

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Feromonas sexuales femeninas de contacto en
Litopenaeus vannamei: Estandarización del protocolo
para su detección y sus efectos en el comportamiento de
cortejo en machos**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

José Alberto Gutiérrez Vera

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
José Alberto Gutiérrez Vera

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Misael Rosales Leija
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Dr. André Luiz Braga de Souza

Dr. Jorge Alfaro Montoya



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

José Alberto Gutiérrez Vera © 2022

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **José Alberto Gutiérrez Vera** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Feromonas sexuales femeninas de contacto en *Litopenaeus vannamei*: Estandarización del protocolo para su detección y sus efectos en el comportamiento de cortejo en machos

Resumen aprobado por:

Dr. Misael Rosales Leija
Director de tesis

La identificación de feromonas sexuales es una de las líneas de investigación con mayor potencial práctico para optimizar la reproducción en cautiverio de los crustáceos de importancia comercial. Para *Litopenaeus vannamei*, el principal crustáceo cultivado en el mundo, se hipotetiza la existencia de dos tipos de feromonas sexuales femeninas (distancia y contacto). Sin embargo, estas no se han identificado ni existe un protocolo para su identificación. El objetivo de este trabajo fue estandarizar un protocolo de bioensayo para la detección de feromonas de contacto femeninas en *L. vannamei* y evaluar sus efectos sobre el comportamiento reproductivo de los machos. Con este fin, en la primera parte de la investigación se evaluaron los efectos de diferentes condiciones experimentales sobre el comportamiento de los camarones macho mediante bioensayos seriados, concluyendo que las siguientes condiciones son necesarias para una clara evidencia del efecto que las feromonas sexuales de contacto femeninas pueden tener sobre el comportamiento reproductivo de los camarones machos: 1) un período de acondicionamiento de al menos 1 h con el tanque cubierto; 2) la introducción de la “hembra artificial” hecha de tubos rígidos de PVC recubiertos con moléculas liposolubles mientras el tanque aún está cubierto; y 3) un período de observación de al menos 20 min. En la segunda parte de esta investigación se realizaron bioensayos donde se presentaron diferentes tratamientos de hembras “artificiales” a camarones machos sexualmente maduros, observándose una asociación significativa entre el comportamiento reproductivo de *L. vannamei* y los cuatro diferentes extractos cuticulares a los que fueron expuestos: (1) exoesqueleto ventral de hembra madura (EVHM), (2) exoesqueleto dorsolateral de hembra madura (EDHM), (3) exoesqueleto ventral de hembra inmadura (EVHI) y (4) exoesqueleto dorsolateral de hembra inmadura (EDHI). En los tratamientos EVHI y EDHI se presentaron tres comportamientos distintos: contacto, empuje y contacto prolongado; mientras que en los tratamientos EVHM y EDHM se presentaron dos comportamientos: contacto y empuje. En los cuatro tratamientos existieron diferencias significativas en la escala de comportamiento presentado, expresado como bioactividad total, con respecto a los controles tratados con hexano.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, reproducción, feromona, cortejo sexual.

Abstract of the thesis presented by **José Alberto Gutiérrez** Vera as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

***Litopenaeus vannamei* female contact sex pheromones: Protocol standardization for their detection and their effects on male courtship behavior**

Abstract approved by:

Dr. Misael Rosales Leija
Thesis Director

The identification of sex pheromones is one of the lines of research with the greatest practical potential to optimize the reproduction in captivity of commercially important crustaceans. For *Litopenaeus vannamei*, the main cultivated crustacean in the world, the existence of two types of female sexual pheromones (distance and contact) is hypothesized. However, these have not been identified and there is no bioassay protocol for their identification. The objective of this work was to standardize a bioassay protocol for the detection of female contact pheromones in *L. vannamei* and to evaluate their effects on the reproductive behavior of males. In the first part of the thesis, the effects of different experimental conditions on the behavior of male shrimp was evaluated through serial bioassays, concluding that the following conditions are needed for a clear evidence of the effect that female contact sex pheromones can have on the male's reproductive behavior: 1) a conditioning period of at least 1 h with the tank covered; 2) the introduction of the "artificial female" made of rigid PVC tubes coated with liposoluble molecules while the tank is still covered; and 3) an observation period of at least 20 min. In the second part of this thesis, bioassays were carried out where different treatments of "artificial" females were presented to sexually mature male shrimp, observing a significant association between the reproductive behavior of *L. vannamei* and the four different cuticular extracts to which they were exposed: (1) ventral exoskeleton of mature female (EVHM), (2) dorsolateral exoskeleton of mature female (EDHM), (3) ventral exoskeleton of immature female (EVHI) and (4) dorsolateral exoskeleton of immature female (EDHI). In the EVHI and EDHI treatments there were three different behaviors: contact, pushing and prolonged contact; while in the EVHM and EDHM treatments there were two behaviors: contact and push. In the four treatments there was significant differences in the behavioral scale presented, expressed as total bioactivity, with respect to the controls treated with hexane.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, reproduction, pheromone, contact, courtship behavior.

Dedicatoria

A mis padres Marcia y Plácido 🌿

A mis hermanos Jonny y Karen 🐾

A mi sobrina Alanna ☆

A mi novia Melanie ❤️

A Kirara, Luna, Muxe, Lizzy y Tulita 🐾

Gracias por todo su apoyo y cariño.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por aceptarme como estudiante y permitirme usar sus instalaciones para el desarrollo de mi proyecto de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para mis estudios de posgrado con el número de apoyo 753749.

Al Dr. Misael Rosales Leija por aceptarme como su estudiante, por su apoyo en la realización de este proyecto, por compartirme su experiencia y conocimiento, y por su dedicación en la revisión del trabajo escrito y presentaciones.

A la Dra. Carmen Paniagua Chávez por ser una excelente profesora, por aceptar ser parte de mi comité, por sus consejos y observaciones, y por permitirme utilizar las instalaciones del Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA) para la realización de análisis de calidad de agua.

A la Dra. Elizabeth Ponce Rivas por ser parte de mi comité, por sus comentarios y observaciones, y por prestarme el quipo e instalaciones necesarias para el mantenimiento de todos los organismos utilizados en este proyecto; sin todo su apoyo este proyecto no habría sido posible.

Al Dr. André Luiz Braga de Souza por aceptar formar parte de este proyecto, por sus acertados comentarios, por la valiosa ayuda en la obtención de los organismos utilizados en este proyecto, pero sobre todo por el entusiasmo mostrado en todo momento.

Al Dr. Jorge Alfaro Montoya por formar parte del sínodo de esta tesis, por compartir toda su experiencia en el área para enriquecer este proyecto, y por siempre demostrar su emoción por este trabajo.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla por ser un profesor ejemplar e inspirador, por todos los consejos durante mi estancia en el posgrado, por estar al pendiente de mi trabajo de tesis desde un inicio, por siempre recibirme amablemente en su laboratorio, y por el préstamo de reactivos y material de laboratorio utilizados en este proyecto.

Al técnico Francisco Morineau Escalante por su apoyo en el transporte de organismos, la preparación de sistemas para mantenimiento y sistemas para bioensayos, y por siempre estar al pendiente de lo que necesitara para este trabajo.

Al M. en C. Salvador Villasuso Palomares por darme la capacitación necesaria para realizar los análisis de calidad de agua en el SUBNARGENA.

A Lorena y David por apoyarme en el manejo de los organismos cuando fue necesario, por sus palabras de aliento, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A Melanie por el apoyo durante la realización de los bioensayos y durante el manejo de los organismos en la toma de biometrías, por escuchar con atención los ensayos de mis presentaciones, pero sobre todo por sus palabras de aliento y por acompañarme con amor en esta etapa.

A mi familia por todo el apoyo emocional y económico que me han brindado para llegar hasta esta etapa: a mi mamá por ser mi más grande inspiración como persona, a mi papá por todo el amor y enseñanzas que me brindó, a mi hermana por siempre alegrarme los días y ser como es, y a mi hermano por toda la confianza y apoyo en todos los sentidos.

Tabla de contenido

Resumen en español.	ii
Resumen en inglés.	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Biología de <i>Litopenaeus vannamei</i>	2
1.1.2 Reproducción de <i>Litopenaeus vannamei</i> en cautiverio	4
1.1.3 Endocrinología general de los crustáceos	5
1.1.4 Ablación unilateral del pedúnculo ocular	6
1.1.5 Alternativas a la ablación unilateral del pedúnculo ocular	8
1.1.6 Feromonas en crustáceos	9
1.1.7 Feromonas en <i>Litopenaeus vannamei</i>	12
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos	15
1.4.1 Objetivo general.....	15
1.4.2. Objetivos específicos.....	15
Capítulo 2. Metodología	16
2.1 Obtención y mantenimiento de los organismos	16
2.1.1 Hembras adultas para obtención de extractos	16
2.1.2 Machos adultos para realización de bioensayos.....	17
2.2 Extracción de compuestos cuticulares liposolubles.....	19

2.3 Estandarización del protocolo para bioensayos	20
2.3.1 Exposición de luz durante aclimatación	20
2.3.2 Duración de aclimatación.....	21
2.3.3 Material para “hembras artificiales”	21
2.3.4 Método para introducir “hembra artificial” al tanque.....	22
2.3.5 Duración del periodo de observación del bioensayo	22
2.4 Diseño experimental para evaluación del efecto de compuestos cuticulares de hembras sobre el comportamiento de machos	23
2.4.1 Bioensayo I: Efecto de extractos de hembras inmaduras en el comportamiento de camarones macho.....	23
2.4.2 Bioensayo II: Efecto de extractos de hembras maduras en el comportamiento de camarones macho.....	24
2.6 Análisis estadístico	24
Capítulo 3. Resultados	26
3.1 Estandarización del protocolo para bioensayos	26
3.1.1 Exposición de luz durante aclimatación	26
3.1.2 Duración de aclimatación.....	26
3.1.3 Material para “hembras artificiales”	27
3.1.4 Método para introducir “hembra artificial” al tanque.....	27
3.1.5 Duración del periodo de observación del bioensayo.....	27
3.2 Bioensayo I: Efecto de extractos de hembras inmaduras en el comportamiento de camarones macho.....	28
3.2.1 Relación entre los tratamientos y cada uno de los comportamientos presentados	28
3.2.2 Número de veces que se presentaron los comportamientos reiterados	30
3.2.3 Evaluación de la bioactividad total.....	31
3.3 Bioensayo 2: Efecto de extractos de hembras maduras en el comportamiento de camarones macho.....	31

3.3.1 Relación entre los tratamientos y cada uno de los comportamientos presentados	32
3.3.2 Número de veces que se presentaron los comportamientos reiterados	33
3.3.3 Evaluación de la bioactividad total.....	34
Capítulo 4. Discusión	35
4.1 Estandarización de protocolo de bioensayo	35
4.2 Efecto de extractos de hembras sobre comportamiento de camarones machos	37
Capítulo 5. Conclusiones	47
Capítulo 6. Recomendaciones	48
Literatura citada
Anexos	58
Anexo A	58

Lista de Figuras

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Litopenaeus vannamei* (imagen modificada de Bayley y Jham, 1992).3
- Figura 2.** Sistema endocrino de crustáceos (imagen modificada de Christie, 2011). A: Localización de las principales estructuras endocrinas en crustáceos. B: Localización del complejo órgano X-glándula sinusal dentro del pedúnculo ocular (imagen modificada de Serrano *et al.*, 2004). Abreviaturas: (LG) *lamina ganglionaris*; (ME) *medulla externa*; (MI) *medulla interna*, (MT) *medulla terminalis*; (GS) glándula sinusal; (OX) órgano X; (NO) nervio óptico.....6
- Figura 3.** Regulación de la reproducción por la GIH derivada del pedúnculo ocular y del cerebro en hembras de *Litopenaeus vannamei* (imagen modificada de Chen *et al.*, 2014) . Abreviaturas: (GIH) hormona inhibidora de la gónada; (VTG) vitelogenina.7
- Figura 4.** Esquema del funcionamiento hipotético de las feromonas sexuales en crustáceos decápodos (Imagen modificada de Wyatt, 2003).11
- Figura 5.** Comportamiento reproductivo de *Litopenaeus vannamei* (imagen modificada de Misamore y Browdy, 1996).....13
- Figura 6.** Hembra en estadio IV de desarrollo gonadal. Los lóbulos ováricos presentan una fuerte pigmentación naranja, ocupan la totalidad del largo del dorso de la hembra con un grosor prominente y se les distingue una constricción en el primer segmento abdominal.....17
- Figura 7.** Identificación sexual en *Litopenaeus vannamei*. A: Macho con presencia de petasma en el primer par de pleópodos. B: Hembras con ausencia de petasma y presencia de télico entre el cuarto y quinto par de pereiópodos.18
- Figura 8.** Actividad de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a diferentes condiciones experimentales ($n= 3$ réplicas/tratamiento). A) Exposición de luz durante la aclimatación, B) Duración de la aclimatación, C) Material para “hembras artificiales”, D) Método para introducir “hembra artificial” al tanque.26
- Figura 9.** Respuesta conductual de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras inmaduras ($n= 15$ réplicas/tratamiento). A) Contacto, B) Empuje y C) Contacto prolongado. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHI) exoesqueleto dorsolateral de hembra inmadura, (EVHI) exoesqueleto ventral de hembra inmadura.....29
- Figura 10.** Grado de bioactividad presentada por machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras inmaduras ($n= 15$ réplicas/tratamiento). Grado 0: sin respuesta; grado 1: contacto; grado 2: empuje y grado 3: Contacto prolongado. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHI) exoesqueleto dorsolateral de hembra inmadura; (EVHI) exoesqueleto ventral de hembra inmadura.....31
- Figura 11.** Respuesta conductual de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras maduras ($n= 15$ réplicas/tratamiento). A) Contacto y B) Empuje. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHM) exoesqueleto dorsolateral de hembra madura; (EVHM) exoesqueleto ventral de hembra madura.32

Figura 12. Grado de bioactividad presentada por machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras maduras ($n= 15$ réplicas/tratamiento). Grado 0: sin respuesta; grado 1: contacto; grado 2: empuje y grado 3: contacto prolongado. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHM) exoesqueleto dorsolateral de hembra madura; (EVHM) exoesqueleto ventral de hembra madura.....34

Lista de Tablas

- Tabla 1.** Parámetros del agua recomendados para el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boyd, 2009; Lara Espinoza *et al.*, 2015).4
- Tabla 2.** Escala de las respuestas conductuales de *Litopenaeus vannamei* macho tras la exposición a extractos cuticulares de hembras inmaduras.....24
- Tabla 3.** Valores promedio \pm desviación estándar del número de veces que se presentaron los comportamientos reiterados de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras inmaduras. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.5$) entre tratamientos: a>b. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHI) exoesqueleto dorsolateral de hembra inmadura; (EVHI) exoesqueleto ventral de hembra inmadura.30
- Tabla 4.** Valores promedio \pm desviación estándar del número de veces que se presentaron los comportamientos reiterados de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras maduras. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos: a>b. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHM) exoesqueleto dorsolateral de hembra madura; (EVHM) exoesqueleto ventral de hembra madura.....33
- Tabla 5.** Interpretación de los valores del coeficiente V de Cramer (Lee, 2016).58

Capítulo 1. Introducción

El cultivo de crustáceos es una actividad primaria que ha ganado importancia en las últimas décadas, llegando a contribuir el 11.43 % del total de la producción acuícola mundial. En 2018, esta actividad tuvo un estimado de producción total de 9,387,000 t, de las cuales 3,653,000 t correspondieron a acuicultura continental y 5,734,000 t a maricultura. Dentro de este subsector acuícola, la camaronicultura es una de las industrias más importantes, siendo el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, la especie más cultivada. Dicha especie aportó 4,966,200 t a la producción mundial de crustáceos por cultivo, lo que representa el 52.90 % (FAO, 2020).

En México, *L. vannamei* también es el crustáceo más importante para el sector pesquero y acuícola. La producción nacional en 2017 se estimó en 230,381 t en peso vivo por un valor de \$16,888,988,000 MXN, de las cuales 158,115 t provenían de la acuicultura, lo que en volumen representa el 68.63 % del total de la producción nacional de camarón. Con estas cifras, el camarón se posiciona en segundo lugar del total de la producción pesquera por volumen y primer lugar si solo se toma en cuenta la producción por cultivo. Sin embargo, por su valor económico se posiciona en el primer lugar entre los recursos capturados y cultivados. Esto se debe a que si se compara el valor por tonelada de camarón en 2017 (\$73,308.94 MXN) con el de la trucha (\$60,206.33 MXN), el pez de aleta que tuvo mayor valor económico por tonelada, el camarón está por encima (CONAPESCA, 2018).

En vista de los beneficios de producir *L. vannamei* por la industria acuícola, la camaronicultura es el subsector acuícola que ha mostrado un mayor crecimiento a nivel mundial y nacional (Martínez-Córdova et al., 2009). Sin embargo, con este crecimiento se presentan nuevos retos, como son la dispersión de enfermedades, la búsqueda de la sustentabilidad, la producción suficiente de crías para cubrir la demanda mundial y nacional, entre otros. La resolución de este último es fundamental, ya que en la medida que se intensifique la producción de postlarvas mediante el desarrollo de biotecnologías que permitan aumentar la eficiencia reproductiva, la producción de camarón tendrá el potencial de crecer a una mayor proporción de su crecimiento actual. Por tanto, la generación de conocimiento en el área es indispensable para el mejor aprovechamiento de este recurso.

Dentro de los distintos proyectos de investigación que se realizan para la producción de camarón, la evaluación de alternativas a la ablación del pedúnculo ocular con el fin de inducir a la maduración y desove de los organismos reproductores está tomando importancia. En gran parte debido a la eficiencia variable que presenta esta técnica para la producción de nauplios, pero también debido a la creciente preocupación por el bienestar animal. Si bien no hay estudios que comprueben que los camarones sufran dolor con esta técnica, sí hay estudios que muestran la percepción negativa de los

consumidores a esta práctica, ya que la consideran como poco humanitaria (Domenénech, 2018; Zacarias *et al.*, 2021). Por lo tanto, con el fin de contribuir a satisfacer las demandas del mercado mundial de manera eficiente y sostenible, el uso feromonas surge como una de las alternativas con mayor potencial para incrementar la eficiencia reproductiva en crustáceos.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Biología de *Litopenaeus vannamei*

El camarón *L. vannamei* es originario de la costa del Océano Pacífico de México, Centroamérica y Suramérica, hasta el sur de Perú (Briggs *et al.*, 2004). Como ya se mencionó, a la fecha *L. vannamei* es el crustáceo más cultivado. Las ventajas de su cultivo se basan en su crecimiento rápido y una resistencia a diversas enfermedades, como el virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés), relativamente mucho mayor que cualquier otra especie de camarón (Liao y Chien, 2011). Puede alcanzar tallas comerciales de 16 g en promedio en un período de 2 a 3 meses, además de adaptarse y crecer rápidamente en distintas salinidades (Hsien-Tsang y Aguillón, 2008).

En la naturaleza, los camarones adultos viven y se aparean en ambientes marinos tropicales cercanos a las costas, mientras que las etapas juveniles y pre-adultas viven en estuarios y lagunas costeras. Las hembras depositan huevos con un tamaño de 0.22 a 0.26 mm, que al entrar en contacto con el agua se sedimentan y adoptan una forma esférica. De 12-14 h después de la ovoposición del huevo eclosiona un nauplio. Los estadios larvales (nauplio, protozoa y mysis) se adentran en la zona costera conforme van desarrollándose para finalmente establecerse en el fondo de los sistemas lagunares estuarinos poco profundos. El nauplio es una larva de 0.2 y 0.6 mm que pasa por seis subestadios (por el tamaño y número de mudas), durante este estadio el organismo se alimenta únicamente de sus reservas vitelinas y presenta un comportamiento planctónico. Por su parte, la protozoa es una larva de 0.6 – 2.8 mm con tres subestadios que se caracterizan por empezar a ingerir alimento exógeno (fitoplancton). El último estadio larvario es la mysis, cuyas dimensiones se encuentran entre 2.8 y 5.2 mm, se alimenta de fitoplancton y zooplancton, y se divide en tres subestadios. Al inicio de esta etapa la larva sigue siendo planctónica; sin embargo, al acercarse a ser una postlarva adquiere un comportamiento bentónico debido al desarrollo de las patas caminadoras o pereiópodos. El estadio de postlarva es muy parecida en su aspecto al camarón juvenil o adulto, la diferencia radica en la talla (5-25 mm). El camarón pre-adulto regresa al ambiente marino fuera de la costa, donde ocurre su maduración sexual, apareamiento y desove, reiniciándose así el ciclo de vida (**Figura 1**) (Rothlisberg, 1998; Treece y Yates, 1993; Wei *et al.*, 2014).

