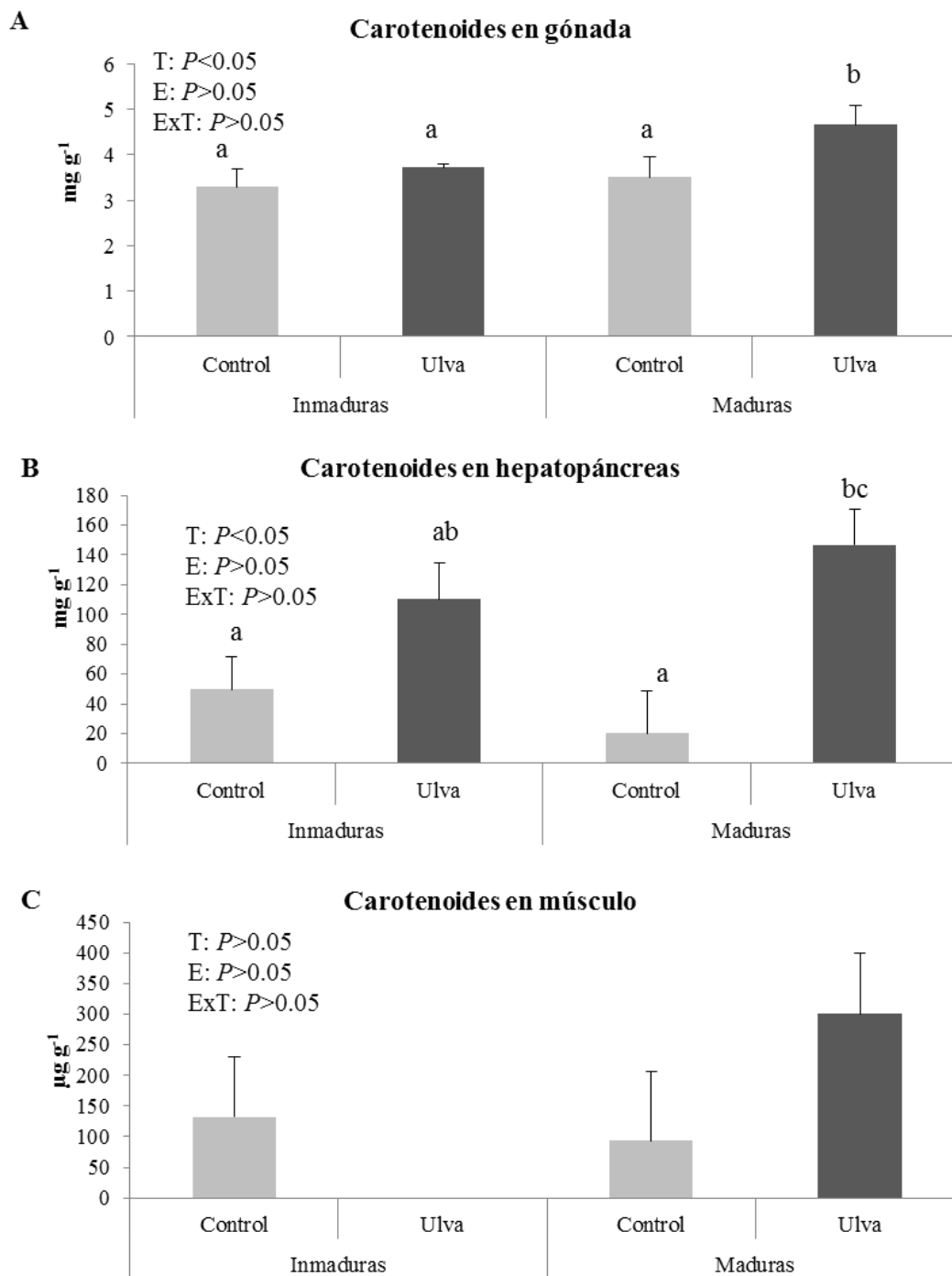


Figura 3-2. (A) Carotenoides medidos en gónadas (B), hepatopáncreas (C) y músculo (D) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con una dieta con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días (medias \pm ES), considerando E=estadio; T=tratamiento; ExT=interacción. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes.

8.4.7. Carotenoides analizados en gónadas, hepatopáncreas y músculo

El contenido de carotenoides en tejidos se muestra en la Figura 3-2. Los carotenoides totales aumentaron significativamente en gónadas (A) y en hepatopáncreas (B) de hembras maduras alimentadas con *Ulva* 34 y 700% respectivamente, sin tener efecto o interacción significativa por el tratamiento. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de carotenoides del músculo (C).

8.5. Discusión

En estudios anteriores, encontramos que la alimentación de *L. vannamei* con un 2% de *Ulva* en el calamar fresco, aumenta el rendimiento reproductivo durante un ciclo de producción en un laboratorio comercial (Corral-Rosales et al., 2018a, b). Aquí, nuestro objetivo fue determinar el efecto del consumo de *Ulva* sobre las reservas de lípidos. *Ulva* tiene una proporción muy alta de 18:3n-3 (Aguilera-Morales et al., 2005; Serviere-Zaragoza et al., 2014), cinco veces más que los otros ingredientes de la dieta suministrados a los reproductores. Los niveles altos de 18:3n-3 podrían cambiar la proporción n-3/n-6 en las gónadas y, por lo tanto, afectar la producción de eicosanoides, como la prostaglandina E₂, que desempeña un papel importante en el control de la maduración ovárica (Rowley et al., 2005; Alfaro-Montoya, 2015) y, específicamente, en la proliferación de ovocitos y en el nivel de vitelogenina en la hemolinfa (Sumpownon et al., 2015). En el presente estudio, encontramos niveles más altos de 18:3n-3 en los fosfolípidos de las gónadas en camarones alimentados con *Ulva*, pero la proporción n-3/n-6 fue más baja, particularmente en las hembras inmaduras. Esta disminución fue dada por niveles significativamente más altos de 20:4n-6 en fosfolípidos, y una disminución significativa de 22:6n-3 en hembras inmaduras en comparación con hembras maduras alimentadas con *Ulva*. No obstante, *Ulva per se* casi no tiene 22:6n-3, y los niveles de 20:4n-6 son mucho más altos en otros ingredientes, como poliquetos y mejillones, y estos ingredientes se dieron en una proporción muy alta (20%) en comparación con *Ulva* (2%), por lo que estos ácidos grasos probablemente no se obtuvieron directamente de *Ulva*, y dado que los camarones tienen una baja capacidad de elongar PUFA para producir HUFA, los HUFA n-3 presente en las gónadas y en otros tejidos probablemente no fueron el resultado de un alto contenido de HUFA en *Ulva*. Sin embargo, 20:4n-6 y 22:6n-3 se pueden obtener de los otros

ingredientes, con la diferencia de que en las hembras alimentadas con el alga pueden presentar una mayor digestibilidad y asimilación (Peña-Rodríguez, 2010), además de un efecto protector de HUFA, gracias a la presencia de otros componentes presentes en *Ulva* que no están en la dieta control. Los otros componentes presentes en *Ulva* que se analizaron aquí y que eran muy altos en el alga fueron el fucosterol (95%), los compuestos fenólicos (5.3 mg eq. de fluoroglucinol g⁻¹) y los carotenoides (3.6 mg g⁻¹). Aquí, encontramos una correlación significativa entre los carotenoides y el 20:4n-6 ($r = 0.62$; $P < 0.05$), pero no con el 22:6n-3, lo que podría significar que el contenido del 20:4n-6 incrementa junto con el contenido de carotenoides, pero no el 22:6n-3. Los carotenoides tienen propiedades antioxidantes y pueden proteger los HUFA presentes en los ingredientes (El-Agamey et al., 2004) y se ha reportado que los carotenoides en los crustáceos tienen un efecto sobre la pigmentación, como fuente de provitamina A y de protección celular contra el daño fotodinámico (El-Agamey et al., 2004; Liñan-Cabello et al., 2004), además participan en la activación de receptores hormonales nucleares y en la proliferación celular (Liñan-Cabello et al., 2004). La astaxantina libre es el carotenoide dominante en ovarios maduros y se ha informado que mejora el desarrollo del ovario, el desove (Dall et al., 1995) y la calidad del esperma en camarones (Quinitio et al., 1996). Se sabe que los carotenoides se incorporan a las lipocarotenoproteínas en el hepatopáncreas y se transportan como vitelogenina a las gónadas, donde se acumula como vitelina en los ovocitos y se utiliza durante el desarrollo lecitotrófico. Sin embargo, en nuestro caso, el krill también tenía una alta concentración de carotenoides (2.1 mg g⁻¹) y probablemente estos niveles fueron suficientes para la maduración del camarón, ya que la concentración de carotenoides en la gónada fue solo ligeramente aumentada por *Ulva*. Es posible que el exceso de carotenoides proporcionados por *Ulva* se transfiriera a los huevos y permitiera una mayor tasa de eclosión, ya que se producen más nauplios en hembras alimentadas con *Ulva* (Corral-Rosales et al., 2018b). Son necesarios más análisis sobre la calidad del desove y la composición lipídica.

El fucosterol y el isofucosterol son típicos de las ulvaceas: su proporción puede variar según la especie, el sitio y la estación de cosecha (Siddhanta et al., 2002). Se ha informado que el fucosterol obtenido de la fracción de n-hexano de algas marinas

Pelvetia siliquosa es eficaz contra los radicales libres y la hepatotoxicidad inducida por el tetracloruro de carbono, al aumentar la actividad de las enzimas que eliminan los radicales libres, como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Le et al., 2003). El fucosterol también puede atenuar la expresión de citoquinas antiinflamatorias desactivando las proteínas quinasas inducidas por especies reactivas de oxígeno (Lampi et al., 1999) y modular la cascada de caspasa y, por lo tanto, la apoptosis (Abdul et al., 2016). Obtuvimos una correlación positiva de 20:4n-6 con los niveles de fucosterol en las gónadas ($r = 0.76$; $P < 0.05$) y podría deberse a las propiedades antioxidantes del fucosterol, o el fucosterol podría estar modulando otras respuestas en la acumulación y maduración de reservas de gónadas, ya que los camarones alimentados con *Ulva* tenían diferencias más pronunciadas de reservas entre la etapa inmadura y madura que el grupo control (es decir, 22:6n-3 en fosfolípidos), que podrían ser el resultado de una mejor sincronización de la maduración de los ovocitos. Esto concuerda con resultados encontrados por Corral-Rosales et al. (2018b) donde se observó un número significativamente mayor de ovocitos postvitelogénicos en la etapa III de maduración en las gónadas de hembras alimentadas con *Ulva*, en comparación con el control que tenía una proporción similar de ovocitos vitelogénicos tardíos en las etapas II y III del desarrollo gonadal. Los niveles de compuestos fenólicos en las gónadas también se correlacionaron con 20:4n-6 ($r = 0.80$; $P < 0.05$), y fueron los únicos correlacionados con 22:6n-3 ($r = 0.86$; $P < 0.05$) en fosfolípidos de la gónada. Se ha informado que los compuestos fenólicos en las algas tienen propiedades antioxidantes y que reducen el estrés oxidativo y el daño celular causado por la peroxidación de lípidos *in vivo* (Rice-Evans et al., 1997; Maqsood et al., 2010). En consecuencia, 20:4n-6 y 22:6n-3 en fosfolípidos gonadales de hembras alimentadas con *Ulva* probablemente se obtienen de los otros ingredientes, pero están protegidos por los compuestos fenólicos presentes en *Ulva*. Esto se vuelve importante durante el período de producción comercial cuando los organismos están sujetos a un estrés constante causado por la ablación y la producción intensiva que produce estrés oxidativo por los radicales libres de oxígeno (ROS), estos radicales afectan a las reservas bioquímicas altamente oxidables, particularmente HUFA, reduciendo la calidad de los nutrientes y, por lo

tanto, el desove y la calidad de los nauplios (Charniaux-Cotton, 1985; Palacios et al., 2001; Tsukimura, 2001).

En este estudio se incrementó el 20:4n-6 en fosfolípidos gonadales, el cual es el sustrato para la síntesis de prostaglandinas (PG), que puede afectar el rendimiento reproductivo, la calidad de desove y la calidad del huevo (Coman et al., 2011; Kangpanich et al., 2016; Xu et al., 2017). En *P. monodon*, el 20:4n-6 promueve el desarrollo embrionario y el desove (Coman et al., 2011). En *L. vannamei*, mejora los tiempos de metamorfosis en nauplios y zoeas, aumenta la resistencia de los nauplios a bajas salinidades y aumenta la tasa de fertilización (Xu et al., 2017). Además de la síntesis de PG, se ha informado que 20:4n-6 participa en la transducción de señales para la esteroidogénesis no dependiente de la producción de eicosanoides (Johnson et al., 1991; Gómez-Chang et al., 2012; Norberg et al., 2017). Por lo tanto, la producción de progesterona y testosterona a partir del colesterol, ambas hormonas necesarias para la maduración en el camarón, podría ser estimulada por 20:4n-6. A su vez, estas hormonas regulan la vitelogénesis primaria y la vitelogénesis secundaria. Curiosamente, 20:4n-6 fue mayor en los lípidos de las gónadas en camarones alimentados con *Ulva*, pero disminuyó en el grupo de control. Esto podría indicar que 20:4n-6 se transfiere de los lípidos de reserva a los fosfolípidos cuando la gónada está madura, tal vez durante los pasos finales de la maduración final, que duran varias horas (Yano, 2000). Otra observación interesante fue que 22:6n-3 se acumuló en el hepatopáncreas, que podría indicar una falta de transporte a las gónadas durante la maduración. Acorde a lo anterior, hay niveles significativamente más bajos de 22:6n-3 en la fracción de fosfolípidos de las gónadas inmaduras de hembras alimentadas con *Ulva* (6.5%), sin embargo, los niveles fueron significativamente más altos en las gónadas maduras del mismo grupo (9.1%), con niveles similares independientemente de la maduración en el grupo control (8.3%). Es probable que el 22:6n-3 está mejor protegido por los antioxidantes presentes en *Ulva*, y luego se acumula en el hepatopáncreas hasta la vitelogénesis secundaria, para ser transferido a la gónada a través de la vitelogenina. Este mecanismo se interrumpe de alguna manera en el grupo de control, probablemente por ablación, y se mejora en el camarón alimentado con *Ulva*.

CAPÍTULO 4

9. Reducción de la melanización del espermatóforo en camarones *Litopenaeus vannamei* alimentados con *Ulva clathrata* durante la producción de un laboratorio comercial.

Artículo: Corral-Rosales, D. C., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E., Arjona, O. y Palacios, E., (2019). Reduction of spermatophore melanization in *Litopenaeus vannamei* shrimp fed *Ulva clathrata* during a commercial hatchery production.

Anexo 4

9.1. Resumen

Se evaluó el rendimiento reproductivo y la composición bioquímica de reproductores machos *Litopenaeus vannamei* (36 ± 7 g, $n = 600$) después de incluir 0.8% de harina de *Ulva clathrata* en la dieta fresca para maduración en un laboratorio de producción de larvas comercial durante 45 días. La melanización es uno de los principales problemas encontrados en los criaderos comerciales debido a las altas temperaturas del agua utilizadas para inducir la maduración en las hembras. Menos melanización podría derivarse de niveles significativamente más altos de antioxidantes, como carotenoides, compuestos fenólicos y fucosterol acumulados en todos los tejidos de machos alimentados con *Ulva*, o por compuestos con actividad antibacteriana. Los machos alimentados con *Ulva* tuvieron menos espermatóforos melanizados en comparación con los controles (120 machos o 1.9% con melanización vs. 233 machos o 3.7% en controles, $P < 0.01$). Los machos alimentados con *Ulva* también presentaron una mayor actividad de cortejo (839 machos o 13.2% vs. 689 machos o 10.8%, $P < 0.01$) y una mayor proporción de huevos viables (85.5% vs. 81.2%, $P < 0.01$). No se observó diferencia significativa en la mortalidad como resultado del consumo de la dieta. Los machos que recibieron *Ulva* en el alimento, presentaron 50% menos de carbohidratos en el hepatopáncreas y 53% menos de carbohidratos en el músculo, pero más 20:4n-6 en la fracción de acilglicéridos del hepatopáncreas (2.8 ± 0.2 vs. 2.2 ± 0.2 , $P < 0.05$) y en el espermatóforo (6.4 ± 0.3 vs. 5.7 ± 0.2 , $P < 0.05$). El 20:4n-6 es el principal sustrato para la producción de PG y participa indirectamente en la síntesis de hormonas esteroides que regulan la maduración de los espermatozoides. La inclusión de 0.8% de *Ulva* en la dieta fresca para maduración, mejoró el rendimiento reproductivo en machos y disminuyó la melanización, probablemente como resultado de la capacidad antibacteriana del alga y de los cambios en el perfil lipídico y en el contenido de antioxidantes en los organismos, el uso del alga podría ser un método de bajo costo para mejorar el rendimiento reproductivo y disminuir la melanización del espermatóforo.

9.2 Introducción

El rendimiento y la calidad reproductiva de machos y hembras es igualmente importante para poder lograr el éxito en la reproducción durante la maduración comercial de

peneidos. Sin embargo, se ha prestado más atención al efecto nutricional de las dietas sobre el desarrollo y la bioquímica de las gónadas de hembras (Wouters et al., 2001a; Corral et al., 2018b). Actualmente, la dieta utilizada para lograr la maduración y la reproducción de peneidos en cautiverio se basa en los requerimientos nutricionales establecidos para las hembras (Meunpol et al., 2005; Coman et al., 2007), pero desde hace tiempo se ha propuesto que puede haber diferencias en los requerimientos nutricionales entre hembras y machos (Magarelli, 1981). También se ha reportado que la calidad del esperma en machos puede verse afectado por la temperatura, el fotoperíodo y la edad del camarón y este a su vez afecta directamente la viabilidad del huevo (Pérez-Velázquez et al., 2001; Pascual et al., 2003; Harlıoğlu et al., 2018). Los machos tienden a tener una baja calidad de esperma como resultado de la melanización del tracto reproductivo masculino o del espermátforo. La melanización consiste en la deposición extracelular de la melanina en los tejidos (Braga et al., 2018b), siendo la fenoloxidasa la enzima responsable de la melanización observada en crustáceos e insectos (Söderhäll y Cerenius, 1992). También es la responsable de la oxidación de fenoles en quinones los cuales se polimerizan en melanina. La melanina es un pigmento pardo-negro al cual se le adjudican diversas propiedades biológicas, tal como la inhibición de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas (Smith y Söderhäll, 1983; Alfaro y Lozano, 1993). La melanización se ha asociado a altas temperaturas, las cuales son necesarias para la maduración de las hembras durante el ciclo de producción comercial (Pérez-Velázquez et al., 2001), a un crecimiento bacteriano (Braga et al., 2018a) y a una dieta deficiente (Goimier et al., 2006; Braga et al., 2010). Alfaro y Lozano (1993) sugirieron que la melanización de los espermatozoides y del tracto reproductivo puede ser causada por agentes patógenos como *Vibrio alginolyticus* y *Pseudomonas putrefaciens*, síndrome denominado MRSM (Male re-productive system melanization, por sus siglas en inglés); estos patógenos pueden aumentar si sube la temperatura y esta infección se caracteriza por la hinchazón y melanización de diferentes regiones del tracto reproductivo (Alfaro y Lozano, 1993). La familia *Ulvaceae* muestra una gran gama de compuestos (terpenos, esteroides, compuestos polifenólicos y polisacáridos) con actividades antibacterianas contra patógenos humanos, bacterias y hongos (Suganthy et al., 2009; Trigui et al., 2013; Chakraborty et

al., 2010) que podrían disminuir los agentes patógenos causantes de la melanización. Por otra parte, si bien la dieta de maduración es rica en proteínas, ácidos grasos altamente insaturados y colesterol, todos nutrientes esenciales para los camarones, no es particularmente rica en compuestos antioxidantes. En *L. setiferus* se ha demostrado que la vitamina E aumenta el porcentaje de espermatozoides normales (Chamberlain, 1988). En *L. vannamei* Pérez-Velázquez et al. (2003a) mostraron que una dieta sin vitaminas, principalmente vitamina C, afecta negativamente el conteo de espermatozoides y la capacidad de fertilización. Anteriormente, se ha descrito que la inclusión de *Ulva clathrata* en la dieta de reproductores durante un ciclo de producción aumentaba la tasa de eclosión, la fecundidad y la fertilidad en hembras ablacionadas y sin ablacionar (Corral et al., 2018a), y aumentaba los niveles de pigmentos en gónadas y hepatopáncreas de hembras reproductoras (Corral et al., 2019). Sin embargo, los efectos del consumo de *Ulva* durante la maduración de los machos son desconocidos. En el presente trabajo, evaluamos los efectos de incluir *Ulva clathrata* en las dietas de reproductores sobre la melanización de los espermatóforos, las reservas bioquímicas, el perfil de lípidos y la capacidad antioxidante en el hepatopáncreas, los músculos y el espermatóforo de los machos en un laboratorio de larvas comercial.

9.3. Materiales y métodos

9.3.1. Diseño experimental y variables producción.

El diseño experimental y el protocolo de alimentación se describen en el Capítulo 1 (Ver puntos 6.3.1, 6.3.2, 6.3.3). Cada tanque se monitoreó diariamente durante el atardecer con una lámpara para evaluar la presencia de melanización en el espermatóforo y la actividad de cortejo; si había machos con melanización se les eliminó el espermatóforo, se registró el evento y se devolvieron los camarones a su tanque original. Después del desove, se tomaron tres muestras por tratamiento de 100 huevos recién desovados para observación microscópica, cada muestra era colocada inmediatamente después de su colecta en un porta objetos y observada bajo microscopio. Se registraron los tiempos de metamorfosis y el desarrollo embrionario de cada muestra. El embrión en etapa de mórula fue el indicador para distinguir el éxito de la fertilización y la viabilidad de los embriones, y se clasificaron como huevos viables.

Los huevos no divididos o los huevos con un patrón asimétrico se clasificaron como huevos no fértiles, y se denominaron inviábiles. La actividad de cortejo fue evaluada durante 15 min en los tanques de maduración, se registraba el número de cortejo por tanque durante ese lapso de tiempo.

9.3.2. Obtención de muestras

Al final del ciclo de producción (45 días), se tomaron 32 machos (16 machos alimentados con *Ulva* y 16 con la dieta control), se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para análisis adicionales. Las muestras de espermatóforo, hepatopáncreas y músculo se diseccionaron en una placa congelada para analizar posteriormente la composición bioquímica, los ácidos grasos, el contenido de esteroides, los compuestos fenólicos y los carotenoides.

9.3.3. Análisis bioquímicos

Los análisis del contenido de proteínas (Bradford, 1976), lípidos (Barnes y Blackstock, 1973), carbohidratos (Van Handel, 1965) y triglicéridos (prueba enzimática, Radox, 187 TR1697) del hepatopáncreas y el músculo se realizaron como se describe en el Capítulo 2 (ver el punto 7.3.6.)

9.3.4. Análisis de ácidos grasos y esteroides

Los análisis se realizaron como se describe en el Capítulo 3, ver apartado 8.3.3. y 8.3.4.

9.3.5. Análisis de compuestos fenólicos y carotenoides.

Los compuestos fenólicos en el músculo y en el hepatopáncreas se determinaron de acuerdo con el método de Cabello-Pasini et al. (2011) modificado, según descrito en el Capítulo 3 (ver punto 8.3.5.), utilizando etanol como disolvente de extracción en lugar de metanol. Los carotenoides se extrajeron en 6 ml de Folch y se analizaron como describe en el Capítulo 3 (ver punto 8.3.3.)

9.3.6. Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) utilizando el Tratamiento como factor (T, con dos niveles, con o sin *Ulva*) para la mortalidad, el cortejo, la melanización del espermátforo, la tasa de fertilización, los compuestos bioquímicos, los ácidos grasos, los esteroides y los compuestos fenólicos (Software STATISTICA, Versión 5.0). Adicionalmente se realizaron análisis de regresión lineal para determinar las correlaciones entre los parámetros reproductivos y la temperatura.

