

## Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de embriones de *Cryphiops caementarius* (Crustacea, Palaemonidae) incubados *in vitro*

Walter Eduardo Reyes Avalos<sup>1</sup>, Silvia Gámez Diestra<sup>2</sup>, Henry Luján Monja<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Cultivo de Crustáceos. Departamento de Biología, Microbiología y Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa  
Av. Pacífico 508 Nuevo Chimbote-Ancash (Perú)  
e-mail: wreyes\_avalos@yahoo.com

<sup>2</sup> Asociación Acuicultura y Desarrollo (AQUADES)  
Chimbote (Perú)

### Resumen

Se determinó el efecto de la temperatura sobre la duración del desarrollo de embriones de *C. caementarius* incubados *in vitro*. Se emplearon 12 incubadoras cilindro-cónicas de 0,5 L. Las temperaturas usadas fueron de 22°C, 24°C, 26°C y 28°C. Una hembra ovífera fue obtenida en laboratorio cuyos huevos de 24 horas de desovados fueron extraídos, separados de las setas y sembrados en las incubadoras a una densidad de 500 huevos/L. La temperatura del agua afectó fuertemente ( $r=-0,998$ ) la duración del desarrollo de embriones de *C. caementarius*, siendo de 24 días a 22°C; de 20 días a 24°C; de 17 días a 26°C y de 15 días a 28°C. La proporción de larvas obtenidas a 22°C, 24°C y 28°C varió entre 33 y 35%; en cambio en 26°C se obtuvo 42% de larvas, diferencia ocasionada por el bajo flujo del aire y no al efecto de la temperatura del agua.

*Palabras clave:* Embrión, *Cryphiops*, temperatura, camarón, desarrollo.

### Summary

#### Effect of temperature on embryo development of *Cryphiops caementarius* (Crustacea, Palaemonidae) incubated *in vitro*

The effect in the duration of the development of embryos of *C. caementarius* was determined in incubation *in vitro*. Twelve 0,5 L cylinder conical incubators were used. The temperatures used were 22°C, 24°C, 26°C and 28°C. A berried female was brought to the laboratory and the eggs were extracted, separated and seeded in the incubators at a density of 500 eggs/L. The temperature of the water strongly affected ( $r=-0.998$ ) the duration of the incubation of embryos; being 24 days at 22°C; 20 days at 24°C, 17 days at 26°C and 15 days at 28°C. The proportion of larvae obtained at 22°C, 24°C and 28°C ranged between 33 and 35%; however at 26°C, 42% of larvae we viable, likely caused by low air flow and not the result of the water temperature.

*Key words:* Embryo, *Cryphiops*, temperature, prawn, development.

### Introducción

*Cryphiops caementarius* es el camarón de río de importancia comercial en el Perú (Yépez & Bandín, 1998) y tiene una amplia distribución latitudinal en la vertiente occidental de los andes, desde el río Taymí en el norte del Perú (06°32' S) (Amaya y Guerra, 1976) hasta el río Maipo en el norte de Chile (33°26' S) (Jara, 1997), pero es abundante en los ríos de Arequipa-Perú, cuyas poblaciones disminuyen al norte y sur.

Los estudios de la biología reproductiva de *C. caementarius* han permitido entender los procesos de maduración gonadal, apareamiento y desove; habiéndose determinado que en los ríos de Arequipa la reproducción es fluctuante, existiendo desove todo el año pero con un máximo entre noviembre y marzo (Viacava y cols.,

1978). Una reproducción similar de la especie es observado en el río Lacramarca (9° 7' 70" S y 78° 34' 20"O) cuya temperatura del agua varía en función de la época del año. Así en verano la temperatura promedio es de 24°C y en invierno de 18°C, con un promedio anual de 21,4°C (Loayza, 2002) y en estas condiciones se lleva a cabo el desarrollo embrionario. En cuanto a este último aspecto, se ha determinado que los huevos incubados por la hembra se pierden por estrés al cautiverio (Vegas y cols., 1981), además por canibalismo, por limitación de alimento y por desprendimiento desde la masa embrionaria, ocasionando baja fecundidad, y ello conlleva a manejar una población numerosa y grandes instalaciones, así como de cuidados para evitar pérdida de hembras y embriones, situación que podría magnificarse durante un cultivo comercial.