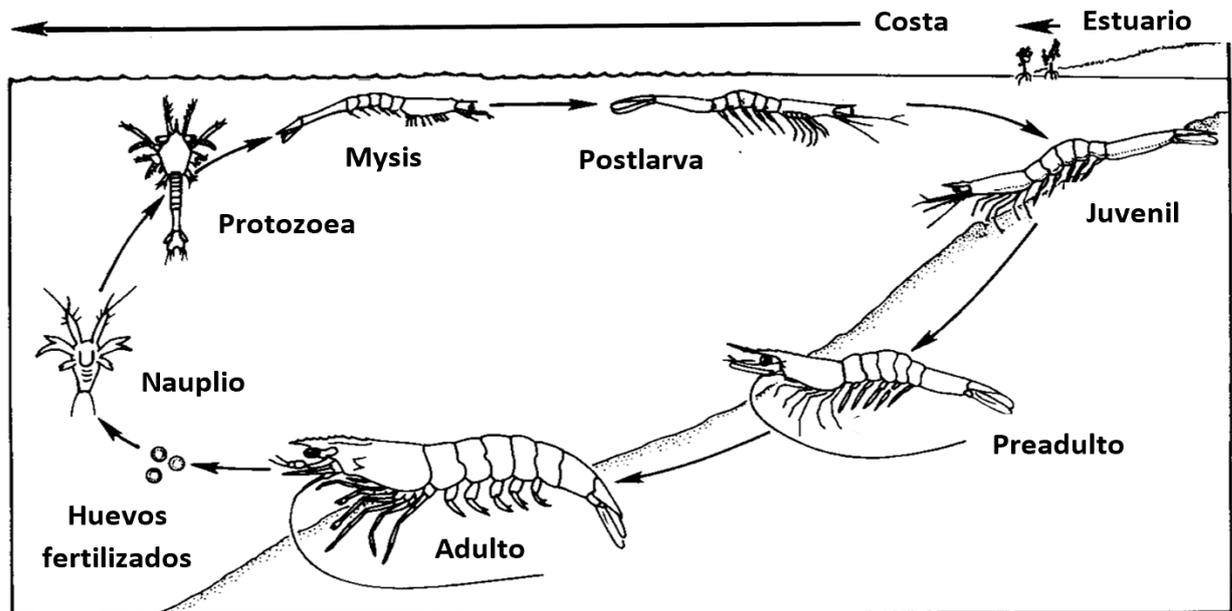


Figura 1. Ciclo de vida de *Litopenaeus vannamei* (imagen modificada de Bayley y Jham, 1992).

Los organismos juveniles y adultos se caracterizan por tener el cuerpo dividido en dos regiones características visibles externamente: cefalotórax y abdomen. El cefalotórax tiene 13 segmentos (5 cefálicos y 8 torácicos) y está conformado por rostrum, ojos, antenas, anténulas, branquias, maxilípedos, mandíbula, maxílula, maxila, pereiópodos, escafoceritos y escafognatitos; el abdomen tiene 6 segmentos, los 5 primeros están compuestos por somas y pleópodos, mientras que el último presenta apéndices aplanados (urópodos) unidos a una espina o telson (Hsien-Tsang y Aguillón, 2008).

A pesar de la capacidad que tienen estos organismos para adaptarse a distintas condiciones, para la reproducción y crecimiento ideal es indispensable la medición y mantenimiento de los parámetros físicos y químicos del agua en los rangos de valores óptimos para la especie (**Tabla 1**). Aún dentro de estos rangos, existen los denominados puntos isotérmico e isosmótico, en donde los organismos tienen el menor desgaste metabólico y por tanto presentan un mayor rendimiento en sus procesos fisiológicos (Hochachka y Somero, 2014). En *L. vannamei* los puntos isotérmico e isosmótico se encuentran en 25.6-26.2 °C y 24.7 ppt respectivamente (Castille y Lawrence, 1981; González *et al.*, 2010).

Tabla 1. Parámetros del agua recomendados para el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boyd, 2009; Lara Espinoza *et al.*, 2015).

Parámetros	Valores óptimos
pH	7.0-8.3
Dureza Total (como mg/l de CaCO ₃)	>75
Temperatura (°C)	26-30
Oxígeno disuelto (ppm)	5-9
Salinidad (ppt)	20-35
CO ₂ (ppm)	< 7
Amoniaco (ppm)	< 0.02
Nitritos (ppm)	< 0.55

Pese a las claras ventajas del cultivo de camarón blanco del Pacífico sobre otras especies, es indispensable tomar en cuenta la genética, reproducción, alimentación, manejo, sanidad y economía de la especie, con el fin de obtener el máximo rendimiento posible de su cultivo. Dentro de estos aspectos, la reproducción ha tomado importancia debido al potencial que tiene su investigación para optimizar el cultivo y satisfacer la demanda mundial de este organismo.

1.1.2 Reproducción de *Litopenaeus vannamei* en cautiverio

La mayoría de los laboratorios comerciales de producción de postlarvas de *L. vannamei* utiliza la técnica de la ablación unilateral del pedúnculo ocular en su protocolo de reproducción para inducir la maduración y el desove. Regularmente, este protocolo inicia con la selección de reproductores al llegar a un peso entre 35 y 40 g, seleccionándose organismos en intermuda que no presenten estructuras corporales dañadas, que sean activos, y que estén libres de enfermedades o manchas de cualquier tipo (Hsien-Tsang y Aguillón, 2008).

Los reproductores seleccionados son separados y aclimatados durante un periodo de 2-3 semanas para que se adapten a las condiciones del área (alimentación y fotoperiodo). La alimentación se basa en alimento natural (poliquetos, calamar, mejillones, almejas, etc.), y el fotoperiodo adecuado es 14 horas luz: 10 oscuridad. Transcurrido el período de aclimatación, las hembras son separadas para colocarlas en tanques para la inducción a la maduración y desove, lo cual se realiza mediante la ablación unilateral del pedúnculo ocular. Esta técnica tiene su fundamento en los centros endocrinos que controlan la

reproducción, localizados en el pedúnculo ocular (Gonzalez-Alanis, 2004; Jayasankar *et al.*, 2020). Tema que será abordado con mayor profundidad en los siguientes subtemas.

El apareamiento inicia 5-7 días después de realizada la ablación del pedúnculo ocular; el macho corteja a la hembra al nadar tras de ella, para posteriormente colocarse debajo de ella hasta expulsar el espermatóforo, el cual se adhiere entre el tercer y quinto par de pereiópodos de la hembra. Finalmente, la hembra desova de 100,000 a 250,000 huevos, de los cuales eclosionan larvas de 12 a 14 h después, si son mantenidos a una temperatura entre 28 y 30°C (Arcos *et al.*, 2003).

A la fecha, también existen laboratorios comerciales cuya producción de postlarvas se basa en la selección de líneas genéticas de hembras con maduración ovárica espontánea. Se ha demostrado que estas hembras pueden tener una productividad similar que las hembras sometidas a la ablación si los reproductores reciben alimento húmedo suplementario de alta calidad durante la pre-maduración, sin embargo, debido a que los picos de maduración son impredecibles y por tanto no siempre se logra la sincronización de los desoves, es difícil el establecimiento de programas de producción (Zacarias *et al.*, 2019).

Alfaro-Montoya *et al.* (2019) mencionan que, en la última década, al menos diez líneas de investigación relacionadas con la reproducción de esta especie tienen potencial para mejorar la camaronicultura con base en el conocimiento científico, y las clasifican en cinco niveles de aplicación: conocimiento básico, protección del producto, mejora del rendimiento de crecimiento, producción de larvas, y alternativas a la ablación del pedúnculo ocular; siendo este último el nivel de aplicación objeto de este estudio. Los mismos autores señalan que gran parte del crecimiento en estas líneas de investigación se deben a los avances en el estudio de la endocrinología reproductiva de los crustáceos.

1.1.3 Endocrinología general de los crustáceos

El sistema endocrino de los crustáceos está conformado por órganos neuroendocrinos, órganos neurohemales y glándulas endocrinas (González *et al.*, 2018) (**Figura 2A**). A su vez, los órganos neuroendocrinos están constituidos por somas de neuronas con actividad secretora, y dentro de esta clasificación se encuentran el órgano X del pedúnculo ocular, ganglio subesofágico, ganglio torácico y ganglio abdominal. Dentro de los órganos neurohemales más conservados filogenéticamente, se encuentran la glándula sinusal o glándula del seno, el órgano pericárdico y los órganos postcomisurales, todos ellos formados por los axones de células neurosecretoras que liberan las secreciones de estas a la circulación hemolinfática. El órgano Y, el órgano mandibular, la glándula

androgénica y los ovarios constituyen las glándulas endocrinas (Agarwal et al., 2017). De todas estas estructuras, el complejo formado por el órgano X-glándula sinusal constituye el principal centro de control endocrino en crustáceos, y 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 (Jayasankar et al., 2020). Este complejo neurosecretor se encuentra en la base del pedúnculo ocular, entre la *medulla terminalis* y la *medulla interna* (Figura 2B) (Huberman, 2000).

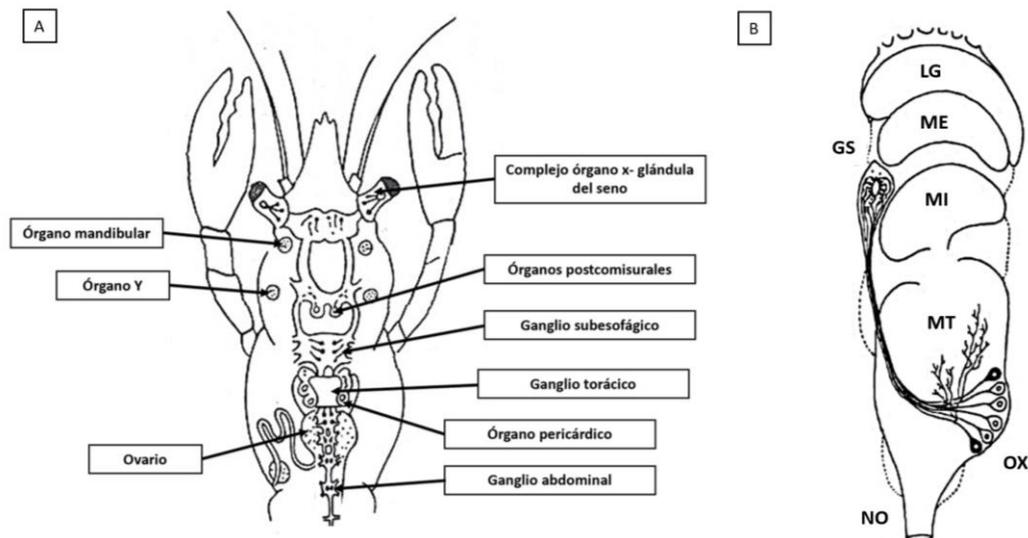


Figura 2. Sistema endocrino de crustáceos (imagen modificada de Christie, 2011). A: Localización de las principales estructuras endocrinas en crustáceos. B: Localización del complejo órgano X-glándula sinusal dentro del pedúnculo ocular (imagen modificada de Serrano et al., 2004). Abreviaturas: (LG) *lamina ganglionaris*; (ME) *medulla externa*; (MI) *medulla interna*, (MT) *medulla terminalis*; (GS) glándula sinusal; (OX) órgano X; (NO) nervio óptico.

1.1.4 Ablación unilateral del pedúnculo ocular

La técnica de la ablación unilateral del pedúnculo ocular fue descrita por primera vez por Panouse en 1943 (Radhakrishnan y Vijayakumaran, 1984), quien descubrió que al retirar uno de los pedúnculos oculares se promovía la maduración ovárica y la liberación de gametos en crustáceos. La técnica consiste en elegir el pedúnculo ocular que se encuentre en peor condición (opaco, lacerado, melanizado y/o incompleto) para retirarlo quirúrgicamente, ya sea mediante la técnica de ligado o la de cauterizado. Este procedimiento se realiza de 2 a 3 días posteriores a la muda (Taylor et al., 2004).

El fundamento de este procedimiento está en el modelo básico de regulación fisiológica de la reproducción de los crustáceos, el cual está establecido en un control hormonal de tres niveles: (1) el sistema nervioso central (órgano X-glándula sinusal/ganglio torácico), (2) órgano mandibular/ glándula

androgénica, y (3) sistema reproductor masculino y femenino con sus órganos diana complementarios (Okumura, 2004). La ablación del pedúnculo actúa sobre el nivel de regulación más alto, que inicia con una cascada de aminos biogénicas, entre ellas la serotonina, que al estimular la secreción de la hormona estimulante de la gónada (GSH) por el ganglio torácico, activa la vitelogénesis en el ovario y hepatopáncreas, y de manera indirecta la maduración meiótica (Agarwal et al., 2017; Chen et al., 2014).

Esta vía es inhibida por la liberación de neurohormonas inhibitoras de la familia de las hormonas hiperglucémicas de los crustáceos (hormona hiperglucémica de crustáceos [CHH] / hormona inhibitora de la muda [MIH] / hormona inhibitora gonadal [GIH] / hormona inhibitora del órgano mandibular [MOIH]), las cuales son mayormente sintetizadas en el órgano X y almacenadas y secretadas por la glándula sinusal. Dentro de estas, destaca la GIH, que al ser antagonista de la GSH bloquea la vitelogénesis, regulando así negativamente la maduración de los gametos. La GIH se divide en dos subfamilias (Tipo I y II) de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y estructuras precursoras, ambas subfamilias tienen diferentes isoformas que actúan coordinadamente para una misma acción biológica (Diwan, 2005; Huberman, 2000; Kang et al., 2021).

Chen et al. (2014) determinaron que el cerebro y el pedúnculo ocular son los sitios más importantes de expresión de la GIH, y por tanto ambos podrían actuar en conjunto para regular la expresión de la vitelogenina y con ello la maduración sexual (**Figura 3**).

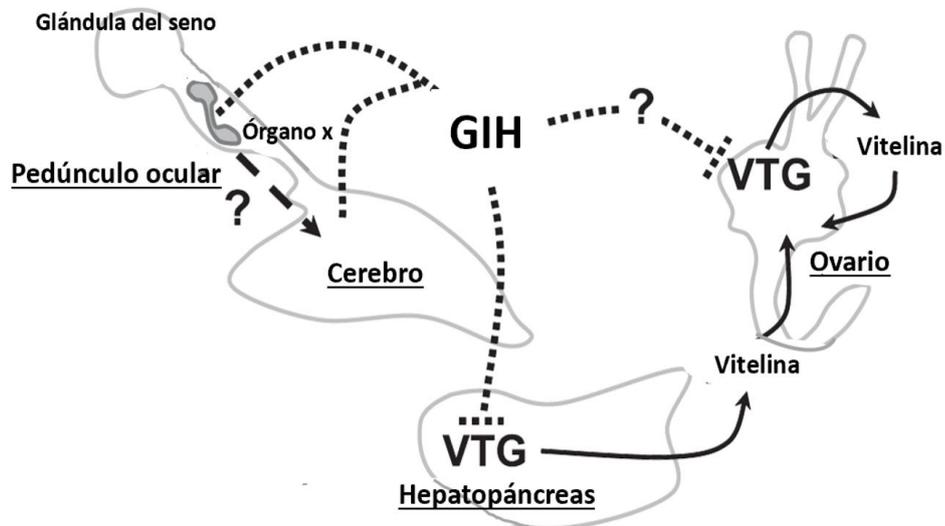


Figura 3. Regulación de la reproducción por la GIH derivada del pedúnculo ocular y del cerebro en hembras de *Litopenaeus vannamei* (imagen modificada de Chen et al., 2014). Abreviaturas: (GIH) hormona inhibitora de la gónada; (VTG) vitelogenina.

Como ya se ha mencionado, el complejo órgano X- glándula sinusal se localiza en el pedúnculo ocular, por lo que al retirar el mismo, se inhibe gran parte de la producción y secreción de GIH, aumentando así la expresión de vitelogenina y la subsecuente maduración y liberación de los gametos. Además, en los últimos estudios se ha demostrado que la ablación del pedúnculo ocular en camarones no solo elimina las fuentes de GIH periféricas al pedúnculo ocular, sino que también modula negativamente la expresión de GIH en el cerebro (Chen *et al.*, 2014).

A pesar de que la técnica de ablación del pedúnculo ocular sigue siendo la más utilizada en los protocolos de maduración de camarones peneidos (Alfaro-Montoya *et al.*, 2019), presenta una serie de problemas asociados a la producción de postlarvas, dentro de las cuales se pueden mencionar que 1) no logra inducir la maduración de gónadas en una gran proporción de las hembras, 2) las hembras que logran madurar producen un número de huevos variables, 3) es posible que las hembras nunca se emparejen con un macho, 4) los nauplios producidos por hembras sometidas a esta técnica tienen una menor supervivencia que aquellos producidos por hembras que maduran de manera natural y 5) aún si los nauplios logran sobrevivir hasta postlarvas, estas muestran una menor resistencia a patógenos en comparación a las postlarvas producidas de manera natural (Arcos *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2004; Teodoro *et al.*, 2009; Zacarias *et al.*, 2019, 2021). Aunado a esto, es una técnica invasiva que compromete el sistema inmune y el estado fisiológico general de los organismos reproductores, aumentando la mortalidad y disminuyendo el periodo de vida útil de estos organismos (Sainz-Hernández *et al.*, 2008).

Bajo estos argumentos es que reluce nuevamente la importancia suplir o complementar esta técnica, sobre todo con alternativas no invasivas que permitan el desarrollo de la camaronicultura con un enfoque humanitario y eficiente.

1.1.5 Alternativas a la ablación unilateral del pedúnculo ocular

Actualmente, las alternativas a la ablación del pedúnculo ocular son la mayor frontera de investigación para la camaronicultura, y todas están basadas en la estimulación de la vitelogénesis, ya sea de manera indirecta, o a través de la inhibición de GIH (Alfaro-Montoya *et al.*, 2019). Se han utilizado diversas moléculas para estimular la maduración gonadal y el desove sin ablación del pedúnculo ocular, desde hormonas como los esteroides y juvenoides, hasta prostaglandinas y neurotransmisores (Alfaro-Montoya *et al.*, 2019). Dentro de los tratamientos con hormonas, el 17 alpha-metiltestosterona ha demostrado ser efectivo para incrementar el conteo espermático en machos de *L. vannamei* sin aumentar significativamente las anomalías en los espermatozoides, además, los tratamientos con

17 alpha-hidroxi-progesterona han sido efectivos para incrementar la expresión de vitelogenina en hembras de *Penaeus japonicus* (Alfaro, 1996; Yano, 1987). Por otro lado, los tratamientos con juvenoides (metil fernesoato y hormona juvenil III) han logrado estimular la madurez gonadal *in vitro* en machos y hembras, no obstante se requiere la evaluación *in vivo* para confirmar estos resultados (Alfaro et al., 2008; Teodoro et al., 2009; Tsukimura y Kamemoto, 1991).

Dentro de los neurotransmisores, la serotonina ha tenido resultados prometedores para inducir la maduración ovárica al ser combinada con el antipsicótico espiperona, presentando tasas de maduración cercanas a la ablación unilateral del pedúnculo ocular (Alfaro et al., 2004), pero al ser aplicado mediante inyección, continua siendo un proceso invasivo y menos práctico que otras alternativas.

Otra de las técnicas que está surgiendo como una alternativa prometedora es la interferencia por RNA, basada en el uso de RNA de doble cadena (dsRNA) para silenciar por interferencia la transcripción de la GIH. Esta técnica ha sido probada en *Penaeus monodon* y *L. vannamei*, con una tasa de ovoposición de 57% y 63%, respectivamente (Feijó et al., 2016; Treerattrakool et al., 2011). Sin embargo, al igual que la alternativa anterior, las moléculas de GIH dsRNA deben administrarse vía inyección. Además, como ya se ha citado, la GIH tiene múltiples isoformas que podrían actuar en conjunto para regular negativamente la reproducción de los crustáceos, por lo que, para igualar las tasas de maduración de la ablación, sería necesario inyectar una combinación de dsRNA de diferentes isoformas. Una última desventaja que se le ha atribuido a esta alternativa subyace en las reservas ya existentes de GIH en la glándula del seno; Kang et al. (2021) mencionan que, a pesar de que las moléculas de GIH dsRNA pueden inhibir en gran medida la síntesis de GIH, no pueden eliminar la GIH que ya ha sido sintetizada y almacenada.

Por otro lado, las terapias con feromonas se caracterizan por ser no invasivas, lo que las dota de un gran potencial para ser aprovechadas en el control de la reproducción de estos organismos ya sea sustituyendo o complementando la técnica de la ablación del pedúnculo ocular (Alfaro-Montoya et al., 2019).

1.1.6 Feromonas en crustáceos

Se define como feromona a aquellas sustancias que un individuo secreta al medio que lo rodea y que son captadas por otro de la misma especie, causándole una reacción específica (Law y Regnier, 1971). En invertebrados se han identificado un gran número de feromonas que actúan en la determinación

de las características de comportamiento social, como lo son la delimitación territorial, la identificación de colonias específicas, la jerarquía social, el estado de los ciclos reproductivos, y los rituales de apareamiento (Ando *et al.*, 2004).

