

Short Communication

Determinación del voltaje y el tamaño del animal óptimos para la extracción de espermatozoides en el camarón de agua dulce *Macrobrachium acanthurus*

Tiago Viana da Costa¹, Lidia Miyako Yoshii-Oshiro², Laura Susana López-Greco³
Emanuela Paula Melo², Luciana Antunes de Mattos² & Andrea Bambozzi-Fernandes²

¹Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia

Universidade Federal do Amazonas, Parintins-AM, 9.152-240, Brasil

²Estação de Biologia Marinha, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Mangaratiba-RJ, 23.860-020, Brasil

³Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN e IBBEA, CONICET-UBA
Universidad de Buenos Aires, Argentina

Corresponding author: Tiago Viana da Costa (tvianadacosta@yahoo.com.br)

RESUMEN. Hasta el momento los estudios sobre reproducción en *Macrobrachium acanthurus* están poco avanzados siendo importantes si se prevé la posibilidad de su cultivo. El objetivo de este trabajo fue identificar el voltaje más adecuado para la extracción de los espermatozoides y la menor talla con que estos langostinos los producen, como paso previo a desarrollar técnicas de fecundación *in vitro*. Se utilizaron voltajes de 4,5 y 6,0 voltios, realizándose el conteo de los espermatozoides en base a la supervivencia espermática en frotis coloreados con eosina-nigrosina. En el estudio de las tallas, los langostinos fueron separados en intervalos de clases y analizados en cuanto a la producción de espermatozoides y la supervivencia espermática. El mejor voltaje para la extracción del material seminal debido a menores mortalidades fue 6,0 voltios, a partir de 5 g de peso corporal y 18 mm de longitud de caparazón, cuando los langostinos pueden ser utilizados para la extracción de espermatozoides.

Palabras clave: *Macrobrachium acanthurus*, Caridea, espermatozoides, reproducción, supervivencia espermática.

Determination of adequate voltage and animal size for the extraction of spermatozoa in the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus*

ABSTRACT. So far *Macrobrachium acanthurus* reproduction studies are poorly advanced being important if there is the possibility of cultivation. The aim of this study was to identify the most suitable voltage for the extraction of spermatozoa and the smaller size at which these prawns produce them, as a prior step to develop *in vitro* fertilization techniques. Voltages of 4.5 and 6.0 were used, performing sperm count based on survival of sperm smears, colored with eosin-nigrosine. In the study of size, prawns were separated into class intervals and analyzed for production of spermatozoa and sperm survival. The best voltage for the extraction of seminal material due to lower mortality was 6.0 volts and from 5 g of body weight, and 18 mm of length prawns could be used for the extraction of spermatozoa.

Keywords: *Macrobrachium acanthurus*, Caridea, sperm, reproduction, sperm survival.

Macrobrachium acanthurus (Wiegmann, 1836) es un langostino de agua dulce, que se distribuye en el continente americano y en Brasil se encuentra desde Pará (0°6'0.99"S, 50°4'1.77"W) hasta Rio Grande do Sul (33°45'24.71"S, 53°22'6.63"W). Es un camarón de gran potencial para el cultivo, dado que la mayor cantidad de los animales comercializados provienen de

la pesca extractiva, lo que ha contribuido a una reducción drástica de las reservas naturales, junto con los cambios ambientales causados por el hombre (Coelho *et al.*, 1982; Valenti *et al.*, 1989).