En incubación *in vivo*, San Feliu y cols. (1976) reportan que con diferentes temperaturas (entre 12 y 21°C) se homogeniza el desarrollo de embriones portados por hembras de *Palaemon serratus*. En *C. caementarius*, los diversos datos de investigaciones realizadas (Tello, 1972; Viacava y cols., 1978; Vegas y cols., 1981) muestran una relación inversa entre temperatura y duración del desarrollo embrionario, dentro de los límites de tolerancia de la especie (8 y 28°C; Zuñiga y Ramos, 1990). Aunque Yávar y Dupré (2007) determinaron que la duración del desarrollo de embriones portados por las hembras de *C. caementarius* disminuye al aumentar la temperatura (15 a 25°C).

La incubación *in vitro* ha sido realizada con embriones extraídos de la masa ovífera de *Astacus* sp. (Arrignon, 1985) y de *Jasus frontalis* (Dupré, 1988), habiéndose determinado disminución del tiempo de incubación a medida que la temperatura aumenta. De esta manera es posible controlar el desarrollo embrionario de diferentes desoves de crustáceos, mediante manipulación de la temperatura, con la finalidad de disponer de larvas con edades homogéneas y así evitar canibalismo durante la crianza larval. Por otro lado, de ser posible la fecundación *in vitro*, la incubación es necesaria para continuar con el desarrollo pues permitirá estudiar respuestas a la salinidad (Ituarte y cols., 2005; Hangsapreurrke y cols., 2008) y a otras condiciones.

Por tanto el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la temperatura en la duración del desarrollo de embriones de *C. caementarius* incubados *in vitro*.