Específicamente, las feromonas sexuales tienen importancia vital en la reproducción al tener efectos estimulatorios de un macho o una hembra para propiciar la relación sexual con el fin de perpetuar la especie (Zhang *et al.*, 2011). En crustáceos se ha determinado la existencia de dos tipos de feromonas sexuales: feromonas de proximidad (contacto) y feromonas activas a distancia. Las feromonas de distancia son solubles en el medio, actúan con bajas concentraciones, y son captadas por vía olfatoria; mientras que las feromonas de contacto son insolubles en el medio y actúan a altas concentraciones directamente en el sentido del tacto o gusto (Caskey y Bauer, 2005). En el caso de crustáceos acuáticos, las feromonas de contacto son compuestos liposolubles como ceras e hidrocarburos (Zhang *et al.*, 2011).

Ryan (1966) fue el primer autor en mostrar evidencia de la posible existencia de feromonas en crustáceos. Posteriormente, Barki e Ilan (1999) probaron esta hipótesis mientras realizaban bioensayos de emparejamiento y receptividad en langosta australiana (*Cherax quadricarinatus*), ya que los machos de esta especie presentaban comportamientos de cortejo muy marcados con el simple hecho de estar en presencia de las hembras. Sin embargo, la naturaleza química de estas sustancias seguía siendo desconocida, y no fue hasta tiempo después que Hardege *et al.* (2011) realizaron la primera identificación de feromona sexual en crustáceos mediante las técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) y resonancia magnética (NMR, por sus siglas en inglés). La feromona identificada fue el uridinfosfato, que actúa como feromona de distancia en el cangrejo común (*Carcinus maenas*).

Ese mismo año, Zhang *et al.* (2011) identificaron la primer feromona sexual de contacto en crustáceos al trabajar con el camarón fantasma limpiador (*Lysmata boggesi*). La feromona fue caracterizada mediante la técnica de cromatografía de gas acoplada a espectrómetro de masas (GC-SM, por sus siglas en inglés), y está conformada por una mezcla de sustancias volátiles derivadas de ácidos grasos: hexadecanamida, octadecenamida y metil linoleato. Con estos resultados, los autores establecieron la hipótesis de que, en animales acuáticos como los crustáceos, las feromonas de distancia son hidrosolubles y las de contacto liposolubles. Estos mismos autores señalan que la función principal de las feromonas de distancia en crustáceos posiblemente sea la atracción (efecto disparador), mientras que las feromonas de contacto podrían estar implicadas en el reconocimiento final de la pareja y la liberación de gametos (efecto disparador e inductor) (**Figura 4**), concordando con lo que previamente se había establecido en otros organismos (Wyatt, 2003).

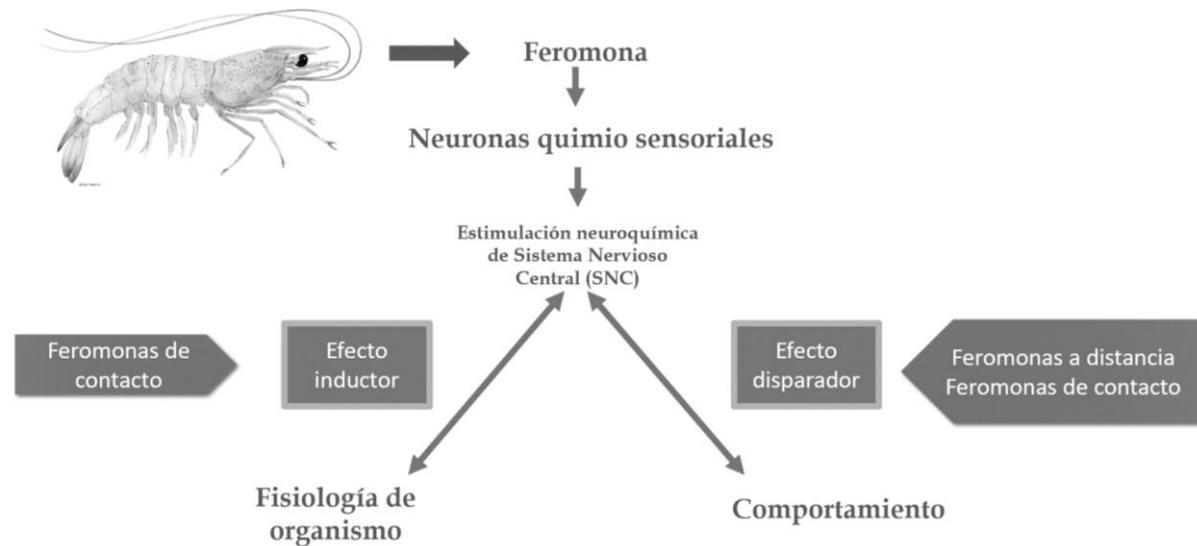


Figura 4. Esquema del funcionamiento hipotético de las feromonas sexuales en crustáceos decápodos (Imagen modificada de Wyatt, 2003).

Posteriormente, Kamio *et al.* (2014) lograron identificar feromonas sexuales en la orina del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*), estableciéndose la premisa de que la orina era el medio de los crustáceos para liberar las feromonas sexuales de distancia; y que por lo tanto, este tipo de feromonas podían ser extraídas tanto del agua condicionada por los organismos, como de la orina de los mismos. Después, Okamura *et al.* (2017) se dieron a la tarea de desarrollar un bioensayo pre-cópula para la caracterización química de estas moléculas, usando como modelo al cangrejo ermitaño (*Pagurus Filholi*); los resultados obtenidos por estos autores sustentan la existencia de feromonas sexuales en la orina de crustáceos, además establecen evidencia de que estas moléculas son muy estables en el medio acuático

Con estos avances se ha establecido que las feromonas en crustáceos son especie-específicas, y por tanto es necesario un correcto protocolo para los bioensayos de identificación. Con respecto a este punto, Dunham (1988) estableció una serie de condiciones requeridas para el correcto desarrollo de bioensayos de comportamiento para la detección de feromonas sexuales femeninas en crustáceos. Estos incluyen: 1) la limitación de la influencia de otros modos de señalización (sonora y visual), 2) la utilización de controles negativos, 3) el uso de ensayos "a ciegas" en los que el observador no es consciente de la naturaleza de las sustancias bajo investigación y 4) la visualización de un comportamiento claro. Bamber y Naylor (1996) establecieron también la necesidad de emplear machos sexualmente maduros y receptivos a las feromonas de hembras.

A pesar de estos estudios, la investigación respecto a la comunicación química en crustáceos ha tenido poca atención en los usos potenciales en acuicultura, solo abarcando intentos preliminares de incorporación de feromonas como atrayentes en el alimento o su uso para facilitar la captura de reproductores silvestres (Barkari *et al.*, 2011; Montemayor, 1995). Sin embargo, estas investigaciones tienen el potencial de solventar diversos problemas actuales en la reproducción en cautiverio de estos organismos, ya sea sustituyendo técnicas realizadas en la actualidad o complementándolas para aumentar su eficiencia. No obstante, para llegar al punto en que las feromonas y otros mensajeros químicos externos que modifican el comportamiento y la fisiología sean utilizados en la industria acuícola, es necesario identificar estas moléculas, con el fin de sintetizarlas artificialmente y poder establecer nuevas tecnologías aplicables a escala comercial.

1.1.7 Feromonas en *Litopenaeus vannamei*

En *L. vannamei* aún no se ha realizado la identificación de feromonas sexuales, no obstante, Alfaro *et al.* (2004) sugirieron la inducción de la maduración ovárica por feromonas en *L. vannamei*. Los autores señalan que la maduración ovárica no solo se activó al inyectar serotonina con espiperona en las hembras de esta especie, sino que también hubo maduración espontánea en el grupo control, atribuyéndolo a la presencia de metabolitos en el agua.

La existencia de feromonas sexuales en *L. vannamei* también se ha hipotetizado por el comportamiento reproductivo de esta especie. Misamore y Browdy (1996) dividieron este comportamiento en cuatro etapas: persecución, sondeo, sujeción y flexión (**Figura 4**). Durante la etapa de persecución, el macho se acerca a la hembra para empujarla y empezar el cortejo al nadar tras de ella. Una vez que la hembra es alcanzada inicia la etapa de sondeo, donde el macho se coloca en posición ventral a ella, y con el primer par de antenas (anténulas) palpa la región ventral, principalmente la zona del télico. Cuando las anténulas captan la señal de reconocimiento, el macho inicia el comportamiento de sujeción y finalmente se flexiona en un ángulo de 20° a 90° con respecto a la hembra para depositar el espermatóforo sobre el télico. El comportamiento de sujeción puede presentarse más de una vez en una misma pareja. Estos autores atribuyeron las etapas de persecución y sujeción a la acción de feromonas sexuales.

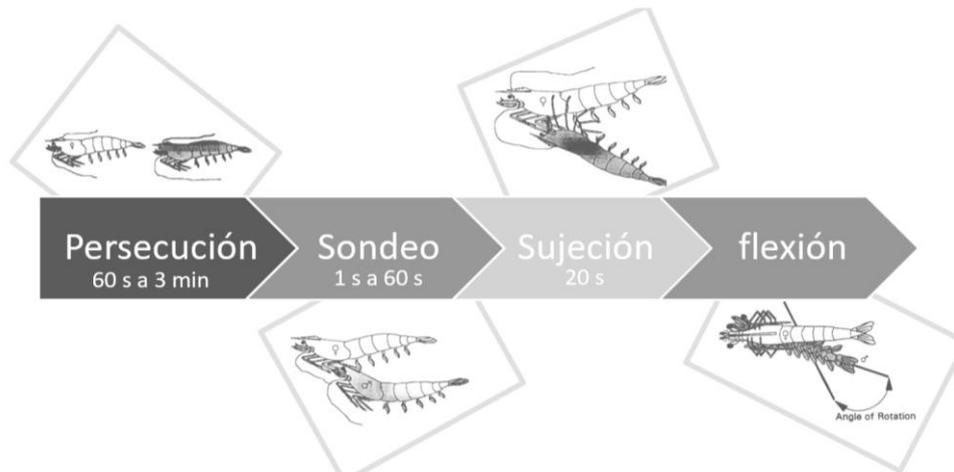


Figura 5. Comportamiento reproductivo de *Litopenaeus vannamei* (imagen modificada de Misamore y Browdy, 1996).

Yano *et al.* (1988) también hipotetizaron que el comportamiento de persecución y sujeción eran desencadenados por la acción de feromonas. Estos autores plantearon que el comportamiento de persecución era desencadenado por una feromona de distancia a la que denominaron feromona estimulante de la persecución (CSP, por sus siglas en inglés), mientras que el comportamiento de sujeción era promovido por una feromona de contacto que era captada por las antenas de los machos, a la cual denominaron feromona estimulante del emparejamiento (MSP, por sus siglas en inglés). Además, estos mismos autores establecieron que la etapa de emparejamiento y transferencia del espermatóforo podrían tener un rol fundamental en la maduración final del ovocito.

En definitiva, los estudios sobre estas moléculas en crustáceos son recientes, y en el caso de *L. vannamei* escasos, por lo que hace falta que se abarque una gran cantidad de puntos para su aplicación práctica en la industria acuícola; sin embargo, la identificación es un buen punto de inicio. En el caso específico de las MSP, al estar relacionadas principalmente con el emparejamiento, su identificación podría dar lugar a un mejor entendimiento de este proceso. Adicionalmente, un mayor conocimiento de las MSP tendría una aplicación práctica en la industria, ya que su uso podría incrementar la tasa de copulación de los organismos reproductores, aumentando así la eficiencia de reproducción en cautiverio. Por otro lado, no se puede descartar que esta feromona pudiera tener algún papel en el proceso de la maduración sexual que le permita sustituir o complementar a la ablación del pedúnculo ocular.

1.2 Justificación

El camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei*, es el principal crustáceo cultivado en el mundo, y la especie acuícola más importante por valor económico en México. Por lo que es necesario que se sigan realizando investigaciones relacionadas con la reproducción de este organismo, con las cuales se pueda optimizar el cultivo y así satisfacer la demanda de postlarvas de mejor calidad a escala comercial.

Dentro de las líneas de investigación relacionadas con la reproducción de esta especie, la identificación de feromonas sexuales es una de las que tiene mayor potencial práctico en la industria acuícola. No obstante, la investigación sobre feromonas en crustáceos es escasa, y a pesar de que en *L. vannamei* se hipotetiza la existencia de dos tipos de feromonas sexuales femeninas (distancia y contacto), a la fecha estas no han sido identificadas y no existe un protocolo de bioensayo para su identificación. Por tanto, para establecer las bases para futuras investigaciones que permitan que las feromonas de contacto puedan ser utilizadas para optimizar la reproducción en cautiverio de *L. vannamei*, es necesario estandarizar un protocolo de bioensayo para su identificación, además de demostrar los efectos que tienen sobre el comportamiento reproductivo de los machos.

El nivel de aplicación que pudieran tener estas moléculas sobre la reproducción de *L. vannamei* dependerá del efecto que se les demuestre: disparador o inductor. De los resultados de este estudio, la potencial aplicación más próxima sería el uso de feromonas de contacto para mejorar las tasas de copulación, incrementando la eficiencia de producción de postlarvas, pues se podría potencializar la acción de los machos y la aceptación de las hembras. Sin embargo, a largo plazo las feromonas podrían ser una alternativa no invasiva para suplementar o sustituir la técnica de ablación de pedúnculo ocular.

1.3 Hipótesis

- Las condiciones experimentales influyen en el efecto que tienen los extractos de potenciales feromonas sexuales femeninas de contacto de *Litopenaeus vannamei* sobre el comportamiento reproductivo de organismos del sexo opuesto.
- La cutícula de las hembras maduras de *Litopenaeus vannamei* contiene compuestos liposolubles que inducen un comportamiento de sujeción en el sexo opuesto.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Establecer y validar un protocolo de bioensayo para la detección de potenciales feromonas sexuales femeninas de contacto en *Litopenaeus vannamei* mediante la demostración de que los compuestos cuticulares liposolubles de hembras maduras tienen un efecto sobre el comportamiento reproductivo de los machos de la misma especie.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones experimentales de aclimatación y de bioensayo para la identificación de potenciales feromonas de contacto en *Litopenaeus vannamei*.
- Evaluar el comportamiento de los machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos al extracto de cutícula de hembras maduras y hembras inmaduras.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención y mantenimiento de los organismos

2.1.1 Hembras adultas para obtención de extractos

Inicialmente, postlarvas de una línea genética de rápido crecimiento producidas por inducción gonadal natural (sin ablación) fueron obtenidas de un laboratorio comercial (Maricultura Vigas, Campeche, México) y mantenidas en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) hasta alcanzar la fase adulta. De estos organismos, 36 hembras fueron transportadas a las instalaciones del CICESE vía terrestre en un tanque de 1,000 l suministrado de oxígeno mediante un tanque equipado con una válvula de presión; durante todo el recorrido se mantuvo un monitoreo constante del oxígeno disuelto y la temperatura, manteniendo ambos parámetros con un mínimo de 3 mg/l O₂ y a 26 °C, respectivamente.

Dentro de las instalaciones del CICESE, los organismos fueron aclimatados en un tanque de 500 l mediante el bombeo continuo de agua proveniente del sistema receptor, hasta alcanzar los 28° C. Una vez aclimatados, los organismos fueron transferidos a un tanque de 2,000 l dentro de un invernadero para su mantenimiento. El tanque de mantenimiento se encontraba conectado a un sistema de recirculación acuícola para mantener la calidad de agua, y estaba equipado con dos controladores de temperatura de 1,000 W y dos piedras aireadoras. Además, diariamente se retiraba la materia orgánica acumulada en el tanque mediante sifoneo y se realizaba un recambio de agua del 20 %.

En los tanques de mantenimiento se realizó la transición del alimento seco peletizado al alimento semi-húmedo BREED-S FRESH de la marca INVE®, este proceso duró 12 días. Una vez terminada la transición, se empezó a suministrar el 25% de la biomasa de una dieta de alta calidad para reproductores basada en dos raciones de 19% de poliquetos (08:00 y 16:30 h), dos raciones de 30% de calamar fresco (13:00 y 21:00 h), y 2% de alimento semihúmedo BREED-S FRESH de la marca INVE®, este último suministrado mediante un alimentador automático de 12 h. Esta alimentación se mantuvo hasta que al menos 10 hembras alcanzaron el estadio IV de desarrollo gonadal (madurez completa), estadio en el cual los ovocitos presentan los bastones corticales completos, es decir son ovocitos maduros. El estadio de desarrollo gonadal se determinó mediante la observación directa del tamaño y pigmentación de la gónada en el organismo a contraluz (**Figura 6**). Cabe destacar que la maduración de las hembras sucedió de manera espontánea, es decir sin ablación de pedúnculo ocular.



Figura 6. Hembra en estadio IV de desarrollo gonadal. Los lóbulos ováricos presentan una fuerte pigmentación naranja, ocupan la totalidad del largo del dorso de la hembra con un grosor prominente y se les distingue una constricción en el primer segmento abdominal.

Durante todo el periodo de mantenimiento hasta la madurez, los organismos se mantuvieron a 28° C, 35 ppt y con un rango de oxígeno disuelto (OD) de 3-6 mg/l. Para corroborar estos parámetros se realizó un monitoreo diario de OD, temperatura y salinidad, mientras que los desechos nitrogenados (Nitrógeno Amoniacal Total, Nitritos y Nitratos) se midieron cada tercer día para confirmar que no se encontraban por encima de los límites establecidos para la especie.

2.1.2 Machos adultos para realización de bioensayos

Un total de 10,000 postlarvas fueron obtenidas también del laboratorio comercial Maricultura Vigas. Estos organismos fueron transportados en una bolsa de lona transparente vía aérea y terrestre a las instalaciones del CICESE. Una vez en las instalaciones del CICESE, los organismos fueron depositados en un tanque de 540 l para la aclimatación, la cual consistió en bombear agua del sistema receptor, incrementando la temperatura 2° C cada 10 min hasta alcanzar los 28° C. Una vez alcanzados los 28° C, al tanque se le colocó un controlador de temperatura de 1,000 W y una piedra difusora, y se cerró

la entrada de agua al sistema para iniciar el mantenimiento de los organismos sin recambio ni tratamiento de agua.

Los animales fueron mantenidos en este tanque durante dos semanas, que fue cuando se estimó que alcanzaron un peso promedio de 0.05 g. Durante este periodo, los organismos fueron alimentados a saciedad aparente con alimento comercial de la marca Zeigler® en presentación de migaja (40% de proteína). Transcurrido este tiempo, se realizó el conteo de los organismos sobrevivientes, y se llevó a cabo la transferencia de estos a un tanque de 2,000 l equipado con controlador de temperatura (1,000 W) y piedras difusoras; este tanque se mantuvo conectado a un sistema de recirculación para mantener la calidad de agua. También se cambió la dieta de los animales por un alimento comercial de la marca Zeigler® en presentación de micro pellet (40% de proteína), ajustándose la ración diaria de acuerdo con la ganancia de peso determinada en biometrías semanales y de acuerdo con el factor de conversión alimenticia (FCA).

Cuando los organismos alcanzaron un peso promedio de 3 g, fueron divididos en 2 tanques de 2,000 l con las mismas condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. A partir de esta etapa, se cambió nuevamente la dieta, ahora por alimento comercial de la marca Zeigler® en presentación de mini pellet (35% de proteína), el cual fue administrado de acuerdo con la ganancia de peso y el FCA. Se continuó con las biometrías semanales, y una vez que los organismos alcanzaron un peso promedio de 12 g, se procedió a realizar el sexado de los mismos por medio de la determinación de la presencia o ausencia del petasma (**Figura 7**).

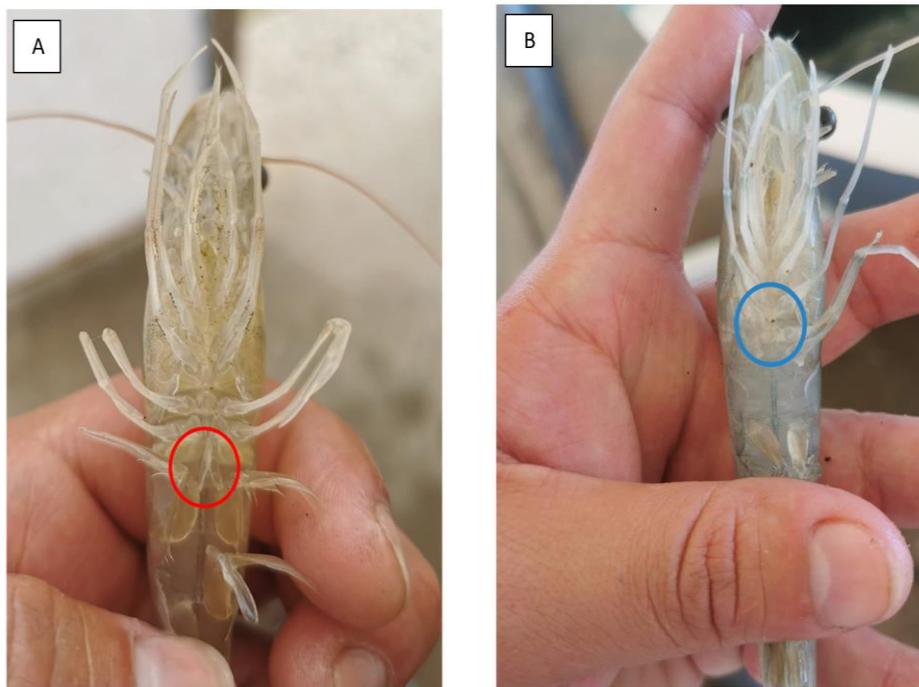


Figura 7. Identificación sexual en *Litopenaeus vannamei*. A: Macho con presencia de petasma en el primer par de pleópodos. B: Hembras con ausencia de petasma y presencia de téllico entre el cuarto y quinto par de pereiópodos.

