

Estimulación eléctrica en la expulsión de espermátóforos de *Cryphiops caementarius* según tamaños y estados de muda

Electrical stimulation in the expulsion of *Cryphiops caementarius* spermatophores according to size and molting stages

Walter Reyes-Avalos^{1,2}, Anghela Mogollón-Calderón¹, Adelhi Fuentes-Muñoz¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la estimulación eléctrica en la expulsión de espermátóforos de *Cryphiops caementarius* según tamaños y estados de muda. Se evaluaron camarones machos de 3.0 a 10.8 cm de longitud total, capturados en el río Lacramarca (Ancash, Perú) y mantenidos en acuarios (55 L). Para la expulsión de los espermátóforos se aplicaron choques eléctricos de 4 V (n=15), 6 V (n=12) y 8 V (n=6), sobre los coxopoditos del quinto par de periópodos (1-3 s y por 2-3 veces). La expulsión de espermátóforos se logró con 4 a 8 V, independiente del tamaño de los camarones, pero hubo mayor expulsión con 6 y 8 V en ejemplares de 5-8 cm de tamaño y en muda C, Do y D1. No hubo expulsión de espermátóforos en camarones en muda B con ningún estímulo eléctrico.

Palabras clave: apareamiento, electroeyaculación, espermatozoides, reproducción

¹ Laboratorio de Acuicultura Ornamental, Departamento Académico de Biología, Microbiología y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Perú

² E-mail: wreyes@uns.edu.pe

Recibido: 5 de julio de 2021

Aceptado para publicación: 6 de marzo de 2022

Publicado: 27 de abril de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of electrical stimulation on the expulsion of *Cryphiops caementarius* spermatophores according to size and molting stages. Male prawns from 3.0 to 10.8 cm total length, caught in the Lacramarca River (Ancash, Peru) and kept in aquariums (55 L) were evaluated. For spermatophores expulsion, electric shocks of 4 V (n=15), 6 V (n=12) and 8 V (n=6) were applied on the coxopodites of the fifth pair of pereopods (1-3 s and for 2-3 times). Spermatophores expulsion was achieved with 4 to 8 V, independent of the size of the prawn, but there was greater expulsion with 6 and 8 V in specimens of 5-8 cm in size and in C, Do and D1 molting. There was no expulsion of spermatophores in molting B prawn with any electrical stimulus.

Key words: mating, electroejaculation, spermatozoa, reproduction

INTRODUCCIÓN

El camarón *Cryphiops caementarius* es de interés comercial por su alta densidad poblacional en los ríos de la costa del Perú (Zacarias y Yépez, 2015), cuya extracción en 2019 fue de 1122 t (PRODUCE, 2020), cantidad similar a los años previos. Además, la especie tiene potencial para el cultivo, por lo que es necesario contribuir con el manejo de reproductores.

El sistema reproductor de *C. caementarius* macho localizado en el cefalotórax comprende un par de testículos con conductos deferentes cuya partes proximales están enrolladas, pero la parte media se extiende hasta la ampolla terminal, donde se almacenan espermatóforos listos para salir por el poro genital del coxopodito del quinto par de pereópodos (Lip, 1976), tal y como se presenta en *Macrobrachium amazonicum* (Paschoal y Zara, 2018), *M. rosenbergii* (Shen *et al.*, 2020) y *M. carcinus* (Ruiz *et al.*, 2020).

El espermatóforo de crustáceos decápodos almacena los espermatozoides (Becker y Bauer, 2020), pudiéndose colectar mediante disección del conducto deferente (Lin y Ting, 1986), así como por desprendimiento del

esternito de la hembra (López *et al.*, 2007), presión manual (Nimrat *et al.*, 2019) y por aplicación de corriente eléctrica en el poro genital (Costa *et al.*, 2016). Estas técnicas se aplican con fines de manejo de la reproducción y de mejoramiento genético; sin embargo, poca atención se ha dado al ciclo de muda que es el proceso fisiológico más importante de todo crustáceo. La relación de la muda con la formación de espermatóforos es reportada en *Litopenaeus vannamei* (Parnes *et al.*, 2006) y *Farfantepenaeus brasiliensis* (Braga *et al.*, 2014). En *M. acanthurus* se extraen espermatóforos en muda C (Costa *et al.*, 2016), mientras que en *C. caementarius* no se conocen los espermatóforos ni técnica alguna para su extracción. Por consiguiente, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la estimulación eléctrica en la expulsión de espermatóforos de *C. caementarius*, según tamaños y estados de muda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los camarones (n=33) fueron colectados del río Lacramarca (9°5'39" S, 78°5'39" W) (Ancash, Perú). La especie *C. caementarius* se reconoció según Méndez (1981) y De Grave y Fransen (2011). El sexo