Los machos de *M. acanthurus* tienen un sistema reproductivo que consiste en testículos, conductos deferentes, ampolla terminal y glándulas androgénicas

(Carvalho, 1980) y de acuerdo a Díaz *et al.* (2002a), la ampolla terminal está muscularizada y al contraerse produce la expulsión de los espermátóforos. La adquisición del material genético se puede hacer mediante la disección de machos congelados, estimulación eléctrica o compresión abdominal. De acuerdo con Goldberg (1998), aunque la disección de los machos congelados parezca ser menos práctico que la estimulación eléctrica, permite el uso de toda la longitud de los conductos deferentes, proporcionando mayor volumen de semen para la inseminación artificial, mediante el uso de sus fragmentos. El método de extracción del espermátóforo, sea por electroestimulación o compresión abdominal puede influir en la producción y calidad del espermato, permitiendo la reutilización del reproductor. La técnica de electroestimulación se ha convertido en la más extendida, ya que es más rápida y proporciona el espermátóforo, similar a como ocurre la fecundación en la naturaleza, siendo una técnica utilizada por primera vez en *M. rosenbergii* De Man, 1879 (Sandifer & Lynn, 1980).

Estudios que evaluaron la relación entre la talla y cantidad de espermatozoides se han restringido principalmente a especies marinas de camarones, según lo informado por Alfaro-Montoya (1993) para *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874); Pratoomchat *et al.* (1993) para *Penaeus monodon* Fabricius, 1798; Díaz *et al.* (2001) para *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) y Ceballos-Vázquez *et al.* (2003, 2010) para *L. vannamei* (Boone, 1931).

Los objetivos de este trabajo fueron determinar el voltaje más apropiado para la extracción de espermátóforos de *M. acanthurus*, mediante la evaluación de su capacidad de regeneración y mantenimiento del potencial reproductivo masculino, y la talla con que estos animales comienzan su participación efectiva en la reproducción.

Los machos de *M. acanthurus* fueron capturados en los meses de verano de 2011 a 2013 en el río Sahy (22°56'S, 44°01'W) y conducidos vivos a la Estación de Biología Marina de la Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Todos los animales fueron capturados haciendo uso de redes de inmersión en una zona de cascadas, con acentuado flujo de agua, numerosas rocas y vegetación marginal.

Para la evaluación del voltaje para extracción de los espermátóforos, un total de 14 langostinos fueron dispuestos individualmente en acuarios de 42 L, equipados con arena como sustrato, vegetación, refugios artificiales y aireación constante. La renovación de agua se realizó cada tres días, midiéndose la temperatura, amoníaco y nitrito cada dos días, con un equipo multiparamétrico. El suministro de comida fue diario y constó de músculo de pescado/camarón marino y ración

para reproductores de camarones marinos (50% de proteína cruda y 10% de grasa) en la proporción de 1:1 sobre la base de 10% del peso corporal. Se midió la longitud total (LT) y del caparazón (LC) y ancho máximo del caparazón (AC). Los ejemplares fueron distribuidos por igual y al azar en dos tratamientos, siete animales por tratamiento, correspondientes a los voltajes de 4,5 y 6,0 voltios (V).

Durante las pruebas de estimulación eléctrica, los animales se colocaron en un estereomicroscopio con la región ventral hacia arriba, con los cables del electrodo en contacto al gonoporo del macho en la base del quinto par de pereiópodos. Al ocurrir las contracciones musculares se obtuvo la completa o parcial expulsión de los espermátóforos almacenados en la porción terminal de los conductos deferentes. La expulsión parcial fue caracterizada cuando se obtuvo sólo un espermátóforo. En el momento en que ocurría la expulsión simultánea de los espermátóforos de los vasos deferentes, izquierdo y derecho, y en consecuencia la unión de los dos por su alta adherencia, se separaron de manera que constituyesen cada uno una unidad experimental. La supervivencia media de los espermatozoides obtenida se utilizó para integrar el conteo promedio de cada tensión. Cada espermátóforo fue almacenado en un microtubo de plástico de 2 mL conteniendo 0,5 mL de agua destilada. Se maceró para obtener la completa liberación del contenido y la homogeneización del material con el medio de dilución, formando una solución espermática. La supervivencia espermática, fue analizada de acuerdo a Bambozzi *et al.* (2014) y las células muertas se tiñeron con eosina y quedaron oscuras, mientras que las células vivas no presentaron tinción.