De los machos identificados, 300 individuos fueron seleccionados y separados aleatoriamente, con el objetivo de optimizar su crecimiento mediante la disminución de densidad y el cambio de dieta. Para esto, los organismos seleccionados fueron transferidos a dos tanques de 2,000 l con las condiciones de cultivo ya descritas, además, se les cambio la dieta a una combinación de alimento semi-húmedo BREED-S FRESH de la marca INVE® y calamar fresco. Se alimentó con el 5% de la biomasa total de alimento semi-húmedo y el 20 % de la biomasa total de calamar fresco; el alimento semi-húmedo fue suministrado mediante un alimentador automático de 12 h, mientras que el calamar fresco se suministró en tres porciones (9:00, 13:00 y 16:00 h). Los organismos fueron mantenidos en estas condiciones hasta alcanzar un promedio de peso de 28 g, que fue cuando alcanzaron la maduración sexual, la cual se determinó mediante la presencia de un espermátforo completo e íntegro.

Durante todo el periodo de mantenimiento, se realizó el monitoreo diario de OD, temperatura y salinidad, manteniéndose a 3-6 mg/l, 28° C y 35 ppt, respectivamente, mientras que los desechos nitrogenados (Nitrógeno Amoniacal Total, Nitratos y Nitritos) se midieron cada tercer día para confirmar que no se encontraban por encima de los límites establecidos para la especie.

2.2 Extracción de compuestos cuticulares liposolubles

Con el fin de tener mayor probabilidad de extraer las feromonas potencialmente presentes en las hembras maduras, las hembras fueron monitoreadas diariamente para determinar el estado de maduración gonadal. Una vez que las hembras alcanzaban el estadio IV de madurez gonadal, eran extraídas del sistema entre las 12:00 y 19:00 h del día, que es cuando se presentan las condiciones de luz donde la literatura reporta actividad de cortejo y emparejamiento en esta especie (Isao Yano, 1987). Posteriormente eran sacrificadas mediante choque térmico al ser transferidas a un recipiente con agua proveniente del mismo sistema, pero con una temperatura de 4° C.

Para obtener el extracto de cutícula se siguió la metodología de Zhang *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Primero se maceraron por separado los componentes estructurales de la región abdominal y dorsolateral del exoesqueleto, para la posterior sumersión de cada uno en 5 ml de hexano grado HPLC por 30 s. Una vez transcurrido este tiempo, con el objetivo de retirar los restos de exoesqueleto, cada extracto (abdominal y dorsolateral) fue pasado por un tamiz con luz de malla de 0.5 mm, y posteriormente fue recolectado en frascos ámbar de 60 ml para su almacenamiento a una temperatura de -20° C. Este procedimiento se repitió hasta completar la extracción en 10 hembras maduras, es decir, hasta contar con 50 ml de cada extracto (ventral y dorsolateral).

Con el objetivo de evaluar el efecto de los compuestos cuticulares liposolubles de hembras inmaduras sobre el comportamiento reproductivo de los machos, se procedió a recolectar los extractos de las primeras utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente. Para tener certeza de que las hembras inmaduras a muestrear se encontraban en el estadio I de maduración gonadal, el muestreo se realizó una vez que las hembras habían desovado y terminaban el proceso de reabsorción gonadal. Al final se obtuvieron cuatro diferentes extractos: (1) exoesqueleto ventral de hembra madura (EVHM), (2) exoesqueleto dorsolateral de hembra madura (EDHM), (3) exoesqueleto ventral de hembra inmadura (EVHI) y (4) exoesqueleto dorsolateral de hembra inmadura (EDHI).

2.3 Estandarización del protocolo para bioensayos

Para determinar el protocolo de bioensayo para la detección de feromonas sexuales de contacto en *L. vannamei*, se procedió a realizar una serie de experimentos donde cada nuevo experimento utilizó la condición elegida en el experimento anterior. Las condiciones por determinar fueron las siguientes: 1) exposición de luz durante aclimatación, 2) duración de aclimatación, 3) material para “hembras artificiales”, 4) método para introducir “hembra artificial” al tanque y 5) duración del periodo de observación del bioensayo.

Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema de recirculación acuícola con agua de mar filtrada (35 ppt), conformado por diez tanques de fibra de vidrio con una capacidad de 150 l, todos conectados a un filtro Bubble Bead® y a un tanque reservorio de 100 l. En el tanque reservorio se colocaron 4 controladores de temperatura de 300 W, con el objetivo de mantener una temperatura constante de 28° C.

Se realizaron un total de cinco experimentos preliminares, cada uno con 2 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento; efectuándose todos dentro del fotoperiodo natural en un horario entre las 18:00 y 20:00 h, ya que, de acuerdo con Yano *et al.* (1988), el emparejamiento de *L. vannamei* es mayor entre una hora antes y una hora después de la puesta de sol.

2.3.1 Exposición de luz durante aclimatación

Para determinar las condiciones de luz adecuadas durante la aclimatación, se evaluaron dos tratamientos: aclimatación con luz y aclimatación sin luz. Para esto, se utilizaron camarones machos

en etapa reproductiva, los cuales fueron distribuidos de manera individual y aleatoria en seis tanques. En el caso del tratamiento sin luz, tres tanques seleccionados aleatoriamente fueron cubiertos en su totalidad con una lona de plástico negro, mientras que, en el tratamiento con luz, los tres tanques restantes se mantuvieron descubiertos. Los organismos fueron mantenidos en esas condiciones durante 1 h y, transcurrido este tiempo, se retiraron las cubiertas del tratamiento con luz. Finalmente, se observó la actividad de los organismos dentro del tanque por 1 h, determinándose si tenían actividad (movimiento progresivo lineal o no lineal) o no (movimiento no progresivo).

2.3.2 Duración de aclimatación

En este experimento se evaluaron dos tiempos de aclimatación: 20 min y 1 h, los cuales fueron escogidos con base en los protocolos de Caskey y Bauer (2005), Hardege *et al.* (2011) y Kamio *et al.* (2014). Para lo cual, se utilizaron camarones machos en etapa reproductiva, distribuidos de manera individual y aleatoria en seis tanques. Para ambos tratamientos, los tanques fueron cubiertos en su totalidad con una lona de plástico negra. Transcurridos 20 min, tres tanques seleccionados aleatoriamente fueron descubiertos. Posteriormente, transcurrida 1 h, los tres tanques restantes fueron descubiertos. Inmediatamente tras ser descubiertos, el comportamiento de los organismos de todos los tanques fue observado por un lapso de 1 h, determinándose si tenían actividad (movimiento progresivo lineal o no lineal) o no (movimiento no progresivo).

2.3.3 Material para “hembras artificiales”

Se evaluaron 2 diferentes materiales para ser utilizados como “hembras artificiales” durante los bioensayos. El primero consistió en tubos rígidos de Policloruro de vinilo (PVC) de ½ in con una longitud de 9 cm y un peso de 19.39 ± 1.02 g, mientras que el segundo fue una manguera flexible transparente de PVC de ¼ in con una longitud de 9 cm y un peso de 4.39 ± 0.11 g. Se utilizaron camarones machos en etapa reproductiva, distribuidos de manera individual y aleatoria en seis tanques. En ambos tratamientos, la aclimatación consistió en mantener a los organismos por 1 h con los tanques cubiertos en su totalidad con una lona de plástico negra. Una vez terminada la aclimatación, los tanques fueron descubiertos y se colocaron lentamente dos “hembras artificiales” de PVC en tres tanques seleccionados aleatoriamente y dos “hembras artificiales” de manguera flexible transparente en los tres tanques restantes. Finalmente, se observó el comportamiento de los organismos en todos los

tanques durante 1 h para determinar si los camarones tenían contacto o no con las “hembras artificiales”.

2.3.4 Método para introducir “hembra artificial” al tanque

Se utilizaron camarones machos en etapa reproductiva, distribuidos de manera individual y aleatoria en seis tanques, siguiéndose el mismo método de aclimatación descrito en el experimento preliminar anterior. Una vez terminada la aclimatación, se procedió a introducir dos “hembras artificiales” (tubos de PVC de ½ in con una longitud de 9 cm y un peso de 19.39 ± 1.02 g) por tanque, mediante dos diferentes métodos: 1) introducción con el tanque cubierto y 2) introducción con el tanque descubierto. Cada uno de los métodos se aplicó en tres tanques seleccionados aleatoriamente. Una vez que las hembras artificiales fueron colocadas lentamente, se procedió a descubrir los tanques del primer tratamiento. Inmediatamente después, se procedió a evaluar la actividad de los organismos en ambos tratamientos. En el caso de que se presentara movimiento progresivo lineal o no lineal, se consideró que el organismo tenía actividad dentro del tanque, de lo contrario (movimiento no progresivo), se consideró que no tuvo actividad.

2.3.5 Duración del periodo de observación del bioensayo

Por último, para determinar la duración necesaria para los bioensayos, se procedió a realizar un experimento con las condiciones seleccionadas en los experimentos preliminares anteriores, pero con dos tratamientos para las “hembras artificiales”: hexano (control) y EVHM; a fin de recrear las condiciones de los bioensayos formales. Cada uno de los tratamientos fue utilizado en tres tanques seleccionados aleatoriamente. Primero se colocaron camarones machos en etapa reproductiva de manera individual y aleatoria en los tanques. Ya en los tanques, los organismos fueron aclimatados con el tanque cubierto durante 1 h, y transcurrido este tiempo se les introdujeron dos “hembras artificiales” (tubos de PVC de ½ in con una longitud de 9 cm y un peso de 19.39 ± 1.02) previamente preparadas con el tratamiento correspondiente. Posteriormente, se procedió a descubrir todos los tanques para finalmente determinar el intervalo de tiempo de bioensayo en el cual los camarones habían tenido al menos un contacto y mantenían un movimiento constante dentro del tanque. Adicionalmente, se observó el comportamiento general que presentaban los organismos frente a las “hembras artificiales” tratadas.

2.4 Diseño experimental para evaluación del efecto de compuestos cuticulares de hembras sobre el comportamiento de machos

Previo a los bioensayos, se procedió a remover completamente el solvente de cada extracto mediante evaporación rotatoria, y posteriormente se disolvió el residuo en 20 ml de hexano.

Para la realización de los bioensayos se utilizó el sistema de cultivo descrito anteriormente para los experimentos preliminares, así como las condiciones de calidad de agua, horario y fotoperiodo ya mencionadas. Con base en los resultados obtenidos de los experimentos preliminares se decidió mantener a los organismos en un periodo de acondicionamiento de 1 h con el tanque cubierto, donde los camarones macho fueron colocados de manera individual y aleatoria. Una vez terminado el periodo de acondicionamiento, se colocó dos tubos rígidos de PVC de ½ in y 9 cm de longitud a cada tanque, a fin de ser utilizados como “hembras artificiales”. La preparación de los tubos consistió en la inmersión de estos durante 1 s en el tratamiento correspondiente, con el posterior secado del tubo durante 15 s a temperatura ambiente (Zhang *et al.*, 2011).

Así mismo, con base en los resultados de los experimentos preliminares se determinó que el periodo de experimentación de los bioensayos fuera de 20 min, donde se observó y grabó (para una posterior revisión) el comportamiento de los camarones frente a las “hembras artificiales”. Para evitar habituación, ningún individuo fue utilizado más de una vez. Además, los bioensayos fueron realizados a ciegas, es decir, sin que el observador tuviera conocimiento de la asignación de tratamientos en los tanques experimentales, esto con el fin de reducir el sesgo del observador.

Dado el alcance de la cámara utilizada y del número de tanques con el que contaba el sistema, cada bioensayo se llevó a cabo en ocho días, en grupos de dos réplicas por tratamiento por día.

2.4.1 Bioensayo I: Efecto de extractos de hembras inmaduras en el comportamiento de camarones machos

Para evaluar el efecto de los extractos de hembras inmaduras en el comportamiento de los camarones macho, se realizó un bioensayo en el que se utilizaron 15 réplicas para cada uno de los siguientes tratamientos: experimental con EVHI, experimental con EDHI y tratamiento control con hexano (CTL). Para cada comportamiento presentado se establecieron las categorías: presentó comportamiento o no presentó comportamiento. En caso de que algún comportamiento se presentara más de una vez, en una o más réplicas, se estableció el número de veces que se presentaba dicho comportamiento.

Además, para evaluar la bioactividad total presentada ante cada tratamiento, se generó una escala de acuerdo con la intensidad de los comportamientos presentados en este experimento (**Tabla 2**).

Tabla 2. Escala de las respuestas conductuales de *Litopenaeus vannamei* macho tras la exposición a extractos cuticulares de hembras inmaduras.

Grado	Respuesta
0	Sin respuesta: No se observó ningún cambio en el comportamiento.
1	Contacto: El macho tuvo al menos un contacto con la “hembra artificial” e inició una examinación con las anténulas.
2	Empuje: Después de tener contacto el macho tomó impulso para empujar a la “hembra artificial”.
3	Contacto prolongado: Las anténulas del macho mantuvieron contacto constante con la “hembra artificial” por al menos 10 s.

2.4.2 Bioensayo II: Efecto de extractos de hembras maduras en el comportamiento de camarones macho

El efecto que tienen los extractos de hembras maduras sobre el comportamiento de los camarones macho se evaluó mediante un bioensayo en el que se utilizaron 15 réplicas para cada uno de los siguientes tratamientos: experimental con EVHM, experimental EDHM y tratamiento control con hexano (CTL). De la misma manera que en el bioensayo previo, para cada comportamiento presentado se establecieron las categorías: presentó comportamiento o no presentó comportamiento. En caso de que algún comportamiento se presentara más de una vez, en una o más réplicas, se estableció el número de veces que se presentaba dicho comportamiento. Además, para evaluar la bioactividad total presentada ante cada tratamiento, se utilizó nuevamente la escala generada para el bioensayo anterior (**Tabla 2**).

2.6 Análisis estadístico

En el caso de los experimentos preliminares para el establecimiento del protocolo para los bioensayos, la relación de la actividad de los camarones respecto a las diferentes condiciones probadas se evaluó mediante el análisis de tablas de contingencia (2 x 2) con la prueba exacta de Barnard. Cuando el resultado del análisis determinó que las variables eran dependientes ($p < 0.05$), se procedió a evaluar

el grado de asociación de estas mediante el cálculo del Coeficiente V de Cramer. Para la interpretación de este coeficiente se utilizó la escala establecida por Lee (2016) (**Anexo A**).

Para determinar la relación entre la presentación de cada comportamiento respecto a los diferentes tratamientos de los bioensayos, se realizó un análisis de tablas de contingencia (3×2) con la prueba χ^2 de independencia. En el caso de que las variables fueran dependientes ($p < 0.05$), se calculó el coeficiente V de Cramer, se estudiaron los valores residuales de Pearson para establecer entre qué tratamientos había diferencias, y se dividió la tabla en tablas 2×2 para tener un estudio más exacto de estas diferencias. Las tablas 2×2 se analizaron mediante la prueba exacta de Barnard, y se les evaluó el grado de asociación entre variables mediante el cálculo del Coeficiente V de Cramer.

En el caso de los comportamientos que se presentaron más de una vez por réplica, el número de veces que se presentó cada comportamiento se analizó con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y en caso de haber diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$), se realizó la prueba *a posteriori* de Tukey's HSD. Para todas las variables se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas Shapiro-Wilk y Barlett, respectivamente. Cuando no se cumplieron los supuestos anteriores, se procedió a realizar la prueba de Kruskal-Wallis, con una prueba *a posteriori* de comparación múltiple de rango de medias si se encontraban diferencias entre tratamientos. En el caso de la bioactividad total, esta se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con una prueba de suma de rangos por pares de Wilcoxon en el caso de encontrar diferencias entre tratamientos. Todas las pruebas se llevaron a cabo con una confiabilidad del 95% utilizando el software "R" versión 4.1.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Estandarización del protocolo para bioensayos

3.1.1 Exposición de luz durante aclimatación

Cuando los camarones macho fueron aclimatados con el tanque cubierto para evitar la entrada de luz, todas las réplicas mostraron movimiento progresivo (Activo), a diferencia de cuando fueron aclimatados con presencia de luz, donde ninguna de las réplicas presentó movimiento progresivo, solo rotación sobre su propio eje (Sin actividad) (**Figura 8A**). De acuerdo con la prueba de independencia realizada, existe una influencia significativa de las condiciones de luz durante la aclimatación sobre la actividad de machos de *L. vannamei* en el periodo de bioensayo ($p = 0.03$). El coeficiente V de Cramer de 1 permitió establecer que la influencia es muy fuerte.

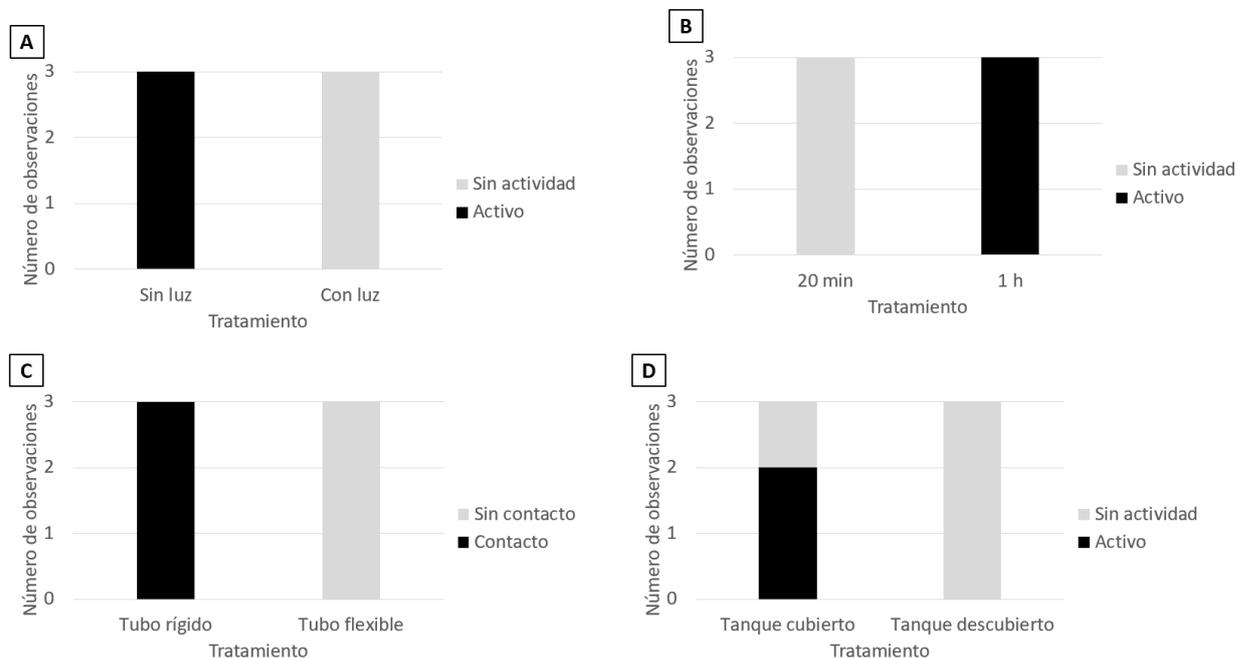


Figura 8. Actividad de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a diferentes condiciones experimentales ($n = 3$ réplicas/tratamiento). A) Exposición de luz durante la aclimatación, B) Duración de la aclimatación, C) Material para “hembras artificiales”, D) Método para introducir “hembra artificial” al tanque.

3.1.2 Duración de aclimatación

En cuanto a la duración de la aclimatación, todas las réplicas de los camarones aclimatados por 1 h mostraron movimiento progresivo (Activo), al contrario de los camarones aclimatados por 20 min,

donde ninguna de las réplicas presentó movimiento progresivo (Sin actividad) (**Figura 8B**). Acorde con la prueba de independencia realizada, existe influencia significativa del tiempo de aclimatación sobre la actividad de machos de *L. vannamei* en el periodo de bioensayo ($p = 0.03$). El coeficiente V de Cramer de 1 indicó que la influencia es muy fuerte.

