

Formación de grupos genéticos en el Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti*, por inseminación artificial

Ubaldo Bécquer Z., N. Hernández M., G. Espinosa L.

Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de La Habana
c/ 16 #114, entre 1ª y 3ª, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana (Cuba)
e-mail: ubqr@cim.co.cu

Resumen

Se presenta un procedimiento para obtener familias de medios hermanos paternos por inseminación artificial en el Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti*. El esperma maduro es diseccionado y extraído de los espermatozoides por electroeyaculación y presión manual de las coxas del quinto par de pereopodos, este producto se mezcla y se coloca en las estructuras sexuales de cuatro hembras maduras. Este procedimiento garantiza la formación de familias de medios hermanos paternos, criando la descendencia de un macho con dos hembras, controlando la reproducción y evaluando los parámetros genéticos en crías selectivas.

Summary

This paper presented a protocol to obtain paternal half-sib families in the Atlantic White shrimp *Litopenaeus schmitti* by artificial insemination. The mature sperm of the male is separated and removed from the spermatophores; this product is mixed and placed in the female external reproductive structure of four different mature female. By this way we can obtain paternal half-sib family, rearing offspring from two females by each male, and controlling the reproduction to assess genetic parameters and correlations in selective breeding.

Introducción

El mantenimiento de Camarones domesticados es un elemento importante en el desarrollo de una industria sostenible. En el Camarón Blanco del Atlántico, *Litopenaeus schmitti* el cierre del ciclo de cultivo en condiciones artificiales se informó por Bueno (1990) y Ramos *et al.* (1995). Una condición definitiva para la implementación de un programa de cría selectiva para Camarones Peneidos es el control de todo el ciclo de vida, incluyendo la reproducción, evitando con la introducción de organismos silvestres la posibilidad de contacto con patógenos.

Debido a los pocos estudios existentes sobre la estimación de parámetros genéticos en Camarones, la respuesta potencial a la selección es desconocida. Para implementar los mejores programas de mejoramiento genético basados en la selección, el conocimiento de parámetros, como la heredabilidad de la tasa de crecimiento relativo y las correlaciones genéticas entre caracteres de crecimiento son fundamentales. El uso de los mejores métodos basados en el conocimiento de estos parámetros permite obtener la máxima ganancia genética por generación.

El diseño más preciso y menos sesgado para la estimación de los parámetros genéticos es el de medios hermanos (Falconer y Mackay, 1996), donde un macho se aparee con varias hembras formando familias de medios hermanos paternos, la descendencia mantiene su individualidad por madres, midiéndose el carácter,

comparándose las varianzas fenotípicas. Para este diseño es necesario el control de la reproducción y el desarrollo de técnicas de inseminación artificial para llevar a cabo los apareamientos controlados.

Fonseca y Alaiza (2002), estimaron para Cuba en el año 2002, una producción 2 300 Tm de camarón con talla comercial que significa un rendimiento de aproximadamente 1,1 Tm/ha/año, sin embargo no se dispone de información a escala comercial de algún programa de mejoramiento genético de esta especie, entre otros aspectos por la carencia de metodologías estandarizadas para la formación y manejo de grupos genéticos. Con este trabajo pretendemos ofrecer un procedimiento para la formación de familias de medios hermanos paternos y hermanos fraternos en este Camarón.

Material y métodos

Se realizaron arrastres por barcos camaroneros comerciales en aguas del archipiélago Cubano ($23^{\circ}10'34''-19^{\circ}9'32''$ N y $74^{\circ}7'55''-84^{\circ}57'11''$ W): específicamente en la Bahía de Cienfuegos, para capturar progenitores del Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti*. Después se trasladaron a las instalaciones productivas del Centro de Desove de Yaguababo, Empresa de Producción de larvas y primeras postlarvas Yaguacam, provincia de Cienfuegos (80° W y 22° N) (Figura 1).