## **Materiales y métodos**

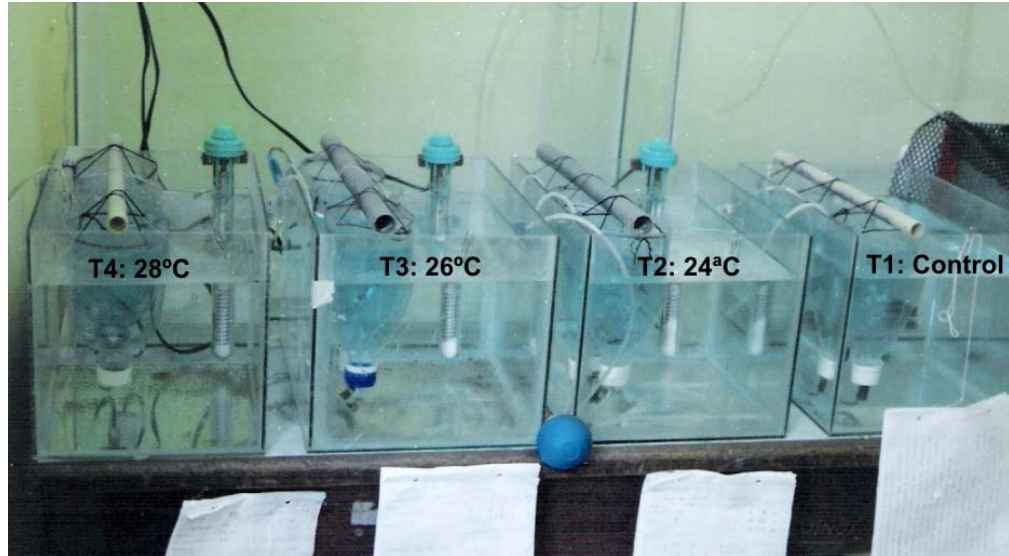
---

Se emplearon ejemplares de *C. caementarius* de  $53,2 \pm 5,2$  mm de longitud total y  $3,8 \pm 1,2$  g de peso total, capturados del río Lacramarca de la Provincia del Santa, Departamento de Ancash. Para obtener huevos recién fecundados, se juntó en un acuario a un macho en intermuda con una hembra madura próxima a la muda prenupcial. El estado de muda se determinó de acuerdo a Reyes y Luján (2003) y el estado del ovario según Viacava y cols. (1978). Después de 24 h del desove, parte de los huevos de la hembra fueron extraídos y colocados en cajas Petri con agua dulce aireada, donde fueron separados de las setas con agujas de punta roma, obteniendo solo racimos de 4 a 12 huevos y muy pocos huevos individuales, los que fueron sembrados en las incubadoras a una densidad de 500 huevos/L. La hembra con los huevos remanentes fue mantenida en otro acuario como un segundo control.

Se emplearon cuatro acuarios (tratamientos) con 12 L de agua y dentro de cada acuario se instalaron tres incubadoras (repeticiones) flotantes cilindro-cónicas de material plástico y con capacidad efectiva de 0,5 L (Figura 1). Se empleó agua potable previamente declarada por aireación durante 72 h antes de su uso. Las temperaturas del agua de cada tratamiento experimental fue 24°C, 26°C y 28°C, mantenida con

termostatos de 75W, con  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ; en cambio el agua del tratamiento control estuvo sujeta a variación ambiental y durante el experimento esta fue de  $22,1 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 1:** Disposición de los acuarios con las incubadoras y termostatos para el experimento con embriones de *C. caementarius*.



En el agua de cada incubadora se mantuvo una concentración de azul de metileno de 250 ppm. Cada incubadora tenía la entrada de aire en el fondo con flujo de 1 L/min para mantener a los embriones en suspensión. Los embriones muertos fueron retirados de las incubadoras mediante sifón. Una vez por semana se renovó el 30% de agua de cada incubadora y diariamente se agregó agua para compensar la evaporada. El oxígeno del agua se determinó con oxímetro digital ( $\pm 0,01$  mg/L) y la dureza total según Fukushima y cols. (1982).

Fueron medidos los ejes mayor (L) y menor (l) de los huevos recién y de los próximos a la eclosión ( $n=20$ ) con ocular micrométrico (EM-15x Lomo) montado en microscopio de luz convencional y con el promedio se calculó el volumen ( $\text{mm}^3$ ) aplicando la fórmula de un elipsoide ( $V=\pi \cdot L \cdot l^2/6$ ).

La regresión y correlación de los datos del tiempo de incubación de los embriones y temperatura del agua, así como el de temperatura del agua con la concentración de oxígeno se determinaron con Microsoft Excel versión 2007. Los datos fueron analizados usando Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de amplitud múltiple de Duncan (Steel y Torrie, 1988) con un nivel de significancia del 1%.

## Resultados

Los huevos recién puestos de *C. caementarius* eran de color anaranjado intenso y ligeramente ovoides con un eje mayor de  $0,655 \pm 0,050$  mm y un eje menor de  $0,512 \pm 0,034$  mm, siendo el volumen de  $0,089$   $\text{mm}^3$ . No se produjo ruptura de la cubierta embrionaria al momento de separarlos de las setas de los pleópodos de la hembra. El tamaño de los embriones próximos a la eclosión no fue estadísticamente diferente entre tratamientos, por consiguiente el promedio de los ejes mayor y menor fueron de  $0,815 \pm 0,045$  mm y  $0,625 \pm 0,041$  mm, respectivamente, con un volumen de  $0,167$   $\text{mm}^3$ .

