

## CONTROL DE LA REPRODUCCION DE CAMARONES MARINOS

Jorge Alfaro Montoya

Estación de Biología Marina, Escuela de Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

### RESUMEN

El entendimiento de la biología reproductiva básica es necesario para el mejoramiento de la producción de gametos de camarones. Esta presentación revisará nuestro conocimiento actual en materia de determinación sexual, control hormonal de la maduración, fertilización, y técnicas para la producción comercial de gametos y desove. La maduración controlada de camarones es una actividad comercial; sin embargo, no se conoce el modelo genético de los sexos, ni se ha desarrollado la reversión de sexos y producción de monosexos. La fertilización *in vitro* de *Penaeus* es aun una técnica de bajos rendimientos, y la criopreservación de embriones o larvas no existe. La ablación ocular continúa siendo la técnica de manejo hormonal para la maduración de hembras, aunque la aplicación de serotonina podría ser una alternativa en el futuro cercano. El avance logrado en producción de espermátóforos y en el entendimiento de los problemas asociados con su calidad, son nuevas contribuciones para el mejoramiento de la reproducción controlada de camarones.

### ABSTRACT

The understanding of basic reproductive biology is necessary for the improvement in the production of shrimp gametes. This presentation will review our current knowledge on subjects like sex determination, hormonal control of maturation, fertilization, and techniques for commercial

gamete production and spawning. The controlled reproduction of shrimp is a commercial activity; however, the genetic model for sex determination and sex reversal have not been established. *In vitro* fertilization and embryo cryopreservation have not been developed. Eyestalk ablation is still the only hormonal technique for female maturation, but serotonin treatment could be a new alternative. The advance on spermatophore production and the understanding of the problems involved in its quality are new contributions for the controlled reproduction of shrimp.

### BIOLOGIA REPRODUCTIVA

#### Determinación del sexo

La determinación del sexo en crustáceos está controlada por dos mecanismos, el heterogamético y el poligénico. El heterogamético es el más ampliamente distribuido entre los crustáceos y existen dos tipos diferentes de heterogametismo (GINSBURGER-VOGEL y CHARNIAUX-COTTON 1982):

a) Especies con machos homogaméticos, como ocurre en el camarón de salmuera, *Artemia*: macho = ZZ, hembra = ZW

b) Especies con machos heterogaméticos, como en el cangrejo *Pachygrapsus*: macho = XY, hembra = XX

El concepto de heterogametismo se refiere a un mecanismo de determinación sexual controlado

por un par de cromosomas sexuales. Por el contrario, el mecanismo poligénico involucra a un mayor número de cromosomas autosómicos.

Independientemente de los mecanismos de determinación genética, los crustáceos comparten las siguientes características: a) cada individuo de una especie posee los genes para hembra y macho, b) la expresión genética, desarrollo y actividad de la glándula androgénica (GA) son responsables de la morfogénesis de macho, c) la ausencia de la GA desencadena la morfogénesis de hembra.

La reversión sexual mediante remoción e implante de GA se ha realizado con éxito en varios crustáceos inferiores. Desde la perspectiva de acuicultura, *Macrobrachium rosenbergii* es el decápodo que más se ha estudiado en este campo (SAGI 1988). La remoción de ambas GA, en ejemplares jóvenes (1,0 g) de *M. rosenbergii*, transforma al individuo en neo-hembra, que es el término empleado para describir a un individuo genéticamente macho y fenotípicamente hembra. El implante de GA en hembras, origina el desarrollo de las características masculinas, produciendo un neo-macho.

Los experimentos en este campo han permitido evaluar la progenie de neo-hembras con machos de *M. rosenbergii* y los resultados indican, tentativamente, que esta especie es heterogamética, con el macho homogamético (ZZ, SAGI y COHEN 1990).

Desde el punto de vista práctico en acuicultura, estos descubrimientos indican que mediante la producción de neo-hembras y su apareamiento con machos, se pueden obtener lotes de postlarvas 100% machos. En camarones marinos del género *Penaeus*, la tasa de crecimiento de machos y hembras en estanques de cultivo comercial es semejante, por lo que aparentemente no se justifica la aplicación práctica de estos principios; sin embargo, el conocimiento científico debe ampliarse. No existen reportes publicados sobre manipulación de GA en *Penaeus*, pero la localización de la GA se ha reportado para *P. japonicus* (PAYEN *et al.* 1982), *P. vannamei* y *P. stylirostris* (ALFARO 1994).