del macho se verificó por la presencia del poro genital en cada coxopodito del quinto par de periópodos. Los animales fueron mantenidos en acuarios (55 L) en densidades de cuatro camarones por acuario y recibieron alimento balanceado (28% de proteína total). Para el tamaño de muestra se consideró emplear tres estímulos eléctricos (4, 6 y 8 V), cuatro estados de muda (B, C, Do y D1) y tres repeticiones. Los camarones fueron de 3.0 a 10.8 cm de longitud total (LT), medidos desde la escotadura post orbital hasta el extremo posterior del telson, con vernier (± 0.01 mm) y de 2.0 a 22.5 g de peso determinado con balanza digital (± 0.01 g). El estado de muda de los camarones se verificó según Da Silva *et al.* (2019), quienes consideran la postmuda (A y B), intermuda (C) y premuda (Do, D1, D2 y D3). Luego fueron agrupados en cuatro rangos de tamaño (3-4, 5-6, 7-8 y 9-10 cm de LT) y para el rango inferior se tuvo en cuenta el tamaño de la primera madurez sexual que es de 2.2 cm de LT (Lip, 1976).

Para la expulsión de los espermatozoides se aplicaron choques de corriente eléctrica de 4 V (n = 15 individuos), 6 V (n = 12) y 8 V (n = 6), sobre un coxopodito del quinto par de periópodos o en el centro de la quilla que une ambos coxopoditos. Para ello, se empleó un transformador de corriente (AC/DC), previamente calibrado con multímetro digital Konstar UT33D. La duración del choque eléctrico fue entre 1 a 3 s y se hizo por 2-3 veces. Los espermatozoides fueron medidos con ocular micrométrico (EM-15X Lomo) en microscopio óptico Carl Zeiss y luego se observó la morfología. Cuatro camarones de los grupos de 6 V y 8 V, pero en estado de muda C, fueron disectados para verificar la presencia y distribución de espermatozoides en el conducto deferente distal y en la ampolla terminal. Los espermatozoides fueron liberados de los espermatozoides y coloreados con azul de metileno.

En la investigación se tuvo en cuenta la Ley Peruana 27265 (Ley de Protección a los Animales Domésticos y a los Animales Sil-

vestres Mantenidos en Cautiverio) y se hizo todo lo posible para minimizar el sufrimiento durante el sacrificio de los animales en laboratorio. Los resultados de frecuencia de expulsión de espermatozoides fueron sometidos a análisis de Chi-cuadrado con nivel de significancia del 5%. Se empleó el Software SPSS v. 23 para Windows.

RESULTADOS

La mayor expulsión de espermatozoides (66.7%) fue lograda con 6 y 8 V ($X^2 = 9.258$, $p = 0.009$) (Figura 1a), en tanto que fue similar según el estado de muda (C: $X^2 = 0.768$, $p = 0.681$, Do: $X^2 = 5.127$, $p = 0.077$; D1: $X^2 = 1.756$, $p = 0.416$), aunque en muda B no expulsaron espermatozoides con ningún voltaje eléctrico (Figura 1b). Los camarones de 5-6 cm de LT ($X^2 = 12.833$, $p = 0.002$) y 7-8 cm de LT ($X^2 = 14.850$, $p = 0.001$) expulsaron mayor número de espermatozoides con 6 y 8 V, pero aquellos de 9-10 cm de LT ($X^2 = 2.750$, $p = 0.253$) y de 3-4 cm de LT ($X^2 = 2.555$, $p = 0.279$) el número de espermatozoides fue menor (Figura 1c) y estuvieron en muda C y D1. La estimulación eléctrica no causó alteración de los poros genitales ni ocasionó muertes hasta después de 15 días de culminado el experimento.