La estimulación eléctrica se realizó cada 15 días totalizando cuatro estimulaciones, observando la capacidad de regeneración del espermátóforo en cautiverio. Por lo tanto, solamente la primera electroestimulación contenía espermátóforos producidos en la naturaleza y cada animal se sometió a la estimulación solo en periodo de intermuda. Para verificar las diferencias estadísticas entre los voltajes estudiados, se aplicó el test de Shapiro-Wilk para observación de la normalidad de los datos. Como los datos no se ajustaron a normalidad, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$) para probar la diferencia entre los porcentajes medios de supervivencia, y para determinar la diferencia entre la supervivencia de los espermatozoides de las mitades izquierda y derecha. Para determinar la existencia de diferencias entre los periodos de muestreo de espermátóforos se utilizó el test de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

Para los testes del efecto del tamaño corporal sobre la producción de espermátóforos, se utilizaron 204

machos obtenidos de diciembre 2012 a febrero 2013. A partir de los resultados del primer experimento, se eligió el mejor voltaje para la extracción de los espermátóforos en el segundo experimento. Los espermátóforos fueron pesados individualmente en balanza analítica, con precisión de 0,1 mg. Para los efectos de los análisis en este experimento, los animales se estimularon eléctricamente una sola vez, teniendo en cuenta de este modo sólo los espermátóforos producidos en el ambiente natural. Los langostinos se separaron en intervalos de clase donde se registró la presencia o ausencia de espermátóforos y en caso de presencia, si el macho presentaba uno o dos. Se aplicó el test de chi-cuadrado (χ^2), con un nivel de significación 5% para verificar una posible diferencia en la producción de espermátóforos. Para determinar el tamaño y peso en que el 50% ($LC_{50\%}$ o $P_{50\%}$) de los machos se encontraron sexualmente maduros y produjeron al menos un espermátóforo, se utilizó el programa Solver, del Excel 2010. También se realizó una correlación de Pearson ($\alpha = 0,05$) entre el peso medio de espermátóforos, obtenida promediando el peso de cada espermátóforo de un animal en particular, con la LC, LT y peso de los langostinos.

La temperatura media del agua durante el periodo experimental fue $23,7 \pm 1,22^\circ\text{C}$. Los niveles de amoníaco y nitrito fueron $1,28 \pm 0,56$ ppm y $1,44 \pm 1,62$ ppm, respectivamente. Para los periodos de extracciones, 25 espermátóforos se obtuvieron para el grupo de langostinos estimulados eléctricamente con 4,5 V y 29 para aquellos estimulados con 6,0 V. Aunque el 100% de los langostinos produjeron espermátóforos, la diferencia en su cantidad se debió a que en cada estimulación eléctrica, los animales tenían una expulsión completa o parcial de espermátóforos, sin un patrón definido. Se detectaron casos en que los langostinos que tenían una extracción completa (dos espermátóforos) en una etapa determinada de la electroestimulación, en otra presentaba sólo extracción parcial (un espermátóforo) o vice-versa. Para 4,5 V, en 9 oportunidades de extracción se produjeron los dos espermátóforos y para 6,0 V en 11 ocasiones. No se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los voltajes ensayados, entre las mitades izquierda y derecha (Tabla 1), ni en la supervivencia espermática entre las diferentes extracciones (Fig. 1). La mortalidad de los langostinos se observó cerca del final del período experimental.

Para el test del efecto del tamaño corporal sobre la producción de espermátóforos, del total de langostinos, 84,3% produjeron espermátóforos, con un peso promedio de $0,84 \pm 0,47$ mg que variaron entre 0,1 y 2,1 mg. La media de LT de los machos de *M. acanthurus* fue $78,37 \pm 14,18$ mm, y el promedio de LC