La duración de la incubación de embriones a  $22^{\circ}\text{C}$ ,  $24^{\circ}\text{C}$ ,  $26^{\circ}\text{C}$  y  $28^{\circ}\text{C}$  fue de 24, 20, 17 y 15 días, respectivamente, existiendo diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ).

entre ellas (Tabla 1). En el caso de los embriones portados por la hembra, la duración del desarrollo fue de 23 días a  $22,1 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 1:** Duración (días) del desarrollo embrionario de *C. caementarius* a diferentes temperaturas de incubación.

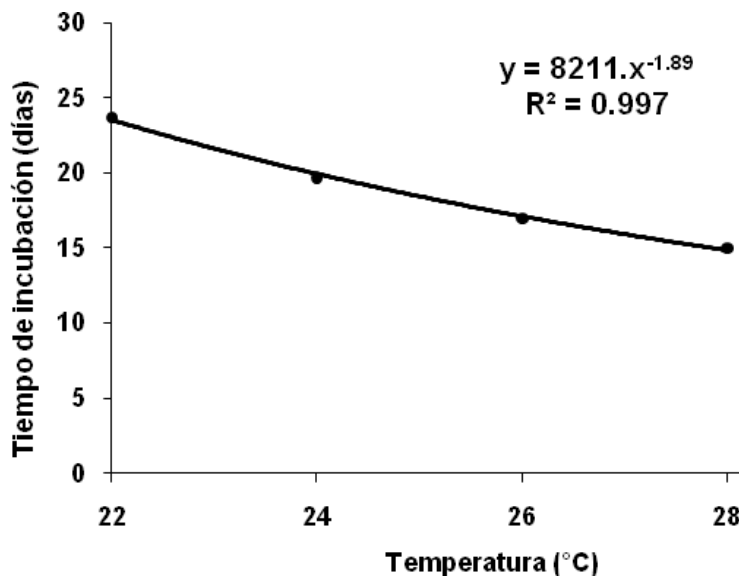
Repetición	Temperatura de incubación			
	$22,1 \pm 1,4^{\circ}\text{C}^*$	$24,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	$26,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	$28,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
r1	23	20	17	15
r2	24	20	17	15
r3	24	19	17	15
<b>Promedio**</b>	<b><math>23,7 \pm 0,6^a</math></b>	<b><math>19,7 \pm 0,6^b</math></b>	<b><math>17,0 \pm 0,0^c</math></b>	<b><math>15,0 \pm 0,0^d</math></b>

\* Tratamiento control donde la temperatura del agua estuvo sujeta a variación ambiental.

\*\*Valores promedio con diferente superíndice indica diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

La relación entre temperatura (X) y el tiempo de incubación de embriones (Y) fue inversamente proporcional ( $r = -0,998$ ) cuya ecuación de la curva resultante que más se ajustó a la dispersión de los datos fue  $Y = 8211 \cdot X^{-1,89}$ .

**Figura 2:** Tiempo de incubación de embriones de *C. caementarius* en función de la temperatura.



La duración de la eclosión de todos los embriones incubados *in vitro* y de aquellos incubados por la hembra, se produjo aproximadamente dentro de 12 h, cuyas larvas fueron observadas a la mañana siguiente; excepto los del tratamiento control que duró 24 h. El promedio de larvas obtenidas a  $22^{\circ}\text{C}$  fue de 84 larvas (33,6%), a  $24^{\circ}\text{C}$  de 83 larvas (33,2%), a  $26^{\circ}\text{C}$  eclosionaron 106 larvas (42,4%) y a  $28^{\circ}\text{C}$  solo hubo 88 larvas (35,2%); siendo diferente el número de larvas obtenidas a  $26^{\circ}\text{C}$  con los demás tratamientos.

Durante la incubación hubo sedimentación de embriones e infección con hongos que ocasionó mortalidad en todos los tratamientos; y en muy pocos casos, la mortalidad de los huevos fue sin estar infectados por hongos y en estos el vitelo tuvo aspecto licuado y de color amarillo transparente. En cambio, los embriones portados por la hembra no fueron afectados por hongos.