3.1.3 Material para “hembras artificiales”

Con respecto al material a utilizar como “hembras artificiales”, el tubo rígido de PVC mostró ser la mejor alternativa, ya que todos los camarones mostraron al menos un contacto cuando se usó este material, a diferencia de las réplicas donde se utilizó la manguera flexible, donde ningún camarón presentó contacto (**Figura 8C**). De acuerdo con la prueba de independencia realizada, existe relación significativa entre el material de la “hembra artificial” y el contacto que tienen los machos de *L. vannamei* con esta ($p = 0.03$). El coeficiente V de Cramer de 1 mostró que la relación es muy fuerte.

3.1.4 Método para introducir “hembra artificial” al tanque

Con respecto al método para introducir las “hembras artificiales” a los tanques, en la introducción con el tanque cubierto, dos de las tres réplicas mostraron movimiento progresivo (Activo), a diferencia de cuando la introducción se realizó con el tanque descubierto, donde ninguna de las réplicas presentó movimiento progresivo (Sin actividad) (**Figura 8D**). De acuerdo con la prueba de independencia realizada, el método de introducción de la “hembra artificial” no tuvo una influencia significativa sobre la actividad de machos de *L. vannamei*, en el periodo de bioensayo ($p = 0.15$).

3.1.5 Duración del periodo de observación del bioensayo

Bajo las condiciones elegidas para los bioensayos de validación del protocolo, se determinó que, una vez terminada la aclimatación e introducidas las “hembras artificiales” en los tanques, los camarones se mantenían activos (movimiento progresivo) hasta por 20 min, además de que en ese periodo todos los camarones macho con el tratamiento EVHM habían tenido al menos un contacto con la “hembra artificial”. Una vez pasados los 20 min, los camarones disminuyeron su actividad gradualmente, y

aproximadamente a los 30 min ninguno presentó actividad. Por tanto, se decidió que la duración de bioensayo sería por un periodo de 20 min.

Adicionalmente se observó el comportamiento de los camarones frente a las “hembras artificiales” tratadas, determinándose la presencia de comportamiento de empuje, pero no del comportamiento de sujeción esperado, razón por la cual se decidió concentrar los extractos para los bioensayos “formales”. Dado el bajo número de réplicas (tres réplicas por tratamiento) y el posible sesgo del observador que conocía de antemano la distribución de los tratamientos, se decidió no realizar ningún tipo de análisis a los resultados de comportamiento obtenidos en este bioensayo.

3.2 Bioensayo I: Efecto de extractos de hembras inmaduras en el comportamiento de camarones macho

Los machos de *L. vannamei* mostraron tres grados de comportamientos diferentes al ser expuestos a los extractos cuticulares de hembras inmaduras: A) contacto, B) empuje y C) contacto prolongado. Cada uno de ellos se evaluó por separado y en conjunto.

3.2.1 Relación entre los tratamientos y cada uno de los comportamientos presentados

Con respecto al comportamiento de contacto, este se presentó en un mayor número de réplicas de los tratamientos EDHI y EVHI (12 y 14 réplicas, respectivamente), en comparación con el control (tres réplicas) (**Figura 9A**). De acuerdo con el resultado de la prueba de independencia, existe una relación significativa entre los tratamientos y el comportamiento de contacto presentado por los machos de *L. vannamei* ($p < 0.001$). El resultado del coeficiente V de Cramer (0.67) estableció que la relación existente es fuerte. Al realizar los análisis de independencia entre pares de tratamientos, se encontró que el comportamiento fue significativamente dependiente del tratamiento cuando se comparó el control con cualquiera de los dos extractos de hembra inmadura ($p < 0.001$ en ambas comparaciones), pero no mostró dependencia significativa cuando se compararon los dos extractos entre sí. Los coeficientes V de Cramer de las comparaciones de cada extracto con el control mostraron que la relación entre tratamiento y comportamiento de contacto fue mayor en el tratamiento con EVHI (0.74), en comparación con el tratamiento EDHI (0.6), aun así, los dos tratamientos tienen una influencia fuerte sobre el comportamiento de contacto. Cabe destacar que, las réplicas del tratamiento control no solo tuvieron una incidencia mínima en el comportamiento de contacto, también fue

bastante notorio que los camarones evitaban el contacto con las “hembras artificiales” después de la aparente percepción con sus antenas.

Con respecto al comportamiento de empuje, este se presentó en un mayor número de réplicas de los tratamientos EDHI y EVHI (cinco y siete, respectivamente), en comparación con el control (una réplica), aunque la frecuencia de presentación de este comportamiento fue menor que la del comportamiento de contacto (**Figura 9B**). Acorde al resultado de la prueba de independencia, existe relación significativa entre los tratamientos y el comportamiento de empuje presentado por los machos de *L. vannamei* ($p = 0.048$), y el resultado del coeficiente V de Cramer (0.37) estableció que la relación existente es moderada. Cuando se realizó el análisis entre pares de tratamientos, se encontró que el comportamiento solo era significativamente dependiente del tratamiento cuando se comparaba el control con el tratamiento EVHI ($p = 0.01$), con un coeficiente V de Cramer de 0.2, lo que indicó una asociación débil.

Finalmente, en lo que se refiere al comportamiento de contacto prolongado, este se presentó en un mayor número de réplicas del tratamiento EVHI (cinco réplicas), en comparación con el tratamiento EDHI (una réplica) y el control (ninguna réplica) (**Figura 9C**).

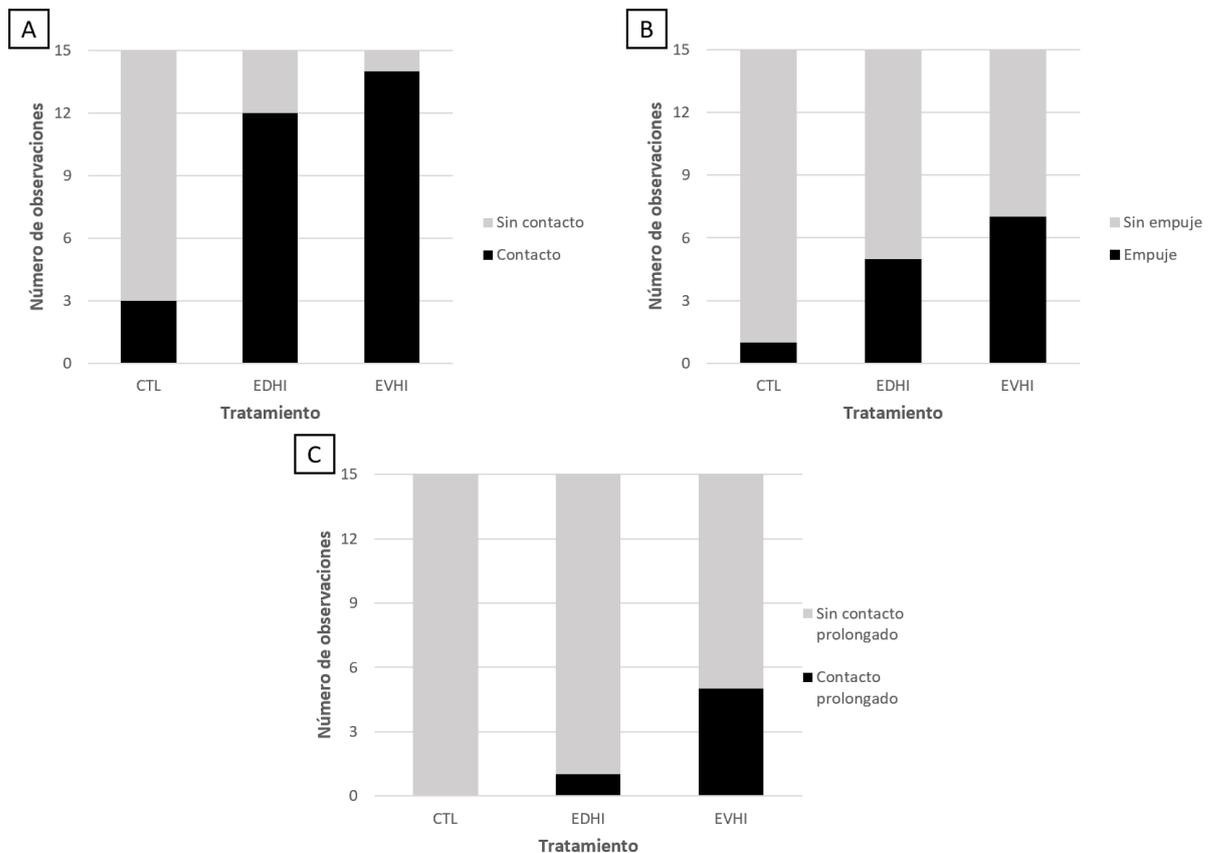


Figura 9. Respuesta conductual de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras inmaduras ($n= 15$ réplicas/tratamiento). A) Contacto, B) Empuje y C) Contacto prolongado. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHI) exoesqueleto dorsolateral de hembra inmadura, (EVHI) exoesqueleto ventral de hembra inmadura.

De acuerdo con el resultado de la prueba de independencia, existe relación significativa entre los tratamientos y el comportamiento de contacto prolongado presentado por los machos de *L. vannamei* ($p = 0.01$). El coeficiente V de Cramer de 0.42, estableció que la relación existente es relativamente fuerte. Al realizar el análisis entre pares de tratamientos, se encontró que, al igual que en el comportamiento de empuje, el comportamiento solo era dependiente del tratamiento cuando se comparaba el control con el tratamiento EVHI ($p = 0.01$). El coeficiente V de Cramer de 0.48 estableció que la relación es relativamente fuerte.

3.2.2 Número de veces que se presentaron los comportamientos reiterados

Dentro de los comportamientos presentados por los machos de *L. vannamei* al ser expuestos a los extractos cuticulares de hembras inmaduras, el comportamiento de contacto y el comportamiento de empuje se presentaron más de una vez en una o más réplicas. En el caso del comportamiento de contacto, los resultados de las pruebas estadísticas indicaron que existen diferencias significativas en el número de veces que se presentó este comportamiento por réplica ($p < 0.001$), encontrándose estas diferencias entre el control y cada uno de los tratamientos, pero no entre tratamientos. A pesar de esto, el tratamiento con EVHI presentó en promedio un mayor número de veces el comportamiento de contacto (2.80 ± 1.90), en comparación con el tratamiento con EDHI (2.07 ± 2.09) (**Tabla 3**). Por otra parte, también se encontraron diferencias significativas en el número de veces que se presentaba el comportamiento de empuje por réplica ($p = 0.04$), siendo el tratamiento con EVHI el que mostró este comportamiento (0.73 ± 0.96) un mayor número de veces (**Tabla 3**).

Tabla 3. Valores promedio \pm desviación estándar del número de veces que se presentaron los comportamientos reiterados de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras inmaduras. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.5$) entre tratamientos: a>b. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHI) exoesqueleto dorsolateral de hembra inmadura; (EVHI) exoesqueleto ventral de hembra inmadura.

Comportamiento	Tratamiento		
	CTL	EDHI	EVHI
Contacto	0.40 ± 0.91^b	2.07 ± 2.09^a	2.80 ± 1.90^a
Empuje	0.07 ± 0.26^b	0.40 ± 0.63^b	0.73 ± 0.96^a

3.2.3 Evaluación de la bioactividad total

En cuanto a la bioactividad total presentada por los machos frente a los extractos de hembras inmaduras, se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con EDHI y EVHI, pero no entre tratamientos ($p < 0.001$). En el caso del control, la mayor proporción de réplicas (80%) presentó el grado 0 en la escala de comportamiento. Por otra parte, en el tratamiento con EDHI la mayor proporción de réplicas (40 %) presentaron el grado 1 en la escala de comportamiento, pero también hubo una proporción importante (33.33 %) que presentó el grado 2. Finalmente, en el tratamiento con EVHI, la mayor proporción de réplicas presentaron grado 2 o 3 en la escala de comportamiento (33.33 % cada uno) (**Figura 10**). Cabe destacar que a pesar de que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos con EDHI y EVHI, el comportamiento grado 3 se presentó en un mayor número de réplicas del tratamiento EVHI.

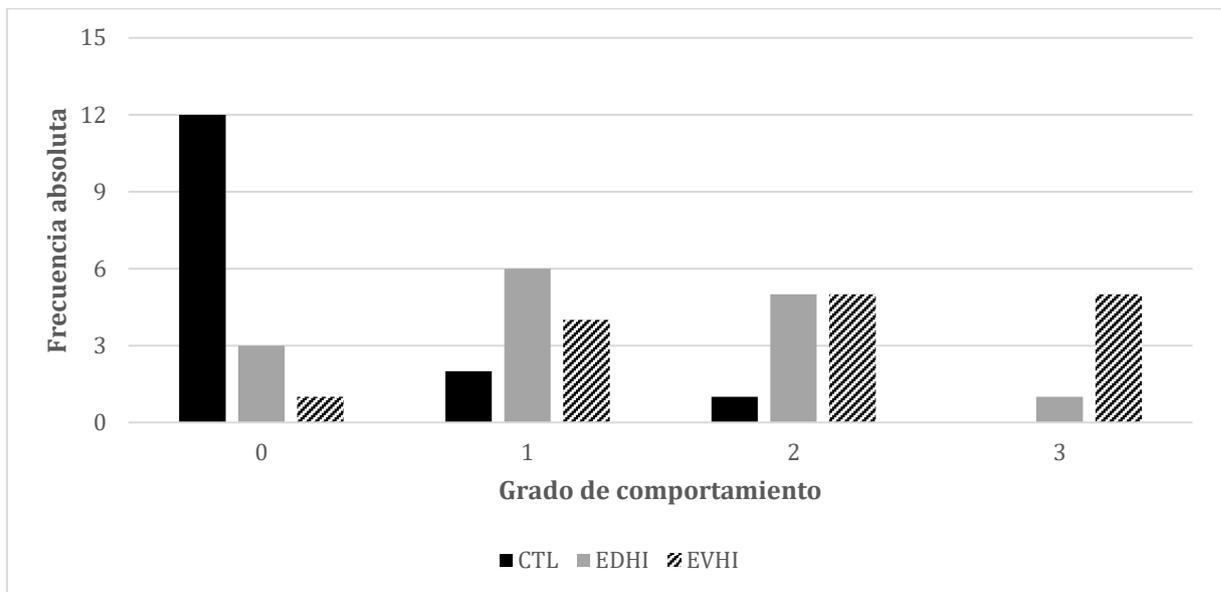


Figura 10. Grado de bioactividad presentada por machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras inmaduras ($n= 15$ réplicas/tratamiento). Grado 0: sin respuesta; grado 1: contacto; grado 2: empuje y grado 3: Contacto prolongado. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHI) exoesqueleto dorsolateral de hembra inmadura; (EVHI) exoesqueleto ventral de hembra inmadura.

3.3 Bioensayo 2: Efecto de extractos de hembras maduras en el comportamiento de camarones macho

Los machos de *L. vannamei* mostraron únicamente dos grados de comportamientos al ser expuestos a los extractos cuticulares de hembras maduras: A) contacto y B) empuje. Cada uno de ellos se evaluó por separado y en conjunto.

3.3.1 Relación entre los tratamientos y cada uno de los comportamientos presentados

Con respecto al comportamiento de contacto, este se presentó en un mayor número de réplicas de los tratamientos EDHM y EVHM (15 y 14 réplicas, respectivamente), en comparación con el control (seis réplicas) (**Figura 11A**). De acuerdo con el resultado de la prueba de independencia, existe relación entre los tratamientos y el comportamiento de contacto presentado por los machos de *L. vannamei* ($p < 0.001$), y con los resultados del coeficiente V de Cramer (0.65), se estableció que la relación existente es fuerte. Cuando se realizaron los análisis de independencia entre pares de tratamientos, se encontró que, al igual que en el caso del bioensayo con extractos de hembras inmaduras, el comportamiento era dependiente del tratamiento cuando se comparaba el control con cualquiera de los dos extractos de hembra inmadura ($p < 0.001$ en tratamiento con EDHM y $p = 0.001$ en tratamiento con EVHM), pero no cuando se compararon los dos extractos entre sí. Los coeficientes V de Cramer de las comparaciones de cada extracto con el control mostraron que la relación entre tratamiento y comportamiento de contacto era fuerte en el tratamiento EDHM (0.66), mientras que esta relación era relativamente fuerte en tratamiento EVHM (0.57). En este bioensayo, también las réplicas control evitaban notoriamente el contacto con las “hembras artificiales” después de la aparente percepción con sus antenas.

Con respecto al comportamiento de empuje, este se presentó en un mayor número de réplicas en el tratamiento EDHM (siete réplicas), en comparación con el tratamiento EVHM (cinco réplicas) y el control (una réplica) (**Figura 11B**).

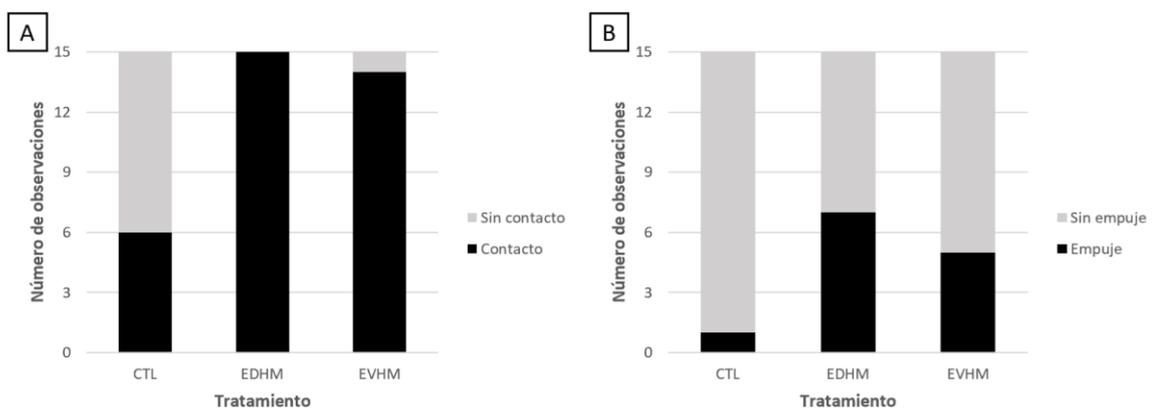


Figura 11. Respuesta conductual de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras maduras ($n= 15$ réplicas/tratamiento). A) Contacto y B) Empuje. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHM) exoesqueleto dorsolateral de hembra madura; (EVHM) exoesqueleto ventral de hembra madura.

Con el resultado de la prueba de independencia se estableció que existe relación significativa ($p = 0.04$) entre los tratamientos y el comportamiento de empuje presentado por los machos de *L. vannamei*, y con un coeficiente V de Cramer de 0.37, la relación existente es moderada. Cuando se realizó el análisis entre pares de tratamientos, se encontró que el comportamiento solo era dependiente del tratamiento cuando se comparaba el control con el tratamiento EDHM ($p = 0.01$), con un coeficiente V de Cramer de 0.45, indicando una asociación relativamente fuerte.

3.3.2 Número de veces que se presentaron los comportamientos reiterados

En cuanto a los comportamientos presentados por los machos de *L. vannamei* al ser expuestos a los extractos cuticulares de hembras maduras, tanto el comportamiento de contacto como el comportamiento de empuje se presentaron más de una vez en una o más réplicas. En el caso del comportamiento de contacto, se encontraron diferencias significativas en el número de veces que se presentó este comportamiento por réplica ($p < 0.001$), encontrándose estas diferencias ente el control y el tratamiento EVHM. Aunque no existieron diferencias significativas entre tratamientos, el tratamiento EVHM presentó en promedio mayor número de veces el comportamiento de contacto (3.60 ± 1.35), en comparación con el tratamiento EDHM (2.67 ± 1.99) (**Tabla 4**). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos con respecto al número de veces que se presentó el comportamiento de empuje (**Tabla 4**).

Tabla 4. Valores promedio \pm desviación estándar del número de veces que se presentaron los comportamientos reiterados de machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras maduras. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos: a>b. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHM) exoesqueleto dorsolateral de hembra madura; (EVHM) exoesqueleto ventral de hembra madura.

Comportamiento	Tratamiento		
	CTL	EDHM	EVHM
Contacto	0.87 ± 1.60^a	2.67 ± 1.99^{ab}	3.60 ± 1.35^b
Empuje	0.67 ± 0.26	0.53 ± 0.64	0.40 ± 0.63

3.3.3 Evaluación de la bioactividad total

Respecto a la bioactividad total presentada por los machos frente a los extractos de hembras maduras, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre el control y los tratamientos EDHM y EVHM, pero no entre EDHM y EVHM. En el control, la mayor proporción de réplicas (60 %) presentó el grado 0 en la escala de comportamiento, en el tratamiento EDHM la mayor proporción de réplicas (53.33 %) presentaron el grado 1 en la escala de comportamiento, y en el tratamiento EVHM, la mayor proporción de réplicas (60 %) presentaron el grado 2 (Figura 12). A pesar de que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos EDHM y EVHM, es de destacar que el tratamiento con EVHM mostró un mayor número de réplicas con comportamiento del grado 2 de la escala de comportamiento, pero el tratamiento con EDHM mostró ligeramente una mayor proporción de réplicas con el grado 3.