El espermatozoides consistió de un cordón blanquecino (Figura 2a), blando, pegajoso, con cubierta gruesa, de extremos abiertos y fueron de diversas formas (figuras 2b,c,d,e,f), pero al contacto con el agua perdieron adhesividad y consistencia en pocos segundos. En el conducto deferente distal no hubo formación de espermatozoides únicos, sino un solo cordón que se repliega hasta acumularse en la ampolla terminal (figuras 2g,h). Los espermatozoides se observaron dispersos en una matriz espesa y transparente dentro de los espermatozoides (Figura 2i). Los espermatozoides fueron de forma de paraguas evertido con un clavo recto y delgado que se proyecta desde el centro del núcleo (Figura 2j). La melanización de un poro genital fue

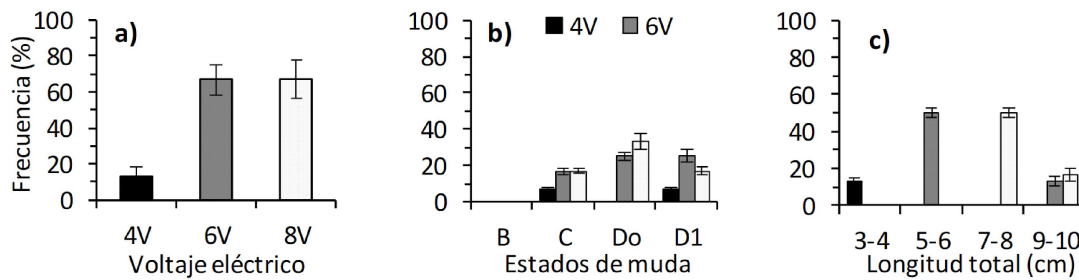


Figura 1. Frecuencia (%) de expulsión de espermatozoides de *C. caementarius* según: a) Voltaje eléctrico, b) Estados de muda y c) Longitud total

observado en dos camarones del grupo de 6 V (Figura 2k) antes de aplicar el estímulo eléctrico, y el espermatozoides extraído tuvo un extremo marrón de consistencia dura que fue el que taponó el poro genital; sin embargo, el resto correspondió al cordón blanquecino característico de un espermatozoides (Figura 2l).

DISCUSIÓN

La mayor expulsión de espermatozoides de *C. caementarius* se logró con 6 y 8 V, sin causar daño a los poros genitales. En cambio, en *M. rosenbergii* se logró la mayor expulsión de espermatozoides con 4.5-6.0 V (Moreno *et al.*, 2000) aunque también es efectivo con 7.4 V (Li y Tsai, 2000) y 9 V (Goldberg y Oshiro, 2000). No se observaron daños por efecto de la estimulación eléctrica como en *M. idella* donde la ampolla terminal se torna oscura por lisis del tejido al emplear 6 V (Joshi y Diwan, 1990).

La estimulación en *C. caementarius* con 6 y 8 V en muda Do ocasionó mayor liberación de espermatozoides, aunque también se obtuvo en muda C y D1, lo que amplía la posibilidad de encontrar camarones aptos para extraer espermatozoides. En *M. acanthurus* se extrae espermatozoides con 4.5-6 V y en ejemplares en muda C (Costa *et al.*, 2016). En cambio, la falta de respues-

ta al estímulo eléctrico se observó en muda B posiblemente debido a la consistencia blanda del exoesqueleto o por falta de espermatozoides en la ampolla terminal. En *L. vannamei* no hay espermatozoides 12 h antes ni después de la muda (Parnes *et al.*, 2006) y en *F. brasiliensis* hasta 24 h después de la muda (Braga *et al.*, 2014). Se requiere evaluar un mayor número de camarones en diferentes estados del ciclo de muda, especialmente en premuda tardía (D2) y en postmuda temprana (A).