Figura 1. Mapa del archipiélago Cubano, mostrando la región de captura de la población silvestre de Camarón (en rojo) y el laboratorio donde se efectuaron los experimentos (en azul).



Los reproductores fueron sometidos a la manipulación comercial vigente contenida en los Procedimientos Operativos de Trabajo (Pérez-Jar y Jaime, 2002), con fines de maduración y reproducción. De forma general, estas instalaciones son locales cerrados, con tanques ovalados de fibra de vidrio pintados de negro en su interior, el fotoperíodo está controlado, se utiliza la técnica de sexos separados, con alimentación mezclada consistente en un balanceado de alto contenido proteico, que contiene Calamar. Se mantienen los reproductores a una densidad máxima de 300 g/m².

Para la obtención de familias de medios hermanos paternos y hermanos completos se utilizaron hembras maduras que no copulaban de forma natural, siendo sometidas a la inseminación artificial.

Entre las 19:30-20:00h se revisaron las hembras colocadas en los tanques de cópula natural, durante la mañana (11:00-12:00h) las que no habían copulado se trasladaron al local de desove donde se situaron en tanques de 100 l a una proporción de hasta cuatro hembras por recipiente, también se utilizaron ejemplares que maduraron durante la tarde en los tanques de hembras debido a las altas temperaturas (28-29°C). El criterio de selección de la hembra para la inseminación artificial fue el grado de maduración completa, estadio IV (Ramos y Primavera,1986).

Los machos fueron seleccionados durante la mañana y colocados en tanques de 100 l con aireación, todos los machos pesaron menos de 30 g. Para realizar las inseminaciones artificiales se empleó material de disección común, para el contraste del espermátforo y las células espermáticas todo lo necesario para la captura y mantenimiento de los animales, un microscopio estereoscópico o una lupa para aumentar hasta 2 veces el campo visual en la disección del espermátforo, todo el proceso se llevó a cabo bajo luz fluorescente.

Los machos que no tuvieron reacción positiva al girar el espermátforo en el ámpula terminal con el estímulo eléctrico eran rechazados, posteriormente se les aplicaba una ligera presión para facilitar la expulsión del espermátforo, éste se extrajo con la ayuda de las pinzas y se colocó en una placa Petri con agua de mar, después se trasladó a un portaobjeto donde se eliminó el material aglutinante y las alas, teniendo cuidado de cortar bien en la base para no perder masa espermática, después se presionó desde el extremo opuesto a las alas para expulsar toda la masa espermática. Realizado todo este proceso, se mezclaron las masas espermáticas de ambos espermátforos para evitar que no ocurriera la fertilización si existía un desarrollo asincrónico de la maduración gonadal masculina. Las porciones se separaban, y se adherían al extremo de una aguja y se colocaban en una hembra entre las coxas del segundo y tercer par de pereiópodos (más cercano al segundo). Esta región se secó con una gasa. Luego de colocados los espermátforos, se doblaron los apéndices y se liberó el ejemplar suavemente al tanque de desove correspondiente.

Para formar las familias de medios hermanos paternos se utilizaron las siguientes variantes:

- el producto sexual de un macho se coloca a dos hembras,
- el producto sexual de un macho se coloca a tres hembras y
- el producto sexual de un macho se coloca a cuatro hembras,

También se realizaron algunas pruebas para lograr la formación de familias por fertilización *in vitro*, el esperma fue tratado como si se fuera a realizar un análisis de calidad espermática. A la hembra en estadio IV de maduración se le extrajo la gónada mediante la disección completa y maceración en un homogenizador de tejidos, posteriormente se filtró hasta obtener los ovocitos, ambos productos sexuales se mezclaron en una placa Petri.

Las instalaciones de desove están climatizadas de manera semiautomática, presentan sensores instalados en algunos tanques, actúan sobre la temperatura ambiente para calentar o extraer aire y mantener la temperatura de los reservorios en 28°C, los tanques son de fibra de vidrio de color negro, cilindro-cónicos de más de 200 l de capacidad, tienen acceso a agua de mar filtrada con cartucho (5 µm) y tratada con luz ultravioleta y aire suministrado por un soplador.