## Control hormonal de la maduración

Las fuentes descritas de hormonas involucradas en reproducción de crustáceos decápodos son la médula terminal – órgano X del ganglio óptico, la glándula del seno, el cerebro, los ganglios torácicos, la glándula androgénica, el órgano mandibular, los ovarios y el órgano Y. Los crustáceos con ojos pedunculados presentan un grupo de células neurosecretoras en el pedúnculo denominadas órgano X. Estas células envían la mayoría de sus axones a un órgano neurohemal, llamado glándula del seno (QUACKENBUSH 1986). La médula terminal – órgano X sintetiza polipéptidos que son empacados en vesículas neurosecretoras y transportadas intra-axónicamente a la glándula del seno, donde son almacenadas y liberadas como pequeños péptidos (ANDREW 1983).

El complejo órgano X – glándula del seno está implicado en el control de procesos como metabolismo de azúcar y calcio, reproducción, muda, osmoregulación, aclimatación estacional térmica, migración de pigmentos retinales y cambios de color. La hormona concentradora de pigmentos rojos y la hormona adaptadora de luz del pigmento retinal distal, fueron las primeras neurohormonas de invertebrados en ser completamente caracterizadas bioquímicamente (JOSEFSSON 1983). Otras hormonas recientemente caracterizadas son la hormona de la muda (CHANG 1985), la hormona hiperglicémica y la hormona inhibidora de la muda (BENZIE 1998).

El mecanismo que se ha propuesto para explicar el control de la maduración es un modelo antagónico, que establece la síntesis de una hormona inhibidora de la gónada (HIG), en el órgano X. Esta hormona inhibe o compite con una hormona estimuladora de la gónada (HEG), producida en el cerebro y ganglios torácicos. La HEG estimula la vitelogénesis secundaria en hembras, espermatogénesis, hipertrofia del ducto deferente e hipersecreción de la glándula androgénica en machos (ADIYODI y SUBRAMONIAM 1983). La acción de la HEG parece estar mediada a través de hormonas esteroides. TALBOT (1981) sugiere que las células foliculares pueden ser la fuente de esteroides femeninos, y FAIRS *et al.* (1990) propusieron que el desarrollo ovárico y la maduración de oocitos en

crustáceos puede estar regulada por hormonas esteroides en forma similar a peces y anfibios. En machos de *P. vannamei* la inyección de 17 - alfa-metil testosterona genera un mejoramiento significativo de la calidad de los espermatozoides (ALFARO 1996). Complementariamente, el órgano mandibular sintetiza esteroides y terpenoides que estimulan el desarrollo ovárico (TSUKIMURA y KAMEMOTO 1991).

Recientemente se demostró que el neurotransmisor 5-hidroxi-triptamina (serotonina) genera el desarrollo de oocitos del langostín, *Procambarus clarkii*, induciendo la liberación de la HEG (SAROJINI *et al.* 1995). Este principio fue evaluado en la maduración y desove de *P. vannamei*, como alternativa a la ablación ocular (VACA y ALFARO, en revisión).

### Fertilización

La fertilización es externa. Al momento de la liberación de los oocitos, éstos se unen a las espermias que son retenidas en el tético de la hembra, ya sea en receptáculos seminales (tético cerrado) o en la superficie externa (tético abierto). La espinia de la esperma se une en forma primaria a la envoltura vitelina del oocito, seguidamente la esperma experimenta una reacción acrosomal que culmina con la unión permanente y fusión de núcleos. El oocito experimenta una reacción cortical iniciada por el contacto con el agua marina y finaliza con la formación de una envoltura de eclosión (CLARK *et al.* 1984; PILLAI y CLARK 1988).

La fertilización *in vitro*, técnica común en peces, no se ha logrado con éxito en el género *Penaeus*. El primer reporte se publicó en 1973 generando 10% de eclosión en *P. aztecus* (CLARK *et al.* 1973); recientemente MISAMORE y BROWDY (1997) reportaron tasas de fertilización *in vitro* de 2,48 % en *P. setiferus* y 3,88% en *P. vannamei*. ALFARO *et al.* (1993b) aplicaron una técnica desarrollada para *Sicyonia ingentis*, en *P. occidentalis*, sin lograr resultados positivos. La información generada al presente parece indicar que existen aspectos de la interacción huevo-esperma que no están bien comprendidos. Complementariamente, no se ha reportado éxito en la criopreservación de embriones o larvas de penaeidos (BENZIE 1998).

## TECNICAS DE REPRODUCCION CONTROLADA

### Maduración controlada

La maduración y apareamiento en laboratorio requiere de tanques ovales o circulares de área (15 m<sup>2</sup>) y diámetro (3,7 m) amplios para facilitar el comportamiento de cortejo y cópula. La profundidad de agua entre 40 y 50 cm es adecuada y permite observar claramente el desarrollo de los ovarios. Machos y hembras se siembran en una proporción 1:1 y a una densidad máxima de 7 camarones/ m<sup>2</sup>.