9.4. Resultados

9.4.1. Parámetros reproductivos y efecto de la temperatura

La mortalidad, la actividad de cortejo y el número de espermátforos melanizados de machos alimentados con la dieta control y con *Ulva* durante 45 días de producción se muestran en la Figura 4-1.

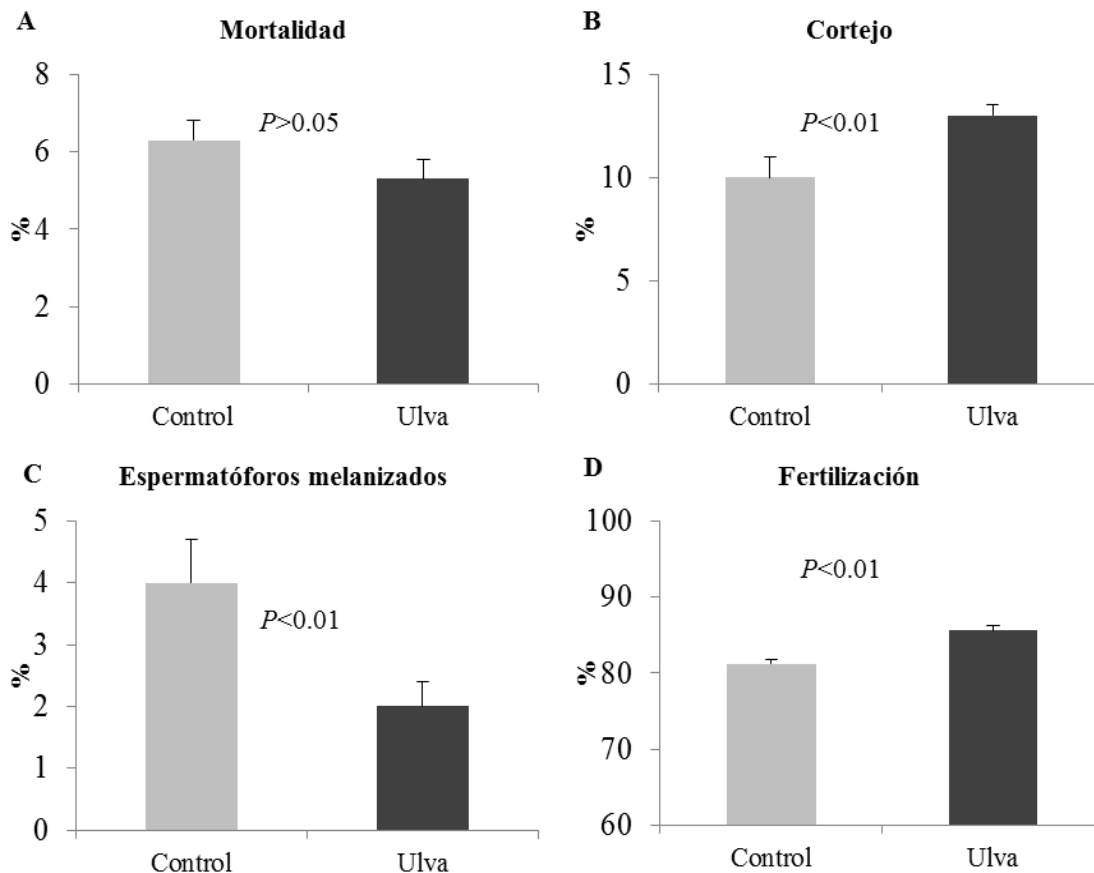


Figura 4-1. A) Mortalidad, B) Cortejo, C) Espermátforos melanizados en machos de *L. vannamei* y D) Fertilización de huevos después de recibir una dieta control (gris claro) o una dieta enriquecida con *Ulva* durante 45 días (media \pm ES).

Durante el período de producción, la mortalidad en los machos con la dieta control fue de 6.3% y 5.6% con la dieta con *Ulva* (19 vs. 17 machos muertos por tratamiento, Fig. 4-1A). La actividad de cortejo fue significativamente mayor en los reproductores alimentados con *Ulva*, con 839 machos ($13.2\pm 0.5\%$) involucrados en la actividad de cortejo, mientras que 689 ($10.8\pm 1.0\%$) participaron con el consumo de la dieta control (Fig. 4-1B). La presencia de melanización en los espermatozoides fue significativamente menor (120 machos o $1.9\pm 0.3\%$) en machos que consumieron *Ulva*, en contraste con un aumento de casi el doble (233 machos o $3.7\pm 0.2\%$) en el control (Fig. 4-1C). La proporción de huevos viables durante el ciclo de producción presentó valores más altos en *Ulva* en comparación con el control (81.2 ± 0.6 vs. $85.5\pm 0.7\%$, Figura 4-1D). La supervivencia diaria y la actividad de cortejo con respecto a la fluctuación en la temperatura durante el período de producción, se muestran en la Figura 4-2.

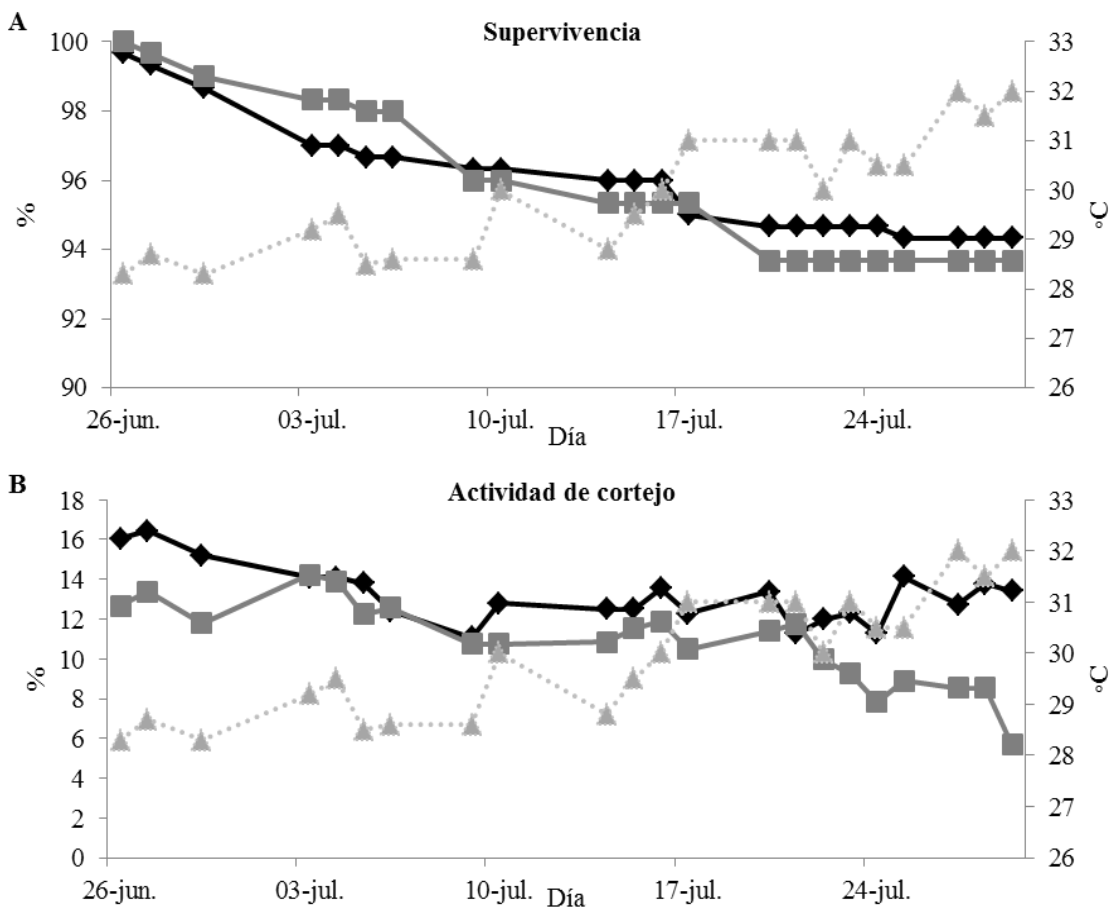


Figura 4-2. A) Supervivencia y B) Actividad diaria de cortejo en *L. vannamei* alimentados con una dieta control (línea gris) y una dieta experimental suplementada con *Ulva clathrata* (línea negra) durante un ciclo de producción. La temperatura se indica mediante la línea punteada de color gris claro (eje derecho).

Se observa que la temperatura estuvo negativamente correlacionada con la supervivencia de ambos tratamientos (95% vs 94%) a lo largo del ciclo (Control $r = -0.85$; $P < 0.05$ vs. *Ulva*, $r = -0.88$; $P < 0.05$). En lo que respecta a la actividad de cortejo también se observó una correlación negativa con la temperatura en los machos alimentados con la dieta control ($r = -0.73$; $P < 0.05$), en cambio la actividad de cortejo en machos alimentados con *Ulva* presentó una disminución solo al inicio (14%) y se mantuvo constante sin importar el cambio en la temperatura por lo que no mostró una correlación significativa con este parámetro.

Por otro lado, el número de espermátóforos con melanización y la viabilidad del huevo con respecto a la variación de la temperatura durante el período de experimentación se muestran en la Figura 4-3.

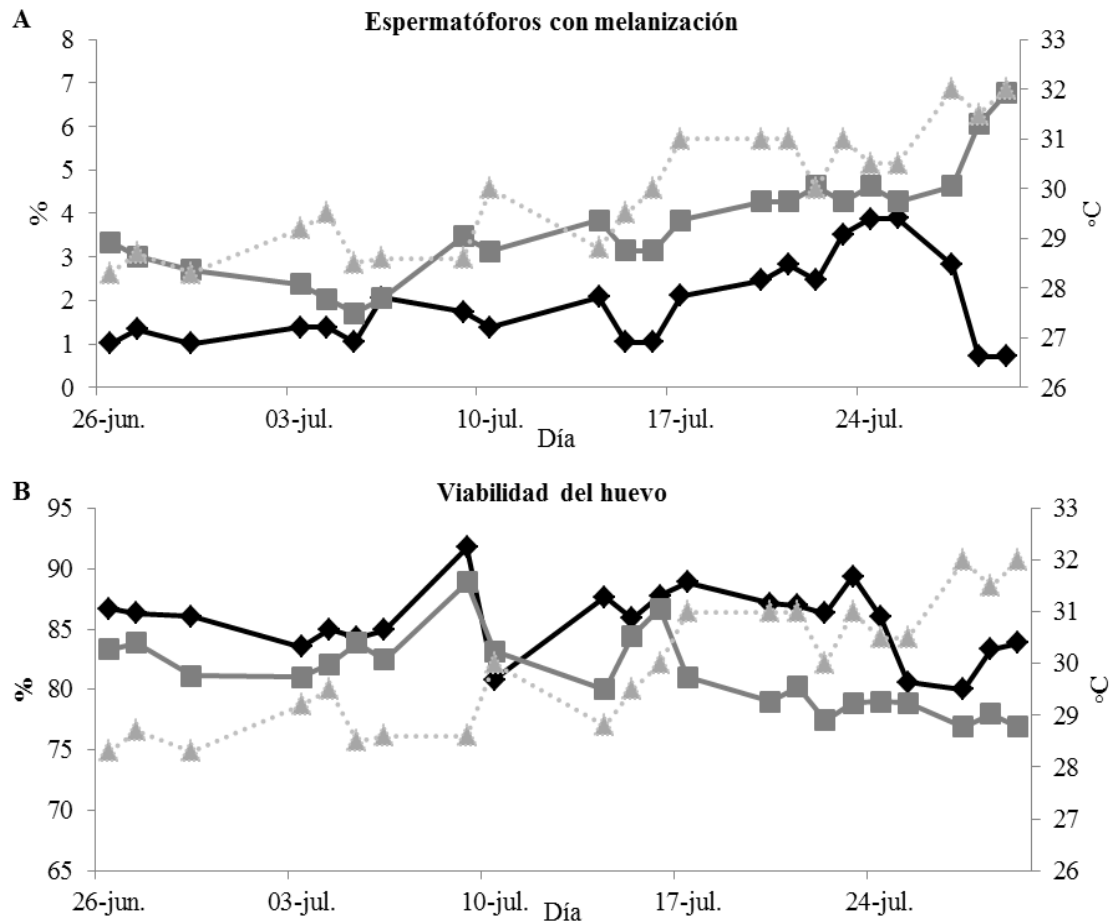


Figura 4-3. A) Incidencia diaria de espermátóforo melanizado y B) Viabilidad del huevo en machos *L. vannamei* alimentados con una dieta control (línea gris) y una dieta experimental suplementada con *U. clathrata* (línea negra) durante un ciclo de producción. La temperatura se indica mediante la línea dentada de color gris claro (eje derecho).

Se observa que el número de espermatozoides melanizados en los camarones alimentados con la dieta control se correlacionó positivamente con la temperatura ($r = 0.77$; $P < 0.05$), pero no se encontró una correlación significativa en los machos alimentados con *Ulva*. A lo largo del ciclo se ve que la fertilización en los huevos (viabilidad) es más o menos constante, pero al aumentar la temperatura por encima de los 30°C el número cae en los animales alimentados con la dieta control mismos que se correlacionaron negativamente con la temperatura ($r = -0.78$; $P < 0.05$) con un retardo en los organismos alimentados con *Ulva*.

9.4.2. Composición bioquímica en tejidos de machos

La composición bioquímica de los tejidos se presenta en la Figura 4-4. En el hepatopáncreas podemos ver que los machos alimentados con *Ulva* presentaron niveles significativamente más bajos de carbohidratos (77.7 ± 4.3 vs. 39.1 ± 4.2 mg g⁻¹, $P < 0.01$), y una tendencia ($P = 0.06$) a tener niveles más bajos de triglicéridos (184.9 ± 19.7 vs 124.2 ± 20.0 mg g⁻¹). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas o lípidos. En el músculo (M), los machos alimentados con *Ulva* tuvieron niveles significativamente más bajos de carbohidratos (45.7 ± 3.4 vs 24.3 ± 3.6 mg g⁻¹, $P < 0.01$) y triglicéridos (11.0 ± 2.1 vs 6.5 ± 1.9 mg g⁻¹, $P < 0.05$), sin presentar diferencias significativas en la concentración de proteínas y lípidos.

9.4.3. Perfil de ácidos grasos en tejidos de machos

El perfil de los ácidos grasos en el hepatopáncreas de los machos alimentados con y sin *Ulva* se muestra en la Tabla 4-1. En la fracción neutra del hepatopáncreas, los machos alimentados con *Ulva* aumentaron el 20:4n-6 (2.2 ± 0.2 vs. $2.8 \pm 0.2\%$, $P < 0.05$), 20:5n-3 (9.0 ± 0.7 vs. $11.2 \pm 0.7\%$, $P < 0.05$), 22:6n-3 (13.0 ± 1.0 vs. $16.0 \pm 0.9\%$, $P < 0.05$), PUFA (33.3 ± 1.5 vs. $38.2 \pm 1.4\%$, $P < 0.05$) y HUFA (25.6 ± 1.7 vs. $31.9 \pm 1.6\%$, $P < 0.05$), mientras que 16:0 se redujo significativamente (27.8 ± 1.4 vs. $22.0 \pm 1.3\%$, $P < 0.05$), el resto de los ácidos grasos no presentó diferencias. En la fracción polar del hepatopáncreas, el consumo de *Ulva* aumentó la suma de MUFA (20.4 ± 1.4 vs. $24.9 \pm 1.3\%$, $P < 0.05$) y disminuyó el 18:2n-6 (2.0 ± 0.1 vs. $1.4 \pm 0.1\%$, $P < 0.05$); el resto de los ácidos grasos no presentó diferencias.

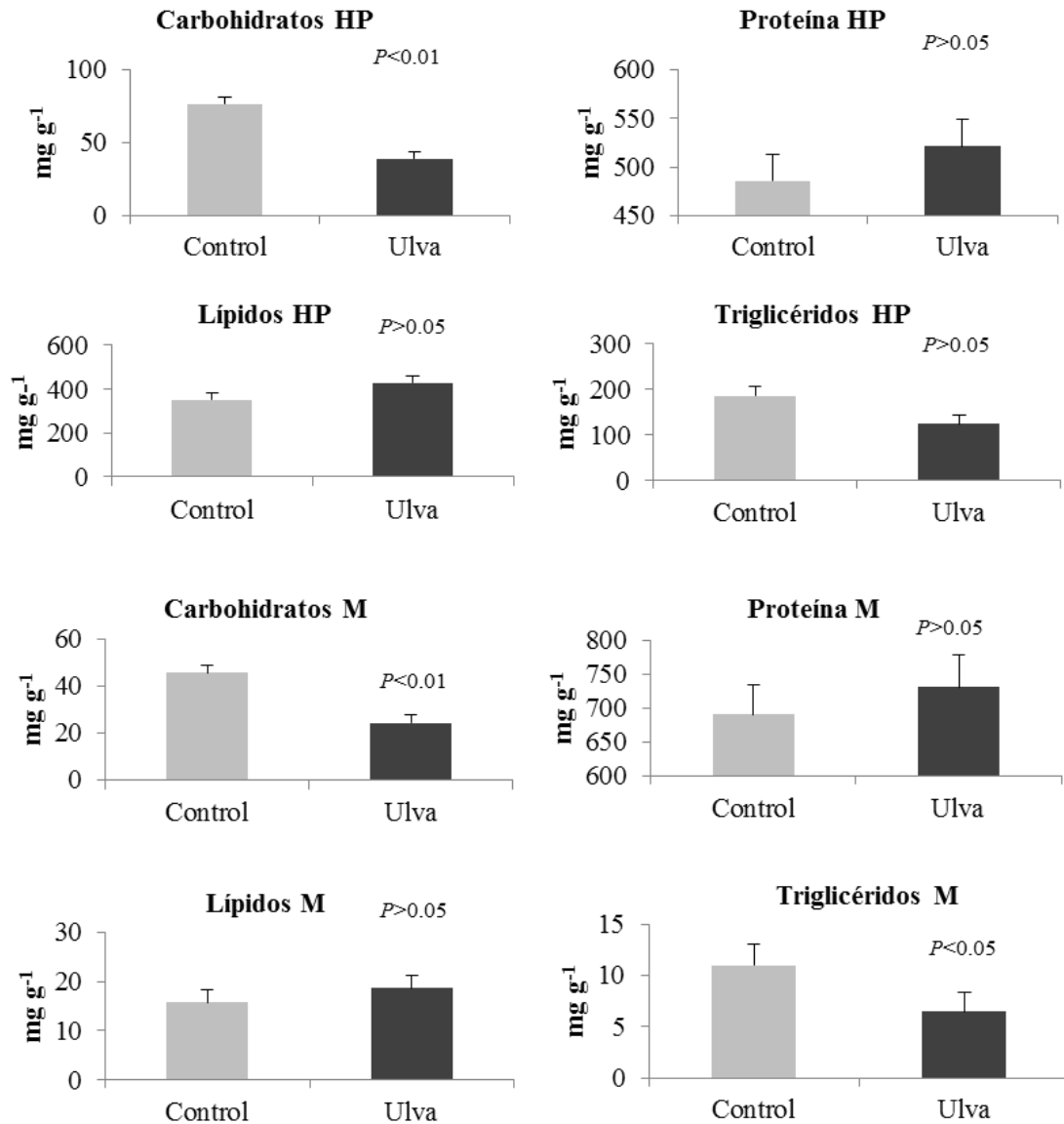


Figura 4-4. Composición bioquímica (mg g⁻¹ dw) de hepatopáncreas (HP) y músculo (M) en machos *L. vannamei* alimentados con una dieta control (gris claro) o una dieta con *Ulva* (gris oscuro) durante 45 días (medias ± ES).

El perfil de ácidos grasos del músculo se presenta en la Tabla 4-2. No se encontraron diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos en el músculo de los machos alimentados con y sin la inclusión de *Ulva clathrata* en la dieta fresca.

El perfil de ácidos grasos del espermatóforo se presenta en la Tabla 4-3. Los machos alimentados con *Ulva* tuvieron niveles significativamente más bajos de 20:5n-3 (17.0 ± 0.4 vs. 15.6 ± 0.4%, P < 0.05) y n-3/n-6 (3.1 ± 0.1 vs. 2.7 ± 0.1%, P < 0.05), y niveles

más altos de 20:4n-6 (5.8±0.2 vs. 6.5±0.2%, $P<0.05$), 18:1n-9 (8.6±0.3vs 9.7±0.3%, $P<0.05$) en el espermátforo, el resto de los ácidos grasos no presentaron diferencias.

Tabla 4-1. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar (% del total de ácidos grasos, medias ± ES) en hepatopáncreas de machos *L. vannamei* alimentados con o sin *U. clathrata* durante un período de 45 días.

| Ácidos grasos | Fracción neutra | | | Fracción polar | | |
|---------------|-----------------|-------------|----------|----------------|-------------|----------|
| | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA |
| 16:0 | 27.8 ± 1.4 | 22.0 ± 1.3 | $P<0.05$ | 20.2 ± 0.5 | 18.9 ± 0.4 | NS |
| 18:0 | 5.5 ± 0.7 | 6.7 ± 0.7 | NS | 11.7 ± 0.6 | 11.4 ± 0.5 | NS |
| 20:0 | 0.2 ± 0.0 | 0.2 ± 0.0 | NS | 0.2 ± 0.0 | 0.3 ± 0.0 | NS |
| 16:1n-9 | 0.6 ± 0.2 | 1.6 ± 0.2 | $P<0.01$ | 1.2 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | NS |
| 16:1n-7 | 5.0 ± 0.2 | 4.5 ± 0.2 | NS | 3.3 ± 0.4 | 4.0 ± 0.3 | NS |
| 18:1n-9 | 8.2 ± 0.4 | 7.1 ± 0.4 | NS | 8.5 ± 0.3 | 9.2 ± 0.3 | NS |
| 18:1n-7 | 5.0 ± 0.2 | 4.7 ± 0.2 | NS | 3.5 ± 0.3 | 4.5 ± 0.3 | $P<0.05$ |
| 20:1n-9 | 3.4 ± 0.2 | 3.2 ± 0.2 | NS | 1.8 ± 0.4 | 2.8 ± 0.4 | NS |
| 20:1n-7 | 2.1 ± 0.2 | 1.1 ± 0.2 | $P<0.01$ | 0.5 ± 0.0 | 0.4 ± 0.0 | NS |
| 18:2n-6 | 2.1 ± 0.1 | 1.9 ± 0.1 | NS | 2.0 ± 0.1 | 1.4 ± 0.1 | $P<0.05$ |
| 18:3n-3 | 3.3 ± 0.5 | 2.2 ± 0.4 | NS | 1.7 ± 0.2 | 1.4 ± 0.2 | NS |
| 20:2n-6 | 1.1 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | NS | 0.9 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | NS |
| 20:3n-3 | 0.6 ± 0.0 | 0.7 ± 0.0 | NS | 0.4 ± 0.0 | 0.4 ± 0.0 | NS |
| 20:4n-6 | 2.2 ± 0.2 | 2.8 ± 0.2 | $P<0.05$ | 5.5 ± 0.4 | 4.6 ± 0.4 | NS |
| 20:5n-3 | 9.0 ± 0.7 | 11.2 ± 0.7 | $P<0.05$ | 15.5 ± 0.8 | 14.0 ± 0.7 | NS |
| 22:6n-3 | 13.0 ± 1.0 | 16.0 ± 0.9 | $P<0.05$ | 16.4 ± 0.7 | 16.1 ± 0.6 | NS |
| ∑Saturados | 38.2 ± 1.7 | 32.8 ± 1.6 | $P<0.05$ | 35.4 ± 0.6 | 33.7 ± 0.6 | NS |
| ∑MUFA | 28.5 ± 0.6 | 29.0 ± 0.5 | NS | 20.4 ± 1.4 | 24.9 ± 1.3 | $P<0.05$ |
| ∑PUFA | 33.3 ± 1.5 | 38.2 ± 1.4 | $P<0.05$ | 44.2 ± 1.2 | 41.4 ± 1.2 | NS |
| ∑HUFA | 25.6 ± 1.7 | 31.9 ± 1.6 | $P<0.05$ | 39.1 ± 1.1 | 37.2 ± 1.0 | NS |
| n-3/n-6 | 4.0 ± 0.2 | 4.5 ± 0.2 | NS | 4.0 ± 0.4 | 4.2 ± 0.4 | NS |

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; NS: sin diferencia significativa ($P\leq 0.05$)

9.4.4. Esteroles analizados en tejidos de machos

La proporción de esteroles medidos en hepatopáncreas, músculo y espermátforo de machos con o sin *Ulva* se muestra en la Tabla 4-4. En el hepatopáncreas, los machos alimentados con *Ulva* presentaron niveles detectables de fucosterol (ND vs. 0.2%, $P<0.001$), sin diferencias significativas para el resto de los esteroles. En los músculos, el consumo de *Ulva* disminuyó significativamente la proporción de colesterol (98.9±0.9vs. 95.4±0.7%, $P<0.05$) y fueron encontrados niveles detectables de brassicasterol (ND vs. 3.3%, $P<0.05$) y fucosterol (ND vs. 0.3%, $P<0,001$).