En cuanto al tamaño de los camarones, la mayor expulsión de espermatozoides se logró en ejemplares de 5-6 cm de LT con 6 V y de 7-8 cm de LT con 8 V, lo que indica que estos voltajes son apropiados para dichas tallas. Similares resultados se reportan en *M. acanthurus* (Costa *et al.*, 2016). La menor expulsión de espermatozoides se obtuvo con 6 y 8 V en camarones de 3-4 cm y de 9-10 cm de LT, los que estuvieron en muda C y D1. En *M. rosenbergii*, se emplea 9 V independiente del tamaño del animal (Goldberg y Oshiro, 2000), aunque no se considera el estado de muda. Es probable que, por el menor tamaño de los camarones empleados en la investigación, algunos no estuvieron completamente desarrollados, aunque de acuerdo con Lip (1976), *C. caementarius* de 2.2 cm de longitud total posee espermatozoides en las ampollas terminales.

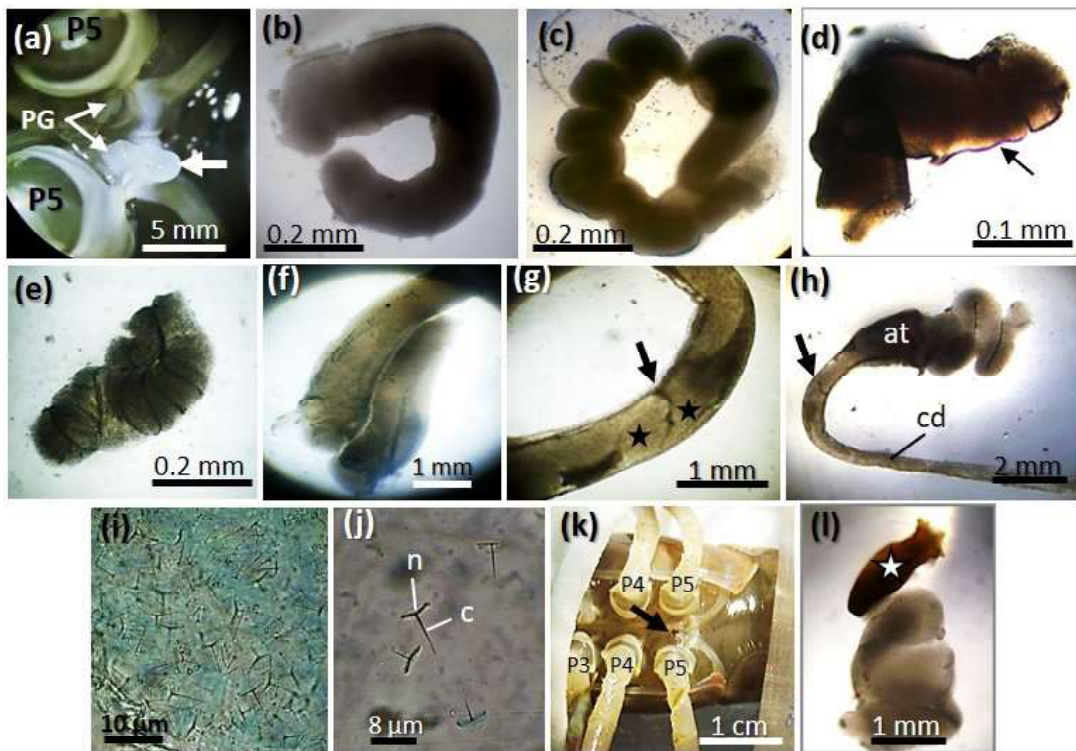


Figura 2. Macho *C. caementarius*. a) Espermátóforo saliendo de un poro genital (flecha). b) El mismo espermátóforo visto en microscopio a 4x. Observe los extremos abiertos del espermátóforo. c), d), e) y f) Formas de espermátóforos extraídos mediante estimulación eléctrica y mantenidos en agua dulce. g) Superposición de espermátóforos (*) en el conducto deferente distal (flecha negra). h) Conducto deferente distal y ampolla terminal de un espécimen fresco. Observe la acumulación de espermátóforos en la ampolla terminal. i) Espermatozoides dentro de matriz del espermátóforo. j) Espermatozoides maduros. k) Poro genital melanizado (flecha negra) antes de la estimulación eléctrica. l) Espermátóforo con un extremo melanizado (*). Abreviaturas: at: ampolla terminal. cd: conducto deferente distal. n: núcleo. c: clavo. PG: poro genital. P: peritópodo