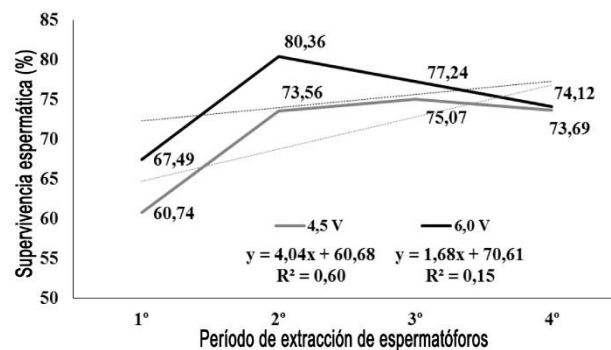


Figura 1. Porcentaje de supervivencia espermática en el tiempo para ambos voltajes ensayados en *Macrobrachium acanthurus*.

fue $24,54 \pm 3,98$ mm y un peso promedio de $10,63 \pm 4,70$ g. Se observó la presencia de espermatozoides en el 100% de los espermátóforos de los langostinos.

La producción de espermátóforos en relación con el peso de los langostinos mostró que los machos con peso corporal igual o mayor a 2 g lo tenían, pero los produjeron en menor proporción (33,3%) que aquellos con pesos mayores a 5 g (88,7%). De estos últimos, en el 61,7% de los casos se obtuvieron dos espermátóforos, mientras que en la primera clase de peso, el 100% de los animales que produjeron espermátóforos, solo presentaron uno solo (Fig. 2a). Estos resultados corroboran los obtenidos mediante las análisis en el Solver, que mostró $P_{50\%} = 5,78$ g. En la Fig. 2b, se observa que la producción de espermátóforos se correlaciona con el LC, detectables a partir de los 16 mm. A partir de la clase de 19 mm la mayoría de los animales (81,4%) presentaron dos espermátóforos (68,6%). Los análisis en el Solver determinaron una $LC_{50\%} = 18,87$ mm. La correlación entre el peso de los espermátóforos y el peso de los langostinos y la LC (Figs. 3a-3b) presentó un bajo valor ($P > 0,05$), verificándose que los langostinos grandes no necesariamente producen espermátóforos más pesados.

Las condiciones ambientales a que los machos están expuestos pueden interferir directamente en la producción de espermátóforos. Según Browdy (1992), en condiciones naturales los factores ambientales determinan la existencia de periodos reproductivos definidos, estimulando o inhibiendo el proceso de reproducción de una especie en particular, ya que la maduración gonadal está bajo el control hormonal, que a su vez es controlada por factores ambientales (Ogle, 1992). La temperatura media del agua en este estudio estuvo dentro del rango considerado normal ($25-30^\circ\text{C}$) para la alimentación y locomoción de *M. acanthurus* (Bernardi, 1990). Díaz *et al.* (2002b) mencionaron que esta especie presenta una amplia tolerancia térmica, lo

Tabla 1. Datos biométricos de *Macrobrachium acanthurus*, supervivencia espermática y mortalidad después de las cuatro electroestimulaciones. *Promedios con la misma letra no difieren significativamente.

	4,5 V	6,0 V
Longitud total - LT (mm)	87,50 ± 14,33 ^a	88,71 ± 15,89 ^a
Longitud del caparazón - LC (mm)	24,28 ± 5,27 ^a	25,11 ± 5,42 ^a
Ancho del caparazón - AC (mm)	14,42 ± 2,89 ^a	15,56 ± 3,41 ^a
Supervivencia espermática promedio (%)	69,68 ± 15,41 ^a	68,71 ± 16,44 ^a
Supervivencia espermática de la mitad derecha (%)	65,16 ± 17,53 ^a	72,10 ± 17,05 ^a
Supervivencia espermática de la mitad izquierda (%)	73,17 ± 11,44 ^a	65,55 ± 15,77 ^a
Mortalidad (%)	71,4 ^a	42,9 ^b