Tabla 4-2. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar (% del total de ácidos grasos, medias \pm ES) de músculo de machos *L. vannamei* alimentados con o sin *U. clathrata* durante 45 días.

| Ácidos grasos | Fracción neutra | | | Fracción polar | | |
|--------------------|-----------------|----------------|-------|----------------|----------------|-------|
| | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA |
| 16:0 | 18.6 \pm 0.6 | 17.7 \pm 0.6 | NS | 20.8 \pm 0.5 | 19.9 \pm 0.5 | NS |
| 18:0 | 11.8 \pm 0.2 | 11.0 \pm 0.2 | NS | 15.1 \pm 0.8 | 15.5 \pm 0.8 | NS |
| 20:0 | 0.1 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | NS | 0.2 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | NS |
| 16:1n-9 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | NS | 0.7 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | NS |
| 16:1n-7 | 2.0 \pm 0.1 | 1.9 \pm 0.1 | NS | 2.7 \pm 0.3 | 2.2 \pm 0.2 | NS |
| 18:1n-9 | 8.2 \pm 0.6 | 8.3 \pm 0.6 | NS | 11.5 \pm 0.4 | 12.0 \pm 0.4 | NS |
| 18:1n-7 | 2.3 \pm 0.4 | 2.8 \pm 0.4 | NS | 2.5 \pm 0.1 | 2.4 \pm 0.1 | NS |
| 20:1n-9 | 1.1 \pm 0.3 | 1.5 \pm 0.3 | NS | 1.0 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | NS |
| 20:1n-7 | 0.3 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | NS | 0.2 \pm 0.6 | 1.4 \pm 0.6 | NS |
| 18:2n-6 | 6.1 \pm 0.3 | 5.7 \pm 0.3 | NS | 7.5 \pm 0.6 | 5.8 \pm 0.6 | NS |
| 18:3n-3 | 1.1 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.1 | NS | 1.5 \pm 0.5 | 2.5 \pm 0.5 | NS |
| 20:2n-6 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | NS | 1.0 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | NS |
| 20:3n-3 | 0.2 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | NS | 0.2 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | NS |
| 20:4n-6 | 4.0 \pm 0.2 | 3.9 \pm 0.2 | NS | 3.9 \pm 0.2 | 4.3 \pm 0.2 | NS |
| 20:5n-3 | 11.6 \pm 0.4 | 12.5 \pm 0.4 | NS | 13.6 \pm 1.1 | 11.3 \pm 1.0 | NS |
| 22:6n-3 | 11.7 \pm 0.4 | 11.7 \pm 0.4 | NS | 11.9 \pm 1.0 | 9.4 \pm 0.9 | NS |
| Σ Saturados | 33.6 \pm 0.6 | 32.1 \pm 0.6 | NS | 39.2 \pm 1.2 | 40.2 \pm 1.1 | NS |
| Σ MUFA | 29.0 \pm 1.6 | 29.4 \pm 1.6 | NS | 20.2 \pm 1.4 | 23.1 \pm 1.3 | NS |
| Σ PUFA | 37.4 \pm 1.3 | 38.5 \pm 1.3 | NS | 40.5 \pm 2.2 | 36.7 \pm 2.0 | NS |
| Σ HUFA | 28.9 \pm 1.0 | 30.3 \pm 1.0 | NS | 30.2 \pm 2.0 | 26.9 \pm 1.8 | NS |
| n-3/n-6 | 2.1 \pm 0.1 | 2.1 \pm 0.1 | NS | 2.2 \pm 0.1 | 2.0 \pm 0.1 | NS |

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; NS: sin diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

No hubo diferencias significativas en el resto de los esteroides analizados. En el espermátforo, los machos alimentados con *Ulva* tuvieron una proporción significativamente más baja de colesterol (96.3 ± 0.6 vs. $94.4 \pm 0.6\%$, $P < 0.05$), y se encontraron niveles detectables de fucosterol (ND vs. $0.6 \pm 0.1\%$ $P < 0.001$). No hubo diferencias significativas en el resto de los esteroides.

Tabla 4-3. Ácidos grasos (% del total de ácidos grasos, medias \pm ES) en espermatozoides de machos *L. vannamei* alimentados con o sin *U. clathrata* durante 45 días.

| Ácidos grasos | Control | | | <i>Ulva</i> | | | ANOVA |
|-------------------|---------|-------|------|-------------|-------|------|----------|
| 16:0 | 18.70 | \pm | 0.30 | 18.62 | \pm | 0.30 | NS |
| 18:0 | 12.14 | \pm | 0.25 | 12.04 | \pm | 0.25 | NS |
| 20:0 | 0.19 | \pm | 0.03 | 0.17 | \pm | 0.03 | NS |
| 16:1n-9 | 1.18 | \pm | 0.04 | 1.26 | \pm | 0.04 | NS |
| 16:1n-7 | 2.41 | \pm | 0.08 | 2.51 | \pm | 0.08 | NS |
| 18:1n-9 | 8.58 | \pm | 0.28 | 9.65 | \pm | 0.28 | $P<0.05$ |
| 18:1n-7 | 3.24 | \pm | 0.05 | 3.20 | \pm | 0.05 | NS |
| 20:1n-9 | 1.39 | \pm | 0.08 | 1.22 | \pm | 0.08 | NS |
| 20:1n-7 | 0.22 | \pm | 0.03 | 0.26 | \pm | 0.03 | NS |
| 18:2n-6 | 3.06 | \pm | 0.18 | 3.35 | \pm | 0.18 | NS |
| 18:3n-3 | 1.35 | \pm | 0.08 | 1.53 | \pm | 0.08 | NS |
| 20:2n-6 | 1.11 | \pm | 0.05 | 1.16 | \pm | 0.05 | NS |
| 20:3n-3 | 0.52 | \pm | 0.04 | 0.57 | \pm | 0.04 | NS |
| 20:4n-6 | 5.78 | \pm | 0.20 | 6.48 | \pm | 0.25 | $P<0.05$ |
| 20:5n-3 | 17.06 | \pm | 0.42 | 15.64 | \pm | 0.42 | $P<0.01$ |
| 22:6n-3 | 14.24 | \pm | 0.56 | 13.14 | \pm | 0.56 | NS |
| Σ Saturado | 34.40 | \pm | 0.56 | 33.89 | \pm | 0.56 | NS |
| Σ MUFA | 20.42 | \pm | 0.49 | 21.70 | \pm | 0.49 | NS |
| Σ PUFA | 45.18 | \pm | 0.85 | 44.41 | \pm | 0.85 | NS |
| Σ HUFA | 38.88 | \pm | 0.94 | 37.56 | \pm | 0.94 | NS |
| n-3/n-6 | 3.15 | \pm | 0.13 | 2.71 | \pm | 0.13 | $P<0.05$ |

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; NS: sin diferencia significativa ($P\leq 0.05$)

9.4.5. Contenido de compuestos fenólicos y carotenoides en tejidos de machos

El contenido de compuestos fenólicos y carotenoides en el hepatopáncreas y el músculo de los machos se muestra en la Figura 4-5. El consumo de *Ulva* aumentó significativamente la concentración de compuestos fenólicos en hepatopáncreas (1.8 ± 0.7 vs. 6.1 ± 0.8 , $P<0.001$) y en músculo (0.23 ± 0.03 vs. 0.40 ± 0.02 , $P<0.001$, Fig. 4-5A, B). También aumentó significativamente el contenido de carotenoides en el hepatopáncreas (0.01 ± 0.02 vs. 0.08 ± 0.01 mg g⁻¹, $P<0.05$, Fig. 4-5C), pero no se encontraron diferencias significativas en el músculo para el contenido de carotenoides (Fig. 4-5D).

Tabla 4-4. Perfil de esteroides (% del total de esteroides, medias \pm ES) en hepatopáncreas, músculo y espermátforo de machos *L. vannamei* alimentados con o sin *U. clathrata* durante 45 días.

| Esteroides | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA |
|-----------------------|----------------|--------------------|--------------|
| Hepatopáncreas | | | |
| Colesterol | 97.7 \pm 0.5 | 97.0 \pm 0.4 | NS |
| Brassicasterol | 0.8 \pm 0.3 | 1.5 \pm 0.3 | NS |
| Campesterol | 0.2 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 | NS |
| Stigmasterol | 0.7 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | NS |
| β -Sitosterol | 0.2 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.1 | NS |
| Fucosterol | ND | 0.2 \pm 0.0 | $P<0.01$ |
| Isofucosterol | 0.3 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | NS |
| Músculo | | | |
| Colesterol | 98.9 \pm 0.9 | 95.4 \pm 0.7 | $P<0.05$ |
| Brassicasterol | ND | 3.3 \pm 0.7 | $P<0.05$ |
| Campesterol | 0.1 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.0 | NS |
| Stigmasterol | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | NS |
| β -Sitosterol | 0.3 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | NS |
| Fucosterol | ND | 0.3 \pm 0.0 | $P<0.01$ |
| Isofucosterol | 0.2 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | NS |
| Espermátforo | | | |
| Colesterol | 96.3 \pm 0.6 | 94.4 \pm 0.6 | $P<0.05$ |
| Brassicasterol | 1.8 \pm 0.2 | 1.9 \pm 0.2 | NS |
| Campesterol | ND | ND | NS |
| Stigmasterol | ND | ND | NS |
| β -Sitosterol | 0.7 \pm 0.2 | 0.8 \pm 0.1 | NS |
| Fucosterol | ND | 0.6 \pm 0.1 | $P<0.01$ |
| Isofucosterol | ND | ND | NS |

NS: sin diferencia significativa ($P\leq 0.05$). ND: no detectado

9.5. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran un efecto significativo de la dieta enriquecida con *Ulva* sobre el rendimiento reproductivo (viabilidad del huevo y cortejo) y, en particular, en la melanización del espermátforo. La melanización fue casi el doble en los machos alimentados con la dieta control (233 en 45 días) en comparación con los machos alimentados con *Ulva* (120 en 45 días). La melanización del espermátforo durante el ciclo de producción se correlacionó con el aumento de la temperatura en los machos alimentados con la dieta de control (dieta rica en lípidos compuesta principalmente por invertebrados) ($r = 0.77$; $P<0.05$), esto coincide con lo reportado por diferentes autores (Alfaro, 1993; Braga et al., 2018a).

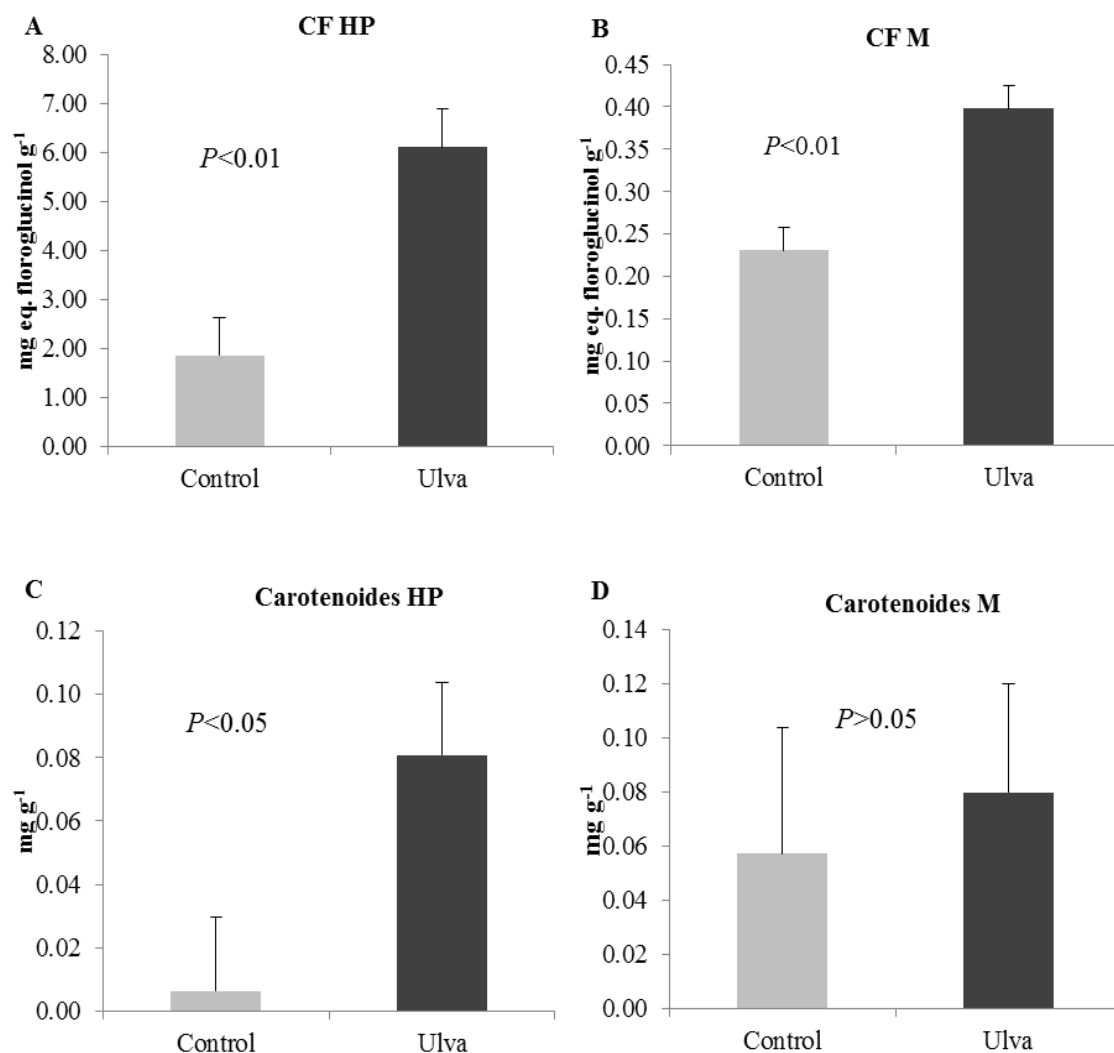


Figura 4-5. Compuestos fenólicos (CF) en A) hepatopáncreas y B) músculo, y carotenoides en C) hepatopáncreas y D) músculo de machos *L. vannamei* alimentados con una dieta control (gris claro) o una dieta con *Ulva* (gris oscuro) durante 45 días (medias \pm ES).

La dieta utilizada durante el ciclo de producción suele administrarse a los reproductores, ya que está enriquecida con ácidos grasos que se encuentran originalmente en las gónadas de las hembras silvestres, mismas que presentan un mejor rendimiento reproductivo que las hembras criadas en cautiverio (Palacios et al., 2000; Wouters et al., 2001b). Es interesante que 0.8% de *Ulva* agregado a la dieta pueda afectar un parámetro problemático, como lo es la melanización del espermatóforo. La melanización es un mecanismo de defensa de las bacterias mediante la activación de la profenol oxidasa para producir melanina (Braga et al., 2018b), que se deposita extracelularmente en los

tejidos en crustáceos (Alfaro y Lozano, 1993). Esto conduce al deterioro del tracto reproductivo en los machos, afecta su capacidad reproductiva (Pérez-Velázquez et al., 2001; Harlioğlu et al., 2018) y, finalmente, con el tiempo (4-5 semanas) aumenta la proporción de machos estériles (Alfaro, 1993; Alfaro y Lozano, 1993). Las bacterias crecen a altas temperaturas, que son frecuentemente usadas en los laboratorios comerciales, ya que la temperatura es necesaria para estimular la maduración de la gónada de hembras, incluso cuando ocasiona deterioro de los machos: se sabe que el aumento de la temperatura del agua desencadena la melanización (Pérez-Velázquez et al., 2001; Pascual et al., 2003; Braga et al., 2018a). Las algas del género *Ulva* presentan una variedad de compuestos con actividades antimicrobianas como terpenos, esteroides, compuestos polifenólicos y polisacáridos (Kim et al., 2010; Trigui et al., 2013), estos compuestos tienen actividades inhibitorias contra bacterias y hongos (Hellio et al., 2000; Trigui et al., 2013), y su efecto es notorio incluso a bajas dosis, por lo que es factible que el efecto de *Ulva* en la prevención de la melanización se logre gracias a estos compuestos. Por otro lado, hubo más cortejos en camarones alimentados con *Ulva*, lo que refleja más espermatozoides en buen estado, y por lo tanto más desoves por tanque. De acuerdo a lo anterior, en un estudio previo encontramos un aumento en el número de desoves en reproductores alimentados con *Ulva* (14 contra 11 desoves por día) (Corral-Rosales et al., 2018b). La esterilidad por melanización en machos cautivos también se ha atribuido a una dieta desequilibrada, ya sea con excesos en proteína (Goimier et al., 2006) o en carbohidratos (Braga et al., 2010), como activadores del estrés oxidativo en espermatozoides, que es más evidente por aumentos en la temperatura. Los machos alimentados con *Ulva* tuvieron una capacidad antioxidante significativamente mayor, mediada por los compuestos fenólicos en el músculo y en el hepatopáncreas y los carotenoides totales en el hepatopáncreas. Una alta actividad antioxidante por pigmentos y flavonoides ha sido reportada previamente para *Ulva* (Kim et al., 2010; Farasat et al., 2014; McCauley et al., 2018). Aquí, además de estos compuestos, encontramos un aumento de fucosterol en todos los tejidos, incluido el espermatozoides, también se ha documentado que el fucosterol tiene actividad antioxidante (Abdul et al., 2016; Begum et al., 2018). Así, la disminución de la melanización en espermatozoides en machos alimentados con *Ulva* podría ser el

resultado de neutralizar el estrés oxidativo por medio de los antioxidantes presentes en *Ulva*, o por inhibir directamente la proliferación de bacterias que causan la melanización en el sistema reproductivo como se mencionó anteriormente.

Un resultado interesante fue el aumento del ácido araquidónico (20:4n-6) en los espermatóforos y en la fracción neutra del hepatopáncreas de los machos alimentados con *Ulva*. Este ácido graso es el principal precursor de los eicosanoides, y entre los eicosanoides, las prostaglandinas (PG), mismas que modulan la actividad reproductiva de los organismos (Duangprom et al., 2018). En peces machos, los PG actúan sobre el cerebro para inducir la síntesis de andrógenos (Zhang et al., 2019). En los crustáceos, la PG participa en el desarrollo ovárico (Duangprom et al., 2018). Alfaro (2015) encontró que al inhibir la producción de PG con ibuprofeno había menos espermatozoides anormales, pero también menos generación de espermatóforos en *L. vannamei*. Meunpol et al. (2005) reportaron que 20:4n-6 incluido en la dieta para *P. monodon* aumenta el conteo de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos y disminuye la proporción de espermatozoides anormales en los machos. Otras vías por las cuales el 20:4n-6 podría estar regulando la producción de esperma, es al afectar los niveles de colesterol. El ácido araquidónico puede regular la transferencia de colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas (Wang y Stocco, 2005), especialmente la testosterona (Mercure y Van der Kraak, 1996). El colesterol se reduce en el conducto deferente de *P. monodon* durante la maduración del esperma (Chotwiwatthanakun et al., 2016). Los espermatozoides en peneidos sufren cambios fisiológicos y bioquímicos durante la maduración que mejoran su reactividad y capacidad para fertilizar el óvulo (Aungsuchawan et al., 2011). De hecho, encontramos niveles más bajos de colesterol en el espermatóforo de los machos alimentados con *Ulva*, pero no en el hepatopáncreas, lo que indica que el fucosterol no disminuyó significativamente la absorción de colesterol en el tracto digestivo, como se ha informado de algunos fitoesteroles en mamíferos (Tapiero et al., 2003). Los niveles más bajos de colesterol en el espermatóforo se pueden asociar a la maduración de los espermatozoides, lo que podría explicar el aumento de la viabilidad del huevo en los reproductores alimentados con *Ulva*. El fucosterol también puede disminuir la inflamación que se espera durante la infección bacteriana del espermatóforo, al inhibir directamente la secreción de interleukin-6

(Hwang et al., 2014) o mediante el derivado de oxisterol del fucosterol un equivalente a la vía del receptor del hígado X (Vanmierlo et al., 2013) en camarones, que controlan la homeostasis del colesterol (Zhao y Dahlmair-Wright, 2010). Sin embargo, *Ulva* no es particularmente rica en 20:4n-6: encontramos alrededor del 1% de 20:4n-6 en esta cepa (Corral et al., 2019) y considerando que el enriquecimiento de *Ulva* fue de 0.8% de la dieta total, el aporte de *Ulva* es mínimo. La pregunta es por qué los niveles de este ácido graso se incrementan en los machos alimentados con *Ulva*. Una posibilidad es que, dado que *Ulva* es rico en antioxidantes, hay una disminución de la oxidación en los tejidos de los camarones alimentados con *Ulva*. Además, se ha reportado que las algas pueden aumentar la absorción y la asimilación de las proteínas y los lípidos de la dieta (Yone et al., 1986a, b), o modular el metabolismo de los lípidos (Nakagawa et al., 1997; Nakagawa y Montgomery, 2007). De acuerdo con esto, los niveles de HUFA en la fracción neutra del hepatopáncreas aumentaron en general en los machos alimentados con *Ulva*. Sin embargo, 20:5n-3 en realidad disminuyó en el espermatóforo de los camarones alimentados con *Ulva*, lo que indica que hubo una incorporación selectiva de 20:4n-6 en el espermatóforo, y no solo una protección de los HUFA por los antioxidantes. El ácido araquidónico probablemente se incorporó a los espermatóforos en forma de fosfolípidos, ya que este tejido también se enriqueció en 18:1n-9. Se ha demostrado que el fucosterol afecta la incorporación de fosfolípidos, la síntesis de lipoproteínas y el transporte de lipoproteínas desde el hepatopáncreas (Hoang et al., 2012). Un transporte selectivo de fosfolípidos enriquecidos con 20:4n-6 desde el hepatopáncreas hacia el espermatóforo, está de acuerdo con la sobreexpresión de los genes de la vía metabólica asociados con el metabolismo y el transporte de 20:4n-6 en juveniles de *L. vannamei* alimentados con *Ulva* (Elizondo-Reyna et al., 2016). También encontramos que el uso y la movilidad de los nutrientes, particularmente los lípidos, es diferente en los machos en comparación con las hembras durante la maduración. En las hembras hubo un mayor transporte de nutrientes desde el hepatopáncreas a las gónadas durante la maduración y este transporte se mejoró al agregar *Ulva* a la dieta (Corral-Rosales et al., 2019). En contraste, los machos presentaron niveles similares de lípidos y proteínas en el hepatopáncreas, con solo una disminución en el contenido de carbohidratos. Los carbohidratos también fueron más bajos en músculo, al igual que los

triglicéridos que se almacenan en el músculo cuando la dieta es rica en carbohidratos. Dado que las dietas tenían niveles similares de carbohidratos, *Ulva* redujo la acumulación de carbohidratos y triglicéridos, ya sea por un aumento del gasto en todos los tejidos o por transporte selectivo a algunos tejidos, como podría ser el caso del espermátforo, que utiliza altas cantidades de glucosa durante la formación del espermátforo (Ceballos et al., 2003). Este efecto también podría ser regulado por el fucosterol, ya que se ha encontrado la misma degradación del glucógeno y la gluconeogénesis en el hígado, produciendo un efecto hipoglucémico (Hoang et al., 2012), posiblemente a través de la vía del receptor X del hígado, que controla la homeostasis de los carbohidratos (Baranowski, 2008).