En cada tanque de desove se colocaba una hembra inseminada.

Al día siguiente (7:00-8:00h) se anillaron las hembras desovadas y sólo los desoves de dos hembras con un macho común como mínimo se trasladaban para el área de eclosión.

Los desoves viables que no contribuyeron a la formación de familias se entregaban a la producción comercial.

El local de eclosión consta de tanques cilindro-cónicos de más de 100 l de capacidad cada uno, a los embriones "sembrados" se les somete a una fuerte aireación para evitar que se adhieran a las paredes del recipiente, también se instalan en un nivel superior bancos de luces fluorescentes, y tapas con un orificio central para la concentración de los nauplios. Los desoves se mantienen separados, conservándose la individualidad familiar, cuando eclosionan estos "huevos" y su número es suficiente para las necesidades de cría larvaria, se forman las familias.

Resultados

La estandarización de la metodología de formación de familias de medios hermanos paternos y hermanos fraternos por inseminación artificial se muestran en la Tabla 1, como se observa la variante 1 macho:2 hembras no permitió formar familias; aunque se obtuvieron desoves viables no correspondió nunca a dos hembras con el mismo macho. Esta variante no debe utilizarse para este objetivo, se emplea un elevado número de reproductores con resultados muy azarosos, las otras 2 variantes (1 macho:3 hembras y 1 macho:4 hembras) mostraron los mismos resultados aunque con la relación 1 macho:4 hembras, se utilizaron menor número de reproductores.

Tabla 1. Número de desoves y familias formadas en 3 razones sexuales evaluadas por la técnica de inseminación artificial para la formación de familias de medios hermanos paternos en el Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti*.

CONDICIÓN	1 macho: 2 hembras	1 macho: 3 hembras	1 macho : 4 hembras
Número hembras	68	60	44
Número machos	34	20	11
Número desoves	36	42	36
Número familias	-	09	10

El tamaño y calidad de los desoves de los parentales que contribuyeron a la formación de las familias, con la variante 1 macho:4 hembras, se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Tamaño y calidad de los desoves de las familias formadas.

Variable	H/♀ (x 1000)	N/♀ (x 1000)	% eclosión
Recorrido	90,4-361,6	12,5-84,0	3,4-35,6
Media ± DS	268,9 ± 83,21	28,6 ± 21,18	11,74

Nota: H/♀: huevos por desove; N/♀: nauplios por desove y % de eclosión

Aplicando esta metodología en un trabajo posterior se formaron 47 familias de hermanos fraternos y 23 familias de medios hermanos paternos, para evaluar los parámetros genéticos en *L. schmitti*.

Discusión

La relación 1 macho:4 hembras es más segura, se obtuvo la descendencia en nauplios de hasta cuatro hembras fertilizadas por un solo macho, es posible ampliar el número de fertilizaciones de un solo macho hasta seis hembras; dependiente entre otros factores de la calidad espermática presente en los machos.

Se obtuvo un recorrido de la variable nauplios por hembra de 12 500 a 84 000, correspondiendo éste último aproximadamente al 80% de los obtenidos diariamente en las instalaciones de producción con cópulas naturales de este mismo lote, la calidad de los desoves se mantuvo baja, promediando sólo la fertilización del 11% de los ovocitos. Ramos (1990) estandariza la técnica de fecundación artificial para esta especie con fines productivos, obteniendo hasta 27 700 nauplios por desove con un 19% de fertilización, compara la respuesta reproductiva de genitores provenientes de varias zonas silvestres y alude resultados diferentes de acuerdo a este factor, también planteó que estos promedios pueden aumentar con el aumento de la habilidad de los técnicos, el objetivo de este autor era elevar la producción de nauplios, inseminando a veces la hembra con el producto sexual de dos machos.