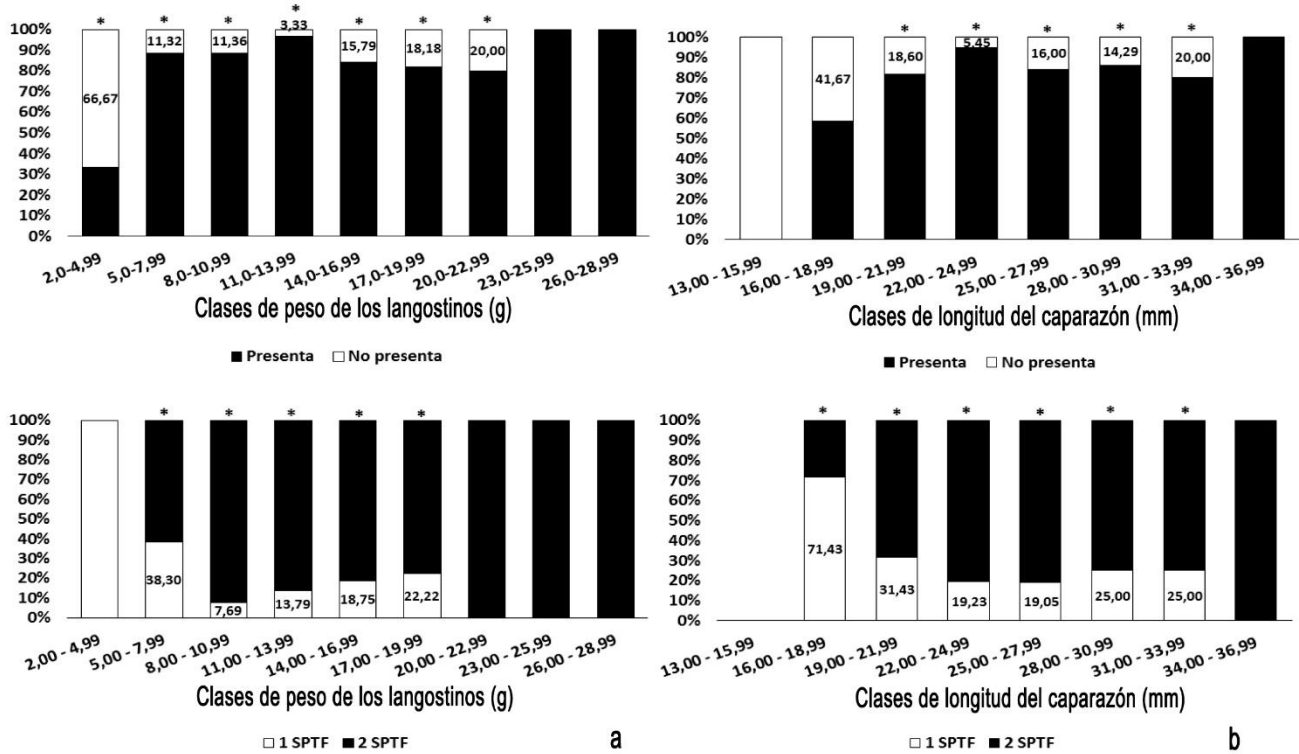


Figura 2. a) Distribución de las categorías de peso y b) longitud del caparazón de *Macrobrachium acanthurus* en relación al porcentaje de langostinos y presencia o ausencia de espermatozoides y en el caso de presencia, si presenta uno o dos espermatozoides (SPTF).

que indica su capacidad de adaptación a las diferentes regiones. Los niveles de amoníaco y nitrito corroboran los reportados por Alves *et al.* (1981) para el cultivo de *Macrobrachium*.

Con respecto al período de extracción, Alfaro-Montoya (2010) menciona que en peneidos, la renovación del espermatozoides puede estar relacionada con el ciclo de ecdisis, y se produce cíclicamente hasta cada dos semanas, de acuerdo con la talla del macho, la cópula o la melanización del espermatozoides. Sin embargo, los machos de *M. acanthurus* en este estudio produjeron espermatozoides independiente de la ecdisis.

En 12 ocasiones, los langostinos mudaron después de la estimulación eléctrica y en 8 de las cuales se observaron en el grupo de 4,5 V. Sin embargo, los animales que se sometieron a ecdisis, así como los que no hicieron mudas, produjeron espermatozoides. Sabiendo que la electroestimulación produce el espermatozoides tal como ocurre durante la fertilización en la naturaleza (Sandifer & Lynn, 1980), este puede haber sido el estímulo para la producción de nuevo material.