El espermátóforo de *C. caementarius* es un cordón blanquecino que al salir de la ampolla terminal adquiere diferentes formas, y es de consistencia blanda y pegajosa, necesario para adherirse al esternito de la hembra durante el apareamiento. Similar consistencia posee el espermátóforo de *M. acanthurus* (Costa *et al.*, 2016), *M. amazonicum* (Paschoal y Zara, 2018) y *M. carcinus* (Ruiz *et al.*, 2020), aunque no se mencionaron las formas que presentan. Por otro lado, los espermátóforos de *C. caementarius* tuvie-

ron extremos abiertos, no reportado en otros palaemónidos y, probablemente sea consecuencia de la formación continua y la disposición de espermátóforos dentro del conducto deferente distal hasta su acumulación en la ampolla terminal. Estudios histológicos podrían determinar si hay formación continua de espermátóforos en el conducto deferente medio y distal y si poseen espermatozoides maduros, pues en este estudio se observaron espermatozoides de forma de paraguas evertido y con un clavo que se proyecta des-

de el centro del núcleo, idénticos a los de *M. rosenbergii* (Poljaroen *et al.*, 2010), *M. amazonicum* (Paschoal y Zara, 2018) y *M. carcinus* (Ruiz *et al.*, 2020).

Los estímulos eléctricos empleados no afectaron ni alteraron los poros genitales de *C. caementarius*. En cambio, la ampolla terminal se torna oscura al emplear 6 V en *M. idella* (Joshi y Diwan, 1990) y *M. rosenbergii* (Vijaya *et al.*, 2004). En *F. paulensis* hay melanización de los poros genitales después de 24 h de aplicar 9 V para la extracción de espermatóforos (Nakayama *et al.*, 2008). En el presente estudio, la aparente melanización de los poros genitales fue porque parte del espermatóforo se encontraba melanizado. Esto se relaciona con la acumulación excesiva de espermatóforos en la ampolla terminal, probablemente porque el macho no tuvo la oportunidad de aparearse. En *L. vannamei*, los espermatóforos restantes que se acumulan en la ampolla terminal se llegan a melanizar (Heitzmann *et al.*, 1993), pero el apareamiento reduce los restos de melanina de los poros genitales (Parnes *et al.*, 2006), que de no ser así ocasiona esterilidad irreversible y muerte (Alfaro-Montoya, 2010).

CONCLUSIONES

La estimulación eléctrica con 6 y 8 V aplicado sobre los coxopoditos del quinto par de periópodos de *C. caementarius* ocasiona mayor expulsión de espermatóforos en ejemplares de 5 a 8 cm de longitud total y en muda C, Do y D1. En cambio, los camarones en muda B, no responden a los estímulos eléctricos.

LITERATURA CITADA

1. **Alfaro-Montoya J. 2010.** The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaes*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): a review. *Aquaculture* 300: 1-9. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.12.008
2. **Becker C, Bauer RT. 2020.** Multiple matings and sperm competition. In: Cothran RD, Thiel M (eds). *The natural history of crustacea*. Vol VI. Reproductive biology. UK: Oxford University Press. p 332-363.
3. **Braga A, Lopes DLA, Poersch LH, Wasielesky W. 2014.** Spermatophore replacement of pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* after manual extrusion: Effect of molting. *Aquaculture* 433: 313-317. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.06.032
4. **Costa TV, Yosii-Oshiro LM, López-Greco LS, Melo EP, Mattos LA, Bambozzi-Fernandes A. 2016.** Determinación del voltaje y el tamaño del animal óptimos para la extracción de espermatóforos en el camarón de agua dulce *Macrobrachium acanthurus*. *Lat Am J Aquat Res* 44: 422-428. doi: 10.3856/vol44-issue2-fulltext-24
5. **Da Silva MAS, Ramiro BO, Neto MEA, Guerra RR. 2019.** Moulting cycle stages in *Macrobrachium rosenbergii* by setogenesis method. *Bol Inst Pesca* 45: e428. doi: 10.20950/1678-2305.2019.45.2.428
6. **De Grave S, Franssen CHJM. 2011.** Carideorum catalogus: the recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zool Med Leiden* 85: 30.ix.2011: 195-589.
7. **Goldberg RS, Oshiro MLY. 2000.** Eficiência da eletroejaculação de morfotipos machos do camarão-de-água-doce *Macrobrachium rosenbergii*. *Rev Bras Zootecn* 29: 1-5. doi: 10.1590/S1516-35982000000100001
8. **Heitzmann JC, Diter A, AQUACOP. 1993.** Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaes vannamei* Boone 1931: dependence on the intermolt cycle. *Aquaculture* 11: 91-98. doi: 10.1016/0044-8486(93)90225-N