En conclusión, la adición del 0.8% de *Ulva* a la dieta reduce el número de espermátforos con melanización incluso cuando aumenta la temperatura. También aumenta la actividad de cortejo y la viabilidad de los huevos. El consumo de *Ulva* afecta la composición bioquímica del hepatopáncreas y del músculo, incrementa el 20:4n-6 en espermátforos y aumenta los compuestos fenólicos y carotenoides en los tejidos, probablemente incrementa la capacidad antioxidante. La inclusión de *Ulva* en la dieta fresca para reproductores machos *L. vannamei* podría ser una estrategia viable y un bajo costo para mejorar la capacidad reproductiva y reducir los efectos de la temperatura durante la producción comercial.

CAPÍTULO 5

10. Mejora de la calidad de desove utilizando *Ulva clathrata* en reproductores de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Borrador: Corral-Rosales, D. C., Nieto-López M G., Cruz-Suárez, L. E., Rodríguez-Jaramillo, C. y Palacios, E., (2019). Improvement of spawning quality using *Ulva clathrata* in white shrimp broodstock of the Pacific *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

10.1. Resumen

Se alimentaron reproductores *L. vannamei* en un laboratorio de larvas comercial con una dieta control y una dieta con 0.8% de harina de *U. clathrata* incluida en la dieta fresca. Se obtuvieron 50 desoves, de los cuales se tomaron muestras de huevos y nauplios para análisis bioquímicos, morfológicos (largo, ancho y diámetro por microfotografías de campo claro), de ácidos grasos y de esteroides. Los resultados obtenidos mostraron que los nauplios de reproductores alimentados con *Ulva* fueron significativamente más largos (12%) y anchos (22%). El diámetro de los huevos de desoves de las hembras que consumieron la dieta con *Ulva* aumentó significativamente un 14%. Los huevos y los nauplios de reproductores alimentados con *Ulva* en la dieta tuvieron niveles significativamente más altos de proteína (51.6 ± 4.3 vs. 79.6 ± 4.7 mg g⁻¹, $P < 0.01$; 62.5 ± 9.2 vs. 93.9 ± 9.8 , $P < 0.05$, respectivamente) y de carotenoides (8.1 ± 1.4 vs. 18.2 ± 1.3 , $P < 0.01$; 6.1 ± 0.3 vs. 8.3 ± 0.4 mg g⁻¹, $P < 0.01$, respectivamente) comparados con el control. En huevos, el consumo de *Ulva* aumentó significativamente el 18:3n-3 en 100% (de 1.2 a 2.4 %), el 20:4n-6 en 18% (de 1.7 a 2.0%), el 20:5n-3 en 19% (de 7.6 a 9.0%) y el 22:6n-3 en 11% (de 11.3 a 12.5%). En la fracción polar, el consumo de *Ulva* aumentó significativamente el 18:3n-3 en 81% y el 22:6n-3 en 11% y disminuyó el 20:0 en 25% y el 18:1n-7 en 13%. En la fracción neutra los nauplios de reproductores alimentados con *Ulva* aumentaron significativamente el 18:0, 16:1n-9, 18:3n-3, 20:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3 y la Σ PUFA 10%, 33%, 150%, 40%, 23%, 20% y 11%, respectivamente y disminuyeron significativamente el 16:0 en 8%, el 18:2n-6 en 24%, los saturados 8% y la relación n-3/n-6 en 20% respecto al grupo control. En la fracción polar el 20:4n-6 aumentó significativamente 11% con el consumo de *Ulva*. Los huevos y nauplios de hembras que consumieron la dieta con *Ulva* tuvieron mejor calidad en sus reservas bioquímicas reflejado en un mayor tamaño en comparación con el grupo control, por lo que *Ulva* incluida en la dieta para reproductores *L. vannamei* puede ser una alternativa para mejorar la calidad de los huevos y de los nauplios bajo condiciones de producción comercial.

10.2. Introducción

En penaeidos, el gasto energético durante la reproducción está asociado con la maduración del ovario debido a la biosíntesis de nutrientes necesarios para las reservas alimenticias durante los primeros estadios lecitroficados (Cahu et al., 1995; Wouters et al., 2001b; Racotta et al., 2003; Boucard et al., 2004). La acumulación de nutrientes en la gónada durante la maduración, depende de la movilización de reservas de otros tejidos especialmente del hepatopáncreas (Teshima et al., 1988; Castille y Lawrence, 1989; Millamena y Pascual, 1990; Palacios et al., 2000; Yu et al., 2007). Durante la producción en cautiverio los desoves múltiples afectan el estado fisiológico de las hembras, como resultado a un periodo insuficiente de almacenamiento de reservas nutricionales en el hepatopáncreas y un limitado transporte a las gónadas, lo que lleva a su agotamiento reproductivo (Primavera, 1985; Harrison, 1990; Palacios et al., 1999c; Vázquez-Boucard et al., 2004). El agotamiento reproductivo puede causar un índice gonadosomático más bajo y niveles más bajos de proteínas totales, lípidos y colesterol en la hemolinfa y en hepatopáncreas (Palacios et al., 1998, 1999c; Cheng et al., 2000; Vázquez-Boucard et al., 2004; Yu et al., 2007). Dichas alteraciones fisiológicas, a su vez, pueden tener un efecto en la calidad del huevo y de las larvas. La calidad del huevo se define como la capacidad de un huevo para ser fertilizado y desarrollarse (Holcomb et al., 2004), mientras que la calidad de las larvas se refiere al rendimiento y a la condición fisiológica (Bray y Lawrence, 1991; Wouters et al., 1997). Ambos parámetros son usados como un criterio de control de calidad y pueden abordarse mediante el análisis de variables bioquímicas (Palacios et al., 1998; Palacios et al., 1999b), morfológicas y de producción (Ibarra et al., 1997; Cavalli et al., 2000). La composición bioquímica de los huevos es un indicador particularmente útil de la calidad de la descendencia, ya que influye en el éxito del desarrollo embrionario y larvario (Holland, 1978; Fraser, 1989; Hernández-Herrera, 2001; Palacios et al., 2001). Los lípidos, en particular los triglicéridos, son la principal fuente de energía metabólica debido a su alto potencial de oxidación (Stryer, 1997). En crustáceos, los lípidos son componentes bioquímicos fundamentales de la reserva de los huevos, no solo por su aporte de energía, sino también porque tienen funciones estructurales (fosfolípidos, colesterol) y hormonales (colesterol y ácido araquidónico) importantes para el

desarrollo. Por lo anterior los niveles de lípidos han sido usados como indicador nutricional en los desoves (Cahu et al., 1988; Lavens y Sorgeloos, 1991; Cahu et al., 1995; Palacios et al., 1999c). En estudios previos, encontramos que la inclusión *Ulva clathrata* en la dieta para reproductores *L. vannamei* en un laboratorio de larvas comercial, disminuye el agotamiento reproductivo en hembras ablacionadas, estimula la vitelogénesis tardía y aumenta la acumulación de lípidos en las gónadas (Corral et al., 2018b). Además, aumenta el ácido araquidónico en las gónadas maduras y mejora el transporte de lípidos (Corral et al., 2019). Sin embargo, se desconoce el efecto del consumo de *Ulva* sobre la calidad del desove. Debido a lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de *Ulva clathrata* en la dieta para reproductores, sobre la calidad del desove mediante criterios bioquímicos y morfológicos.

10.3. Materiales y métodos

10.3.1. Desoves y colecta de muestra

Casi al final del ciclo de producción el día 43 (45 días de producción), a las 19:00 horas, 50 hembras maduras (con ovarios rojo-verdes) con espermatóforo adherido al tético, se capturaron del tanque de maduración y se colocaron en cilindros individuales de 200 L para desovar, cada uno de los cilindros con piedras de aireación a 29.6 ± 1.5 °C y 32.6 ± 0.5 mg L⁻¹ de temperatura y salinidad, respectivamente. Cada cilindro localizado en un área apartada de los tanques de maduración (Figura 5-1A). Después de la medianoche y del desove, cada hembra fue regresada a su tanque de maduración correspondiente. Al amanecer (8:00), se tomaron muestras de huevos de cada desove con una malla de 100 µm. Posteriormente, a medio día justo después de la eclosión, se recolectaron nauplios de cada cilindro en la etapa I con cosechadores individuales de 30 L (Figura 5-1C). Los nauplios se recolectaron mediante fototropismo positivo, se sifonearon y se concentraron en mallas de 100 µm. Una parte de cada muestra de huevos y nauplios se congeló y se almaceno a -80°C y la otra parte se conservó en tubos Eppendorf de 2 mL con formaldehído al 10%. Se pesaron aproximadamente 100 mg de huevos y nauplios de muestras almacenadas a -80°C y se colocaron en tubos con 6 ml de solución de Folch para el análisis de ácidos grasos, esteroles y carotenoides. El resto

de la muestra se pesó y se colocó en tubos de 2 mL para la composición bioquímica. Las muestras conservadas con formaldehído se utilizaron para fotomicrografías.

10.3.2. Microfotografía de campo brillante

Muestras de huevos y nauplios conservados en formaldehído al 10% se colocaron en portaobjetos para microfotografías de campo brillante. Se tomaron un total de 25 fotos digitales de nauplios y huevos de cada tratamiento y se determinó lo alto, el ancho, y el diámetro. La microfotografía de campo brillante de cada muestra se tomó con un microscopio Olympus BX41 conectado a una cámara de video (Nikon Digital Sight DS-Ri1®). Las imágenes fueron procesadas con Image Pro Premier v.9.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD).



Figura 5-1. Área de desove (A); Cilindros individuales de 200 L para el desove (B); Cosecha de nauplio en cosechadores de 30 L (C)

10.3.3. Análisis bioquímicos

Se realizaron análisis de proteínas (Bradford, 1976) y de carbohidratos (Van Handel, 1965) en huevos y nauplios como se describe en el Capítulo 2 (ver el punto 7.3.6.)

10.3.4. Análisis de ácidos grasos, esteroides y carotenoides

Se realizaron análisis de ácidos grasos, esteroides y carotenoides en huevos y nauplios como se describe en el Capítulo 3.

10.3.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) considerando como factor el tratamiento (T, con dos niveles, con o sin *Ulva*) para el ancho, la longitud, los compuestos bioquímicos, los ácidos grasos, los esteroides y los carotenoides (Software STATISTICA, Versión 5.0). Adicionalmente se realizaron análisis de regresión lineal para determinar las correlaciones entre la composición bioquímica, el número de desove y los ácidos grasos.

10.4. Resultados

10.4.1. Microfotografías y medidas de huevos y nauplios

En la Figura 5-3 se muestra la altura y el ancho de nauplios y el diámetro de huevos de desoves de reproductores alimentados con y sin *Ulva* en la dieta. Los nauplios de reproductores alimentados con *Ulva* fueron significativamente más largos ($275.0 \pm 5.7 \mu\text{m}$ vs. 308.8 ± 6.1 , $P < 0.01$) y anchos ($149.1 \pm 3.7 \mu\text{m}$ vs. 182.9 ± 3.9 , $P < 0.01$) con respecto a los nauplios de los controles. El diámetro de los huevos de desoves de la dieta con *Ulva* aumentó significativamente 14% ($232.1 \pm 1.2 \mu\text{m}$ vs. $264.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$, $P < 0.01$, Figura 5-3).

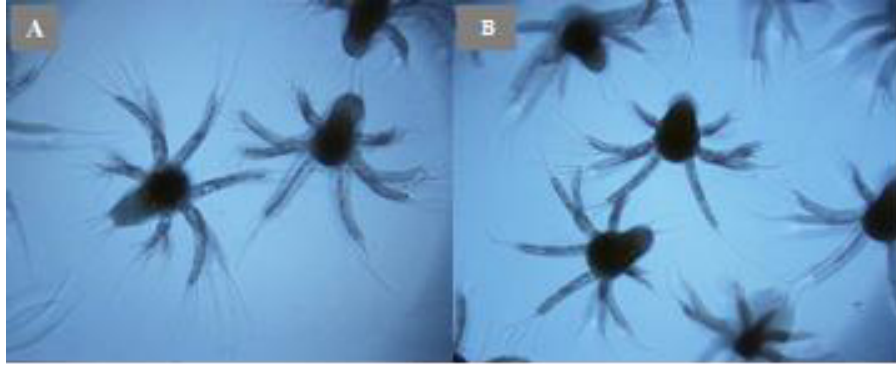


Figura 5-2. Microfotografías de desoves de reproductores alimentados con y sin *Ulva* en la dieta fresca. (A) Nauplios de desoves de la dieta con *Ulva* (10X, campo claro); (B) Nauplios de desoves de la dieta control (10X, campo claro).

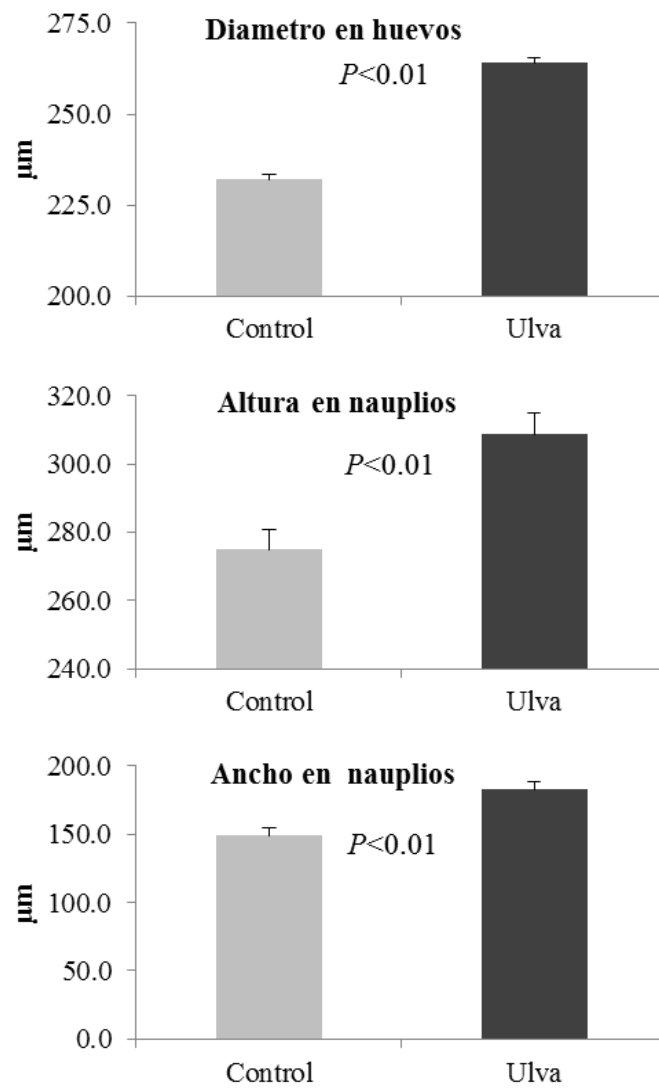


Figura 5-3. Diámetro de huevos (A), altura (A) y ancho (B) de nauplios de desoves de reproductores *L. vannamei* alimentados con y sin *Ulva* en la dieta para reproductores, durante 45 días (promedio \pm ES).

10.4.2. Composición bioquímica de huevos y nauplios

El contenido de carbohidratos, proteínas y carotenoides en huevos y nauplios de reproductores de *L. vannamei* alimentados con y sin *Ulva* en la dieta fresca para maduración se muestra en la Figura 5-4. Los huevos de reproductores alimentados con *Ulva* en la dieta tuvieron niveles significativamente más altos de proteína (51.6 ± 4.3 vs. 79.6 ± 4.7 , $P < 0.01$;) y carotenoides (8.1 ± 1.4 vs. 18.2 ± 1.3 , $P < 0.01$). Los nauplios: también presentaron niveles significativamente más altos de proteína (6.1 ± 0.3 vs. 8.3 ± 0.4 , $P < 0.01$, mg g^{-1}) y carotenoides (62.5 ± 9.2 vs. 93.9 ± 9.8 , $P < 0.05$, mg g^{-1}) con respecto al control. Realizando una regresión lineal entre el número de desoves por hembra y la composición bioquímica en huevos, encontramos que los huevos de los reproductores de la dieta control se correlacionaron negativamente con el número total de desoves y los niveles de proteína ($r = -0.953$). En nauplios también encontramos una correlación negativa en los nauplios de reproductores alimentados con la dieta control entre el número total de desoves de cada hembra y el contenido proteína y carotenoides ($r = -0.981$, $r = -0.948$ respectivamente). No hubo diferencias significativas en el contenido de carbohidratos en huevos y nauplios con o sin el tratamiento con *Ulva*.

10.4.3. Ácidos grasos de huevos de *L. vannamei*

El perfil de ácidos grasos de la fracción neutra y polar en los huevos de los desoves de reproductores alimentados con *Ulva* en la dieta se muestra en la Tabla 5-1. En la fracción neutra en huevos, el consumo de *Ulva* aumentó significativamente el 16:1n-9 en 33%, el 20:1n-9 en 14%, el 18:3n-3 en 100%, el 20:4n-6 en 18%, el 20:5n-3 en 19%, el 22:6n-3 en 11%, la Σ PUFA en 11%, la Σ HUFA en 14% y la relación n-3/n-6 en 23% y disminuyó la Σ MUFA en 6%.

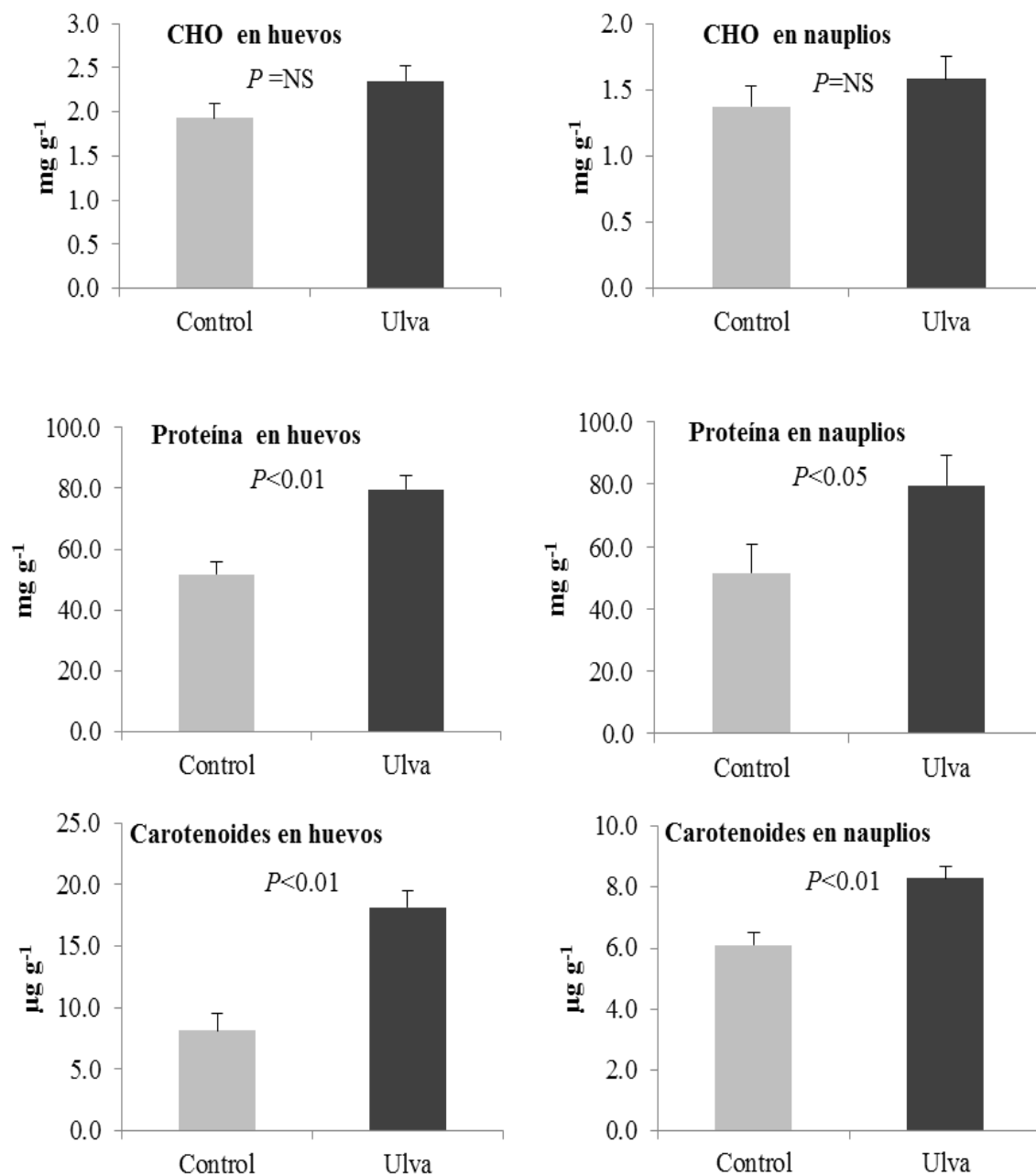


Figura 5-4. Carbohidratos (CHO), proteínas (mg g⁻¹ dw) y carotenoides (μg g⁻¹) en huevos y nauplios de *L. vannamei* alimentados con una dieta de control (gris claro) o una dieta con *Ulva* (gris oscuro) durante 45 días (promedio± ES).

Tabla 5-1. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar (% del total de ácidos grasos, medias \pm ES) medidos en huevos de *L. vannamei* alimentados con o sin *U. clathrata* en la dieta fresca durante 45 días.

| Ácidos grasos | Fracción neutra | | | Fracción polar | | |
|--------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA |
| 16:0 | 24.6 \pm 0.3 | 24.5 \pm 0.2 | NS | 19.3 \pm 0.3 | 19.2 \pm 0.3 | NS |
| 18:0 | 5.1 \pm 0.3 | 5.0 \pm 0.2 | NS | 11.0 \pm 0.7 | 9.9 \pm 0.6 | NS |
| 20:0 | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | NS | 0.4 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | <i>P</i> <0.01 |
| 16:1n-9 | 0.9 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.1 | <i>P</i> <0.01 | 1.8 \pm 0.1 | 1.5 \pm 0.1 | NS |
| 16:1n-7 | 9.2 \pm 0.4 | 8.9 \pm 0.3 | NS | 6.3 \pm 0.3 | 6.5 \pm 0.2 | NS |
| 18:1n-9 | 13.9 \pm 0.2 | 13.3 \pm 0.1 | <i>P</i> <0.05 | 15.5 \pm 0.4 | 15.7 \pm 0.4 | NS |
| 18:1n-7 | 4.7 \pm 0.2 | 4.3 \pm 0.1 | <i>P</i> <0.05 | 5.7 \pm 0.2 | 5.0 \pm 0.2 | <i>P</i> <0.05 |
| 20:1n-9 | 1.4 \pm 0.1 | 1.6 \pm 0.0 | <i>P</i> <0.01 | 2.5 \pm 0.1 | 2.6 \pm 0.1 | NS |
| 20:1n-7 | 0.6 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 | NS | 0.9 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | NS |
| 18:2n-6 | 2.3 \pm 0.1 | 1.9 \pm 0.1 | NS | 2.2 \pm 0.1 | 2.0 \pm 0.1 | NS |
| 18:3n-6 | 0.1 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 | NS | 0.3 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | NS |
| 18:3n-3 | 1.2 \pm 0.4 | 2.4 \pm 0.3 | <i>P</i> <0.05 | 1.1 \pm 0.2 | 2.0 \pm 0.2 | <i>P</i> <0.05 |
| 20:2n-6 | 0.5 \pm 0.0 | 0.5 \pm 0.0 | NS | 0.8 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 | NS |
| 20:3n-3 | 0.6 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.1 | NS | 0.9 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | NS |
| 20:4n-6 | 1.7 \pm 0.1 | 2.0 \pm 0.0 | <i>P</i> <0.01 | 2.7 \pm 0.2 | 3.1 \pm 0.1 | NS |
| 20:5n-3 | 7.6 \pm 0.3 | 9.0 \pm 0.2 | <i>P</i> <0.01 | 10.2 \pm 0.4 | 11.1 \pm 0.4 | NS |
| 22:6n-3 | 11.3 \pm 0.2 | 12.5 \pm 0.2 | <i>P</i> <0.01 | 10.1 \pm 0.4 | 11.2 \pm 0.4 | <i>P</i> <0.05 |
| Σ Saturados | 37.2 \pm 0.6 | 35.7 \pm 0.5 | NS | 34.0 \pm 0.8 | 32.3 \pm 0.8 | NS |
| Σ MUFA | 35.2 \pm 0.4 | 33.5 \pm 0.3 | <i>P</i> <0.01 | 35.8 \pm 0.6 | 34.8 \pm 0.5 | NS |
| Σ PUFA | 27.6 \pm 0.6 | 30.9 \pm 0.5 | <i>P</i> <0.01 | 30.2 \pm 1.0 | 32.9 \pm 0.9 | NS |
| Σ HUFA | 22.8 \pm 0.4 | 25.4 \pm 0.3 | <i>P</i> <0.01 | 24.9 \pm 0.9 | 27.1 \pm 0.8 | NS |
| n-3/n-6 | 3.9 \pm 0.2 | 4.8 \pm 0.2 | <i>P</i> <0.01 | 3.4 \pm 0.2 | 3.8 \pm 0.2 | NS |

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; NS: sin diferencia significativa (*P*≤0.05)

En la fracción polar de huevos, el consumo de *Ulva* aumentó significativamente el 18:3n-3 en 81% y el 22: 6n-3en 11% y disminuyó el 20:0 en 25% y 18:1n-7 en 13%. Al realizar análisis de regresión lineal entre los ácidos grasos de los huevos de los reproductores y los carotenoides, encontramos que los huevos de desoves de animales alimentados con la dieta con *Ulva* tuvieron una correlación positiva entre el 20:4n-6 de la fracción polar y el contenido de carotenoides ($r = 0.910$; *P*<0.05). No se encontraron otras correlaciones con el resto de ácidos grasos.