La concentración de oxígeno del agua de las incubadoras varió inversamente con la temperatura del agua ( $r=-0,995$ ) siendo estas en promedio de  $5,10 \pm 0,55$  mg/L a  $22^{\circ}\text{C}$ , de  $4,63 \pm 0,25$  mg/L a  $24^{\circ}\text{C}$ , de  $4,33 \pm 0,30$  mg/L a  $26^{\circ}\text{C}$  y de  $3,79 \pm 0,30$  mg/L a  $28^{\circ}\text{C}$ . La dureza total del agua fue en promedio de  $185 \pm 25$  mg/L.

## Discusión

---

El desarrollo de los embriones de *C. caementarius* incubados en el tratamiento control duró 24 días y fue similar con aquellos incubados por la hembra (23 días), lo que valida los resultados de la incubación *in vitro*. De esta manera, la temperatura del agua afectó fuertemente la duración del desarrollo de los embriones incubados *in vitro*, existiendo diferencia altamente significativa entre tratamientos.

En los tratamientos experimentales, la duración del desarrollo de los embriones de *C. caementarius* incubados *in vitro* a  $24$  y  $28^{\circ}\text{C}$  fue reducida significativamente de 20 a 15 días, respectivamente con alta correlación ( $r=-0,998$ ), lo cual indica que la temperatura afectó fuertemente a los embriones al reducir en 5 días su desarrollo. Similares efectos de la temperatura sobre los embriones en incubación *in vitro* fueron encontrados en *J. frontalis* (Dupré, 1988) y en *R. typus* (Dupré y cols., 1992). Sin embargo, nuestros resultados distan mucho de aquellos reportados por Yávar y Dupré (2007) para la misma especie procedente del río Limarí ( $30^{\circ}09' \text{ S}$ ), pero en incubación *in vivo*, cuya duración del desarrollo a  $20^{\circ}\text{C}$  fue de 30-32 días y a  $25^{\circ}\text{C}$  de 25-28 días. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la latitud donde habita la especie, como lo sucedido en copépodos (Lonsdale y Levinton, 1985) y en el cangrejo *Petrolisthes granulosus* (Hernández, 2001), cuyo tiempo de desarrollo aumentó a mayor latitud. Pero, el volumen de los huevos recién desovados ( $0,089 \text{ mm}^3$ ) que fue ligeramente mayor ( $0,083 \text{ mm}^3$ ) a lo reportado por Yávar y Dupré (2007), no se relaciona con la latitud, toda vez que diversos investigadores indican que los huevos grandes contienen una mayor energía y es una adaptación a bajas temperaturas (Wear, 1974).

Además, el empleo de temperaturas de  $26$  y  $28^{\circ}\text{C}$  con estrecha variación ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) ocasionó que el desarrollo embrionario de *C. caementarius* sea uniforme y durante corto tiempo, lo cual no concordamos con Yávar y Dupré (2007) quienes mencionan que el desarrollo embrionario en la misma especie se alteraría cuando ocurre fuera del rango de  $20-25^{\circ}\text{C}$ . Mas bien, la amplia variación de la temperatura del agua ( $22,1 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$ ) que tuvo lugar en los acuarios del tratamiento control y en donde estuvo la hembra con los huevos remanentes, aún cuando la temperatura casi llega al límite inferior del siguiente nivel ( $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), ocasionó retraso en el desarrollo de los embriones al demorar 24 días; debiendo tenerse en cuenta las grandes variaciones de la temperatura del agua cuando se requiera manipular el desarrollo para sincronizar la eclosión de embriones procedentes de diferentes progenitores o cuando se comparan resultados del desarrollo embrionario. Así, en la misma especie, Tello (1972) reporta una duración de 26 días a  $21^{\circ}-23^{\circ}\text{C}$ ; Viacava y cols. (1978) encontraron que el desarrollo dura 22 a 23 días a  $24^{\circ}\text{C}$ ; y Vegas y cols. (1981) determinaron una duración de 32 días a  $19^{\circ}\text{C}$  y de 21 días a  $27^{\circ}\text{C}$ .