Se utilizan aguas de buena calidad y alta transparencia; la temperatura óptima es 29°C y en este sentido CHAMBERLAIN (1988) establece la importancia de mantener una baja fluctuación en el rango de 26 a 30°C. Salinidades sobre 35 partes por mil no son beneficiosas, un pH de 8,0 es favorable. Los niveles de amonio y nitrito se mantienen al mínimo mediante altas tasas de recambio de agua nueva (200 - 300%) en sistemas abiertos, o con biofiltros y bajas tasas de recambio diario (30%), en sistemas semi-cerrados.

La intensidad de luz debe ser reducida; se recomienda intensidades de 5,2  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , que es equivalente a una batería de 4 lámparas fluorescentes (40 W) de 1,2 m, colgadas a 1,5 m sobre el nivel del agua. El fotoperíodo se considera de importancia secundaria en penaeidos tropicales (CHAMBERLAIN y LAWRENCE 1981, CHAMBERLAIN 1988).

La rutina diaria de mantenimiento implica remoción de muertos, mudas y restos de alimento. La alimentación consiste de productos fresco-congelados, suministrados individualmente a horas diferentes del día. Los principales productos utilizados son calamares y gusanos marinos, complementados con almejas y pescado.

### Ablación del pedúnculo ocular

La remoción del órgano X - glándula del seno mediante ablación del pedúnculo ocular altera virtualmente todos los aspectos fisiológicos del animal (QUACKENBUSH 1986). Una de esas alteraciones, el desarrollo prematuro o no estacional de

las gónadas, fue primeramente observado por PA-NOUSE (1943) y descrito por primera vez en un camarón peneido (*Penaeus duorarum*) por CAI-LOUET (1972). Los primeros intentos se basaron en ablación bilateral, produciendo maduración rápida de los ovarios con tasas altas de mortalidad y reabsorción de óvulos. El problema se controló mediante la ablación unilateral (AQUACOP 1975). De esta forma se dio origen a un simple procedimiento que se aplica mundialmente, a escala comercial, para inducir la maduración de numerosas especies de camarones peneidos.

La ablación se practica normalmente solo en hembras; sin embargo, la ablación en machos mejora la producción de espermas (LEUNG-TRUJILLO y LAWRENCE 1985, ALFARO y LOZANO 1993). Cualquiera de los dos pedúnculos puede ser utilizado para la aplicación de una de las 3 técnicas descritas en la literatura (PRIMAVERA 1985, TREECE y YATES 1988): punción, ligado, o cauterización.

Para reducir la mortalidad es recomendable practicar la ablación en horas de la mañana cuando la temperatura es más fresca; también se puede aclimatar los animales a temperaturas frías (23 - 24°C) antes de aplicar el procedimiento, y posteriormente subir gradualmente la temperatura, antes de regresar al tanque de maduración.

Es fundamental seleccionar para ablación solo ejemplares que presentan exoesqueleto duro (intermuda), debido a que la ablación de ejemplares en postmuda temprana causa mortalidad (AQUACOP 1979) y de ejemplares en premuda tardía retrasa el desarrollo de los ovarios (CROCOS y KERR 1983). En la práctica, esto se logra mediante tacto y observación; organismos recién mudados son blandos y los que están listos para mudar presentan manchas blancas en el exoesqueleto. Si se desea mayor certeza en la clasificación de estados de muda se pueden realizar observaciones microscópicas rápidas de urópodos frescos, según técnica descrita por ROBERTSON *et al.* (1987).

### **Eyaculación e inseminación artificial**

Los laboratorios comerciales de maduración y desove utilizan comúnmente el apareamiento na-

tural en los tanques; sin embargo, también existen hoy día unidades de producción basadas en la eyaculación e inseminación artificial.

Esta modalidad tecnológica permite reducir los problemas de apareamiento encontrados en tanques de maduración, donde se estima un rendimiento de 3 - 5% de hembras apareadas adecuadamente por noche. Además, se elimina la necesidad de utilizar tanques de diámetro ancho.