Tabla 5-2. Ácidos grasos de la fracción neutra y polar (% del total de ácidos grasos, medias± ES) medidos en nauplios de *L. vannamei* alimentados con o sin *U. clathrata* en la dieta fresca durante 45 días.

| Ácidos grasos | Fracción neutra | | | Fracción polar | | |
|---------------|-----------------|-------------|----------------|----------------|-------------|----------------|
| | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA |
| 16:0 | 24.8 ± 0.2 | 23.1 ± 0.2 | <i>P</i> <0.01 | 18.9 ± 0.2 | 18.9 ± 0.2 | NS |
| 18:0 | 4.8 ± 0.1 | 5.3 ± 0.2 | <i>P</i> <0.05 | 10.5 ± 0.2 | 10.6 ± 0.2 | NS |
| 20:0 | 0.5 ± 0.1 | 0.5 ± 0.1 | NS | 0.4 ± 0.0 | 0.4 ± 0.0 | NS |
| 15:1n-8 | 0.6 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | NS | 0.3 ± 0.1 | 0.3 ± 0.2 | NS |
| 16:1n-9 | 0.9 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | <i>P</i> <0.01 | 1.7 ± 0.1 | 1.7 ± 0.1 | NS |
| 16:1n-7 | 8.7 ± 0.2 | 8.7 ± 0.3 | NS | 6.1 ± 0.4 | 5.8 ± 0.5 | NS |
| 18:1n-9 | 14.0 ± 0.3 | 13.3 ± 0.3 | NS | 15.4 ± 0.3 | 15.6 ± 0.3 | NS |
| 18:1n-7 | 4.3 ± 0.1 | 4.5 ± 0.1 | NS | 5.3 ± 0.1 | 5.0 ± 0.1 | NS |
| 20:1n-9 | 1.6 ± 0.0 | 1.7 ± 0.1 | NS | 2.5 ± 0.1 | 2.6 ± 0.1 | NS |
| 20:1n-7 | 0.7 ± 0.0 | 0.7 ± 0.1 | NS | 0.9 ± 0.0 | 0.9 ± 0.0 | NS |
| 18:2n-6 | 2.1 ± 0.1 | 1.6 ± 0.1 | NS | 2.0 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 | NS |
| 18:3n-6 | 0.1 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | NS | 0.3 ± 0.0 | 0.3 ± 0.0 | NS |
| 18:3n-3 | 1.0 ± 0.2 | 2.5 ± 0.2 | NS | 1.7 ± 0.3 | 1.3 ± 0.3 | NS |
| 20:2n-6 | 0.5 ± 0.0 | 0.5 ± 0.0 | NS | 0.8 ± 0.0 | 0.8 ± 0.0 | NS |
| 20:3n-3 | 0.5 ± 0.1 | 0.7 ± 0.1 | <i>P</i> <0.01 | 0.8 ± 0.1 | 0.6 ± 0.1 | NS |
| 20:4n-6 | 1.7 ± 0.0 | 2.1 ± 0.1 | <i>P</i> <0.01 | 2.8 ± 0.1 | 3.1 ± 0.1 | <i>P</i> <0.01 |
| 20:5n-3 | 7.9 ± 0.2 | 9.5 ± 0.3 | <i>P</i> <0.01 | 10.9 ± 0.3 | 11.0 ± 0.3 | NS |
| 22:6n-3 | 12.4 ± 0.3 | 12.7 ± 0.4 | NS | 11.1 ± 0.4 | 11.6 ± 0.4 | NS |
| ∑Saturados | 36.9 ± 0.3 | 33.9 ± 0.4 | <i>P</i> <0.01 | 32.7 ± 0.3 | 32.8 ± 0.3 | NS |
| ∑MUFA | 34.6 ± 0.4 | 34.5 ± 0.5 | NS | 35.1 ± 0.5 | 34.7 ± 0.5 | NS |
| ∑PUFA | 28.5 ± 0.5 | 31.6 ± 0.6 | <i>P</i> <0.01 | 32.2 ± 0.6 | 32.6 ± 0.6 | NS |
| ∑HUFA | 24.4 ± 0.5 | 26.1 ± 0.7 | NS | 26.5 ± 0.7 | 27.7 ± 0.8 | NS |
| n-3/n-6 | 4.2 ± 0.2 | 5.2 ± 0.2 | <i>P</i> <0.01 | 3.9 ± 0.1 | 3.7 ± 0.1 | NS |

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; NS: sin diferencia significativa (*P*≤0.05)

10.4.4. Ácidos grasos de nauplios de *L. vannamei*

El perfil de ácidos grasos de la fracción neutra y polar medida en nauplios obtenidos de reproductores alimentados con y sin *Ulva* en la dieta se muestra en la Tabla 5-2. En la fracción neutra con *Ulva* aumentaron significativamente el 18:0, 16:1n-9, 18:3n-3, 20:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3 y la ∑PUFA en 10%, 33%, 150%, 40%, 23%, 20% y 11%, respectivamente y disminuyeron significativamente el 16:0 en 8%, la ∑ Saturados en 8% y la n-3/n-6 en 20% respecto al grupo control. En la fracción polar el 20:4n-6 aumentó significativamente en 11% con el consumo de *Ulva*. Al realizar análisis de

regresión lineal entre los ácidos grasos y el contenido de carotenoides de los nauplios de reproductores, encontramos que los nauplios alimentados con la dieta con *Ulva* tuvieron una correlación positiva entre el 20:4n-6 de la fracción polar y el contenido de carotenoides ($r = 0.900$; $P < 0.05$).

10.4.5. Esteroles en huevos y nauplios de *L. vannamei*

Se evaluó el perfil de esteroides en huevos y nauplios de reproductores alimentados con y sin *Ulva* y se muestra en la Tabla 5-3. No hubo diferencia significativa en huevos en relación a la dieta para algún esteroide analizado. En los nauplios de reproductores alimentados con la dieta con *Ulva*, el dehidrocolesterol aumentó significativamente de 3.9 a 12.6%, ($P < 0.05$) y disminuyó el colesterol de 96.1 a 87.4% ($P < 0.05$). El resto de los esteroides analizados no presentaron cambios significativos con el consumo de *Ulva*.

Tabla 5-3. Perfil de esteroides (% del total de esteroides, medias \pm ES) en huevos y nauplios de *L. vannamei* alimentados con o sin *U. clathrata* en la dieta durante 45 días.

| Esteroides | Control | <i>Ulva</i> | ANOVA |
|-------------------|----------------|--------------------|--------------|
| Huevos | | | |
| Dehidrocolesterol | 2.4 \pm 0.3 | 2.6 \pm 0.3 | NS |
| Colesterol | 93.7 \pm 0.7 | 93.3 \pm 0.7 | NS |
| Brassicasterol | 2.7 \pm 0.4 | 3.0 \pm 0.4 | NS |
| Campesterol | 0.2 \pm 0.2 | 0.3 \pm 0.2 | NS |
| B-Sitosterol | 1.0 \pm 0.4 | 0.8 \pm 0.3 | NS |
| Nauplios | | | |
| Dehidrocolesterol | 3.9 \pm 3.0 | 12.6 \pm 2.4 | $P < 0.05$ |
| Colesterol | 96.1 \pm 2.0 | 87.4 \pm 2.6 | $P < 0.05$ |
| Brassicaesterol | ND | ND | |
| Campesterol | ND | ND | |
| B-Sitosterol | ND | ND | |

NS: sin diferencia significativa ($P \leq 0.05$); ND: no detectado

10.5. Discusión

En crustáceos, la vitelogénesis es un evento bifásico que consiste en auto síntesis (o síntesis endógena) que es cuando los ovocitos están en estadios previtelogénicos y heterosíntesis (síntesis exógena) derivada en parte del alimento y de la síntesis endógena (Subramoniam, 2011). La previtelogénica o de auto síntesis es caracterizada por la diferenciación del retículo endoplásmico y la formación del vitelo endógeno almacenado en vesículas, mientras que la vitelogénesis secundaria o de heterosíntesis

corresponde a una fase intensiva de captación y almacenamiento de moléculas precursoras de vitelo exógenas que se acumulan en grandes glóbulos de vitelo (Subramoniam, 2011). En trabajos anteriores observamos que las hembras que consumen *Ulva* tienen ovocitos previtelogénicos y postvitelogénicos más grandes, lo cual indica que se está promoviendo la vitelogénesis secundaria. Dicha vitelogénesis secundaria, probablemente este promovida por una mejor captación y almacenamiento de reservas energéticas exógenas provenientes del alimento, tales como lípidos que son precursores del vitelo (Corral et al., 2018b). Se ha propuesto que el tamaño del huevo (volumen o diámetro) es un equivalente aproximado de la cantidad de reservas y la longitud del nauplio refleja el grado de desarrollo en un momento dado (Racotta et al., 2003). En concordancia, aquí los huevos tuvieron un mayor diámetro y los nauplios mayor longitud cuando provinieron de hembras que consumieron *Ulva*. Aquí, se observó que los niveles de proteína fueron mayores en huevos y nauplios provenientes de reproductores alimentados con *Ulva*.

Por otro lado, el tamaño de los ovocitos puede ser resultados de otros factores no directamente asociados a la dieta. Al finalizar la vitelogénesis, los ovocitos alcanzan la etapa final de la maduración que se caracteriza por la aparición de cuerpos en forma de bastoncillos, llamados barras corticales, localizados radialmente alrededor de la periferia de las membranas plasmáticas del ovocito (Lynn y Clark, 1987; Yano, 1988; Pongtippatee-Taweepreda et al., 2004). Durante el desove, las barras corticales se liberan al contacto de los huevos con el agua de mar y forman una inversión de jalea alrededor de los huevos (Clark et al., 1990; Rankin y Davis, 1990; Pongtippatee-Taweepreda et al., 2004). En este momento, las sustancias de gelatina se desprenden gradualmente de la superficie del huevo desovado y se convierten en los materiales floculantes denominados "agua de huevo" cuya función es un inductor natural de la reacción acrosómica del esperma (Clark et al., 1990; Pillai y Clark, 1990). La extrusión de barras corticales probablemente actúa como un entorno para la fertilización y el desarrollo del embrión (Pongtippatee-Taweepreda et al., 2004). En trabajos anteriores encontramos que el consumo de *Ulva* incrementa el área total cubierta por las mucinas corticales contenidas en las barras corticales de los ovocitos postvitelogénicos (Corral-Rosales et al., 2018b). Aquí encontramos que el diámetro de los huevos de

reproductores alimentados con *Ulva* fue mayor con respecto al control, lo cual podría ser resultado de la presencia de mayor número o tamaño de barras corticales. A su vez, esto podría explicar la mayor tasa de fertilización observada para desoves de reproductores alimentados con *Ulva* (Corral et al., 2018a).

Por otra parte, el perfil de ácidos grasos varió considerablemente entre huevos provenientes de reproductores control y aquellos alimentados con *Ulva*. En particular, aumentó la proporción de 18:3n-3 y del 20:4n-6: el aumento de 18:3n-3 es normal dado que *Ulva* tiene una proporción muy alta de 18:3n-3 (Aguilera-Morales et al., 2005; Serviere-Zaragoza et al., 2015), comparada con los demás ingredientes de la dieta (Corral et al., 2019). En contraste, el incremento de 20:4n-6 es interesante, dado que *Ulva* no contiene grandes cantidades de este ácido graso. El 20:4n-6 es precursor en la síntesis de prostaglandinas, induciendo la respuesta inmune y la contracción durante el desove. En pez oro (*Carassius auratus*) se ha descrito que el 20:4n-6 afecta la esteroidogénesis ovárica estimulando la producción de testosterona mediada por la Prostaglandina E₂ (PGE₂) (Mercure y Van Der, 1996). En huevos y larvas de crustáceos el 20:4n-6 mejora la eclosión del huevo, aumenta la tolerancia en larvas baja salinidad (Xu et al., 2016, Asil et al., 2018), permite la acumulación selectiva de ácidos grasos n-3 y debido a su inducción esteroidogénica tiene funciones reguladoras durante la embriogénesis (Kangpanich et al., 2016). El 20:4n-6 también afecta la producción de esteroides, particularmente testosterona, al regular la transferencia de colesterol (Mercure y Van Der, 1996; Xu et al., 2016; Kangpanich et al., 2016). Aquí hubo una disminución significativa del colesterol en los nauplios del grupo con *Ulva*.

Hemos observado en larvas de reproductores alimentados por la misma cepa de *Ulva* que el consumo de esta alga disminuye los tiempos de metamorfosis en larvas (Corral-Rosales, 2013) y aumenta la tasa de eclosión en huevos (Corral et al., 2018a). La liberación regulada de esteroides activos durante la embriogénesis pueden estar regulada por el 20:4n-6, desencadenando la formación de la cutícula embrionaria, la muda larvaria y la eclosión (Subramoniam et al., 2000; Gunamalai et al., 2004).

Mientras que los efectos del 20:4n-6 son muchos, no es claro por qué los huevos de reproductores alimentados con *Ulva* tienen más de éste HUFA, siendo que el alga tiene muy poco. Aquí, encontramos una correlación positiva entre los niveles de carotenoides

y la proporción del 20:4n-6 de los fosfolípidos en huevos y nauplios. Los carotenoides son compuestos antioxidantes que probablemente protegieron al 20:4n-6 de la oxidación. Los carotenoides pueden esterificarse a los ácidos grasos y acumularse en el vitelo en los huevos para su uso futuro durante la embriogénesis (Persia-Jothy et al., 2019). *Ulva* es rica en carotenoides (luteína, clorofila y zeaxantina) (Peña-Rodríguez et al., 2011) que se pueden metabolizar a astaxantina en el tejido de camarones (Cruz-Suárez et al., 2010a). En crustáceos, se han propuesto que los carotenoides aumentan la tolerancia al estrés, mejoran el desarrollo embrionario, el crecimiento y la maduración gonadal (Petit et al., 1991; Olson, 1993; Menasveta et al., 1994; Mantiri et al., 1995), reducen la tasa de mortalidad durante el desarrollo embrionario; aumentan la capacidad de tolerar condiciones ambientales adversas como la temperatura elevada del agua, los niveles elevados de amoníaco y los efectos oxidantes de la luz (Torrissen, 1984; Menasveta et al., 1994). En huevos de *E. asiática* la acumulación de pigmentos carotenoides como β -caroteno y la astaxantina permite la formación de los precursores de pigmentos oculares y cromatóforos (Persia-Jothy et al., 2019).

Otros compuestos altamente antioxidantes (compuestos fenólicos, polisacáridos sulfatados, fosfolípidos, fucoesterol, etc.) y que fueron acumulados en gónadas de reproductores que consumieron *Ulva* (Corral et al., 2019a,b), probablemente son transportados a los huevos durante la fase final de la vitelogénesis y mejoran la calidad del vitelo, y a la larga, resultan en el aumento significativo del 13% en la tasa de eclosión (Corral et al., 2018b).

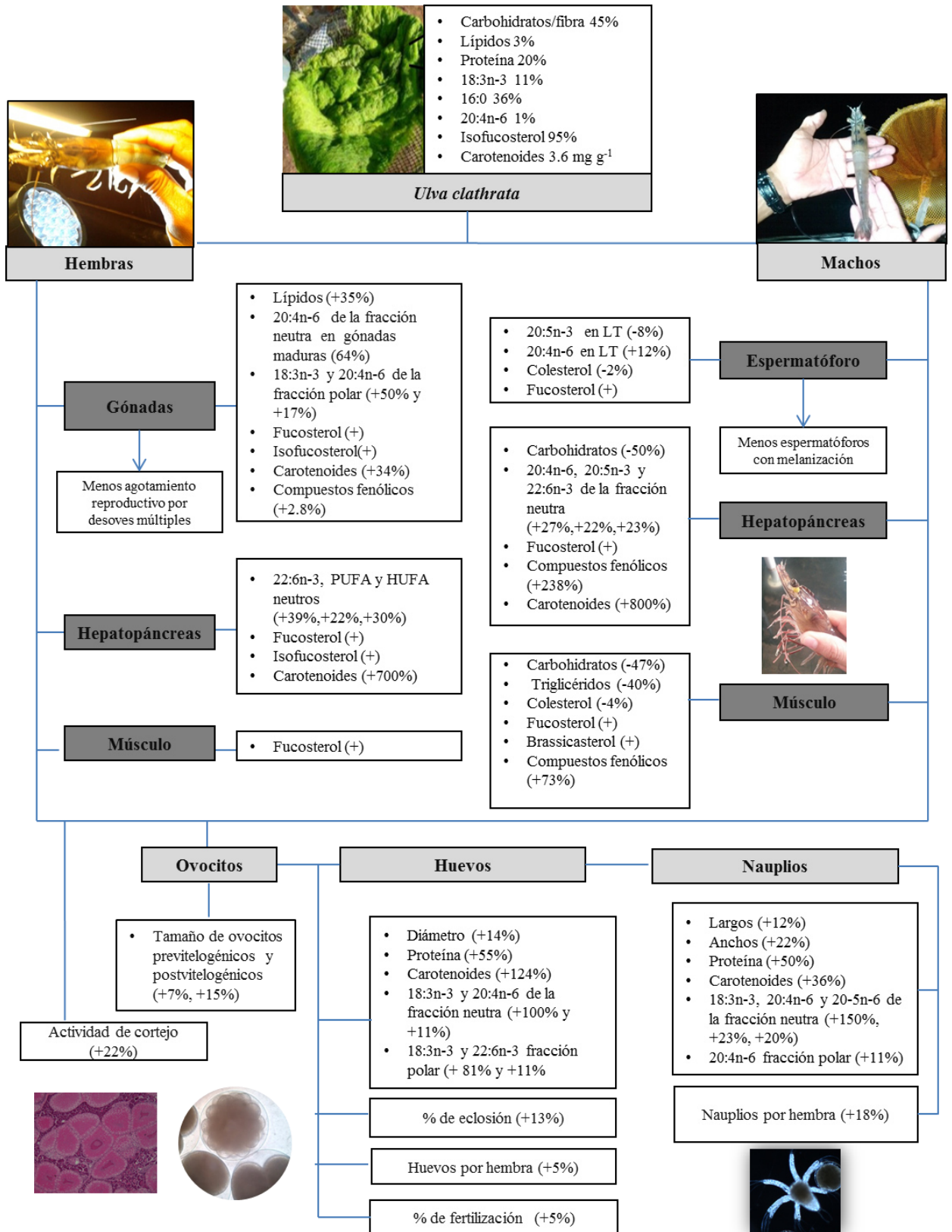
Concluimos que la inclusión de harina de *Ulva* en la dieta para reproductores *L. vannamei* mejora la calidad de los huevos y de los nauplios bajo condiciones de producción comercial, debido probablemente, a una mayor transferencia y acumulación de compuestos esenciales para el desarrollo del embrión, la eclosión del huevo y la reserva de los nauplios.

11. DISCUSIÓN COMPLEMENTARIA

En este estudio, al incluir la harina de la macroalga verde *Ulva* en la dieta para reproductores se obtuvieron mejoras sobre la capacidad reproductiva, la ablación y el agotamiento reproductivo en hembras, la transferencia de nutrientes del hepatopáncreas hacia las gónadas durante la vitelogénesis, la melanización en machos y la calidad del desove, mismos que son resumidos en el diagrama.

Como primer punto, y dado que la harina de *Ulva* fue incluida en el componente calamar de la dieta fresca para maduración, es posible que la capacidad aglutinante de la macroalga permita gelatinizar los jugos del calamar disminuyendo la lixiviación, o la pérdida de elementos nutritivos solubles arrastrados por el exceso de agua y aumentando así su disponibilidad para los reproductores, ya que se ha reportado que la fracción de los carbohidratos de las algas ofrece propiedades hidrofílicas y contribuye a la aglutinación y estabilización de la emulsión al aumentar la viscosidad de los alimentos (Shao et al., 2017). Además, estudios previos reportaron que los polisacáridos sulfatados poseen una serie de propiedades fisicoquímicas con una alta capacidad de unión al agua, lo que los hace ideales para ser utilizados en las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias como agentes emulsificantes (Robic et al., 2009; Yaich et al., 2011). Al respecto, Cruz-Suárez et al. (2000) evaluaron el efecto de la inclusión de diferentes niveles de harina de kelp *Macrocystis pyrifera* sobre algunas propiedades químicas y funcionales de alimentos experimentales y comerciales para juveniles de *L. vannamei* y concluyeron que la harina de kelp puede ser incluida entre 2 y 4% en alimentos peletizados para camarón, funcionando como attractante, aglutinante y texturizante y permitiendo una utilización más eficiente de los nutrientes diarios, al asegurar una menor lixiviación y una mayor ingesta de nutrientes.

Como segundo punto, uno de los resultados interesantes con el consumo de *Ulva* fue el aumento en la sobrevivencia en hembras ablacionadas. Se sabe que la ablación afecta los parámetros bioquímicos y consecuentemente produce un desgaste reproductivo (reducción en huevos y viabilidad de nauplios después de un determinado tiempo), generalmente seguido por un incremento en la mortalidad de hembras.



Sin embargo, para las hembras ablacionadas que fueron alimentadas con la dieta con *Ulva*, la mortalidad se redujo a la mitad y también se disminuyó el desgaste reproductivo en hembras con desoves múltiples. Esto significa que el consumo de *Ulva* de alguna forma, disminuye los efectos negativos de desgaste causados por la ablación. Una alternativa, es que los nutrientes con propiedades funcionales presentes en *Ulva*, tales como terpenos, esteroides, flavonoides compuestos polifenólicos y polisacáridos sulfatados, incrementan la respuesta inmune y la actividad antioxidante como ha sido descrito en los capítulos anteriores y minimizar de alguna forma los efectos nocivos causados por la ablación. Otra es que *Ulva* afecta la respuesta hormonal, como se discutirá más adelante, que puede tener un fuerte efecto sobre la recuperación tras la ablación y sobre el desempeño reproductivo.