La mayoría de las pruebas de electroestimulación llevó a la extrusión de dos espermatozoides, lo que difie-

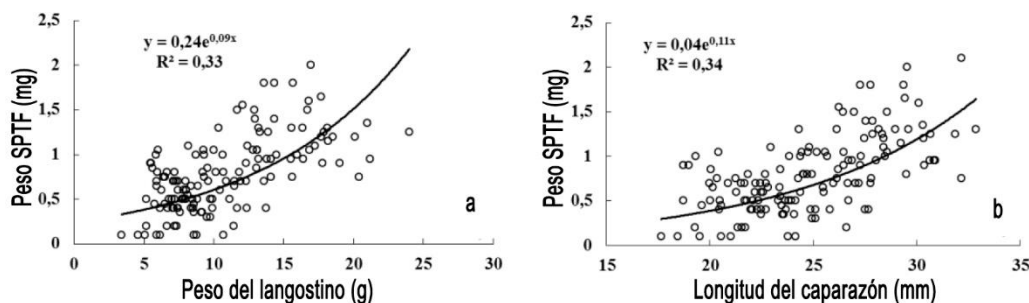


Figura 3. a) Relación entre peso y b) longitud del caparazón de *Macrobrachium acanthurus* en función del peso del espermátóforo (SPTF).

re de lo señalado por Goldberg & Oshiro (2000) para *M. rosenbergii*, utilizando 9,0 V. Los autores también mencionan que el confinamiento de los machos puede conducir a una disminución de la calidad del material genético. En el presente trabajo el uso de animales salvajes permitió extracciones repetidas de espermátóforos, sin pérdida en el porcentaje de espermatozoides viables durante 60 días. Para *M. rosenbergii*, Baskar *et al.* (2004) mencionan la posibilidad de reutilización del macho para una nueva extracción después de 24 h y Harris & Sandifer (1986) obtuvieron entre 81 y 100% de espermátóforos sometidos a diferentes repeticiones de estímulos de 4,0 V durante 29 días. Estos autores, aunque no se observó una disminución en la tasa de fertilización de las hembras, encontraron una disminución significativa en el volumen eyaculado, llegando a la conclusión que, a largo plazo, puede ser un factor limitante para eventuales inseminaciones.

Sandifer & Smith (1979) y Sandifer & Lynn (1980) obtuvieron inseminación exitosa en hembras de *M. rosenbergii* con el uso de fragmentos de la eyaculación. Dado que no existen estudios sobre la cantidad mínima de espermatozoides necesarios para la inseminación de una hembra, y teniendo en cuenta que no hay diferencia entre la producción espermática entre las mitades derecha e izquierda, como también fue observado por Ceballos-Vázquez (2003) para *L. vannamei* en condiciones de cautiverio, la obtención de los espermátóforos en un proceso de electroestimulación puede generar un gran número de hembras inseminadas.

El creciente interés en la producción de camarón en cautiverio para su reproducción se ha incrementado en todo el mundo. Sin embargo, el desempeño reproductivo de un macho puede ser considerado como uno de los principales inconvenientes de la carcinicultura, tanto en las especies marinas como de agua dulce, siendo necesario una mejor comprensión de la capacidad reproductora del macho, asociado a la

calidad espermática en condiciones de cautiverio (Díaz *et al.*, 2001; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003; Alfaro-Montoya, 2010).