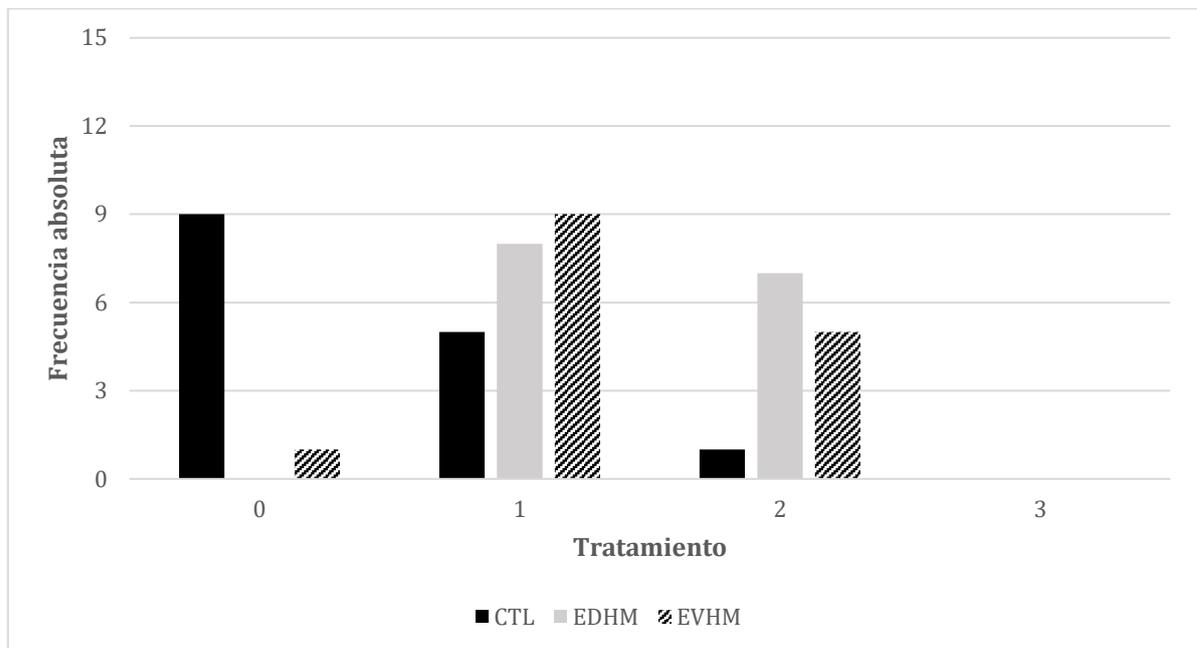


Figura 12. Grado de bioactividad presentada por machos de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a extractos cuticulares de hembras maduras ($n= 15$ réplicas/tratamiento). Grado 0: sin respuesta; grado 1: contacto; grado 2: empuje y grado 3: contacto prolongado. Abreviaturas: (CTL) control; (EDHM) exoesqueleto dorsolateral de hembra madura; (EVHM) exoesqueleto ventral de hembra madura.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Estandarización de protocolo de bioensayo

La evaluación de la respuesta de comportamiento es uno de los principales retos para la identificación de feromonas en crustáceos, razón por la cual diversos autores han señalado la importancia de la estandarización de protocolos de bioensayos desarrollados de acuerdo con el comportamiento natural de cada especie, y al tipo de feromona a identificar (contacto o distancia) (Caskey y Bauer, 2005; Dunham, 1978; Hardege *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011). En este estudio se desarrolló por primera vez un protocolo de bioensayo de comportamiento para la identificación de feromonas sexuales femeninas de contacto en *L. vannamei*, especie de gran importancia económica nacional y mundial (CONAPESCA, 2018; FAO, 2020). De acuerdo con los resultados obtenidos, las siguientes condiciones son necesarias para una clara evidencia del efecto potencial de las feromonas sexuales femeninas de contacto sobre el comportamiento reproductivo de los camarones machos: 1) un período de acondicionamiento de al menos 1 h con el tanque cubierto; 2) la introducción de una “hembra artificial” hecha de tubos rígidos de PVC recubiertos con moléculas liposolubles mientras el tanque aún está cubierto; y 3) un período de observación de al menos 20 min.

En cuanto a las condiciones de luz durante la aclimatación, Hardege *et al.* (2002) son los únicos que han considerado relevante la influencia de este factor sobre el nivel de actividad de los organismos. Estos autores trabajaron con el cangrejo *C. maenas*, y señalan que la disminución de luz durante la etapa de aclimatación produce un estado de inactividad en los organismos, que cesa una vez que el tanque es descubierto, resultando en un mayor nivel de actividad durante el periodo de observación. Esto coincide con los resultados de este estudio, donde se encontró una fuerte influencia de este factor sobre la actividad de los camarones macho. Cuando los tanques eran cubiertos durante la aclimatación, los camarones presentaban mayor incidencia de movimiento progresivo durante el periodo de observación en el bioensayo. Esto es fundamental cuando se trata de identificación de feromonas de contacto, ya que, como su nombre lo dice, estas requieren contacto directo con los órganos sensoriales del organismo para ser captadas, y mientras mayor movimiento progresivo tenga el camarón, mayor probabilidad tendrá de encontrarse con la “hembra artificial” que contenga las feromonas.

Con respecto a la duración de la aclimatación, se han propuesto diferentes tiempos dependiendo la especie. Caskey y Bauer (2005) utilizaron un periodo de aclimatación de 5 min en el camarón *Palaemonetes pugio*, mientras que Hardege *et al.* (2011) utilizaron un intervalo de 10 a 20 min en *C. maenas*, y Peddio *et al.* (2019) un periodo de 15 min en *Procambarus Clarkii*, todos para la identificación de feromonas sexuales femeninas de distancia. Por su parte, los resultados de este

estudio demostraron que los machos de *L. vannamei* tienen mayor actividad general y movimiento progresivo durante el periodo de bioensayo cuando el periodo de aclimatación es de una hora, lo que podría explicarse por el mayor periodo de inactividad que sostiene el organismo al estar en oscuridad por mayor tiempo. Este periodo de aclimatación concuerda con el utilizado por Kamio *et al.* (2014) para la identificación de feromonas sexuales femeninas de distancia en el cangrejo azul (*Callinectes sapidus*). Al igual que con las condiciones de luz, el mayor movimiento progresivo con la aclimatación de una hora aumenta la probabilidad de que los machos tengan contacto con la “hembra artificial”.

Otro aspecto importante por determinar fue el material a utilizar como “hembra artificial”. Con este propósito, en estudios previos se han utilizado piedras y esponjas en la identificación de feromonas de distancia, y tubos de polietileno rígidos en la identificación de feromonas de contacto (Caskey *et al.*, 2009; Hardege *et al.*, 2002; Kamio *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2011). En este trabajo se probaron dos materiales: 1) tubos rígidos de PVC de ½ in y 2) manguera flexible transparente de PVC de ¼ in. El PVC es un polímero sintético que se caracteriza por ser inocuo, ligero, y por amortiguar ondas sonoras (Akovali, 2012); características que lo hacen idóneo para ser manipulado por los organismos y evitar interferencias de estímulos sonoros. Los materiales usados fueron seleccionados por las características del polímero que los conforman, y fueron introducidos por pares en cada tanque para aumentar la probabilidad de contacto por parte de los camarones. Con los resultados obtenidos se determinó que existe una fuerte influencia del material de la hembra falsa sobre la incidencia de contactos de los camarones macho, resultando que los camarones tenían mayor incidencia de contacto con el tubo rígido. La causa por la cual los camarones nunca tuvieron contacto con la manguera flexible reside en el peso de este material, ya que, al ser más ligero, estuvo en constante movimiento por la circulación del agua, dificultando el contacto con los organismos. Además, al ser un material transparente se dificultó su visión en los videos captados por la cámara.

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que todas las réplicas con “hembra artificial” de tubo rígido mostraron al menos un contacto, los camarones disminuyeron su actividad general cuando se les introdujo el tubo en el tanque, razón por la cual se decidió probar diferentes métodos de introducción de las “hembras artificiales”. A pesar de que estadísticamente no se encontró influencia significativa por método de introducción de la “hembra artificial” sobre la actividad de los camarones, se optó por introducirla cuando el tanque aún está cubierto, basándose únicamente en la evidencia visual. La razón por la cual los camarones aumentaron su actividad y movimiento progresivo con este método de introducción se explica por la disminución de estímulos visuales estresantes cuando el tubo es colocado bajo condiciones de poca luz. Además, cuando el tubo es colocado de manera lenta, probablemente se disminuyan también los estímulos mecánicos y sonoros estresantes para el organismo. Esto concuerda con lo descrito por Hardege *et al.* (2011), que señala que cuando se limitan

las interferencias visuales y sonoras del ambiente, existe mayor probabilidad de que los organismos presenten sus comportamientos naturales.

Finalmente, en lo que concierne al periodo de observación del bioensayo, los resultados del último experimento para estandarizar el protocolo para los bioensayos, se estableció un tiempo de 20 min. Este tiempo coincide con el tiempo de observación utilizado para *P. pugio* por Caskey y Bauer (2005), y con el utilizado para *C. maenas* por Hardege *et al.* (2011); pero difiere del utilizado por Hardege *et al.* (2002) para *C. maenas* (duración de un minuto), y del utilizado por Peddio *et al.* (2019) para *P. clarkii* (duración de cuatro horas). Se observó que en un tiempo menor a 20 min es probable que el camarón no tenga contacto con la “hembra artificial” y por tanto no presente el comportamiento esperado, mientras que con un tiempo mayor de 20 min los camarones disminuyen su actividad y se quedan estáticos en un solo lugar, lo que se puede atribuir a la culminación del aumento de actividad propiciado por la aclimatación con condiciones limitadas de luz.

Todos estos resultados en conjunto concuerdan con la hipótesis de que las condiciones de experimentación influyen sobre la eventual respuesta de comportamiento que pudieran tener los machos al ser expuestos a potenciales feromonas, y refuerzan la conjetura de que los protocolos de bioensayos para identificación de feromonas en crustáceos deben ser especie específicos y correspondientes al tipo de feromona a identificar. Además, con las condiciones seleccionadas después de los experimentos, se logró cumplir con los requisitos establecidos por Dunham (1988) para el desarrollo correcto de bioensayos de comportamiento para la detección de feromonas sexuales femeninas en crustáceos.

4.2 Efecto de extractos de hembras sobre comportamiento de camarones machos

La reproducción sexual es un proceso complejo en el que la atracción entre organismos juega un papel fundamental para el emparejamiento y por tanto para la selección sexual (Ryan, 1966). Para reducir errores en este proceso que pudieran conllevar costos energéticos, muchas especies utilizan complejas mezclas de señales químicas que se combinan con patrones de comportamiento para indicar la existencia de una pareja receptiva (Zhang *et al.*, 2011). Yano *et al.* (1988) propusieron que en *L. vannamei* una de estas señales es una feromona de contacto denominada MSP. Con el objetivo de demostrar la existencia de esta feromona, en este estudio se evaluó el efecto de los compuestos liposolubles de la cutícula de hembras sobre el comportamiento reproductivo de los machos.

De los comportamientos observados, el de contacto y empuje mostraron una asociación significativa con los tratamientos en los bioensayos 1 y 2, además de presentarse más de una vez en al menos una réplica. Ambos comportamientos han sido relacionados con el comportamiento reproductivo de *L. vannamei* por Misamore y Browdy (1996). Estos autores describen que el inicio del cortejo se da mediante un empuje a la hembra por parte del macho, y que el contacto directo de las anténulas del macho con la región ventral de la hembra es indispensable para iniciar el emparejamiento. Además, el comportamiento de contacto ha sido descrito como consecuencia de la exposición de feromonas sexuales en otras especies de crustáceos. Al respecto Bauer y Abdalla (2001) reportan un mayor número de contactos por parte de machos de *Palaemonetes pugio* con hembras preovulatorias que con hembras no maduras, mientras que Kelly y Snell (1998) mencionan que en *Trigriopus japonicus* el número de contactos es dependiente de la concentración de las señales de contacto. Este último punto podría explicar las diferencias que se presentaron en estos comportamientos entre el exoesqueleto ventral y el exoesqueleto dorsolateral, tanto de hembras maduras como de hembras inmaduras. De acuerdo con estas diferencias, en hembras inmaduras la mayor cantidad de señales de contacto para ambos comportamientos podría concentrarse en la región ventral, mientras que, en la hembra madura, la señal que promueve el empuje y el contacto pareciera estar más concentrada en la región dorsolateral y en la región ventral, respectivamente. Es importante mencionar que este es el primer trabajo donde se analizan estas dos regiones cuticulares de manera independiente en este tipo de bioensayos.

Un hallazgo inesperado fue el comportamiento de contacto prolongado que se presentó únicamente en los extractos de hembra inmadura. Este comportamiento duró más de 5 minutos y pudiera relacionarse con el estadio de muda en que se muestrearon a estas hembras. Como se mencionó en la metodología, para asegurar que los extractos fueran obtenidos de hembras en el estadio I de madurez gonadal, el muestreo se realizó una vez concluida la reabsorción ovárica, y de acuerdo con Raviv *et al.* (2008), en *L. vannamei* la reabsorción ovárica ocurre durante la premuda (estadios D2 y D3). El que exista una señal de contacto que atraiga a los machos de *L. vannamei* durante la etapa de premuda de las hembras adultas tiene dos posibles explicaciones antagónicas: a) inducción de canibalismo contra organismos que entran en muda y b) estimulación de guardia premuda para proteger a las hembras.

Con respecto a la primera explicación, Wall *et al.* (2009) demostraron que en juveniles del cangrejo *Scylla serrata* la presencia de olores durante la muda no aumenta significativamente el canibalismo en comparación con los olores liberados cuando un congénere es aplastado o sufre alguna lesión. Por otra parte, en juveniles de cangrejo de río *Orconectes rusticus* se ha observado una mayor respuesta táctil frente a organismos en muda comparado con organismos en intermuda. No obstante, en estos dos estudios las señales evaluadas correspondieron a olores, además de que ninguna de las respuestas

táctiles medidas duró más de 10 s, mientras que en este estudio los contactos prolongados duraron más de 30 s y fueron atribuidas a señales de contacto. Por otra parte, se ha observado que el canibalismo en camarones es más frecuente en primeras etapas de vida y va disminuyendo conforme los organismos se acercan a la edad adulta (Romano y Zeng, 2017). Además, se ha propuesto que en camarones peneidos la principal causa de mortalidades en todas las etapas no es el canibalismo, sino las señales químicas de estrés asociadas con una alta densidad de población (Nga *et al.*, 2005).

En cuanto la posibilidad de la existencia de una guardia premuda en *L. vannamei*, no se encontraron reportes en la literatura de la presencia de este comportamiento en esta especie; no obstante, en otros crustáceos decápodos es común con el objetivo de proteger a la hembra de otros machos y de posibles predadores (Breithaupt *et al.*, 2011). Hardege *et al.* (2002) mencionan que el comportamiento de guardia es una parte fundamental del comportamiento reproductivo en crustáceos que se reproducen cuando la hembra está en el estadio de postmuda, y por tanto ha sido usado como signo de comportamiento sexual en la identificación de feromonas (Asai *et al.*, 2010; Kamio *et al.*, 2005). Sin embargo, en *L. vannamei* la reproducción ocurre cuando la hembra está en periodo de intermuda (estadio c4) (Raviv *et al.*, 2008; Yano *et al.*, 1988).

La posibilidad de que se haya presentado el comportamiento de guardia premuda en este trabajo podría fundamentarse con la teoría de Parker (1974), que establece que en diferentes clases taxonómicas del reino animal los comportamientos de cortejo frente a hembras no receptivas pueden exacerbarse cuando la disponibilidad de hembras es baja, y pueden no presentarse cuando la disponibilidad de hembras es alta. El mismo autor explica que cuando las hembras son escasas, este tipo de comportamientos aumenta la probabilidad de emparejamiento, por lo que se podrían adoptar señales determinadas de proximidad a la receptividad para dar inicio a una vigilancia en búsqueda de monopolizar a la hembra. Cuando las hembras que muestran estas señales se vuelven escasas, se puede favorecer la captación de señales cada vez más tempranas por parte de los machos. En la naturaleza y en muchos laboratorios de reproducción de *L. vannamei* se mantiene una relación hembra:macho de 1:0.5 a 1:2.8, lo que podría explicar por qué no se han observado este tipo de comportamiento antes (Calderón-Pérez *et al.*, 2007). Sin embargo, en este experimento los machos se mantuvieron aislados de las hembras por un tiempo prolongado. Para confirmar que en efecto lo que se presencié en este experimento corresponde a un comportamiento de guardia hacen falta más estudios.

Respecto a la bioactividad total, los resultados indican igualmente una influencia de los tratamientos sobre el comportamiento de los machos. El que no existan diferencias en los tratamientos de cada uno de los bioensayos, revela que las señales de contacto que promueven los diferentes comportamientos

categorizados se encuentran distribuidas en toda la superficie cuticular de las hembras. Sin embargo, el que los extractos ventrales presenten una mayor frecuencia de los grados de comportamiento más altos, en conjunto con el mayor promedio de número de comportamientos reiterados, podría significar que la región ventral de las hembras tiene una mayor concentración de señales de contacto tanto en hembras maduras como en inmaduras. Esto contradice los hallazgos encontrados cuando se evaluaron los comportamientos de manera individual, donde aparentemente la señal que promueve el empuje está más concentrada en la región dorsolateral. Sin embargo, al ser la bioactividad total una variable de respuesta más completa, su interpretación es más certera.

Algo a destacar es que en ningún tratamiento se presentó el comportamiento de sujeción que es la señal inequívoca del emparejamiento en *L. vannamei* (Misamore y Browdy, 1996). Para la ausencia de este comportamiento existen diferentes explicaciones posibles. En primer lugar, el muestreo de las hembras maduras se realizó en un intervalo de horario amplio porque muchas de las hembras estaban desovando antes de la puesta de sol. Yano *et al.* (1988) reportan que a pesar de que el emparejamiento se puede dar en presencia de luz, la mayor actividad de cortejo y emparejamiento se da entre una hora antes y una hora después de la puesta de sol, por tanto, podría ser que no se haya logrado captar la concentración adecuada de feromonas dado el corto periodo de atractividad de la hembra. Algunos autores han reportado que en crustáceos el grado de comportamiento sexual presentado por machos al ser expuestos a potenciales feromonas sexuales femeninas es dependiente de su concentración (Caskey *et al.*, 2009; Hardege *et al.*, 2011).

Otra causa podría ser que los machos requieran estímulos adicionales de comportamiento (movimiento) o textura para presentar completamente el comportamiento reproductivo. En insectos y copépodos que utilizan feromonas de contacto se ha observado que cuando se presenta una hembra receptiva inmovilizada a los machos, el emparejamiento podría disminuir o nunca presentarse (Ginzler *et al.*, 2003; Stoffolano *et al.*, 1997). Kelly y Snell (1998) propusieron que la señal de contacto necesita adicionalmente de un estímulo mecánico, tal vez con el fin de evitar desgaste de energía por la posible interacción con hembras muertas. Además, siguiendo la hipótesis de Yano *et al.* (1988) sobre la existencia de dos tipos de feromonas sexuales femeninas en *L. vannamei* (contacto y distancia), es posible que la CSP sea otro de los factores que interactúan con la señal de contacto para el establecimiento del comportamiento reproductivo completo.

Al analizar estos resultados en conjunto, existe evidencia de que la cutícula de hembras maduras e inmaduras de *L. vannamei* contiene mensajeros químicos que actúan como señales de contacto sobre el sexo opuesto. No obstante, las diferencias de comportamiento encontradas en los distintos tratamientos indican que podrían existir dos diferentes señales de contacto con distintas funciones:

atracción durante la premuda y reconocimiento sexual. Estas diferentes señales podrían ser parte de una comunicación multimodal formada por distintos componentes de más de una modalidad sensorial (Breithaupt *et al.*, 2011). En crustáceos, la comunicación multimodal se da mayormente a través de las vías visual, química y mecánica (Bauer, 2011). Sin embargo, la comunicación visual se limita a crustáceos terrestres, o crustáceos acuáticos que habitan ambientes poco turbios. Por otra parte, la comunicación química y mecánica puede ocurrir bajo cualquier condición ambiental (Okamura *et al.*, 2017). Por lo tanto, es posible que para la presentación de un comportamiento reproductivo completo en *L. vannamei* se requiera la acción en conjunto de señales químicas de distancia como la CSP, señales químicas de contacto como la MSP y señales mecánicas, como ya han hipotetizado otros autores para esta y otras especies (Caskey y Bauer, 2005; Caskey *et al.*, 2009; Yano *et al.*, 1988), en contraste con lo encontrado con otros crustáceos, donde la señal de contacto es suficiente para la presentación del intento de sujeción (Zhang *et al.*, 2011).