Por otra parte, los análisis por bioquímica e histología mostraron que el consumo de *Ulva* afectó la vitelogénesis endógena y exógena al incrementar la cantidad de lípidos y proteínas en las gónadas, la talla de ovocitos vitelogénicos tardíos y postvitelogénicos. Adicionalmente, el consumo de alga también modificó la transferencia de nutrientes del hepatopáncreas a las gónadas de hembras, siendo más evidente los cambios generados en la composición lipídica y particularmente, en los HUFAs, principalmente el 20:4n-6, así como en el incremento en el contenido de carotenoides y compuestos fenólicos. Esta mayor incorporación de reservas en las lipoproteínas durante la vitelogénesis exógena que probablemente involucra mayor digestión en sistema digestivo, mayor transporte de nutrientes desde el hepatopáncreas y mayor acumulación en la gónada durante la vitelogénesis muy probablemente se debe a estimulación hormonal. Se ha reportado que hembras alimentadas con *Ulva* presentaron una mayor digestibilidad y asimilación de los nutrientes de la dieta fresca ya que es rica en fibra soluble (polisacáridos) que genera cambios en el metabolismo bacteriano por un lado, o debido a que es rica en minerales altamente disponibles que se usan como cofactores mejorando la actividad enzimática (Peña-Rodríguez, 2011). Con el consumo de *Ulva* aumentó el 20:4n-6 en gónadas, huevos y espermatóforos, lo cual resulta interesante dado que *Ulva* no es rica en 20:4n-6: encontramos alrededor del 1% de 20:4n-6 en esta cepa (Corral et al., 2019) y considerando que el enriquecimiento de *Ulva* fue de 0.8% de la dieta total, el aporte de *Ulva* es mínimo. Una posibilidad es que, dado que *Ulva* es rica en antioxidantes, hay

una disminución de la oxidación en los tejidos de los camarones alimentados con *Ulva*. Otra sería que el 20:4n-6 puede ser acumulado selectivamente en los tejidos. La importancia del 20:4n-6 sobre la actividad reproductiva radica en su intervención como precursor de los eicosanoides, principalmente PG, que afectan la respuesta inmune (podrían incrementar supervivencia después de ablación, como se menciona antes), la reproducción y el desove, y hasta la eclosión.

Por otro lado, es posible que algún componente de *Ulva* modifique la expresión de genes asociados al metabolismo lipídico. En ratas, se ha reportado que el consumo de algunas macroalgas, como *Ulva linza* y *Lessonia trabeculata* reduce significativamente los niveles de grasa intra-abdominal, la presión arterial, la resistencia a la insulina y los niveles séricos de colesterol y triglicéridos: dicho efecto fue acompañado por cambios en la expresión de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Ramirez-Higuera et al., 2014). Los efectos combinados de los diferentes compuestos que se encuentran en estas algas explican el efecto regulador sobre diferentes enzimas antioxidantes y vías metabólicas que protegen a los animales alimentados con una dieta hipercalórica contra el desarrollo de hipertensión, hiperglucemia y obesidad (Ramirez-Higuera et al. 2014). En *L. vannamei* se ha observado que *Ulva* aumenta la expresión de genes de rutas asociadas a metabolismo de lípidos, entre ellos la digestión y absorción de lípidos, biosíntesis de ácidos grasos y síntesis del 20:4n-6 (Elizondo-Reyna et al., 2016).

Las altas temperaturas aumentan la susceptibilidad de un crecimiento bacteriano y consecuentemente la melanización como un mecanismo de defensa en camarones durante la producción comercial (Alfaro y Lozano, 1993; Perez-Velazquez et al., 2001; Pascual et al., 2003). En el presente estudio, se observó disminución de la melanización del espermatóforo en machos alimentados con *Ulva*. Esto podría deberse a la actividad antibacteriana de *Ulva* (Suganthi et al., 2009; Trigui et al., 2013), que está dada por una variedad de metabolitos secundarios como terpenos, esteroides, compuestos polifenólicos y polisacáridos como Ulvan, ramnosa, xilosa y ácido urónico (Suganthi et al. 2009; Trigui et al., 2013) contra patógenos humanos, bacterias y hongos (Hellio et al., 2000; Xu et al., 2002, Liao et al., 2003). Se ha reportado que *Ulva* incluida en la dieta fresca disminuye la cantidad de unidades formadoras de colonias de bacterias del género

Vibrio (principalmente colonias de color verdes) en el agua de los tanques de maduración de reproductores (Corral-Rosales, 2013). Por otro lado, Lu et al. (2008), analizaron la capacidad antibacteriana de *U. clathrata* contra la cepa 65 de *Vibrio anguillarum* y concluyeron que los efectos inhibitorios del alga sobre el crecimiento de la cepa se debía a la presencia de bacterias en competición asociadas con el alga. En nuestro caso, debido a que se usó harina y no alga fresca, el efecto es probablemente debido a metabolitos secundarios. Otra opción podría ser el incremento en compuestos con actividad antioxidante como los carotenoides, el fucosterol y los fenoles en camarones alimentados con *Ulva*, que protegen del estrés oxidativo y el daño celular causado por la peroxidación de lípidos *in vivo* (Rice-Evans et al., 1997; Maqsood et al., 2010), que a su vez disminuye la melanización en machos sometidos a altas temperaturas.

En cualquier caso, el efecto positivo de la harina de *Ulva* sobre la reproducción en producción probablemente se debió a varios componentes a la vez, y sería deseable separar cada uno para poder fabricar alimentos funcionales que afecten cualidades específicas de forma controlada.

12. CONCLUSIONES

1. El consumo de *Ulva* en reproductores *L. vannamei* durante un ciclo de producción comercial aumenta la tasa de eclosión, el número de huevos y nauplios por desove y disminuye la mortalidad en hembras ablacionadas y sin ablación.
2. El consumo de *Ulva* aumenta la acumulación de lípidos y el crecimiento de ovocitos vitelogénicos tardíos y postvitelogénicos en gónadas y disminuye el agotamiento reproductivo en hembras con desoves múltiples.
3. En gónadas y hepatopáncreas de hembras el consumo de *Ulva* mejora la acumulación y el transporte de ácidos grasos durante la vitelogénesis tardía y aporta compuestos antioxidantes como fenólicos, esteroides y carotenoides.
4. En órganos reproductivos, el consumo de *Ulva* promueve la acumulación de 20:4n-6 y fucoesterol en gónadas y espermatóforos de reproductores.
5. En machos, el consumo de *Ulva* disminuye la melanización, promueve la actividad de cortejo, aumenta el contenido de compuestos antioxidantes en hepatopáncreas y músculo como compuestos fenólicos y carotenoides e incrementa la tasa de fertilización.
6. En huevos y nauplios el consumo de *Ulva* aumenta la acumulación de reservas lipídicas transmitidas de los progenitores e incrementa el tamaño de los huevos y nauplios.
7. La suplementación de la fracción de calamar de las dietas frescas para maduración con harina de *Ulva clathrata* (20g de harina de *Ulva* por kg de calamar fresco) es una estrategia viable para mejorar el rendimiento reproductivo y la calidad del desove de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones comerciales.

13. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones presentadas en la presente tesis doctoral, las perspectivas de trabajo futuro se orientan en dos direcciones: En un primer plano está la parte aplicada, los parámetros productivos y de manejo, y en segundo plano la parte de ciencia básica donde se evaluó el efecto de *Ulva* sobre la fisiología reproductiva.

En primera instancia, en la parte práctica, sería interesante probar el efecto de *Ulva* desde la pre-maduración de reproductores en estanques. También sería necesario evaluar diferentes niveles de inclusión, así como incluir el alga en diferentes componentes de la dieta. Sería interesante y permitiría tener datos con mayor precisión, tener un seguimiento individual de los machos con anillos oculares al igual que se tuvo con las hembras. Debido al potencial de los reproductores silvestres sería interesante comparar reproductores con *Ulva* vs. reproductores silvestres. Tomando como base los resultados del efecto de *Ulva* sobre la melanización del espermátforo, sería relevante analizar conteo de espermias, espermatozoides anormales, apoptosis, ATP y microbiología. Adicionalmente, un reto muy interesante sería trabajar con especies peneidos más susceptibles a los cambios de temperatura. Por ejemplo, evaluar el alga sobre el rendimiento reproductivo de *Penaeus stylirostris*, un peneido de interés acuícola, limitado por la melanización del espermátforo debido a las altas temperaturas durante la maduración cautiva, así como usar otras macroalgas para evaluar su efecto. Por último, es necesario realizar un estudio económico sobre la factibilidad de incluir *Ulva* en la dieta y sus ventajas a nivel productivo y como alimento funcional.

Desde el punto de vista de ciencia básica, sería interesante evaluar los niveles de vitelogenina y la transferencia de nutrientes, hormonas esteroideas para tener una visión más clara del efecto de los fitoesteroles (fucoesterol) y del 20:4n-6 y prostaglandinas, así como la transferencia y metabolismo del colesterol para la producción de andrógenos, estrógenos y progestágenos. Por otro lado, sería deseable evaluar el efecto prebiótico y probiótico, enzimas antioxidantes y daño oxidativo, para reforzar algunos de los efectos funcionales de compuestos antioxidantes presentes en *Ulva*, como pigmentos, fucoesterol, compuestos fenólicos, y flavonoides y así, separar sus efectos para lograr un estudio más certero.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul QA, Choi RJ, Jung HA, Choi JS. 2016. Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 1856-1866.
- Adiyodi RG. 1985. Reproduction and its control. In: Bliss, D. E. & Mantel, L. H. eds. *The biology of crustacea*. New York, Academic Press 9:147-215.
- Aguilera-Morales M, Casas-Valdez M, Carrillo-Domínguez B, González-Acosta B, Pérez-Gil F. 2005. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha spp.* as a potential food source. *Journal of Food Composition and Analysis* 18:79-88.
- Alava V, Kanazawa A, Teshima S, Koshio S. 1993. Effect of dietary phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of Kuruma Prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59:345-351.
- Alfaro J. 1993. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. *Journal World Aquaculture Society* 24:6-11.
- Alfaro J. 2001. Controlled reproduction of penaeid shrimp: a contribution to its improvement. Texas A & M University. Thesis doctoral 149 pp
- Alfaro J, Lozano X. 1993. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. *Journal World Aquaculture Society* 24:522-529.
- Alfaro-Montoya J. 2015. The effect of Ibuprofen on female and male reproduction of the open thelyca marine shrimp *Litopenaeus Aquaculture*. *Research* 46:105–116.
- Álvarez M, Cahu C, Stéphan G. 1989. Teneur en alpha-tocophérol des oeufs et des organes des reproducteurs de *Penaeus indicus*. *Océanis* 15:553-560
- Alzate CEO. 2008. Congelación y liofilización de alimentos. Gobernación de Caldas. Manizales, Caldas, Colombia. pp: 172
- Anger K, Harms J. 1990. Elemental (CNH) and proximate biochemical composition of decapod crustacean larvae. *Composition Biochemical Physiology B* 97:69-80
- AOAC., (Association of Official Analytical Chemists). 1997. Official methods of analysis 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Aquacop. 1977. Reproduction in captivity and growth of *Penaeus monodon* Fabricius in Polynesia. *Journal of the World Mariculture Society* 8: 927-945
- Aquacop. 1979. Penaeid reared broodstock: closing the life cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Journal of the World Mariculture Society* 10:445–452.
- Aquacop. 1983. Constitution of broodstock, maturation, spawning, and hatching system for penaeid shrimp in Centre Oceanologique du Pacifique. In: *CRC Handbook of Mariculture*. Volume I. Crustacean Aquaculture, J. P. McVey and J. R. Moore (Eds.): Boca Raton, FL. USA, pp. 105 121.
- Arannilewa ST, Salawu SO, Sorungbe AA, Ola-Salawu BB. 2005. Effect of frozen period on the chemical, microbiological and sensory quality of frozen tilapia fish (*Sarotherodon galiaenus*). *African Journal of Biotechnology* 4:852-855.
- Arcos FG, Ibarra AM, Vázquez-Boucard C, Palacios E, Racotta IS. 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. *Aquaculture* 228:335–349.

- Ashie NA, Smith JP, Simpson BK, Haard NF. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 36:87-121.
- Asil SM, Kenari AA, Miyanji GR, Van Der Kraak G. 2017. The influence of dietary arachidonic acid on growth, reproductive performance, and fatty acid composition of ovary, egg and larvae in an anabantid model fish, Blue gourami (*Trichopodus trichopterus*; Pallas, 1770). *Aquaculture* 476:8-18.
- Aungsuchawan S, Browdy CL, Withyachumnarnkul B. 2011. Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 42:188-195.
- Baily-Brock JH, Moss SM. 1992. Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. In: Fast, A. W. and Lester, L. J. (editors) *Marine shrimp culture: Principles and practices*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 9-28
- Baranowski M. 2008. Biological role of liver X receptors. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59:31-55.
- Barnes H, Blackstock J. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphanilun method for 'total' lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 12:103-118.
- Bauer RT, Cash CE. 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum* and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Transactions of the American Microscopical Society* 110:144-162.
- Begum S, Nyandoro S, Buriyo A, Makangara J, Munissi J, Duffy S, Avery V, Erdelyi M. 2018. Bioactivities of extracts, debromolaurinterol and fucosterol from macroalgae species. *Tanzania Journal of Science* 144:104-116.
- Bell TA, Lightner DV. 1988. *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana.
- Benjama O, Masniyom P. 2011. Nutritional composition and physicochemical properties of two green seaweeds (*Ulva pertusa* and *U. intestinalis*) from the Pattani Bay in Southern Thailand. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology* 33:575.
- Bensehaila S, Doumandji A, Boutekrabt L, Manafikhi H, Peluso I, Bensehaila K, Kouache A, Bensehaila A. 2015. The nutritional quality of *Spirulina platensis* of Tamenrasset, Algeria. *African Journal of Biotechnology* 14:1649-1654.
- Bhattacharya M, Hanna MA, Mandigo RW. 1988. Effect of frozen storage conditions on yields, shear strength and color of ground beef patties. *Journal of Food Science* 53:696-700
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ. 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. (pp: 96-100).
- Boschi A, Angelescu G. 1962. *Methods of investigation concerning aquaculture and piscicultura*. Volume II. pp28
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemical* 72:248-254.
- Braga AL, Nakayama CL, Martins JG, Colares EP, Wasielesky W. 2010. Spermatophore quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Dendrobranchiata) broodstock fed with different maturation diets. *Aquaculture* 307:44-48.

- Braga A, Lopes D, Magalhães V, Klosterhoff M, Romano L, Poersch L, Wasielesky W. 2018a. Infertility of biofloc-reared *Litopenaeus vannamei* males associated with a spermatophore mycobacterial infection: Description of the pathological condition and implications for the broodstock management and larval production. *Aquaculture* 492:357-360.
- Braga A, Lopes D, Magalhães V, Klosterhoff MC, Romano LA, Poersch LH, Wasielesky W. 2018b. Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. *Aquaculture* 486:64-67.
- Bray WA, Lawrence AL, Lester LJ. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. *Journal World Aquaculture Society* 21:41-52.
- Bray WA, Lawrence AL. 1991. New concepts in seedstock production. Learning to determine quality. International symposium on commercial production of shrimp larvae. Mazatlán, México. 1-16.
- Bray WA, Lawrence AL. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: Marine shrimp culture: Principles and practices. Fast, A. W. y L. J. Lester (Eds.), pp. 93-169.
- Briarty LG. 1975. Stereology methods for quantitative light and electron microscopy. *Science Progress* 62:1-32.
- Browdy C. 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: Wyban, J. (Ed.), Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 22-51.
- Cabello-Pasini A, Macías-Carranza V, Abdala R, Korbee N, Figueroa FL. 2011. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 23:363-369.
- Cahu CL, Severe A, Quazuguel P. 1988. The variation of lipid content in *Penaeus indicus* during larval development. *Mariculture Comitee F22* (11 pp.).
- Cahu C, Guillaume JC, Stephan G, Chim L. 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on SR and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. *Aquaculture* 126:159-170.
- Cahu C, Cuzon G, Quazuguel P. 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112:417-424.
- Caillouet AC. 1972. Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. *The World Aquaculture Society* 3: 205-22
- Cardona E, Lorgeoux B, Chim L, Goguenheim J, Le Delliou H, Cahu C. 2016. Biofloc contribution to antioxidant defense status, lipid nutrition and reproductive performance of broodstock of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Consequences for the quality of eggs and larvae. *Aquaculture* 452:252-262.
- Carrillo S, López E, Casas M, Ávila E, Castillo R, Carranco M, Calvo C, Perez GF. 2008. Potential use of seaweeds in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs. *Journal of Applied Phycology* 20:721-728.

- Castille FL, Lawrence LA. 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of gonads and digestive glands of shrimps *Penaeus aztecus* and *Penaeus setiferus* (L.). *Journal Crustacea Biology* 9:202–211.
- Castille L, Lawrence LA. 1991. Reproductive studies concerning natural shrimp populations: A description of changes in the size and biochemical composition of the gonads and digestive glands in penaeid shrimp. In: *Developments in aquaculture and fisheries science*, Vol 22, 17-31
- Castro-González MI, Pérez-Gil F, Pérez-Estrella S, Carrillo-Domínguez S. 1996. Chemical composition of the green alga *Ulva lactuca*. *Ciencias Marinas* 22:205-213.
- Cavalli RO, Scardua MP, Wasielesky JW. 1997. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *Journal World Aquaculture Society* 28:260–267
- Cavalli RO. 2000. Broodstock nutrition and offspring quality of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), PhD dissertation. Faculty of agricultural and applied biological sciences, Ghent University, Gent, Belgium
- Ceballos-Vázquez BP, Rosas C, Racotta IS. 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 228:141-151.
- Chakraborty K, Lipton AP, Paulraj R, Chakraborty RD. 2010. Guaianes sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata* Delile and their antibacterial properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45:2237-2244.
- Chamberlain GW, Lawrence AL. 1981. Maturation, reproduction, and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. *The World Mariculture Society* 12:209-224.
- Chamberlain GW. 1988. Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp. PhD dissertation, Department of Wildlife and Fisheries Science, Texas A&M University, TX, USA.
- Chandini SK, Ganesan P, Bhaskar N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry* 107:707-713.
- Chang ES. 1993. Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans. *Annual Review of Entomology* 38:161-180.
- Chang PS, Chen HC, Wang YC. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture* 164: 233-242.
- Charniaux-Cotton H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *American Zoologist* 25:197-206.
- Charniaux-Cotton H, Payen G. 1988. Crustacean reproduction. 279-304 p. En: Downer, R.G.H. & H. Laufer (Eds.) *Invertebrate endocrinology*. Alan R. Liss, Inc. N.Y
- Chater PI, Wilcox MD, Pearson JP, Brownlee IA. 2015. The impact of dietary fibers on the physiological processes governing small intestinal digestive processes. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber* 6:117-132
- Chimsung N. 2014. Maturation diets for black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) broodstock: a review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 36:265–273.
- Chotwiwatthanakun C, Sangatit J, Santimanawong W, Surinlert P, Prommoon J, Weerachatanukul W, Withayachumnarnkul B, Vanichviriyakit R. 2016. Expression of *Penaeus monodon* ortholog of Niemann–Pick type C-2 in the

- spermatid tract, and its role in sperm cholesterol removal. *Molecular Reproduction and Development* 83:259-270.
- Chow S, Dougherty MM, Dougherty WJ, Sandifer PA. 1991. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *Journal Crustacean Biology* 11:201–216.
- Chu KH, Ovsianico-Koulikowsky NN. 1994. Ontogenic changes in metabolic activity and biochemical composition in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. *Journal Experimental Marine Biology Ecology* 183:11–26.
- Chung MY, Liu CH, Chen YN, Cheng W. 2011. Enhancing the reproductive performance of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by incorporating sodium alginate in the broodstock and larval diets. *Aquaculture* 312:180-184.
- Clark Jr, WH, Lynn JW, Persyo HO. 1980. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus* *Biological Bulletin* 158:175–186.
- Clark Jr WH, Yudin AI, Lynn JW, Griffin FJ, Pillai MC. 1990. Jelly layer formation in penaeoidean shrimp eggs. *Biological Bulletin* 178:295– 299.
- Coman GJ, Arnold SJ, Callaghan TR, Preston NP. 2007. Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 263:75-83
- Coman GJ, Arnold SJ, Barclay M, Smith DM. 2011. Effect of arachidonic acid supplementation on reproductive performance of tank-domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition* 17:141–151.
- CONAPESCA. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México - © - 2010 <http://www.siap.gob.mx/>
- Conchillo A, Ansorena D, Astiasarán I. 2005. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:141-146.
- Corral-Rosales DC. 2013. Mejora de la capacidad reproductiva y de la calidad de las larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* por la inclusión de harina de alga *Ulva clathrata* en dietas para maduración Doctoral disertación, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Corral-Rosales DC, Palacios E, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2018a. Enhancement of reproductive performance in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) by supplementation of *Ulva clathrata* meal in maturation diet in two commercial hatcheries. *Aquaculture research* 49:1053-1059.
- Corral-Rosales DC, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Rodríguez-Jaramillo C, Palacios E. 2018b. Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. *Aquaculture Research* 49:3711-3722.
- Corral-Rosales DC, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE, Arjona O, Palacios E. 2019. Fatty acids, sterols, phenolic compounds and carotenoid changes in response to dietary inclusion of *Ulva clathrata* in shrimp *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Journal Applied Phycology* 0:00-00
- Coste O, Malta EJ, López JC, Fernández-Díaz C. 2015. Production of sulfated oligosaccharides from the seaweed *Ulva sp.* using a new ulvan-degrading enzymatic bacterial crude extract. *Algal Research* 10:224-231.

- Critchley AT, Largo D, Wee W, Bleicher L'Honneur G, Hurtado AQ, Schubert J. 2004. A preliminary summary on *Kappaphycus* farming and the impact of epiphytes. *Japanese Journal of Psychology* 52: 231-232
- Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Ricque-Marie D. 2009a. Use of seaweeds for shrimp nutrition: status and potential. In: Browdy C. L., Darryl E. J. (eds) *The rising tide proceedings of the special session on sustainable shrimp farming*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 131–147
- Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Guajardo-Barbosa C, Ricque-Marie D. 2009b. Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition* 15:421-430.
- Cruz-Suárez LE, León A, Peña-Rodríguez A, Rodríguez-Peña G, Moll B, Ricque-Marie D. 2010. Shrimp/Ulva co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301:64-68.
- Cruz-Suárez LE, Rique-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López M, Villarreal-Cavazos D, Gamboa-Delgado J, Álvarez-González A. 2013. Avances en la valoración de macroalgas del género *Ulva* como nutraceutico en *Litopenaeus vannamei*. *Contribuciones Recientes en Nutrición y Alimentación Acuicola*. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, México 551–595.
- Cummings WC. 1961. Maturation and spawning of the pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Transactions of the American Fisheries Society* 90:462-468.
- Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Sharples DJ. 1990. The biology of Penaeidae. In: J. H. S. Blaster & A. J. Southward, editors. *Advances in marine biology*. London: Academic Press. pp. 12–37.
- Dall W. 1995. Carotenoids versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). *Marine Biology* 124:209-213.
- Dall W, Smith DM, Moore LE. 1995. Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation. *Marine Biology* 123:435-441.
- Du S, Hu C, Cai S, Shen QI, Zheng S. 2006. Effect of different levels of dietary α -tocopherol on ovarian maturation and reproductive performance of broodstock *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Journal of Shellfish Research* 25:589-593.
- Duangprom S, Ampansri W, Suwansaard S, Chotwiwatthanakun C, Sobhon P, Kornthong N. 2018. Identification and expression of prostaglandin E synthase (PGES) gene in the central nervous system and ovary during ovarian maturation of the female mud crab, *Scylla olivacea*. *Animal Reproduction Science* 198:220-232.
- Duarte ME, Nosedá DG, Nosedá MD, Tulio S, Pujol CA. 2001. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. *Phytomedicine* 8:53–58
- El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of biochemistry and biophysics* 430:37-48.
- Elizondo-Reyna E, Medina-González R, Nieto-López MG, Ortiz-López R, Elizondo-González R, Powell MS, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2016. Consumption of *Ulva clathrata* as a dietary supplement stimulates immune and lipid

- metabolism genes in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Applied Phycology 28:3667-3677.
- Emerenciano M, Cuzon G, Arévalo M, Gaxiola G. 2013. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. Aquaculture Research 45, 1713-1726.
- Ergün S, Soyutürk M, Güroy B, Güroy D, Merrifield D. 2008. Influence of *Ulva* meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis ániloticus*) at two levels of dietary lipid. Aquaculture International 17:355–36
- Farasat M, Khavari-Nejad RA, Nabavi SMB, Namjooyan F. 2014. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 13:163.
- Farouk MM, Swan JE. 1998. Effect of muscle condition before freezing and simulated chemical changes during frozen storage on the pH and colour of beef. Meat Science 50:245–256
- Fegan DF. 1992. Recent developments and issues in the Penaeid shrimp hatchery industry. In: Wyban, J. (Ed.), Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 55–70
- Fingerman M. 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. Journal Crustacean Biology 7:1-24.
- Fingerman M. 1995. Endocrine mechanisms in crayfish, with emphasis reproduction and neurotransmitter regulation of Hormone Release. Animal Zoology 35:68–78.
- Fingerman M. 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. Invertebrate Reproduction and Development 31:47–54
- Fleurence J. 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses, Trends Food Science Technology 10-25
- Focken U, Groth A, Coloso RM, Becker K. 1998. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in a semi-intensive pond system in the Philippines. Aquaculture 164:105-116.
- Folch J, Lees M, Sloane, Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. Journal of Biological Chemistry. 226:497-509.
- Franks F. 1983. Metastable water at sub-zero temperatures. Cryobiology 20:335
- Fraser AJ. 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 46:1868–1873
- Frikha F, Kammoun M, Hammami N, Mchirgui R, Belbahri L, Gargouri Y, Miled N, Ben-Rebah F. 2011. Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. Ciencias Marinas 37:113–124
- Galgani ML, AQUACOP. 1989 Influence du regime alimentaire sur la reproduction en captivité de *Penaeus vannamei* et *Penaeus stylirostris*. Aquaculture 80:97-109.
- Galgani ML, Cuzon G, Galgani F, Goguenheim J. 1989. Influence du régime alimentaire sur la reproduction en captivité de *Penaeus indicus*. Aquaculture 81:337-350.