9. **Joshi VP, Diwan AD. 1990.** Artificial insemination studies in *Macrobrachium idella* (Hilgendorf, 1898). In: Proc National Symposium on Freshwater Prawns. Kerala Agricultural University. India.
10. **Li SS, Tsai HJ. 2000.** Transfer of foreign gene to giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) by spermatophore-microinjection. Mol Reprod Dev 56: 149-154. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200006)-56:2<149::AID-MRD5>3.0.CO;2-U
11. **Lin MN, Ting YY. 1986.** Spermatophore transplantation and artificial fertilization in grass shrimp. B Jpn Soc Sci Fish 52: 585-589. doi: 10.2331/suisan.52.585
12. **Lip GB. 1976.** Primera madurez sexual del camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina, 1782 (Natantia: Palaemonidae) en el río Moche. Tesis de Biólogo. Trujillo: Univ. Nacional de Trujillo. Perú. 64 p.
13. **López LS, Vásquez F, Rodríguez EM. 2007.** Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater 'red claw' crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). Acta Zool-Stockholm 88: 223-229. doi: 10.1111/j.1463-6395.2007.00269.x
14. **Méndez M. 1981.** Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. Inf Inst Mar Perú 5: 1-170.
15. **Moreno CA, Graziani CA, Orta TJ. 2000.** Reproducción natural y artificial del camarón de río *Macrobrachium carcinus* (L.). Interciencia 25: 249-253.
16. **Nakayama C, Peixoto S, Lopes D, Vita G, Krummenauer D, Foes G, Cavallis R, et al. 2008.** Métodos de extrusão manual e eléctrica dos espermátóforos de reproductores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae). Cienc Rural 38: 2018-2022.
17. **Nimrat S, Playsin N, Jong-on B, Boonthai T, Vuthiphandchai V. 2019.** Chilled storage of banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) spermatophores with supplementation of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) extract. Aquac Res 51: 3581-3592. doi: 10.1111/are.14695
18. **Parnes S, Raviv S, Shechter A, Sagi A. 2006.** Males also have their time of the month! Cyclic disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in a marine shrimp. J Exp Biol 209: 4974-4983. doi: 10.1242/jeb.02586
19. **Paschoal LRP, Zara FJ. 2018.** Sperm count of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) populations with distinct life histories, with introduction of a simple counting method. Aquaculture 492: 368-374. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2017.12.046
20. **Poljaroen J, Vanichviriyakit R, Tinikul Y, Phoungpetchara I, Linthong V, Weerachatanukul W, Sobhon P. 2010.** Spermatogenesis as distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Zool Anz 249: 81-94. doi: 10.1016/j.jcz.2010.03.002
21. **[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2020.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2019.. [Internet]. Disponible en: <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oe-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/949-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2019>
22. **Ruiz TFR, Vidal MR, Gardinal MVB, Ribeiro K, Vicentini CA, Vicentini IBF. 2020.** Morphology of the male reproductive system of freshwater prawn *Macrobrachium carcinus* (Decapoda, Caridea): Functional and comparative aspects. J Morphol 281: 476-490. doi: 10.1002/jmor.21115

23. **Shen SQ, Li JW, Xu HJ, Yang JS, Ma WM, Qian GY. 2020.** Sexual characteristic development and sex identification of juvenile prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquac Res* 51: 3718-3728. doi: 10.1111/are.14721
24. **Vijaya N, Mariappan S, Surendraraj S, Venkataramani VK. 2004.** Broodstock development in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* by artificial insemination. *Indian J Fish* 51: 517-520.
25. **Zacarias S, Yépez V. 2015.** *Camarón de río Cryphiops caementarius (Molina, 1782)* en la costa centro-sur del Perú, 2007. *Inf Inst Mar Perú* 42: 398-415.