Asimismo, basándose en la definición de feromona establecida por Law y Regnier (1971), que establece que las feromonas son sustancias que un individuo secreta al medio que lo rodea para generar una reacción específica (agresividad, conformación de estatus social, agregación, entre otras) en otro individuo de la misma especie, es posible decir que las señales de contacto demostradas en este trabajo son potencialmente feromonas de contacto, pero para concluir que se trata de feromonas sexuales, es necesario recabar más evidencia. No obstante, se observó una tendencia de mayor incidencia de contacto y mayor número de contactos por réplica en los machos expuestos a los extractos cuticulares de hembras maduras, en comparación con los machos expuestos a los extractos cuticulares de hembras inmaduras. La aparente mayor incidencia de la observación de "no-contacto" presentada por los machos frente a los extractos cuticulares de hembras inmaduras, podría significar que la presunta señal de reconocimiento sexual está presente en mayor concentración en la cutícula de hembras maduras. Sin embargo, no es posible realizar una comparación directa entre las dos etapas reproductivas debido a la posible variación del fotoperiodo natural entre los bioensayos 1 y 2, por lo que es preciso que se realice un bioensayo donde se comparen directamente los extractos cuticulares de hembras maduras contra los extractos cuticulares de hembras inmaduras en las mismas condiciones experimentales.

En cuanto a la posible naturaleza química de estas potenciales feromonas, existe una amplia variedad de moléculas usadas como feromonas en la naturaleza, abarcando diferentes tamaños de molécula, estructura, grupo funcional y combinaciones, siendo limitadas solo por el rango de moléculas que los organismos pueden producir (Wyatt, 2017). Por tanto, cualquier molécula puede potencialmente convertirse en una feromona. En el caso específico de las feromonas de contacto, estas deben ser relativamente insolubles en agua (no polares) para poder mantenerse en la superficie de los

organismos sin tener que ser remplazadas constantemente (Zhang *et al.*, 2011). En este trabajo las señales de contacto fueron extraídas de la cutícula utilizando hexano como solvente, lo que denota la naturaleza liposoluble de estas señales. Las ceramidas y los hidrocarburos son los principales candidatos para actuar como feromonas de contacto en *L. vannamei*, dado que son los compuestos liposolubles que se encuentran en mayor concentración en la cutícula de los crustáceos (Nagasawa, 2012). Sin embargo, solo los hidrocarburos cuticulares de cadena larga han sido identificados como feromonas de contacto en otras especies de crustáceos además de insectos (Howard y Blomquist, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Estudios previos han planteado que los hidrocarburos pueden comunicar un amplio rango de información, como el sexo, la edad, el estado fisiológico, los rasgos genéticos y las preferencias de emparejamiento (Billeter *et al.*, 2009; Rundle *et al.*, 2005). Para confirmar la hipótesis de que los hidrocarburos actúan como feromonas de contacto en *L. vannamei*, es indispensable realizar la caracterización química de los compuestos obtenidos mediante cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masa (GC/MS; por sus siglas en inglés). Este análisis además de establecer claramente la naturaleza química de las señales de contacto aisladas ayudaría a vislumbrar si las señales que promueven el comportamiento de guardia son completamente diferentes a las que promueven el comportamiento de empuje y contacto, o si es una misma mezcla de compuestos cuya acción depende de las proporciones de los mismos.

Otro punto importante por discutir es el origen de las presuntas feromonas obtenidas. De manera general en los artrópodos, las feromonas de contacto son secretadas a la superficie cuticular a través de canales porosos que tienen origen en glándulas epiteliales (Talbot y Demers, 1993). En diversas especies de polillas la glándula productora de feromonas se ubica en células epiteliales modificadas entre el octavo y noveno segmento abdominal. Una vez que los hidrocarburos son sintetizados, son transportados por lipoforinas en la hemolinfa para ser captados y posteriormente liberados por las glándulas epiteliales a la superficie cuticular de todo el cuerpo (Jurenka, 2004). Este modelo de liberación podría explicar por qué en este trabajo las regiones ventrales de hembras maduras e inmaduras presentaron un mayor número de réplicas en escalas de comportamiento más altas en comparación con las regiones dorsolaterales. Probablemente, en la región ventral se encuentren las glándulas que producen las feromonas y por tanto haya una mayor concentración de estos compuestos en esta área, en contraste con la región dorsolateral, donde los compuestos que conforman la presunta feromona podrían ser liberados, mas no sintetizados.

En 1965, Barth propuso que los insectos tenían un control neuroendocrino de la producción y liberación de feromonas. Este control presuntamente era mantenido por las hormonas juvenoides y la hormona ecdisona; sin embargo, con los avances en el conocimiento de la regulación de feromonas en insectos, (Schal *et al.*, 1998) propusieron una revisión a esta hipótesis. Actualmente se sabe que en

muchos insectos la regulación del proceso de biosíntesis de feromonas es regulado principalmente por neuropéptidos especializados denominados neuropéptidos activadores de la biosíntesis de feromonas (PBAN; por sus siglas en inglés), que pertenecen a la familia de las pirokininas y son producidos en el ganglio supraesofágico (Jurenka y Nusawardani, 2011). A la fecha se sabe que existen dos péptidos pertenecientes a la familia de las pirokininas en *L. vannamei*: Pev-PK1 Y Pev-PK2, por lo que en esta especie la regulación de las feromonas podría tener un control similar (Torfs *et al.*, 2001), sin embargo es conveniente mencionar que la función de las pirokininas no se limita a la producción de feromonas, por lo que para confirmar esta hipótesis hace falta todavía más investigación.

Siguiendo la hipótesis de que las presuntas feromonas obtenidas son hidrocarburos, es probable que las pirokininas regulen su biosíntesis mediante la modificación de las rutas biosintéticas de los ácidos grasos como sucede en los insectos (Jurenka y Nusawardani, 2011). La modificación de la ruta involucra enzimas diferentes en cada especie, lo que da lugar a las feromonas especie-específicas (Rafaeli, 2009). Sin embargo, con la poca información que se tiene, es imposible establecer una ruta específica para *L. vannamei*. La ruta general que se ha establecido para el control neuroendócrino de la biosíntesis de la feromona en insectos mediante los péptidos pertenecientes a la familia de las pirokininas se resume a continuación.

El PBAN se une a su receptor específico, que ha sido identificado como un receptor celular de membrana acoplado a proteína G (GPCR; por sus siglas en inglés) en insectos (Park *et al.*, 2002). Una vez que se establece la unión receptor-ligando, inicia una cascada de transducción que estimula la ruta biosintética de la feromona. Mediante análisis transcriptómico combinado con mapeo de rutas biológicas de señalización, se ha determinado que la activación del receptor induce la apertura de un canal de calcio dependiente de ligando. La apertura de este canal produce un influjo de calcio extracelular que aumenta las concentraciones citosólicas de este mineral para que funcione como segundo mensajero. Los altos niveles de calcio citosólico promueven la unión de este con la proteína calmodulina, y esta unión puede estimular directamente la biosíntesis de feromonas en algunos insectos, pero en otros puede estimular la activación de la enzima adenilato ciclasa para producir adenosín monofosfato cíclico (cAMP; por sus siglas en inglés) que actúa como tercer mensajero. Ya sea que se utilice la primera o la segunda ruta, la activación de la ruta biosintética de las feromonas se da por la activación de fosfatasas y quinasas que activan diferentes enzimas (reductasas, desaturasas y carboxilasas de acetil coenzima A) dependiendo la especie (Jurenka, 2004; Jurenka y Nusawardani, 2011; Rafaeli, 2009; Rafaeli y Jurenka, 2003).

Una vez establecida una posible ruta de biosíntesis de las señales de contacto encontradas, continúa la interrogante de cómo son captadas estas señales. Los crustáceos tienen dos tipos generales de

sistemas de quimio recepción: el olfato y la quimio-recepción dispersa (Derby, 2021; Harzsch y Krieger, 2018; Kamio *et al.*, 2021). El olfato es mediado por sensilias denominadas astetascos que se localizan únicamente en la parte externa o lateral de las anténulas. Los astetascos son sensilias unimodales inervadas por neuronas sensoriales olfatorias (OSNs; por sus siglas en inglés), pero no por neuronas mecano sensoriales (MSNs; por sus siglas en inglés) (Derby, 2021; Dunham y Oh, 1992). La quimio-recepción dispersa, por otra parte, esta mediada por sensilias bimodales que son inervadas tanto por neuronas sensoriales químicas (CSNs; por sus siglas en inglés), como por MSNs, y se encuentra distribuida a través de todo el cuerpo del animal y sus apéndices (Ache, 1982). Este funcionamiento general de la quimio-recepción también se ha identificado en *L. vannamei* (Eap *et al.*, 2020). La percepción de feromonas se da casi de manera universal por “quimiorreceptores olfatorios”; sin embargo, las feromonas de contacto podrían ser captadas mediante la quimio-recepción dispersa (Breithaupt *et al.*, 2011).

En *P. clarkii* se ha reportado que tanto el flagelo lateral de la anténula, como el medial están involucrados en el emparejamiento; sin embargo, esta especie puede emparejarse aun sin anténulas (Dunham y Oh, 1992), lo que podría explicarse por lo establecido por Peddio *et al.* (2019) de que esta especie no depende de señales de distancia para su emparejamiento, sino que dependen únicamente de las señales de contacto. Por tanto, la anténula podría percibir las feromonas de contacto, pero también otros órganos podrían cumplir esta función. Con respecto a esto, diversos autores mencionan que el flagelo antenal, las anténulas y los apéndices torácicos de crustáceos podrían tener receptores que detecten feromonas de contacto (Bauer, 1976, 1979; Burkenroad, 1947; Caskey y Bauer, 2005).

El movimiento activo de las anténulas durante emparejamiento en *L. vannamei*, especialmente durante la etapa de sondeo y sujeción, indica que este órgano está implicado en la captación de la presunta feromona de contacto (Misamore and Browdy, 1996). Esto se ve reforzado por lo descrito por Derby (2021), cuando menciona que las anténulas de *L. vannamei* no solo perciben olores, sino que también perciben señales químicas de contacto y señales mecánicas. En el presente trabajo se observó que en los bioensayos 1 y 2, los organismos de réplicas del tratamiento control no se acercaban a la “hembra artificial” después de la aparente percepción con el flagelo antenal, mientras que los organismos de las réplicas de los demás tratamientos (EDHI, EVHI, EDHM Y EVHM) se acercaban a palpar a la “hembra artificial” con las anténulas después de una primera percepción con el flagelo antenal. Esta observación coincide con lo reportado en estudios previos de que el flagelo antenal podría tener una función importante en la percepción de feromonas de contacto dado la presencia de sensilias bimodales (Caskey y Bauer, 2005; Caskey *et al.*, 2009). Con esta información se plantea la hipótesis de que a pesar de que diversos órganos implicados en la quimio-recepción dispersa pueden percibir a las feromonas de contacto en *L. vannamei*, el flagelo antenal y la anténulas podrían tener los

papeles más importante en esta función debido a que son los órganos con mayor número de sensillas (Breithaupt *et al.*, 2011). La captación de la señal por parte del flagelo antenal podría llamar la atención del macho en primera instancia, para que posteriormente este palpe detenidamente el abdomen de la hembra con las anténulas.

A nivel molecular, la detección de la señal química inicia cuando el ligando se une al receptor localizado en el órgano quimio sensorial. Pelosi *et al.* (2014) mencionan que la detección de señales químicas externas en artrópodos es un proceso complejo que involucra receptores de membrana y proteínas de unión solubles altamente concentradas en órganos quimio-sensoriales, pero los mecanismos específicos de transducción aún son desconocidos. En crustáceos, las proteínas quimio-receptoras de membrana son generalmente receptores ionotrópicos (IRs; por sus siglas en inglés), receptores de potencial transitorio (TRPs; por sus siglas en inglés) y receptores parecidos a los gustativos (GRLs; por sus siglas en inglés) (Kamio *et al.*, 2021). En cuanto a las proteínas solubles, en crustáceos se ha establecido que podrían ser de la familia de las proteínas quimio-sensoriales (CSPs; por sus siglas en inglés) o la familia Niemann-Pick tipo C2 (NPC2) (Pelosi *et al.*, 2014). Ambas familias de proteínas han sido identificadas en anténulas de artrópodos, por lo que podrían estar involucradas en captación de feromonas de distancia y de contacto (Ishida *et al.*, 2014). Además, un análogo exclusivo de insectos, las proteínas de unión a olores (OBPs; por sus siglas en inglés), han sido relacionadas fuertemente con la percepción de feromonas, por lo que es muy probable que las CSPs y NPC2 tengan las mismas funciones (Pelosi *et al.*, 2014). Futuras investigaciones deberían centrarse en el mecanismo de transducción que utilizan las feromonas de contacto para estimular los comportamientos aquí descritos.

Finalmente, es importante discutir las posibles implicaciones de los resultados de este trabajo sobre la industria camaronícola nacional y mundial. En este trabajo se ha analizado el efecto disparador de los compuestos cuticulares liposolubles de hembras de *L. vannamei* sobre los machos. Misamore y Browdy (1996) mencionan que la maduración y el desove de *L. vannamei* puede ser inducido bajo las condiciones adecuadas, pero un escaso emparejamiento resulta en el desove de gametos no fertilizados. Por su parte, Yano *et al.* (1988) reportan que de una muestra de 36 hembras maduras, 33 fueron perseguidas por machos, pero solo 10 se lograron emparejar (tasa de emparejamiento de 30.3%), y de esas 10 solo 2 tuvieron una transferencia exitosa de espermátforo (tasa de copulación de 20% en las hembras emparejadas). Lo que estos autores mencionan en conjunto, demuestra que la baja tasa de emparejamiento y copulación es uno de los principales problemas para aumentar la productividad de nauplios. Por tanto, el que exista una primera evidencia de la existencia de feromonas femeninas de contacto que promueven el comportamiento reproductivo en machos, es un primer paso

en vías de resolver esta problemática, sin embargo, para poder llegar a este objetivo, es necesario que se continúe con esta línea de investigación.

Por otra parte, no se debe perder de vista el posible efecto inductor que pudieran tener estos compuestos sobre la fisiología de los machos o de las hembras. En el caso de los machos, existe evidencia de que la transferencia del espermatóforo es inducida por una feromona sexual de contacto femenina (Blades, 1977; Caskey y Bauer, 2005); mientras que en el caso de las hembras, Yano *et al.* (1988) propusieron que la MSP podría inducir de manera indirecta la maduración final del ovocito mediante la transferencia del espermatóforo.

Capítulo 5. Conclusiones

- Para establecer evidencia suficiente del efecto potencial de las feromonas sexuales femeninas de contacto sobre el comportamiento reproductivo de los camarones machos, se requieren las siguientes condiciones: 1) un período de acondicionamiento de al menos 1 h con el tanque cubierto; 2) la introducción de una “hembra artificial” hecha de tubos rígidos de PVC recubiertos con moléculas liposolubles mientras el tanque aún está cubierto; y 3) un período de observación de al menos 20 min.
- Los ensayos de bioactividad realizados mostraron que existe un efecto significativo de los compuestos cuticulares liposolubles de hembra madura y hembra inmadura de *L. vannamei* sobre el comportamiento de machos de la misma especie.
- Los camarones machos reproductores de *L. vannamei* expuestos a hembras artificiales en presencia de extractos cuticulares de hembras inmaduras presentaron tres tipos de comportamiento: contacto, empuje y guardia; mientras que en presencia de extractos cuticulares de hembras maduras presentaron dos tipos de comportamiento: contacto y empuje.
- Los extractos obtenidos de la región ventral de hembras maduras e inmaduras presentan mayor frecuencia de los comportamientos que se encuentran en la escala más alta de bioactividad.
- Los comportamientos observados en este trabajo sugieren que las señales de contacto tienen dos funciones diferentes en camarones machos reproductores de *L. vannamei*: atracción durante la premuda y reconocimiento sexual.
- La exploración de los machos reproductores hacia las “hembras artificiales” mediante el contacto directo con las antenas y las anténulas sugiere que estos dos órganos tienen un papel central en la captación de señales de contacto en *L. vannamei*.
- Los resultados obtenidos en los bioensayos realizados con extractos cuticulares de hembras maduras en machos reproductores sugieren la presencia de potenciales feromonas de contacto, lo cual deberá ser dilucidado mediante análisis de GC-MS.

Capítulo 6. Recomendaciones

- Para experimentos futuros se recomienda tener un mayor número de hembras en maduración para así poder cerrar el intervalo de muestreo entre una hora antes y una hora después de la puesta de sol.
- Se recomienda realizar el análisis de GC/MS para la caracterización química de los extractos obtenidos.
- Se recomienda realizar bioensayos con los análogos sintéticos de los compuestos que se encuentren con la caracterización química, con el objetivo de establecer la identificación definitiva de la feromona.
- Se recomienda repetir los bioensayos agregando tratamientos donde los machos tengan ablacionadas las anténulas y antenas, por separado y en conjunto, para confirmar el papel de estos órganos en la captación de las señales.
- Se recomienda la realización de un bioensayo donde se comparen directamente los extractos cuticulares de hembras maduras contra los extractos cuticulares de hembras inmaduras en las mismas condiciones experimentales.
- A largo plazo se recomienda el uso de marcadores genéticos moleculares para confirmar o descartar las rutas de transducción propuestas para la biosíntesis y captación de las señales de contacto encontradas.

Literatura citada

- Ache, B. W. 1982. Chemoreception and thermoreception. In H. L. Atwood and D. C. Sandeman (Eds.), *The biology of crustacea*, Vol. 3: Neurobiology. Academic press: New York. pp. 368–398.
- Agarwal, D., Ahmad, I., Gora, A. 2017. Endocrinology and reproductive mechanisms in crustaceans. *Aquastar magazine*, 113 (April), 44-47.
- Akovali, G. 2012. Plastic materials: polyvinyl chloride (PVC). In F. Pacheco-Torgal, S. Jalali, y A. Fucic (Eds.), *Toxicity of Building Materials*. doi:10.1533/9780857096357.23.
- Alfaro-Montoya, J., Braga, A., Umaña-Castro, R. 2019. Research frontiers in penaeid shrimp reproduction: Future trends to improve commercial production. *Aquaculture*, 503 (October 2018), 70–87. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.12.068.
- Alfaro, J. 1996. Effect of 17 α -methyltestosterone and 17 α -hydroxyprogesterone on the quality of white shrimp *Penaeus vannamei* spermatophores. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(4), 487–492. doi:10.1111/j.1749-7345.1996.tb00634.x.
- Alfaro, J., Zúñiga, G., García, A., Rojas, E. 2008. Preliminary evaluation of the effect of juvenile hormone III and methyl farnesoate on spermatophore quality of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(1), 167–171. doi:10.4067/S0718-19572008000100018.
- Alfaro, J., Zúñiga, G., Komen, J. 2004. Induction of ovarian maturation and spawning by combined treatment of serotonin and a dopamine antagonist, spiperone in *Litopenaeus stylirostris* and *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 236(1–4), 511–522. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.09.020.
- Ando, T., Inomata, S., Yamamoto, M. 2004. Lepidopteran sex pheromones. *Topics in Current Chemistry*, 239, 51–96. doi:10.1007/b95449.
- Arcos, F. G., Ibarra, A. M., Palacios, E., Vazquez-Boucard, C., Racotta, I. S. 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Egg quality and female physiological condition. *Aquaculture*, 228(1–4), 335–349. doi:10.1016/S0044-8486(03)00313-2.
- Asai, N., Fusetani, N., Matsunaga, S., Sasaki, J. 2010. ChemInform abstract: Sex pheromones of the hair crab *Erimacrus isenbeckii*. Part 1. Isolation and structures of novel ceramides. *ChemInform*, 32(14), no-no. doi:10.1002/chin.200114248.
- Bamber, S. D., Naylor, E. 1996. Chemical communication and behavioural interaction between sexually mature male and female shore crabs (*Carcinus maenas*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76(3), 691–699. doi:10.1017/s0025315400031398.
- Barkari, A., Jones, C., Karplus, I. 2011. Chemical communication and aquaculture of decapod crustaceans: Needs, problems, and possible solutions. In Tomas Breithaupt and M. Thiel (Eds.), *Chemical communication in Crustaceans*. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

- Barki, A., Ilan, K. 1999. Mating behavior and behavioral assay for female recertivity in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Crustacean Biology*, 19(3), 493–497.
- Barth, R. H. 1965. Insect mating behavior: Endocrine control of a chemical communication system. *Science*, 149(3686), 882–883.
- Bauer, R. T. 1976. Mating behaviour and spermatophore transfer in the shrimp *Heptacarpus pictus* (Stimpson) (Decapoda: Caridea: Hippolytidae). *Journal of Natural History*, 10(4), 415–440. doi:10.1080/00222937600770321.
- Bauer, R. T. 1979. Sex attraction and recognition in the caridean shrimp *Heptacarpus paludicola* Holmes (Decapoda: Hippolytidae) . *Marine Behaviour and Physiology*, 6(3), 157–174. doi:10.1080/10236247909378563.
- Bauer, R. T. 2011. Chemical communication in decapod shrimps: The influence of mating and social systems on the relative importance of olfactory and contact pheromones. In T Breithaupt and M. Thiel (Eds.), *Chemical communication in crustaceans*. Springer International Publishing: New York. pp. 277–296.
- Bauer, R. T., Abdalla, J. H. 2001. Male mating tactics in the shrimp *Palaemonetes pugio* (Decapoda, Caridea): Precopulatory mate guarding vs. pure searching. *Ethology*, 107(3), 185–199. doi:10.1046/j.1439-0310.2001.00636.x.
- Bayley, B., Jham, S. 1992. Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. In A. Fast and J. Lester (Eds.), *Marine shrimp culture: principles and practices*. Elsevier Science Publishers. pp. 9–27.
- Billeter, J. C., Atallah, J., Krupp, J. J., Millar, J. G., Levine, J. D. 2009. Specialized cells tag sexual and species identity in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 461(7266), 987–991. doi:10.1038/nature08495.
- Blades, P. I. 1977. Mating behavior of *Centropages typicus* (Copepoda: Calanoida). *Marine Biology*, 40(1), 57–64. doi:10.1007/BF00390628.
- Boyd, C. 2009. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. In *Métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica* (1st ed.). Recuperado el 25 de abril de 2021, de [http://www.cesasin.com.mx/CentroAmerica/1Calidad del agua.pdf](http://www.cesasin.com.mx/CentroAmerica/1Calidad%20del%20agua.pdf).
- Breithaupt, Thomas, Thiel, M. 2011. Chemical communication in crustaceans. *Chemical Communication in Crustaceans*, 1–565. doi:10.1007/978-0-387-77101-4.
- Briggs, M., Feunge-Smith, S., Subasinghe, R., Phillips, M. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. In *FAO (Ed.), FAO (Vol. 1)*. Recuperado el 07 de junio de 2021, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsames.2011.03.003> <https://doi.org/10.1016/j.gr.2017.08.001> <http://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2014.12.018> <http://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2011.08.005> <http://dx.doi.org/10.1080/00206814.2014.902757> <http://dx.doi.org/10.1080/00206814.2014.902757>
- Burkenroad, M. 1947. Reproductive activities of decapod crustacea. *The American Naturalist*, 81(800), 392–398. doi:10.1086/281551.