- Ganesan K, Kumar KS, Subba-Rao PV. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 12:73-78.
- García F, Calderón J, Palacios M, Sagi A. 1993. Identificación de los estadios de maduración ovárica en *Penaeus vannamei*. *Acuicultura tropical*. 1:23-26
- García L, Verde J, Castro R, Chávez A, Oranday A, Núñez A, Rivas C. 2010. Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41:28-36.
- García S, Le-Reste L 1987. Ciclos vitales, dinámica, explotación y ordenación de las poblaciones de camarones peneidos costeros. FAO. Doc. Tec. De Pesca No. 203p.
- Gershwin ME, Belay A, Eds. 2008. *Spirulina in human nutrition and health*. CRC Press Boca Raton, Florida 328.
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. 2003. Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnology* 21:210–216
- Godard M, Décorde K, Ventura E, Soteras G, Baccou JC, Cristol JP, Rouanet JM. 2009. Polysaccharides from the green alga *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent fatty streak lesions in the high cholesterol fed hamster, an animal model of nutritionally-induced atherosclerosis. *Food chemistry* 115:176-180.
- Goimier Y, Pascual C, Sánchez A, Gaxiola G, Sánchez A, Rosas C. 2006. Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Animal Reproduction Science* 92:193-208.
- Guitart B, González E, Reyes R, Fraga I. 1985. Descripción del aparato reproductor masculino de *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*. *Revista cubana de investigaciones pesqueras* 10:41-58
- Gunamalai V, Kirubakaran RY, Subra- Moniam T. 2004. Hormonal coordination of molting and female reproduction by ecdysteroids in the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards). *General and Comparative Endocrinology* 138:128-138
- Harlioğlu MM, Farhadi A, Gür S. 2018. Determination of sperm quality in decapod crustaceans. *Aquaculture* 490:185-193.
- Harrison KE. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction, and embryonic development of decapod crustaceans: A review. *Journal of shellfish research* 9:1-28
- Harrison KE. 1997. Broodstock nutrition and maturation diets. In *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture*, L.R. D’Abramo, D.E. Conklin, and D.M. Akiyama, editors, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A., pp 390-408
- Hayden HS, Blomster JA, Maggs CA, Silva PC, Stanthorpe MJ, Waland JR. 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *European Journal of Phycology* 38:277–294
- Hellio C, Bremer G, Pons AM, Le Gal Y, Bourgougnon N. 2000. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:543-549.
- Hernández-Herrera R. 2001. Indicadores bioquímico-fisiológicos de calidad larvaria y postlarvaria de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

- Higgins FM, Kerry JP, Buckley DJ, Morrissey PA. 1998. Effect of dietary α -tocopheryl acetate supplementation on α -tocopherol distribution in raw turkeymuscles and its effect on the storage stability of cooked turkey meat. *Meat Science* 50:373–383.
- Hoa ND, Wouters R, Wille M, Thanh V, Dong TK, Van Hao N, Sorgeloos P. 2009. A fresh-food maturation diet with an adequate HUFA composition for broodstock nutrition studies in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). *Aquaculture* 297:116–121.
- Hoang MH, Jia Y, Jun HJ, Lee JH, Lee BY, Lee SJ. 2012. Fucosterol is a selective liver X receptor modulator that regulates the expression of key genes in cholesterol homeostasis in macrophages, hepatocytes, and intestinal cells. *Agricultural and Food Chemistry* 60:11567-11575.
- Holcomb MJ, Cloud G, Woolsey J, Ingermann RL. 2004. Oxygen consumption in unfertilized salmonid eggs: an indicator of egg quality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*: 138: 349– 354.
- Holdt SL, Kraan S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology* 23:543-597.
- Holland DL. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In *Bio- chemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology* (Edited by Malins D. C. and Sargent J. R.), Vol. 4, pp. 85-123. Academic Press, New York
- Homola E, Sagi A, Laufer H. 1991. Relationship of claw form and exoskeleton condition to reproductive system size and methyl farnesoate in the male spider crab *Libinia emarginata*. *Invertebrate Reproduction Development* 20:219–225
- Huang JH, Jiang SG, Lin HZ, Zhou FL, Ye L. 2008. Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research* 9:240–251.
- Humanson, G.L. (1972). *Animal tissue techniques*. Freeman, San Francisco, CA. 641 pp
- Huberman A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture* 191: 191-208.
- Hwang E, Park SY, Sun ZW, Shin HS, Lee DG, Yi TH. 2014. The protective effects of fucosterol against skin damage in UVB-irradiated human dermal fibroblasts. *Marine Biotechnology* 16:361-370.
- Johnson EJ. 2014. Role of lutein and zeaxanthin in visual and cognitive function throughout the lifespan. *Nutrition Reviews* 72:605-612.
- Ibarra A, Ramírez JL, Racotta IS, Palacios E, Magallón F. 1997. Performance comparison of eggs and nauplii for spawners from a second generation domesticated and wild shrimp of *Penaeus vannamei*. In: Alston, D.E., Green, B.W., Clifford, H.C. (Eds.), *IV Symposium on Aquaculture in Central America*, 22–24 April, Tegucigalpa, Honduras, WAS-ANDAH, pp. 159–160
- ITIS, Integrated Taxonomic Information System, National Museum of Natural History, Washington, D.C. (<http://www.itis.usda.gov/>)
- Izquierdo M S, Fernández PH, Tacon AGJ. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance on fish. *Aquaculture* 197:25-42
- Johnson AL, Tilly JL, Levorse JM. 1991. Possible role for arachidonic acid in the control of steroidogenesis in hen theca. *Biology of Reproduction* 44:338–44.
- Kacem M, Sellami M, Kammoun W, Frikha F, Miled N, Ben Rebah F. 2011. Seasonal variations in proximate and fatty acid composition of viscera of *Sardinella aurita*,

- Sarpa salpa*, and *Sepia officinalis* from Tunisia. Journal of Aquatic Food Product Technology 20:233-246.
- Kallen JL, Abrahamse SL, van Herp F. 1990. Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish. Biology Bulletin Journal 179: 351-357
- Kangpanich C, Pratoomyot J, Siranonthana N, Senanan W. 2016. Effects of arachidonic acid supplementation in maturation diet on female reproductive performance and larval quality of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). PeerJ 4:e2735
- Kao HC, Chan TY, Yu HP. 1999. Ovary development of the deep-water shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1826) (Crustacean: Decapoda Aristeidae) from Taiwan. Zoological Studies 38:373-387
- Kent M, Browdy CL, Leffler JW. 2011. Consumption and digestion of suspended microbes by juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 319:363-368.
- Khalaila IR, Manor S, Weil Y, Granot R, Keller A, Sagi A. 2002. The eyestalk-androgenic gland-testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. General Compound Endocrinology 127:147-156.
- Kim SK, Wijesekara I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. Journal of Functional Foods 2:1-9.
- King JE. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Biology Bulletin Journal 94:244-262.
- Kruevaisyawan H, Vanichviriyakit R, Weerachatanukul W, Magerd S, Withyachumnarnkul B, Sobhon P (2007). Biochemical characterization and physiological role of cortical rods in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture 270:289-298.
- Kulkarni GK, Nagabhushanam R. 1979. Mobilization of organic reserves during ovarian development in the marine prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture 18:373-377
- Kulkarni GK, Nagabhushanam R, Amaldoss G, Jaiswal RG, Fingerman M. 1992. In vitro stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard), by 5-hydroxytryptamine. Invertebrate Reproduction Development 21:231-240
- Lampi AM, Dimberg LH, Kamal-Eldin A. 1999. A study on the influence of fucosterol on thermal polymerisation of purified high oleic sunflower triacylglycerols. Journal of the Science of Food and Agriculture 79:573-579.
- Laufer H, Landau M, Borst DW, Homola E. 1987. Methyl farnesoate its site of synthesis and regulation of secretion in a juvenile crustacean. Insect Biochemistry 17:1123-1127
- Laufer H, Borst DW, Foley TA, Landau M. 1988. Ecdysteroid titres in vitellogenic *Libinia emarginata*. Journal Insect Physiology 34:615-617
- Laufer H, Ahl JS, Sagi A. 1993. The role of juvenile hormone in crustacean reproduction. American Zoology 33: 365-374.
- Lavens P, Sorgeloos P. 1991. Variation in egg and larval quality in various fish and crustacean species. In: Lavens P., Sorgeloos P.E., Jaspers. and Ollevier E. (eds), Larvi '91 – Fish & Crustacean Larviculture Symposium. Special Publication No 15. European Aquaculture Society, Gent, Belgium, pp. 221-222.

- Lee FY, Chang CF. 1997. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopáncreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 117:433-439.
- Lee S, Lee YS, Jung SH, Kang SS, Shin KH. 2003. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. *Archives of Pharmacal Research* 26:719-722.
- Lee D, Wickins J. 1992. *Crustacean farming*. Oxford, Great Britain, 392p
- Leung-Trujillo JR, Lawrence AL. 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 65:363-370.
- Liao WR, Lin JY, Shieh WY, Jeng WL, Huang R. 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine *Vibrios*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30:433-439
- Li W, Wang K, Jiang N, Liu X, Wan M, Chang X, Liu S. 2018. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of purified polysaccharides from *Ulva pertusa*. *Journal of Applied Phycology* 1-9
- Liñan-Cabello MA, Medina-Zendejas R, Sanchez-Barajas M, Mena-Herrera A. 2004. Effects of carotenoids and retinol in oocyte maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research* 35:905-911.
- Lopes G, Sousa C, Valentao P, Andrade P. 2013. Sterols in algae and health. In: *Bioactive compounds from marine foods: Plant and animal sources*, First Edition. Edited by Blanca Hernandez-Ledesma and Miguel Herrero. John Wiley & Sons, Porto, Portugal 173-191.
- Lotz JM. 1997. Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World journal of microbiology and biotechnology* 13:405-413.
- Luschen W, Willig A, Jaros PP. 1993. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas*. *General and Comparative Endocrinology* 105C:291-296
- Lu K, Lin W, Liu J. 2008. The characteristics of nutrient removal and inhibitory effect of *Ulva clathrata* on *Vibrio anguillarum* 65. *Journal of Applied Phycology* 20:1061.
- Lynn JW, Clark Jr WH 1987. Physiological and biochemical investigations of the egg jelly release in *Penaeus aztecus*. *The Biological Bulletin* 173:451-460.
- Lytle JS, Lytl TF, Ogle J. 1990. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 89:287-299
- Magarelli PC. 1981. Nutritional and behavioral components of reproduction in the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, reared under controlled environment conditions. Ph.D. dissertation, University of Arizona.
- Mantiri DM, Nègre-Sadargues G, Castillo R, Trilles JP. 1995. Evolution of carotenoid metabolic capabilities during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Linnaeus, 1758). *Comparative Biochemistry Physiology* 111B: 553-558.
- Maqsood S, Benjakul S. 2010. Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry* 119:123-132.
- Marinho-Soriano E, Camara MR, Cabral DM, Carneiro MD. 2007. Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial

- substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. *Aquaculture Research* 38:182-187.
- Matsuno T. 2001. Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Science*, 67, 771–783.
- McCauley JI, Winberg PC, Meyer BJ, Skropeta D. 2018. Effects of nutrients and processing on the nutritionally important metabolites of *Ulva* sp. (Chlorophyta). *Algal research* 35:586-594.
- Medina-Reyna CE. 2001. Growth and emigration of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in the Mar Muerto Lagoon, Southern Mexico. *Naga, the ICLARM Quarterly* 24: 30–34.
- Menasveta P, Choosuwap J, Piyatiratitivorakul S, Fast A, Latscha T. 1994. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius). En: *The Third Asian Fisheries Forum* (Chou LM, Munro AD, Lam TJ, Chen TW, Cheong LK, Hooi KW, Phang VPE, Tan CH, eds), pp. 713-716. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Méndez L, Acosta B, Racotta I. 1999. Mineral concentrations in muscle and hepatopáncreas of newly caught wild and hatchery-exhausted spawners of pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture* 8:17-26.
- Mengqing L, Wenjuan J, Qing C, Jialin W. 2004. The effect of vitamin A supplementation in broodstock feed on reproductive performance and larval quality in *Penaeus chinensis*. *Aquaculture Nutrition* 10:295–300
- Mercure F, Van Der Kraak G. 1996. Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology*. 102:130-140.
- Meunpol O, Meejing P, Piyatiratitivorakul S. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research* 36:1216-1225
- Middleditch BS, Missler SR, Ward DG, McVey JB, Brown A, Lawrence AL. 1979. Maturation of penaeid shrimp: dietary fatty acids. *Journal of the World Aquaculture Society* 10:472-476.
- Millamena OM. 1989. Effect of fatty acid composition of broodstock diet on tissue fatty acid patterns and egg fertilization and hatching in pond-reared *Penaeus monodon*. *Asian Fisheries Science* 2:127–134.
- Millamena OM, Pascual FP. 1990. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* Fabricius broodstock from the wild. *Journal World Aquaculture Society* 21:116–121.
- Mirheydari SM, Emadi AM. 2014. Influence of Dietary HUFA on growth, survival, fecundity, egg diameter and fatty acid composition of broodstock white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) tissues. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 6:340-349.
- Mohamed KS, Diwan AD. 1992. Biochemical changes in different tissues during yolk synthesis in marine prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Ind. The Journal of Marine Science and Technology* 21:30-34
- Mohamed KS, Diwan AD. 1994. Vitellogenesis in the Indian White prawn *Penaeus indicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Journal Aquaculture in the Tropics* 9:57-172
- Moll B, Deikman J. 1995. *Enteromorpha clathrata*: A potential seawater-irrigated crop. *Bioresource Technology* 52:255-260.

- Moll B. 2004. Aquatic surface barriers and methods for culturing seaweed. International Patent (PCT) No. WO 2004/093525 A2.
- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. 2013. Tablas de Composición de Alimentos. Madrid, España: Ediciones Pirámide
- Morelli A, Puppi D, Chiellini F. 2017. Perspectives on biomedical applications of Ulvan. In Seaweed Polysaccharides (pp. 305-330)
- Motoh H. 1984. Biology and ecology of *Penaeus monodon*. Proceeding of the first International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimp. SEAFDEC Aquaculture Department, Iloilo City, 27-36pp
- Mourente G, Rodriguez A. 1991. Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. Marine Biology 110:21-28.
- Naessens E, Lavens P, Gomez L, Browdy CL, McGovern-Hopkins K, Spencer AW, Kawahigashi, Sorgeloos P. 1997. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed Artemia biomass preparations. Aquaculture 155:87-101.
- Norambuena F, Morais S, Estévez A, Bell JG, Tocher DR, Navarro JC, Cerdà J, Duncan N. 2013. Dietary modulation of arachidonic acid metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock reared in captivity. Aquaculture 372:80–88.
- Norambuena F, Hermon K, Skrzypczyk V, Emery JA, Sharon Y, Beard A, Turchini GM. 2015. Algae in fish feed: performances and fatty acid metabolism in juvenile Atlantic salmon. PLoS One 10:e0124042.
- Norberg B, Kleppe L, Andersson E, Thorsen A, Rosenlund G, Hamre K. 2017. Effects of dietary arachidonic acid on the reproductive physiology of female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). General and Comparative Endocrinology 250:21-35.
- Ollivaux C, Vinh J, Soyeux D, Toullec JY. 2006. Crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in the lobster *Homarus gammarus*. FEBS J 273: 2151-2160.
- Olson JA. 1993. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 39:57-65.
- Ortiz J, Romero N, Robert P, Araya J, Lopez-Hernández J, Bozzo C, Rios A. 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. Food Chemistry 99:98-104.
- Ouellet P, Taggart CT, Frank KT. 1992. Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 40:368–378.
- Pádua MD, Fontoura PSG, Mathias AL. 2004. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). Brazilian Archives of Biology and Technology 47:49-55.
- Paibulkichakul C, Piyatiratitivorakul S, Kittakoop P, Viyakarn V, Fast AW, Menasveta P. 1998. Optimal dietary levels of lecithin and cholesterol for black tiger prawn *Penaeus monodon* larvae and postlarvae. Aquaculture 167:273–281
- Paibulkichakul C, Piyatiratitivorakul S, Sorgeloos P, Menasveta P. 2008. Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. Aquaculture 282:83-89
- Palacios E, Ibarra AM, Ramirez JL, Portillo G, Racotta IS (1998). Biochemical composition of eggs and nauplii in white pacific shrimp, *Penaeus vannamei*

- (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquaculture Research* 29:183-189.
- Palacios E, Racotta IS, APSA. 1999a. Spawning frequency analysis of wild and pond-reared pacific white shrimp *Penaeus vannamei* broodstock under large-scale hatchery conditions. *Journal of the World Aquaculture Society* 30:180-191.
- Palacios E, Carreño D, Rodríguez-Jaramillo MC, Racotta IS. 1999b. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance and biochemistry of white pacific shrimp *Penaeus vannamei* broodstock. *Journal of Applied Aquaculture* 9:1-23.
- Palacios E, Perez-Rostro CI, Ramírez JL, Ibarra AM, Racotta IS. 1999c. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture* 171:309-321
- Palacios E, Ibarra AM, Racotta IS. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185:353-371.
- Palacios E, Racotta IS, Heras H, Marty Y, Moal J, Samain JF. 2001. The relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture International* 96:531-543.
- Palacios E, Racotta IS. 2003. Effect of number of spawns on the resulting spawn quality of 1-year-old pond-reared *Penaeus vannamei* (Boone) broodstock. *Aquaculture Research* 34:427-435.
- Palacios E, Racotta IS, Villalejo M. 2003. Assessment of ovarian development and its relation to mating in wild and pond-reared *Litopenaeus vannamei* shrimp in a commercial hatchery. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34:466-477
- Palacios E, Bonilla A, Pérez A, Racotta IS, Civera R. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 299:201-215.
- Pangantihon-Kuhlmann M, Millamena O, Chern Y. 1998. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquatic Living Resources* 11:403-409.
- Pangestuti R, Kurnianto D. 2017. Green seaweeds-derived polysaccharides Ulvan: occurrence, medicinal value and potential applications. In *Seaweed Polysaccharides* (pp. 205-221).
- Panouse JB. 1943. Influence de l'ablation de pedoncle oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette, *Leander serratus*. *C R Acad Sci (Paris)* 217:553 555
- Parnes S, Raviv S, Scechter A, Sagi A. 2006. Males also have their time of the month Cyclic disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in a marine shrimp. *Journal of Experimental Biology* 209:4974-4983.
- Parnes S, Raviv S, Azulay D, Sagi A. 2007. Dynamic of reproduction in a captive Shrimp broodstock: unequal contribution of the female Shrimp and a hidden shortage in competent males. *Development* 50:21-29
- Pascual C, Sánchez A, Sánchez A, Vargas-Albores F, LeMoullac G, Rosas C. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218:637-650.

- Peixoto S, Cavalli RO, Wasielesky W. 2003. The influence of water renewal rates on the reproductive and molting cycles of *Penaeus paulensis* in captivity. Brazilian Archives of Biology and Technology 46:281–286.
- Peixoto MJ, Salas-Leitón E, Pereira LF, Queiroz A, Magalhães F, Pereira R, Ozório RO. 2016. Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture Reports 3:189-197.
- Peña-Rodríguez A. 2011. Uso potencial de la macroalga verde *Ulva clathrata* en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Peña-Rodríguez A, Mawhinney TP, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2011. Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. Food Chemistry 129:491-498.
- Pérez J. 2005. Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en condiciones de cautiverio (Tesis para Doctor en Ciencias). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, México
- Pérez-Castañeda R, Sánchez-Martínez JG, Aguirre-Guzmán G, Rábago-Castro JL, de la Luz Vázquez-Sauceda M. 2015. Interaction of fisheries and aquaculture in the production of marine resources: advances and perspectives in Mexico. In Environmental Management and Governance (pp. 111-140). Springer, Cham.
- Pérez-Farfante I. 1975. Spermatophores and thelyca of the American white shrimps, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. Fishery Bulletin 73:463–486.
- Perez-Velazquez M, Bray WA, Lawrence AL, Gatlin III DM, Gonzalez-Felix ML. 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 198:209-218.
- Perez-Velazquez M, Lawrence AL, Gatlin DM, González-Félix ML, Bray WA. 2002. Replacement of fresh dietary components by a dry feed for successful maturation of male *Litopenaeus vannamei* (Boone) broodstock. Aquaculture Research 33:1901–1905
- Perez-Velazquez M, González-Félix ML, Lawrence AL, Bray WA, Gatlin III DM. 2003. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. Journal World Aquaculture Society 34:92-98.
- Persia-Jothy T, Rajesh-Kannan R, Subramoniam T. 2019. Lipid and carotenoid metabolism in the developing embryos of the intertidal anomuran crab, *Emerita asiatica* (Milne Edwards). Invertebrate Reproduction y Development 1-11.
- Petit H, Sance S, Negre-Sadargues G, Castillo R, Trilles JP. 1991. Ontogeny of carotenoid metabolism in the prawn *Penaeus japonicus* Bate (1888) (Crustacea Penaeidea). A qualitative approach. Comp Biochemical Physiology 99B: 667-671
- Pillai MC, Clark Jr WH. 1987. Egg activation in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. Journal of Experimental Zoology 244:325– 329.
- Polyakov NE, Leshina TV, Kovalova TA and Kispert LD. 2001. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: Antioxidants or pro-oxidants Free Radical Biological Medicine 31:398–404
- Pongtippatee-Taweepreda P, Chavadej J, Plodpai P, Pratoomchart B, Sobhon P, Weerachatanukul W, Withyachumnarnkul B. 2004. Egg activation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 234:183-198.