El hecho de que el parental común sea el macho, quien se aparea con diferentes hembras; presenta una ventaja sobre la variante de que el progenitor común sea la hembra, en este caso la progenie tendría que criarse separadamente en el tiempo, introduciendo un efecto adicional de parto o nacimiento, que se añade a un efecto ambiental diferente en cada crianza, además el parental macho sólo dona su esperma sin afectar el ambiente de sus descendientes (Kearsey y Pooni, 1998).

Todd (2002) plantea reconsiderar el empleo de las técnicas de inseminación artificial en la industria porcina debido a las siguientes ventajas genéticas como son:

- (a) aumento del mérito genético por la producción de descendientes provenientes de reproductores superiores,
- (b) reducción de la pérdida genética,
- (c) reducción de los costos de producción,
- (d) incremento de la precisión en la selección y
- (e) la posibilidad de utilizar complejos sistemas de cruzamiento.

En *L. vannamei* Arce *et al.* (2001) establecen programas de crías selectivas en el Instituto Oceánico en Hawaii, en las primeras experiencias formaban familias de medios hermanos maternos, inseminando a una hembra con dos machos diferentes, mediando dos semanas entre los desoves sucesivos, proponiéndose maximizar el número de familias de medios hermanos y reducir el tiempo de formación de las familias experimentaron algunas variantes de inseminación para producir familias de medios hermanos paternos, llegando a la misma metodología aplicada por nosotros en este trabajo, aumentaron los desoves (84%) y los nauplios viables por desove (24 400). Debemos adicionar a este procedimiento que la masa espermática de los dos espermátóforos individuales por macho deben mezclarse para evitar disminuir la fertilidad si existe desarrollo asincrónico de la gónada, descrito por Leung-Trujillo y Lawrence (1987) en *L. setiferus*.

El diseño más simple para las evaluaciones genéticas utilizando parientes, es el de familias de hermanos fraternos (*full-sibling*), pero las medidas de las varianzas no son un buen estimado de la varianza genética aditiva (V_A); porque también incluye al calcular la varianza entre familias, componentes de valores de varianza no-aditivos, como los efectos maternos y varianza de dominancia, que pueden sobreestimar la inferencia de la heredabilidad del carácter evaluado. El mejor método para estimar V_A y h^2 empleando parientes lo constituye el diseño jerárquico-anidado de familias de medios hermanos paternos. En este diseño una muestra aleatoria de machos (*sire*), se aparea cada uno con hembras (*dams*), en un número predeterminado, usualmente 2 ó 3; se obtienen medidas fenotípicas del carácter de interés, de una muestra de la descendencia por cada hembra, los descendientes por cada hembra representan familias de hermanos fraternos (*full-sibling*), porque tienen el mismo padre y la misma madre, y se encuentran relacionados con familias de medios hermanos, porque todos los descendientes poseen el mismo padre. De esta manera se anidan diferentes madres apareadas con un mismo macho, creando una estructura jerárquica. La varianza entre familias de medios hermanos se utiliza para estimar V_A , la varianza entre padres (*sires*), es un buen estimado de V_A . Cuando se utilizan familias de medios hermanos paternos se eliminan los efectos maternos en el estimado. Es importante que los descendientes se encuentren distribuidos al azar en las crías, abarcando todo el recorrido de la variación ambiental, de manera que las variaciones ambientales a que se someten los descendientes por cada padre (*sire*) no difieran de un promedio. Con este procedimiento se elimina la varianza ambiental (V_E), de la varianza entre familias de medios hermanos.