En relación con el porcentaje de eclosión de embriones de *C. caementarius* no hubo diferencia significativa entre tratamientos siendo en promedio de 36,1%, lo cual indica que la temperatura no afectó la eclosión de los embriones. En cambio, significativa baja eclosión fue obtenida en incubación *in vitro* de embriones de *M. rosenbergii* a  $31^{\circ}\text{C}$  (3%) comparado con  $26^{\circ}\text{C}$  (30%) y  $28^{\circ}\text{C}$  (19%) (de Caluwé y cols., 1995). Esto sugiere que los embriones de *C. caementarius* son resistentes a las condiciones

ambientales toda vez que soportaron alta temperatura (28°C) y bajo tenor de oxígeno (3,79 ± 0,30 mg/L) durante la incubación *in vitro*. El límite termal de la especie es de 28°C (Zúñiga y Ramos, 1990) y similar es para los embriones, dado a que en ensayos previos estos fueron muy sensibles a 30°C; además, la concentración de oxígeno que estuvo estrechamente relacionada con la temperatura del agua de las incubadoras ( $r=-0,995$ ) no fue limitante para el desarrollo porque se obtuvieron larvas en todos los tratamientos, sin embargo es probable que el oxígeno no afectara a los embriones debido a que estos estaban libres o formando pequeños racimos. Fernández y cols. (2003) determinaron que la disponibilidad de oxígeno afecta el desarrollo de los embriones del centro más que los de la periferia de la masa embrionaria en *Cancer setosus* y *Homalaspis plana*.

Sin embargo, creemos que se puede incrementar la eclosión de embriones mejorando el sistema de aireación de las incubadoras para reducir la pérdida de la prole, debido a que fue observada sedimentación de embriones en todas las incubadoras que ocasionó infección con hongos y mortalidad, lo que indica además que la concentración de azul de metileno no fue adecuada para controlar la micosis. En cambio no hubo micosis en los embriones portados por la hembra, lo cual corrobora la protección que ejercen los pleópodos de la madre al liberar sustancias con propiedades antifúngicas (Fisher, 1983); y además, el movimiento vigoroso de los pleópodos de la hembra *C. caementarius* facilita la eclosión de embriones y la dispersión de larvas, como ha sido reportado previamente (Vegas y cols., 1981; Cavero y Mogollón, 2000), de ahí que hubo adelanto de un día en la eclosión de los embriones incubados por la hembra en relación con los incubados en el tratamiento control y a la misma temperatura (22,1 ± 1,4°C). Arrignon (1985) considera que si la temperatura y el oxígeno son óptimos y la protección contra las micosis esté prevista y sea eficaz, la incubación *in vitro*, de embriones de *Astacus* sp, permite obtener tres a cinco veces más larvas que una incubación natural.