La determinación de la talla de primera madurez sexual ($L_{50\%}$) es fundamental para la utilización sustentable de los recursos pesqueros, apoyando medidas de ordenamiento pesquero de la especie en el área estudiada (Fonteles-Filho, 2011). Freire *et al.* (2012) determinaron el $LC_{50\%}$ para machos de *M. amazonicum* capturados en la región noreste del estado de Pará/Brasil, en 12,3 mm. Para esta misma especie, Hayd & Anger (2013) consideraron un LC de 2,5 mm como el tamaño de inicio de la madurez sexual. Cavalcante (2012) determinó un $CC_{50\%}$ de 8,85 mm para machos de *M. surinamicum* y Mantelatto & Barbosa (2005), a partir de datos de crecimiento relativo, indicaron que la madurez sexual de *M. brasiliense* (Heller, 1862) fue entre 9 y 10 mm LC.

Según Anger & Moreira (1998), el tamaño con que una población inicia la madurez sexual es esencial para determinar el tiempo de vida de una especie. Estos autores también mencionan que el tamaño más pequeño con que los machos exhiben el apéndice masculino no refleja necesariamente el inicio de la madurez sexual, siendo sólo un parámetro para la separación de sexos en los estudios de estructura de la población. Ogle (1992) indica que no está totalmente claro si la madurez del macho está relacionada con su edad/talla, aunque algunos estudios indiquen que los animales mayores producen significativamente más espermatozoides (Alfaro-Montoya, 1993; Pratoomchat *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 2001). Sin embargo, Ceballos-Vázquez *et al.* (2010) mencionaron que la edad de los langostinos está estrechamente relacionada con el tamaño y, por lo tanto, el peso es uno de los principales criterios utilizados para la selección de reproductores, excepto en el caso de animales salvajes, cuando el tamaño es ampliamente utilizado para seleccionar reproductores ya que la edad es desconocida.

Los resultados obtenidos tampoco están de acuerdo con lo señalado por Ceballos-Vázquez *et al.* (2003) para *L. vannamei* en cuanto a la existencia de correlación positiva significativa ($r = 0,9$) entre el peso del cuerpo y de los espermatóforos. Estos mismos autores también concluyen que la mera presencia de espermatóforos no es un buen criterio para la selección de machos para fines de reproducción, y es mejor relacionado con la edad del animal. Pratoomchat *et al.* (1993) también reportaron una correlación positiva significativa ($r = 0,73$) entre el peso del espermatóforo y de los camarones *P. monodon*, siendo este mismo resultado señalado por Díaz *et al.* (2001) para *P. muelleri* ($r = 0,99$).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos aquellos que contribuyeron para realización de este trabajo y la Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por el financiamiento del proyecto de doctorado.