Hembras en estado máximo de maduración se seleccionan al atardecer (en caso de fotoperíodo normal) y se mantienen en un reservorio durante la inseminación. Al mismo tiempo se seleccionan machos con espermatóforos bien desarrollados y apariencia normal (ALFARO y LOZANO 1993) y se procede a la eyaculación manual. La eyaculación se practica tomando al macho con una mano y presionando suavemente las ampulas terminales con los dedos pulgar e índice, hasta lograr la expulsión parcial del espermatóforo, luego se remueve completamente con una pinza fina sin tocar el tejido de las aberturas genitales para evitar daños al animal. Los espermatóforos se mantienen en viales secos hasta el momento de la inseminación. El sistema reproductor del macho puede sufrir invasión bacteriana generando sistemas ennegrecidos y espermatóforos no útiles (ALFARO *et al.* 1993a); también el macho puede presentar espermatóforos deteriorados, sin infección, que deben ser removidos para estimular el desarrollo de nuevos espermatóforos (ALFARO y LOZANO 1993).

La inseminación se inicia con la toma de los espermatóforos (2 a 4 sub-unidades) entre los dedos pulgar e índice para exprimir su contenido y formar una pequeña masa de espermas. El contenido de espermas en la masa es inferior al contenido en el espermatóforo entero (ALFARO, datos no publicados) por lo que se recomienda utilizar más de 2 sub-unidades para la inseminación.

Seguidamente se toma la hembra y se le aplica papel absorbente en el tético. La masa de espermas se toma con unas pinzas finas humedecidas en agua de mar, para luego esparcirla entre los terceros y cuartos pares de pereiópodos. La hembra inseminada se sujeta entre los dedos y se regresa al reservorio, siempre manteniéndola entre los dedos, con

el propósito de evitar remoción de la masa de espermias. Luego de unos minutos se deja libre y se observa su comportamiento y posible remoción de la masa de espermias.

### Desove controlado

Hembras apareadas o inseminadas artificialmente se pasan a tanques de 500 L, comúnmente de forma cilíndrica y color negro. Se coloca una hembra por tanque y se suministra aireación suave. El agua debe ser de excelente calidad, para lo que se somete a filtración de 1  $\mu$ m, carbón activado, y desinfección (MACVEY y FOX 1983); se recomienda la adición de EDTA como agente quelante de metales pesados, a razón de 10 mg/L (CHAMBERLAIN y LAWRENCE 1981). PRIMAVERA (1985) recomienda no exceder de 3.000 huevos/L para evitar bajas tasas de eclosión. El número de huevos está relacionado con la talla de la hembra; ejemplares de 34 – 50 g de *P. stylirostris* producen alrededor de 150.000 a 200.000 huevos por desove (CHAMBERLAIN y LAWRENCE 1981, PIZARRO y ALFARO 1994).

### REFERENCIAS

- Adiyodi, R. G. y T. Subramoniam. 1983. Arthropoda – Crustacea ( oogenesis, oviposition and oosorption ). En: K. G. Adiyodi (ed.), Reproductive biology of crustacea, vol. 1: oogenesis, oviposition and oosorption, John Wiley and Sons Ltd., London, p. 443-495.
- Alfaro, J. 1994. Ultraestructura de la glándula androgénica, espermatogénesis y oogénesis de camarones marinos (Decapoda: Penaeidae). Rev. Biol. Trop. 42:121-129.
- Alfaro, J. 1996. Effect of 17 alpha – methyltestosterone and 17 alpha – hydroxyprogesterone on the quality of white shrimp *Penaeus vannamei* spermatophores. J. World Aquacult. Soc. 27: 487-492.
- Alfaro, J., A. L. Lawrence y D. Lewis. 1993a. Interaction of bacteria and male reproductive system blackening disease of captive *Penaeus setiferus*. Aquaculture 117:1-8.
- Alfaro, J., J. A. Palacios, T. M. Aldave y R. A. Angulo. 1993b. Reproducción del camarón *Penaeus occidentalis* (Decapoda: Penaeidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 41:563-572.
- Alfaro, J. y X. Lozano. 1993. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 24:522-529.
- Andrew, D. 1983. Neurosecretory pathways supplying the neurohemal organs in crustacea. En: A.P. Gupta (ed.), Neurohemal organs of arthropods: their development, evolution, and functions. Charles C. Thomas, Springfield, IL, USA, p. 90-117.
- Aquacop. 1975. Maturation and spawning in captivity of penaeid shrimp: *Penaeus merguensis* de Man, *P. japonicus* Bate, *P. aztecus* Ives, *Metapenaeus ensis* de Haan and *P. semisulcatus* de Haan. Proc. World Maricult. Soc. 6:123-132.
- Aquacop. 1979. Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proc. World Maricult. Soc. 10:445-452.
- Benzie, J. A. H. 1988. Penaeid genetics and biotechnology. Aquaculture 164:23-47.
- Caillouet, A. C., Jr. 1972. Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. Proc. World Maricult. Soc. 3: 205-225.
- Chamberlain, G. W. 1988. Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp. Doctoral dissertation, Texas A&M University, College Station, TX, 210 p.
- Chamberlain, G. W. y A. L. Lawrence. 1981. Effect of light intensity and male and female eyestalk ablation on reproduction of *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. J. World Maricult. Soc. 12:357-372.
- Chang, E. S. 1985. Hormonal control of molting in decapod crustacea. Amer. Zool. 25: 179-185.
- Clark, W. H., A. I. Yudin, F. J. Griffin y K. Shigekawa. 1984. The control of gamete activation and fertilization in the marine penaeidae, *Sicyonia ingentis*. En: W. Engels (ed.), Advances in invertebrate reproduction 3, Elsevier, New York, p. 459-472.
- Clark, W. H., P. Talbot, R. A. Neal, C. R. Mock y B. R. Salser. 1973. In vitro fertilization with non – motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. Mar. Biol. 22:353-354.
- Crocos, P. J. y J. D. Kerr. 1983. Maturation and spawning of the banana prawn *Penaeus merguensis* de Man (Crustacea: Penaeidae) in the Gulf of Carpentaria, Australia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 69: 37-59.
- Fairs, N. J., P. T. Quinlan y L. J. Goad. 1990. Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titers during vitellogenesis in *Penaeus monodon*. Aquaculture 89:83-99.
- Ginsburger – Vogel, T. y H. Charniaux – Cotton. 1982. Sex determination. En: L. G. Abele (ed.), The biology of crustacea, vol. 2: embriology, morphology, and genetics. Academic Press, New York, p. 257-281.