Los resultados de la fertilización *in vitro* fueron nulos, el esperma se obtiene adecuadamente incluso con valoración al microscopio biológico, pero al macerar la gónada femenina con el homogenizador de tejidos se explotan por la manipulación mecánica los ovocitos, no obteniendo fertilización. Este procedimiento fue informado por primera vez por Clark *et al.* (1973) en *Farfantepenaeus aztecus*, posteriormente Ling y Ting (1984, citados por Primavera, 1985) consignan una tasa de fertilización del 50% en *Penaeus monodon* cuando adicionan homogenados de esperma antes del desove, procedimiento de gran dificultad para aplicar en la formación de grupos genéticos. La continuación de estos estudios para el control de los apareamientos y obtención estable de familias de medios hermanos representa un reto a solucionar en un futuro.

Conclusiones

Se dispone de una metodología para la formación de grupos genéticos para la evaluación de parámetros genéticos y correlaciones en los programas de crías selectivas para *L. schmitti*, como herramienta para el inicio del mejoramiento genético de este recurso en Cuba y que se puede extender a otras especies de camarones del género *Litopenaeus*.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la empresa YAGUACAM, y a la dirección del Cultivo de Camarón en Cuba (GEDECAM), pertenecientes al Ministerio de la Industria Pesquera (MIP), y a la dirección del Centro de Investigaciones Marinas (CIM) de la Universidad de La Habana por el financiamiento para la realización de esta investigación. Este trabajo forma parte de una tesis de doctorado en cooperación con el Centro de

Investigaciones Biológicas del Noroeste, (CIBNOR) BCS (México). También se emplearon fondos de dos proyectos "Alma Mater" (UH) y otro financiado por el Consejo de Estado Cubano.

Bibliografía

1. Arce, S.M, S.M. Moss y B.J. Argue. (2001). Artificial Insemination and Spawning of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Implications for a Selective Breeding Program. UJNR Technical Report No. 28, Oceanic Institute, HI, USA
2. Bueno, S.L.S. (1990). Maturation and Spawning of the White Shrimp *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936, Under large scale rearing conditions. Journal of the World Aquaculture Society, 21(3):170-179
3. Clark, W.J.Jr., P. Talbot, R.A. Neil, C.R. Mock y B.R. Salsler. (1973). *In vitro* fertilization with non-motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. Marine Biology, 22:353-354
4. Falconer, D.S. y T.F.C. Mackay. (1996). Introduction to quantitative genetics. Logman, England, 464 pp
5. Fonseca, F. y R.F. Alaiza. (2002). Cuban Shrimp Enterprise. En: Shrimp News International, World Shrimp Farming 2003, R. Rosenberry. URL: <http://www.shrimpnews.com>
6. Kearsley, M. y H.S. Pooni. (1998). The general analysis of quantitative traits. En: Half-sib mating designs. Chapman y Halls. Chapter 5. 77-100
7. Leung-Trujillo, J.R y A.L. Lawrence. (1987). Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. Aquaculture, 65:363-370
8. Perez-Jar, L. y B. Jaime C. (2002). Manual de procedimientos operativos de trabajo: Producción de reproductores de Camarones Peneidos en ciclo cerrado. 01 Maduración y reproducción de camarones Peneidos. CIP, GEDECAM, MIP, Cuba. 71 pp
9. Primavera, J.H. (1985). A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. En: Y.P. Taki *et al.* Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimps. Aquaculture Department SEAFDEC, Iloilo, Philippines. 47-64
10. Ramos, L. y J.H. Primavera. (1986). Induced maturation in ablated *Penaeus notialis* and *Penaeus schmitti*. En: J.L. Mac Lean, L.B. Dizon y L.V. Hesillos. The First Asian Fisheries Society, Manila, Filipinas, 697-700
11. Ramos, L. (1990). Fecundidad artificial del Camarón Blanco *Penaeus schmitti*: Fecundidad y viabilidad de los desoves. Rev. Inv. Mar., 11(2)
12. Ramos, L., J. Molina, S. Samada y M. Espejo. (1995). Maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus schmitti*. Journal of the World Aquaculture Society, (26):183-187
13. Todd, M.S. (2002). Efficiency of Genetic Transfer Using AI Technology. Internal report, North Carolina State University, Raleigh