## Bibliografía

- Amaya, J. y A. Guerra. (1976). *Especies de camarones de los ríos norteños del Perú y su distribución*. Ministerio de Pesquería. Dirección General Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Lima. Perú. 29 pp.
- Arrignon, J. (1985). *Cría del cangrejo de río*. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 201 pp.
- Cavero, J. y V. Mogollón. (2000). Evaluación de la fertilidad del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) madurado bajo condiciones de laboratorio. *Wiñay Yachay*, 4(2): 7-16
- Dupré, E. (1988). Desarrollo embrionario de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis* (Decapoda, Macrura, Palinuridae). *Invest. Mar., Valparaíso*, 16: 49-62
- Dupré, E., G. Bellolio y K. Lohrmann. (1992). Desarrollo embrionario del camarón roca (*Rhynchocinetes typus*, H. Milne Edwards, 1837) en condiciones de laboratorio. *Revista Chilena de Historia Natural*, 65: 435-442
- Fisher, W.S. (1983). Eggs of *Palaemon macrodactylus*: III. Infection by the fungus, *Lagenidium callinectes*. *Biol. Bull.*, 164: 214-226
- Fukushima, M., G. Sifuentes, G. Saldaña, G. Castillo, J. Reyes y L. Shimokawa. (1982). *Métodos limnológicos*. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. 188 pp.
- Hangsapreurke, K., T. Thamrongnawasawat, S. Powtongsook, P. Tabthipwon, P. Lumubol y B. Pratoomchat. (2008). Embryonic development, hatching, mineral consumption, and survival of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) reared in artificial seawater in closed recirculating water system at different levels of salinity. *Mj. Int. J. Sci. Tech.* 2(03), 471-482
- Hernández, P. (2001). Producción y rendimiento reproductivo en *Petrolisthes granulatus* (Decapoda, Anomura, Porcellanidae) en diferentes localidades del norte de Chile: Una comparación latitudinal. *Invest. Mar., Valparaíso*, 29(1): 73-81

10. Ituarte R.B., E.D. Spivak y K. Anger. (2005). Effects of salinity on embryonic development of *Palaemonetes argentines* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) culture *in vitro*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 47(3): 213-223
11. Jara, C.G. (1997). Antecedentes sobre el desarrollo de la carcinología en Chile. *Invest. Mar., Valparaíso* 25: 245-254
12. Loayza, R.E. (2002). *Diagnóstico del humedal de "Villa María"*. Instituto Ambientalista Natura, Chimbote, Ancash, Perú. 218 pp.
13. Lonsdale, D.J. y J.S. Levinton. (1985). Latitudinal differentiation in embryonic duration, egg size and newborn survival in a Harpacticoid copepod. *Biol. Bull.* 168: 419-431
14. Reyes, W.E y H. Luján. (2003). Estados y subestados del ciclo de muda del camarón de río (*Cryphiops caementarius* Molina, 1872) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) en laboratorio. En: *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*. P.: 808-817. Disponible en URL: <http://www.civa2003.org>
15. San Feliu, J.M. F. Muñoz, F. Amat, J. Ramos, J. Peña y A. Sanz. (1976). Cultivo experimental de larvas de crustáceos y peces en tanques. *Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq.*, 36: 3-41
16. Steel, R.G. y J.H. Torrie. (1988). *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2da. Edic. Mc Graw-Hill, Interamericana de México, S.A. 132-183
17. Tello, E. (1972). Anotaciones sobre el camarón. *Documenta*, 18:5-9
18. Vegas, M., L. Ruiz, A. Vega y S. Sánchez. 1981. El camarón *Cryphiops caementarius* (Palaemonidae): desarrollo embriológico, contenido estomacal y reproducción controlada: primeros resultados. *Rev. Lat. Acuí.*, 9: 11-23
19. Viacava, M., R. Aitken y J. Llanos. (1978). Estudio del camarón de río en el Perú 1975-1976. *Bol. Inst. Mar Perú*, 3(5): 161-232
20. Wear, R.G. (1974). Incubation in british decapod crustacean, and the effect of temperature on the rate and success of embryonic development. *Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom*, 54: 745-762
21. Yávar, C. y E. Dupré. (2007). Desarrollo embrionario del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae) en condiciones de laboratorio. *Rev. Biol. Trop.* 55 (Suppl. 1): 15-24
22. Yépez, V. y R. Bandín. (1998). Evaluación del recurso camarón de río *Cryphiops caementarius* en los ríos Ocoña, Majes-Camaná y Tambo, Octubre 1997. *Inf. Prog. Inst. Mar Perú*, 77: 3-21
23. Zúñiga, O y R. Ramos. (1990). Tasa respiratoria de *Cryphiops caementarius*: explicación de la migración juvenil. *Biología Pesquera*, 19: 19-25