REFERENCIAS

- Alfaro-Montoya, J. 1993. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. J. World Aquacult. Soc., 24: 6-11.
- Alfaro-Montoya, J. 2010. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): a review. Aquaculture, 300: 1-9.
- Alves, P.C., M.P. Ramos & M.A. Suarez. 1981. Cultivo de camarões do gênero *Macrobrachium* Bate (Palaemonidae) do Brasil. Bol. Tec., 86: 66 pp.
- Anger, K. & G.S. Moreira. 1998. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. J. Crustacean Biol., 18: 823-838.
- Bambozzi, A., L.A. de Mattos, M.R.B. de Mello & L.M.Y. Oshiro. 2014. Criopreservação do espermatóforo e da massa espermiática do camarão branco *Litopenaeus schmitti* post-mortem. Bol. Inst. Pesca, 40: 49-60.
- Baskar, N.V., S. Mariappan, A. Surendraraj & V.K. Venkataramani. 2004. Broodstock development in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* by artificial insemination. Indian J. Fish., 51: 517-520.
- Bernardi, N. 1990. Temperature influence upon food ingestion and spontaneous locomotion of the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). J. Therm. Biol., 15: 33-36.
- Browdy, C.L. 1992. A review of reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: J. Wyban (ed.). Proceedings of the special session on shrimp farming. J. World Aquacult. Soc., Baton Rouge, LA, pp. 22-51.
- Carvalho, H.A. 1980. Morfologia do aparelho reprodutor de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1863) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). Parte I. Masculino. Ciênc. Cultura, 32: 73-79.
- Cavalcante, D.V. 2012. Biología e ecología do camarão dulcícola *Macrobrachium surinamicum* Holthuis, 1948 (Decapoda: Palaemonidae) no estuário Guajará, Pará, costa norte do Brasil. Tesis de Ecología Acuática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, 102 pp.
- Ceballos-Vázquez, B.P., C. Rosas & I.S. Racotta. 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 228: 141-151.
- Ceballos-Vázquez, B.P., E. Palacios, J. Aguilar-Villavicencio & I.S. Racotta. 2010. Gonadal development in male and female domesticated whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in relation to age and weight. Aquaculture, 308: 116-123.
- Coelho, P.A., M.R. Porto & C.M.A. Soares. 1982. Biología e cultivo de camarões de água doce. Universidad Federal de Pernambuco, Serie Aquicultura, 1: 58 pp.
- Díaz, A.C., A.V. Fernandez-Gimenez, N.S. Harán & J.P. Fenucci. 2001. Reproductive performance of male Argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea) in culture conditions. J. World Aquacult. Soc., 32: 236-242.
- Díaz, A.C., A.V. Fernandez-Gimenez, A.M. Petriella & J.P. Fenucci. 2002a. Morphological and functional study of the male reproductive tract in the shrimp *P. muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea). Invertebr. Reprod. Develop., 42: 69-74.
- Díaz, F., E. Sierra, A.D. Re & L. Rodríguez. 2002b. Behavioral thermoregulation and critical thermal limits of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann). J. Therm. Biol., 27: 423-428.
- Fonteles-Filho, A.A. 2011. Oceanografía, biología e dinâmica populacional de recursos pesqueiros. Expressão gráfica, Fortaleza, 464 pp.
- Freire, J.L., C.B. Marques & B.B. Silva. 2012. Estrutura populacional e biología reprodutiva do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) em um estuário da região nordeste do Pará, Brasil. Braz. J. Aquat. Sci. Technol., 16: 65-76.
- Goldberg, R.S. 1998. Comparação da eficiência da eletroejaculação entre tipos morfológicos de macho e manejos de criopreservação espermiática do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. Tesis de Ciências, Universidade Federal Rural do Rio Janeiro, Seropédica, 41 pp.

- Goldberg, R.S. & L.M.Y. Oshiro. 2000. Eficiência da eletroejaculação de morfotipos machos do camarão-de-água-doce *M. rosenbergii*. Rev. Bras. Zootec., 29: 1-5.
- Harris, S.E.G. & P.A. Sandifer. 1986. Sperm production and the effects of the electrically induced spermatophore expulsion in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). J. Crustac. Biol., 6: 633-647.
- Hayd, L. & K. Anger. 2013. Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. Rev. Biol. Trop., 61: 39-57.
- Mantelatto, F.L.M. & L.R. Barbosa. 2005. Population structure and relative growth of freshwater prawn *Macrobrachium brasiliense* (Decapoda, Palaemonidae) from São Paulo State, Brazil. Acta Limnol. Bras., 17: 245-255.
- Ogle, J.T. 1992. A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. Invertebr. Reprod. Develop., 22: 267-274.
- Pratoomchat, B., S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta & A.W. Fast. 1993. Sperm quality of pond-reared and wild caught *Penaeus monodon* in Thailand. J. World Aquaculture Soc., 24: 530-540.
- Sandifer, P.A. & T.I.J. Smith. 1979. A method for artificial insemination of *Macrobrachium* prawns and its potential use in inheritance and hybridization studies. J. World Aquacult. Soc., 10: 403-418.
- Sandifer, P.A. & J.W. Lynn. 1980. Artificial insemination of caridean shrimp. In: W.H. Clark Jr. & T.S. Adams (eds.). Advances in invertebrate reproduction. Elsevier, North Holland, pp. 271-288.
- Valenti, W.C., J.T.C. Mello & V.L. Lobão. 1989. Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do rio ribeira do Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). Rev. Bras. Zool., 6: 9-15.

Received: 17 July 2014; Accepted: 9 March 2016