- Josefsson, L. 1983. Chemical properties and physiological actions of crustacean chromatophorotropins. *Amer. Zool.* 23:507-515.
- Leung-Trujillo, J. y A. L. Lawrence. 1985. The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. *J. World Maricult. Soc.* 16:258-266.
- MacVey, J. y J. Fox. 1983. Hatchery techniques for penaeid shrimp utilized by Texas A & M-NMFS Galveston Laboratory Program. *CRC Handbook of mariculture*, vol. 1, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p. 129-154.
- Misamore, M. y C. Browdy. 1997. Evaluating hybridization potential between *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* through natural mating, artificial insemination and in vitro fertilization. *Aquaculture* 150:1-10.
- Panouse, J. B. 1943. Influence de l'ablation du pédoncule oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette *Leander serratus*. *C.R. Acad. Sci. Paris* 217:553-555.
- Payen, G. G., L. Chin, A. Laubier - Bonichon y H. Charniaux - Cotton. 1982. The androgenic gland of the shrimp *Penaeus japonicus* Bate. Description, role, and control by the eyestalk. *Gen. Comp. Endocrin.* 46:384.
- Pillai, M. C. y W. H. Clark. 1988. Hatching envelope formation in shrimp (*Sicyonia ingentis*) ova: origin and sequential exocytosis of cortical vesicles. *Tissue & Cell* 20:941-952.
- Pizarro, F. y J. Alfaro. 1994. Reproductive performance of *Penaeus stylirostris* females injected with heat-killed *Vibrio alginolyticus*. *J. World Aquacult. Soc.* 25:576-578.
- Primavera, J. H. 1985. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. *Proceedings First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/ Shrimps*, Iloilo City, Philippines, SEAFDEC Aquaculture Department, p. 47-64.
- Quackenbush, L. S. 1986. Crustacean endocrinology, a review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43:2271-2282.
- Robertson, L., W. Bray, J. Leung-Trujillo y A. L. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J. World Aquacult. Soc.* 18:180-185.
- Sagi, A. 1988. The androgenic gland in crustacea - with emphasis on the cultured freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* - a review. *The Israeli J. Aquacult.* 40: 107-112.
- Sagi, A. y D. Cohen. 1990. Growth, maturation and progeny on the cultured freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* males. *World Aquacult.* 21:87-90.
- Sarajini, R., R. Nagabhushanam y M. Fingerman. 1995. Mode of action of the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: an *in vitro* and *in vivo* study. *J. Exp. Zool.* 271:395-400.
- Talbot, P. 1981. The ovary of the lobster *Homarus americanus*: Structure of the mature follicle and origin of the chorion. *J. Ultrastruct. Res.* 76:249-262.
- Treece, G. D. y M. E. Yates. 1988. Laboratory manual for the culture of penaeid shrimp larvae. Sea Grant Publication No. TAMU-SG-88-202, Texas A&M University, College Station, TX, 75 p.
- Tsukimura, B. y F. I. Kamemoto. 1991. *In vitro* stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 92: 59-66.
- Vaca, A. y J. Alfaro. 1999. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture* ( en revisión).