- Pratoomchat B, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. 1993. Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24:530–541
- Primavera JH, Lim C, Borlongan E. 1979. Feeding regimes in relation to reproduction and survival of ablated *Penaeus monodon*. *Kalikasan Philippine Journal of Biology* 8:227–235.
- Primavera JH. 1983. Broodstock of Sugpo, *Penaeus monodon* Fabricus, Third edition. SEAFDEC Extension Manual 7:1–17.
- Pushparaj A, Raubbin RS, Balasankar T. 2014. Antibacterial activity of *Kappaphycus alvarezii* and *Ulva lactuca* extracts against human pathogenic bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 3:432-6
- Qi H, Sheng J. 2015. The Antihyperlipidemic mechanism of high sulfate content Ulvan in Rats. *Marine Drugs* 13:3407–3421
- Qi H, Sun Y. 2015. Antioxidant activity of high sulfate content derivative of ulvan in hyperlipidemic rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 76:326-329.
- Quackenbush LS. 1986. Crustacean Endocrinology, a review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43:2271–2282
- Quezada-Rodríguez P, del Rocío E, Fajer-Ávila EJ. 2017. The dietary effect of ulvan from *Ulva clathrata* on hematological-immunological parameters and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Phycology* 29:423-431.
- Quinitio ET, Caballero RM, Gustilo L. 1993. Ovarian development in relation to changes in the external genitalia in captive *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 114:71–81.
- Quinitio ET, Parado-Estapa FD, Millamena OM, Biona H. 1996. Reproductive performance of captive *Penaeus monodon* fed various sources of carotenoids, pp. 74-82. In: Santiago CB, Coloso RM, Millamena OM, Borlongan IG (eds) *Feeds for Small-Scale Aquaculture*. Proceedings of the National Seminar-Workshop on Fish Nutrition and Feeds: SEAFDEC Aquaculture Department, Iloilo, Philippines.
- Ramirez-Higuera A, Quevedo-Corona L, Paniagua-Castro N, Chamorro-Ceballos G, Milliar-Garcia A, Jaramillo-Flores ME. 2014. Antioxidant enzymes gene expression and antihypertensive effects of seaweeds *Ulva linza* and *Lessonia trabeculata* in rats fed a high- fat and high-sucrose diet. *Journal Applied Phycology* 26:597–605
- Rankin SM, Davis RW. 1990. Ultrastructure of oocytes of the shrimp, *Penaeus vannamei*: cortical specialization formation. *Tissue Cell* 22:879–893
- Racotta IS, Palacios E, Ibarra AM. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227:107–130
- Ravid T, Tietz A, Khayat M, Boehm E, Michelis R, Lubzens E. 1999. Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Journal of Experimental Biology* 202:1819–1829
- Regunathan C, Wesley SG. 2006. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition* 12:425–563.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159.

- Ro S, Talbot P, Leung-Trujillo J, Lawrence AL. 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1–3. *Journal Crustacean Biology* 10:455–468.
- Robic AC, Gaillard J, Sassi F, Lerat Y, Lahaye M. 2009. Ultrastructure of ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers* 91:652–664.
- Rodríguez-MoscOSO E, Arnaiz R. 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of grooved carpet-shell clam, *Tupes decussurus* (Linne, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture* 162:125–139.
- Rodríguez-Rendón S, Macías-Regalado E, Calderón-Pérez JA, Núñez-Pastén A, Solís-Ibarra R. 2007. Comparison of some reproductive characteristics of farmed and wild white shrimp males *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 55.
- Roohinejad S, Koubaa M, Barba FJ, Saljoughian S, Amid M, Greiner R. 2017. Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality and health-related beneficial properties. *Food Research International* 99:1066–1083.
- Rosas C, Sánchez A, Díaz E, Soto LA, Gaxiola G, Brito R. 1996. Effect of dietary protein level on apparent heart increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae. *Journal World Aquaculture Society* 27:92–102
- Rowley AF, Vogan CL, Taylor GW, Clare AS. 2005. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *Journal of Experimental Biology* 208:3–14.
- Sagi A, Ahl SB, Danaee H, Laufer H. 1994. Methyl farneosate levels in male spider crabs exhibiting active reproductive behavior. *Hormone Behav.* 28: 261–272
- Sainz-Hernández JC, Racotta IS, Dumas S, Hernández-López J. 2008. Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture* 283:188–193
- Santelices B. 1989. *Algas marinas de Chile*. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Schiener P, Black KD, Stanley MS, Green DH. 2015. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology* 27:363–373.
- Senanan WS, Panutrakul P, Barnette V, Manthachitra S, Chavanich AR, Kapuscinski N, Tangkrock O. 2010. Ecological risk assessemnt of an alien aquatic species: a case study of *Litopenaeus vannamei* (Pacific whiteleg shrimp) aquaculture in the Bangpakong river, Thailand. In *Tropical Deltas and Coastal Zones: Food Production, Communities and Environment at the Land-Water Interface*, ed. Chu T. Hoanh, Brian W. Szuster, Kam Suan-Pheng, Abdelbagi M. Ismail, and Andrew D. Noble, 9:64–79. *Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture*. UK: CAB International
- Serrano-Pinto V, Vazquez-Boucard C, Villarreal-Colmenares H. 2003. Yolk proteins during ovary and egg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 134:33–43.

- Shafir S, Tom M, Ovadia M, Lubzens E. 1992. Protein, vitellogenin and vitellin levels during ovarian development in *Penaeus semisculatus* De Haan. *Biology Bulletin*. 183:394–400.
- Siddhanta AK, Goswami AM, Shanmugam M, Mody KH, Ramavat BK. 2002 Sterols from marine green algae of Indian waters. *Journal of the Indian Chemical Society* 79:294-297
- Slavin J. 2013. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5:1417-1435.
- Smit AJ. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *Journal Applied Phycology* 16:245–262.
- Solis NB. 1988. Biology and ecology. *Biology and culture of Penaeus monodon* (edition by Solis), 3–36. SEAFDEC Aquaculture Department, Tigbauan, Iloilo, Philippines
- Sorgeloos P, Coutteau P, Dhert P, Merchie G, Lavens P. 1998. Use of brine shrimp, *Artemia spp.*, in larval crustacean nutrition: a review. *Reviews in fisheries science* 6:55-68
- Spaargaren DH, Haefner Jr PA. 1994. Interactions of ovary and hepatopáncreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II. Biochemical relationships. *Journal of Crustacean Biology* 14:6-19
- Spaziani EP, Hinsch GW, Edwards SC. 1993. Changes in prostaglandin E2 and F2 during vitellogenesis in the Florida crayfish *Procambarus paeninsulanus*. *Journal of Comparative Physiology B* 163:541-545.
- Stryer L. 1997. *Biochemistry*. Standford University. Fourth edition. W.H. Freeman and Company New York. United States of America. 653-683
- Subramoniam T. 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. En: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 125: 135-156
- Subramoniam T. 2011. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. *Fisheries Science* 77: 1–21
- Suganthy N, Karutha Pandian S, Pandima Devi K. 2009. Neuroprotective effect of seaweeds inhabiting South Indian coastal area (Hare Island, Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve): cholinesterase inhibitory effect of *Hypnea valentiae* and *Ulva reticulata*. *Neuroscience Letters* 68:216–219
- Sumpownon C, Engsusophon A, Siangcham T, Sugiyama E, Soonklang N, Meeratana P, Sobhon P. 2015. Variation of prostaglandin E2 concentrations in ovaries and its effects on ovarian maturation and oocyte proliferation in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology* 23:129–138.
- Sun Y, Chen X, Song L, Liu S, Yu H, Wang X, Li P. 2018. Antiviral activity against *Avian Leucosis virus* subgroup J of degraded polysaccharides from *Ulva pertusa*. *BioMed Research International* 6:57-63.
- Tan-Fermin JD, Pudadera RA. 1989. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture* 77:229–242.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. 2003. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedical Pharmacotherapy* 57:321-325.
- Teshima S, Kanazawa A. 1979. Lipid transport mechanism in the prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 45:1341-1346.

- Teshima S, Kanazawa A, Horinouchi K, Koshio S. 1988. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus japonicus*: Induced maturation and transfer of lipid reserves to the ovaries. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57:1123-1129.
- Teshima S, Kanazawa A, Koshio S, Horinouchi K. 1989. Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: variation in lipid profiles of the ovary and hepatopáncreas. *Comparative Biochemistry Physiology* 92:45–49
- Thanh TT, Quach MT, Nguyen TN, Luong DV, Bui ML, Van Tran TT. 2016. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. *International Journal of Biological Macromolecules* 93:695-702.
- Torrissen O. 1984. Pigmentation of salmonids-effect of carotenoids in eggs and start-feeding diet on survival and growth rate. *Aquaculture* 43:185–193
- Treece G, Yates M. 1988. Laboratory Manual for the culture of Penaeid shrimp larvae, Marine advisory service Sea Grant College Program Texas A&M
- Treece GD, Fox JM. 1993. Design, operation and training manual for an intensive culture shrimp hatchery. Texas A&M University, Austin, TX
- Treerattrakool S, Boonchoy CH, Urtgama S, Panyim SY, Udomkit A. 2014. Functional characterization of recombinant gonad-inhibiting hormone (GIH) and implication of antibody neutralization on induction of ovarian maturation in marine shrimp. *Aquaculture* 428-429:166- 173.
- Trigui M, Gasmi L, Zouari I, Tounsi S. 2013. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *Journal Applied Phycology* 25:319-328.
- Tsang WS, Quackenbush LS, Chow BK, Tiu SH, He JG, Chan SM. 2003. Organization of the shrimp vitellogenin gene. Evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopáncreas. *Gene* 303:99–109
- Tseng DY, Chen YN, Kou GH, Lo CF, Kuo CM. 2001. Hepatopáncreas is the extra-ovarian site of vitellogenin synthesis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular y Integrative Physiology* 129:909–917.
- Tsukimura B. 2001. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoologist* 41:465-476.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2008. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Nutrient Data Laboratory Home Page.
- Uawisetwathana U, Leelatanawit R, Klanchui A, Prommoon J, Klinbunga S, Karoonuthaisiri N. 2011. Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp. *PloS ONE* 6: e24427
- Vaca A, Alfaro J. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture* 182:373-385.
- Van Handel E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry* 11:256–265.
- Van Herp F. 1992. Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in Crustacea. *Invertebrate Reproduction and Development* 22:21-30.
- Vanmierlo T, Husche C, Schött HF, Pettersson H, Lütjohann D. 2013. Plant sterol oxidation products–analogs to cholesterol oxidation products from plant origin. *Biochimie* 95:464-472.

- Varadharajan D, Pushparajan N. 2013. Food and feeding habits of aquaculture candidate a potential Crustacean of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, South East Coast of India. Journal of Aquaculture Research and Development 4-1
- Vargas-Cardenas J, Olivera-Galvez A, Brito LO, Vega-Galarza E, Cano-Pitta D, Vergara-Rubin V. 2015. Assessment of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) in recirculating aquaculture system. Aquaculture International 23:1491-1504.
- Vázquez-Boucard CG, Patrois J, Ceccaldi HJ. 2004. Exhaustion of lipid reserves in the hepatopáncreas of *Fenneropenaeus indicus* broodstock in relation to successive spawnings. Aquaculture 236:523-537
- Villalón JR. 1991. Practical manual for semintensive commercial production of marine shrimp. Texas AM University, Sea Grant Program Galveston. 103p
- Villalón JR, Preis F. 1993. A brief overview of the shrimp industry in Ecuador. Journal of Aquatic Food Product Technology 2:5-22.
- Walker PJ, Winton JR. 2010. Emerging viral diseases of fish and shrimp. Veterinary research 41:51.
- Wang L, Chen L, Qin J, Li E, Yu N, Du Z, Qi J. 2015 Effect of dietary lipids and vitamin E on growth performance, body composition, anti-oxidative ability and resistance to *Aeromonas hydrophila* challenge of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Aquaculture research 46:2544-2558.
- Wang X, Stocco DM. 2005. The decline in testosterone biosynthesis during male aging: a consequence of multiple alterations. Molecular and Cellular Endocrinology 238:1-7
- Weidner D, Rosenberry R. 1992. World shrimp farming. In: Proceedings of the special session on shrimp farming, edited by J. Wyban, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. P. 1-21.
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal Plant Physiology 144:307-313.
- Wickins JF, Beard TW, Child AR. 1995. Maximizing lobster, *Homarus gammarus* (L.), egg and larval viability. Aquaculture Research 26:379-392
- Wijesekara I, Pangestuti R, Kim SK. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydrate Polymers 84:14-21.
- Wong KH, Cheung PC. 2000. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part I.— Proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. Food Chemistry 71:475- 482.
- Wouters R, Vanhauwaert A, Naessens E, Pedrazzoli A, Lavens P. 1997. The effect of dietary n-3 HUFA and 22:6n-3/20:5n-3 ratio on white shrimp larvae and postlarvae. Aquaculture International 5:113–126.
- Wouters R, Gomez L, Lavens P, Calderon J. 1999. Feeding enriched *Artemia sp.* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. Journal of Shellfish Research 18:651-656.
- Wouters R, Nieto J, Sorgeloos P. 2000. Artificial diets for penaeids shrimp. Global Aquaculture Advocate 3:61- 62

- Wouters R, Lavens P, Nieto J, Sorgeloos P. 2001a. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture* 202:1-21.
- Wouters R, Piguave X, Bastidas L, Calderon J, Sorgeloos P. 2001b. Ovarian maturation and haemolymphatic vitellogenic concentration of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed increasing levels of total dietary lipids and HUFA. *Aquaculture Research* 32:573-582.
- Wouters R, Zambrano B, Espin M, Calderon J, Lavens P, Sorgeloos P. 2002. Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei* B. *Aquaculture Nutrition* 8:249-256.
- Wu X, Cheng Y, Sui L, Zeng C, Southgate PC, Yang X. 2007. Effect of dietary supplement of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne- Edwards), female broodstock. *Aquaculture* 273:602–613
- Wyban J, Martinez G, Sweeney J. 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquaculture* 28:59-62.
- Xu XL, Ji WJ, Castell JD, O'Dor RK. 1994. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture* 119:359-370.
- Xu D, Omura T, Masaki N, Arima H, Banno T, Okamoto A, Setou M. 2016. Increased arachidonic acid-containing phosphatidylcholine is associated with reactive microglia and astrocytes in the spinal cord after peripheral nerve injury. *Scientific Reports* 6:26427.
- Xu H, Zhang Y, Luo K, Meng X, Luan S, Cao B, Kong J. 2017. Arachidonic acid in diets for early maturation stages enhances the final reproductive performances of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 479:556–563.
- Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H. 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry* 128:895-901.
- Yaich H, Amira AB, Abbes F, Bouaziz M, Besbes S, Richel A, Garna H. 2017. Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast. *International Journal of Biological Macromolecules* 105:1430-1439.
- Yano I. 1983. Maturation of kuruma prawns *Penaeus japonicus* cultured in earthen ponds. Proceedings of the twelfth U.S.-Japan meeting on aquaculture, Baton Rouge, Louisiana. NOAA Tech. Rep. NMFS 47: 3-7
- Yano I, Chinzei Y. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry Physiology* 86B:213–218.
- Yano I, Kanna RA, Oyama RN, Wyban JA. 1988. Mating behavior in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Marine Biology* 97:171-175.
- Yano I. 2000. Endocrine control of reproductive maturation in penaeid shrimp. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., editors. Recent advances in marine biotechnology 4, Aquaculture, Pt. A. Enfield, NH: Science Publishers Inc.161–176.
- Yildiz G, Celikler S, Vatan O, Dere S. 2012. Determination of the antioxidative capacity and bioactive compounds in green seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Journal of Food Properties* 15:1182-1189.

- Yong Seok Kian A, Mustafa S, Rahman RA. 2004. Broodstock condition and egg quality in tiger prawn, *Penaeus monodon*, resulting from feeding bioencapsulated live prey. *Aquaculture International* 12:423- 433.
- Yu S, Nehus ZT, Badger TM, Fang N. 2007. Quantification of vitamin E and γ -oryzanol components in rice germ and bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:7308–7313.
- Yu DJ, Wang SM, Song KB. 2012 Physicochemical properties of paprika (*Capsicum annuum* L.) dehydrated with red algae extract. *Food Science and Biotechnology* 21:145-150.
- Yung PY, Burke C, Lewis M, Kjelleberg S, Thomas T. 2011. Novel antibacterial proteins from the microbial communities associated with the sponge *Cymbastela concentrica* and the green alga *Ulva australis*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1512-1515.
- Zhang YT, Hong WS, Qiu HT, Wang Q, Chen SX. 2019. Androgen induces olfactory expression of prostaglandin E2 receptor Ep1 in the burrow-living fish *Bostrychus sinensis*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 188:156-165.
- Zhao C, Dahlman-Wright K. 2010. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *Journal Endocrinology* 204:233-240
- Zhong, Y, Chen T, Zheng W, Yang Y. 2015. Selenium enhances antioxidant activity and photosynthesis in *Ulva fasciata*. *Journal of Applied Phycology* 27:555-562.

15. RESUMEN BIOGRÁFICO

Diana Cristina Corral Rosales

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Nutrición y Tecnología de Alimentos para
Organismos Acuáticos

Tesis: EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DIETARIA DE *Ulva clathrata* SOBRE EL
DESEMPEÑO REPRODUCTIVO Y LA CALIDAD DEL DESOVE EN
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EN
CONDICIONES DE PRODUCCIÓN COMERCIAL

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacido en Durango, Dgo el 9 de Febrero de 1990, hija de Guillermo
Joaquín Corral Arreola y Virginia Rosales Martínez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido en
Lic. Biólogo en el 2013, tesis con mención honorífica.

ACTIVIDADES/EXPERIENCIA EN INVESTIGACIÓN

- Junio- Agosto del 2012 **Granja CEGOSA S. A. de C. V. carretera
Aldama Tamaulipas km 85.**
Actividades realizadas: Manejo de granja,
muestreo de estanques, análisis de postlarvas,
biometrías, conteo de microalgas, uso de
fertilizantes acuícolas, identificación de
fitoplancton, Investigación.

- Noviembre del 2012 a
Mayo del 2013 **AQUAPACIFIC S. A. de C. V. Mazatlán,
Sinaloa, México**
Actividades realizadas: elaboración de dietas para
reproductores, biometrías, calidad de agua, análisis
bromatológico, análisis bacteriológico, manejo de
4000 reproductores de camarón blanco, manejo de
larvas de camarón blanco, uso y manejo de
microscopio, evaluación de parámetros zootécnicos
y reproductivos, fertilización in vitro, investigación
científica.

- Junio- Septiembre del 2014 **Grupo GAM, Laboratorio de Larvas Granmar S. A. de C. V. San Juan de la Costa, La Paz, Baja California Sur.**
Actividades realizadas: elaboración de dietas para reproductores, evaluación de una macroalga como aditivo funcional sobre el desempeño reproductivo del camarón blanco, biometrías, calidad de agua, manejo 1500 reproductores, evaluación de parámetros zootécnicos y reproductivos, técnica de ablación, desoves individuales, calidad del desove, calidad espermática, investigación.
- Septiembre-Octubre 2014 **Centro de Investigaciones Biológicas del**
Mayo 2015 **Noroeste CIBNOR, La Paz, Baja California Sur.**
Noviembre 2015
Agosto- Septiembre 2016
Octubre-Noviembre 2017
Actividades realizadas: Estancias cortas de investigación para el análisis de muestras y obtención de datos. Capacitación en las siguientes técnicas y métodos.
-Disección de tejidos en placa fría
-Determinación de metabolitos en tejidos por análisis bioquímicos: Preparación y tratamientos de muestra, preparación de reactivos y soluciones, proceso analítico de: Carbohidratos totales, lípidos totales, proteína y triglicéridos.
-Técnicas generales de Histología: Fijación de tejidos en solución Davidson, deshidratación en alcoholes, infiltración e inclusión en parafina, corte de tejidos en micrótopo de rotación, tinción con hematoxilina eosina, análisis digitales de imágenes.
-Análisis de ácidos grasos y esteroides por el Método modificado de Folch: cromatografía gas-líquido (CGL), integración, identificación y cuantificación.
-Pruebas colorimétricas por espectrofotometría.
Investigación científica.

PRESENTACIONES/COMUNICACIONES/PONENCIAS

- Participación como asistente en el segundo Encuentro Nacional en Vigilancia Epidemiológica Tamaulipas 2013 (28,29 y 30 de octubre 2013)
- Participación en el Simposio Internacional de Acuicultura y Nutrición Noviembre 2013.

- Simposio Internacional de Nutrición Acuícola SINA (Hermosillo, Sonora, 2015), trabajo presentado: Mejora de la capacidad reproductiva y de la calidad de las larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* por la inclusión de harina de alga *Ulva clathrata* en dietas para maduración.
- The International Symposium on Fish Nutrition and Feeding ISFNF (Sun Valley, Idaho, Junio 2016), trabajos presentados: 1) Supplementation of broodstock diets with *Ulva clathrata* improves reproductive performance and ovary nutrients accumulation of *Litopenaeus vannamei*. 2) Improvements of reproductive performance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* by enriching broodstock diets with *Ulva clathrata*: comparison in two commercial hatcheries.
- Simposio Internacional de Nutrición Acuícola SINA (Ensenada, Baja California, 2017), trabajo presentado: Efectos de la inclusión de *Ulva clathrata* en la dieta fresca para maduración de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sobre el perfil de ácidos grasos
- International Society for Applied Phycology ISAP (Nantes, Francia, Junio 18-23 2017) trabajo presentado: Supplementation of broodstock diets with *Ulva clathrata* improves reproductive performance and ovary nutrients accumulation of *Litopenaeus vannamei*.
- The World Aquaculture Society WAS (Ciudad del Cabo, Sudáfrica, Junio 2017). trabajos presentados: 1) Supplementation of broodstock diets with *Ulva clathrata* improves reproductive performance and ovary nutrients accumulation of *Litopenaeus vannamei*. 2) Improvements of reproductive performance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* by enriching broodstock diets with *Ulva clathrata*: comparison in two commercial hatcheries.
- The World Aquaculture Society LAQUA17 (Mazatlán, Sinaloa, Noviembre 2017), trabajo presentado: Enhancement of reproductive performance in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) by supplementation of *Ulva clathrata* meal in maturation diet in two mexican commercial hatcheries.
- International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (Islas Canarias, España, Junio 2018), trabajo presentado: Effects of *Ulva clathrata* inclusion in the fresh diet on reproductive performance, biochemical composition and fatty acid profile of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock.

PUBLICACIONES

- Corral-Rosales D. C. (2013). Mejora de la capacidad reproductiva y de la calidad de las larva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* por la inclusión de harina de alga *Ulva clathrata* en dietas para reproductores (Tesis licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.
- Corral-Rosales, D. C., Palacios, E., Ricque-Marie, D., y Cruz-Suárez, L. E. (2018). Enhancement of reproductive performance in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) by supplementation of *Ulva clathrata* meal in maturation diet in two commercial hatcheries. *Aquaculture Research*, 49(2), 1053-1059.
- Corral-Rosales, D. C., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Rodríguez-Jaramillo, C. y Palacios, E. (2018). Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. *Aquaculture Research*, 49(12), 3711-3722.
- Corral-Rosales, D. C., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E., Arjona, O. y Palacios, E. (2019). Fatty acids, sterols, phenolic compounds and carotenoid changes in response to dietary inclusion of *Ulva clathrata* in shrimp *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Applied Phycology*. 00-00

16. ANEXOS

ANEXO 1.

Artículo: Corral-Rosales, D. C., Palacios, E., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L. E. (2018). Enhancement of reproductive performance in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) by supplementation of *Ulva clathrata* meal in maturation diet in two commercial hatcheries. *Aquaculture Research*, 49(2), 1053-1059.
<https://doi.org/10.1111/are.13554>

ANEXO 2.

Artículo: Corral-Rosales, D. C., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Rodríguez-Jaramillo, C. y Palacios, E. (2018). Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. *Aquaculture Research*, 49(12), 3711-3722.
<https://doi.org/10.1111/are.13839>

ANEXO 3.

Artículo: Corral-Rosales, D. C., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E., Arjona, O. y Palacios, E., (2019). Fatty acids, sterols, phenolic compounds and carotenoid changes in response to dietary inclusion of *Ulva clathrata* in shrimp *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Applied Phycology*. 00-00.