- Calderón-Pérez, J. A., Rendón-Rodríguez, S., Solís-Ibarra, R. 2007. Daily cycle and body characteristics of mating *Litopenaeus vannamei* shrimps (Decapoda: Penaeidae) in the wild off southern Sinaloa, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 55(1), 189–198. doi:10.15517/rbt.v55i1.6070.
- Caskey, Bauer, R. T. 2005. Behavioral tests for a possible contact sex pheromone in the caridean shrimp *Palaemonetes pugio*. *Journal of Crustacean Biology*, 25(4), 571–576. doi:10.1651/C-2580.1.
- Caskey, J. I., Watson, G. m., Bauer, R. t. 2009. Studies on contact sex pheromones of the caridean shrimp *Palaemonetes pugio*: II. The role of glucosamine in mate recognition. *Invertebrate Reproduction and Development*, 53(2), 105–116. doi:10.1080/07924259.2009.9652296.
- Castille, F. L., Lawrence, A. L. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 68(1), 75–80. doi:10.1016/0300-9629(81)90320-0.
- Chen, T., Zhang, L.-P., Wong, N.-K., Zhong, M., Ren, C.-H., Hu, C.-Q. 2014. Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) is predominantly expressed in the brain and negatively regulates hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression. *Biology of Reproduction*, 90(3), 1–10. doi:10.1095/biolreprod.113.115030.
- Christie, A. E. 2011. Crustacean neuroendocrine systems and their signaling agents. *Cell Tissue Res*, 345, 41–67. doi:10.1007/s00441-011-1183-9.
- CONAPESCA. 2018. Anuario estadístico de acuicultura y pesca Publicación 2018. 300. Recuperado el 12 de agosto de 2021, de www.conapesca.gob.mx.
- Derby, C. D. 2021. The crustacean antennule: A complex organ adapted for lifelong function in diverse environments and lifestyles. *Biological Bulletin*, 240(2), 67–81. doi:10.1086/713537.
- Diwan, A. D. 2005. Current progress in shrimp endocrinology - A review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(3), 209–223.
- Domenénech, R. 2018. El trauma de los langostinos tuertos. Avant editorial: Barcelona.
- Dunham, D. W., Oh, J. W. 1992. Chemical sex discrimination in the crayfish *Procambarus clarkii*: Role of antennules. *Journal of Chemical Ecology*, 18(12), 2363–2372. doi:10.1007/BF00984955.
- Dunham, P. J. 1978. Sex pheromones in crustacea. *Biological Reviews*, 53(4), 555–583. doi:10.1111/j.1469-185x.1978.tb00864.x.
- Dunham, P. J. 1988. Pheromones and behaviour in crustacea. In H. Laufer and R. Downer (Eds.), *Endocrinology of selected invertebrate types*. doi:10.1016/0016-6480(88)90128-1.
- Eap, D., Correa, S., Ngo-Vu, H., Derby, C. D. 2020. Chemosensory basis of feeding behavior in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biological Bulletin*, 239(2), 115–131. doi:10.1086/710337.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. doi:CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

- Feijó, R. G., Braga, A. L., Lanes, C. F. C., Figueiredo, M. A., Romano, L. A., Klosterhoff, M. C., Nery, L. E. M., Maggioni, R., Wasielesky, W., Marins, L. F. 2016. Silencing of gonad-inhibiting hormone transcripts in *Litopenaeus vannamei* females by use of the RNA interference technology. *Marine Biotechnology*, 18(1), 117–123. doi:10.1007/s10126-015-9676-2.
- Ginzl, M. D., Blomquist, G. J., Millar, J. G., Hanks, L. M. 2003. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(3), 533–545. doi:10.1023/A:1022894419521.
- Gonzalez-Alanis, P. 2004. Maduración y reproducción del camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de recirculación de agua (Tamaulipas, México). *Aqua-Cultura*, (103), 32–36.
- González, M., Ramos, L., Betancourt, A. 2018. Endocrinología de la reproducción en crustáceos decápodos (Crustacea : Decapoda): Avances científicos y perspectivas futuras. *Revista de Investigaciones Marinas*, 38(2), 1–8. doi:1991-6086
- González, R. A., Díaz, F., Licea, A., Denisse Re, A., Noemí Sánchez, L., García-Esquivel, Z. 2010. Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 35(5), 218–224. doi:10.1016/j.jtherbio.2010.05.004.
- Hardege, J. D., Bartels-Hardege, H. D., Fletcher, N., Terschak, J. A., Harley, M., Smith, M. A., Davidson, L., Hayden, D., Müller, C. T., Lorch, M., Welham, K., Walther, T., Bublit, R. 2011. Identification of a female sex pheromone in *Carcinus maenas*. *Marine Ecology Progress Series*, 436, 177–189. doi:10.3354/meps09226.
- Hardege, J. D., Jennings, A., Hayden, D., Müller, C. T., Pascoe, D., Bentley, M. G., Clare, A. S. 2002. Novel behavioural assay and partial purification of a female-derived sex pheromone in *Carcinus maenas*. *Marine Ecology Progress Series*, 244(November), 179–189. doi:10.3354/meps244179.
- Harzsch, S., Krieger, J. 2018. Crustacean olfactory systems: A comparative review and a crustacean perspective on insect olfactory systems. *Progress in Neurobiology*, 161, 23–60. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.11.005.
- Hochachka, P. W., Somero, G. N. 2014. Biochemical adaptation. In *Biochemical Adaptation*.
- Howard, R. W., Blomquist, G. J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, 50, 371–393. doi:10.1146/annurev.ento.50.071803.130359.
- Hsien-Tsang, S., Aguillón, C. 2008. Manual sobre reproducción y cultivo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Recuperado el 13 de diciembre de 2020, de http://www.mag.gob.sv/phocadownload/Apoyo_produccion/manual_reproduccion_de_camaron_blanco.pdf.
- Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191(1–3), 191–208. doi:10.1016/S0044-8486(00)00428-2
- Ishida, Y., Tsuchiya, W., Fujii, T., Fujimoto, Z., Miyazawa, M., Ishibashi, J., Matsuyama, S., Ishikawa, Y., Yamazaki, T. 2014. Niemann-Pick type C2 protein mediating chemical communication in the

- worker ant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(10), 3847–3852. doi:10.1073/pnas.1323928111.
- Jayasankar, V., Tomy, S., Wilder, M. N. 2020. Insights on molecular mechanisms of ovarian development in decapod crustacea: Focus on vitellogenesis-stimulating factors and pathways. 11(October). doi:10.3389/fendo.2020.577925.
- Jurenka, R. 2004. Insect pheromone biosynthesis. In *Topics in Current Chemistry*. doi:10.1007/b95450.
- Jurenka, R., Nusawardani, T. 2011. The pyrokinin/ pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) family of peptides and their receptors in Insecta: Evolutionary trace indicates potential receptor ligand-binding domains. *Insect Molecular Biology*, 20(3), 323–334. doi:10.1111/j.1365-2583.2010.01065.x.
- Kamio, M., Araki, M., Nagayama, T., Matsunaga, S., Fusetani, N. 2005. Behavioral and electrophysiological experiments suggest that the antennular outer flagellum is the site of pheromone reception in the male helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Biological Bulletin*, 208(1), 12–19. doi:10.2307/3593096.
- Kamio, M., Schmidt, M., Germann, M. W., Kubanek, J., Derby, C. D. 2014. The smell of moulting: N-acetylglucosamino-1,5-lactone is a premoult biomarker and candidate component of the courtship pheromone in the urine of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Biology*, 217(8), 1286–1296. doi:10.1242/jeb.099051.
- Kamio, M., Yambe, H., Fusetani, N. 2021. Chemical cues for intraspecific chemical communication and interspecific interactions in aquatic environments: Applications for fisheries and aquaculture. *Fisheries Science*. doi:10.1007/s12562-021-01563-0.
- Kang, B. J., Sultana, Z., Wilder, M. N. 2021. Assessment of the effects of double-stranded RNAs corresponding to multiple vitellogenesis-inhibiting hormone subtype I peptides in subadult female whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. 12(March), 1–12. doi:10.3389/fendo.2021.594001.
- Kelly, L. S., Snell, T. W. 1998. Role of surface glycoproteins in mate-guarding of the marine harpacticoid *Tigriopus japonicus*. *Marine Biology*, 130(4), 605–612. doi:10.1007/s002270050282.
- Lara Espinoza, C., Espinosa, A., Rivera Domínguez, M., Astorga Cienfuegos, K., Acedo Félix, E., Bermúdez, C. 2015. Desarrollo de camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de cultivo intensivo con biofloc y nulo recambio de agua. *AquaTIC: Revista Electrónica de Acuicultura*, (43), 1–13.
- Law, J. H., Regnier, F. E. 1971. Pheromones. *Perception*, 40, 533–548.
- Lee, D. K. 2016. Alternatives to P value: confidence interval and effect size. *Korean Journal of Anesthesiology*, 69(6), 555–562. doi:https://doi.org/10.4097/kjae.2016.69.6.555.
- Liao, I. C., Chien, Y. 2011. The Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Asia: The world's most widely cultured Alien crustacean. In *In the Wrong Place - Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts*. doi:10.1007/978-94-007-0591-3.

- Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., Cortés-Jacinto, E. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante? *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 25(1), 181–196.
- Misamore, M., Browdy, C. 1996. Mating behavior in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*: a generalized model for mating in *Penaeus*. *Journal of Crustacean Biology*, 16(1), 61–70.
- Montemayor, J. 1995. Uso de feromonas y aminos biogénicas como atractantes en alimento para langostinos *Macrobrachium rosenbergii*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Nagasawa, H. 2012. The crustacean cuticle: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience - Elite*, 4 E(2), 711–720. doi:10.2741/e412.
- Nga, B. T., Lüring, M., Peeters, E. T. H. M., Roijackers, R., Scheffer, M., Nghia, T. T. 2005. Chemical and physical effects of crowding on growth and survival of *Penaeus monodon* Fabricius post-larvae. *Aquaculture*, 246(1–4), 455–465. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.026.
- Okamura, S., Kawaminami, T., Matsuura, H., Fusetani, N., Goshima, S. 2017. Behavioral assay and chemical characters of female sex pheromones in the hermit crab *Pagurus filholi*. *Journal of Ethology*, 35(2), 169–176. doi:10.1007/s10164-017-0507-y.
- Okumura, T. 2004. Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 38(1), 49–54. doi:10.6090/jarq.38.49.
- Palacios, E., Carrefio, D., Rodríguez-Jaramillo, M. C., Racotta, I. S. 1999. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance, and biochemistry of white Pacific shrimp, *Penaeus vannamei*, broodstock. *Journal of Applied Aquaculture*, 9(3), 1–23. doi:10.1300/J028v09n03_01.
- Park, Y., Kim, Y. J., Adams, M. E. 2002. Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11423–11428. doi:10.1073/pnas.162276199.
- Parker, A. G. A. 1974. Courtship persistence and female-guarding as male time investment strategies
Published by: Brill Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/4533569> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to log in to JSTOR to a. *Behavior*, 48(1), 157–184.
- Peddio, S., Sollai, G., Podda, C., Frau, G., Palmas, F., Sabatini, A., Crnjar, R., Solari, P. 2019. The success in the short-distance communication for mating does not depend on chemical signals in the crustacean decapod *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Advances in Oceanography and Limnology*, 10(1), 67–73.
- Pelosi, P., Iovinella, I., Felicioli, A., Dani, F. R. 2014. Soluble proteins of chemical communication: An overview across arthropods. *Frontiers in Physiology*, 5 AUG(August), 1–13. doi:10.3389/fphys.2014.00320.
- Radhakrishnan, E. V., Vijayakumaran, M. 1984. Effect of eyestalk ablation in the spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus): 3. On Gonadal Maturity. *Indian Journal of Fisheries*, 31(2), 209–216.

- Rafaeli, A. 2009. Pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN): Regulatory role and mode of action. *General and Comparative Endocrinology*, 162(1), 69–78. doi:10.1016/j.ygcen.2008.04.004.
- Rafaeli, A., Jurenka, R. A. 2003. PBAN regulation of pheromone biosynthesis in female moths. *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*, (1984), 107–136. doi:10.1016/B978-012107151-6/50007-4
- Raviv, S., Parnes, S., Sagi, A. 2008. Coordination of reproduction and molt in decapods. *Reproductive Biology of Crustaceans*, 365–390. doi:10.1201/9781439843345-c9.
- Romano, N., Zeng, C. 2017. Cannibalism of decapod crustaceans and implications for their aquaculture: A review of its prevalence, influencing factors, and mitigating methods. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 25(1), 42–69. doi:10.1080/23308249.2016.1221379.
- Rothlisberg, P. C. 1998. Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: A review. *Aquaculture*, 164(1–4), 49–65. doi:10.1016/S0044-8486(98)00176-8.
- Rundle, H. D., Chenoweth, S. F., Doughty, P., Blows, M. W. 2005. Divergent selection and the evolution of signal traits and mating preferences. *PLoS Biology*, 3(11), 1988–1995. doi:10.1371/journal.pbio.0030368.
- Ryan, E. 1966. Pheromone: Evidence in a decapod crustacean. *Science*, 151(3708), 340–341.
- Sainz-Hernández, J. C., Racotta, I. S., 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(1–4), 188–193. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.07.002.
- Schal, C., Sevala, V., Cardé, R. T. 1998. Novel and highly specific transport of a volatile sex pheromone by hemolymph lipophorin in moths. *Naturwissenschaften*, 85(7), 339–342. doi:10.1007/s001140050511.
- Serrano, L., Grousset, E., Charmantier, G., Spanings-Pierrot, C. 2004. Occurrence of L- and D-crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the eyestalk X-organ/sinus gland complex during the ontogeny of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(9), 1129–1140. doi:10.1369/jhc.4A6292.2004.
- Stoffolano, J. G., Schaubert, E., Yin, C. M., Tillman, J. A., Blomquist, G. J. 1997. Cuticular hydrocarbons and their role in copulatory behavior in *Phormia regina* (Meigen). *Journal of Insect Physiology*, 43(11), 1065–1076. doi:10.1016/S0022-1910(97)00050-4.
- Talbot, P., Demers, D. 1993. Tegumental glands of Crustacea. In N. H. Michael and A. F. John (Eds.), *The crustacean integument: morphology and biochemistry*. CRC Press: New York. pp. 151–191.
- Taylor, J., Vinatea, L., Ozorio, R., Schuweitzer, R., Andreatta, E. R. 2004. Minimizing the effects of stress during eyestalk ablation of *Litopenaeus vannamei* females with topical anesthetic and a coagulating agent. *Aquaculture*, 233(1–4), 173–179. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.09.034.

- Teodoro, E., Seminario, C., Y., S. 2009. Efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular sobre el tiempo de maduración de los ovocitos y fecundidad de *Penaeus vannamei*. MeMorias Del li Congreso BinaCional de InvestigaCión, CienCia y TeCnología de Las Universidades, (figura 1), 95–103. Recuperado el 28 de septiembre de 2021, de [https://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/11046/1/Efecto de la ablacion unilateral del pedunculo ocular sobre el tiempo de maduracion de los ovocitos y fecundidad de Penaeus vannamei.pdf](https://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/11046/1/Efecto%20de%20la%20ablacion%20unilateral%20del%20pedunculo%20ocular%20sobre%20el%20tiempo%20de%20maduracion%20de%20los%20ovocitos%20y%20fecundidad%20de%20Penaeus%20vannamei.pdf).
- Torfs, P., Nieto, J., Cerstiaens, A., Boon, D., Baggerman, G., Poulos, C., Waelkens, E., Derua, R., Calderón, J., De Loof, A., Schoofs, L. 2001. Pyrokinin neuropeptides in a crustacean: Isolation and identification in the white shrimp *Penaeus vannamei*. *European Journal of Biochemistry*, 268(1), 149–154. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.01858.x.
- Treece, G. D., Yates, M. E. 1993. Manual del laboratorio para el cultivo de Larvas de Camarón Peneido. Marine Advisory Service Sea Grant College Program.
- Treerattrakool, S., Panyim, S., Udomkit, A. 2011. Induction of ovarian maturation and spawning in *Penaeus monodon* broodstock by double-stranded RNA. *Marine Biotechnology*, 13(2), 163–169. doi:10.1007/s10126-010-9276-0.
- Tsukimura, B., Kamemoto, F. I. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 92(C), 59–66. doi:10.1016/0044-8486(91)90008-U.
- Wall, D., Paterson, B., Mohan, R. 2009. Behaviour of juvenile mud crabs *Scylla serrata* in aquaculture: Response to odours of moulting or injured crabs. *Applied Animal Behaviour Science*, 121(1), 63–73. doi:10.1016/j.applanim.2009.08.005.
- Wei, J., Zhang, X., Yu, Y., Huang, H., Li, F., Xiang, J. 2014. Comparative transcriptomic characterization of the early development in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PLoS ONE*, 9(9), 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0106201.
- Wyatt, T. 2003. Pheromones and animal behaviour: Communication by smell and taste (1st ed., Vol. 21). Cambridge University Press: New York.
- Wyatt, T. D. 2017. Pheromones. *Current Biology*, 27(15), R739–R743. doi:10.1016/j.cub.2017.06.039.
- Yano, I., Kanna, R. A., Oyama, R. N., Wyban, J. A. 1988. Mating behaviour in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Marine Biology*, 97(2), 171–175. doi:10.1007/BF00391299.
- Yano, Isao. 1987. Effect of 17 α -hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 61(1), 49–57. doi:10.1016/0044-8486(87)90337-1.
- Zacarias, S., Carboni, S., Davie, A., Little, D. C. 2019. Reproductive performance and offspring quality of non-ablated Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under intensive commercial scale conditions. *Aquaculture*, 503(June 2018), 460–466. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.01.018.
- Zacarias, S., Fegan, D., Wangsoontorn, S., Yamuen, N., Limakom, T., Carboni, S., Davie, A., Metselaar, M., Little, D. C., Shinn, A. P. 2021. Increased robustness of postlarvae and juveniles from non-ablated Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* , broodstock post-challenged with pathogenic

isolates of *Vibrio parahaemolyticus* (Vp AHPND) and white spot disease (WSD). Aquaculture, 532(October 2020), 736033. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736033.

Zhang, D., Terschak, J. A., Harley, M. A., Lin, J., Hardege, J. D. 2011. Simultaneously hermaphroditic shrimp use lipophilic cuticular hydrocarbons as contact sex pheromones. PLoS ONE, 6(4). doi:10.1371/journal.pone.0017720.

Anexos

Anexo A

Tabla 5. Interpretación de los valores del coeficiente V de Cramer (Lee, 2016).

Valor estimado	Interpretación de la asociación
0-0.1	No existe
0.11-0.20	Débil
0.21-0.40	Moderada
0.41 -0.60	Relativamente fuerte
0.61-0.80	Fuerte
0.81-1.00	Muy fuerte